

Tesis de Posgrado

Caracterización biofísica del movimiento de agua e iones en el intestino grueso de los mamíferos

del Valle Escobar, Elsa

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

del Valle Escobar, Elsa. (1991). Caracterización biofísica del movimiento de agua e iones en el intestino grueso de los mamíferos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2421_DelValleEscobar.pdf

Cita tipo Chicago:

del Valle Escobar, Elsa. "Caracterización biofísica del movimiento de agua e iones en el intestino grueso de los mamíferos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2421_DelValleEscobar.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

Título del trabajo:

CARACTERIZACION BIOFISICA DEL MOVIMIENTO DE AGUA E
IONES EN EL INTESTINO GRUESO DE LOS MAMIFEROS

Autora: Elsa del Valle Escobar

Director de tesis: Dr Mario N. Parisi

Consejero de tesis: Dr. Juan Miguel Castagnino

*Tesis
2421
y.2*

RESUMEN

El flujo neto de agua es registrado minuto a minuto en el ciego de rata control y adaptada a una dieta rica en potasio; en el colon humano y en monocapas de líneas celulares HT29 y CaCo2. Este flujo de agua es correlacionado con la diferencia de potencial, la corriente de cortocircuito y los flujos unidireccionales de Na^+ , Cl^- y Rb^+ con los siguientes resultados: 1) Existe en todos estos epitelios un flujo neto de agua absorptivo que es función lineal de los gradientes osmóticos o hidráulicos aplicados. La diferencia de potencial es positiva con una resistencia de aproximadamente de $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$, valores típicos de epitelios abiertos. 2) Una fracción del flujo neto observado en condiciones basales está asociado al transporte de iones y es Na^+ dependiente. 3) La presencia de un gradiente osmótico transepitelial induce un potencial de difusión positivo en el ciego de rata control, no ocurriendo lo mismo con un gradiente de presión hidrostática. 4) Otros mecanismos de transporte se distinguen en el ciego de rata cuando estas son alimentadas por 12 días con dieta incrementada en su concentración en KCl. 5) El ciego de rata es en este caso sensible al amiloride debido a la adaptación al potasio, no observándose este efecto en animales controles. 6) La absorción de agua en el colon humano es

dependiente de Na^+ y Cl^- , siendo afectada por AMPc y norepinefrina. 7) En el colon humano existen epitelios espontáneamente secretorios; en ellos podría estar incrementada la concentración de AMPc intracelular. La norepinefrina $1 \cdot 10^{-6}$ M, incrementa la absorción de agua, probablemente por inhibición del componente secretor del flujo de agua. 8) En monocapas celulares diferenciadas (CaCo_2), existe un flujo neto asociado a transporte secretor que se correlaciona estrechamente con flujos netos secretorios de Na^+ y Cl^- . 9) En las células CaCo_2 , también se observó un transporte diferencial de manitol y glucosa a 37°C ; este último 100 veces mayor es sensible al amiloride. 10) Las monocapas epiteliales de CaCo_2 y HT29, en ausencia de Ca^{++} ven incrementado su flujo neto de agua hasta 10 veces, mientras que la resistencia transepitelial es no significativamente distinta de cero. Se observa por criofractura que en esta condición las bandas de las uniones estrechas están desorganizadas.

Para su mejor comprensión esta tesis ha sido dividida en capítulos y en cada uno de ellos se muestran los resultados encontrados en cada línea experimental, dando a continuación una discusión detallada de estos. En el último capítulo, Conclusiones generales, se dan modelos hipotéticos que surgen de reunir estos datos y los de la literatura para proponer posibles mecanismos para el movimiento de agua e iones en el intestino grueso.

Esta experimentación fue realizada en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina, UBA, bajo la dirección del Dr. Mario Parisi, a quien quiero agradecer muy especialmente por su excelente disposición en todo momento para la discusión de las ideas y el análisis de los resultados y por sobre todo enseñarme un riguroso desarrollo de las ideas y del método científico. Cabe asimismo el agradecimiento a su entereza y comprensión en los difíciles momentos transcurridos en el período de realización de este trabajo.

Parte de esta tesis fue realizada en Francia, en el Instituto Pasteur (Paris) y en Le Centre D'Etudes Nuclaires de Saclay (Saclay). Es por ello que quiero agradecer a los Dres. Jacques Bourguet, Pierre Ripoche y Daniel Louvard, quienes gentilmente dispusieron lo necesario para la realización de la experimentación en cultivos celulares y también por su hospitalidad durante mi estadía allí. Este agradecimiento abarca a mis colegas de ambos institutos que siempre me brindaron toda su hospitalidad y confianza.

Quiero agradecer a Cristina Ibarra, por intermedio de quien me inicié en el estudio del transporte de epitelios, a Claudia Capurro y Ricardo Dorr, mis colegas y amigos durante todos estos años, con quienes hemos discutido primariamente estos resultados y sobre todo por su atenta lectura de este trabajo y su acertada crítica que contribuyó a su mejoramiento.

Agradezco a la Universidad de Buenos Aires y al Conicet los subsidios acordados, con lo que se solvento parcialmente este trabajo.

Finalmente, debo agradecer a la Fundación Antorchas, la Fundación Roemmers y al INSERM (Francia), quienes subvencionaron parte de este trabajo de tesis.

a mis padres

INDICE

	página
CAPITULO I: OBJETIVOS E INTRODUCCION	
Objetivos.....	14
Introducción.....	16
Ciego de rata.....	17
Colon humano.....	20
Ciego de rata en animales adaptados a una dieta rica en potasio	23
Cultivos de monocapas celulares diferenciadas.....	25
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS	
Ciego de rata.....	30
Colon humano.....	31
Monocapas epiteliales de líneas celulares HT29-18E...33	
Condiciones de trabajo "in vitro".....	39
Técnicas experimentales.....	39
CAPITULO III: CIEGO DE RATA CONTROL	
<u>Resultados</u>	45

Efectos de los gradientes hidrostáticos y osmóticos aplicados sobre el J_w	46
El J_w y la composición iónica de las soluciones buffer.....	53
Flujo neto de agua y diferencia de potencial transepitelial observados en la presencia de gradientes osmóticos y salinos transepiteliales.....	55
Flujos unidireccionales de Na^+ , Cl^- y Rb^+	59
<u>Discusión</u>	62
J_w inducido por soluto en el ciego de rata.....	62
Reemplazos iónicos y movimientos netos de agua.....	64
Caminos para el movimiento de agua.....	66

CAPITULO IV: COLON HUMANO

<u>Resultados</u>	71
Permeabilidades osmóticas e hidráulicas.....	71
Rol del Na^+ , Cl^- y HCO_3^- sobre J_w	74
Flujo neto espontáneamente secretorio en el colon humano distal "in vitro".....	77
El efecto de la norepinefrina y el AMPcíclico sobre el J_w y la CCC.....	81
<u>Discusión</u>	84
Flujo neto osmóticamente e hidráulicamente inducido en el colon humano distal.....	84

Jw asociado a transporte en el colon humano distal...	87
Secreción de bicarbonato y acción de la norepinefrina.....	90
La acción del AMPc y la presencia de Jw neto secretorio.....	91

CAPITULO V: CIEGO DE RATAS ADAPTADAS A UNA DIETA ALTA EN POTASIO

<u>Resultados</u>	95
Efecto de los gradientes hidrostáticos transepiteliales sobre el Jw: rol del Na ⁺ , Cl ⁻ y HCO ₃ ⁻	95
Diferencia de potencial transepitelial, corriente de cortocircuito y movimientos iónicos unidireccionales.....	97
<u>Discusión</u>	100
Movimientos iónicos a través del ciego de ratas adaptadas.....	103

CAPITULO VI: MONOCAPAS CELULARES DE HT29 Y CaCo2

<u>Resultados</u>	107
Efecto de la depleción de Ca ⁺⁺ en el medio de cultivo.....	113
Permeabilidad a moléculas de distinto peso molecular	

en monocapas de células CaCo2.....	113
Efecto de la temperatura sobre la resistencia y el Jw en monocapas de células CaCo2.....	114
Propiedades de transporte de las células CaCo2 a 37°C.....	119
Estudios morfológicos por microscopía y criofractura de monocapas HT29 y CaCo2.....	123
<u>Discusión</u>	134
Jw inducido osmótica e hidráulicamente en monocapas de células CaCo2 y HT29-18E.....	137
Acoplamiento entre agua e iones en células CaCO2....	138
 CAPITULO VII: CONCLUSIONES GENERALES.....	142
 TRABAJOS PUBLICADOS.....	163

Abreviaturas utilizadas

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

CCC: corriente de cortocircuito

Col. colaboradores

dP: diferencia de potencial

Jw: flujo neto de agua

Jwt: flujo neto de agua asociado a transporte

Jwta: flujo neto de agua asociado a transporte
absortivo.

Jwts: flujo neto de agua asociado a transporte
secretor.

Phid: coeficiente de permeabilidad hidráulica

Posm: coeficiente de permeabilidad osmótica

Δ P: diferencia de presión hidrostática

R: resistencia

SEM: error standard de la media

SS-R: solución standard rata

SS-H: solución standard humano

CAPITULO I

OBJETIVOS E INTRODUCCION

OBJETIVOS

La fisiología del transporte de agua y electrolitos en el intestino de los mamíferos representa un área de intenso interés en investigación. Regularmente aparecen trabajos que definen los posibles mecanismos de transporte y los efectos de sustancias endócrinas, parácrinas y neurohumorales, las que estarían relacionadas a la regulación del movimiento de agua e iones. La absorción y secreción de electrolitos por la mucosa del intestino grueso implica la compleja interacción de procesos fisiológicos, bioquímicos y fisicoquímicos, en donde los mecanismos de acción involucrados difícilmente esten completamente aclarados y subsisten entre otros los siguientes interrogantes: 1) ¿cuál es el real acople entre agua e iones en el intestino grueso?, 2) ¿cuál es el rol de los gradientes osmóticos e hidráulicos en los flujos de agua observados? y 3) ¿cuál es la relativa importancia de las rutas paracelular y transcelular?.

Para dar una respuesta inicial a estos interrogantes se ha trabajado en dos modelos experimentales: 1) El ciego de rata, tanto en animales controles y en animales adaptados a una dieta rica en potasio. En este último caso se demostró con anterioridad importantes cambios fisiológicos, localizados en el colon distal y causados por el

hiperaldosteronismo; 2) el colon humano normal, utilizando segmentos aparentemente sanos obtenidos de ablaciones por cáncer u otras dolencias.

Estos modelos estudiados "in vitro" dieron una primer respuesta a los interrogantes arriba planteados. Sin embargo la profundidad del análisis es limitada por la complejidad de estos sistemas. Es así, que diferentes tipos celulares en distinta ubicación (vellosidad o cripta) tienen distintas características, por ejemplo ser absortivos o secretrorios. Es por ello que la parte final de nuestro trabajo desemboca en el estudio de monocapas epiteliales originadas a partir de líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano, siendo este un tercer modelo experimental, con el cual intentamos aproximarnos a la comprensión de los interrogantes planteados.

El objetivo de introducir estudios de permeabilidad en cultivos celulares fue determinar la potencial utilidad de líneas celulares (CaCo2, HT29) diferenciadas, como sistemas modelo de transporte para el intestino. Estas líneasw celulares son cultivadas sobre membranas de polycarbonato, en la cual forman una monocapa epitelial. Nuestra intención ha sido demostrar que estas monocapas diferenciadas son capaces de comportarse como una verdadera barrera epitelial, capaz de regular lo que pasa a través de ellas, ya sea por vía paracelular o transcelular.

INTRODUCCION

El colon está dotado de una extraordinaria capacidad de guardar fluidos y electrolitos para el cuerpo humano. El colon humano recibe un volumen diario de 2000 ml desde el ileum con una concentración de Na^+ y K^+ de 140 y 65 mM respectivamente (Devroede GJ y Philips ST, 1969; Debognie JC y Philipps SF, 1978). La excreción de agua es de 50 ml/día, mientras que el Na^+ y el K^+ excretado es de 1.2 y 1.5 mM/día, respectivamente. El número por si mismo enfatiza el importante rol del colon en la homeostasis del agua y electrolitos. Mas allá, la capacidad total del colon para la absorción de agua y sales excede por lejos esta capacidad diaria (Levitan y col., 1962). Cuando 2500 ml de solución isotónica en adición a la carga ileal diaria, es infundida vía un cateter directamente en el colon, la excreción final de agua y solutos permanece invariable (Debognie y Philipps SF, 1978). Esto indicaría la alta capacidad absorptiva del colon el cual sustituye al intestino delgado cuando este tiene una reducida absorción de agua y solutos a causa de disfunciones (Philipps SF, 1972). Además de esta alta capacidad compensatoria "en agudo", ha sido demostrado que el colon sufre cambios adaptativos crónicos durante la insuficiencia renal crónica (Bastl C y col, 1980) o el alto consumo de potasio en la dieta (Fissher y col., 1976).

Entendiéndose como adaptación cambios fisiológicos observados en reacción al estímulo dado durante un cierto período de tiempo.

CIEGO DE RATA

El desarrollo del intestino grueso en diferentes especies está cercanamente relacionado a su alimentación, y en particular a la necesidad de los mamíferos herbívoros a proveer, en algún sitio del tracto alimentario, de una cámara de fermentación en la cual la compleja estructura de los polisacáridos de las plantas pueda ser hidrolizados por las bacterias.

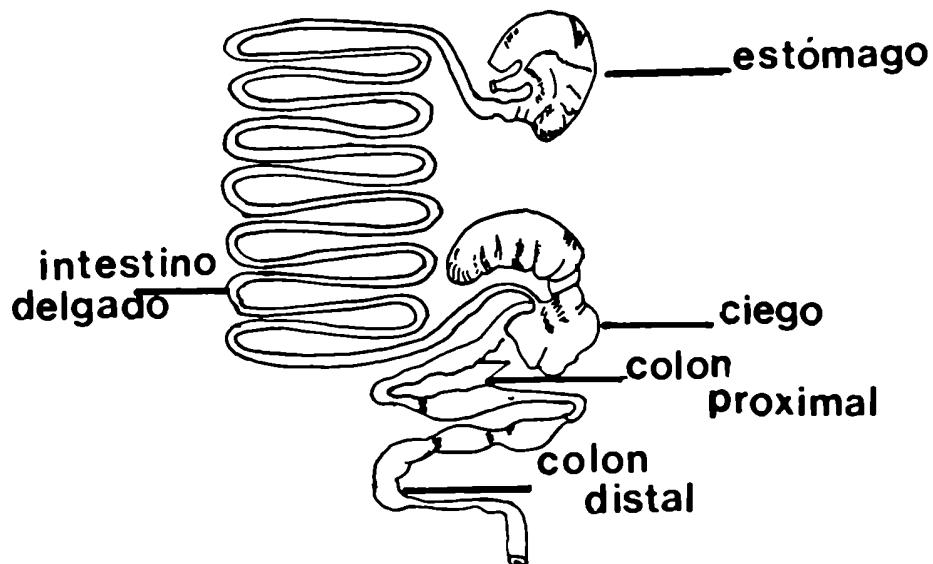
La rata está clasificada entre los mamíferos herbívoros sin cámara de fermentación externa. Este grupo comprende a la mayoría de los roedores (incluyendo hamster, conejo, caballo, elefante, etc.). En estos mamíferos el intestino grueso muestra su mayor desarrollo. El ciego es grande y a menudo mucho mayor que el resto del intestino grueso y puede estar subdividido por un septum o una válvula espiral (Fig. 1).

El intestino grueso, tradicionalmente ha sido dividido en tres partes, el mas cercano llamado ciego, el siguiente colon y el extremo distal recto.

A causa de la limitada accesibilidad del colon humano para estudios "in vitro", los investigadores clínicos

Fig. 1: ESQUEMA DEL SISTEMA DIGESTIVO DE LA RATA

El desarrollo anatómico del intestino grueso de especies diferentes está cercanamente relacionado a su comida y en particular a la necesidad de los mamíferos herbívoros de poseer en algún sitio del tracto alimenticio de una cámara de fermentación en la cual la estructura compleja de los polisacáridos de las plantas pueden ser hidrolizadas por las bacterias. En el esquema se observa el gran tamaño del ciego de la rata respecto del resto del intestino grueso.



frecuentemente usan el colon de rata para estudiar el transporte de electrolitos en el intestino grueso, y tienden a asumir que las conclusiones extraídas de uno son extrapolables al otro. Sin embargo existe una creciente evidencia de marcadas diferencias segmentales y entre especies en los mecanismos del transporte colónico (Fromm y Hegel, 1978; Foster y col., 1985; Clauss y col., 1985; Sullivan y Smith, 1986; Sandle y col., 1987). Esto parece determinar los precisos efectos celulares de algunos estimulantes de la absorción o de la secreción (Sellin y De Soigne, 1984, 1985; Hirsch y col., 1985).

En el colon de rata, por ejemplo, procesos de transporte activo transcelular para Na^+ y K^+ han sido estudiados extensivamente en condiciones de clampeo de voltage. El colon distal se caracteriza por una predominante absorción electroneutra de NaCl (probablemente reflejando un intercambio doble $\text{Na}^+/\text{H}^+:\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) y activa absorción de K^+ . En este segmento, el hiperaldosteronismo secundario a una dieta completamente deplecionada de sodio inhibe la absorción electroneutra de NaCl, estimula el transporte de Na^+ electrogénico sensible al amiloride y revierte la absorción de K^+ a una secreción. (Foster y col., 1983a; 1984). En el colon de rata proximal, sin embargo, la absorción activa de Na^+ basal es mediada por el intercambiador Na^+/H^+ y hay una activa secreción de K^+ (Foster y col., 1983b, 1986); en este segmento la aldosterona estimula la absorción electroneutra de NaCl y la

secreción de K^+ .

Todas las referencias encontradas en colon de rata al momento, son en los segmentos proximal o distal, pero no existen antecedentes de experimentación similar en ciego de rata.

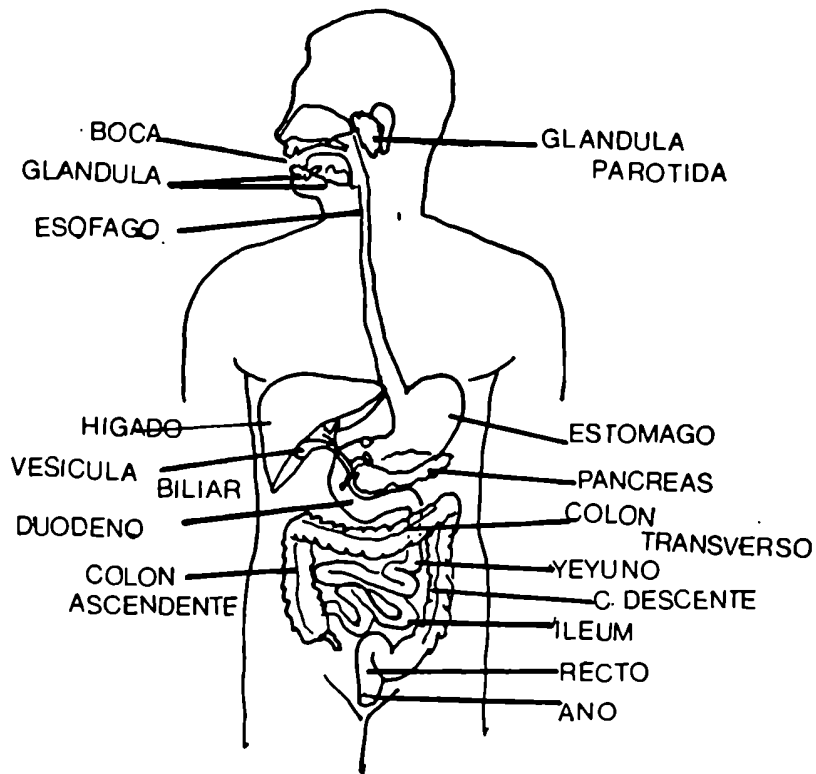
COLON HUMANO

De acuerdo a la bibliografía dedicada al estudio de la fisiología, la función principal del tubo digestivo es proporcionar al organismo agua, electrolitos y sustancias nutritivas en forma continua; para ello, los alimentos deben primero ser transportados a una velocidad tal que permita la digestión y la absorción. Desde este enfoque el estudio del tubo digestivo se divide en general en tres partes: 1) transporte de alimentos, 2) secreción de jugos digestivos y 3) absorción del alimento digerido, agua y diferentes electrolitos.

En la figura 2 se esquematiza la totalidad del tubo digestivo humano y las principales diferencias anatómicas entre sus constituyentes. Cada sección está destinada a una función específica: 1) simple transporte de alimento de un punto a otro, como en el esófago; 2) almacenamiento del alimento en el cuerpo del estómago o de materia fecal en el colon descendente; 3) digestión del alimento en el estómago, duodeno, yeyuno e ileon y 4) absorción de los productos

Fig. 2: SISTEMA DIGESTIVO HUMANO

Se esquematiza la totalidad del tubo digestivo y las principales diferencias anatómicas entre sus constituyentes. Cada sección está destinada a una función específica como: 1) transporte de alimentos de un punto a otro como en el esófago, 2) almacenamiento del alimento en el cuerpo del estómago o de materia fecal en el colon descendente, 3) digestión del alimento en el estómago, duodeno, yeyuno e íleon, y 4) absorción de los productos finales de la digestión en la totalidad del intestino delgado y la mitad proximal del intestino grueso.



finales de la digestión en la totalidad del intestino delgado y la mitad proximal del intestino grueso.

En el presente estudio se intentó caracterizar el transporte de agua e iones en el intestino grueso, teniendo en cuenta que las funciones del colon son: 1) absorción de agua y electrolitos del quimo y 2) almacenamiento de materias fecales hasta el momento de su expulsión. La primera mitad del colon (Fig. 2) interviene principalmente en la absorción y la segunda mitad en el almacenamiento.

Dada la poca posibilidad de obtención de segmentos humanos para la experimentación "in vitro" donde, sin duda, las condiciones experimentales son mas controlables, nuestro conocimiento actual del transporte en el intestino humano viene principalmente de la experimentación "in vivo" (Davis GR y col., 1983; Devroede GJ y Philipps SF, 1969).

Los pocos trabajos previos en el colon humano in vitro (Archampong EQ y col., 1972; Grady CF y col., 1970; Rask-Madsen J y col., 1977; Hawker PC y col., 1978; Wills NK y col., 1984; Sellin J y De Soigne R, 1987) han sido centrados en mediciones electrofisiológicas (diferencia de potencial transepitelial, dP; corriente de cortocircuito, CCC) asociada con el estudio de movimientos isotópicos de iones (Sellin J y De Soigne R, 1987). Estos trabajos han sido realizados principalmente en colon distal, encontrandose en este segmento un transporte electrogénico de Na^+ (Hawker y col., 1978; Grady y col., 1970; Archampong y col., 1972), aportando este a una corriente de cortocircuito sensible al

amiloride, existiendo una activa secreción de potasio (Hawker y col., 1978).

La aldosterona incrementaría el transporte electrogénico de Na^+ , a juzgar por la elevación de la diferencia de potencial transepitelial "in vivo", (Edmonds y Godfrey, 1970). Estudios recientes en el colon proximal (ascendente) indicarían que la fracción sensible al amiloride de la CCC es menor que en el colon distal, siendo la corriente basal de igual magnitud (Sandle y col., 1986).

Se postula una secreción de bicarbonato en el colon humano "in vivo" (Davis y col., 1983), la que es también postulada en el colon humano "in vitro" (Sellin y De Soigne, 1987), para la que no se demuestra evidencia de una dependencia de Cl^- .

CIEGO DE RATA EN ANIMALES ADAPTADOS A UNA DIETA RICA EN POTASIO

El incremento de la ingesta de potasio con la dieta resulta en el fenómeno de "tolerancia al potasio" en el cual, los animales son protegidos contra los efectos letales de la hiperkalemia (aumento de la concentración de potasio en el organismo) aumentando la velocidad de secreción neta de potasio en el intestino grueso y en el sistema renal de los tubos colectores (Binder, 1975; Fisher y col., 1976;

Hayslett y Binder, 1982; Silva y col., 1973).

El término "adaptación al potasio" se refiere a los mecanismos por los cuales las células epiteliales incrementan su capacidad secretoria de potasio durante el aumento de potasio de la dieta. Este fenómeno adaptativo fue descrito primariamente por Tatcher y Radike para la rata (Tatcher y Radike, 1947). Animales a los cuales se les da por más de 12 días, grandes dosis subletales de soluciones de sales de potasio desarrollan la habilidad de sobrevivir a una carga aguda de potasio parenteral u oral, la que sería letal en animales no adaptados o controles. Respuestas similares han sido también descritas en otros animales, y la adaptación al potasio es considerada un prototipo para el estudio de influencias externas sobre los procesos de transporte.

Esta respuesta esta asociada con numerosos cambios adaptativos en el colon, que inducen un aumento en la diferencia de potencial espontánea transepitelial y una secreción neta de potasio "in vivo", estimulando la secreción activa de potasio "in vitro" y un incremento en la actividad de la bomba Na-Katepeasa en asociación con un incremento en el área de la membrana basolateral (Fisher y col., 1976; Foster y col., 1983a; Hayslett y Binder, 1982; Kashgarian y col. 1980).

Estos cambios de la función de la mucosa colónica han sido también descritos en el túbulo contorneado distal del riñón pero no se observaron en el túbulo proximal o en el

yeyuno (Fisher y col., 1972; Hayslett y col., 1982; Silva y col., 1973). El incremento en la toma de potasio en la dieta estimula la secreción endógena de aldosterona (Boyd y col., 1971) y estudios posteriores demuestran que no todos los cambios ocurridos son dependientes del incremento de la secreción de aldosterona (Foster y col., 1984).

CULTIVOS DE MONOCAPAS CELULARES DIFERENCIADAS

Las células de la mucosa intestinal o de la corteza renal están caracterizadas por una polarización morfológica y funcional. La superficie apical, ligada a fenómenos secretorios o absorptivos, está recubierta de microvellosidades; la superficie basolateral se encuentra en contacto con las otras células. Las dos superficies como así las células mismas están relacionadas por un sistema complejo de uniones. Esta asimetría funcional de la membrana plasmática indica una polarización estructural de sus dominios, cada uno de ellos con una composición específica en lípidos y proteínas.

Desde que la primera línea celular de carcinoma de colon humano, HT29, fue establecida por Fogh y col. en 1975, muchas otras líneas fueron establecidas a partir del cáncer de colon. Recientemente tres líneas celulares, CaCo2, HT29 y T84, demostraron exhibir, ya sea espontáneamente o por inducción, fenotipos diferenciados permanentes ya sea de

células absortivas maduras o células secretoras de mucus maduras (review, Zweimbaun, en prensa). En la línea celular HT29, cambios en las condiciones de cultivo, tales como el reemplazo de glucosa por galactosa (Pinto y col., 1982) o la depleción total de los azúcares del medio (Zweimbaun y col., 1985), se encontró que inducen la diferenciación. En las células HT29 cultivadas en glucosa se informa cierta heterogeneidad (Mostov y Globel, 1982), la que puede ser debida a una heterogenidad celular de la línea sin clonar o bien a una pluripotencialidad de las células HT29. Esto último fue sugerido por la inducción de tumores que muestran diagramas de diferenciación como enterocitos (Zweimbaun y col., 1983, 1984) y secreción de grandes cantidades de mucus (Rousset y col., 1978)

El clonado de las células HT29 es realizado por el grupo de Louvard en el Instituto Pasteur, Godfrey y col., informan del clonado y diferenciación en medio conteniendo galactosa y la expresión de un marcador apical, la sacarosa-isomaltasa (Godefroy y col., 1988). Subclones presentando células goblet fueron descriptas con anterioridad (Huet y col., 1987).

En la línea CaCo2, establecida en 1974 a partir de un adenocarcinoma colónico humano por Fogh, recién se observa en 1983, que las células se diferencian espontáneamente en el medio de cultivo semejándose a enterocitos. Estas células son indiferenciadas durante su fase de crecimiento exponencial. En la confluencia ellas forman una monocapa

polarizada, donde aparecen las uniones estrechas y las microvellosidades. Se expresan hidrolasas características del estado de diferenciación terminal de los enterocitos y luego de varios días de confluencia sobre un sustrato impermeable se forman domos indicando la existencia del transporte transepitelial (Grasset y col., 1984).

Las células CaCo2 se diferencian idénticamente cuando son cultivadas en soportes permeables de discos plásticos o de nitrocelulosa, dando un valor de resistencia transepitelial en la confluencia de $173.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ y permaneciendo invariable por 17 días (Hidalgo y col., 1989).

Los epitelios establecen una barrera física entre dos medios. El cultivo de monocapas celulares sobre soporte permeable permite acceder a un compartimiento basal y a otro apical con la facilidad de poder estudiar la absorción y el transporte polarizado. El principal inconveniente reside en poder obtener una barrera "cerrada" a los fluidos en masa sin lesión de las monocapas y sin destrucción de la impermeabilidad de las uniones estrechas. La medida de la resistencia transepitelial de las monocapas es una técnica que permite evaluar la integridad de estas y la posible difusión paracelular (Grasset y col., 1984). De acuerdo a la naturaleza de los epitelios, la resistencia observada varía de $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (CaCo2, Grasset y col., 1984) a $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (T84, Dharmastaphorn y col., 1984). Los sistemas de transporte iónico de Na^+ , K^+ y Cl^- han sido puesto en

evidencia en el polo basal de la línea T84 (Dharmastaphorn y col., 1985).

El interés del cultivo sobre filtro es reproducir "in vitro" las condiciones de crecimiento de los epitelios y poder disponer de un medio controlado a ambos lados de la monocapa.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

Toda la experimentación se realizó "in vitro" con distintos tipos de epitelio colónico. Se aplicó en todos los modelos la misma estrategia experimental y la misma tecnología, de manera que los valores de permeabilidad en todos los epitelios estudiados son comparables. Se trató de relacionar los movimientos de agua observados con la composición del medio y el efecto de distintos tipos de gradientes, osmótico, hidráulico o iónico sobre la permeabilidad. En todos los casos siempre, se midió y se correlacionó simultáneamente movimiento de agua y parámetros eléctricos (diferencia de potencial, dP ; corriente de cortocircuito, CCC y resistencia).

CIEGO DE RATA

En los experimentos en los cuales se utilizó intestino grueso de rata, tanto en la experimentación con animales control como en adaptados (los que se alimentaron con una dieta rica en potasio). Se utilizaron ratas macho de 250 a 300 g de peso, las que eran mantenidas en una dieta standard o con una dieta standard adicionada con un 13% (p/p) en CLK (en los animales control y adaptados al potasio respectivamente) y con acceso al agua "ad libitum". Los animales adaptados permanecían entre 10 a 15 días con la

dieta, período durante el cual se duplica el valor de la uremia y ocurriendo numerosos cambios fisiológicos ya ennumerados (Hayslett and Binder, 1982).

Minutos antes del comienzo de la experiencia los animales fueron sacrificados mediante un golpe seco en la cabeza y el estómago fue abierto con una incisión media de donde se removía el ciego, el cual fue lavado con una solución salina fría (solución standard rata) similar al plasma y posteriormente abierto por el borde mesentérico. Dos fragmentos simétricos fueron colocados (disponiendo la superficie mucosa hacia arriba) sobre una malla de nylon y montados como un diafragma entre dos cámaras de lucite, resultando una superficie expuesta de 1.7 cm² y un volumen de 5 ml para cada cámara. Las cámaras utilizadas son cámaras tipo Ussing modificadas, conformadas por dos cámaras en paralelo que permiten la medición simultánea de parámetros eléctricos y flujo neto de agua en la misma porción de tejido (Fig. 3).

COLON HUMANO

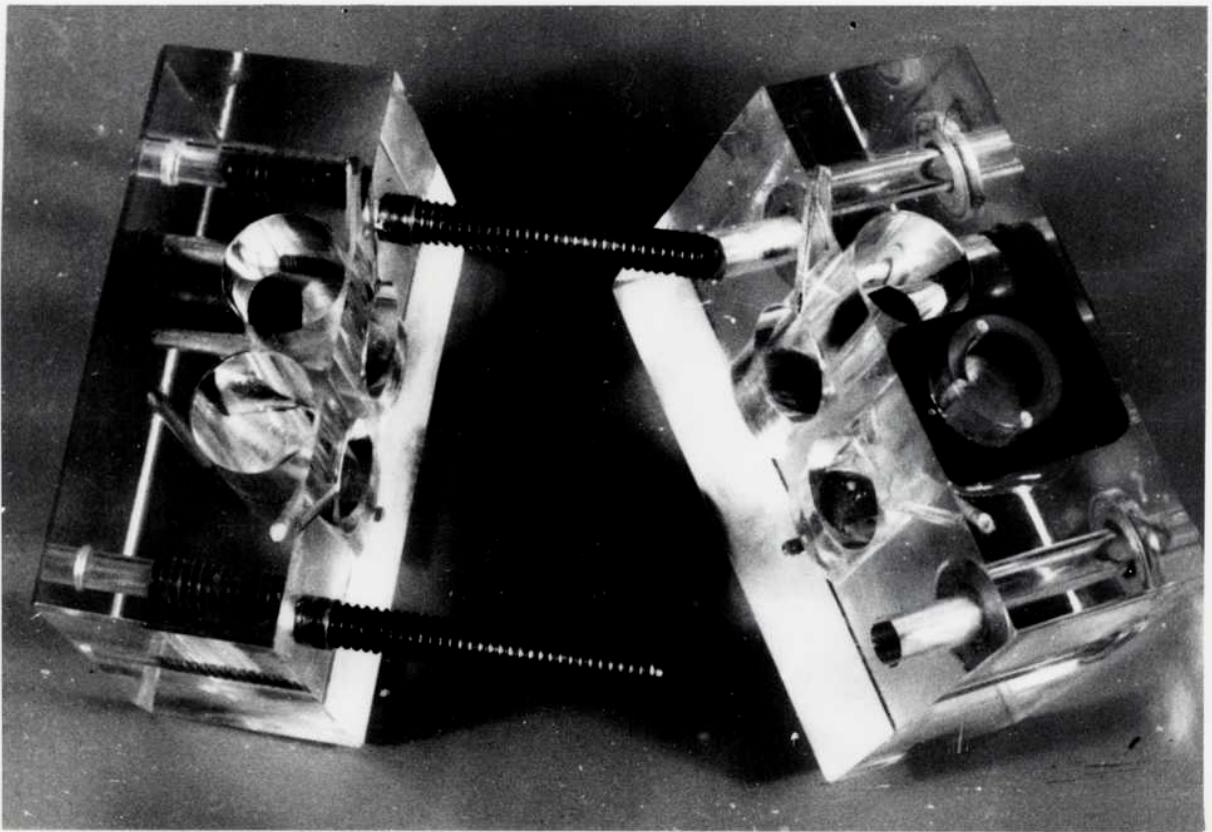
Los fragmentos de colon humano normal, principalmente sigmoideo y recto, fueron obtenidos a partir de extirpaciones quirúrgicas en pacientes con cáncer en los límites de seguridad lejanos al tumor. Inmediatamente luego de la ablación, segmentos aparentemente no afectados,

Fig. 3: CAMARA DE USSING

La cámara de Ussing está formada por dos fragmentos entre los cuales se coloca el epitelio como un diafragma, dejando dos superficies expuestas de 1.7 cm².

En cada hemicámara existen reservorios de 5 ml de capacidad, en donde se colocan las soluciones que estarán en contacto directo con el epitelio a través de la superficie expuesta.

Se puede trabajar en paralelo en dos fragmentos idénticos del mismo epitelio, en uno se puede medir flujo neto de agua manteniendo la cámara mucosa a volumen constante conectando la cámara a un sistema inyector o substractor de agua. En el otro fragmento se miden los parámetros eléctricos dP y CCC para ello se conecta a cada lado del epitelio electrodos de calomel, realizando la conexión con puentes de agar preparados en la misma solución del baño. La corriente de cortocircuito (CCC), se transmite a través de electrodos de Ag/AgCl.



tomados de las regiones mas distales al tumor fueron lavados y sumergidos en una solución salina de alta concentración en potasio (semejante al medio interno celular, ver Tabla I) y a baja temperatura (4°C). Con esta técnica se trata de mantener el tejido en condiciones de no existencia de gradientes, de manera tal de inhibir las fuerzas pasivas de movimiento transmembrana de sustancias y asimismo también de muy bajo funcionamiento metabólico, hasta el momento de relizar los ensayos. Antes del experimento la mucosa y la submucosa fueron disecadas de los tejidos subyacentes (siempre a 4°C) y montadas nuevamente como un diafragma entre las cámaras de lucite. Luego las cámaras fueron llenadas con solución salina (solución standard humano) a 37°C e inmersas en un baño termostatzado a la misma temperatura. En estas condiciones la dP creció lentamente estabilizandose, aproximadamente a los 30 minutos. No se observaron diferencias significativas en experimentos comenzados 30, 130 o 230 minutos después de incubación a alto potasio y baja temperatura. A causa de estas observaciones, en muchos experimentos, tres fragmentos diferentes fueron montados consecutivamente para así poder testear tres condiciones experimentales en el mismo trozo de intestino ("protocolo de los tres fragmentos").

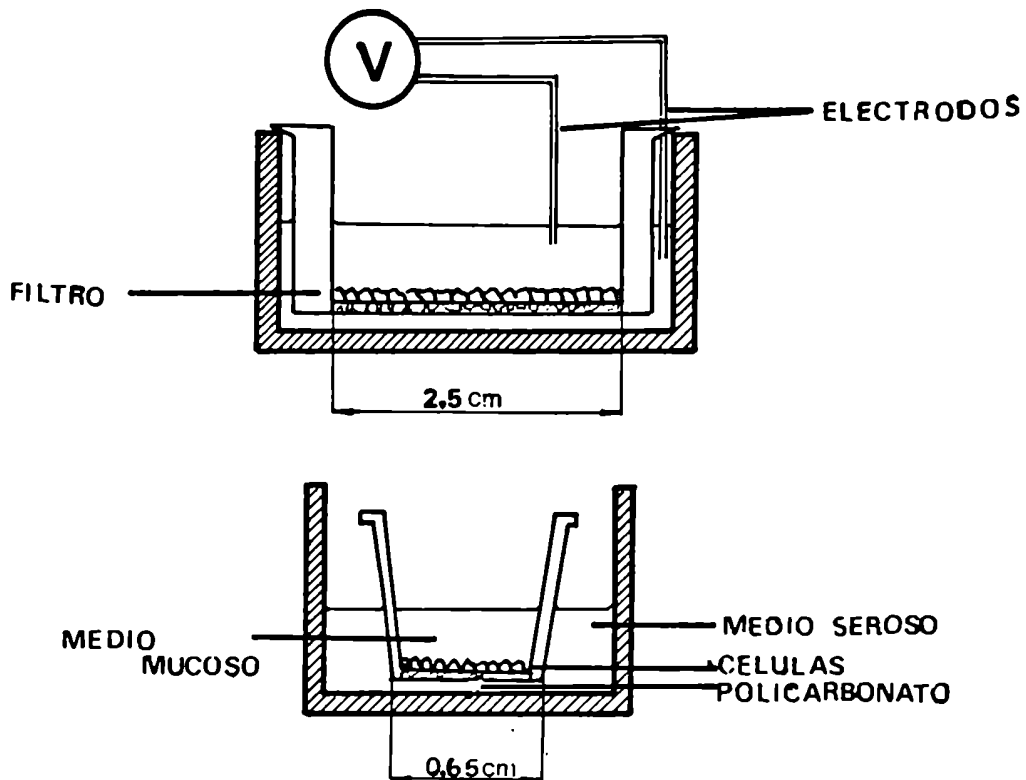
MONOCAPAS EPITELIALES DE LINEAS CELULARES HT29-18E Y CACO2

Cuando se utilizaron cultivos celulares, una innovación crítica estuvo basada en el uso de soportes permeables para el asentamiento de las células. El desarrollo de discos de cultivo de fondo poroso, compuestos de filtros de esteres de celulosa (Millipore) o de filtros de policarbonato (Nucleopore) (Cereijido y col., 1978, Steele y col., 1986), permite la obtención de epitelios confluentes donde el medio por encima de las células es separado del medio inferior de las células y a los cuales se puede acceder fácilmente (Fig. 4). Estos discos cultivados pueden ser manipulados fácilmente en condiciones estériles bajo flujo laminar y en ellos se pueden realizar numerosas medidas no invasivas (dP, resistencia, corriente de cortocircuito, liberación de AMPc, o consumo de oxígeno) Si, la medición es realizada en esterilidad el cultivo puede retornar al incubador, de manera tal que el mismo cultivo es utilizado repetidamente.

Para estos soportes conteniendo las monocapas celulares se diseñaron cámaras tipo Ussing modificadas, de manera tal que el filtro plástico entre estrechamente en la cámara dejando una cara de la monocapa expuesta y la otra cerrada para trabajar a volumen constante. Estas cámaras se utilizaron tanto para la medición del movimiento de agua como para la determinación de los flujos unidireccionales. La caracterización primaria de la permeabilidad se realizó a 20°C, a 37°C y con pH controlado en un medio conteniendo buffer Tris-Hepes o bien buffer bicarbonato.

Fig. 4: FILTROS POROSOS PARA CULTIVO CELULAR.

Los filtros realizados en policarbonato con poros de $3\mu\text{m}$ de diámetro son adheridos a un soporte plástico del cual se pueden separar por medio de un bisturí para ser montados como un difragma en la cámara de Ussing tradicional. Los filtros son de distintas dimensiones de 2.5 cm (a) o de 0.65 cm (b) de diámetro dejando distintos volúmenes a cada lado de la monocapa. Estas son sembradas en una concentración de aproximadamente 50000 cel/cámara. Al llegar a confluencia las células se diferencian formando uniones estrechas en la cara superior o apical como así microvellosidades. Esto no es observado en la cara basolateral que queda directamente apoyada sobre el filtro. No es necesario ningún pretratamiento del filtro para el crecimiento celular.



En este trabajo se emplearon tres tipos celulares originados de carcinoma de colon, dos de ellos clonados: el HT29-18Eglu y el HT29-18Egal (Godefroy y col, 1989) y la línea celular aún no clonada CaCo2. Las condiciones de cultivo son las desarrolladas por Godfrey y col.(1988) para las células HT29 y por Pinto y col. (1984) para las CaCo2. Todas las líneas celulares utilizadas son líneas diferenciadas y demostradas como tales por los autores mencionados anteriormente.

Cada tipo celular utiliza un medio diferente que le es propicio para el crecimiento; en este medio es cultivado en todo momento hasta el comienzo de la experimentación.

Dos medios diferentes son utilizados para el cultivo y la diferenciación de la línea HT29, ellos difieren en su composición en hexosas.

Medio de cultivo de HT29-18Eglu:

DMEM (Eurobio), medio Eagle modificado por Dulbecco
+ 10% suero fetal bovino (Seromed)
+ glutamina (10 mM)
+ Transferrina Humana (10 µg/ml; Sigma)
+ glucosa 20 mM (glucosa final= 25 mM, teniendo en cuenta la glucosa contenida en el medio)
+ penicilina (100 U/ml)
+ estreptomycin (100 µg/ml)

Medio de cultivo de HT29-18Egal

DMEM, sin glucosa y sin piruvato (Eurobio)
+ 10% suero fetal bovino dialisado tres veces contra NaCl 0,9% (Seromed)
+ glutamina (10 mM)
+ Transferrina Humana (10 µg/ml; Sigma)
+ galactosa 5 mM
+ penicilina (100 U/ml)
+ estreptomycinina (100 µg/ml)

Medio de cultivo de células CaCo2

DMEM (Eurobio)
+ 20% suero fetal bovino (Seromed)
+ glutamina (2 mM)
+ Transferrina Humana (10 µg/ml; Sigma)
+ glucosa 20 mM (glucosa final= 25 mM, teniendo en cuenta la glucosa contenida en el medio)
+ penicilina (100 U/ml)
+ estreptomycinina (100 µg/ml)
+ aminoácidos no esenciales (Seromed)

Las células eran cultivadas en el medio indicado en

cápsulas de Petri de 12 cm, el repicado celular se realizaba cuando llegaban a confluencia, aproximadamente a los cinco días de sembrado. Las células se separan agregando 3 ml de Tripsina-EDTA a la cámara de cultivo, luego de haber aspirado el medio, se dejan diez minutos en estufa a 37°C y se agrega 10 ml de medio para inhibir la tripsina, se centrifuga a 2000g, se descarta el sobrenadante y se recuperan las células del fondo con 6 ml de medio, se coloca 1 ml de medio homogeneizado con células en dos cámaras de Petri a las que se agrega 10 ml de medio, se homogeneiza y se vuelve a la estufa para continuar el cultivo. Al resto del centrifugado se lo diluye apropiadamente de manera tal que al agregar en cada soporte poroso (filtro) 1 ml de mezcla que contenga alrededor de 50.000 células por filtro.

Los filtros usados eran de policarbonato con poros de 3 μ de diámetro, con una densidad de 1.200.000 poros por cm². Con este tamaño de poro y en esta densidad el filtro nunca representó una barrera adicional en el estudio de la permeabilidad de las monocapas, el flujo del filtro sin células era aproximadamente de 300 μ l/min. Se utilizaron filtros de distinto diámetro total (0.65 cm; 2,5 cm o 1,3 cm), dependiendo el utilizado del tipo de medición a realizar. En el momento de la experiencia, el filtro era separado del soporte plástico con un bisturí y colocado como un diafragma en la cámara de Ussing, ya sea para mediciones de flujo neto de agua o flujos unidireccionales de diferentes moléculas marcadas radiactivamente.

Condiciones de trabajo "in vitro"

Las soluciones utilizadas para los epitelios intestinales "in vitro" están indicadas en la tabla I, como asimismo la osmolaridad total y el pH de cada una de ellas .

En algunos experimentos el buffer bicarbonato fue reemplazado por el buffer Tris-Hepes (Tris-Cl 7.5 mM, Na-Hepes 12.5 mM) de pH 7.4 y el que era burbujeado con O₂.

Los reemplazos iónicos se hicieron equivalente a equivalente manteniendo la isotonicidad de la solución por agregado de polietilenglicol (PEG) cuando fue necesario.

Para calcular el gradiente osmótico efectivo aplicado, la osmolaridad teórica fue corregida aplicando el coeficiente osmótico correspondiente ($\sigma = 2.5$) al PEG empleado (Porta y col., 1989).

Las cámaras y las soluciones de los baños se mantenían a 37°C a lo largo de todo el experimento. El baño seroso era continuamente burbujeado con una mezcla gaseosa de 95% O₂ y 5% CO₂.

Técnicas experimentales

Las técnicas experimentales utilizadas en todos los casos fueron semejantes y se describen a continuación: el flujo neto de agua (J_w) se registró minuto a minuto como se describió en otras barreras epiteliales (Bourguet and Jard,

TABLA I

	SS-RATA	SS-HUMANO	SA-K+
NaCl	116	114	
Colina-Cl			
KCl	5.2	4.5	120
CaCl ₂	1.2	1.2	1.2
MgCl ₂	1.2	1.2	1.2
KHCO ₃			10
NaHCO ₃	25	25	
glucosa	10	5	25
K ₂ HPO ₄	2.4	1.2	1.2
KH ₂ PO ₄	0.2	0.2	0.2
pH	7.8	7.4	7.2

Al realizar los reemplazos iónicos en las soluciones que bañaban los epitelios, estos se hicieron equivalente a equivalente, en cada tipo de solución correspondiente a la línea experimental. Cuando era necesario se ajustaba la osmolaridad de la solución por agregado de PEG, PM= 4000. SS-Rata= solución standard rata; SS-HUMANO= solución standard humano; SA-K+= solución alta en potasio. Todas las concentraciones son en mM.

1964). Haciendo uso de las cámaras de Ussing descritas anteriormente, en esta técnica se trabaja con la cámara mucosa mantenida a volumen constante, aplicando una presión a través de una columna de agua de 13 cm, conectada a un sistema automático de inyección o sustracción de agua que se pone en marcha cuando pasa fluido de un lado a otro del tejido para mantener el volumen de la cámara constante. Así se registra una señal proporcional al volumen de líquido inyectado o aspirado minuto a minuto. De esta manera se pueden detectar variaciones mínimas de 50 nanolitros de flujo secretor o absortivo. Un esquema del equipo utilizado se da en la figura 5.

Para medir la diferencia de potencial se usaron puentes de agar conectados a hemiceldas de calomel y ubicados adyacentes al epitelio. La composición de los puentes de agar es similar en cada caso a las soluciones que contuviesen las cámaras (preparados al 3% p/p en las soluciones salinas correspondientes). La diferencia de potencial transepitelial podía ser cortocircuitada¹ haciendo pasar corriente a través de alambres de plata clorurados localizados simétricamente al costado de cada cámara y enfrentando la superficie expuesta del epitelio (Parisi y Cancela, 1988).

1 Se define corriente de cortocircuito considerando que la diferencia de potencial transmembrana (dP) puede ser clampeado a cero pasando corriente a través de los electrodos de Ag^+/ClAg ; el valor de esta corriente, llamada corriente de cortocircuito, da la suma algebraica del movimiento de iones transepitelial.

Los flujos iónicos transepiteliales fueron medidos cada 5 minutos por medio de marcadores radiactivos, usando una técnica previamente descrita por Parisi y Cancela en 1988. El trazador se agrega a un lado de la membrana y el volumen del otro lado se remueve y se cuenta cada 5 minutos al menos durante 12 períodos consecutivos. En todos los experimentos los flujos unidireccionales en el sentido mucoso-seroso (J_{ms}) y en el sentido seroso-mucoso (J_{sm}) fueron medidos simultáneamente en dos fragmentos del mismo colon. Doble marcaje fue corrientemente usado, permitiendo asimismo la determinación simultánea de ^{22}Na , ^{36}Cl y ^{86}Rb . Este último isótopo fue utilizado como un marcador de potasio. Todos los flujos unidireccionales de iones fueron medidos en condiciones de cortocircuito.

En cultivos celulares, se midió también la permeabilidad a distintas moléculas hidrosolubles utilizando marcadores radiactivos ^{14}C -glucosa, ^3H -glucosa, ^{14}C -metanol, ^{14}C -PEG, ^3H -manitol, ^{14}C -manitol, ^3H -Inulina y ^{14}C -Inulina.

CAPITULO III

RESULTADOS EN CIEGO DE RATA CONTROL

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

RESULTADOS

Un flujo neto absorptivo fue espontáneamente observado cuando el tejido era montado entre soluciones similares (solución standard rata). Este flujo de 0.25 ± 0.02 $\mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$, a 13 cm de agua podía ser variado de acuerdo a los gradientes hidrostáticos u osmóticos aplicados o cambiando la composición salina del medio. Esto se puede observar claramente en la Fig. 6. Como se describe en la sección métodos, la técnica empleada para la medición de flujos implica la existencia de una presión hidrostática aplicada en la superficie mucosa Fig. 6).

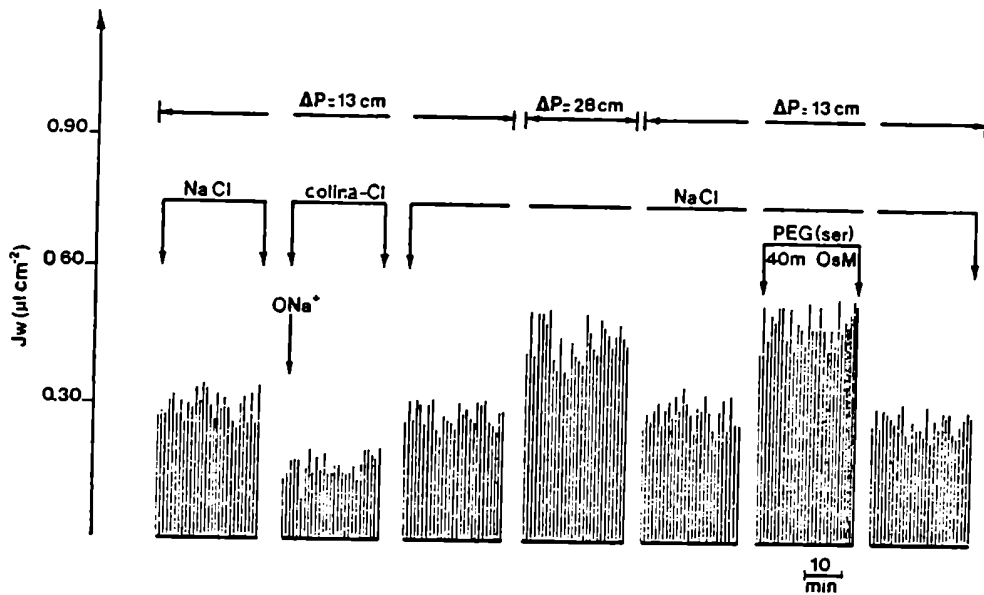
Efecto de los gradientes hidrostáticos y osmóticos aplicados sobre el J_w .

Teniendo presente los principales iones asociados con el transporte en general Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , se intentó relacionar el flujo neto de agua con la composición del baño.

Se observó una relación lineal cuando una presión hidrostática variable fue aplicada del lado mucoso. Esta relación se mantuvo aún cuando diferentes soluciones salinas estuvieron presentes a ambos lados del tejido (en el conjunto de tres iones se indica los principales componentes o aquellos que eran cambiados en la solución, $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}/\text{HCO}_3^-$, $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{Tris}^+$ o colina $^+/\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$). Los coeficientes de permeabilidad hidráulica (Phid) se

Fig. 6: FLUJO NETO DE AGUA TRANSPÉPITELIAL REGISTRADO MINUTO A MINUTO EN CIEGO DE RATA NORMAL.

La altura de cada línea indica la cantidad de fluido que pasa cada minuto a través del epitelio. El flujo observado en condiciones basales, $\Delta P = 13$ cm de H₂O y solución standard rata en ambos baños del epitelio, disminuye significativamente en ausencia de Na⁺ y aumenta con el aumento del gradiente implicado (hidráulico u osmótico). Todos los efectos observados son reversibles. Las condiciones indican: NaCl: solución standrad rata en ambas caras del epitelio. $\Delta P = 13, 28$ cm de H₂O, presión hidrostática aplicada en el lado mucoso. Colina-Cl: el Na⁺ es reemplazado en la solución standard por colina. PEG (ser): el gradiente osmótico es creado por agregado de polietilenglicol en el lado seroso del epitelio.



calcularon en cada caso a partir de la pendiente de la línea de regresión media (Fig. 7, Tabla II). No se observaron diferencias significativas en los cuatro casos considerados.

La ordenada al origen fue significativamente distinta de cero cuando la solución standard rata estuvo presente en los baños seroso y mucoso (Tabla II)

Este valor de ordenada existe en ausencia de todo gradiente hidrostático, osmótico o iónico y representa el transporte asociado a J_w . Se puede observar que la ordenada al origen fue mayor cuando el SO_4^- reemplazó al Cl^- o cuando el buffer Tris-Hepes reemplazó al buffer bicarbonato. El J_w asociado a transporte puede ser calculado por substracción al J_w observado a 13 cm de agua del componente hidrostático a ese mismo nivel (Tabla II).

También se observó una relación lineal (Fig. 8) entre el J_w observado y el gradiente osmótico creado cuando el baño seroso fue hecho hiperosmótico por agregado de PEG a la solución salina standard, en un rango de concentraciones de 0 a 40 mM. De la pendiente de la curva de regresión lineal se puede obtener el coeficiente de permeabilidad osmótica (Posm), siendo este de 0.0014 cm/s. La ordenada al origen da un valor de $0.24 \pm 0.02 \mu\text{l}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ que no es diferente del flujo absortivo observado en la ausencia de gradiente osmótico, a 13 cm de H_2O . El J_w asociado a transporte ($0.16 \pm 0.02 \mu\text{l}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$) fue calculado por substracción del flujo hidrostático promedio a 13 cm de H_2O ($0.08 \pm 0.02 \mu\text{l}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$). Este valor no fue significativamente diferente

del obtenido a partir de la figura 7, en las experiencias realizadas en solución standard (Tabla II).

Fig. 7: VARIACION DEL FLUJO NETO DE AGUA CON LA PRESION HIDROSTATICA APLICADA: Efecto de la composición del medio. El ciego de rata control fue montado entre dos soluciones idénticas. Las soluciones usadas fueron: 1, standard (NaCl); 2, Na₂SO₄ reemplaza el NaCl; 3, cloruro de colina reemplaza al NaCl; 4, El buffer Tris-Hepes reemplaza al buffer bicarbonato. Todos estos reemplazos fueron realizados teniendo en cuenta que la composición del medio standard de trabajo tiene composición similar al plasma. Los valores de permeabilidad calculados a partir de la pendiente de cada curva son indicados en la tabla II.

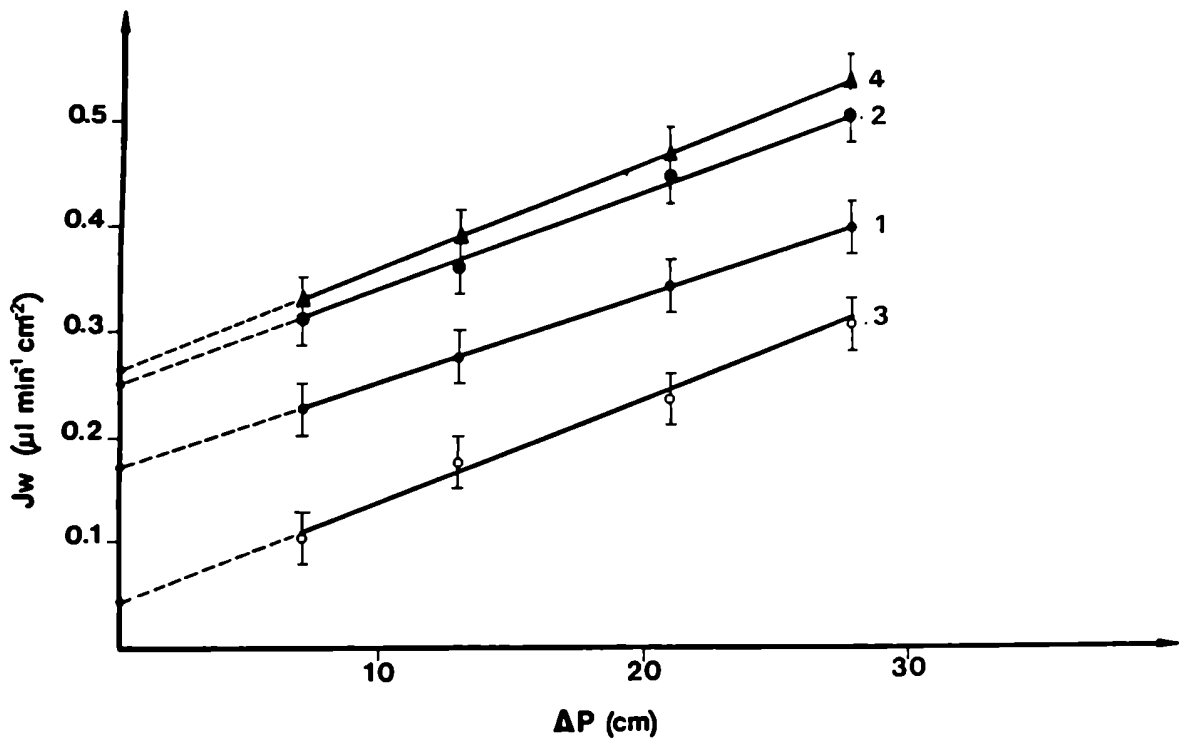


Fig. 8: EFECTO DEL GRADIENTE OSMOTICO SOBRE EL FLUJO NETO DE AGUA EN RATAS NORMALES.

Se grafica el J_w observado en función de la concentración de PEG (polietilenglicol) en el baño seroso (n= 6). Ordenada al origen de la recta media= $0.24 \pm 0.02 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$; $\text{Posm} = 0.0014 \pm 0.0002 \text{ cm/s}$.

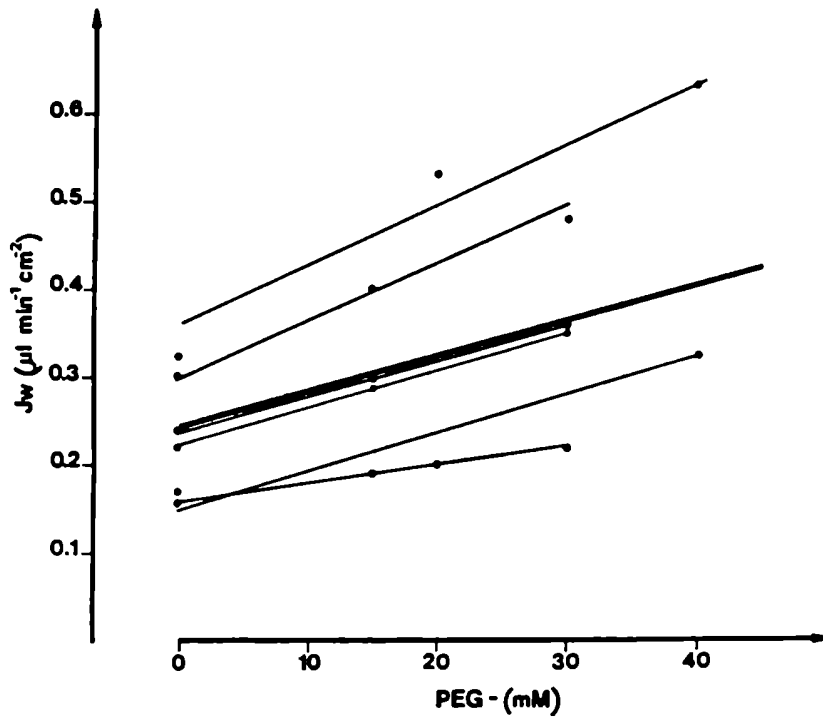


TABLA II

Jw ASOCIADO A TRANSPORTE Y Phid EN FUNCION DEL MEDIO DE INCUBACION

CONDICION	Jw ASOCIADO A TRANSPORTE $\mu\text{l}/(\text{min}.\text{cm}^2)$	Phid cm/s	ΔJw $\mu\text{l}/(\text{min}.\text{cm}^2)$
Na/Cl-/HCO ₃ -	0.17 ± 0.03 (13)	0.164 ± 0.016 (13)	
Na/SO ₄ =/HCO ₃ -	0.25 ± 0.03 (14)	0.185 ± 0.060 (5)	+0.07 ± 0.02 (12)
Colina/Cl-/HCO ₃ -	0.04 ± 0.03 (6)	0.222 ± 0.041 (6)	-0.10 ± 0.03 (6)
Na/Tris+/Cl-	0.26 ± 0.04 (7)	0.203 ± 0.050 (5)	+0.14 ± 0.03 (5)

La condición indica los tres iones mayoritarios presentes a ambos lados del tejido. El flujo de agua (Jw) asociado a transporte en las condiciones 1 y 3 fue calculada de los datos tomados de la Fig. 7 y representa la ordenada al origen de las respectivas líneas de regresión.

En las condiciones 2 y 4 el Jw asociado a transporte fue calculado por substracción al Jw total observado, a una presión hidrostática de 13 cm del Jw correspondiente al gradiente hidrostático a ese nivel. El coeficiente de permeabilidad (Phid), fue calculado a partir de la pendiente de la línea de regresión dada en la Fig. 7.

La última columna indica las diferencias medias en experimentos pareados entre la condición testeada y la condición 1.

Los valores son dados como $\bar{X} \pm \text{SEM}$, el n° de experimentos es indicado entre paréntesis.

El Jw y la composición iónica de las soluciones buffer

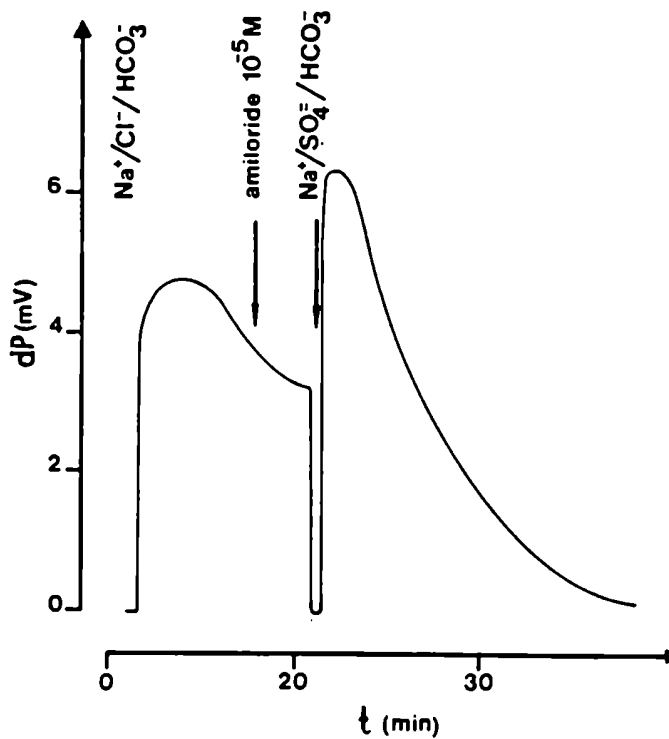
Cuando el ciego de rata fue montado entre dos soluciones salinas, una diferencia de potencial transepitelial (dP), insensible al amiloride estuvo asociada al Jw absorbivo observado (Fig. 9). Este valor de dP evolucionó espontáneamente, con un registro máximo a 6.5 mV, para luego estabilizarse a valores más bajos pero siempre positivos (3.7 ± 0.5 mV, n= 7). La resistencia promedio transepitelial fue de $145 \pm 15 \Omega \cdot \text{cm}^2$

Cuando se reemplazó NaCl por cloruro de colina isosmóticamente, a ambos lados del tejido ($\text{colina}^+/\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, Tabla II) Phid no cambió significativamente. Aún más, en ésta condición, la ordenada al origen tampoco fue significativamente distinta de cero (Fig. 7, Tabla II). El Jw observado, a 13 cm de H₂O, cayó significativamente en la ausencia de Na⁺ (control 0.30, exp. 0.20, diferencia media $0.10 \pm 0.03 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$, n= 5), mientras que la dP resultó no significativamente diferente de cero (-0.10 ± 0.07 mV, n= 6).

El reemplazo de los iones cloruro por iones sulfato significativamente aumentó el Jw asociado a transporte, medido en condiciones de estado estacionario ($\Delta P = 13$ cm de H₂O, Tabla II, Fig. 9). La dP tuvo en esta situación, un incremento transitorio seguido de una reducción sostenida (Fig. 9).

Fig. 9: DIFERENCIA DE POTENCIAL TRANEPITELIAL EN CIEGO DE RATA NORMAL.

La diferencia de potencial transepitelial (dP, seroso positivo) es graficada en función del tiempo. Se observa el efecto del amiloride mucoso y el reemplazo de Cl^- por $\text{SO}_4^{=}$ (mucoso y seroso). La presencia del diurético no cambia la dP.



El reemplazo del buffer bicarbonato por el buffer Tris-Hepes también incrementó el J_w absortivo asociado a transporte (Tabla II), mientras que cayó la dP observada (control 3.0 ± 0.6 mV, exp. 0.7 ± 0.2 mV, $n=4$). La figura 10 muestra que en esta situación la corriente de cortocircuito cayó a valores no significativamente distintos de cero (promedio 4.2 ± 3.8 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n=5$).

Flujo neto de agua y diferencia de potencial transepitelial observados en la presencia de gradientes osmóticos y salinos transepiteliales.

La existencia de un gradiente químico a través de una barrera epitelial puede generar una diferencia de potencial transepitelial (Naftalin y col. 1985, Tripathi y Boulpaep, 1988, Van Os y col. 1976, Wright y col. 1972). Para testear este punto en el ciego de rata, el NaCl se reemplazó por Na_2SO_4 del lado mucoso (la osmolaridad total fue ajustada con PEG). En esta condición la dP aumentó con una simultánea reducción en el J_w absortivo (Tabla III, condición I, Fig. 11). Cuando el mismo reemplazo se realizó en el lado seroso el potencial transmural cayó y se revirtió, acompañado por un significativo incremento en J_w (Tabla III, condición 2). Cuando el NaCl se reemplazó isosmóticamente por sacarosa en el baño mucoso apareció una importante dP (positiva del lado seroso, Tabla III,

Fig. 10: MEDICION DE LA CORRIENTE DE CORTOCIRCUITO EN AUSENCIA DE BICARBONATO DEL MEDIO. La corriente de cortocircuito (CCC) medida a través de electrodos de Ag/AgCl ubicados simétricamente a ambos lados del epitelio cae por efecto del reemplazo del buffer HCO_3^- por el buffer Tris-Hepes.

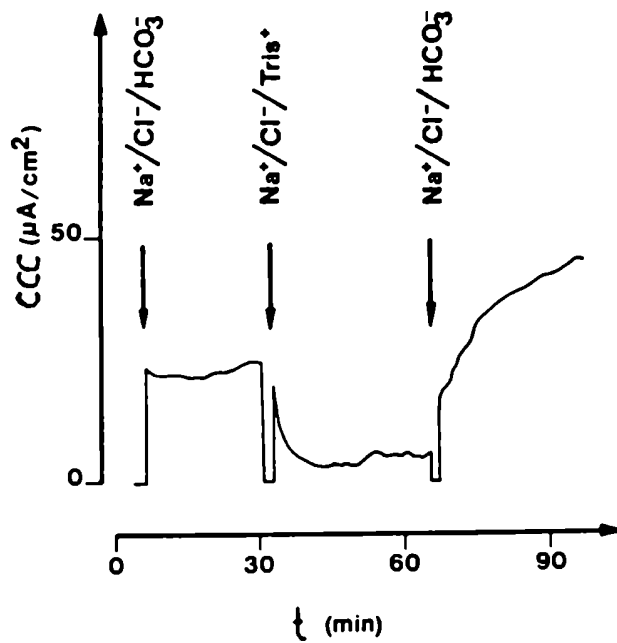


Fig. 11: EFECTO DE CAMBIOS ASIMETRICOS SOBRE LA dP TRANSEPITELIAL.

En la figura se observa los cambios en la diferencia de potencial transepitelial (dP) originadas por gradientes iónicos u osmóticos. Inicialmente todos los tejidos estaban entre dos soluciones iónicas standard. En la indicación de la flecha la composición de los baños mucoso o seroso era cambiada. a: Na_2SO_4 reemplazó al NaCl isoosmóticamente en el baño mucoso. b: sacarosa reemplazó al NaCl isoosmóticamente en el baño mucoso. c: PEG, 40 mOsM, fue agregado al baño seroso. d: cloruro de colina reemplaza isoosmóticamente al NaCl en el baño mucoso.

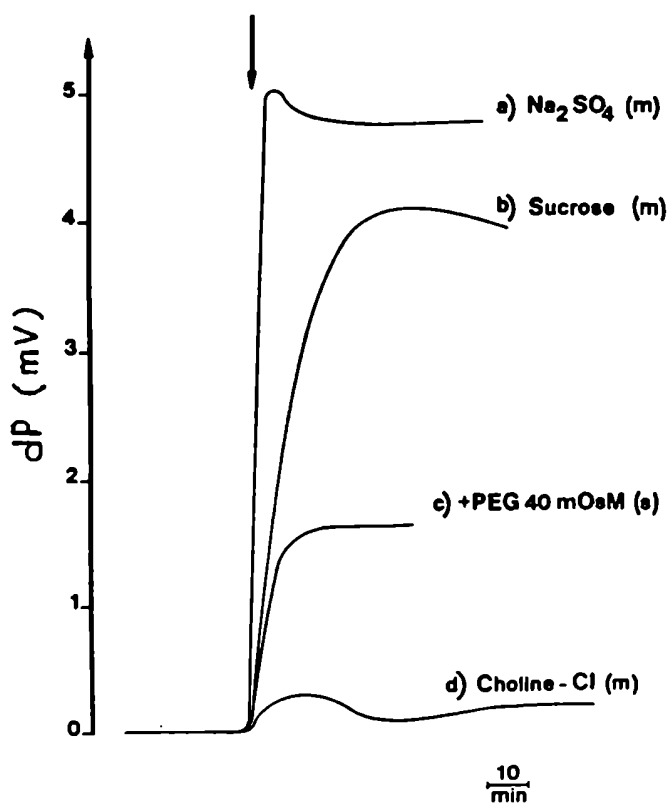


TABLA III

Jw NETO Y DIFERENCIA DE POTENCIAL TRANSEPITELIAL EN PRESENCIA DE GRADIENTES TRANSEPITELIALES OSMOTICOS O IONICOS

CONDICION	n	ΔDP (mV)	ΔJw (ul/(min.cm ²))
1) Na ₂ SO ₄ mucoso	5	+4,7 ± 0.8	+0.12 ± 0.02
2) Na ₂ SO ₄ seroso	11	-4.9 ± 0.5	+0.12 ± 0.02
3) SACAROSA mucosa	3	+7.9 ± 2.6	-0.14 ± 0.02
4) PEG seroso	12	+1.8 ± 0.2	+0.13 ± 0.02
5) PEG mucoso	5	-2.0 ± 0.2	-0.24 ± 0.08
6) ΔP mucoso	3	0	+0.25±0.02

En todas las condiciones NaCl y otros componentes standard están presentes inicialmente a ambos lados del tejido. En las condiciones 1 y 3 Na₂SO₄ o sacarosa reemplaza al NaCl en el baño indicado. En la condición 4 sulfato de metilcolina inicialmente reemplaza al NaCl en ambos lados del tejido y luego cloruro de colina reemplaza a éste en el lado mucoso. En las condiciones 5 y 6 PEG (40 mM) es agregado ya sea en lado mucoso o seroso como se indica. En la condición 7 se incrementa el gradiente hidrostático en 15 cm en el lado mucoso. Los valores de diferencia de potencial (ΔDP) indican cambios asociados en la diferencia de potencial transmembrana (lado seroso positivo). La última columna indica cambios observados en Jw (+ = absorción). ΔDP y ΔJw fueron medidos en condiciones de estado estacionario simultáneamente.

condición 3, Fig. 11) asociada a una significativa reducción en el J_w . En experimentos comenzados en presencia de colina metil-sulfato a ambos lados del tejido, el reemplazo unilateral de colina metil-sulfato por cloruro de colina también generó un significativo J_w absortivo asociado a la aparición de una dP biónica (tabla III).

En otros experimentos las soluciones serosa o mucosa fueron cambiadas por una solución hipertónica, la que contenía 40 mOsm de PEG. Esto condujo al desarrollo de un potencial transepitelial (tabla III, condición 4 y 5) de polaridad opuesta a otro observado, en similares circunstancias, en la vesícula biliar del conejo (Van Os y col. 1979 y 1976, Wright y col. 1972). La variación en la dP tiene su máxima pendiente inmediatamente después del establecimiento del gradiente osmótico (Fig. 11). Por otra parte, no se desarrollaron cambios significativos en la dP durante la aplicación de la presión de filtración. (Tabla III, condición 6).

Flujos unidireccionales de Na^+ , Cl^- y Rb^+

Los flujos unidireccionales de sodio, cloro y rubidio fueron medidos en experimentos de doble marcaje, como se indica en la sección métodos. El J_{ms} y el J_{sm} fueron simultáneamente medidos en dos segmentos adyacentes de cada

ciego.

Los resultados observados están resumidos en la tabla IV de donde se pueden obtener varias conclusiones: flujos netos de sodio y cloro fueron observados en condiciones de cortocircuito; los flujos de rubidio (considerados como flujos de potasio), fueron 50 veces más bajos que los de cloruro y por el contrario no se observó movimiento neto significativo de rubidio. El flujo neto de sodio no cambia significativamente en la presencia o ausencia de HCO_3^- (Tabla IV).

TABLA IV

FLUJOS UNIDIRECCIONALES DE NA+, CL- Y RB+

	Cl-	Rb+	Na+	
			HCO ₃ ⁻	TRIS+
Jms	11.61 ± 1.02	0.169 ± 0.022	5.92 ± 0.55	6.26 ± 0.30
Jsm	8.16 ± 1.05	0.144 ± 0.021	3.55 ± 0.34	3.40 ± 0.42
Jneto	3.45 ± 1.46	0.025 ± 0.023	2.37 ± 0.68	2.88 ± 0.53
p	<0.05	NS	<0.05	<0.01

Los flujos unidireccionales fueron medidos por marcadores radiactivos en condiciones de cortocircuito.

Los valores son dados como $\bar{X} \pm \text{SEM}$ en $\mu\text{Eq.h}^{-1}\text{cm}^{-2}$, n= 6.

Jms y Jsm son los flujos mucoso-seroso y seroso-mucoso, respectivamente.

Los flujos de Na⁺, fueron medidos en presencia de buffer HCO₃⁻ o en presencia de buffer Tris-Hepes.

DISCUSION

El desarrollo de un movimiento neto de agua a través de una barrera epitelial puede estar asociado a tres condiciones básicas: 1) la existencia de un gradiente osmótico transepitelial, 2) la existencia de un gradiente hidrostático transepitelial o 3) la presencia de una reabsorción isotónica, acoplada a un proceso de transporte activo. El flujo neto resultante, absortivo o secretorio, sería la suma algebraica de estos mecanismos conducentes.

Jw conducido por soluto en el ciego de rata

El ciego de rata, montado entre dos soluciones iónicas standard, que contienen Na^+ , Cl^- y HCO_3^- , mostró una diferencia de potencial transepitelial (seroso positivo), un flujo neto de agua absortivo dependiente de sodio y flujos netos de sodio y cloro, medidos en condiciones de corto circuito. Estos resultados son compatibles con la presencia en la membrana mucosa del ciego de rata de una entrada no electrogénica de NaCl . Este mecanismo recientemente propuesto en el ciego de conejo (Hatch y col. 1988, Selling y col. 1988) y en el colon distal de rata (Sandle y McGlone, 1987) se encuentra operando frecuentemente como un

intecambiador Na^+/H^+ acoplado a un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Otras transferencias iónicas son sin embargo, necesarias para comprender los resultados observados. Cuando el tejido estaba bañado a ambos lados con solución standard rata, la corriente de cortocircuito fue de $+25.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($3.7 \text{ mV} / 145 \text{ n.cm}^2$). Teniendo en cuenta los flujos netos de Na^+ y Cl^- la CCC esperada sería no significativamente diferente de cero teniendo en cuenta la dispersión de los datos. Salvo que H^+ o Ca^{++} fuesen transportados a velocidades extremadamente altas, parecería que la corriente positiva perdida fuera correspondiente a la secreción de un anión, probablemente HCO_3^- . Esta hipótesis es soportada por dos observaciones experimentales: 1) la corriente de cortocircuito se vuelve despreciable cuando el buffer Tris-Hepes reemplaza al buffer bicarbonato (Fig. 10); 2) en esta última situación el Na^+ transferido no cambia significativamente (Tabla IV).

Del flujo neto de Na^+ observado podemos calcular la cantidad de agua que debe ser conducida a través del tejido si el movimiento de este ion genera la reabsorción isotónica. El J_w esperado para un movimiento de Na^+ neto de $2.37 \pm 0.68 \mu\text{eq}/(\text{h.cm}^2)$ sería $0.28 \pm 0.08 \mu\text{l}/(\text{min.cm}^2)$. Este valor puede ser comparado con los valores experimentalmente observados (Tabla II). J_w aumenta de 0.17 ± 0.03 a $0.26 \pm 0.04 \mu\text{l}/(\text{min.cm}^2)$ cuando el HCO_3^- es removido del medio que baña ambas caras del epitelio. Se puede concluir que una excelente concordancia entre los valores teóricos y experimentales fueron observados en esta última situación.

La diferencia observada en la presencia de HCO_3^- ($0.26 - 0.17 = 0.09 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$) representaría la secreción de agua asociada a HCO_3^- . Si el Na^+ y el Cl^- se estuvieran moviendo isotónicamente, un cálculo similar se podría realizar para los flujos de Cl^- . Aunque estos últimos valores son más dispersos el J_w esperado para un movimiento neto de Cl^- de $3.45 \pm 1.46 \mu\text{eq}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$ sería de $0.46 \pm 0.19 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$. Esto es, como se esperaba, no significativamente distinto del calculado anteriormente para el flujo neto de Na^+ .

La dP , serosa positiva, provee una fuerza conductora alternativa para el movimiento pasivo de Cl^- desde el lumen al plasma, vía el camino paracelular. Mas allá, si consideramos la magnitud de los flujos observados en condiciones de cortocircuito, este mecanismo puede ser importante para el movimiento de agua a circuito abierto.

No se han observado movimientos netos de Rb^+ en el ciego de rata en condiciones standard (Tabla IV).

Reemplazos iónicos y movimientos netos de agua.

Cuando el NaCl fue reemplazado por cloruro de colina en ambos baños, mucoso y seroso, la dP y la reabsorción asociada a soluto cayeron a cero (Tabla II, Fig. 7). Este es el resultado esperado de acuerdo al rol central del transporte de Na^+ en la reabsorción y la secreción intestinal. (Edmonds, 1967, Luckoff y col., 1984).

El reemplazo del Cl^- por $\text{SO}_4^{=}$ o el reemplazo del HCO_3^- por Tris-Hepes significativamente incrementó el Jw absortivo. Estos resultados indican que a pesar de la presencia del sodio, un requerimiento básico, otros iones juegan un rol en el manejo del agua en el ciego de rata.

Para establecer los gradientes reales para los iones HCO_3^- entre el interior y el exterior celular, es necesario conocer los potenciales de membrana apical y basolateral y la concentración de HCO_3^- intracelular. Nosotros no tenemos estos datos. Sin embargo, la ausencia de la secreción de HCO_3^- puede explicar el incremento en el Jw y la disminución en la diferencia de potencial transepitelial en el estado estacionario, observada cuando el Cl^- estuvo ausente en el medio. El incremento inicial en la dP (Fig. 9) estaría asociada con un aumento en la resistencia transepitelial (el $\text{SO}_4^{=}$ es menos permeable que Cl^- en la vía paracelular). Otra posibilidad sería que fuese la resultante de velocidades de intercambio asimétricas de $\text{SO}_4^{=}$ por Cl^- a través del tejido. Por ejemplo, el Cl^- mucoso es intercambiado más rápidamente que el Cl^- seroso.

Cuando el buffer bicarbonato fue cambiado por el buffer Tris-Hepes en ambos baños, seroso y mucoso, un significativo aumento en el Jw estuvo asociado con una importante caída en la dP y en la CCC. Estos resultados dan argumentos adicionales indicando que la secreción de HCO_3^- esté probablemente presente en condiciones controles, contribuyendo a la dP positiva y reduciendo el Jw absortivo.

Caminos para el movimiento del agua

El rol del camino paracelular en el movimiento de fluidos y solutos a través del intestino delgado ha sido recientemente descrito por Pappenheimer y col. (Pappenheimer, 1987; Pappenheimer y col., 1987), y es generalmente aceptado que éste es el camino para el movimiento del agua bajo la aplicación de un gradiente hidrostático transepitelial (Fishbarg y col., 1976, Porta y col., 1989). Es asimismo razonable aceptar que éste es también el caso en el ciego de rata.

El camino paracelular podría ser también la ruta para el movimiento neto de agua asociado con la presencia de gradientes de Cl^- transepiteliales (tabla III). Estos movimientos de agua aparecen cuando el NaCl es reemplazado isotónicamente por Na_2SO_4 o bien por sacarosa tanto en las soluciones mucosas o serosas. Asociado con la aparición de potenciales de difusión transmural, estos flujos tienen probablemente el mismo origen que los observados en la vesícula biliar de conejo (Van Os y col. 1979 y 1976) en condiciones similares. El reemplazo unilateral de Cl^- por $\text{SO}_4^{=}$, en la ausencia de sodio, generó un importante J_w , junto con el desarrollo de un potencial biónico (Tabla III). Esta observación también sostiene la hipótesis previamente descripta.

Cuando el flujo neto de agua fue inducido por un gradiente osmótico impuesto externamente apareció un potencial transepitelial significativo, su polaridad era opuesta a la observada en idénticas condiciones experimentales, en el epitelio de la vesícula biliar de conejo . En este último tejido la dP observada fue atribuida a la polarización del soluto en las capas no mezcladas (Van Os y col., 1976; Wright y col., 1972). Sin embargo, Tripathi y Boulpaep han informado recientemente en el túbulo proximal de Ambystoma, un potencial transepitelial osmóticamente inducido ("streaming potential"), que ellos consideran como verdaderos fenómenos electrocinéticos y no potenciales de difusión primarios a través de uniones estrechas selectivas para aniones (Tripathi y Boulpaep, 1988).

Una interpretación para lo aquí descrito como potencial transepitelial "osmóticamente inducido" llevaría a aceptar la existencia de una ruta osmótica conteniendo pequeños canales para agua donde el "potencial osmóticamente inducido" se desarrollaría (Fischbarg y col., 1985). En paralelo, habría un camino mayor a través el cual el agua se mueve cuando es aplicado un gradiente hidrostático (Pappenheimer, 1987; Pappenheimer y Reiss, 1987; Porta y col., 1989). Naftalin y Tripathi han interpretado al "potencial osmóticamente inducido" observado en el ileum de conejo, como reflejando la existencia de "canales osmóticos selectivos para cationes" teniendo la misma polaridad que

el aquí descrito (Naftalin y Tripathi, 1985; Tripathi y Boulpaep, 1988).

El valor de P_{osm} , calculado bajo condiciones de estado estacionario de J_w , evidentemente estuvo influenciado por la existencia de barreras en serie al movimiento de agua (Naftalin y Tripathi, 1985). Es también cierto que el tejido subepitelial forma una delgada capa de fluido no mezclado en la cual la polarización de sales y PEG reducirían la diferencia osmótica transepitelial efectiva. Sin embargo, este valor de P_{osm} puede ser comparado con aquellos obtenidos en diferentes condiciones experimentales, en el mismo tejido. Una importante dispersión de los datos fue observada en los flujos de agua inducidos por PEG, ésta dispersión probablemente refleja esa compleja situación.

Una importante cuestión a plantearse es: ¿cuál es la ruta para el movimiento de agua durante la transferencia isosmótica asociada al transporte de soluto?. Cuando el HCO_3^- fue reemplazado por el buffer Tris-Hepes se observaron flujos absortivos importantes junto a diferencias de potencial menores a 1 mV. Si en esta situación un J_w similar es inducido por un gradiente osmótico, "el potencial osmóticamente inducido" observado es significativamente mayor que el potencial de transporte. Esto sugiere que la ruta paracelular sería de importancia durante la reabsorción isotónica.

En suma nuestros resultados muestran que la absorción o secreción de agua en el ciego de rata son debidos al

balance de complejos mecanismos, donde movimientos osmóticos, hidrostáticos y asociados a solutos están profundamente interrelacionados.

CAPITULO IV

RESULTADOS EN COLON HUMANO

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La figura 12 muestra el registro simultáneo, minuto a minuto, de J_w y la CCC a través del colon humano distal "in vitro". Un flujo neto absortivo fue observado en muchos casos ($+0.36 \pm 0.04 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$, $X \pm \text{SEM}$, $n=21$). El tejido fue montado entre dos soluciones idénticas y bajo una presión hidrostática P de 13 cm de H_2O , aplicada del lado mucoso. La dP asociada en este caso fue de 11.3 ± 1.8 mV (serosa positivo). Este J_w absortivo varió de acuerdo con los gradientes hidrostáticos u osmóticos aplicados o cuando la composición iónica del medio era cambiada (Fig. 12). El reemplazo de Na^+ por colina⁺ a ambos lados del tejido, mucoso y seroso, redujo fuertemente la CCC y el J_w absortivo, siendo ambos efectos completamente reversibles. La dP y la CCC fueron ambos, parcialmente sensibles al amiloride 10^{-4} M (inhibición media 25 ± 8 %, $n=3$).

Permeabilidades osmóticas e hidráulicas

La figura 13 representa el J_w observado como una función de los gradientes hidrostáticos u osmóticos transepiteliales aplicados (el gradiente osmótico fue obtenido por agregado de PEG, $\text{PM} = 4000$, en el lado seroso).

En ambos casos se obtuvo una correlación lineal siendo

Fig. 12: FLUJO NETO DE AGUA Y CORRIENTE DE CORTOCIRCUITO EN EL COLON HUMANO DISTAL.

La corriente de cortocircuito (CCC) y el flujo neto de agua (Jw) fueron medidos simultáneamente en el colon humano montado entre dos soluciones standar idénticas, como siempre en condiciones basales una presión hidrostática de 13 cm de H₂O era aplicada en el lado mucoso. Se observaron los efectos de; 1) la remoción de Na⁺; 2) aumento de ΔP (+19 cm de H₂O); 3) creación de un gradiente osmótico transepitelial (+40 mOsm, agregado de PEG en el lado seroso) y 4) remoción de HCO₃⁻.

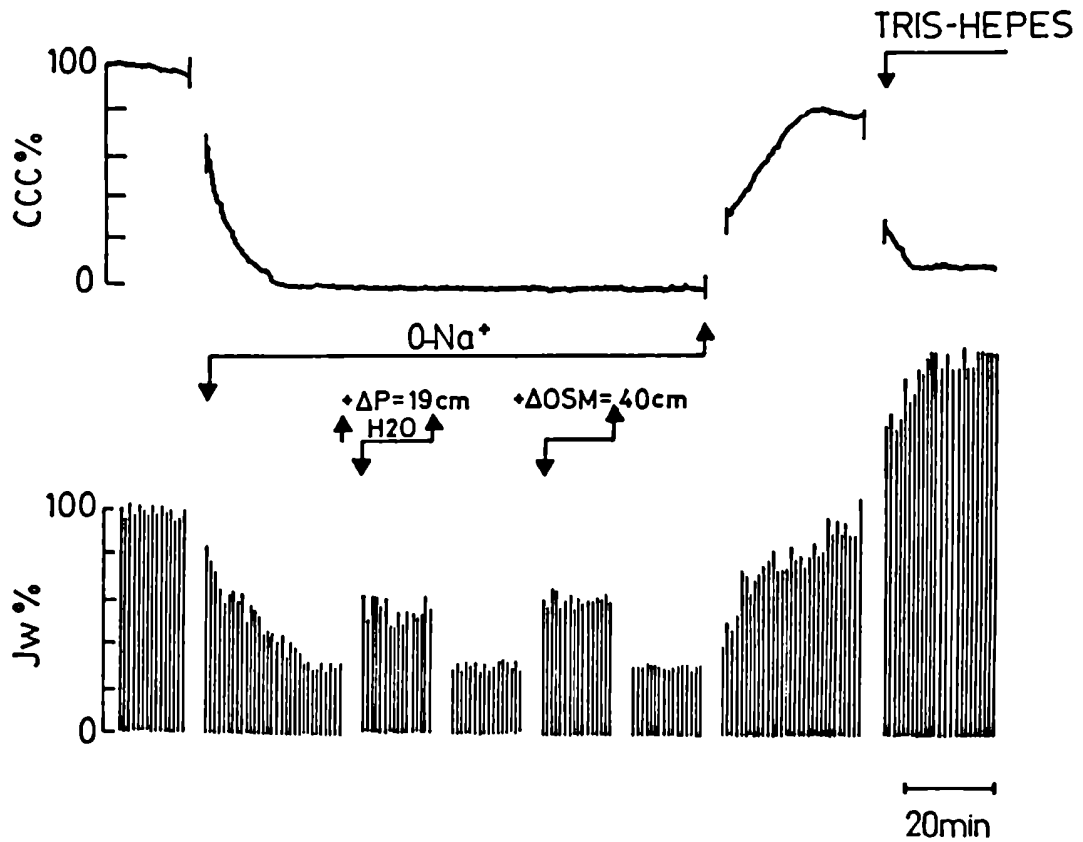
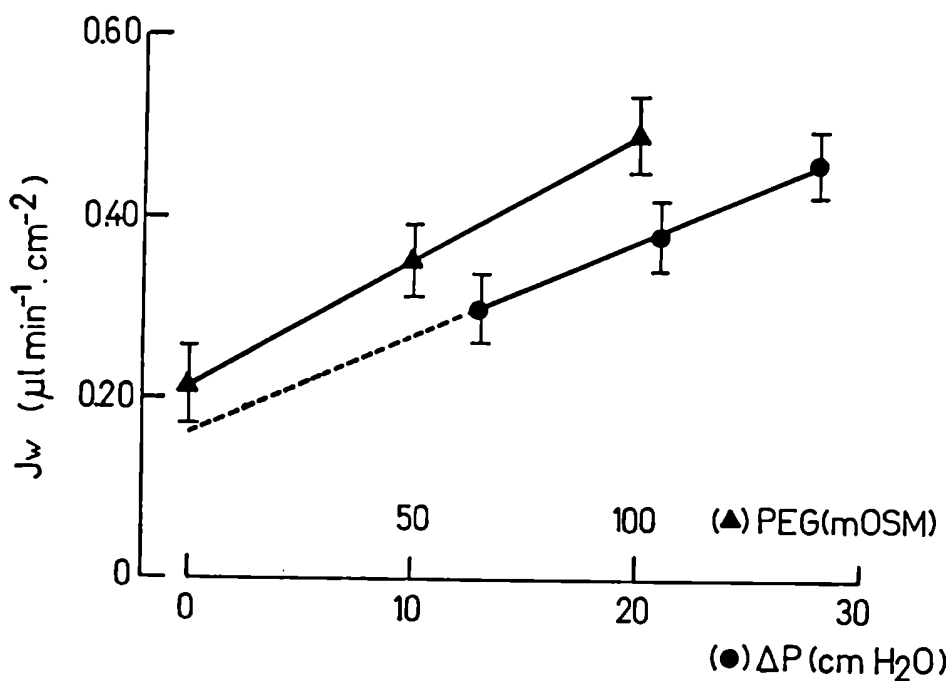


Fig. 13: EFECTO DE LOS GRADIENTES OSMOTICOS O HIDRAULICOS SOBRE EL FLUJO NETO DE AGUA.

Se observó una relación lineal cuando cualquiera de los gradientes, osmóticos o hidráulicos era incrementado. De la pendiente de las rectas se calcula la $Phid = 0.22 \pm 0.03$ cm/s y la $Posm = 0.0028 \pm 0.0005$ cm/s.



Phid (0.22 ± 0.03 cm/s, $\bar{X} \pm$ SEM, n= 6) y Posm (0.0028 ± 0.0005 cm/s, $\bar{X} \pm$ SEM, n= 6), éstas fueron en cada caso, calculadas a partir de la pendiente de la curva de regresión. En el caso de ΔP vs J_w , la ordenada al origen representa el J_w observado en ausencia de cualquier tipo de gradiente, ya sea éste químico, osmótico o hidrostático, y probablemente, indica el J_w absortivo asociado al transporte activo iónico.

Rol de los iones Na^+ , Cl^- y HCO_3^- en el J_w observado

Para entender el rol del Na^+ , el Cl^- y el HCO_3^- en el J_w observado, el "protocolo de los tres fragmentos" fue utilizado, como se explicó en la sección métodos, luego de ser extraído el fragmento de colon del paciente, se mantenía en una solución de alto contenido de potasio y de composición similar al medio interno celular, con este sistema se podían tomarse fragmentos del mismo colon mantenidos a baja temperatura luego de dos y cuatro horas de producida la ablación; estos fragmentos puestos en soluciones fisiológicas similares al plasma y a $37^\circ C$ en poco tiempo recuperaban sus condiciones basales, lo que permitió estudiar varias condiciones en el mismo colon, pudiendo hacer comparaciones con datos apareados.

En una primera serie experimental, se testearon tres condiciones diferentes. De forma tal de no crear gradientes

de concentración u osmóticos todos los cambios iónicos se realizaron simultánea y simétricamente a ambos lados del tejido. Las soluciones testeadas fueron: 1) solución standard humana (SSH), 2) el NaCl fue reemplazado en la SSH por cloruro de colina y las restantes sales de sodio por sales de potasio, 3) las sales de cloruro fueron reemplazadas por sales de $\text{SO}_4^{=}$. Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla V. Se puede observar que 1) la remoción de Na^+ vuelve la dP y la CCC no significativamente diferentes de cero junto una fuerte reducción en el Jw, 2) el reemplazo de Cl^- por $\text{SO}_4^{=}$ no cambió significativamente el Jw absorptivo pero indujo un significativo aumento en la resistencia transepitelial.

En una segunda serie experimental empleando el protocolo de los tres fragmentos, las siguientes series experimentales fueron comparadas : 1) solución standard humana, 2) el buffer Tris-Hepes reemplazó al buffer bicarbonato y 3) las sales de $\text{SO}_4^{=}$ reemplazaron las sales de Cl^- en medio regulado por buffer Tris-Hepes. Los resultados obtenidos son resumidos en la tabla VI. Se puede observar que: 1) en la ausencia de bicarbonato tanto la dP como la CCC son fuertemente reducidos observándose también un importante incremento en Jw sin cambio en la resistencia transepitelial y 2) en ausencia de HCO_3^- y Cl^- , el Jw observado fue más alto que en las condiciones standard, evidenciándose asimismo un incremento de la resistencia transepitelial.

TABLA V

dP TRANSEPITELIAL, CCC, RESISTENCIA (R) Y Jw EN EL COLON HUMANO DISTAL
 ABSORPTIVO

	STANDARD	0-SODIO	0-CLORO
dP (mV)	8.4 ± 1.4	0.5 ± 1.6	13.8 ± 3.9 (ΔdP= 5.4 ± 2.1*)
CCC (µA/cm2)	83 ± 10	1.3 ± 6.7	87 ± 12
R (ohms.cm2)	101 ± 16		159 ± 27 (ΔR= 58 ± 18 *)
Jw (µl/(min.cm2))	0.16 ± 0.03	0.04 ± 0.13	0.17 ± 0.05

*p <0.01, prueba t de datos pareados.

Tres medios diferentes fueron ensayados: buffer standard, 0-sodio y 0-cloro. Los datos presentados son $\bar{X} \pm SEM$, n= 6. El componente hidrostático de Jw (0.20 µl/(min.cm2)) fue substraído.

Flujo neto espontáneamente secretorio en el colon humano distal "in vitro"

Los resultados previamente presentados pueden ser entendidos, si el J_w neto absortivo es considerado integrado por dos componentes, un flujo mayor absortivo y un componente menor secretor. Cuando estuvieron montadas entre dos soluciones salinas idénticas, algunas preparaciones presentaron un flujo neto espontáneo secretor (se debe remarcar que en este caso el tejido mueve agua en contra del gradiente de presión aplicado del lado mucoso, 13 cm de H_2O). Aún más, cuando los tres fragmentos del mismo órgano fueron montados consecutivamente, ellos se comportaron consistentemente como absortivos o secretorios. La figura 14 presenta el registro simultáneo de J_w y CCC en un experimento secretorio. La dP media observada fue de 11.9 ± 2.1 mV y el J_w de -0.55 ± 0.11 $\mu l / (\text{min} \cdot \text{cm}^2)$ ($n=9$). Es interesante hacer notar el hecho de que en ambos tipos de tejidos (absortivos y secretorios), no se observaron diferencias en la dP y la CCC, y que la única forma de distinguirlos fue a través de la medición simultánea de J_w .

El protocolo de los tres fragmentos, fue también empleado en los tejidos secretorios. Las condiciones testeadas fueron similares a la series anteriores: 1) solución standard humano, 2) depleción de sodio del medio y

TABLA VI

dP TRANSEPIITELIAL, CCC, RESISTENCIA (R) Y Jw EN EL COLON HUMANO DISTAL
 ABSORPTIVO

	STANDARD	O-BICARBONATO	O-CLORO/O-BICARBONATO
dP (mV)	9.4 ± 3.4	2.9 ± 1.6	9.8 ± 2.9
CCC (μ A/cm ²)	78 ± 17	24 ± 5	58 ± 11
R (ohms . cm ²)	120 ± 14		169 ± 15 (Δ R= 49 ± 15*)
Jw (μ l/(min. cm ²))	0.15 ± 0.05	0.37 ± 0.13	0.25 ± 0.03 (Δ Jw= 0.10 ± 0.04*)

*p < 0.01, prueba t de datos pareados.

Tres medios diferentes fueron ensayados: buffer standard, Tris-Hepes reemplazando NaHCO₃ y Tris-Hepes reemplazando NaHCO₃ mas SO₄= reemplazando Cl- en ambos medios, mucoso y seroso. Datos \bar{X} ± SEM, n=6

Fig. 14: FLUJO NETO DE AGUA Y CORRIENTE DE COROCIRCUITO EN EL COLON HUMANO SECRETOR.

Registro simultáneo del flujo neto de agua (Jw) y la corriente de cortocircuito (CCC) en un tejido colónico espontáneamente secretor. Se registra el efectos del reemplazo del Na^+ por colina $^+$ y Cl^- por $\text{SO}_4^{=}$.

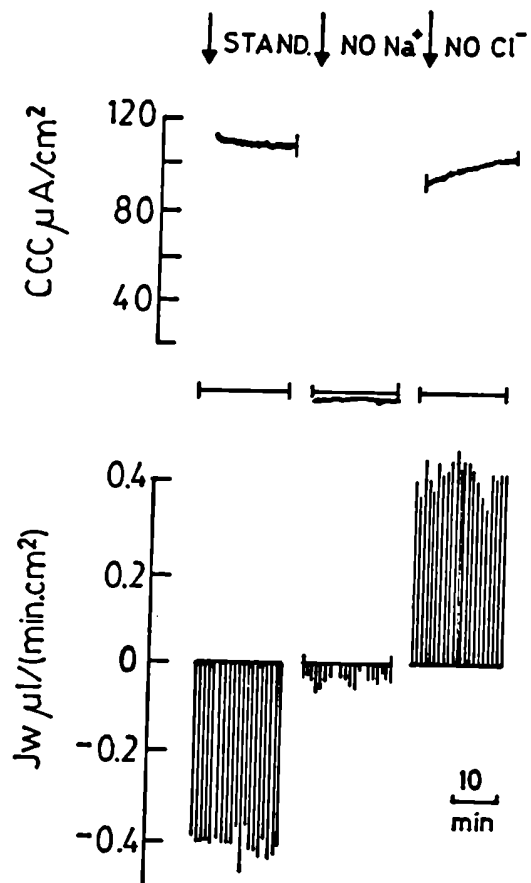


TABLA VII

dP TRANSEPITELIAL, CCC, RESISTENCIA (R) Y Jw EN EL COLON HUMANO DISTAL SECRETOR

	STANDARD	0-SODIO	0-CLORO
dP (mV)	9.8 ± 1.9	-0.7 ± 1.2	17.6 ± 2.6 (ΔDP= 7.8 ± 2.1)
CCC (μA/cm ²)	110 ± 17	-3.9 ± 11.1	104 ± 22
R (ohms.cm ²)	89 ± 11		169 ± 14 (ΔR= 80 ± 18 *)
Jw (μl/(min.cm ²))	-0.60 ± 0.06	0.04 ± 0.09	0.22 ± 0.05

*p < 0.01, prueba t de datos pareados.

Tres medios diferentes fueron ensayados: buffer standard, 0-sodio y 0-cloro. Los datos presentados son $\bar{X} \pm SEM$, n= 6. El componente hidrostático de Jw (0.20 μl/(min.cm²)) fue substraído.

3) reemplazo de iones SO_4^- por iones Cl^- . Los resultados resumidos en la tabla VII indican que como en el caso de las preparaciones absortivas dP, CCC y Jw cayeron a cero en ausencia de Na^+ y que cuando el SO_4^- reemplazó al Cl^- el Jw se revertió de la secreción a la absorción, junto con un incremento en la dP y la resistencia transepitelial.

El efecto de la norepinefrina y el AMPcíclico sobre el Jw y la CCC

Ha sido previamente informado que la epinefrina comienza un decremento notorio en la CCC en el colon humano "in vitro" sin observarse cambios en los flujos unidireccionales de Na^+ y Cl^- (Sellin y De Soigne, 1987). Aquí se ensayó los efectos de la norepinefrina ($5 \cdot 10^{-6}$ M) sobre la determinación simultánea de Jw y la CCC. Se puede observar en la figura 15 (curva promedio de 4 experimentos) que la disminución en la CCC estaba claramente en paralelo con un aumento en Jw. El tiempo medio para ambos procesos fueron, respectivamente, 11.4 ± 2.1 min y 11.4 ± 2.0 min. Dos de los tejidos testeados fueron inicialmente secretorios y la norepinefrina revertió esta situación. Las variaciones medias observadas en el Jw, dP, CCC y en la resistencia son presentadas en la Tabla VIII.

También ha sido informado que la teofilina, un secretagogo mediado por AMPc, incrementa CCC e induce secreción de Cl^- en el colon distal "in vitro" (Sellin y De Soigne, 1987). Hemos estudiado simultáneamente CCC y Jw bajo la acción de un potente análogo del AMPc, el 8Br-AMPc, 10^{-3} M

Fig. 15: EFECTO DE NOREPINEFRINA
Efecto de norepinefrina ($5 \cdot 10^{-6}$ M), agregada del lado seroso, sobre el Jw y La corriente de cortocircuito (CCC). Registro simultáneo de cuatros experimentos (CCC: % del valor control).

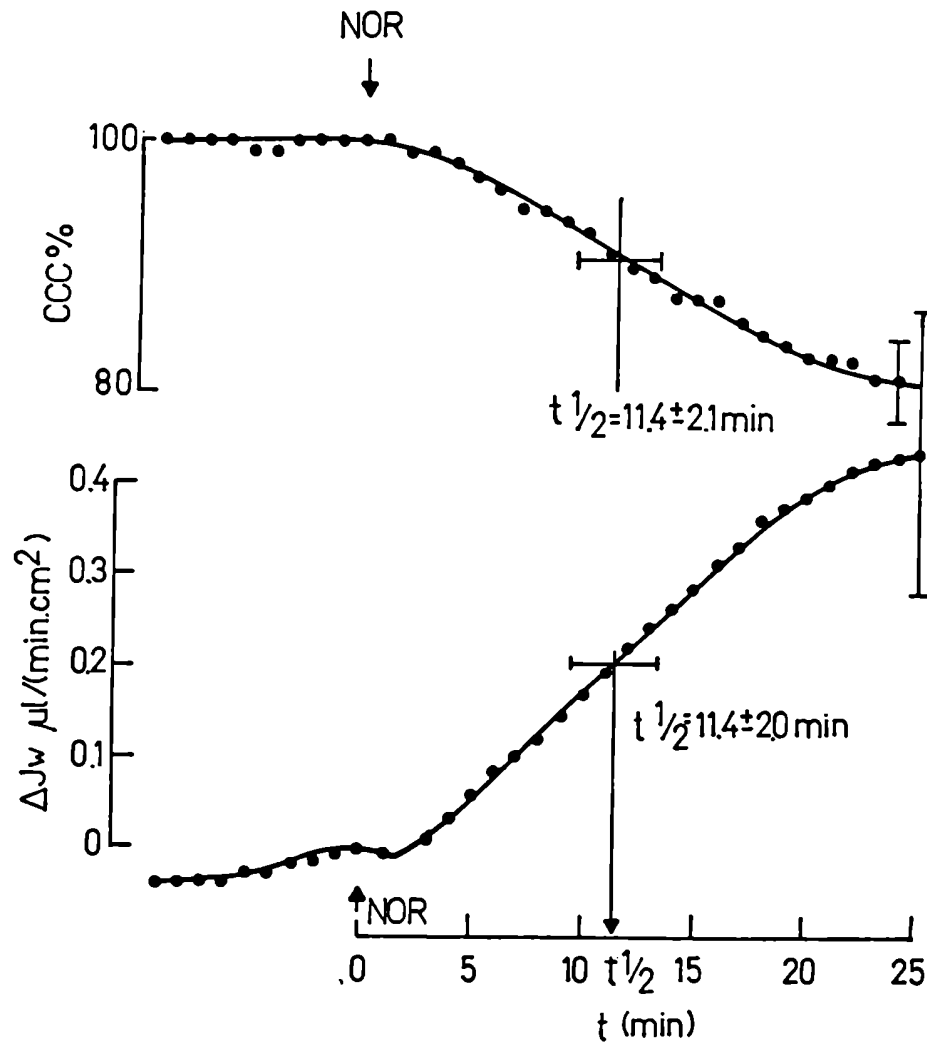


TABLA VIII

EFECTO DE NOREPINEFRINA Y 8-BrAMPc EN COLON HUMANO DISTAL

	ΔJ_w $\mu l / (\text{min} \cdot \text{cm}^2)$	ΔdP (mV)	ΔCCC ($\mu A / \text{cm}^2$)	ΔR (ohm $\cdot \text{cm}^2$)
Norepinefrina (5.10exp-6M)	+0.43 \pm 0.13	-0.90 \pm 0.37	-13.4 \pm 5.2	-1.0 \pm 5.7
P	<0.025	<0.05	<0.05	ns
8-Br AMPc (1.10exp-3)	-0.12 \pm 0.03	+1.43 \pm 0.48	+2.26 \pm 3.40	+24.7 \pm 7.4
P	<0.01	<0.05	ns	<0.025

Prueba t antes-después en todas las condiciones.

Los efectos de norepinefrina y 8-Br AMPc sobre la diferencia de potencial (dP), corriente de cortocircuito (CCC), resistencia y J_w en el colon humano distal fueron observados tanto en epitelios absorptivos o secretorios (n= 4).

La figura 16 muestra un registro típico en el cual los efecto del nucleótido sobre la CCC y Jw fueron simultáneamente testeados. El aumento en CCC fue en este caso, paralelo a una disminución en el Jw absortivo (valores medios en la Tabla VIII). Estos resultados fueron acompañados por un significativo incremento en la resistencia transepitelial (Tabla VIII).

DISCUSION

Flujo neto osmótica e hidráulicamente conducido en el colon humano distal

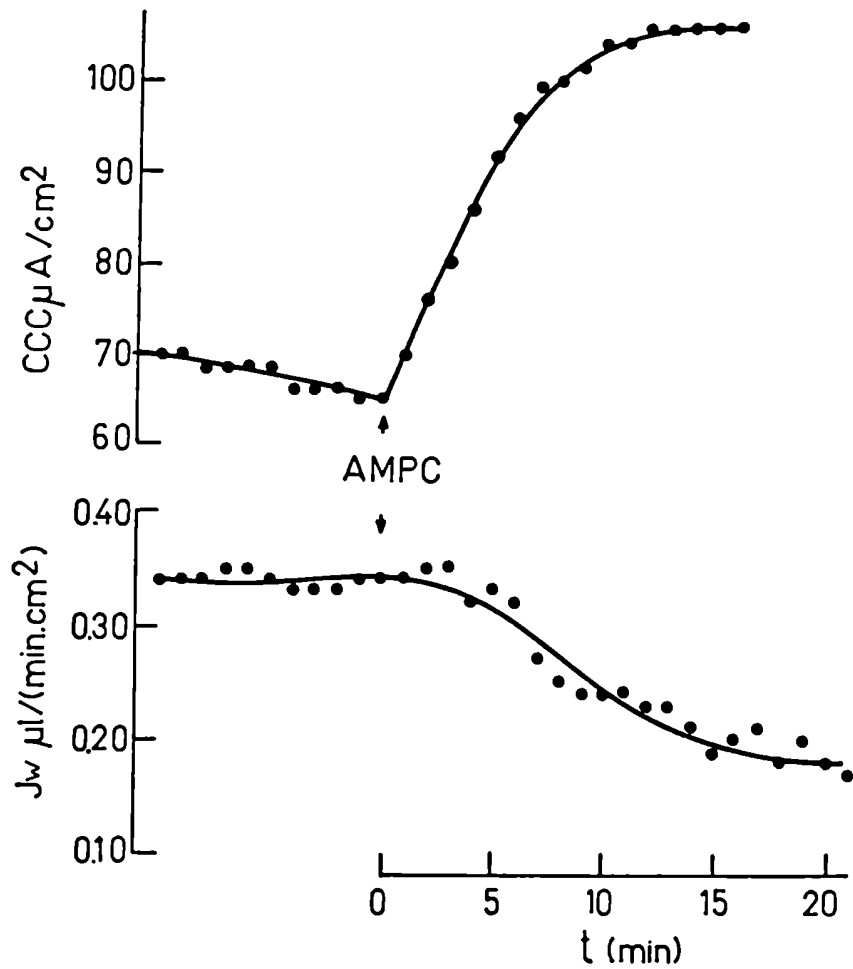
El Jw fue, en el colon humano distal "in vitro", una función lineal de los gradientes osmóticos o hidrostáticos. aplicados similarmente a como se observó en otras barreras epiteliales. Los valores observados fueron semejantes a los informados en el ciego de rata y los valores de P_{hid} y de P_{osm} indicarían que la presión hidrostática es 100 veces más efectiva que el gradiente osmótico para mover agua a través del colon humano "in vitro". Debe considerarse, sin embargo, que nuestras medidas osmóticas estarán probablemente afectadas por los fenómenos de barrido ("sweeping away") y de "polarización de solutos", asociado con el fenómeno de las capas no mezcladas (Wright y col., 1972).

Como se dijo anteriormente en el ciego de rata control, es generalmente aceptado, que la presión hidrostática en el

rango empleado en este estudio (24.4 cm de H₂O= 1 mOsm) no mueve agua transcelularmente (Van Os y col., 1979). En el caso de los flujos asociados a gradientes osmóticos o transporte probablemente podrían mover agua, ya sea, entre o a través de las células (Fischbarg y col., 1976).

Fig. 16: EFECTO DE 8-Br AMPc

Efecto del agregado de 8-Br AMPc (1.10×10^{-3} M) del lado seroso, sobre el registro simultáneo de J_w y CCC en un experimento representativo.



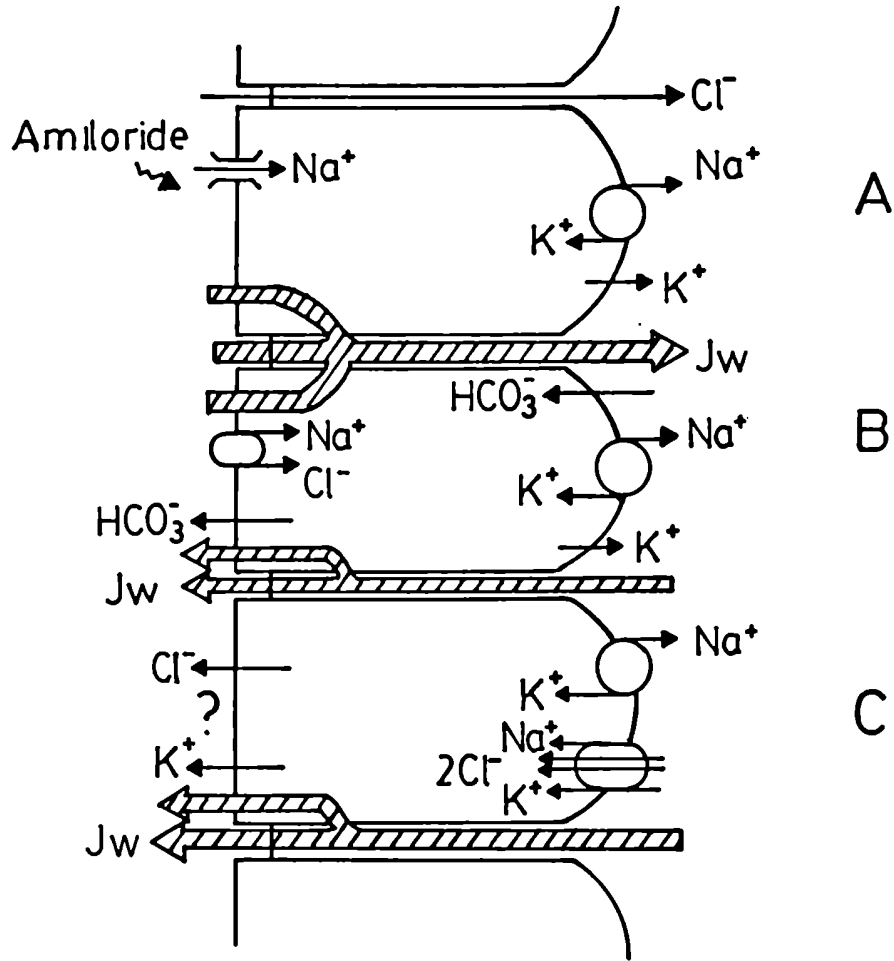
Jw asociado a transporte en el colon humano distal

Nuestros resultados mostraron un Jw absortivo neto en el colon humano "in vitro", en la mayoría de los casos estudiados. Se demostró que este Jw absortivo en ausencia de todo tipo de gradiente, químico, osmótico o hidráulico, estaba asociado con una diferencia de potencial positiva del lado seroso, y parcialmente sensible al amiloride del lado mucoso. Tanto la dP como el Jw asociado fueron sensibles a la presencia de Na⁺ en el medio de incubación. El reemplazo del Cl⁻ por SO₄⁼ no modificó el Jw absortivo, pero incrementó la resistencia transepitelial. Finalmente la remoción de HCO₃⁻ redujo fuertemente la diferencia de potencial transepitelial y la CCC junto con un importante aumento del Jw absortivo.

Las observaciones presentes sobre el Jw asociado a transporte pueden ser acomodados en el marco de los informes previos sobre los movimientos iónicos en el colon humano (Sellin y De Soigne, 1987), los mecanismos propuestos son resumidos en la figura 18. En la célula superior (A) una entrada de Na⁺ electrogénica y sensible al amiloride en el borde mucoso está acoplada con la Na⁺/K⁺ ATPasa presente en la membrana basolateral (Grady y col., 1970; Hawker y col., 1978). El ion Cl⁻ se mueve a través de un camino paracelular de baja resistencia (Sandle y McGlone, 1987). La entrada no electrogénica de Na⁺ sumada a Cl⁻ es propuesta en la segunda célula (B) (Hayslett y col., 1980). Ambos mecanismos

Fig. 17: POSIBLES MECANISMOS PARA EL MOVIMIENTO DE AGUA E IONES.

El modelo propuesto se basa en datos discutidos en este capítulo y en resultados presentados por otros investigadores con anterioridad.



(A y B) resultan en la reabsorción de NaCl. Este movimiento de sales conducirá un J_w neto absortivo que puede ser representado como parcialmente moviéndose transcelularmente y parcialmente paracelularmente. La importancia de las rutas paracelular y transcelular en los movimientos netos de agua asociados a transporte permanece, como se estableció anteriormente, como una cuestión abierta.

El J_w absortivo fue, en nuestras condiciones experimentales, dependiente de la presencia de Na^+ en el medio de incubación. Esto no es inesperado, si consideramos que el transporte de sodio está conduciendo la reabsorción de agua. El reemplazo del Cl^- por $\text{SO}_4^{=}$ no cambió significativamente el J_w absortivo ni la CCC. Sin embargo, la dP y la resistencia cayeron en esta situación, indicando que el sulfato tiene una menor permeabilidad que el Cl^- , tal como se ha observado en otros tejidos.

La secreción de bicarbonato ha sido descrita en el colon humano "in vivo" (Davis y col., 1983) y ha sido postulado en el colon humano "in vitro" (Sellyn y De Soigne, 1987). Hemos agregado este mecanismo en la célula B, acoplado a la entrada de HCO_3^- en la membrana basolateral. Este mecanismo hipotético permite explicar el efecto de la remoción de bicarbonato en nuestros experimentos: una reducción en la CCC junto con un incremento en el J_w absortivo. Este mecanismo, como ha sido propuesto por Sellin y colaboradores, podría no ser Cl^- dependiente (Sellin y De Soigne, 1987).

Se puede concluir que el J_w absortivo en la mayoría de los experimentos resulta de la suma algebraica de una fracción mayor absortiva, acoplada a la absorción de NaCl y una fracción menor secretoria, acoplada a la secreción de bicarbonato. Ambos mecanismos requieren de la presencia de sodio para ser operativos (CCC y J_w caen a cero en la ausencia de este ion).

De acuerdo a los datos y en conclusión analizando el modelo previo, el J_w debe ser puramente absortivo en ausencia del HCO_3^- y del Cl^- del medio. A partir de la corriente de cortocircuito observada ($58 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) y del flujo neto de agua ($0.25 \mu\text{l}/(\text{min}.\text{cm}^2)$) se puede calcular la concentración iónica del fluido transportado en estas condiciones; siendo este valor de aproximadamente de 136 mEq/l. Esto indica que la reabsorción de NaCl no estaría lejos de la isotonicidad en el colon humano "in vitro".

Secreción de bicarbonato y acción de la norepinefrina

La epinefrina reduce la CCC en el colon humano "in vitro" sin cambios en los flujos unidireccionales de Na^+ y Cl^- (Sellin y De Soigne, 1987). Estos resultados han sido interpretados como debidos a una alteración en el transporte de otro ion, probablemente sea debido a la inhibición de la secreción de bicarbonato (Sellin y De Soigne, 1987). Nosotros hemos observado que la norepinefrina induce una

disminución en la CCC paralelamente a la disminución en el J_w absortivo (Fig. 15). Estos resultados también son compatibles con la inhibición de la secreción de bicarbonato. De los datos presentados en la tabla VIII se puede calcular la cantidad de agua acoplada a la secreción de HCO_3^- . Si aceptamos que el incremento en el J_w absortivo neto es debido a la reducción en el componente secretor del movimiento neto de agua, un incremento en J_w de $0.43 \mu\text{l}/(\text{min cm}^2)$ estuvo acompañado con una disminución de $13 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en la CCC. Esto indicaría una concentración iónica de 16 mEq/l , la cual no es significativamente diferente de la concentración empleada de bicarbonato.

La acción del AMPc y la presencia de J_w neto secretorio.

Ha sido previamente demostrado que el AMPc (Harris y Shield, 1970) y la teofilina (Sellin y De Soigne, 1987) estimulan la secreción de Cl^- en el colon de mamíferos. Nosotros observamos ahora que bajo la acción del nucleótido, un incremento en el J_w secretorio junto con un incremento en la dP y la CCC. (Fig. 15, Tabla VIII).

La situación descrita en C (Fig. 16), también basada en información disponible previamente sobre el colon humano (Parsons y Paterson, 1965; Sellin y De Soigne, 1987) puede ser útil para entender la acción del AMPc y el J_w secretorio espontáneo observado en algunos experimentos: un

cotransporte no electrogénico $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ en el borde seroso (Mc Cabe y Smith, 1985) está acoplado con la secreción de Cl^- y K^+ en el borde mucoso. Este sistema es similar a uno descrito bajo la adaptación al potasio en el colon de rata (Hayslett y col.; 1982, Fondacaro, 1986). y es dependiente a la presencia de Cl^- y sensible a la estimulación con AMPc. (Harris y Shield, 1970).

Como ya se dijo anteriormente, la observación, en algunos tejidos, de un Jw neto espontáneamente secretor fue un resultado inesperado, ya que tanto la dP como la CCC son similares en fragmentos absortivos y secretorios. Una posible hipótesis para comprender esta situación sería considerar que la secreción de Cl^- , vía el sistema adenilato ciclasa, estaría estimulada en estos pacientes y concomitante a este movimiento de Cl^- habría un flujo neto secretor de agua. Esta es sustentada por el hecho de que fragmentos secretorios son absortivos en la ausencia de Cl^- y también hay que considerar los efectos del AMPc, donde el Jw absortivo disminuye con un aumento paralelo de la CCC, indicando el incremento de la secreción de un ion negativo (Tabla VIII, Fig. 13 y 16). La secreción de Cl^- podría estar operando a un nivel muy bajo en los fragmentos netamente absortivos.

En suma, se puede aceptar que el movimiento neto de agua en el colon humano distal resulta de la suma algebraica del Jw asociado a transporte absortivo, un Jw asociado a transporte secretor, un Jw osmóticamente

conducido y un Jw conducido hidráulicamente. El Jw secretor puede estar asociado a dos diferentes iones el HCO_3^- y el Cl^- y considerando ya sea la secreción de HCO_3^- o bien la secreción de Cl^- . Esta compleja situación puede ser entendida en base a información disponible previamente sobre el movimiento iónico en el colon de mamíferos. Experimentos futuros aclararán los diferentes mecanismos iónicos y si los correspondientes Jw absortivos o secretorios puede ser correlacionados con estructuras anatómicas específicas.

CAPITULO V

RESULTADOS EN

CIEGO DE RATAS ADAPTADAS A UNA DIETA ALTA EN POTASIO

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Las ratas alimentadas durante 12 días con una dieta cuya concentración de potasio fue aumentada hasta una concentración de un 13% p/p, producen un aumento en la aldosterona circulante e importantes cambios fisiológicos en el riñón y en el colon distal, pero hasta ahora no se conocía su efecto sobre el ciego.

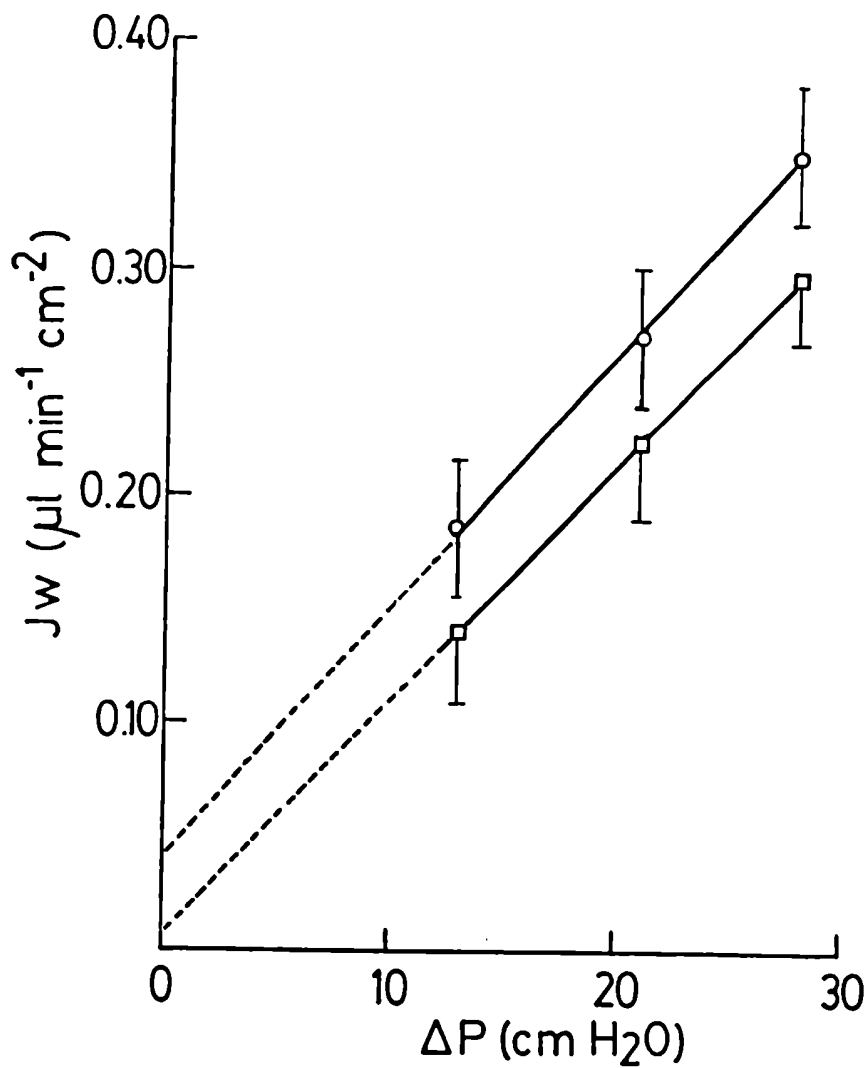
Nuevamente, cuando el ciego adaptado fue montado entre dos cámaras, como se explicó en métodos, se observó una diferencia de potencial transepitelial espontánea de 7.52 ± 1.10 mV (n= 11) y un flujo neto absorbente de agua de 0.20 ± 0.03 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Similarmente a los resultados observados en ciego de rata control, estos eran fuertemente dependientes de la composición de los medios o bien de los gradientes osmóticos o hidrostáticos presentes.

Efecto de los gradientes hidrostáticos transepiteliales sobre el J_w : rol del Na^+ , Cl^- y HCO_3^- .

La figura 18 muestra el J_w observado como una función de la ΔP transepitelial aplicada en diferentes condiciones experimentales. En una primera serie dos condiciones fueron testeadas: 1) solución standard rata presente a ambos lados del ciego; 2) se reemplaza el cloruro de sodio por cloruro de colina en la solución anterior. Idénticamente a los

Fig. 18: EFECTO DEL GRADIENTE HIDROSTATICO

Existe una relación lineal entre el J_w observado y el gradiente hidrostático aplicado. No se observa cambio de pendiente con los diferentes medios. (o) solución standard rata, (\square) el Na^+ es reemplazado por colina⁺ en la solución anterior.



tejidos anteriores, de la pendiente se obtiene la Phid correspondiente y de la ordenada al origen se obtiene el flujo neto asociado a transporte (Jwt). Este Jwt no fue significativamente diferente de cero en ninguna de las dos condiciones anteriores, teniendo permeabilidades del mismo orden no significativamente diferentes entre sí (Tabla IX).

En una segunda serie experimental $\text{SO}_4^{=}$ reemplazó al Cl^- en la solución de ambos baños, mucoso y seroso (la osmolaridad total fue ajustada con PEG, PM= 4000). En esta condición el Jwt se volvió claramente positivo, ocurriendo un neto incremento en la Phid (Tabla IX).

Finalmente, la remoción de HCO_3^- (buffer Tris-Hepes en ambos baños) no induce cambios significativos en el Jwt ni en en la Phid (Tabla IX).

Diferencia de potencial transepitelial, corriente de cortocircuito y movimiento iónicos unidireccionales

La adaptación al potasio induce en el ciego de la rata, tal como fue observado en otras partes del intestino grueso (Sandle y col., 1985), un aumento en la diferencia de potencial transepitelial (Tabla IX), este incremento es acompañado por un incremento de la CCC ($57.8 \pm 7.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), no habiendo cambios en la resistencia transepitelial ($130 \pm 16 \mu.\text{cm}^2$) esto datos pueden ser comparados con los valores

Fig. 19: dP EN EL CIEGO DE RATA ADAPTADA

Gráfico de la dP transepitelial en el ciego de rata adaptada en función del tiempo. Se observa una caída de la dP en adaptadas por la presencia de amiloride $1 \cdot 10^{-5}$ M y un aumento cuando el Cl^- es reemplazado por $\text{SO}_4^{=}$.

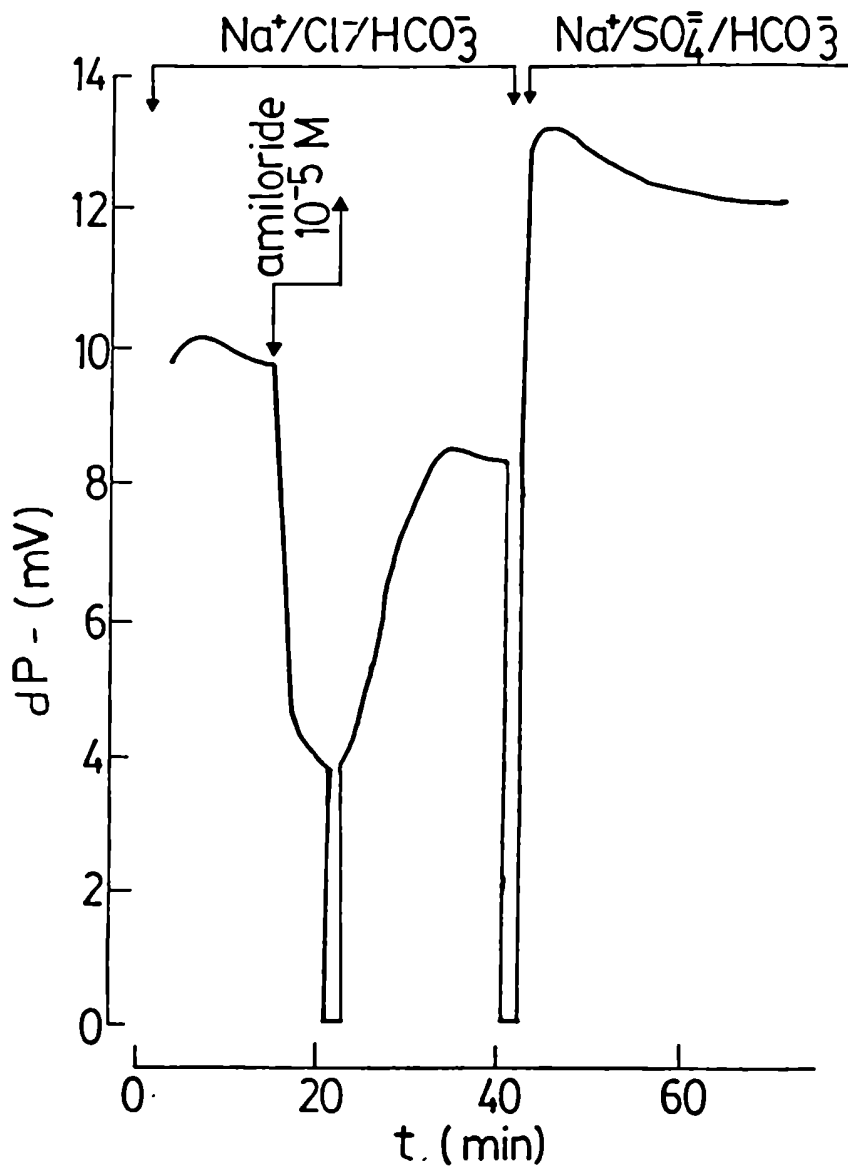


TABLA IX

Jw , Phidr, dP EN FUNCION DE LA COMPOSICION DEL MEDIO

		Jwt (ul/min.cm ²)	Phyd (cm/s)	dP (mV)
NaCl	1) control	0.17 ± 0.03 (13)	0.16 ± 0.02 (13)	3.7 ± 0.5 (7)
	2) adaptadas	0.06 ± 0.06 (11)	0.19 ± 0.03 (11)	7,5 ± 1.1 (11)
	diff	-0.11 ± 0.02 P < 0.01	+0.03 ± 0.03 NS	+4.20 ± 1.4 P < 0.02
Na ₂ SO ₄	3) control	0.25 ± 0.03 (14)	0.18 ± 0.06 (5)	0.5 ± 0.2 (11)
	4) adaptadas	0.39 ± 0.09 (7)	-0.003 ± 0.03 (7)	13.8 ± 0.6 (8)
	diff.	+0.14 ± 0.08 NS	-0.18 ± 0.06 P < 0.02	+13.3 ± 0.45 P < 0.001
Colina-Cl	5) control	0.04 ± 0.03 (6)	0.22 ± 0.04 (6)	0.1 ± 0.1 (6)
	6) adaptadas	0.01 ± 0.03 (5)	0.21 ± 0.04 (5)	0.1 ± 0.1 (7)
	diff.	-0.03 ± 0.04 NS	+0.01 ± 0.06 NS	0.0 ± 0.2 NS
Tris-Hepes	7) control	0.26 ± 0.04 (7)	0.20 ± 0.05 (5)	0.7 ± 0.2 (4)
	8) adaptadas	0.07 ± 0.05 (4)	0.16 ± 0.04 (4)	0.1 ± 0.1 (3)
	diff.	-0.19 ± 0.07 P < 0.05	-0.04 ± 0.07 NS	-0.6 ± 0.2 NS
	diff 4-2	+0.33 ± 0.08 P < 0.001	+0.19 ± 0.04 P < 0.001	-6.3 ± 1.4 P < 0.001
	diff 6-2	+0.05 ± 0.09 NS	-0.02 ± 0.05 NS	+7.4 ± 1.4 P < 0.001
	diff 8-2	-0.01 ± 0.06 NS	+0.03 ± 0.05 NS	+7.4 ± 2.2 P < 0.01

Flujo neto de agua asociado a transporte (Jwt), coeficiente de permeabilidad hidráulica (Phid) y diferencia de potencial (dP) en el ciego de ratas adaptadas a una dieta rica en potasio.

NaCl: buffer standard en ambos lados del tejido, Na₂SO₄: SO₄= reemplaza a Cl- en el medio, Colina-Cl: colina reemplaza al Na+ en el medio, Tris-Hepes: el buffer Tris-Hepes reemplaza el buffer bicarbonato.

de ratas controles (Tabla II). Esta dP desaparece en ausencia de Na^+ en el medio de incubación y es fuertemente reducido en ausencia de HCO_3^- (Tabla IX).

Se observa un claro y sostenido aumento de dP cuando el Cl^- es reemplazado por el $\text{SO}_4^{=}$ (Fig. 19).

Una variación importante en la adaptación es que la diferencia de potencial se vuelve sensible al amiloride (10^{-4} M, Fig. 19) (antes del agregado de amiloride; 6.2 ± 2.2 mV; luego: 3.2 ± 1.3 mV; dif. media -3.28 ± 0.73 mV, $n=5$, $p < 0.01$).

En la tabla X se muestra la dP transepitelial, la CCC, los flujos unidireccionales de Na^+ , Cl^- y Rb^+ y los movimientos netos de estos iones (Cl^- y Rb^+ fueron medidos en experimentos de doble marcaje). Se puede observar comparando estos resultados con aquellos de la tabla II, de ciego de rata control, que existen notables diferencias: 1) La absorción neta de Na^+ es mayor que en controles, 2) la absorción neta de Cl^- desaparece y 3) se desarrolla una secreción neta de K^+ .

DISCUSION

Varios cambios adaptativos fueron observados en el ciego de ratas adaptadas comparado con el ciego control: 1) la ausencia de un movimiento neto de agua asociado a transporte en condiciones standard o bien en ausencia de

TABLA X

		Jms	Jsm μEq/(h, cm2)	Jnet	dP (mV)	CCC μA/(h. cm2)	R Ohm. cm2	
Na+	control	6	5.92 ± 0.55	3.55 ± 0.34	2.37 ± 0.68	3.4 ± 0.5	23.4 ± 3.2	145 ± 14
	adaptadas	4	7.55 ± 0.91	3.06 ± 0.26	4.49 ± 0.44	6.8 ± 0.6	56.6 ± 7.1	120 ± 28
	dif		1.60 ± 0.60*	-0.49 ± 0.42	2.12 ± 0.78*	3.4 ± 0.78*	33.2 ± 6.8*	
Cl-	control	6	11.61 ± 1.02	8.16 ± 1.05	3.45 ± 1.46			
	adaptadas	8	5.96 ± 1.01	6.28 ± 1.30	-0.33 ± 1.65	5.8 ± 0.4	36.9 ± 3.9	157 ± 7
	dif		-5.65 ± 1.43*	-1.88 ± 1.67	-3.78 ± 2.20			
Rb+	control	6	0.169 ± 0.022	0.144 ± 0.021	0.0025 ± 0.023			
	adaptadas	8	0.104 ± 0.010	0.140 ± 0.015	-0.036 ± 0.009	5.8 ± 0.4	36.9 ± 3.9	157 ± 7
	dif		-0.065 ± 0.02*	-0.004 ± 0.026	-0.038 ± 0.009*			

*P < 0.05 prueba t para datos no pareados.

Flujos iónicos e unidireccionales, dP y CCC en el ciego de ratas adaptadas. Los flujos de Cl- y Rb+ fueron realizados en doble marcaje en los animales adaptados. Las medidas fueron siempre realizadas en condiciones de cortocircuito.

HCO_3^- , 2) un significativo aumento de la diferencia de potencial, la corriente de cortocircuito y la absorción neta de Na^+ , 3) la ausencia de flujo un neto de Cl^- en condiciones de cortocircuito, 4) el desarrollo de una sensibilidad a la acción del amiloride, 6) el efecto diferente de la presencia de amiloride en el J_w y la dP observada, 6) el desarrollo de una secreción neta de potasio.

Como se dijo inicialmente, no se observó J_w cuando el ciego de rata adaptada fue montado entre dos soluciones standard rata en ambos baños (Tabla IX). Se pueden dar dos hipótesis alternativas a este hecho; 1) no hay movimiento de agua asociado a transporte en el ciego de ratas adaptadas o 2) existe un movimiento de agua asociado a transporte secretorio (J_{wts}) que cancela movimiento de agua asociado a transporte absorptivo (J_{wta}) luego de la adaptación al potasio. Varias observaciones favorecen esta segunda posibilidad: primero la dP transepitelial, la CCC y la absorción neta de Na^+ son mayores comparadas con las controles y esto es difícil de conciliar con la ausencia de un J_{wta} . Segundo, la existencia de un flujo secretor está basado en las siguientes observaciones: 1) la dP desaparece en ausencia de Na^+ sin cambios en el J_w observado (siempre no significativamente diferente de cero, Tabla IX), y 2) cuando $\text{SO}_4^{=}$ reemplaza al Cl^- en el medio, aparece un importante J_w absorptivo (Tabla IX). Una conclusión directa de estos resultados sería aceptar que tanto J_{wta} como J_{wts}

son dependientes de Na^+ , mientras que solo el flujo secretorio es dependiente de Cl^- .

En el ciego de ratas controles se describió un Jwts dependiente de Cl^- y de HCO_3^- . El que sin embargo, representa una pequeña fracción del Jw observado. Cabría preguntarse si es explicable la ausencia de un Jw en los animales adaptados como debida a un aumento del Jwts observado en animales control. Sin embargo, una diferencia importante aparece: se desarrolla un Jw absortivo en ausencia de Cl^- pero no en ausencia de bicarbonato (en animales controles la ausencia de cualquiera de estos iones produce aumento del flujo neto absotivo). Para dar consistencia a estos resultados debería aceptarse que la absorción de sodio se vuelve bicarbonato sensible en los animales adaptados, ya sea por efecto del bicarbonato mismo o bien por un efecto del pH debido a que el buffer Tris-Hepes es un buffer no permeable a diferencia del HCO_3^- , lo que provocaría cambios en el pH intracelular, al cual ahora serían sensible los mecanismos de transporte en los animales adaptados. Además, se observó una neta secreción de potasio.

Tal vez, dos diferentes Jwts pueden estar presentes en el ciego de ratas adaptadas uno ligado a la secreción de HCO_3^- y otro ligado a la secreción de Cl^- .

Movimientos iónicos a través del ciego de ratas adaptadas

Además del aumento de la absorción de Na^+ una secreción neta de K^+ fue observada en el ciego adaptado. Esta secreción podría estar asociada con un J_{wts} y si aceptamos que el valor del J_{wta} es el flujo observado en presencia de $\text{SO}_4^{=}$ y por lo tanto J_{wts} tiene, en las condiciones standard, valores similares, se debe concluir que la concentración de K^+ en el fluido secretado debe ser muy baja.

Si, la absorción neta de Cl^- observada en controles desaparece luego de la carga con potasio, es probable que la posible secreción de Cl^- que acompañaría a la salida de K^+ no pueda ser detectada con mediciones isotópicas debido a la importante permeabilidad paracelular del Cl^- .

Experimentos previos en ratas adaptadas mostraron, en el colon distal de rata, un incremento en el flujo absortivo de Na^+ sin cambios en el movimiento de Cl^- (Budinger y col., 1986), lo que estaba asociado con un neto incremento en la dP , una reducción en la resistencia transepitelial (Sandle y col., 1985) y un incremento en la secreción de K^+ (Siga y col., 1989). Los resultados presentados aquí para el ciego adaptado, considerando el movimiento iónico, indican que el ciego de rata adaptada tiene similitudes y diferencias con otras partes del colon pero que sin embargo, estos resultados son estrechamente coincidentes con aquellos observados en el colon distal de rata luego de la infusión continua de aldosterona por siete días; este tratamiento produce la inducción tanto de una absorción electrogénica y sensible al amiloride de sodio y

de la secreción de potasio como de la inhibición de la absorpción electroneutra de NaCl (Turnamian y Binder, 1986).

Es posible relacionar dos observaciones al estado del camino paracelular en el ciego de ratas adaptads: 1) la fuerte reducción en la permeabilidad hidráulica observada cuando el SO_4^- reemplaza al Cl^- en el medio, 2) la evolución temporal de la dP en presencia de SO_4^- comparada con la de los controles. Ambos resultados pueden ser interpretados como una baja permeabilidad a SO_4^- del camino paracelular en los animales adaptados.

En suma, se puede concluir que la adaptación al potasio en el ciego de rata implica el desarrollo de un movimiento de agua secretorio asociado a transporte, acoplado a la secreción de potasio. Simultaneamente, existe un cambio de una reabsorción no electrogénica de NaCl a una entrada de Na^+ sensible a amiloride, junto con una reducción en la permeabilidad paracelular.

CAPITULO VI

RESULTADOS EN MONOCAPAS CELULARES DE HT29 Y CaCo2

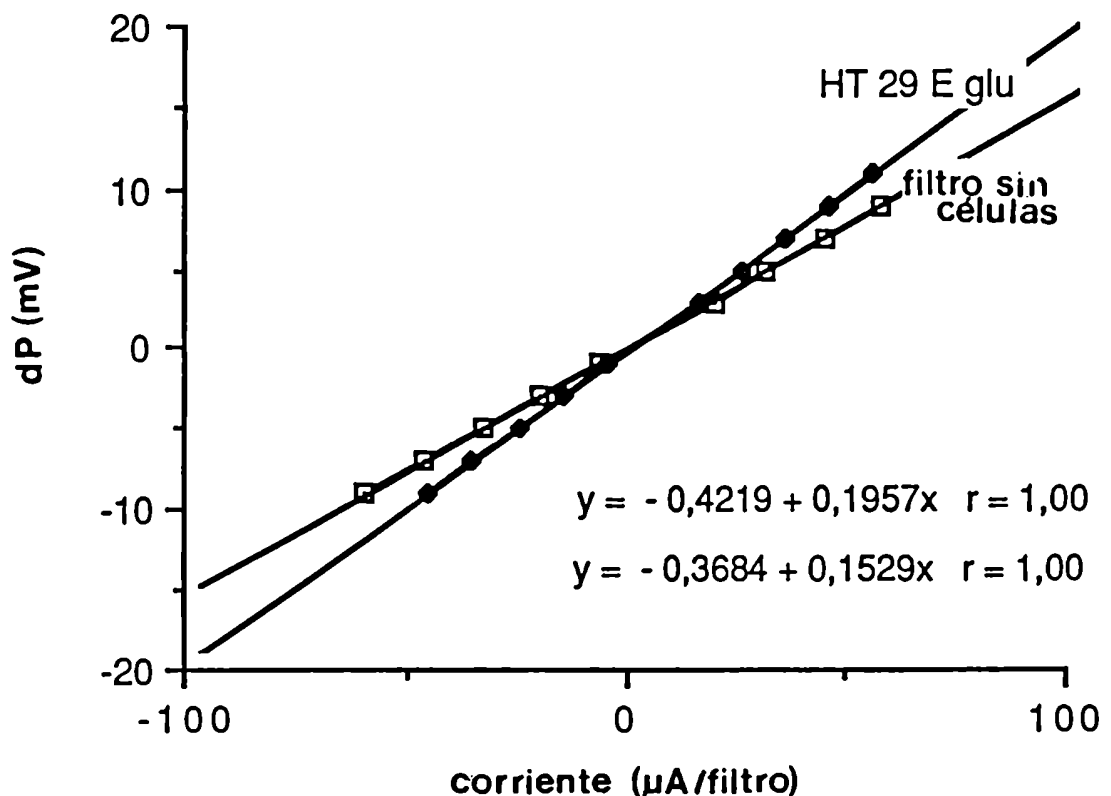
DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Las células diferenciadas HT29-18 (clon E glucosa y galactosa) y CaCo2 puestas en cultivo sobre filtros de policarbonato conservan su morfología polarizada (Hidalgo y col., 1989; Godefroy y col., 1990), es por ello que representan un modelo interesante para el estudio del transporte en epitelios, pues forman una sola monocapa epitelial sin otros tejidos acompañantes.

Dos tipos de observaciones fueron hechas durante este trabajo. En una primera parte las propiedades de permeabilidad de las líneas celulares CaCo2 y HT29-18E fueron estudiadas a 20°C y en buffer Tris-Hepes, para caracterizar sus propiedades de permeabilidad pasiva. En una segunda etapa células CaCo2 fueron estudiadas a 37°C, ya sea en buffer Tris-Hepes o en buffer bicarbonato.

La figura 20 muestra como las células sembradas, en una concentración de 80.000 cel/cámara para HT29-18E galactosa (HT29-18Egal) y de 50.000 cel/cámara para CaCo2 y HT29-18E glucosa (HT29-18Eglu), al cabo de tan solo 3 días forman una cubierta que aumenta la resistencia del filtro a valores medibles y significativos. Esto indica que se puede medir la resistencia para estudiar la conformación de una barrera epitelial y por lo tanto resulta en un ensayo sencillo y rápido que se puede realizar en condiciones de esterilidad y que permite conocer el estado del cultivo y la posible conformación del epitelio. El siguiente paso fue observar la

Fig. 20: MEDICION DE RESISTENCIA POR PULSOS DE POTENCIAL. Aplicando pulsos de potencial incrementados de a 2 mV se registra la corriente observada. La relación encontrada cumple con la Ley de Ohms, por lo tanto de la pendiente del gráfico de ΔV vs I se puede calcular la resistencia. De la curva "a" se calcula la resistencia del filtro de policarbonato sin células. De la curva "b" se calcula la resistencia del filtro más células a los tres días de sembradas en una concentración de 50000 cel /filtro. Los filtros en este caso son de 0.65 cm de diámetro. La dP y la CCC son registradas por medio de puentes de agar y electrodos de Ag/AgCl respectivamente, esterilizados con anterioridad, lo que permite el seguimiento de la formación de la monocapa por mas de 18 días.



evolución de la resistencia con los días de sembrado. En la figura 21 se muestra esta relación, pudiendo observarse que los tres tipos celulares llegan a un estado estacionario al cabo de 12 días aproximadamente, siendo las resistencias en estas condiciones de $56.6 \pm 3.1 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ (HT29-18Egal); $65.1 \pm 5.6 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ (HT29-18Eglu) y $324.0 \pm 20.5 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ (CaCo2). Si en este estado, se mide el flujo neto transepitelial, nuevamente se encuentra (como en los epitelios anteriormente analizados), que la relación entre la presión hidrostática aplicada y el flujo neto de agua observado es una relación lineal. En las condiciones de trabajo planteadas, a 20°C de temperatura y en medio de pH controlado por buffer Tris-Hepes, la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero, pero por el contrario las P_{hid} pueden ser nuevamente calculadas a partir de las pendientes siendo: $1.13 \pm 0.49 \text{ cm/seg}$ (HT29 gal); $0.88 \pm 0.40 \text{ cm/seg}$ (HT29 glu) y $1.15 \pm 0.29 \text{ cm/seg}$ (CaCo2) (Fig. 22, Tabla XI).

Se observó una relación lineal entre el J_w y el gradiente osmótico transepitelial aplicado (el baño seroso fue hecho hiperosmótico por agregado de PEG, PM= 4000, 0 a 200 mM), nuevamente, de la pendiente se calculó P_{osm} , no se observaron diferencias significativas para los valores de P_{osm} , en ninguno de los tipos celulares (Tabla XI). Como puede verse en la Tabla XI, no se observó variación en el valor de P_{osm} cuando la temperatura se elevó de 20°C a 37°C o bien cuando se usaron distintos buffers (bicarbonato o Tris-Hepes).

Fig. 21: VARIACION DE LA RESISTENCIA DURANTE EL CRECIMIENTO CELULAR.

La resistencia de las monocapas varía en función de los días de sembrado. (\square) CaCO_2 , $R = 324 \pm 20 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 6$); (\blacklozenge) HT29-18E gal, $R = 56.6 \pm 3.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 6$), (\blacksquare) HT29-18E glu, $R = 65.1 \pm 5.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 6$). Los valores de resistencia son tomados cuando se alcanza el estado estacionario, aproximadamente a los 12 días de sembrado. "n" indica la cantidad de cajas plásticas conteniendo 12 filtros cada una utilizadas.

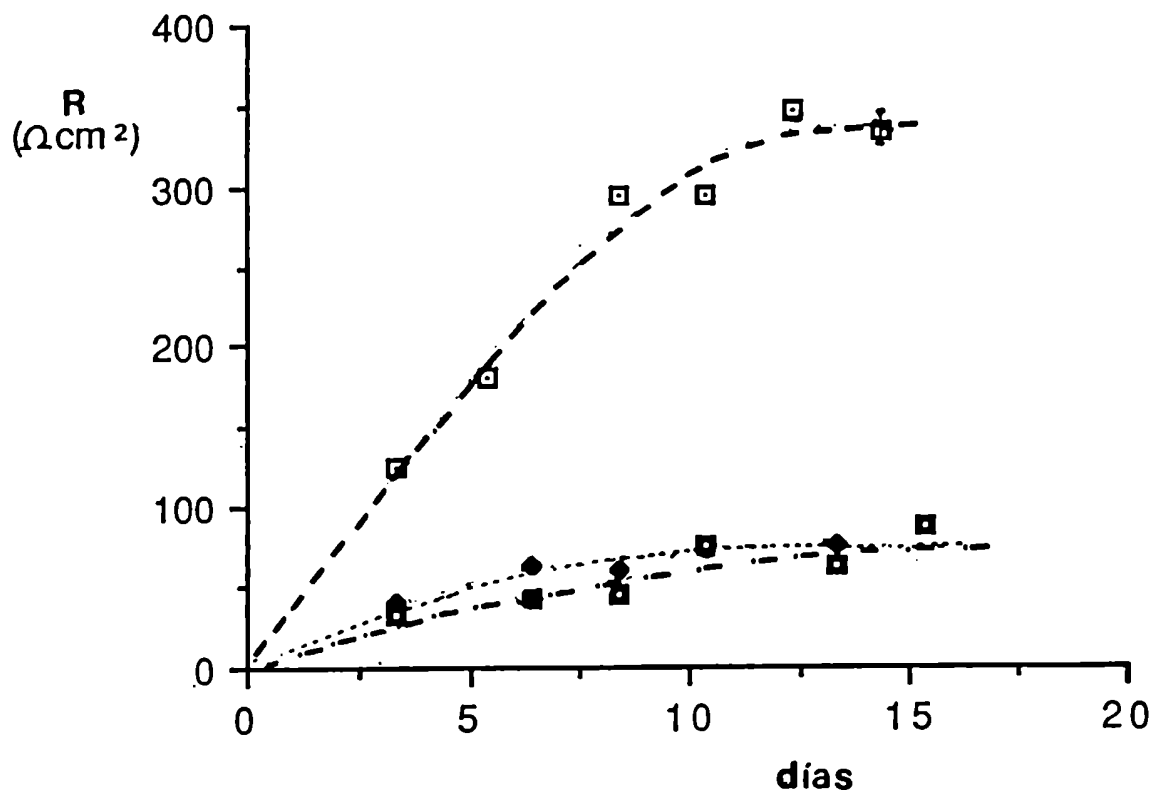


Fig. 22: EFECTO DE LA PRESION HIDROSTATICA SOBRE EL Jw A 20°C

Las mediciones fueron realizadas en monocapas confluentes, en su máxima resistencia a 20°C y en medio regulado por buffer Tris-Hepes.

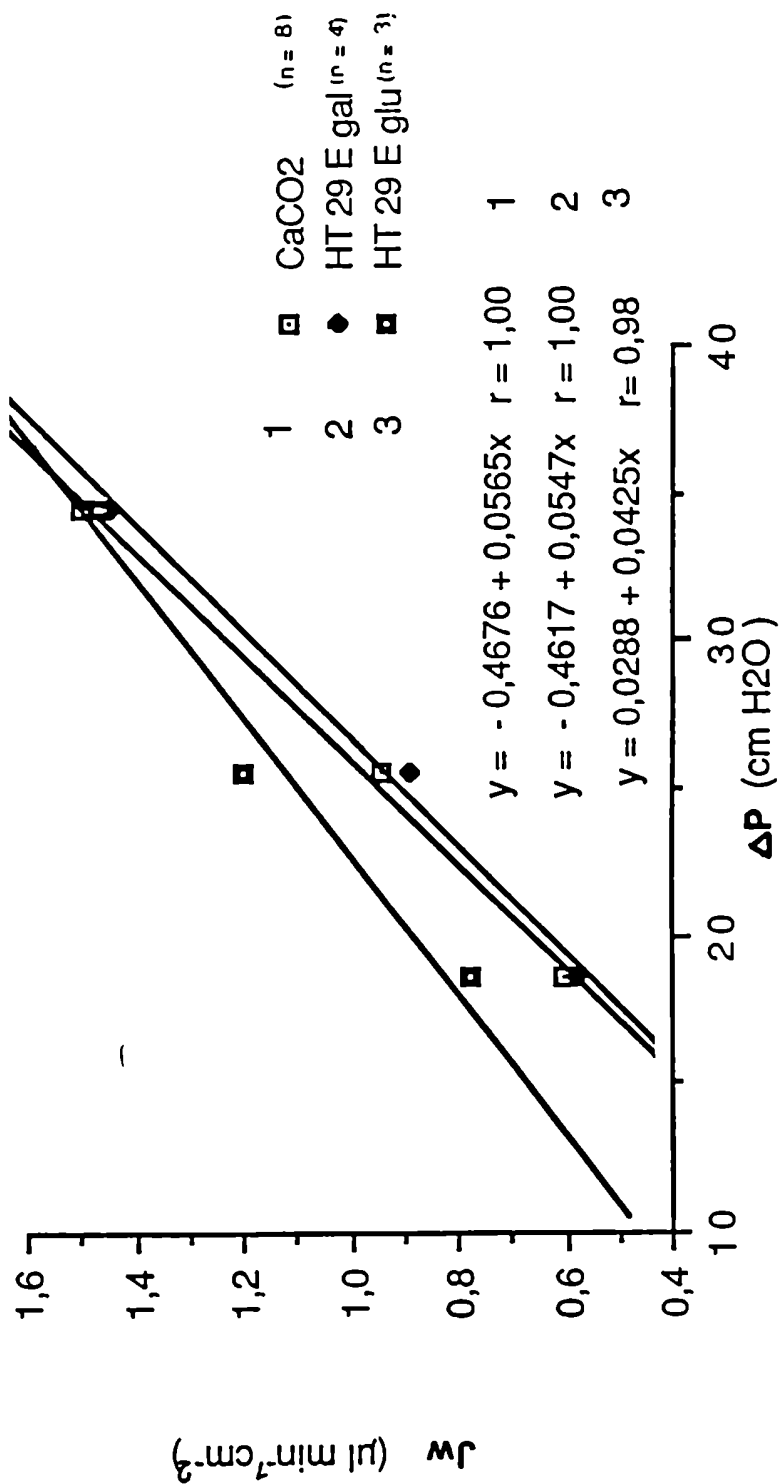


TABLA XI

línea	medio	temp	n	Phid	Jwt	Posm
CaCo2	Tris-Hepes	20 C	8	1.31 ± 0.12	-0.47 ± 0.23	0.0042 ± 0.0015
HT29-glu	Tris-Hepes	20 C	7	1.19 ± 0.15	-0.22 ± 0.16	0.0041 ± 0.0012
HT29-gal	Tris-Hepes	20 C	4	1.13 ± 0.13	-0.46 ± 0.27	
CaCo2	Tris-Hepes	37 C	6	2.61 ± 0.30	-0.48 ± 0.25	0.0039 ± 0.0016
CaCo2	HCO3-	37 C	8	2.61 ± 0.41	-0.97 ± 0.32*	0.0046 ± 0.0004

*El valor es estadísticamente diferente de cero (p < 0.05)

En la Tabla XI se muestran los valores de Phid, Posm (cm/s); el flujo neto de agua asociado a transporte (Jwt, $\mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$) en la barrera epitelial desarrollada por células CaCo2 y HT29 a diferentes temperaturas y diferentes reguladores de pH.

Efecto de la depleción de Ca^{++} en el medio de cultivo.

El aumento de las resistencias de la monocapa pudiera ser simplemente debido al hecho mecánico de cubrir los poros de los filtros con el crecimiento celular, es por ello que se buscó un medio que actúe sobre las monocapas ya formadas. Ha sido demostrado que la presencia de calcio en el medio de cultivo es necesario para la formación de las uniones intercelulares y que su ausencia produce la apertura de estas (Cereijido y col., 1978).

Cuando las monocapas fueron incubadas en un medio sin Ca^{++} y adicionado con EGTA 1 mM a 37°C, se observó una caída exponencial de la resistencia en función del tiempo (Fig. 23). Al cabo de una hora y media los valores de resistencia no eran significativamente diferentes de cero.

También, se midió el J_w en ausencia de Ca^{++} , encontrándose que este aumenta significativamente (Fig. 24).

Permeabilidad a moléculas de distinto peso molecular en monocapas de células CaCO_2 .

Una variedad de moléculas hidrosolubles, en un rango de pesos moleculares que varían de 180 a 70.000 daltons, marcadas radiactivamente, manitol, inulina y Dextran (las que no son permeables en la membrana plasmática), fueron

utilizadas para evaluar la permeabilidad de estas monocapas celulares. Como puede observarse en la Tabla XII, todas estas presentan una muy baja permeabilidad, típico de epitelios bien conformados (vejiga urinaria de anfibios Permeabilidad. a sacarosa= $(3.07 \pm 0.5) 10^{-6}$ cm/seg, Parisi y col., 1985).

Se utilizó así mismo, una molécula liposoluble como el metanol (PM= 32), y se vió que la permeabilidad en este caso aumenta 1000 veces, resultado claramente coherente con el hecho de que esta molécula pasa por difusión a través de la membrana celular.

En un mismo experimento se usaron pruebas de ^3H -manitol e ^{14}C -inulina y se midieron los flujos unidireccionales en presencia y ausencia de Ca^{++} con EGTA 1 mM (Tabla XIII). La permeabilidad aumenta significativamente tanto para el manitol ($2.65 \pm 0.39 10^{-5}$ cm/s), como para la inulina ($(5.26 \pm 0.72) 10^{-6}$ cm/s).

Efecto de la temperatura sobre la resistencia y el J_w en monocapas de células CaCo_2 .

Como anteriormente se mencionó, en una primer etapa, se intentó probar que la utilización de monocapas diferenciadas era un método viable para el estudio de mecanismos de transporte transepiteliales, es por ello que se intentó probar que se formaba una barrera cerrada y selectiva al

Fig. 23: EFECTO DE LA INCUBACION SIN CALCIO SOBRE LA RESISTENCIA DE LAS MONOCAPAS CELULARES.

Las monocapas incubadas en medio deplecionado de Ca^{++} y con EGTA 1 mM, al cabo de una 90 minutos muestran una resistencia no significativamente distinta de cero. (●) CaCO_2 , (●) HT29-18E gal, (◐) HT29-18E glu.

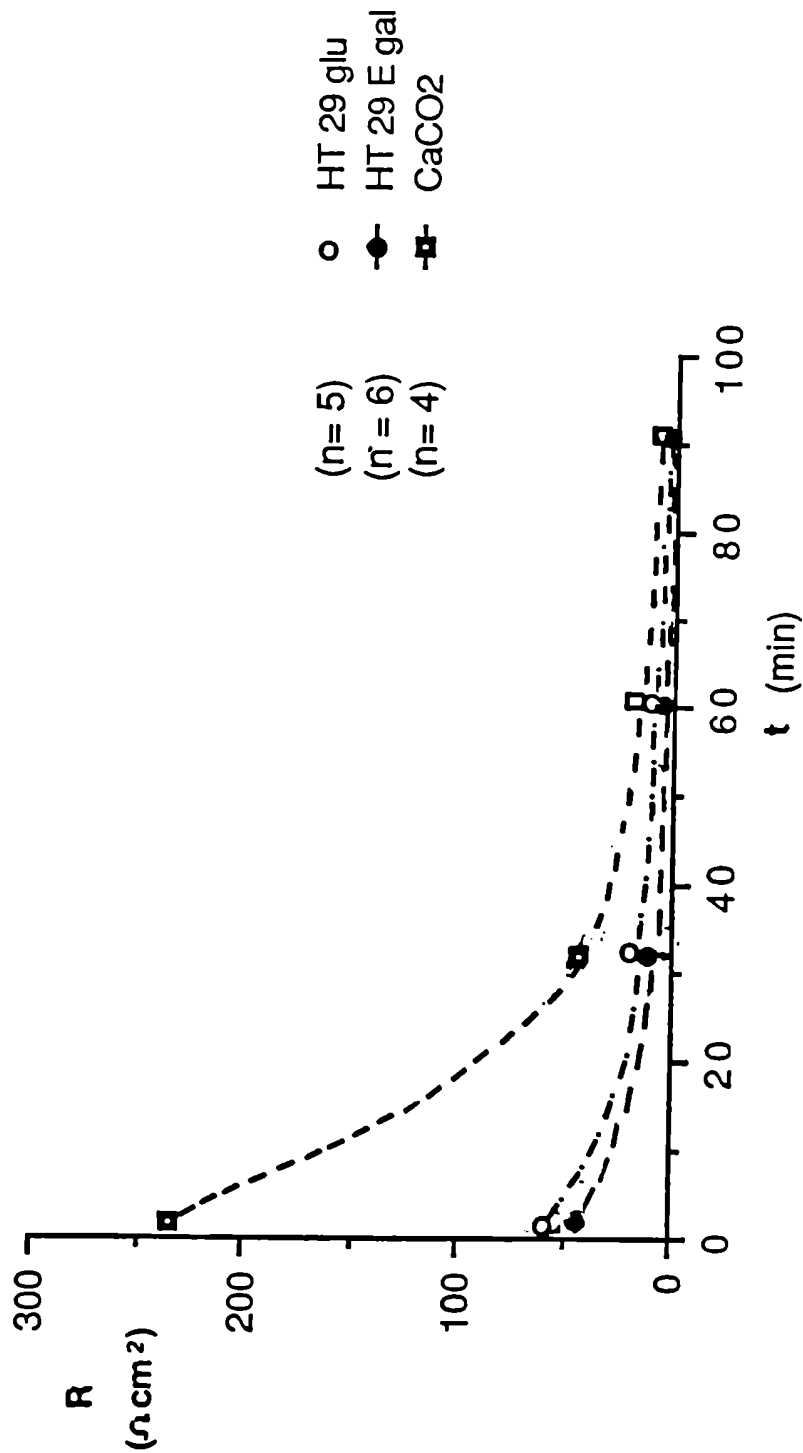


TABLA XII

PERMEABILIDAD A DISTINTAS MOLECULAS RADIATIVAS DE DIFERENTE PESO MOLECULAR EN MONOCAPAS DE CELULAS CACO2.

molécula	PM	Ps (cm/s)	n
metanol	32	$(1.41 \pm 0.57) \cdot 10^{exp-4}$	3
manitol	180	$(1.59 \pm 0.39) \cdot 10^{exp-6}$	4
Inulina	5000	$(1.57 \pm 0.37) \cdot 10^{exp-6}$	5
Dextran	70000	$(6.42 \pm 1.24) \cdot 10^{exp-6}$	3

Los valores de permeabilidad al manitol, inulina y dextran tomados a 20 C, durante un período de 90 minutos, son del orden dado por otros investigadores para los epitelios "in vitro". Las monocapas celulares utilizadas estaban en su resistencia máxima y en fase estacionaria.

Fig. 24: EFECTO DE LA DEPLECION DE CALCIO SOBRE Jw EN CELULAS CaCo2.
 El Jw aumenta significativamente luego de una incubación de 60 minutos en medio sin calcio y con EGTA 1 mM, n= 4.

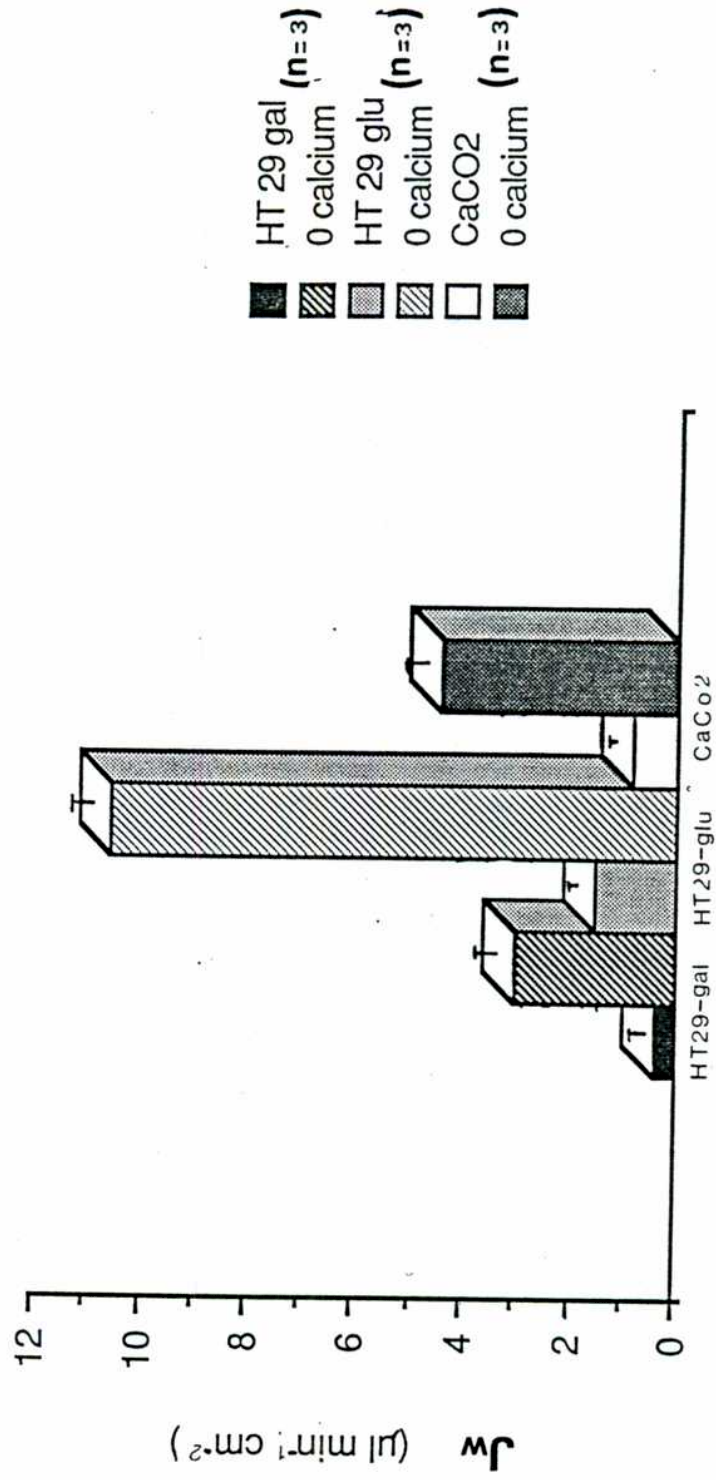


TABLA XIII

PERMEABILIDAD A INULINA Y MANITOL EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE CALCIO

MOLECULA	PM	Ps (cm/s)	
		Ca	0-Ca
3H-manitol	180	$(1.53 \pm 0.36) \cdot 10^{exp-6}$ (n= 6)	$(1.05 \pm 0.22) \cdot 10^{exp-5}$ (n= 4)
14C-inulina	5000	$(9.89 \pm 0.23) \cdot 10^{exp-7}$ (n= 6)	$(5.26 \pm 0.72) \cdot 10^{exp-6}$ (n= 4)

La permeabilidad en ausencia de calcio fue medida luego que las monocapas eran mantenidas una hora en estufa a 37 C en medio sin calcio con agregado de 1 mM EGTA. Los datos de los movimientos unidireccionales de inulina y manitol fueron determinados a 20 C

pasaje de diversas sustancias a través de ellas, utilizando los métodos anteriormente relatados. Por esto, se trabajó a 20°C y con pH regulado con buffer Tris-Hepes. Cuando se aumenta la temperatura a 37°C, una primera observación fue que en las células CaCo2 la resistencia y la diferencia de potencial caen con el aumento de la temperatura ($226 \pm 18 \mu\text{cm}^2$; $0.38 \pm 0.08 \text{ mV}$, $n= 18$). Sin embargo, el flujo neto de agua aumenta significativamente (Fig. 25, Tabla XI), aumentando Phid con el aumento de temperatura, mientras que Posm permanece invariable (Tabla XI).

Propiedades de transporte de las células CaCo2 a 37°C

Los movimientos de Na^+ y Cl^- fueron estudiados en monocapas de células CaCo2. Los flujos unidireccionales y netos calculados de los correspondientes movimientos isotópicos con $^{22}\text{Na}^+$ y $^{36}\text{Cl}^-$, se muestran en la tabla XIV. Se observó un flujo neto secretor, tanto para Na^+ , como para Cl^- , la adición de amiloride (10^{-3} M) en el baño mucoso, redujo significativamente los flujos en el sentido mucoso-seroso de ambos iones, mientras que los flujos en el sentido seroso-mucoso no fueron modificados. Como consecuencia los flujos netos secretorios de Na^+ y Cl^- fueron aún mayores en presencia de amiloride. Como los movimientos de Na^+ y Cl^- fueron simultáneamente medidos ambos flujos pueden considerarse como valores pareados. Cuando los flujos en el

TABLA XIV

FLUJOS UNIDIRECCIONALES DE Na⁺ Y Cl⁻

	n	control		amiloride	
		Na ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	Cl ⁻
Jms	7	1.67 ± 0.34	1.77 ± 0.48	1.33 ± 0.32	1.41 ± 0.67
Jsm	8	2.72 ± 0.36	3.20 ± 0.43	2.61 ± 0.60	3.46 ± 0.67
Jneto		-1.05 ± 0.34*	-1.43 ± 0.43*	1.28 ± 0.30*	2.05 ± 0.40*

* p< 0.001

Los valores control y amiloride son datos tomados en forma pareada y se informa X ± SEM, n= 8.

La media de las diferencias para cada uno de los iones entre las condiciones control y amiloride son (-0.34±0.05) µE/h.cm², con significancia p< 0.001 para Na⁺ en el flujo mucoso-seroso. EL valor para Cl⁻ es de (-0.37±0.17) uE/h.cm². Las restantes diferencias no son significativas.

Fig. 25: EFECTO DEL GRADIENTE HIDROSTATICO EN MONOCAPAS DE CELULAS CaCo2 A 37°C.

Se observó el efecto de la temperatura y la composición del medio sobre la permeabilidad. Se experimentó en medio regulado por buffer Tris-Hepes a 20°C (◊) y a 37°C (◐) y en medio regulado en buffer HCO₃⁻ a 37°C (●).

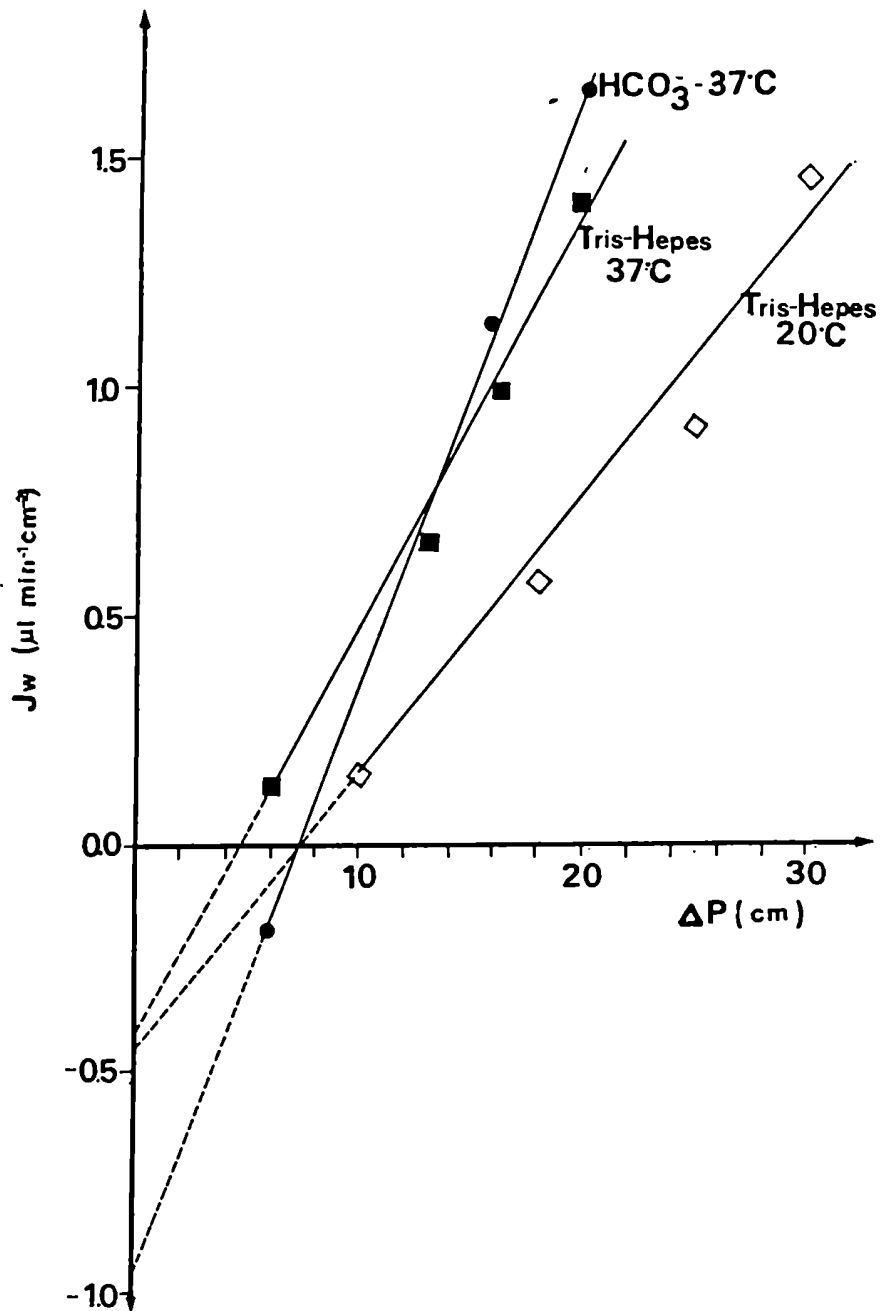


TABLA XV

TRANSPORTE DE GLUCOSA Y FLUJO DE MANITOL

AMILORIDE MUCOSO 1.10EXP-3 M.		(n= 6)	
		Ps manitol (cm/s)	Ps glucosa (cm/s)
control	Jms	(4.03 ± 1.03).10exp-8	(1.78 ± 0.18).10exp-6
	Jsm	(9.74 ± 1.07).10exp-8*	(1.89 ± 0.12).10exp-6
amiloride	Jms	(6.90 ± 2.40).10exp-8	(1.49 ± 0.16).10exp-6**
	Jsm	(10.6 ± 0.59).10exp-8*	(1.75 ± 0.11).10exp-6
AMILORIDE MUCOSO 1.10EXP-5 M.		(n= 3)	
		Ps manitol (cm/s)	Ps glucosa (cm/s)
control	Jms	(1.12 ± 0.71).10exp-7	(6.32 ± 4.83).10exp-6
	Jsm	(6.06 ± 0.36).10exp-8	(1.33 ± 0.22).10exp-6
amiloride	Jms	(1.59 ± 1.12).10exp-7	(5.39 ± 4.05).10exp-6
	Jsm	(4.16 ± 0.80).10exp-8	(1.33 ± 0.22).10exp-6

*p < 0.05 comparando Jsm-Jms; **p < 0.05 comparando control contra amiloride.

Flujos unidireccionales de glucosa y de manitol en monocapas de células CaCo2 y a 37 C durante toda la experiencia. El medio de trabajo es el medio de cultivo, el que es continuamente gaseado con 10% de CO2.

sentido mucoso-seroso fueron comparados, no se observaron diferencias significativas ni en las condiciones control ($J_{msCl^-} - J_{msNa^+} = 0.10 \pm 0.16 \mu\text{eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$, $n=7$, ns) o bien en la presencia de amiloride (10^{-3} M) ($J_{msCl^-} - J_{msNa^+} = 0.08 \pm 0.16 \mu\text{eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$, $n=7$, ns). Sin embargo, cuando los flujos seroso a mucoso fueron comparados, los flujos de Cl^- fueron $\mu\text{eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$, $n=8$, $p < 0.05$). La diferencia se vuelve más importante luego de la acción del amiloride ($J_{smCl^-} - J_{smNa^+} = 0.85 \pm 0.14 \mu\text{eq}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$, $n=8$, $p < 0.01$).

Las mediciones simultáneas de los flujos de manitol y glucosa, siempre en células CaCo2 y a 37°C, son presentados en la Tabla XV. Se puede notar que un movimiento neto secretor de manitol fue observado. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre ambos flujos unidireccionales de glucosa. Sin embargo, el amiloride en concentración 10^{-3} M y 10^{-5} M reduce el movimiento de glucosa en ambas direcciones.

Estudios morfológicos por microscopía y criofractura de monocapas HT29 y CaCo2.

Las líneas celulares CaCo2 y HT29-18E, se diferencian como enterocitos y presentan como rasgos de diferenciación característicos la formación de microvellosidades y de "uniones estrechas" (Tight Junctions) intercelulares, esto puede llegar a observarse por distintas técnicas

histológicas, una de ellas la criofractura, aquí aplicada.

Las fotografías de las criofracturas de los distintos tipos celulares (Fig. 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32), muestran claramente estructuras diferenciadas observándose en las monocapas de CaCO_2 una profusa microvellosidad en la cara apical (Fig. 26, 27), y en el borde de las uniones intercelulares pueden también observarse las uniones estrechas con las bandas características rodeando la membrana apical descritas en otros epitelios por Cereiido y col., (Fig. 28). En las monocapas de células HT29, también puede observarse la formación de microvellosidades en la membrana apical, aunque en mucho menor cantidad (Fig. 29, 30). La Fig. 29 muestra en estas células la presencia de uniones estrechas con sus bandas características, mientras que en la Fig. 31, se puede observar estas bandas bordeando todo el contorno apical de la célula. En la Fig. 32, podemos observar el punto de unión de tres células, se distingue claramente las uniones intercelulares, microvellosidades cortadas transversalmente por el clivage y una compleja unión estrecha entre dos de ellas.

Cuando el medio se depleciona de calcio se produce una desorganización de las bandas en la unión estrecha, tal como puede verse en la Fig. 33.

Fig. 26: CRIOFRACTURA EN MONOCAPAS EPITELIALES DE LINEAS
CELULARES.

En células CaCo2 se observa una profusa microvellosidad (*)
en las células diferenciadas, se observa un grupo de células
con una clara unión intercelular (→) interdigitadas.
(aumento 5900X).

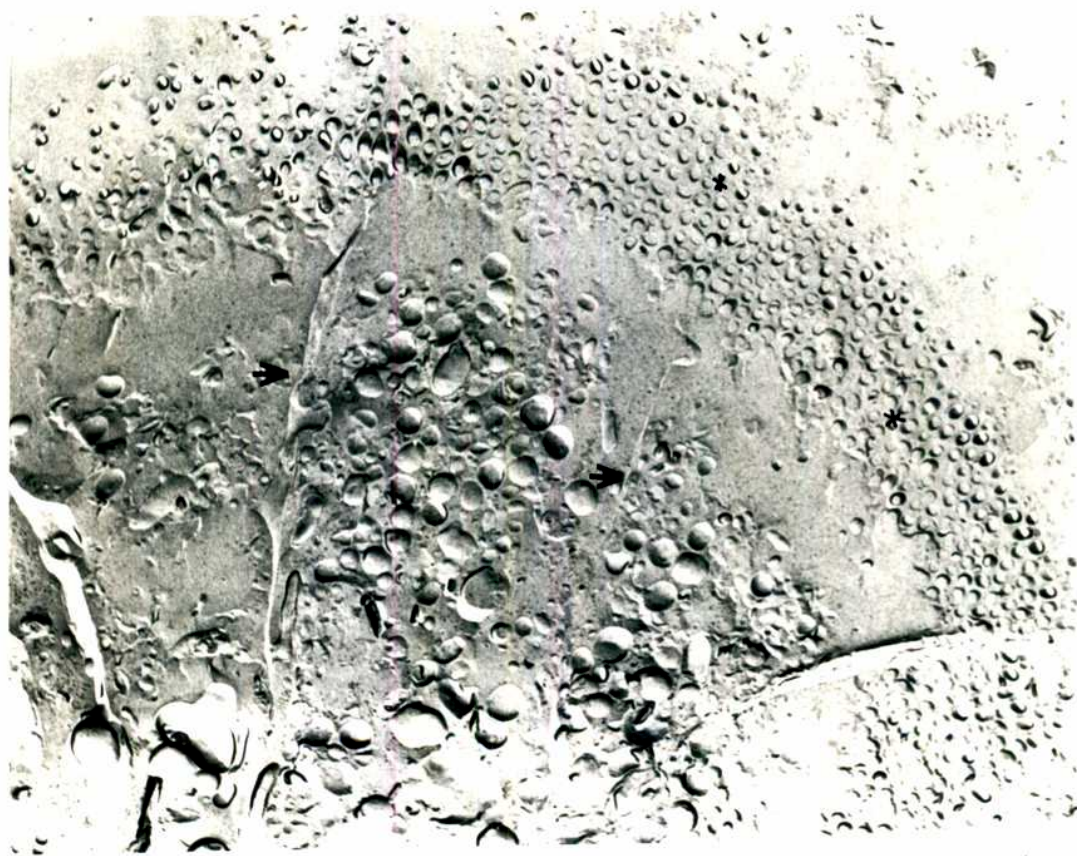


Fig. 27: MICROVELLOSIDADES EN CELULAS CaCo2
Microvellosidades cortadas longitudinalmente, pueden observarse dentro de la microvellosidad gran cantidad de gránulos de proteínas, posiblemente microtúbulos y microfilamentos (aumento 18000X).

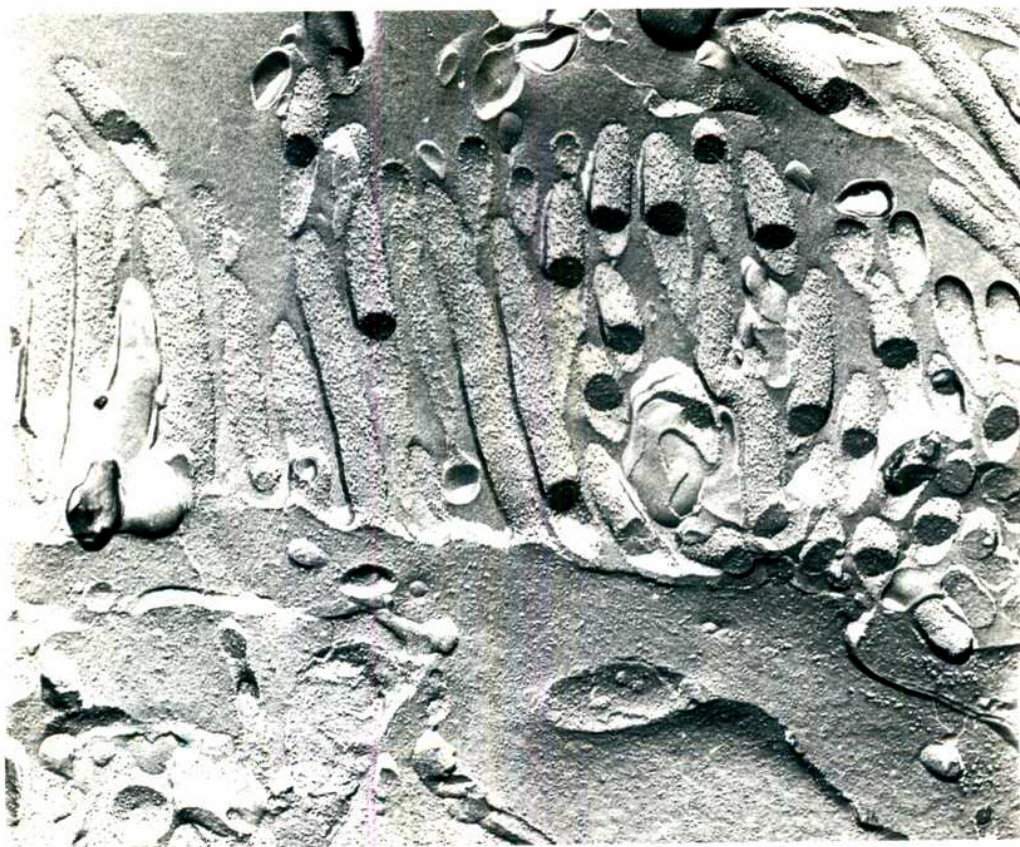


Fig. 28: UNION ESTRECHA EN MEMBRANA APICAL
Al borde de la membrana apical y antes de las
microvellosidades (*) se observa las bandas (→)
características que conforman la unión estrecha. Las
microvellosidades aquí se cortan transversalmente. (aumento
13000X).

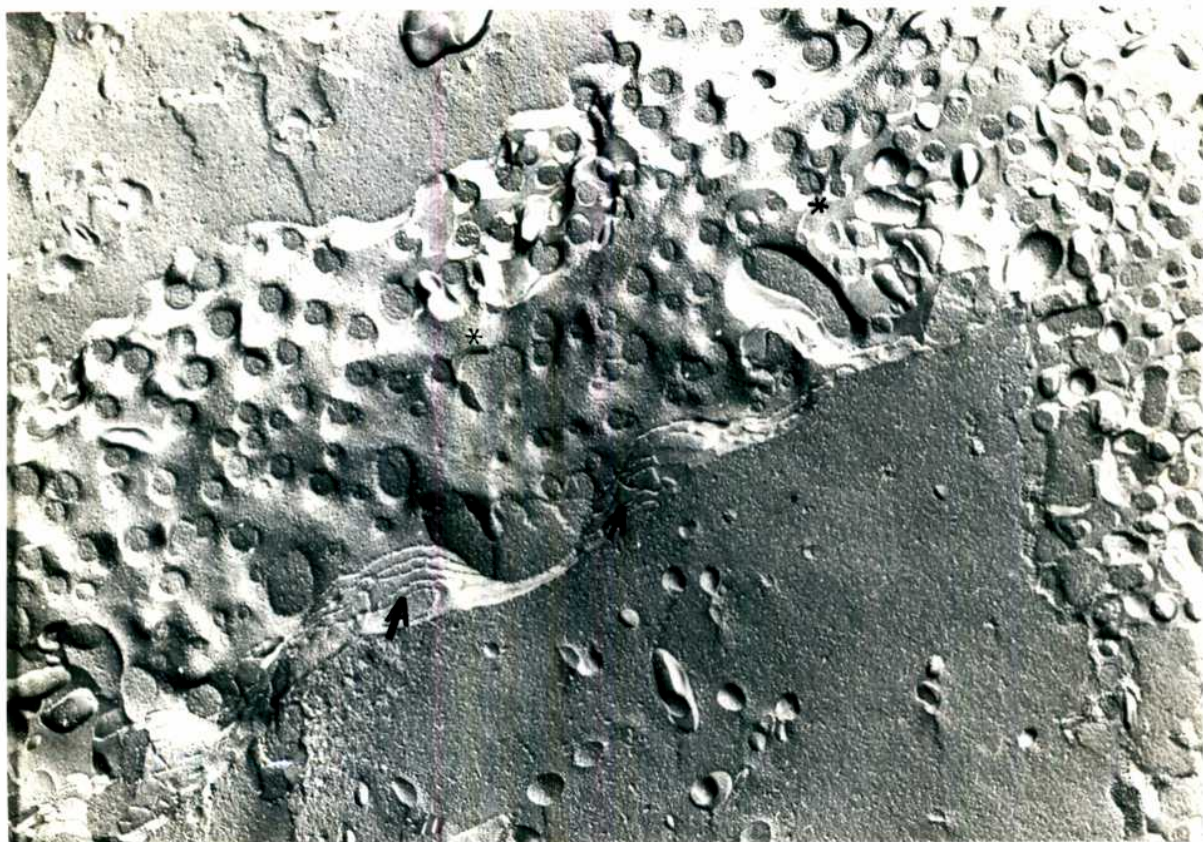
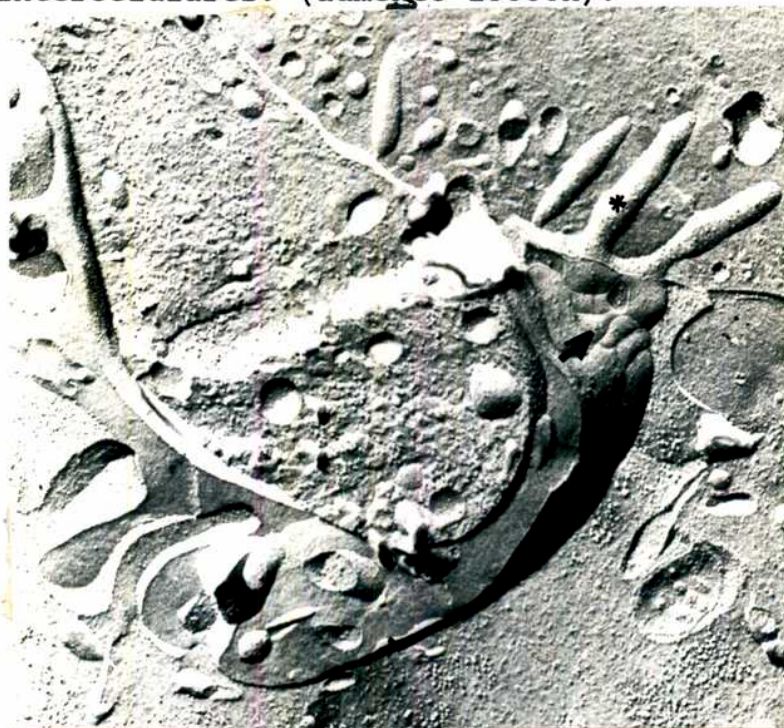


Fig. 29, 30: DIFERENCIACION EN CELULAS HT29.

Las células HT29 aunque menos diferenciadas que las CaCo2 también presentan microvellosidades (*) en su cara apical y las bandas características (—) de la unión estrecha en las uniones intercelulares. (aumento 18000X).

29



30

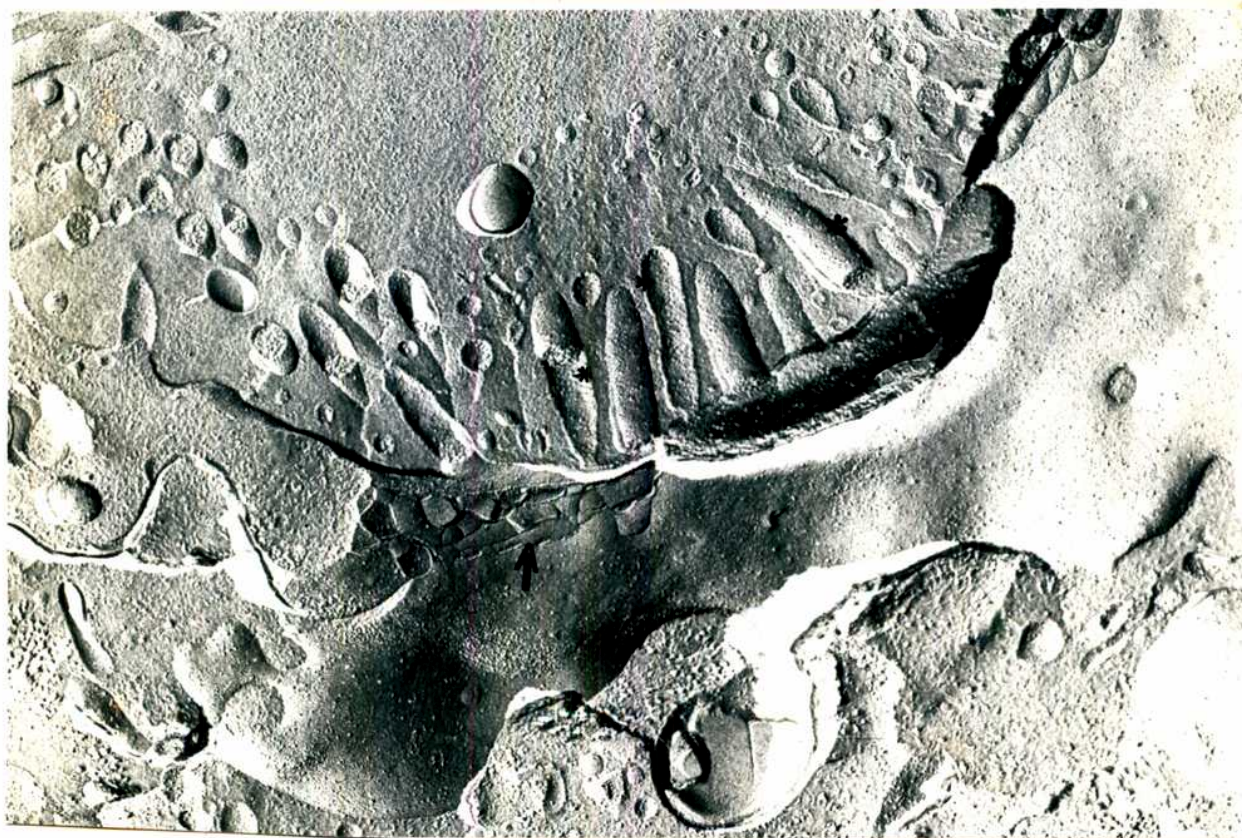


Fig. 31: UNION ESTRECHA BORDEANDO EL CONTORNO APICAL DE LA CELULA HT29.

La unión estrecha rodea todo el borde superior de las células sirviendo para ensamblarse y comunicarse con las células vecinas. En esta fotografía se observan las bandas de la union estrecha (→) claramente diferenciadas y organizadas (aumento 18000X).



Fig. 32: UNIONES INTERCELULARES EN CELULAS HT29.
En esta fotografía pueden verse las uniones intercelulares (→) de tres células con la union estrecha (→) y las microvellosidades cortadas transversalmente (*) (aumento 18000X).



Fig. 33: EFECTO DE LA DEPLECION DE CALCIO SOBRE LA UNION ESTRECHA.

Luego de la incubación sin calcio en el medio a 37°C, se observa en la criofractura que las bandas (→) de la unión estrecha en la membrana apical están desorganizadas, observándose claramente discontinuidades y rupturas de ligasones en comparación con las observadas en las imágenes anteriores. (aumento 18000X).

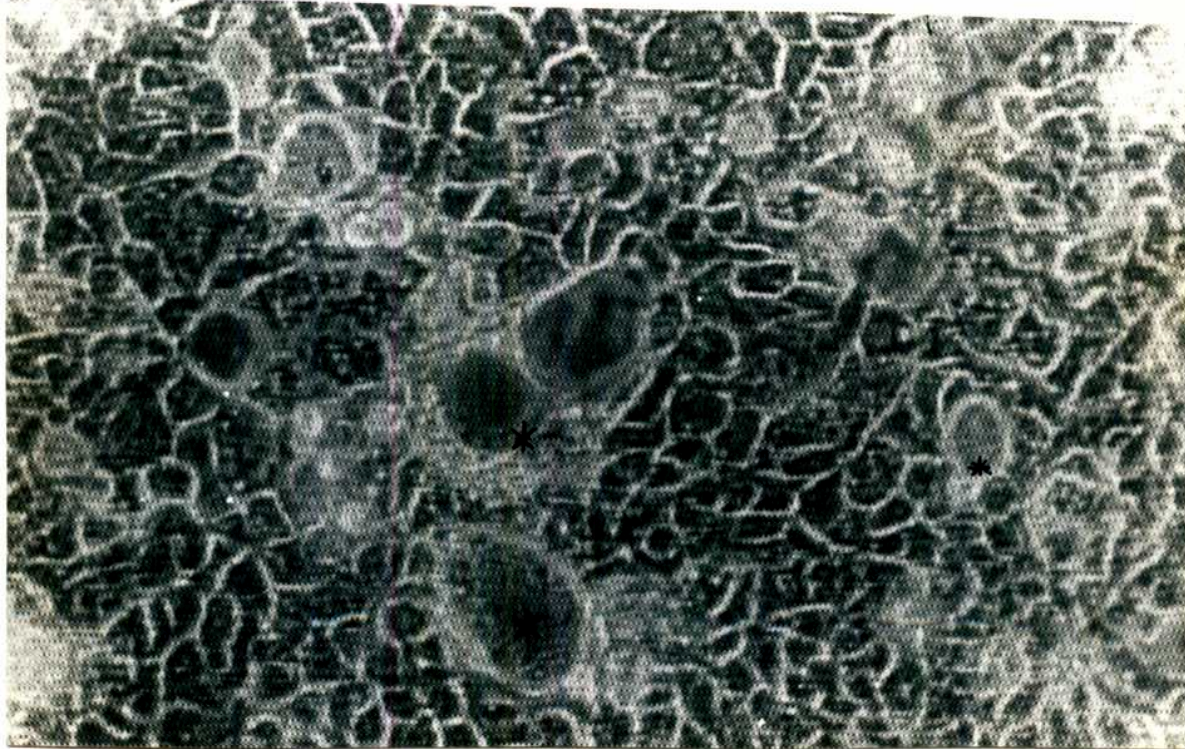


Fig. 34: MONOCAPAS EPITELIALES DE CELULAS CaCo2 EN SOPORTE NO PERMEABLE.

(a) Las células cultivadas durante tres días en cápsula de Petri comienzan a diferenciarse cuando llegan a confluencia, pierden su forma redondeada y toman formas más geométricas. Estas células en soportes no permeables forman domos (*), acumulando líquido en la cara inferior basolateral.

(b) Las células luego de 8 días de sembradas son mucho más pequeñas y angulosas.

a

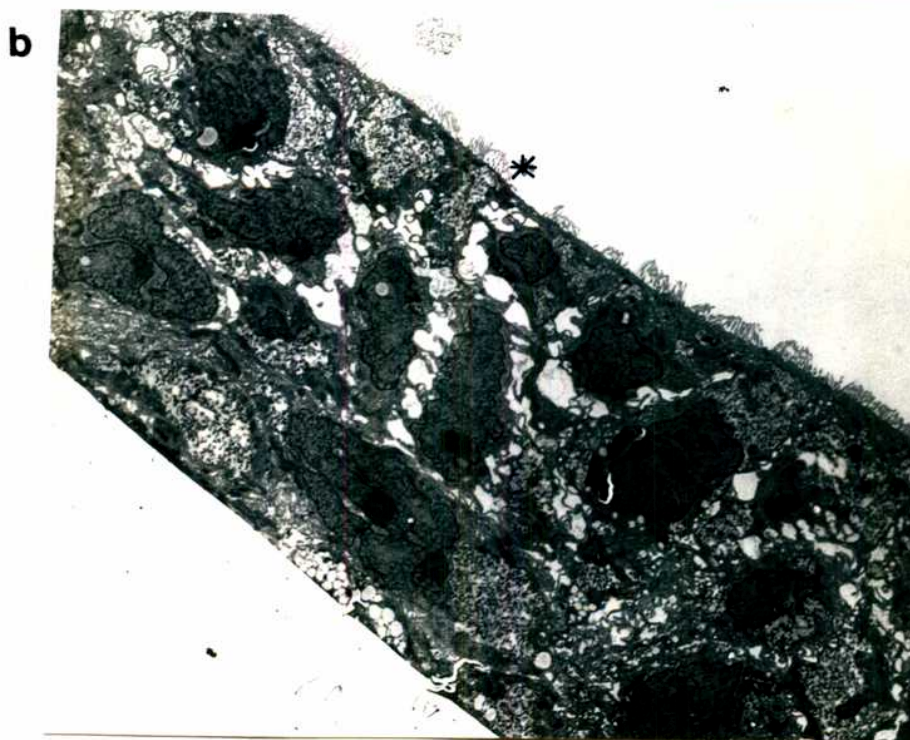


b



Fig. 35: MICROFOTOGRAFIA DE MONOCAPA EPITELIAL DE CELULAS CaCo2.

En esta fotografía se observan las microvellosidades (*) en la cara apical, el núcleo celular y gran cantidad de vesículas en el interior de las células CaCo2. Estas células se diferencian en cultivo y en soportes permeables crecen en monocapas epiteliales (a), de lo contrario mayoritariamente forman multicapas (b).



DISCUSION

Estudios previos demostraron que las células CaCo2 (Pinto y col., 1983) y las HT29 (Godefroy y col., 1989), desarrollan una diferenciación enterocítica en cultivo. Las células CaCo2, cuando crecen sobre una superficie plastica forman domos característicos del transporte epitelial, esto ocurre cuando la monocapa llegó a confluencia y cesó el crecimiento (Fig. 34, 35)

Cuando las células CaCo2 son cultivadas en filtros de policarbonato exhiben una bien definida "union estrecha" y presentan un valor de resistencia transepitelial de $154 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Grasset y col., 1984). Estas células en cultivo permanecen diferenciadas siempre y no es necesario para ello ningún proceso de inducción.

Las células HT29, se diferencian por inducción del medio, deplecionando a este de hexosas, o bien cambiando la glucosa por galactosa (Pinto y col., 1983). Las células indiferenciadas son casi esféricas, unidas unas a otras por algunos desmosomas y forman multicapas celulares. Cuando son cultivadas en un medio deplecionado de glucosa, forman una monocapa de células columnares (Godefroy y col., 1989), presentando uniones estrechas intercelulares y un ribete en cepillo claramente diferenciado.

El establecimiento de la polaridad celular en células

epiteliales es caracterizada por la adquisición de dos dominios de membranas claramente distinguibles, delimitadas por las uniones estrechas, las que separan dos superficies distintas con proteínas y lípidos específicos (Gumbiner y Louvard, 1985; Louvard y col., 1986). En ausencia de Ca^{++} las uniones intercelulares pueden ser abiertas (Gumbiner y Simmons, 1986; Sedar y Forke, 1964). Aquí, se ha demostrado que en estas células diferenciadas (HT29 gal; HT29 glu y CaCo2), estas uniones son funcionales, ellas previenen el acceso de marcadores de acuerdo al tamaño molecular (manitol- ^{14}C , Inulina- ^3H y dextran- ^{14}C), y en ausencia de Ca^{++} , cuando la unión está abierta y las bandas de la tight desorganizada (criofractura Fig. 31), permite el acceso de moléculas de distinto tamaño (Tabla XIII). También debe observarse que la resistencia cae a cero en estas condiciones. Artursson y Magnuson demostraron en las células CaCo2 desarrolladas sobre filtro, que la permeabilidad eléctrica aumentada inducida por la ausencia de Ca^{++} , fue causado por una separación reversible de los componentes de la unión compleja (Artursson y Magnuson, 1990).

Los valores de resistencia encontrados aquí son mayores para CaCo2 ($324 \Omega \cdot \text{cm}^2$) que los referidos en la literatura ($154 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $174 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Hidalgo y col., 1989; Grasset y col., 1984). Esto posiblemente se deba a que esta línea celular no fue clonada con anterioridad y aún permanece heterogénea y sería posible que estemos trabajando con un grupo altamente diferenciado, como puede verse por la

densidad del ribete en cepillo formado en la membrana apical (Fig. 27 y 30).

En los clones HT29, el valor de resistencia esta intimamente relacionado con los valores de un epitelio abierto (leaky) tal como el del intestino humano "in vitro" (capitulo) y es relativamente mayor que el informado con anterioridad por Godefroy y col., (1990). Esto concuerda con que el clon utilizado en esta experimentación (clon E) y el clon 18 utilizado previamente por Godefroy presentan diferente grado de diferenciación y polarización (Godefroy y col., 1990). El clon E presenta al ser aislado mayores características de diferenciación, como ser mayor expresión de enzimas y también mayor porcentaje de uniones estrechas. Además de considerar, que en el clon 18, las células cultivadas en medio que contenía glucosa permanecían indiferenciadas, mientras que en el clon E presentan prodiedades de diferenciación.

En una primera etapa, nuestro propósito fue demostrar que las monocapas diferenciadas de líneas celulares provenientes de adenocarcinoma de colon humano eran un modelo viable para el estudio de transporte, es por eso que se estudiaron los procesos donde actúan las fuerzas pasivas, con lo que se intentó demostrar que existía una barrera epitelial íntegra. Es por ello que se trabajo a 20°C de temperatura y en medio de buffer Tris-Hepes. Es sabido que en estas condiciones el transporte activo se encuentra inhibido, el que se reactiva a 37°C. Se observa un aumento

significativo del J_w con el aumento de la temperatura. Gonzalez Mariscal y col., encontraron en células MDCK (células de riñón de perro), que una disminución de la temperatura de 37 °C a 3 °C resultaba en un incremento de la resistencia del 306%, sugiriendo un incremento en la capacidad de sellado de las uniones oclusoras (Gonzalez Mariscal, 1985). Este efecto fue también observado en el pasaje de 20°C a 37°C las células CaCo2, viéndose una disminución de la resistencia con el aumento de la temperatura.

J_w inducido osmótica e hidraúlicamente en monocapas de células CaCo2 y HT29-18E.

El J_w fue, tanto en CaCo2 como en HT29-18E, una función lineal de los gradientes hidrostáticos u osmóticos aplicados. Los valores observados a 20°C, no fueron significativamente diferentes en ambos tipos celulares, aún cuando las resistencias transepiteliales fueron significativamente más altas en células CaCo2 que en HT29-18E (Tabla XI). Podríamos comparar estos valores con aquellos previamente encontrados en el colon humano "in vitro" (Fig. 13): $Phid = 0.22 \pm 0.03 \text{ cm.s}^{-1}$; $Posm = 0.0028 \pm 0.0005 \text{ cm.s}^{-1}$; $R = 100 \pm 16 \text{ .cm}^2$.

Una interesante observación fue que en las células CaCo2, $Phidr$ fue una función de la temperatura del medio

mientras este no fue el caso para Posm. Estos resultados sugieren diferentes caminos para los movimientos de agua osmóticos e hidráulicos. Estos resultados habren una expectativa pues profundizando en este sistema tengamos un método para discernir entre los movimientos transcelulares y paracelulares.

Acoplamiento entre agua e iones en células CaCo₂.

Si consideramos juntos, el aumento observado en la Phid y la reducción en la resistencia transepitelial en las células CaCo₂ a 37°C, esto resultados se pueden asociar con una abertura del camino paracelular a 37°C.

Grasset y col., (1985) previamente han descrito una secreción neta de Na⁺ y Cl⁻ en células CaCo₂ cultivadas en filtro poroso pero tan solo fue observado luego de la acción de distintos secretagogos. Ellos concluyen que las células CaCo₂, las cuales en cierto grado recuerdan a las células de la cripta colónica, poseen una conductancia de cloro mucosa dependiente de amiloride, característica de células secretoras. En nuestros experimentos, la secreción de Na⁺ y Cl⁻ fue observada en ausencia de cualquier estimulación externa, observandose también la sensibilidad al amiloride. Además, La aparición de un J_{wt} secretor (pues en ausencia de todo gradiente ya sea este químico, osmótico o hidráulico se observa una ordenada al origen negativa) (Fig. , Tabla XI)

sería coincidente con las secreciones Na^+ y Cl^- observadas con marcadores radiactivos.

El Jw secretor descrito aquí fue de relativa importancia y conociendo tanto los valores de flujos netos iónicos como los valores de flujo neto de agua, se puede calcular las correspondientes concentraciones en el fluido secretado ($\text{Cl}^- = 24,5 \text{ meq/l}$; $\text{Na}^+ = 18.0 \text{ meq/l}$). Si aceptamos que ningún otro ión está siendo secretado por las células, el fluido transportado sería altamente hipotónico.

El efecto del amiloride reduciendo el flujo de Na^+ mucoso-seroso, y en un menor grado el flujo de Cl^- (los experimentos fueron realizados a circuito abierto), indica la existencia de un pequeño pero detectable transporte de Na^+ mucoso-seroso. La secreción de Cl^- fue significativamente mas alta que la secreción de Na^+ en experimentos de doble marcaje. Esto es más evidente bajo la acción del amiloride. Estos resultados refuerzan la idea de que existe una importante salida de Cl^- en el borde apical. Este movimiento extra de Cl^- debiera ser acompañado, al menos en condiciones de circuito abierto, por el eflujo de otro cation (K^+) o el influjo de otro anion (HCO_3^-).

La existencia de un movimiento neto de manitol en el sentido seroso-mucoso, acoplado a un significativo Jw en el mismo sentido (Tabla XI, Tabla XV), puede ser interpretado de dos diferentes maneras: 1) como resultado de la polarización de soluto debido a la existencia de capas no mezcladas tanto en la superficie mucosa como en la serosa

(Diamond, 1979) o 2) como consecuencia de un fenómeno de arrastre por solvente en la vía paracelular. Aunque los flujos de glucosa y manitol fueron simultáneamente medidos en la misma monocapa, esta asimetría no fue observada en los flujos unidireccionales de glucosa pero si en los flujos de manitol (Tabla XV). Estos resultados fuertemente sugieren que la primera posibilidad no puede ser cierta. Alternativamente, si aceptamos que el arrastre por solvente puede ser observado en la vía paracelular, simultáneamente aceptamos que existe una importante proporción del flujo que se mueve entre y no a través de las células.

En experimentos de doble marcaje los flujos transepiteliales de glucosa son 100 veces más alto que los flujos de manitol. Esto, nuevamente, esta de acuerdo con los resultados esperados ya que glucosa a través de su transportador puede ser tomado por las células epiteliales y no existe la misma posibilidad para el que debe pasae pracelularmente. No se observó neto de glucosa, esto no es inesperado si consideramos que éstas células están trabajando cómo células de la cripta. El efecto pequeño pero significativo del amiloride sobre la trasferencia de glucosa fue una interesante observación porque existe actualmente suficiente evidencia de que el amiloride afecta de alguna manera el trnasportador Na^+ /glucosa. Cook y col., informaron que el amiloride inhibe la captaciónn de Na^+ dependiente de hexosas en un clon de células de riñon de cerdo (LLC-RK1/CL4). También fue observado que la captación de glucosa

se vuelve sensible a la acción del amiloride en el yeyuno de rata luego de la adaptación de potasio (Capurro y col., 1990)

CAPITULO VII

CONCLUSIONES GENERALES

Como los resultados son discutidos ampliamente en cada uno de las líneas experimentales presentadas en los capítulos anteriores, aquí haremos un breve resumen tratando de proponer un modelo sobre el manejo de agua e iones en los distintos epitelios, incluyendo informaciones dadas por otros investigadores con anterioridad.

Respecto de nuestros interrogantes iniciales, se han podido dar varias respuestas sobre cual es la interrelación entre el movimiento de agua e iones y de las fuerzas de las cuales dependen.

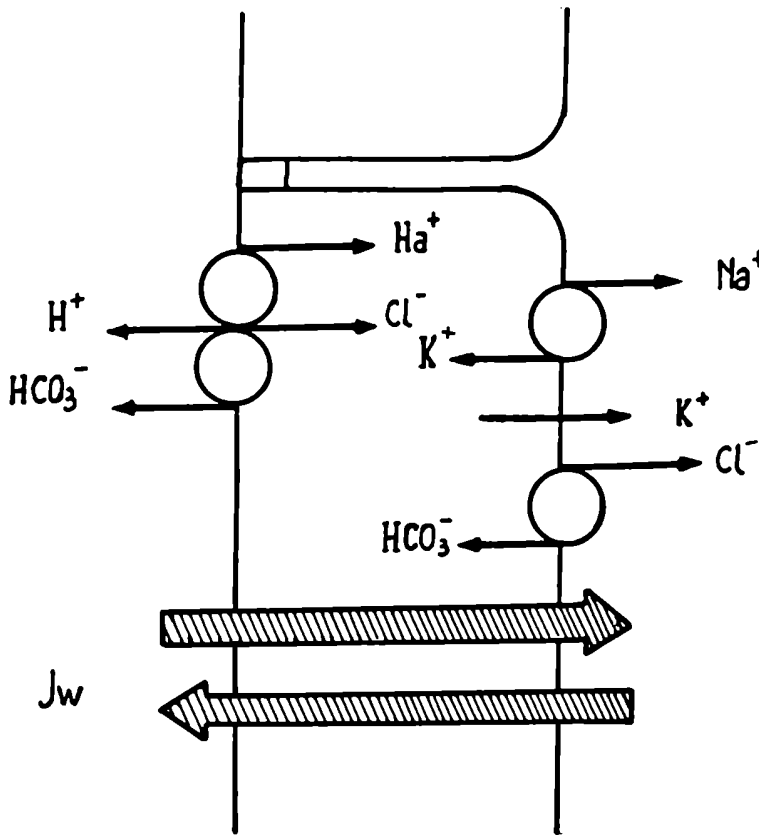
Existen en todos los epitelios un flujo neto espontáneo de agua, el que resulta de un balance entre flujos absortivos y secretorio, los que claramente dependen de los movimientos iónicos celulares involucrados. Este flujo existe en ausencia de fuerzas pasivas que pudieran impulsarlo (gradientes químicos, osmóticos o hidráulicos) (cap. III, IV, V, VI). Es por ello que si en estas condiciones existe, tiene que estar asociado al transporte celular.

Este movimiento de agua depende de la composición de los medios que bañan los epitelios, tal como se ve en las figuras de la pagina y en las tablas en pagina. Variaciones observadas tanto en el ciego de rata normal y adaptado como en el colon humano.

Usando estos resultados podemos dar modelos del movimiento de agua e iones en los distintos epitelios "in vitro". En estos modelos podemos distinguir similitudes y

diferencias en los distintos c6lones utilizados:

CIEGO DE RATA CONTROL



Se demuestra la existencia de un flujo neto de agua absorptivo, dependiente de Na^+ y Cl^- , el que es contrabalanceado por un flujo de agua secretor dependiente de HCO_3^- .

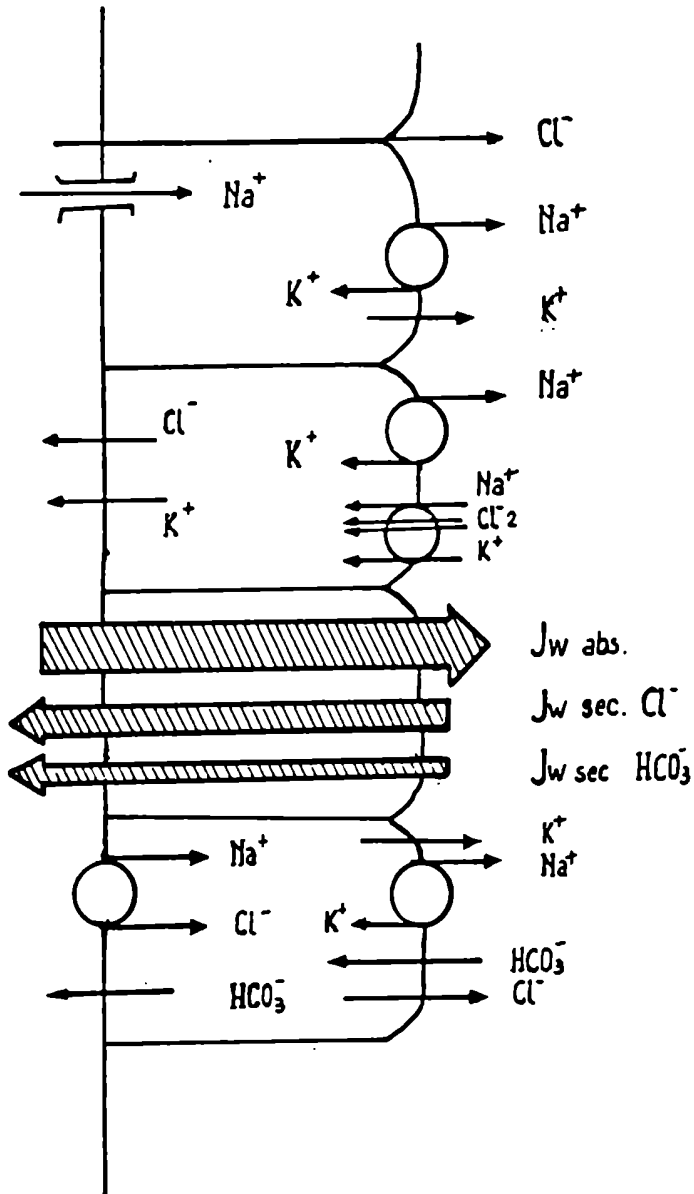
Entrada de sodio no electrog6nica no dependiente de amiloride.

CIEGO DE RATA ADAPTADA

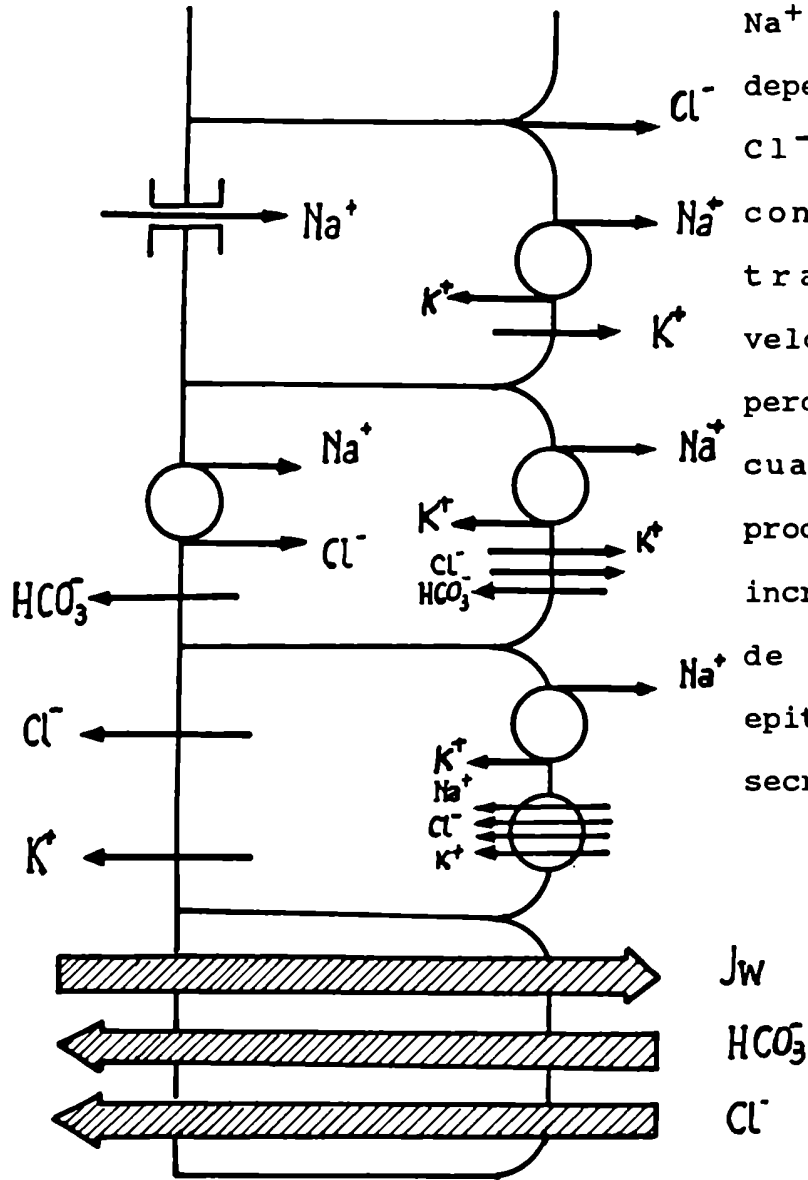
Se demuestra la existencia de un flujo absorptivo dependiente de Na^+ y Cl^- , compensado por un flujo secretor dependiente de Na^+ , Cl^- y HCO_3^- , de este último probablemente por una regulación del pH intracelular.

Es de notar que en este caso hay un incremento de la absorción de sodio que es electrogénico .

La aparición de nuevos mecanismos no implican la desaparición de los preexistentes.



COLON HUMANO



Existencia de flujos absorptivos dependiente de Na⁺ y flujos secretorios dependiente de HCO₃⁻ y de Cl⁻, este último en condiciones normales trabajaría a baja velocidad de transporte, pero en condiciones en las cuales se estimula la producción de AMPc, puede incrementar su transporte de manera tal de tener epitelios espontáneamente secretorios.

También se demostró que en estas barreras epiteliales se puede mover fluido aplicando gradientes osmóticos u hidrostáticos, siendo la relación lineal entre el gradiente aplicado y el flujo de agua observado. Este concepto fue utilizado para demostrar que las monocapas celulares se comportan también como una verdadera barrera epitelial, para la cual se puede definir una cierta permeabilidad osmótica o hidráulica. Encontrándose un flujo secretorio de agua asociado al transporte secretorio de NaCl.

En el ciego de rata control se encontró que existen estructuras determinadas para el movimiento de agua osmótica (canales), los que discriminan el pasaje de cargas positivas. Esto no se observa cuando se aplica gradiente hidrostático por lo que ambos flujos deben estar moviéndose por vías diferentes.

28/10/57

Alfredo
D.M. R. Pina

REFERENCIAS:

ARCHAMPONG EQ, HARRIS J, CLARK CG. Absorption and secretion of water and electrolytes across the healthy and diseased human colonic mucosa in vitro. Gut 13: 880-886, 1972.

ARTUSSON P, MAGNUSSON C. Epithelial transport of drugs in cell culture II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophicities across monolayers of intestinal epithelial (CaCo2) cells. J. Pharm. Sci. 79: 595-600, 1990.

BASTL C, HAYSLETT JP, BINDER HJ. Increased large intestinal secretion of potassium in renal insufficiency. Kidney Int. 12: 9-17, 1972.

BINDER HJ. Effect of dexamethasone on electrolyte transport in the large intestine of the rat. Gastroenteology 75; 221-217, 1975.

BLAIS A, BISSONNETTE P and BERTELOOT A. Common characteristics of Na^+ -dependant sugar transport in CaCO2 cells and human fetal colon. J. Membrane Biol. 99:

113-125, 1987.

BOURGUET J, JARD S. Un dispositif automatique de mesure et d'enregistrement du flux net d'eau à travers la peau et la vessie des amphibiens. *Biochim Biophys Acta* 88: 442-444, 1964.

BOYD JE, PALMORE WP, MULROW PJ. Role of potassium in the control of aldosterone secretion in the rat. *Endocrinology* 88: 556-565, 1971.

BUDINGER ME, FOSTER ES, HAYSLETT JP, BINDER HJ. Sodium and chloride transport in the large intestine of potassium loaded rats. *Am J Physiol* 240: F257-f268, 1986.

CAPURRO C, ESCOBAR E, IBARRA C, PORTA M, PARISI M. Water permeability in different epithelial barriers. *Biol. Cell.* 66: 145-148, 1989.

CEREIJIDO M, ROBBINS ES, DOLAN WJ, ROTUNDO CA, SABATINI DD. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol.* 77: 853-880, 1978.

CLAUSS W, SCHAFFER H, HORCH I, HORNICKE H. segmental differences in electrical properties and Na-transport of

rabbit caecum, proximal and distal colon in vitro.
Pflügers Arch. 408: 278-282, 1985.

CURRAN PF. Ion transport in intestine and its coupling to other transport processes. Federation Proc. 24: 993-999, 1985.

CURRAN PF and SCHWARTZ GF. Na, Cl and water transport by rat colon. The Journal of General Physiology. 43: 555-571, 1960.

DIAMOND JM. Osmotic water flow in leaky epithelia. J. Memb. Biol. 51: 195-216, 1979.

DHARMSATHAPHORN K, MANDEL KG, MC ROBERTS JA, TISDALE LD, MASUI H. A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. Am J Physiol. 243: G204-208, 1984.

DHARMSATHAPHORN K, MANDEL KG, MASUI H, MC ROBERTS JA, Vasoactive intestinal polypeptide-induced chloride secretion by a colonic epithelial cell line. Direct participation of a basolaterally localized Na^+ , K^+ , Cl^- cotransport system. J Clin Invest. 75: 462-471, 1985.

DAVIS GR, MORAWSKI SG SANTA ANA CA, FORDTRAN JS. Evaluation of chloride/bicarbonate exchange in the human

colon in vivo. J Clin Invest. 71: 201-207, 1983.

DAVIS GR, SANTA ANA CA, MORAWSKI SG and FORDTRAN JS. Permeability characteristics of human jejunum, ileum, proximal colon and distal colon: results of potential difference measurements and unidirectional fluxes. Gastroenterology. 83: 844-850, 1982.

DEBONGNIE JC, PHILLIPS SF. Capacity of the human colon to absorb fluid. Gastroenterology 74: 698-703, 1978.

DEVROEDE GJ, PHILLIPS SF. Studies of the perfusion technique for colonic absorption. Gastroenterology 56: 92-100, 1969.

DEVROEDE GJ, PHILLIPS SF. Conservation of sodium , chloride, and water by the human colon. Gastroenterology 56; 1010-109, 1969.

EDMONDS CJ. The gradient of electrical potential difference and of sodium and potassium of the gut contents along the caecum and colon of normal and sodium depleted rats. J Physiol Lond. 193: 571-588, 1967.

EDMONDS CJ, GODFREY RC. Measurement of electrical potentials of the human rectum and pelvic colon in normal and aldosterone patients. Gut 11: 330-337, 1970.

FISCHBARG J, LIEBOVITCH LS, KENIZRCK JP. Central role for cell osmolarity in isotonic fluid transport across epithelia. Biol Cell 55: 239-244, 1985.

FISCHBARG J, WARSHAWSKY CR, LIM JJ. Pathways for hydraulically and osmotically induced water fluxes across epithelia. Nature 266: 71-73, 1976.

FISHER KA, BINDER HJ, HAYSLETT JP. Potassium secretion by colonic mucosal cells after potassium adaptation. Am J Physiol. 231: 987-994, 1976.

FOGH J, TREMPE G. New tumor cell lines, in human tumor cells "in vitro" (J. Fogh, ed.), New York, plenum press. pp. 115-141, 1975.

FONDACARO JD. Intestinal ion transport and diarrheal disease. Am J Physiol. 250: G1-G8, 1986.

FOSTER ES, BUDINGER ME, HAYSLETT JP, BINDER HJ. Ion transport in proximal colon of the rat. Sodium depletion stimulates neutral sodium chloride absorption. J Clin Invest. 77: 228-235, 1986

FOSTER ES, HAYSLETT JP, BINDER HJ. Mechanism of active potassium absorption and secretion in rat colon. Am J

Physiol. 246: G611-G617, 1984.

FOSTER ES, SANDLE GI, HAYSLETT JP, BINDER HJ. Cyclic adenosine monophosphate stimulates active potassium secretion in the rat colon. Gastroenterology 84: 324-330, 1983b.

FOSTER ES, ZIMMERMAN TW, HAYSLETT JP, BINDER HJ. Corticosteroid alteration of active electrolyte transport in rat distal colon. Am J Physiol. 245; G668-G675, 1983 a.

FROMM M AND HEGEL U. Segmental heterogeneity of epithelial transport in rat large intestine. Pflügers Arch. 378: 71-83, 1978.

GRADY GS, DUHAMEL RC, MOORE EW. Active transport of sodium by human colon in vitro. Gastroenterology 59: 583-585, 1970.

GODEFROY O, HUET C, BLAIR L, SAHUQUILLO-MERINO C, LOUVARD D. Differentiation of a clone isolated of histocompatibility antigens (HLA) and of transferrin receptors. Biology of the cell 63: 41-55, 1988.

GONZALEZ-MARISCAL L, CHAVEZ DE RAMIREZ B, CERREIJO M. Tight junctions formation in cultured epithelial cells

(MDCK). J. Memb. Biol. 86: 113-125, 1985

GRASSET E, PINTO M, DUSSAULX E, ZWEIBAUM A, DESJEUX J-F. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. Am. J. Physiol. 247: C260-C267, 1984.

HATCH M, FREEL R. Electrolyte transport across the rabbit caecum in vitro. Pfügers Arch. 411: 333-338, 1988.

HAYSLETT JP, BINDER HJ. Mechanism of potassium adaptation. Am J Physiol 243: F103-F112, 1982

HAWKER PC, MASHITE KE, TURNBERG LA. Mechanisms of Na, Cl, and K in the human colon. Gastroenterology 74: 1241-1247, 1978.

HIDALGO IJ, RAUB TJ, and BORCHARDT RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (CaCo2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastroenterology. 96: 736-749, 1989.

HIRSCH D, PACE P, BINDER HJ, HAYSLETT JP. Evidence that aldosterone influences transport in target tissues by dissimilar mechanism. Am J Physiol. 248: F507-F512, 1985.

HUET C, SAHUQUILLO-MERINO C, COUDRIER E, LOUVARD D.
Absorptive and mucus secreting subclones isolated from a
multipotent intestinal cell line (HT29) provide new
models for cell polarity and terminal differentiation. J
Cell Biol. 105: 345-357, 1987.

KASHGARIAN M, TAYLOR CR, BINDER HJ, HAYSLETT JP.
Amplification of cell membrane surface in potassium
adaptation. Lab Invest. 42:581--588, 1980

LEVITAN R and INGELFINGER FJ. Effect of d-aldosterone on
salt and water absorption from the intact human colon.
Journal of Clinical Invest. 44, 5 ; 801-808, 1965.

LEVITAN R, FORDTRAN JS, BURROWS BA (1962). Water and
salt absorption in the human colon. J Clin Invest. 41:
1754-1759 (1962).

LUBCKE P, HAAG K, BERGER E, NAUF H and GEROK W. Ion
transport in rat proximal colon in vivo. Am. J. Physiol.
251: G132-G139, 1986.

LUCKHOFF A, HORSTE N. Hormonal regulation of electrolyte
and water transport in the colon. Korn. wochwmschr. 62:
55-563, 1984.

MISFELDT DS, HAMAMOTO ST, PITEIXA DR. Transepithelial transport in cell culture. Proc Natl Acad Sci. USA 73: 1212-1216, 1976.

MOSTOV KE, BLOBEL G. A transmembrane precursor of secretory component; the receptor for transcellular transport of polymeric immunoglobulins. J Biol Chem 257: 11816-11821, 1982.

NAFTALIN RJ, TRIPHATI S. Passive water flows driven across the isolated rabbit ileum by osmotic, hydrostatic and electrical gradients. J Physiol (London) 360: 27-50, 1985.

PAPPENHEIMER JR. Physiological regulation of transepithelial impedance in the intestinal mucosa of rats and hamsters. J Membr Biol. 100: 137-148, 1987.

PAPPENHEIMER JR, REISS KZ. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. J Membr. Biol. 100: 123-136, 1987.

PARISI M, CANCELA L. Time course studies on phosphate transfer in frog urinary bladder. Kidney Int 33: 58-63, 1988.

PARISI M, MEROT J, BOURGUET J. Glutraldehyde fixation preserves the permeability properties of the ADH-induced water channels. *J. Membrane Biol.* 86: 239-245, 1985.

PARISI M. IBARRA C, PORTA M. Intracellular Ca⁺⁺ concentration and the antidiuretic hormone-induced increase in water permeability: effects of ionophore A23187 and quinidine. *Biochin. Biophys. Acta* 88; 442-444, 1987.

PARISI M, WIETZERBAUM J AND BORGUET J. Intracellular pH, transepithelial pH gradients, and ADH-induced water channels. *Am. J. Physiol.* 244: F712-F718, 1983.

PHILLIPS SF. Diarrhea: a current view of the pathophysiology. *Gastroenterology* 63: 743-749, 1972.

PINTO M, APPAY MD, SIMON-ASSMANN P, CHEVALLIER G, DRACOPOLI N, FOGH J and ZWEIMBAUM A. Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol. Cell.* 44: 193-196, 1982.

PINTO M, ROBIEN-LEON S, APPAY MD, KEDINGER M, TRIADOU N, DUSSAULX B, LACROIX B, SIMON-ASSMANN P, HAFFEN K, FOGH J, ZWEIMBAUM A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human adenocarcinoma cell-line Caco-

2 in culture. Biol Cell. 47: 323-330, 1983.

PORTA M, CAPURRO C, PARISI M. Water permeability in the human amnion: pH regulation of the paracellular pathway. Biochim. biophys. acta 980: 220-240, 1989.

RASK-MADSEN J, HJELT K. Effects of amiloride on electrical activity and electrolyte transport in human colon. Scand. J. Gastroenterol 12: 1-6, 1977.

RASTEGAR A, BIEMESDERFER D, KASHGARIAN M, HAYSLETT JP. Changes in membrane surfaces of collecting ducts cells in potassium adaptation. Kidney Int. 18: 293-301, 1980.

REUSS L, COSTANTIN. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange at the apical membrane of Necturus gallbladder. J Gen Physiol. 83: 801-818, 1984.

ROUSSET M, DUSSAULX E, CHEVALIER G, ZWEIBAUM A. Expression phénotypique des antigènes coliques polymorphes (WZ) dans les adénocarcinomes de colon humain. C.R. Acad Sci (Paris) 286: 659-662, 1978.

SANDLE GI, FOSTER ES, LEWIS SA, BINDER HJ, HAYSLETT JP. The electrical basis for enhanced potassium secretion in rat distal colon during dietary potassium loading. Pflugers Arch 403: 433-439, 1985

SANDLE GI, McGLONE F. Segmental variability of membrane conductances in rat and human colonic epithelia. (Implications for Na, K and Cl transport). Pflügers Arch. 410: 173-180, 1987.

SANDLE GI, WILLS NK, ALLES W, BINDER HJ. Electrofisiology of the human colon: evidence of segmental heterogeneity. Gut 27: 999-1005, 1986.

SELLIN J, DE SOIGNE R. Ion transport in human colon in vitro. Gastroenterology 93,; 441-448, 1987.

SELLIN J, DE SOIGNE R. Rabbit proximal colon: a distinct transport epithelium. Am J Physiol 246; G603-G610, 1984.

SELLIN J, DE SOIGNE R. Steroids alter ion transport and absorptive capacity in proximal and distal colon. Am J Physiol. 249; G113-G119, 1985.

SELLING JH, OYARZABAL H, CRAGOE EJ. Electrogenic sodium absorption in rabbit cecum "in vitro". J Clin Invest. 81: 1275-1283, 1988.

SCHULT SG and FRIZZELL RA. An overview of intestinal absorptive and secretory processes. Gastroenterology. 63: 161-170, 1972.

SIGA EL, MARTIN RS, IBARRA C, VERON D, IBARRA F, GIMENEZ M, PARISI M, ARRIZURIETA E. Voltage dependence and barium sensitivity of colonic K⁺ secretion in renal failure. Am J Physiol 256: F490-F496, 1989.

SILVA P, HAYSLETT JP, EPSTEIN FH. The role of Na-K-activated adenosine triphosphatase in potassium adaptation. J Clin Invest. 52: 2665-2671, 1973.

STEELE RE, PRESTON AS, JOHNSON JP, HANDLER JS. Porous-bottom dishes for culture of polarized cells. Am J Physiol. 251: C136-C139, 1986.

SULLIVAN SK, SMITH PL. Active potassium secretion by rabbit proximal colon. Am J Physiol. 250; G475-G483, 1986.

TATCHER JC, RADIKE AW. Tolerance to potassium intoxication in the albino rat. Am J Physiol 151:138-146, 1947.

TRIPHATI S, BOULPAEP E. Cell membrane water permeabilities and streaming currents in Ambystoma proximal tubule. Am J Physiol 255: F188-F203, 1988.

TURNAMIAN SG, BINDER HJ. Regulation of active sodium and

potassium transport in the distal colon of the rat. Role of aldosterone and glucocorticoid receptors. J Clin Invest 84: 1924-1929, 1989.

TYOR N.P., AND ELRIDGE J. S. A comparison of the metabolism of rubidium 86 and potassium 42 following simultaneous injection in the man. Am. J. Med. Sci. 232: 186-202, 1956.

VAN OS CH, MICHELS JA, SLEGERS JFG. Effect of electrical gradients on volume flows across gallbladder epithelium. Biochim Biophys Acta 443: 545-555, 1976.

VAN OS CH, WIEDNER G, WRIGHT EM. Volume flow across gall-bladder epithelium induced by small hydrostatic and osmotic gradient. J Membr Biol 49: 1-20, 1979.

WADE JB, O'NEIL RG, PRYOR JL, BOULPAEP EL. Modulation of cell membrane area in renal collecting tubules by corticosteroid hormones. J Cell Biol 81: 439-445, 1979.

WILLS NK, ALLES WP, SNADLE GI, BINDER HJ. Apical membrane properties and amiloride binding kinetics of the human descending colon. Am J Physiol. 247; G749-G757, 1984.

WRIGHT EM, SMULDERS AP, TORMEY JM. The role of lateral

intercellular spaces and solute polarization in the unstirred layers. J Membr Biol. 72: 198-219, 1972.

ZWEIBAUM A, LABURTHE M, GRASSET E, LOUVARD D. The use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In: Handbook of Physiology. The gastrointestinal system IV (in press).

ZWEIBAUM A, TRIADOU N, KEDINGER M, AUGERON C, ROBINELEON S, PINTO M, ROUSSET M, HAFFEN K. Sucrose-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. Int J Cancer 32: 407-412, 1983.

ZWEIBAUM A, HAURI HP, STERCHI E, CHANTRET I, HAFFEN K, BAMAT J, SORDAT B. Immunohistological evidence obtained with monoclonal antibodies of small intestinal brush border hydrolases in human colon cancer cells and foetal colons. Int J Cancer 34: 591-598, 1984.

ZWEIMBAUM A, PINTO M, CHEVALLIER G, DUSSAULX E, TRIADOU N, LACROIX B, HAFFEN K BRUNJL, ROUSSET M. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. J Cell Physiol. 122: 21-29, 1985.

TRABAJOS PUBLICADOS

Water and ion handling in the rat cecum

E. ESCOBAR, C. IBARRA, E. TODISCO, AND M. PARISI
*Seccion de Biomembranas, Departamento de Fisiologia, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires, 1121 Buenos Aires, Argentina*

ESCOBAR, E., C. IBARRA, E. TODISCO, AND M. PARISI. *Water and ion handling in the rat cecum*. *Am. J. Physiol.* 259 (Gastrointest. Liver Physiol. 22): G786-G791. 1990.—The minute-by-minute net water movement (J_w) in the rat cecum was correlated with the transepithelial potential difference (PD), short-circuit current (I_{sc}), and the unidirectional Na^+ , Cl^- , and Rb^+ fluxes, with the following results. 1) J_w was a linear function of the applied hydrostatic or osmotic transepithelial gradients (hydrostatic permeability coefficient = 0.164 ± 0.018 cm/s, $n = 13$; osmotic permeability coefficient = 0.0014 ± 0.0002 cm/s, $n = 6$). 2) A fraction of this absorptive J_w (0.17 ± 0.03 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 13$) was independent of the presence of any osmotic, hydrostatic, or chemical gradient. 3) This fraction was Na^+ dependent, associated with an amiloride-insensitive PD and net Na^+ (2.37 ± 0.68 $\mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 6$) and Cl^- influxes (3.45 ± 1.46 $\mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 6$), measured under short-circuit conditions. No net Rb^+ movement was detected. 4) The absorptive J_w increased when HCO_3^- was replaced by tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris^+) buffer or Cl^- by SO_4^{2-} . A good agreement between the observed and the expected J_w (assuming isosmotic reabsorption) was observed in the absence of HCO_3^- . 5) The presence of an osmotic but not a hydrostatic transepithelial gradient generated a transepithelial PD. These results show that water movement across the rat cecum in vitro is the result of a combination of hydrostatic-, osmotic-, and transport-associated transfers. Concerning this last driving force, the observed results indicate that the transport-related J_w results from the addition of an absorptive J_w , coupled to a nonelectrogenic NaCl entry, plus a secretory J_w , probably coupled to HCO_3^- secretion.

osmotic gradients; water permeability; water pathways; water and ion coupling; hydraulic permeability

THE MAMMALIAN LARGE INTESTINE reabsorbs substantial quantities of water. The human colon, for example, receives a daily volume load of some 2,000 ml from the ileum, whereas the fecal excretion is only 50 ml/day (8). It is generally accepted that this water absorption is associated with transepithelial ionic transfer (6), but many important points are not yet clarified. 1) What is the real coupling between ions and water in the large intestine? 2) What is the role of the osmotic and hydrostatic gradients in the observed water fluxes? 3) What is the relative importance of the paracellular and transcellular routes for water transfer? The properties of the large intestine vary from segment to segment (2) and from species to species (15). To answer these questions, we have chosen the rat cecum, where several parameters were measured: the minute-by-minute net water movement (J_w), the transepithelial potential difference (PD),

the short-circuit current (I_{sc}), and the unidirectional fluxes of ^{22}Na , ^{36}Cl , and ^{86}Rb (as a potassium marker).

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats weighing 250–300 g were maintained on ad libitum water and standard chow. The animals were killed with a blow to the head, and the abdomen was entered through a midline incision. The cecum was removed, flushed with cold saline, opened along the mesenteric border, and rinsed. Two symmetric fragments were then placed (mucosal surface upwards) on a nylon mesh and mounted as diaphragms between Lucite chambers (exposed area 1.7 cm^2).

The J_w was recorded as previously described in other epithelia (1). Briefly, the mucosal chamber was closed, and the tissue was applied against the nylon mesh by a variable hydrostatic pressure ($\Delta P \geq 5$ cmH_2O). When fluid moved across the tissue, an automatic device injected or extracted fluid to maintain the volume of the mucosal chamber constant. A signal, proportional to the injected or extracted volume, was recorded minute by minute. Absorptive or secretory fluxes as small as 50 nl/min could be detected.

Voltage electrodes consisted of agar bridges connected to calomel half cells and placed adjacent to the epithelium. Agar bridges had the same composition as the corresponding bath solutions. The transepithelial PD could be short circuited through current passing electrodes (Ag-AgCl wires) located at the rear of each half chamber (12). No significant asymmetries in junction potentials were observed when NaCl was replaced by Na_2SO_4 , to prepare the agar bridges (one sulfate bridge was tested against a chloride bridge). Furthermore, no effect of polyethylene glycol (PEG) addition on the junction potentials was observed, i.e., no significant PD developed when 50 mM PEG were added to one of two chambers separated by a Millipore filter (0.65 μm).

Transepithelial ionic fluxes were measured at 5-min intervals as previously described (12). The tracer was added to one side of the membrane, and the fluid on the other side was completely removed and counted every 5 min during at least 12 consecutive periods. In most experiments the unidirectional mucosal-to-serosal ($J_{m \rightarrow s}$) and serosal-to-mucosal ($J_{s \rightarrow m}$) fluxes were simultaneously measured in two fragments of the same cecum. Double marking was currently employed, allowing also the simultaneous determination of ^{22}Na , ^{36}Cl , or ^{86}Rb unidirectional fluxes. The latter isotope was used as a marker for K^+ fluxes (18). All unidirectional fluxes were

measured under short-circuit conditions.

The employed saline contained (in meq/l) 141 Na⁺, 2 K⁺, 2.4 Ca²⁺, 2.4 Mg²⁺, 120.3 Cl⁻, 25 HCO₃⁻, 4.8 HPO₄⁻, 4 H₂PO₄⁻, and 10 mM glucose. When Na⁺ concentration is zero, a low-bicarbonate (2.5 meq/l) saline was employed. In some experiments a tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer [Tris⁺ 7.5 meq/l, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)⁻ 12.5 meq/l] replaced bicarbonate. Bath solutions were maintained at 37°C. The serosal solution was continuously bubbled with 95% O₂-5% CO₂ (bicarbonate buffer) or 100% O₂ (Tris buffer). The medium pH was 7.8 (7.4 for 2.5 HCO₃⁻), and medium osmolarity ranged between 293 and 310 mosmol/kg. Hypertonic solutions were obtained by adding PEG (mol wt 4,000). To calculate the actual applied osmotic gradient, the theoretical osmolarity was corrected by applying the corresponding osmotic coefficient ($g = 2.5$) for the employed PEG (13).

RESULTS

Figure 1 shows the spontaneous J_w . A net absorptive flux was observed when the tissue was mounted between two identical standard solutions [$0.25 \pm 0.02 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $\Delta P = 13 \text{ cmH}_2\text{O}$]. The absorptive flux varied with the applied hydrostatic or osmotic gradients or when the saline ionic composition was changed (Fig. 1).

J_w and the transepithelial hydrostatic and osmotic gradients. Figure 2 shows the absorptive J_w when ΔP s were applied on the mucosal side. Different saline solutions (Na⁺-HCO₃⁻-Cl⁻, Na⁺-HCO₃⁻-SO₄²⁻, Na⁺-Tris⁺-Cl⁻, and choline⁺-HCO₃⁻-Cl⁻; Table 1) were present on both sides of the tissue. A linear relationship was observed in all cases between fluid absorption and pressure. The hydrostatic permeability coefficients (P_{hydr}) were estimated from the slope of the regression lines (Table 1). No significant differences were observed among the four conditions tested. The ordinate intercept was significantly different from zero when the standard saline was present in the mucosal and serosal baths (Table 1). This intercept represents the transport-related J_w , in the ab-

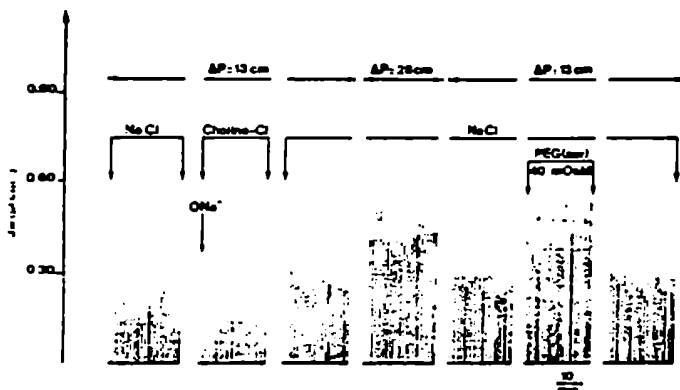


FIG. 1. Net water flux (J_w) across rat cecum. Height of each line is proportional to J_w (measured during successive 1-min period). ΔP , transepithelial hydrostatic gradient (cmH₂O, mucosal side positive); NaCl, standard buffer solution (HCO₃⁻ 2.5 meq/l) was present on both sides of tissue; choline-Cl, this salt replaced NaCl and K⁺ salts replaced other Na⁺ salts (0 Na⁺); PEG, polyethylene glycol was added to serosal bath.

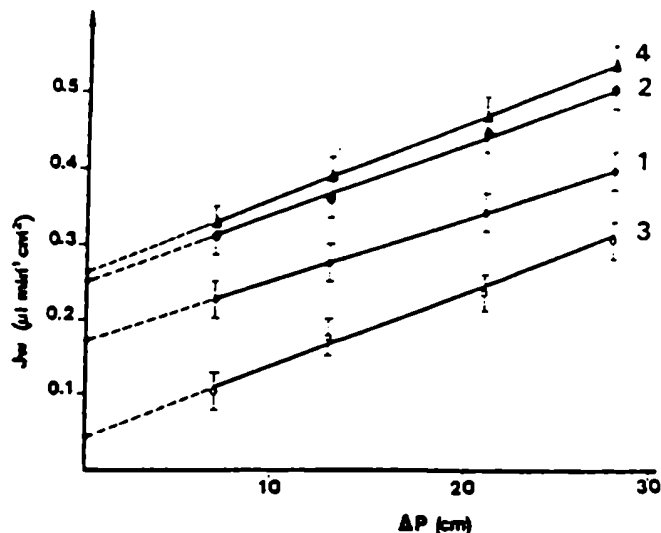


FIG. 2. J_w (means \pm SE) as function of ΔP (cmH₂O). Cecum was mounted between identical solutions. Solutions used were 1, control (NaCl); 2, Na₂SO₄ replacing NaCl; 3, choline-Cl⁻ replacing NaCl; 4, Tris-HEPES replacing NaHCO₃. Slopes (hydrostatic permeability coefficient) are indicated in Table 1.

sence of any hydrostatic, osmotic, or chemical gradient. It can be observed that the ordinate intercept was higher when SO₄²⁻ replaced Cl⁻ (total osmolarity was adjusted with PEG) or when Tris buffer replaced HCO₃⁻. The transport-associated J_w can be also calculated by subtracting from the total observed J_w at 13 cmH₂O, the mean hydrostatic J_w at this pressure level (see Table 1).

A linear relationship (Fig. 3) was also observed between J_w and the applied transepithelial osmotic gradient [the serosal bath was made hypertonic by adding PEG (0-40 mM) to the standard saline]. From the slope of the regression line a transepithelial osmotic permeability coefficient (P_{osm}) can be obtained (0.0014 cm/s , $n = 6$). The ordinate intercept gave a value ($0.24 \pm 0.02 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) that was not different from the observed absorptive flux, in the absence of an osmotic gradient, at 13 cmH₂O. The transport-associated J_w ($0.16 \pm 0.02 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) was calculated by subtracting the mean hydrostatic flux at 13 cmH₂O ($0.08 \pm 0.02 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$). It was also not significantly different from the one obtained from Fig. 2 (Table 2).

J_w and the ionic composition of the buffer solutions. When the rat cecum was mounted between two standard saline solutions, an amiloride-insensitive transepithelial PD (serosal side positive) was associated with the absorptive flux (Fig. 4). This PD value changed spontaneously, with a maximum of 6.5 mV. Then it stabilized at lower but always positive values ($3.7 \pm 0.5 \text{ mV}$, $n = 7$). Mean transepithelial resistance was $145 \pm 15 \Omega \cdot \text{cm}^2$. When NaCl was isosmotically replaced by choline chloride in both sides of the tissue (choline⁺-Cl⁻-HCO₃⁻, Table 1), P_{hydr} did not change significantly. Nevertheless, the ordinate intercept was not significantly different from zero (Fig. 2, Table 1). The observed J_w at 13 cm H₂O fell significantly in the absence of Na⁺ (control 0.30, experimental 0.20, mean difference $0.10 \pm 0.03 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 5$), whereas the transepithelial PD was abol-

TABLE 1. Transport-associated J_w and P_{hydr} as function of ionic composition of incubating media

Condition	Transport-Associated J_w , $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	P_{hydr} , cm/s	ΔJ_w , $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$
1) $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-\text{-Cl}^-$	0.17 ± 0.03 (13)	0.164 ± 0.018 (13)	
2) $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-\text{-SO}_4^{2-}$	0.25 ± 0.03 (14)	0.185 ± 0.060 (5)	$+0.07 \pm 0.02$ (12)
3) Choline- $\text{HCO}_3^-\text{-Cl}^-$	0.04 ± 0.03 (6)	0.222 ± 0.041 (6)	-0.10 ± 0.03 (6)
4) $\text{Na}^+\text{-Tris}^-\text{-Cl}^-$	0.26 ± 0.04 (7)	0.203 ± 0.050 (5)	$+0.14 \pm 0.03$ (5)

Values are means \pm SE; no. of experiments in parentheses. Conditions indicate 3 major ions present on both sides of tissue. Transport-associated water flux (J_w) for conditions 1 and 3 was calculated from data presented in Fig. 2 and represents ordinate intercepts of respective regression lines. In conditions 2 and 4 transport-associated J_w was calculated by deducting from total observed J_w , at 13 cmH₂O, mean hydrostatic J_w at this pressure level. Hydrostatic permeability coefficient (P_{hydr}) was calculated, in all cases, from slope of regression lines presented in Fig. 2. Last column indicates mean difference in paired experiments ($\Delta P = 13$) between tested and control (1). Differences were significant at a level of $P < 0.05$.

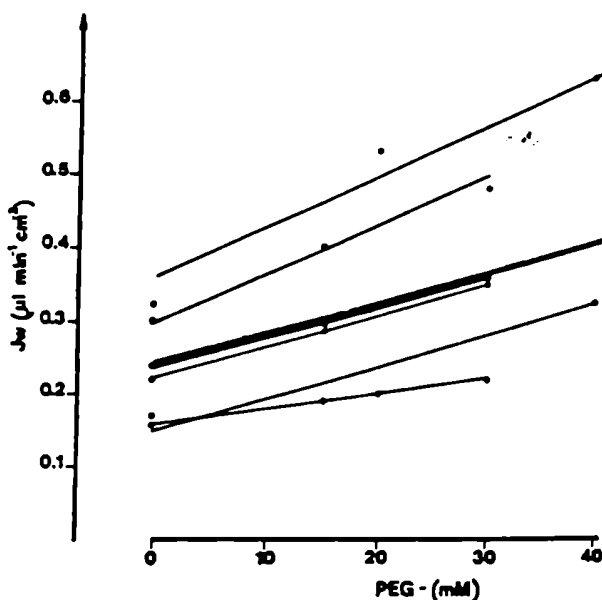


FIG. 3. J_w as function of PEG concentration in serosal bath ($n = 6$). Ordinate intercept, $0.24 \pm 0.02 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$; slope, $0.0014 \pm 0.0002 \text{ cm/s}$.

ished ($-0.10 \pm 0.07 \text{ mV}$, $n = 6$).

Replacement of Cl^- by SO_4^{2-} significantly increased the transport-associated J_w , measured under steady-state conditions ($\Delta P = 13 \text{ cmH}_2\text{O}$, Table 1, Fig. 2). The transepithelial PD underwent a transient increase followed by a sustained reduction (Fig. 4).

Replacement of HCO_3^- by Tris buffer also increased the absorptive J_w (Table 1), whereas the observed PD decreased (control $3.0 \pm 0.6 \text{ mV}$, experimental $0.7 \pm 0.2 \text{ mV}$, $n = 4$). Figure 5 shows that in this situation the I_{sc} could drop to zero (mean value $4.2 \pm 3.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 5$).

Net J_w and transepithelial PD in the presence of trans-epithelial salt and osmotic gradients. The existence of a salt gradient across an epithelial barrier can generate a transepithelial PD (9, 17, 19, 21). To test this point in the rat cecum, NaCl was replaced by Na_2SO_4 on the mucosal side (total osmolarity was adjusted with PEG). The transepithelial PD increased concomitantly with a reduction in the net absorptive J_w (Table 2, condition 1, Fig. 6). When the same replacement was made in the serosal side, the transmural potential reversed, and J_w increased (Table 2, condition 2). When NaCl was isos-

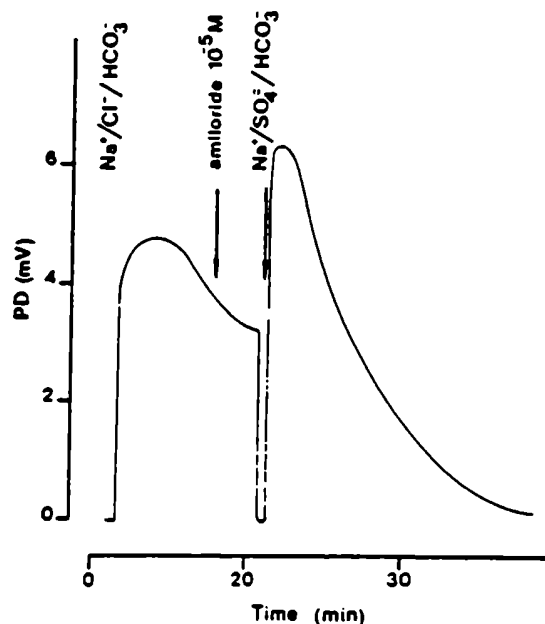


FIG. 4. Transepithelial potential difference (PD, serosal side positive) as function of time. Effect of amiloride (mucosal) and of replacement of Cl^- by SO_4^{2-} (mucosal and serosal). Diuretic did not change PD.

motically replaced with sucrose in the mucosal bath, a large PD was observed (serosal side positive, Table 2, condition 3, Fig. 6) associated with a significant reduction in J_w . In experiments started in the presence of choline-methyl- SO_4^{2-} on both sides of the tissue, unilateral replacement of choline-methyl- SO_4^{2-} by choline- Cl^- also generated a significant absorptive J_w and a bionic PD (Table 2).

In other experiments the serosal or mucosal solutions were changed by a hypertonic one, containing 40 mosmol/kg PEG. This led to the development of a transmural potential (Table 2, conditions 4 and 5) with opposite polarity to analogous observations in the rabbit gallbladder (19-21). The PD transient had its maximal slope immediately after the establishment of the osmotic gradient (Fig. 6). On the other hand, no significant changes in PD developed during pressure filtration (Table 2, condition 6).

Unidirectional Na^+ , Cl^- , and Rb^- fluxes. Na^+ , Cl^- , and Rb^- unidirectional fluxes were measured (in double-label experiments) as described in MATERIALS AND METHODS.

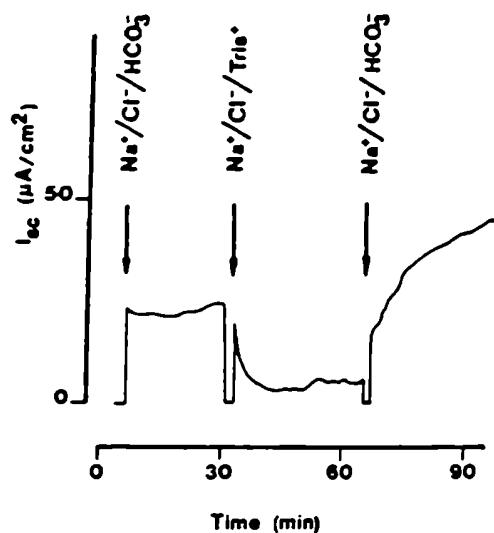


FIG. 5. Short-circuit current (I_{sc}) across rat cecum. Effect of replacement of HCO_3^- by Tris^- (mucosal and serosal).

TABLE 2. Net J_w and transepithelial PD in presence of transepithelial salt and osmotic gradients

Condition	n	ΔPD , mV	ΔJ_w , $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$
1: Mucosal Na_2SO_4	5	$+4.7\pm 0.8$	-0.07 ± 0.01
2: Serosal Na_2SO_4	11	-4.9 ± 0.5	$+0.12\pm 0.02$
3: Mucosal sucrose	3	$+7.9\pm 2.6$	-0.14 ± 0.02
4: Mucosal choline- Cl^-	3	-4.4 ± 0.3	$+0.13\pm 0.04$
5: Serosal PEG	12	$+1.8\pm 0.2$	$+0.13\pm 0.02$
6: Mucosal PEG	5	-2.0 ± 0.2	-0.24 ± 0.08
7: Mucosal hydrostatic gradient	3		$+0.25\pm 0.02$

Values are means \pm SE. In conditions 1-3, 5-7 NaCl and other standard components were initially present on both sides of tissue. In conditions 1-3 Na_2SO_4 or sucrose replaced NaCl in indicated bath. In condition 4 choline-methyl-sulfate initially replaced NaCl on both sides of tissue and then choline- Cl^- replaced choline-methyl-sulfate in mucosal bath. In condition 5-6 PEG was added (40 mM) either to serosal or mucosal bath. In condition 7 additional hydrostatic gradient (15 cmH_2O) was applied to mucosal side. Potential difference (PD) values indicate associated changes in transmembrane PD (serosal side positive). Last column indicates changes in observed J_w (absorptive positive). ΔPD and ΔJ_w were measured simultaneously in steady-state conditions.

The $J_{m\rightarrow s}$ and $J_{s\rightarrow m}$ were determined simultaneously, in two adjacent fragments of each cecum. The results are summarized in Table 3. Rb^+ fluxes were $<2\%$ of the Cl^- fluxes. Net Na^+ and Cl^- fluxes were observed under short-circuit conditions. In contrast, no significant net Rb^+ movement was detected. Na^+ net fluxes were independent of the presence or absence of HCO_3^- (Table 3).

DISCUSSION

The development of a net J_w across an epithelial barrier must be associated with at least one of three basic situations: 1) the existence of a transepithelial osmotic gradient, 2) the existence of a transepithelial hydrostatic gradient, 3) the presence of a net J_w coupled to an active transport process. The net absorptive or secretory J_w will be the algebraic sum of the water transfer associated with those mechanisms.

Solute-driven J_w in the rat cecum. The rat cecum,

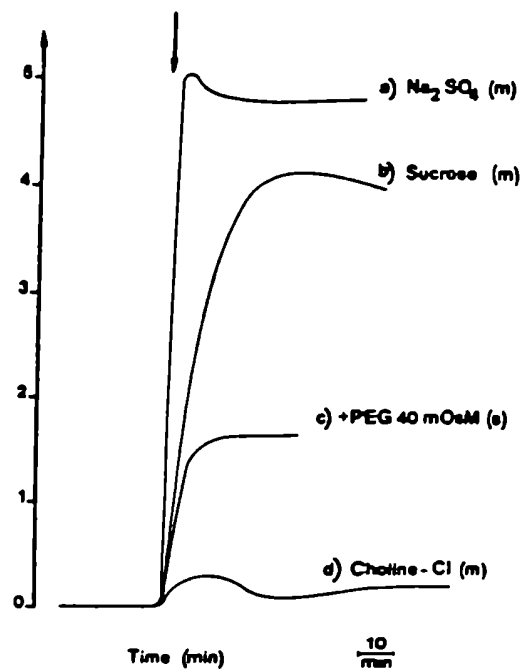


FIG. 6. Changes in transepithelial PD elicited by ion or osmotic gradients. Initially all tissues were between 2 standard saline solutions. At arrow mucosal (m) or serosal (s) bath composition was changed. a: Na_2SO_4 replaced NaCl isosmotically in mucosal bath. b: sucrose replaced NaCl isosmotically in mucosal bath. c: PEG, 40 mosmol, was added to serosal bath. d: choline- Cl^- isosmotically replaced NaCl in mucosal bath.

TABLE 3. Unidirectional $J_{m\rightarrow s}$ and $J_{s\rightarrow m}$ Cl^- , Rb^+ , and Na^+ fluxes

	Cl^-	Rb^+	Na^+	
			HCO_3^-	Tris^-
$J_{m\rightarrow s}$	11.61 ± 1.02	0.169 ± 0.022	5.92 ± 0.55	6.26 ± 0.30
$J_{s\rightarrow m}$	8.16 ± 1.05	0.144 ± 0.021	3.55 ± 0.34	3.40 ± 0.42
J_{net}	3.45 ± 1.46	0.025 ± 0.023	2.37 ± 0.68	2.88 ± 0.53
P value	<0.05	NS	<0.05	<0.01

Values are means \pm SE in $\mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 6$ experiments. $J_{m\rightarrow s}$, $J_{s\rightarrow m}$, mucosal-to-serosal and serosal-to-mucosal fluxes, respectively. Na^+ fluxes were measured in the presence of HCO_3^- or Tris^- .

mounted between two standard saline solutions containing Na^+ , Cl^- , and HCO_3^- , showed an amiloride-insensitive PD (serosal side positive), a net absorptive and sodium-dependent J_w , and net absorptive Na^+ and Cl^- fluxes, measured under short-circuit conditions. These results are compatible with the presence of a nonelectrogenic NaCl entry mechanism in the mucosal border of the rat cecum. This mechanism, recently proposed for the rabbit cecum (7, 16) and the distal colon of the rat (15), is frequently operating as a $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange coupled to a $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ exchange (6).

Other net ionic transfers are, however, necessary to understand the results. When the tissue was bathed on both sides with standard saline, the I_{sc} was approximately $+25.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($3.7 \text{ mV}\cdot 145 \Omega^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$). From the net absorptive Cl^- and Na^+ fluxes the expected I_{sc} would be (taking into account data scattering) not significantly different from zero. Unless H^+ or Ca^{2+} were transported at extremely high rates, it is likely that the missing positive current is anion secretion, probably HCO_3^- . This

hypothesis is supported by two experimental observations: 1) J_w became negligible when Tris buffer replaced HCO_3^- buffer in the bathing media (Fig. 5) and 2) in the latter situation net Na^+ flux did not change significantly (Table 3).

From the observed net Na^+ flux we can calculate the amount of water that must be driven across the tissue if this ion movement generates isosmotic reabsorption. The expected J_w for a net Na^+ movement of $2.37 \pm 0.68 \mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ would be $0.28 \pm 0.08 \mu\text{l}/\text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($0.34 \pm 0.06 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ in the absence of HCO_3^-). These values can be compared with the experimentally observed ones (Table 1). J_w increased from 0.17 ± 0.03 to $0.26 \pm 0.04 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ when HCO_3^- was removed from the bathing media. Clearly, there was good agreement between theoretical and experimental values. The difference observed in the presence of HCO_3^- ($0.26 - 0.17 = 0.09 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) would represent the HCO_3^- -associated water secretion. If both Na^+ and Cl^- move isosmotically, a similar calculation could be made from Cl^- fluxes. Although the values showed sizable scatter, the J_w for a net Cl^- movement of $3.45 \pm 1.46 \mu\text{eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ would be $0.46 \pm 0.19 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. This value is not significantly different from the one obtained starting from Na^+ net flux.

The serosa-positive PD provides an alternative driving force for passive Cl^- movement from lumen to plasma, via the paracellular pathway. Nevertheless, this mechanism must be of minor importance, if we consider the magnitude of the net Cl^- fluxes observed in short-circuit conditions.

Under the present experimental conditions, there is no net Rb^+ flux in the rat cecum.

Ionic replacements and net J_w . When NaCl was replaced by choline- Cl^- in both the serosal and mucosal bath, the transepithelial PD and the solute-associated reabsorption dropped to zero. This is the expected result according to the central role of Na^+ transport in intestinal reabsorption and secretion (3, 8).

Replacement of Cl^- by SO_4^{2-} or replacement of bicarbonate by Tris buffer significantly increased the absorptive J_w . These results indicate that besides the basic requirement for Na^+ , other ions contribute to water handling by this epithelium. To establish the actual HCO_3^- gradients between inside and outside the cell we need to know the apical and basolateral membrane potentials and the intracellular HCO_3^- concentration. These data are not available. Nevertheless, the absence of HCO_3^- secretion can explain the increase in the absorptive J_w and the decrease in the steady-state transepithelial PD observed in the absence of Cl^- (14). The initial decrease in PD (Fig. 4) could be associated with an increase in the transepithelial resistance (SO_4^{2-} is less permeable than Cl^- in the paracellular pathway). Alternatively, it could result from asymmetric rates of exchange of SO_4^{2-} for Cl^- across the tissue, i.e., mucosal Cl^- exchanged more rapidly than serosal Cl^- .

When HCO_3^- buffer was bilaterally replaced by Tris buffer, the increase in J_w was associated with sizable reductions in transepithelial PD and I_{sc} . These results support the notion that HCO_3^- secretion occurs under

control conditions, contributing to the positive PD and reducing the absorptive J_w .

Pathways for J_w . The role of the paracellular path on fluid and solute movement across the small intestine has been recently shown by Pappenheimer and Reiss (10, 11). It is generally accepted that this is the pathway for J_w under a hydrostatic transepithelial gradient (5, 13). This may also be the case in the rat cecum.

The paracellular pathway could be also the route of the net J_w observed in the presence of transepithelial Cl^- gradients (Table 2). These J_w values appeared when NaCl was isosmotically replaced by Na_2SO_4 or sucrose either in the mucosal or serosal solutions. Unilateral replacement of SO_4^{2-} by Cl^- , in the absence of Na^+ , also generated a large J_w (Table 2). Associated with the appearance of transmural diffusion potentials, these fluxes have probably the same origin as those observed in the rabbit gallbladder (20, 21) in similar conditions.

When a net J_w was induced by an osmotic gradient, a significant transepithelial potential was observed. Its polarity was opposite to that observed in rabbit gallbladder epithelium in similar experimental conditions. In gallbladder, the measured PD was attributed to solute polarization in the unstirred layers (20, 21). Tripathi and Boulpaep (17) have recently reported, in *Ambystoma* proximal tubule, streaming potentials that they considered as true electrokinetic phenomena and not primarily diffusion potential across anion-selective tight junctions. One interpretation for our "osmotically induced" transepithelial potentials would be the existence of an osmotic route containing small water channels, where a streaming potential develops (4). In parallel, there is a larger pathway through which water moves when a hydrostatic gradient is applied (10, 11, 13). Naftalin and Tripathi (9) have interpreted the streaming potential observed in the rabbit ileum, having the same polarity as the one here described, as reflecting the existence of "cation-selective osmotic channels."

The P_{osm} value calculated from steady-state J_w induced by PEG was evidently influenced by the existence of barriers to J_w in series with the epithelium (9). Clearly, the subepithelial tissue constitutes a thick unstirred fluid layer in which polarization of salt and PEG may reduce the effective transepithelial osmotic difference.

Another important question pertains to the route for J_w during the isosmotic transfer secondary to solute transport. Large absorptive fluxes could be observed together with low PDs (<1 mV) when HCO_3^- was replaced by Tris⁺. If in this situation a similar J_w was induced by creating an osmotic gradient, the apparent streaming potential was significantly higher than the "transport" potential. This suggests that the paracellular route could be dominant during isotonic reabsorption.

In summary, our results show that water absorption or secretion in the rat cecum is due to a complicated interaction among osmotic-, hydrostatic-, and salt transport-dependent volume fluxes.

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad de Buenos Aires, and Fundación Roemmers, Argentina. Part of this work was performed at the Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Dept. of

Biology, Section of Biomembranes, France, in the frame of a cooperative program.

Address for reprint requests: M. Parisi, CC 128, SUC 53 (B), 1453 Buenos Aires, Argentina.

Received 14 November 1988

Final form 25 June 1990.

REFERENCES

1. BOURGUET, J., AND S. JARD. Un dispositif automatique de mesure et d'enregistrement du flux net d'eau a travers la peau et la vessie des amphibiens. *Biochim. Biophys. Acta* 38: 442-444, 1964.
2. CLAUSS, W., M. SCHAFER, J. HORCH, AND H. HORMICK. Segmental differences in electrical properties and Na-transport of rabbit caecum, proximal and distal colon in vitro. *Pfluegers Arch.* 403: 273-282, 1985.
3. EDMONDS, C. J. The gradient of electrical potential difference and of sodium and potassium of the gut contents along the caecum and colon of normal and sodium depleted rats. *J. Physiol. Lond.* 193: 571-588, 1967.
4. FISCHBARG, J., L. S. LIEBOVITCH, AND J. P. KENIZRCK. Central role for cell osmolarity in isotonic fluid transport across epithelia. *Biol. Cell* 55: 239-244, 1965.
5. FISCHBARG, J., C. R. WARSHAWSKY, AND J. J. LIM. Pathways for hydraulically and osmotically induced water fluxes across epithelia. *Nature Lond.* 266: 71-73, 1976.
6. FONDOCARO, J. D. Intestinal ion transport and diarrheal disease. *Am. J. Physiol.* 250 (Gastrointest. Liver Physiol. 13): G1-G8, 1986.
7. HATCH, M., AND R. FREEL. Electrolyte transport across the rabbit caecum in vitro. *Pfluegers Arch.* 411: 333-338, 1988.
8. LUCKHOFF, A., AND N. HORSTER. Hormonal regulation of electrolyte and water transport in the colon. *Klin. Wochenschr.* 62: 555-563, 1984.
9. NAFTALIN, R. J., AND S. TRIPATHI. Passive water flows driven across the isolated rabbit ileum by osmotic, hydrostatic and electrical gradients. *J. Physiol. Lond.* 360: 27-50, 1985.
10. PAPPENHEIMER, J. R. Physiological regulation of transepithelial impedance in the intestinal mucosa of rats and hamsters. *J. Membr. Biol.* 100: 137-148, 1987.
11. PAPPENHEIMER, J. R., AND K. Z. REISS. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J. Membr. Biol.* 100: 123-136, 1987.
12. PARISI, M., AND L. CANCELA. Time course study of phosphate transfer in frog urinary bladder. *Kidney Int.* 33: 58-63, 1988.
13. PORTA, M., C. CAPURRO, AND M. PARISI. Water permeability in the human amnion: pH regulation of the paracellular pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 980: 220-224, 1989.
14. REISS, L., AND J. L. COSTANTIN. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange at the apical membrane of *Necturus* gallbladder. *J. Gen. Physiol.* 83: 801-818, 1984.
15. SANDLE, G. J., AND F. MCGCLONE. Segmental variability of membrane conductances in rat and human colonic epithelia. Implications for Na^+ , K^+ and Cl^- transport. *Pfluegers Arch.* 410: 173-180, 1987.
16. SELLING, J. H., H. OYARZABAL, AND E. J. CRAGOE. Electrogenic sodium absorption in rabbit cecum "in vitro." *J. Clin. Invest.* 81: 1275-1293, 1988.
17. TRIPATHI, S., AND E. L. BOULPAEP. Cell membrane water permeabilities and streaming currents in *Ambystoma* proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 255 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 24): F188-F203, 1988.
18. TYOR, N. P., AND J. S. ELDRIDGE. A comparison of the metabolism of rubidium 86 and potassium 42 following simultaneous injection in the man. *Am. J. Med. Sci.* 232: 186-202, 1956.
19. VAN OS, C. H., J. A. MICHELS, AND J. F. G. SLEGERS. Effects of electrical gradients on volume flows across gall-bladder epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* 443: 545-555, 1976.
20. VAN OS, C. H., G. WIEDNER, AND E. M. WRIGHT. Volume flow across gall-bladder epithelium induced by small hydrostatic and osmotic gradients. *J. Membr. Biol.* 49: 1-20, 1979.
21. WRIGHT, E. M., A. P. SMULDERS, AND J. M. TORMEY. The role of the lateral intercellular spaces and solute polarization effects in the passive flow of water across the rabbit gallbladder. *J. Membr. Biol.* 72: 198-219, 1972.

BBAMEM 74954

Water handling in the human distal colon in vitro: role of Na^+ , Cl^- and HCO_3^-

Elsa Escobar, Fernando Galindo and Mario Parisi

Sección de Biomembranas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (Argentina)
and Département de Biologie, CEN, Saclay (France)

(Received 6 February 1990)

(Revised manuscript received 28 May 1990)

Key words: Norepinephrine; cyclic AMP; Amiloride; Absorption; Secretion

The minute by minute net water movement (J_w) was measured, in the human distal colon in vitro, simultaneously with the transepithelial potential difference (PD) and short circuit current (SCC) with the following results: (1) An absorptive J_w ($+0.36 \pm 0.04 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$) was observed, in 21 cases, when the colon was mounted between two identical standard salines (Na^+ 140, Cl^- 110, HCO_3^- 25 mequiv./l) and in the presence of a hydrostatic pressure gradient (ΔP) of 13 cm of H_2O (mucosal side positive). (2) This absorptive J_w was a linear function of the applied ΔP or the imposed osmotic transepithelial gradient ($P_{\text{hydr}} = 0.22 \pm 0.03 \text{ cm/s}$; $P_{\text{osm}} = 0.0020 \pm 0.0005 \text{ cm/s}$; $n = 6$). (3) A fraction of this J_w was independent of the presence of any hydrostatic, osmotic or chemical gradient while associated with a serosal side positive and partially amiloride sensitive PD ($11.3 \pm 1.8 \text{ mV}$). (4) Both J_w and PD were dependent on the presence of Na^+ in the incubating media. (5) Replacement of Cl^- by SO_4^{2-} did not change the absorptive J_w , but increased the observed PD and the transepithelial resistance. (6) HCO_3^- removal strongly reduced the SCC and PD together with an important increase in J_w . Unexpectedly, other 9 colon fragments spontaneously showed a secretory J_w when mounted between two identical standard salines ($-0.55 \pm 0.11 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$). In these experiments it was observed that: (7) The tissue moved water against the imposed ΔP (13 cm of H_2O), while the associated PD ($+11.9 \pm 2.1 \text{ mV}$) was similar to the one observed in absorptive fragments. (8) As in the case of absorptive preparations, PD, SCC and the transport associated J_w fell to zero in the absence of Na^+ . (9) When SO_4^{2-} replaced Cl^- , secretory J_w reversed to absorptive J_w , together with an increase in PD and resistance. In both absorptive and secretory preparations it was finally observed that: (10) norepinephrine ($5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) decreased SCC and increased the absorptive J_w in a tightly parallel manner (half-times for each response: $\text{SCC} = 11.4 \pm 2.1 \text{ min}$; $J_w = 11.4 \pm 2.0 \text{ min}$, $n = 4$) and (11) 8-Br cyclic AMP (10^{-3} M) increased SCC while simultaneously decreasing the absorptive J_w . It is concluded that the observed J_w in the distal human colon in vitro results from the complex addition of osmotic, hydrostatic and transport associated driving forces. The transport-associated J_w has absorptive and secretory components. The secretory component could be associated with two different mechanisms: bicarbonate secretion or Cl^- secretion. This last mechanism, mediated by cyclic AMP, would be stimulated in spontaneously secretory tissues.

Introduction

Most previous works on human colon in vitro [1–6] have been centered on electrophysiological measurements (transepithelial potential difference (PD), and short circuit current (SCC)) associated with the study of isotopic ions movements [6]. These studies had shown that Na^+ absorption occurs due to both electrogenic Na^+ absorption [5] and electroneutral Na^+/Cl^- co-

transport [6]. Bicarbonate and chloride secretion have also been described [4,6] and, more recently, the membrane conductance in proximal and distal segments was studied with microelectrodes, nystatin, ion chemical blockers and Cl^- replacement [7].

The human colon receives a daily volume load of some 2000 ml from the ileum while the fecal excretion is only 50 ml/day [8]. Nevertheless no systematic study has been done on water handling in this organ in vitro and many important points are not yet clarified: (1) What is the real coupling between ions and water in the large intestine? (2) What is the role of hydrostatic and osmotic gradients in the observed water movement? (3)

Correspondence: M. Parisi, C.C. No 128 SUC 53 (B), (1453) Buenos Aires, Argentine.

What are the mechanisms controlling the switching between water absorption and secretion? To give an initial answer to the previously listed questions, we have now used an experimental approach, previously employed in other epithelial barriers [9,10], that allows the minute by minute recording of the net water movement across the tissue. These measurements were associated with PD and SCC determinations, in different experimental conditions.

Methods

Fragments of human distal colon were obtained from chirugically extirpated organs in patients with cancer. Immediately after ablation, pieces of apparently non affected regions (from sigmoid and rectum) were washed and placed in a high K^+ saline (see later) at low temperature (4°C). Before the experiments the mucosa and submucosa layers were dissected from the underlying tissues (always at 4°C) and mounted as a diaphragm between two twin barrels lucite chambers (a nylon mesh was placed on the serosal surface). The chambers were then filled with standard saline at 37°C and immersed in a thermostated bath at the same temperature. In these conditions PD slowly increased and then stabilized in about 30 min. No significant differences were observed in PD between experiments started after 30, 130 or 230 min of incubation at low temperature. Considering these observations, in many experiments three different fragments from the same colon were consecutively mounted to test three experimental conditions (three fragments protocol).

The standard saline contained (mM): 114 NaCl, 4.5 KCl, 1.2 CaCl_2 , 1.2 MgCl_2 , 25 NaHCO_3 , 5 glucose, 1.2 K_2HPO_4 , 0.2 KH_2PO_4 (pH 7.4 when bubbled with 5% $\text{CO}_2/95\% \text{O}_2$). High K^+ , low Na^+ saline contained (mM): 120 KCl, 10 NaHCO_3 , 1.2 MgCl_2 , 1.2 CaCl_2 , 1.2 K_2HPO_4 , 0.2 KH_2PO_4 , 25 glucose. In some experiments a Tris-Hepes buffer (Tris-chloride 7.5 mM, Na-Hepes 12.5 mM) replaced NaHCO_3 in the standard saline (pH 7.4 when bubbled with O_2). Hypertonic solutions were obtained by adding polyethyleneglycol (PEG, mol. wt. 4000) to the standard saline. Theoretical osmolarity was corrected by applying the corresponding osmotic coefficient (2.5, Ref. 11).

The net transepithelial water transfer (J_w) was minute by minute recorded as previously described in other epithelial barriers [10]. Briefly, the mucosal chamber was a closed one, where the tissue was applied against the nylon mesh by a variable hydrostatic pressure ($\Delta P \geq 5$ or more cm of H_2O). When water moved across the tissue, an automatic device injected or sucked water to maintain the volume constant. A signal, proportional to the injected or sucked volume, was minute by minute recorded. 50-nl variations in the absorptive or secretory

fluxes could be detected (positive values indicate absorption and negative values secretion).

Voltage electrodes consisted of agar bridges connected to calomel half cells and placed adjacent to the epithelium. The transepithelial PD could be short-circuited through current passing electrodes (Ag-AgCl wires) located at the rear of each half chamber [12]. In experiments designed to evaluate the effects of ionic replacements, the electrical parameters were tested, for each fragment, first in the standard condition, second in the tested one during which J_w was simultaneously measured, and finally in the standard condition again.

The hydraulic (P_{hydr}) and osmotic (P_{osm}) permeability coefficients

The J_w across a membrane in the presence of a hydrostatic (ΔP) or osmotic (Δosm) gradient is described by

$$J_w = L_p(\text{hydr}) \cdot \Delta P$$

and

$$J_w = \sigma \cdot L_p(\text{osm}) \cdot \Delta osm$$

where $L_p(\text{hydr})$ and $L_p(\text{osm})$ are phenomenological coefficients. σ is the Staverman reflexion coefficient and ΔP and Δosm are expressed in units of pressure. If J_w is measured in $\text{mol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$, P_{hydr} and P_{osm} can be defined:

$$P_{hydr} = L_p(\text{hydr}) \cdot R \cdot T / V_w$$

$$P_{osm} = L_p(\text{osm}) \cdot R \cdot T / V_w$$

where R and T have the usual meanings and V_w is the volume of one mole of water. Both coefficients are expressed in units of cm/s . On these bases P_{hydr} and P_{osm} can be calculated from the slope of the regression line obtained when J_w values are plotted against ΔP or Δosm .

Results

Fig. 1 shows the minute by minute simultaneously recorded J_w and SCC across the human distal colon in vitro. A net absorptive flux ($+0.36 \pm 0.04 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$, mean \pm S.E., $n = 21$) was observed in most cases (see later). The tissue was mounted between two identical standard solutions and under a ΔP of 13 cm of H_2O (mucosal side positive). The associated transepithelial PD was, in these conditions, $11.3 \pm 1.8 \text{ mV}$ (serosal side positive). This absorptive J_w varied in accordance with the applied hydrostatic or osmotic gradients or when the ionic composition of the medium was changed (Fig. 1). Replacement of Na^+ by choline $^+$ on both the mucosal and serosal sides strongly reduced the SCC and

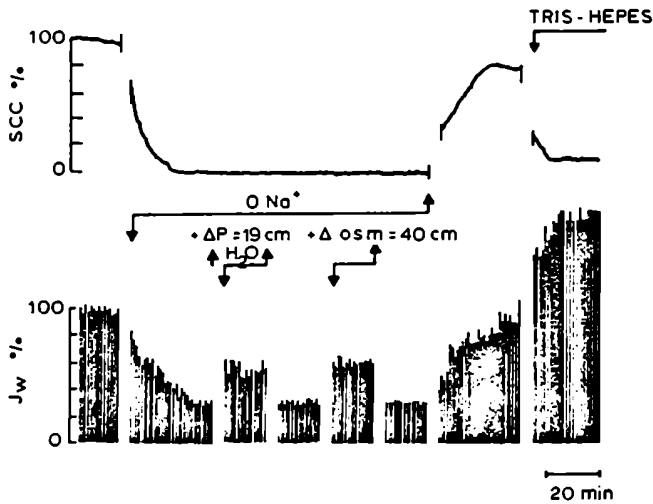


Fig. 1. Short circuit current (SCC) and absorptive net water flux (J_w) simultaneously measured in the human colon mounted between two identical standard salines and under a hydrostatic pressure (ΔP) gradient (mucosal side positive) of 13 cm of H_2O . Effects of Na^+ removal, changes in ΔP (+19 cm of H_2O), transepithelial osmotic gradient (+40 mosM, serosal PEG) and HCO_3^- removal.

the net absorptive J_w . This effect was fully reversible. PD and SCC were partially sensitive to mucosal amiloride 10^{-4} M (mean inhibition $25 \pm 8\%$, $n = 3$).

The hydraulic and osmotic permeabilities

Fig. 2 represents the observed J_w as a function of the applied hydrostatic or osmotic transepithelial gradients. In both cases linear correlations were obtained and P_{hydr} (0.22 ± 0.03 cm/s, mean + S.E., $n = 6$) and P_{osm} (0.0028 ± 0.0005 cm/s, mean + S.E., $n = 6$) were calculated in each case from the slope of the regression line (see Methods). The intercept represents, in the case of ΔP vs. J_w , the J_w observable in the absence of any osmotic, chemical or hydrostatic gradient, and probably indicates the absorptive J_w associated with the ionic active transport.

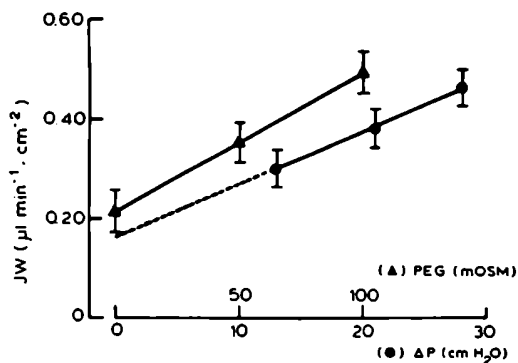


Fig. 2. Net absorptive water flux (J_w) as a function of the applied osmotic or hydrostatic gradients.

TABLE I

Transepithelial PD, SCC, resistance (R) and J_w in the human (absorptive) distal colon

Three different media were tested: standard buffer, no-sodium and no-chloride (see Methods). Means \pm S.E. ($n = 6$). The hydrostatic component of J_w ($0.20 \mu l / (\text{min} \cdot \text{cm}^2)$) was deduced.

	Standard	No-sodium	No-chloride
PD (mV)	8.4 ± 1.4	0.5 ± 1.6	$13.8 \pm 3.9^*$ ($\Delta PD = 5.4 \pm 2.1$)
SCC ($\mu A / \text{cm}^2$)	83 ± 10	1.3 ± 6.7	87 ± 12
R ($\text{ohm} \cdot \text{cm}^2$)	101 ± 16	-	$159 \pm 27^*$ ($\Delta R = 58 \pm 18$)
J_w ($\mu l / (\text{min} \cdot \text{cm}^2)$)	0.16 ± 0.03	0.04 ± 0.13	0.17 ± 0.05

* $P < 0.05$, t -test for paired data.

The role of Na^+ , Cl^- and HCO_3^- ions in the observed J_w

To understand the role of Na^+ , Cl^- and HCO_3^- in the observed J_w , the 'three fragments protocol', as described in Methods, was employed. Three different conditions were tested in a first experimental series (all ionic changes were simultaneously and symmetrically made on both sides of the tissue): (1) The standard saline; (2) $NaCl$ was replaced by choline- Cl and other Na^+ salts by K^+ salts; (3) Cl^- salts were replaced by SO_4^{2-} salts. The obtained results are presented in Table I. It can be observed that: (1) Removal of Na^+ made PD and SCC not significantly different from zero together with a strong reduction in J_w . (2) Replacement of Cl^- by SO_4^{2-} did not change significantly the absorptive J_w , but induced a significant increase in PD and transepithelial resistance.

In a second series employing the 'three fragments protocol', the following experimental situations were compared: (1) the standard saline; (2) Tris-Hepes replaced bicarbonate-buffer, and (3) SO_4^{2-} salts replaced Cl^- salts in Tris-Hepes buffers. The obtained results are summarized in Table II. It can be observed that: (1) in the absence of HCO_3^- both PD and SCC were strongly

TABLE II

Transepithelial PD, SCC, resistance (R) and J_w in the human (absorptive) distal colon

Three different media were tested: standard buffer, Tris-Hepes replacing $NaHCO_3$ and Tris-Hepes replaced $NaHCO_3$ plus SO_4^{2-} replacing Cl^- in both the mucosal and serosal baths. Means \pm S.E. ($n = 6$).

	Standard	No-bicarbonate	No-chloride, no-bicarbonate
PD (mV)	9.4 ± 3.4	2.9 ± 1.6	9.8 ± 2.9
SCC ($\mu A / \text{cm}^2$)	78 ± 17	24 ± 5	58 ± 11
R ($\text{ohm} \cdot \text{cm}^2$)	120 ± 14	122 ± 28	$169 \pm 15^*$ ($\Delta R = 49 \pm 15$)
J_w ($\mu l / (\text{min} \cdot \text{cm}^2)$)	0.15 ± 0.05	0.37 ± 0.13	$0.25 \pm 0.03^*$ ($\Delta J_w = 0.10 \pm 0.04$)

* $P < 0.05$, t -test for paired data.

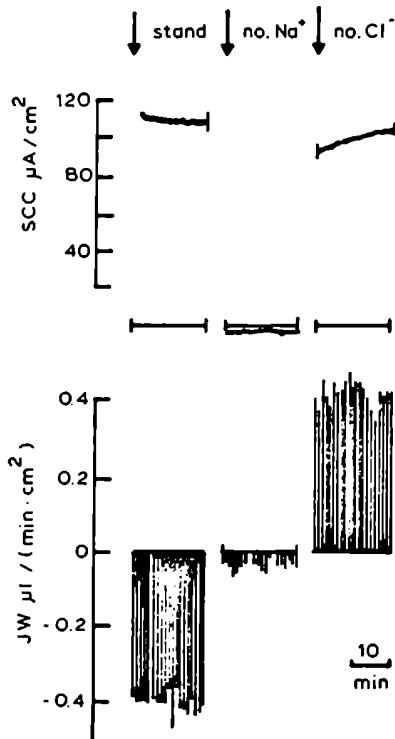


Fig. 3. Simultaneous record of J_w and SCC in a spontaneously secretory colon. Effects of replacement of Na^+ by choline $^+$ and Cl^- by SO_4^{2-} .

reduced, together with an important increase in J_w and no change in transepithelial resistance, and (2) in the absence of both HCO_3^- and Cl^- J_w was higher than in the standard condition, together with an increase in the transepithelial resistance.

Spontaneous secretory J_w in the human distal colon in vitro

Previous presented results can be understood, as it will be discussed later, if the net absorptive J_w is presented as the algebraic addition of a major absorptive J_w and a minor secretory J_w . Nevertheless some preparations showed, when mounted between two identical standard salines, a spontaneous net secretory J_w . It must be remarked that in this case the tissue was moving water against the imposed hydrostatic gradient (13 cm of H_2O). Furthermore, when three fragments from the same organ were consecutively mounted, they consistently showed absorptive or secretory J_w values. Fig. 3 presents the simultaneously recorded J_w and SCC in a secretory experiment. The mean observed PD was 11.9 ± 2.1 mV and the J_w -0.55 ± 0.11 $\mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$ ($n = 9$). Interesting enough the observed PD and SCC were similar to the PD and SCC seen in absorptive tissues and the only way to differentiate both situations was the simultaneous measurement of J_w .

The 'three fragments protocol' was also employed with the secretory tissues. The tested conditions were:

TABLE III

Transepithelial PD, SCC, resistance (R) and J_w in the human (secretory) distal colon

Three different media were tested: standard buffer, no-sodium and no-chloride (see Methods). Means \pm S.E. ($n = 6$). The hydrostatic component of J_w (0.20 $\mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$) was deduced.

	Standard	No-sodium	No-chloride
PD (mV)	9.8 ± 1.9	-0.7 ± 1.2	$17.6 \pm 2.6^*$ ($\Delta\text{PD} = 7.8 \pm 2.1$)
SCC ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	110 ± 17	-3.9 ± 11.1	104 ± 22
R ($\text{ohm} \cdot \text{cm}^2$)	89 ± 11	-	$169 \pm 14^*$ ($\Delta R = 80 \pm 18$)
J_w ($\mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$)	-0.60 ± 0.06	0.04 ± 0.09	0.22 ± 0.05

* $P < 0.01$, t -test for paired data.

(1) the standard saline, (2) no sodium in the media, and (3) SO_4^{2-} ions replaced Cl^- ions. It was observed that (Table III); (1) as in the case of absorptive preparations, PD, SCC and J_w fell to zero in the absence of Na^+ , and (2) when SO_4^{2-} replaced Cl^- ions J_w reversed from secretion to absorption, together with an increase in PD and transepithelial resistance.

The effect of norepinephrine and cyclic AMP on J_w and SCC

It has been previously reported that epinephrine elicits a distinct decrease in SCC in the human colon in vitro, with no change in the unidirectional Na^+ and Cl^- fluxes [6]. We have now tested the effects of norepinephrine ($5 \cdot 10^{-6}$ M) on the simultaneously determined J_w and SCC. It can be observed in Fig. 4 (mean curve for four experiments) that the decrease in

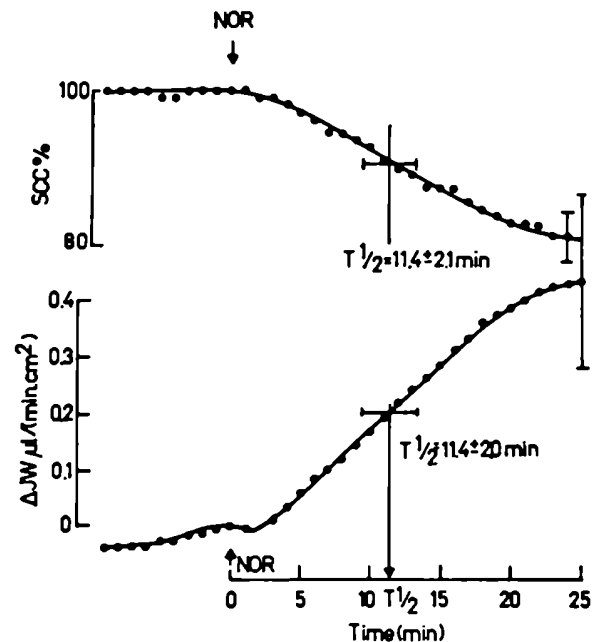


Fig. 4. Effect of norepinephrine ($5 \cdot 10^{-6}$ M, serosal) on J_w and SCC simultaneously recorded in four experiments (SCC: % of the control value).

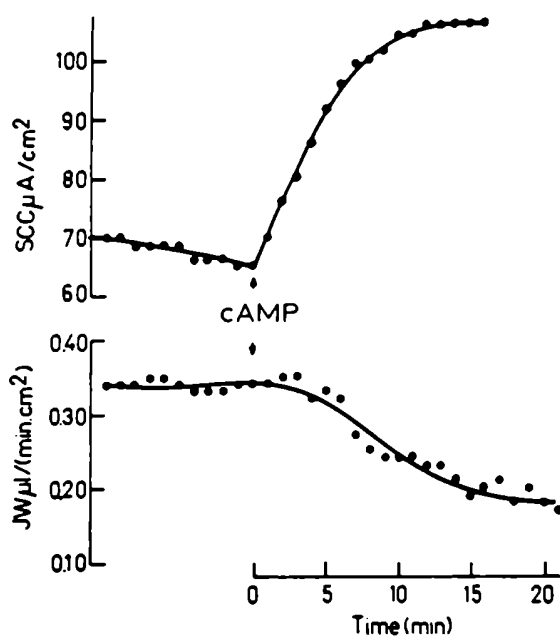


Fig. 5. Effects of 8-Br cyclic AMP (cAMP, $1 \cdot 10^{-3}$ M, serosal) in the simultaneously recorded J_w and SCC in a representative experiment.

SCC was clearly in parallel with an increase in J_w . The mean half-times for both processes were, respectively, 11.4 ± 2.1 min and 11.4 ± 2.0 min. Two of the tested tissues were initially secretory ones, and norepinephrine reversed this situation. The mean observed variations in J_w , PD, SCC and resistance are presented in Table IV.

It has also been reported that theophylline, a cyclic AMP mediated secretagogue, increases SCC and induces Cl^- secretion in the distal human colon in vitro [6]. We have now simultaneously studied SCC and J_w under the action of a potent analog of cyclic AMP: 8-Br cyclic AMP, 10^{-3} M. Fig. 5 shows a typical record in which the effect of the nucleotide on SCC and J_w was simultaneously tested. It can be observed that the increase in SCC was now paralleled with a decrease in the absorptive J_w (mean values in Table IV). These results were accompanied by a significant increase in transepithelial resistance (Table IV).

TABLE IV

Effects of norepinephrine and 8-Br cyclic AMP on transepithelial PD, SCC, resistance and J_w in the human distal colon

t-test for 'before-after' conditions (mean \pm S.E., $n = 6$).

	ΔJ_w ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)	ΔPD (mV)	ΔSCC ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)	ΔR ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)
Norepinephrine ($5 \cdot 10^{-6}$ M)	$+0.43 \pm 0.13$	-0.90 ± 0.37	-13.4 ± 5.2	-1.0 ± 5.7
P	< 0.025	< 0.05	< 0.05	n.s.
8-Br cyclic AMP ($1 \cdot 10^{-3}$ M)	-0.12 ± 0.03	$+1.43 \pm 0.48$	$+2.26 \pm 3.40$	$+24.7 \pm 7.4$
P	< 0.01	< 0.05	n.s.	< 0.025

Discussion

Osmotically and hydraulically driven J_w in the human distal colon

J_w was, in the human distal colon in vitro, a linear function of the applied transepithelial or osmotic gradients. The observed values were similar to those reported in the rate caecum [13], and P_{hydr} and P_{osm} values would indicate that hydrostatic pressure was 100-times more effective than the osmotic gradient to move water across the human colon in vitro. It must be, however, considered that our osmotic measurements were probably affected by the 'sweeping away' and 'solute polarization' phenomena [14], associated with the presence of unstirred layers [15].

It is generally accepted that hydrostatic pressure, in the range employed in this study ($24.4 \text{ cm H}_2\text{O} = 1 \text{ mosM}$), does not move water transcellularly [16]. In the case of the osmotic gradients or transport associated fluxes, water can probably be moved either between or through the cells [17]. We have recently studied the relative contribution of paracellular and transcellular movements to water transfer in the human amnion [12]. Further experiments are necessary to clarify the situation in the human colon.

Transport associated J_w in the human distal colon

Present observations on the transport associated J_w can be accommodated in the frame of previous reports on ionic movements in the human colon [6], and the proposed mechanisms are shown in Fig. 6. In the upper cell (A) an electrogenic and amiloride sensitive entry of Na^+ in the mucosal border is coupled with the Na^+/K^+ -ATPase present in the serosal membrane [2,4]. Cl^- moves across a low resistance paracellular path [7]. The non-electrogenic entry of Na^+ plus Cl^- ions [18] is proposed in the second cell (B). Both mechanisms (A and B) result in NaCl reabsorption. This salt movement will drive a net absorptive J_w that we have represented as partially moving transcellularly and partially paracellularly. The importance of paracellular vs. transcellular routes in the transport associated net water movement remains an open question.

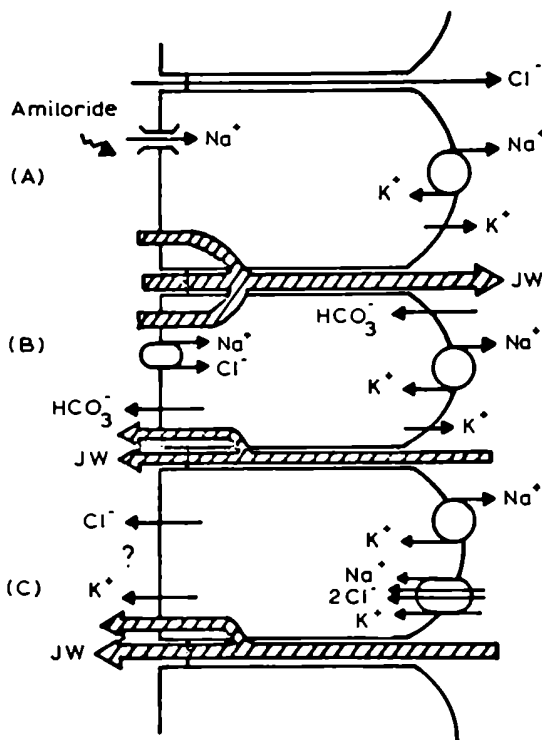


Fig. 6. Proposed model, based on present and previous results, to understand water handling in the human distal colon in vitro.

The absorptive J_w was, in our experimental conditions, dependent on the presence of Na^+ in the incubation media. This was not unexpected if Na^+ transport is driving water reabsorption. Replacement of Cl^- by SO_4^{2-} did not change significantly the absorptive J_w and SCC. Nevertheless, the membrane PD and resistance went up in this situation, indicating that SO_4^{2-} had a lower permeability than Cl^- , as it was also observed in other tissues.

Bicarbonate secretion has been described in the human colon in vivo [19] and it has also been postulated in the human colon studied in vitro [6]. We have added this mechanism in cell B, coupled to a HCO_3^- entry in the basolateral membrane. This hypothetical mechanism allows to explain the effects of HCO_3^- removal in our experiments: a reduction in SCC together with an increase in the absorptive J_w . This mechanism, as previously proposed [6], would not be Cl^- dependent.

Hence, it can be concluded that the net absorptive J_w observed in most experiments results from a major absorbing fraction, coupled to NaCl absorption, and from a minor secretory fraction, coupled to bicarbonate secretion. Both mechanisms need Na^+ to be operative (SCC and J_w fell to zero in the absence of this ion).

According to the previous model, the observed J_w must be purely absorptive in the absence of bicarbonate and Cl^- in the media. From the observed short circuit current ($58 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) and net water flux ($0.25 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$), the ionic concentration of the transported fluid

can be calculated about 136 mequiv./l. This would indicate that NaCl reabsorption was not far from isotonicity in this experimental condition. Nevertheless, there is considerable evidence in the literature indicating that the colon is able to absorb against an osmotic gradient [20,21].

Bicarbonate secretion and the action of norepinephrine

Epinephrine reduces SCC in the human colon in vitro together with no changes in Na^+ or Cl^- unidirectional fluxes [6]. These results have been interpreted as due to an alteration in the transport of another ion, most probably to an inhibition of bicarbonate secretion [6]. We have now observed that norepinephrine induced a decrease in SCC tightly paralleled (Fig. 4) by an increase in the absorptive J_w . These results are also compatible with an inhibitory effect on bicarbonate secretion. From data presented in Table IV we can calculate the amount of water coupled to HCO_3^- secretion, if we accept that the increase in the net absorptive J_w was due to a reduction in the secretory component of the net water movement. An increase in J_w of $0.43 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ was coupled with a reduction of $13.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in SCC. This would indicate an ionic concentration of 16 mequiv./l, which is not significantly different from the bicarbonate concentration here employed.

The action of cyclic AMP and the presence of a net secretory J_w

It has been previously demonstrated that cyclic AMP [22] and theophylline [6] stimulate Cl^- secretion in the mammalian colon. We have now observed, under the nucleotide action, an increase in the secretory J_w together with an increase in transepithelial PD and SCC (Fig. 5, Table IV).

The situation described in C (Fig. 6), also based in previous information available on the human colon [23,6], can be useful to understand both the action of cyclic AMP and the spontaneously secretory J_w observed in some experiments: A non electrogenic $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ symport in the serosal border [24] is coupled with Cl^- and K^+ secretion in the mucosal border. This system is similar to the one described under K^+ adaptation in the rat colon [18,25], and is dependent on the present of Cl^- ions and sensitive to cyclic AMP stimulation [22].

The observation, in some tissues, of a spontaneously net secretory J_w was a rather unexpected result. It must be remarked here that PD and SCC were similar in absorptive and secretory fragments. We propose a working hypothesis to understand these observations: Cl^- secretion, via the cyclase system, would be stimulated in these patients. This is supported by the fact that secretory fragments switched to absorptive ones in the absence of Cl^- as well as by the effects of cyclic AMP

(Table IV, Figs. 3 and 5). Cl^- secretion would be operating at a low level in net absorptive fragments.

The role of the paracellular and submucosal hydraulic conductances in the observed phenomena

In the previous sections it has been considered that both paracellular and submucosal hydraulic conductances were constant in the different tested conditions. Nevertheless, there is experimental evidence showing that this is not always the case. Ionic substitution could affect paracellular hydraulic conductivity. It has been observed, however, in the rat colon, that HCO_3^- or Cl^- or Na^+ substitution do not change the magnitude of the J_w induced by applying a hydrostatic pressure up to 30 cm of water on the mucosal side [26]. This situation can not probably be compared with the case in which the hydrostatic pressure is applied on the serosal surface [27].

Naftalin and Simmons [28] have found that theophylline and cyclic AMP raised Cl^- conductance relative to Na^+ conductance in the small intestine. We have observed a decrease in the absorptive J_w under the nucleotide action. This could then be interpreted (alternatively to an increase in transcellular secretion) as due to an enhanced reflux of NaCl via the increased paracellular conductance in this situation. This hypothesis is, however, difficult to conciliate with the simultaneously observed increase in SCC (Fig. 5).

Ahsan et al. [29] have observed an α_2 -adrenergic dependent increase in rabbit ileal water flow due to enhanced submucosal hydraulic conductance, which was accompanied by a small decrease in tissue resistance. If this effect can be observed in colon, it might provide an alternative explanation to the one proposed here for the adrenaline dependent increase in J_w . However, it must be difficult to understand the parallel reduction in short circuit current (Fig. 4).

In summary, it can be accepted that the observed net water movement in the human distal colon results from a transport associated absorptive J_w , a transport associated secretory J_w , an osmotically driven J_w and a hydrostatically driven J_w . The secretory J_w would be associated with two different ions: HCO_3^- secretion or Cl^- secretion. This complex situation can be, however, understood on the bases of previous available information on ionic movements in the mammalian colon. Future experiments will clarify the different ionic mechanisms and whether the corresponding absorptive or secretory J_w can be correlated with specific anatomic structures.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnicas

(CONICET), Universidad de Buenos Aires and Fundacion Roemmers, Argentina. This work was performed in the frame of a cooperative program (CONICET-IN-SERM).

References

- 1 Archampong, E.Q., Harris, J. and Clark, C.G. (1972) *Gut* 13, 880-886.
- 2 Grady, C.F. Duhamel, R.C. and Moore, E.W. (1970) *Gastroenterology* 59, 585-588.
- 3 Rask-Madsen, J. and Hjelt, H. (1977) *Scand. J. Gastroenterol.* 12, 1-6.
- 4 Hawker, P.C., Mashiter, K.E. and Turnberg, L.A. (1978) *Gastroenterology* 74, 1241-1247.
- 5 Wills, N.K., Alles, W.P., Sandle, G.I. and Binder, H.J. (1984) *Am. J. Physiol.* 247, G749-G757.
- 6 Sellin, J. and De Soignie, R. (1987) *Gastroenterology* 93, 441-448.
- 7 Sandle, G.I. and McGlone, F. (1987) *Pflügers Arch.* 410, 173-180.
- 8 Luckhoff, A. and Horster, N. (1984) *Korn. Wochenschr.* 62, 555-563.
- 9 Bourguet, J. and Jard, S. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 88, 442-444.
- 10 Parisi, M., Ibarra, C. and Porta, M. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 905, 399-408.
- 11 Porta, M., Capurro, C. and Parisi, M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 980, 220-224.
- 12 Parisi, M. and Cancela, L. (1988) *Kidney Int.* 33, 58-63.
- 13 Capurro, C., Escobar, E., Ibarra, C., Porta, M. and Parisi, M. (1989) *Biol. Cell.* 66, 145-148.
- 14 Wright, E.M., Smulders, A.P. and Tormey, J.M. (1972) *J. Membr. Biol.* 7, 198-219.
- 15 Van Os, C.H., Widner, G. and Whright, E.M. (1979) *J. Membr. Biol.* 49, 1-20.
- 16 Fischbarg, J., Warshawsky, C.R. and Lim, J.J. (1976) *Nature* 266, 71-73.
- 17 Carpi-Medina, P., Leon, V., Espidel, J. and Whittembury, G. (1988) *J. Membr. Biol.* 104, 35-43.
- 18 Hayslett, J.P., Miketey, N., Binder, H.J. and Aronson, P.S. (1980) *Am. J. Physiol.* 239, F378-F382.
- 19 Davis, G.R., Morawsky, S.G. and Santa Ana, C.A. (1983) *J. Clin. Invest.* 71, 201-207.
- 20 Harris, J. and Shield, R. (1970) *Gut* 11, 27-33.
- 21 Parsons, D. and Paterson, C. (1965) *Q. J. Exp. Physiol.* 50, 220-230.
- 22 McCabe, R.D. and Smith, P.L. (1985) *Am. J. Physiol.* 248, G103-G109.
- 23 Fondacaro, J.D. (1986) *Am. J. Physiol.* 250, G1-G8.
- 24 Heintze, K., Stewart, C.P. and Frizzel, R.A. (1983) *Am. J. Physiol.* 244, G357-G365.
- 25 Knauf, H. and Haag, H. (1986) *Pflügers Arch.* 407, 585-589.
- 26 Escobar, E., Ibarra, C., Todisco, E. and Parisi, M. (1990) *Am. J. Physiol.*, in press.
- 27 Wanitschke, R., Nell, G. and Rummel, W. (1977) *Arch. Pharmacol.* 297, 191-194.
- 28 Naftalin, R. and Simmons, N. (1979) *J. Physiol.* 290, 331-350.
- 29 Ahsan, M., Naftalin, R. and Smith, P. (1988) *J. Physiol.* 404, 385-404.

Water permeability in different epithelial barriers

C. CAPURRO, E. ESCOBAR, C. IBARRA, M. PORTA and M. PARISI

Seccion de Biomembranas, Departamento de Fisiologia, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

The water permeability properties of a series of epithelial barriers (the toad urinary bladder [TUB], the rat caecum [RC], the distal human colon [DHC], and the human amnion [HA]) were studied in different experimental conditions. Three parameters were simultaneously determined: the water permeability coefficient in the presence of a transepithelial hydrostatic gradient (P_{hydr}); the water permeability coefficient in the presence of an osmotic gradient (P_{osm}); and the transepithelial potential difference (dV). All experiments were performed with the same experimental device, allowing comparison of the permeability properties of the barriers tested. The results obtained were: (1) TUB ($N=8$): $P_{\text{hydr}}=0.079 \pm 0.008$ cm/s; $P_{\text{osm}}=0.0004 \pm 0.0002$ cm/s; $dV=31 \pm 5$ mV; (2) TUB after ADH ($N=8$): $P_{\text{hydr}}=0.093 \pm 0.012$ cm/s; $P_{\text{osm}}=0.0065 \pm 0.0011$ cm/s; $dV=52 \pm 8$; (3) RC ($N=10$): $P_{\text{hydr}}=0.18 \pm 0.02$ cm/s; $P_{\text{osm}}=0.0019 \pm 0.0004$ cm/s; $dV=3.9 \pm 0.1$ mV; (4) RC adapted to a high K diet ($N=10$): $P_{\text{hydr}}=0.21 \pm 0.02$ cm/s; $P_{\text{osm}}=0.0018 \pm 0.0006$ cm/s; $dV=4.5 \pm 0.5$ mV; (5) DHC ($N=6$): $P_{\text{hydr}}=0.22 \pm 0.03$ cm/s; $P_{\text{osm}}=0.002 \pm 0.05$ cm/s; $dV=15 \pm 3$ mV; (6) HA ($N=10$): $P_{\text{hydr}}=0.32 \pm 0.05$ cm/s; $P_{\text{osm}}=0.0154 \pm 0.0015$; $dV=0$. The results show a good correlation between P_{hydr} and dV, but not between dV and P_{osm} or between P_{osm} and P_{hydr} .

toad bladder — rat caecum — distal human colon — human amnion

INTRODUCTION

Fromter and Diamond in a work now considered classical [6], classified epithelial barriers as "tight" and "leaky". The criterion employed to state, for example, that the proximal convoluted tubule of the kidney is a leaky barrier, whereas the collector tube is a tight one, was transepithelial conductance. This situation is reflected in the transepithelial potential difference (dV) that, in general, increases with barrier tightness. The net water movements observed in epithelia were also divided, according to their origins, into 2 main groups: (1) the so called "isotonic transfer", which is associated with an ionic transport in the absence of any transepithelial gradient [3, 11]; and (2) the osmotically driven net water flux, of which the classical example is the flux controlled by antidiuretic hormone (ADH) in some tight epithelia. There is general agreement that in ADH-sensitive tissues water moves mainly transcellularly, with the regulatory barrier located in the apical border of the target cell [7, 8]. Much less clear is the case of isotonic transfer, where the relative significance of transcellular and paracellular routes for water movement is still under discussion [5, 14].

We have now studied a series of epithelial barriers (toad urinary bladder, rat caecum, distal human colon, and human amnion) in different experimental conditions. Three parameters were simultaneously determined: water permeability in the presence of a transepithelial hydrostatic gradient (P_{hydr}); water permeability in the presence of a transepithelial osmotic gradient (P_{osm}); and dV. All experiments were performed by means of the same experimental device, thus allowing a valid comparison of the permeability properties of the different epithelial barriers. The results obtained show a good correlation between P_{hydr} and dV, but not between dV and P_{osm} or between P_{osm} and P_{hydr} .

MATERIALS AND METHODS

The tested epithelial barriers were placed as a diaphragm between 2 lucite chambers, and the transepithelial net water flux (Jw) was measured at 1-min intervals by a technique previously described [1]. In most experiments 2 fragments of the same tissue were tested simultaneously. The transepithelial potential difference (dV) was measured through conventional agar bridges and calomel electrodes.

Tissues employed

Human amniotic membranes were obtained immediately after uncomplicated term vaginal delivery. They were separated from the other placental tissues and mounted, as previously described, for permeability measurements. Fragments of human distal colons (sigmoid or rectum) were obtained from surgically extirpated organs in patients with cancer or other diseases. Immediately after ablation, apparently nonaffected regions were dissected free, and the mucosal and submucosal layers were separated from the underlying tissues and mounted for permeability measurements. Human materials were obtained from the University Hospital (Hospital de Clinicas) at Buenos Aires, according to the formal rules of this institution.

The rat caecum was removed immediately after decapitation of the animal, washed, opened sagittally, and placed in the experimental chamber. Two groups of rats (Wistar) were studied: the first group was fed normally, whilst the other received a high potassium diet (HKD) for 10 d before the experiments.

Toad urinary bladders were obtained from pithed animals (*Bufo arenarum*) originating from the Buenos Aires area and mounted for permeability measurements as previously described. Mammalian tissues were incubated at 37°C during the experiments and toad bladders at 20°C. Both sides of the preparations were bathed with the same saline solution. The 2 basic compositions were the following: *Mammalian tissues* (mM): 114 NaCl, 5 KCl, 1.2 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 5 glucose, 2.4 K₂HPO₄, 1.0 KH₂PO₄; *Toad urinary bladder* (mM):

112 NaCl, 1.0 CaCl₂, 5 KCl, 2.5 NaHCO₃. In all cases osmotic gradients were created by adding to the serosal side of the epithelia (maternal side in the case of the amnion) different concentrations of polyethyleneglycol (PEG, mol wt 8000). Hydrostatic pressure was always applied to the mucosal bath (luminal or fetal baths in the case of the amnion). This pressure applied the tissue against a nylon mesh placed on its serosal surface.

Hydraulic (P_{hydr}) and osmotic (P_{osm}) permeability coefficients

The volume flow (J_w) across a membrane in the presence of a hydrostatic (ΔP) or osmotic ($\Delta \Pi$) gradient is described by:

$$J_w = Lp \cdot \Delta P \text{ and} \\ J_w = \sigma \cdot p \cdot \Delta \Pi$$

where Lp and p are phenomenological coefficients and σ is the Staverman reflexion coefficient. If J_w is measured in mol/cm²/s, the hydraulic permeability coefficient (P_{hydr}) and the osmotic permeability coefficient (P_{osm}) can be defined:

$$P_{hydr} = Lp \cdot R \cdot T / V_w \\ P_{osm} = \sigma \cdot p \cdot R \cdot T / V_w$$

where R and T have the usual meanings and V_w is the volume of 1 mol of water. Both coefficients are expressed in units of centimeters per second. On this basis, P_{hydr} and P_{osm} can be calculated from the slope of the regression line obtained when the volume flow values are plotted against ΔP or $\Delta \Pi$.

RESULTS

Figure 1 shows the minute-by-minute recording of J_w across the human amnion. The height of each stroke is proportional to the 1-min J_w . This parameter, as can be observed, was the function of the applied hydrostatic pressure and osmotic gradient. The same types of experiments were performed with the other tested epithelia—human colon, rat caecum, and toad urinary bladder.

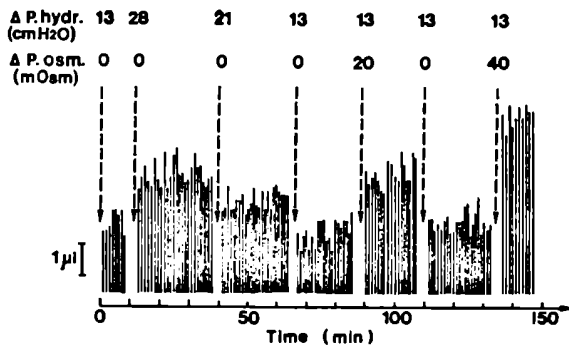


FIGURE 1. — Net water transfer across the human amnion *in vitro*. The height of each stroke indicates the 1 min net water flow. The 2 horizontal rows indicate the transepithelial hydrostatic (P_{hydr}) and osmotic (P_{osm}) gradients.

Hydraulic permeability

The J_w observed in the different epithelial tissues is represented in Figure 2 as a function of the applied hydrostatic pressure. In all cases linear correlations were obtained, and P_{hydr} was calculated in each case from the slope of the regression line. These lines intercept the ordinate at positive values, except for that for the human amnion. The intercept represents the J_w value observable in the absence of any osmotic, chemical, or hydrostatic gradient, and probably represents the J_w associated with the ionic active transport. This is strongly supported by the following observation: after sodium removal (NaCl was isosmotically replaced by choline-chloride on both sides), the regression lines went through the origin in all cases, whereas the positive ordinates disappeared (results not shown).

No statistically significant differences in P_{hydr} were observed between toad urinary bladders at rest and after stimulation with ADH, or between normal and K-adapted rats.

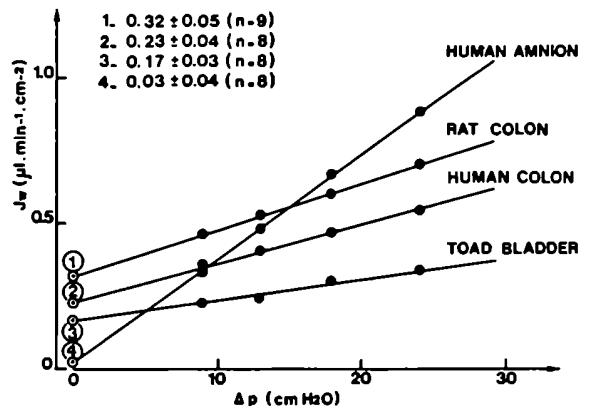


FIGURE 2. — The observed J_w as a function of the applied hydrostatic gradient in different epithelial barriers. Regression lines were obtained from the experimental values. Each point is the mean of at least 6 experiments. See Table I for the experimental dispersion of the calculated slopes. 1, 2, 3, and 4 represent the calculated ordinate intercept.

Osmotic permeability

Figure 3 shows the observed J_w as a function of the applied osmotic gradient in different tissues. Again, linear correlations were observed. The osmotic permeabilities (P_{osm}) were calculated from the regression lines. As expected, P_{osm} in ADH-treated toad urinary bladders was significantly higher than in the control ones. No differences in P_{osm} were observed between normal and K-adapted rats.

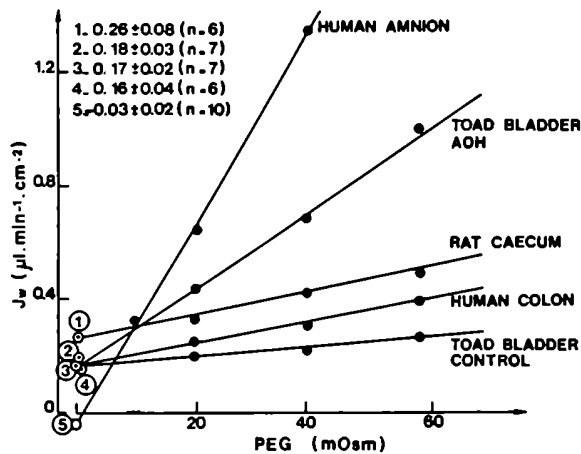


FIGURE 3. — The observed J_w as a function of the applied osmotic gradient in different epithelial barriers. Regression lines calculated as in Fig. 2. 1, 2, 3, 4, and 5 represent the calculated ordinate intercept.

Spontaneous potential difference

Table I shows the spontaneously observed potential differences, 10 min after mounting, in different epithelial barriers. The P_{hydr} and P_{osm} values are also represented. It can be observed that K-adaptation induced an important increase in dV with no change in P_{hydr} or P_{osm} . On the other hand, ADH action increased dV and P_{osm} in the toad urinary bladder, with no change in P_{hydr} .

DISCUSSION

It is generally accepted that hydrostatic pressure, in the range employed in this study ($24.4 \text{ cm H}_2\text{O} = 1 \text{ mOsm}$), does not move water transcellularly. The observed J_w can thus take place only in a paracellular or a leaky pathway (the last resulting from damage to cells or from any other artifactual path generated during membrane manipulation and mounting). We employed here the same experimen-

tal device with different tissues and it can be accepted that in all cases, the leaky path was similar. Two observations indicate that it does not bring a major contribution to the observed J_w : (1) The lowest P_{hydr} values were observed in the toad urinary bladder, the tissue that shows the highest mechanical fragility; (2) The observed dV values in different tissues were similar to those previously reported in acceptable experimental conditions [2, 10]. It can also be mentioned here that in the human amnion the observed P_{hydr} was sensitive to changes in the pH of the medium [9]. This result indicates that in this tissue, which shows the highest P_{hydr} values, the parameter represents the paracellular path.

Figure 2 and Table I indicate that P_{hydr} ranged from $7.9 \pm 0.8 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ in the toad urinary bladder to $32 \pm 5 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ in the human amnion. These values can be compared with the $15 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ previously reported in the rabbit gallbladder epithelium [13]. When a correlation plot was made between P_{hydr} and dV a negative and statistically significant potential correlation was observed ($r = 0.9 \pm 0.1$, $P < 0.05$; Fig. 4). This would indicate that in general, leaky barriers have higher hydraulic permeabilities and conversely, tight epithelia

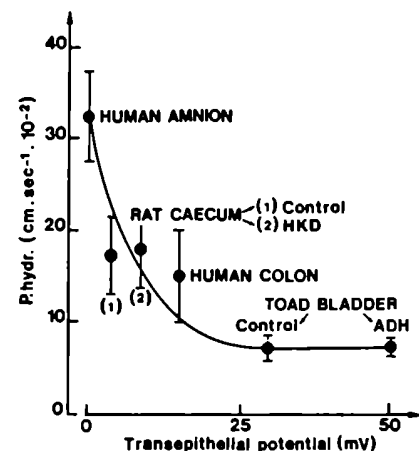


FIGURE 4. — Correlation plot between the observed P_{hydr} and transepithelial potential values in different epithelial barriers. The curve represents the regression potential function ($r = 0.9 \pm 0.1$).

TABLE I. — Water permeability coefficients and potential differences in epithelial barriers.

	N	P_{hydr}^* ($\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot 10^2$)	P_{osm}^{**} ($\text{cm}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot 10^2$)	V (mV)
Toad bladder control	8	7.9 ± 0.8	0.04 ± 0.02	31.0 ± 5.0
Toad bladder + ADH	8	9.3 ± 1.2	0.65 ± 0.11	52.0 ± 8.0
Human colon	6	22.0 ± 3.0	0.20 ± 0.05	15.0 ± 3.0
Rat caecum	10	18.0 ± 2.0	0.19 ± 0.04	3.9 ± 0.1
Rat caecum + HKD	6	21.0 ± 2.0	0.18 ± 0.06	8.5 ± 0.5
Human amnion	10	32.0 ± 5.0	1.54 ± 0.15	0

* P_{hydr} : water permeability coefficient (Pf) under hydrosmotic pressure.

** P_{osm} : water permeability coefficient (Pf) under osmotic gradient.

show low P_{hydr} values. It must be remarked however, that in 2 cases in which dV was increased in a specific barrier (ADH action in toad urinary bladder or K-adaptation in the rat caecum), there were no changes in the corresponding P_{hydr} .

The observed values for P_{osm} ranged from 0.08×10^{-2} cm/s for the toad bladder at rest to 1.5×10^{-2} cm/s in the human amnion (compared to 0.93×10^{-2} cm/s in the rabbit gall bladder epithelium [13]). These results would indicate that the hydrostatic pressure was between 30 and 100 times more effective than the osmotic gradient in driving a net water flux in the amnion. It must be considered, however, that our P_{osm} values (measured in steady-state conditions) are probably underestimated because of the "sweeping away" and "solute polarization" phenomena associated with the presence of unstirred layers [3]. Nevertheless, and because all experiments were made in the same experimental conditions, we can accept, as a first approach to the problem, that the values obtained in different tissues (all representing a single cell layer and having similar total thickness) can be compared.

Figures 5 and 6 show that no clear correlation was observed between P_{hydr} and P_{osm} or between P_{osm} and V_d . This is probably due to the fact, in addition to the unstirred layer problem previously described, that water may be moved osmotically either between the cells or through the cells [4, 14]. Interestingly enough, some type of correlation can be observed (dotted lines) if the values corresponding to the ADH-stimulated toad bladders are deleted. There is general agreement that in challenged bladders, water is osmotically driven transcellularly. On the other hand, it has been reported that in the human amnion, transepithelial [^{14}C] sucrose movements and J_w evolve in parallel in the presence of both hydrostatic and an osmotic gradient [9]. This parallelism was also observed when both P_{hydr} and P_{osm} changed under medium acidification. These results have been interpreted as indicating that the osmotically driven J_w is paracellular in human amnion [9].

The permeability of cell membranes has been recently estimated in different epithelial barriers [12]. These values, taken together with those observed in total tissues, will give further information on the relative importance of paracellular and transcellular routes in transepithelial water transfer.

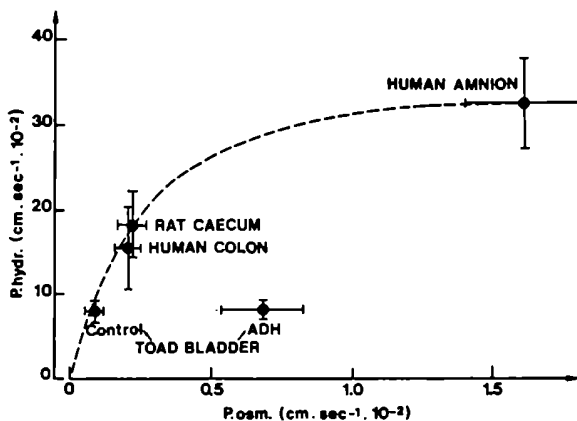


FIGURE 5. — Correlation plot between hydraulic and osmotic permeabilities in different epithelial barriers.

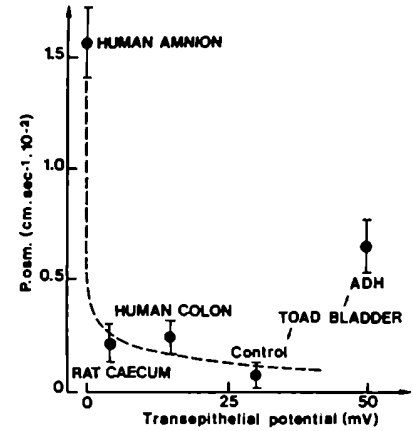


FIGURE 6. — Correlation plot between osmotic permeability and transepithelial potential in different epithelial barriers.

REFERENCES

- Bourguet J. & Jard S. (1964) Un dispositif automatique de mesure et d'enregistrement du flux net d'eau à travers la peau et la vessie des amphibiens. *Biochim. Biophys. Acta* 88, 442-444
- Clauss W., Schafer H., Horch I. & Hornicke H. (1985) Segmental differences in electrical properties and Na-transport of rabbit caecum, proximal and distal colon *in vitro*. *Pflugers Arch.* 403, 278-282
- Diamond J.M. (1979) Osmotic water flow in leaky epithelia. *J. Membr. Biol.* 51, 195-216
- Fischbarg J., Liebovitch L.S. & Koniarek J.P. (1985) Central role for cell osmolarity in isotonic fluid transport across epithelia. *Biol. Cell* 55, 239-244
- Fischbarg J., Warshavsky C.R. & Lim J.J. (1976) Pathways for hydraulically and osmotically induced water fluxes across epithelia. *Nature* 266, 71-73
- Fromter E. & Diamond J.M. (1972) Route of passive ion permeation in epithelia. *Nature* 235, 9-11
- Parisi M. & Bourguet J. (1983) The single file hypothesis and the water channels induced by antidiuretic hormone. *J. Membr. Biol.* 71, 189-193
- Parisi M. & Bourguet J. (1985) Water channels in the animal cells: a widespread structure? *Biol. Cell* 55, 155-158
- Porta M., Capurro C., Escobar E. & Parisi M. (1989) The human amnion epithelium: a model of paracellular water transport. *Biol. Cell* (in press)
- Reuss L. & Finn A.L. (1974) Passive electric properties of toad urinary bladder epithelium. *J. Gen. Physiol.* 64, 1-15
- Sackim H. & Boulpaep E.L. (1975) Model for coupling of salt and water transport. Proximal tubular reabsorption in *Necturus* kidney. *J. Gen. Physiol.* 66, 671-734
- Van Heeswijk M.P.E. & Van Os C.H. (1986) Osmotic permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine. *J. Membr. Biol.* 92, 183-193
- Van Os C.H., Wiedner G. & Wright E.M. (1979) Volume flow across gallbladder epithelium induced by small hydrostatic and osmotic gradients. *J. Membr. Biol.* 49, 1-20
- Whittembury G., Paz Alliaga A., Biondi A., Carpi Medina P., Gonzalez E. & Linares H. (1985) Pathways for volume flow and volume regulation in leaky epithelia. *Pflugers Arch.* 405 (suppl. 1), S17-S22

WATER AND ION HANDLING IN THE RAT CECUM DURING DIETARY
POTASSIUM LOADING

by

E. Escobar, R.S. Martin and M. Parisi

Seccion de Biomembranas, Departamento de Fisiologia
and Instituto de Investigaciones Medicas Alfredo Lanari.
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires. Argentina

Mail address:

Dr Mario Parisi
CEN/ SACLAY/BIOLOGIE/BIOMEMBRANES
91191 GIF SUR YVETTE
FRANCE.

ABSTRACT

The transepithelial net water movement (J_w), the potential difference (PD), short circuit current (SCC) and the unidirectional $^{22}\text{Na}^+$, $^{36}\text{Cl}^-$ and $^{86}\text{Rb}^+$ fluxes were measured in the cecum of Wistar rats adapted to a high potassium diet (HKD). Several adaptive changes were observed, in HKD rats, as compared with the control ones: 1) the net transport associated J_w (J_{wt}) became not significantly different from zero, in standard conditions ($0.06 \pm 0.06 \mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$, $n = 11$; no osmotic or chemical gradients; Na^+ , Cl^- and HCO_3^- as major components of the employed buffer); 2) the transepithelial PD ($7.5 \pm 1.1 \text{ mV}$, $n = 11$) and SCC ($56.6 \pm 7.1 \mu\text{A}$, $n = 6$) were significantly higher; 3) the net Na^+ absorption ($4.49 \pm 0.44 \mu\text{Eq}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$), measured under SCC conditions, was also higher than in control animals, 4) the net chloride fluxes ($-0.33 \pm 1.65 \mu\text{Eq}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$, measured also in SCC condition) disappeared; 5) both the PD and SCC became sensitive to amiloride (mean inhibition: $-3.28 \pm 0.73 \text{ mV}$, $n = 5$); 6) a net potassium secretion developed in HKD rats ($-0.036 \pm 0.009 \mu\text{Eq}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$); 7) replacement of the bicarbonate buffer by a Tris-Hepes buffer strongly reduced PD ($0.1 \pm 0.1 \text{ mV}$, $n=4$) as in control animal, but with no modification of the J_{wt} ($0.07 \pm 0.05 \mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$, $n=5$), 8) after replacement of Cl^- by SO_4^{2-} a net J_{wt} developed ($0.39 \pm 0.09 \mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$, $n=7$) together with a significant increase in PD ($13.8 \pm 0.6 \text{ mV}$, $n=8$). It is concluded that potassium

adaptation in the rat cecum implicates the development of a secretory Jwt that, in control conditions, compensates an absorptive Jwt. This secretory Jwt is coupled to K^+ secretion. Simultaneously, a shift from a non electrogenic NaCl reabsorption to an electrogenic amiloride sensitive Na^+ entry was observed.

Rats previously fed with a potassium enriched diet (high potassium diet, HKD rats) are able to withstand acute oral potassium loads that are fatal in control animals (11). This potassium tolerance involve, at least in part, an adaptive change in the large intestine (6) and the collecting duct system of the kidney (14, 8) which accelerates the rates of potassium secretion and excretion (5). In addition, an amplification of the basolateral membrane area of the epithelial cells was observed, which includes an increase in the number of Na-K-ATPase units. Finally, amiloride sensitive (9) and barium sensitive (10) Na^+ and K^+ conductances were detected in the apical border of the distal colon during potassium loading.

Most previous "in vitro" studies on potassium adaptation in the rat colon were centered in the measurement of ionic fluxes and electrical parameters. Nevertheless, we have recently employed, in the rat cecum, an experimental approach that allows the minute by minute recording of the transepithelial net water movement (J_w) (4). This approach was now used to study the water handling in the rat cecum of HKD rats. The transepithelial potential difference (PD), the short circuit current (SCC) and the unidirectional $^{22}\text{Na}^+$, $^{36}\text{Cl}^-$ and $^{86}\text{Rb}^+$ (as a potassium marker) fluxes were determined in parallel. Important changes were observed in the transport associated net water movement (J_{wt}) after potassium adaptation. This J_{wt} was the result, as in control conditions (4) of the complex addition of absorptive

and secretory mechanisms. The ionic transfers across the cecum were also modified. Some of these changes were similar to those observed in the rat distal colon after potassium loading.

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats weighing 250-300 g were maintained on ad libitum water and standard chow. Two weeks before the experiments they were placed in individual cages and separated into two groups according to K⁺ intake. Group I was fed with the standard diet (Cargill, Alpac, Buenos Aires) containing by analysis 0.2 mg of potassium per gram. The daily average intake was 4 mEq. Group II was fed with the same chow with added KCl up to a final concentration of 1.72 mEq/g. Tap water was supplied ad libitum in both groups.

The animals were killed with a head stroke and the abdomen was entered through a midline incision. The cecum was removed, flushed with cold saline, opened along the mesenteric border and rinsed. Two symmetrical fragments (exposed area: 1.7 cm²) were then placed (mucosal surface upwards) on a nylon mesh and mounted as a diaphragm between two lucite chambers.

The transepithelial net water movement was recorded minute by minute as previously described in other epithelial barriers (1). Briefly, the mucosal chamber was a closed one where the tissue was applied against the nylon mesh by a variable hydrostatic pressure ($\Delta P \geq 5$ cm of water). When

water moved across the tissue an automatic device injected or sucked water to maintain constant the volume on the mucosal chamber. A signal, proportional to the injected or sucked volume, was minute by minute recorded. Fifty nanoliters variations in the absorptive or secretory fluxes could be detected.

Voltage electrodes consisted of agar bridges connected to calomel half cells and placed adjacent to the epithelium. The transepithelial PD could be short circuited through current passing electrodes (Ag-AgCl wires) located at the rear of each half chamber (7).

Transepithelial ionic fluxes were measured as previously described (7). The tracer was added to one side of the membrane and the other side volume was completely removed and counted every 5 minutes during at least 12 consecutive periods. In most experiments the unidirectional mucosa to serosa (J_{ms}) and serosa to mucosa (J_{sm}) fluxes were simultaneously measured in two fragments of the same cecum. Double marking was currently employed, allowing the simultaneous determination of $^{22}Na^+$, $^{36}Cl^-$ or $^{86}Rb^+$ unidirectional fluxes. This last isotope was used as a marker of K^+ movements (13). All unidirectional fluxes were measured in short-circuit conditions.

The standard saline employed contained (in mEq/l): Na^+ 141; K^+ 5.2; Ca^{++} 2.4; Mg^{++} 2.4; Cl^- 122; HCO_3^- 25; HPO_4^{--} 4.8; $H_2PO_4^{--}$ 0.4 and 10 mM glucose. When Na^+ concentration was zero, a low bicarbonate (2.5 mEq/l)

solution was employed.

In some experiments a Tris-Hepes buffer (tris hydroxymethylaminomethane (Tris⁺ 7.5 mEq/l); N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES⁻ 12,5 mEq/l) replaced bicarbonate. Bath solutions were maintained at 37 °C. The serosal solution was continuously bubbled with 95% O₂/5% CO₂ (bicarbonate buffer) or 100 % O₂ (Tris-Hepes buffer). The medium pH was 7.8 (7.4 for 2.5 HCO₃⁻), and medium osmolarity ranged between 293 and 310 mosmol/Kg.

RESULTS

Jw and the applied transepithelial hydrostatic pressure; The role of Na⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻ in the net transport associated water movement.

Figure 1 shows the observed Jw as a function of the applied transepithelial ΔP in different experimental conditions. From the slope of the regression lines the corresponding hydraulic permeability coefficients (Phydr) were calculated. The ordinate intercepts gave the expected Jw in the absence of any hydrostatic, osmotic or chemical gradient. These values estimate (4) the net water movement associated with the transepithelial ionic transfers (Jwt). Two different conditions are represented in Fig.1 I) the standard saline was present on both sides of the rat cecum, II) choline buffer replaced sodium buffer (standard saline) in the media. The results obtained in rats adapted to a high

potassium diet are compared with those previously reported (4) in control animals. The Jwt was not significantly different from zero, in HKD rats, either when standard saline was employed or when choline replaced sodium. In control rats (Fig. 1, Table I), Jwt had a positive value in the presence of Na^+ and became no significantly different from zero in the absence of this cation.

In a second experimental series SO_4^- replaced Cl^- in the standard saline (total osmolarity was adjusted with PEG, MW 4000) on both sides of the tissue. In these conditions the Jwt became clearly positive in HKD rats and even higher than the one observed in control rats when the standard saline was employed (Table I).

Finally, removal of HCO_3^- (Tris-Hepes buffer in both mucosal and serosal baths), that significantly increased Jwt in control rats, did not induced a significant change in this parameter in HKD ones (Table I).

The observed hydraulic permeability (Phydr) was similar in control and HKD rats in standard conditions. Nevertheless, when SO_4^- replaced Cl^- on both the mucosal and serosal baths, a clear decrease in this parameter was observed in potassium adapted animals.

The transepithelial potential difference, short circuit current (SCC) and unidirectional ionic movements.

Potassium adaptation induced in the rat cecum, as previously observed in other parts of the large intestine

(9), an increase in the transepithelial PD (Table I). This potential disappeared, in both control and HKD rats, in the absence of Na^+ in the incubating media (Table I): Replacement of HCO_3^- by Tris-Hepes also strongly reduced this parameter in both control and HKD rats.

When SO_4^- replaced Cl^- in HKD rats, a clear and sustained increase in PD was observed (Fig.2). In the case of control animals the situation was not the same: an initial increase in this parameter was followed by a continuous decrease down to very low values (Fig.2, Table II).

The transepithelial PD became sensitive to amiloride (10^{-6} M, Fig. 2) in HKD rats (before amiloride 6.2 ± 2.2 mV; after amiloride 3.2 ± 1.3 mV; mean diff. -3.28 ± 0.73 mV, $n=5$, $p \leq 0.01$). This diuretic has not effect on control animals (4).

Table II shows the transepithelial PD, SCC and Na^+ , Rb^+ and Cl^- unidirectional and net movements, simultaneously measured in K^+ adapted rats (Rb^+ and Cl^- fluxes were measured in double labelling experiments). These results are again compared with those previously reported in similar conditions, with control rats. It can be noted that: 1) the net Na^+ absorption was higher in the HKD rats; 2) the net chloride absorption observed in control animals disappeared; in K^+ adapted ones; 3) a net Rb^+ secretion developed in HKD animals, 4) as shown in Table I, an increase in the transepithelial PD was observed in HKD rats. This increase was associated with an increase in SCC.

DISCUSSION

Water handling by the cecum of HKD rats

Several adaptive changes were observed in the cecum of HKD rats as compared with the control ones: 1) the absence of a transport associated net water movement in standard conditions or in the absence of bicarbonate, 2) an increase in the transepithelial PD, short circuit current and net Na^+ absorption, 3) the absence of a net absorptive Cl^- movement in short circuit conditions, 4) the development of a sensitivity to amiloride action, 5) a different role of the presence of HCO_3^- in the observed J_w and PD, 6) the development of a net potassium secretion.

As previously stated, no J_{wt} was detected when the cecum of HKD rats was mounted between two identical solutions, containing Na^+ , Cl^- and HCO_3^- (Table I). This was not the case in control rats, where a net absorptive J_{wt} was observed. Two alternative hypotheses can be proposed to explain this difference: 1) there is no transport associated water movement in HKD rats or 2) a secretory transport associated water movement (J_{wts}) cancelled an absorptive transport associated water movement (J_{wta}) after potassium loading. Several observations favour this second possibility. First, the transepithelial PD, the SCC and the net absorptive Na^+ transfer were higher in HKD rats as compared with control ones. These results are difficult to

conciliate with the absence of a J_{wta} . Second, the existence of a secretory J_w , in HKD rats, is supported by two additional observations: 1) the transepithelial PD disappeared in the absence of Na^+ with no significant change in the observed J_w (always no significantly different from zero, Table I), and 2) when SO_4^{2-} replaced Cl^- in the media, an important absorptive net J_w appeared (Table I). A straightforward interpretation of these results is to accept that both the absorptive and secretory J_w are Na^+ dependent, while only the secretory one is Cl^- dependent.

A HCO_3^- and Cl^- dependent J_{wts} has been described in the cecum of control rats. Nevertheless, this J_{wts} only represents a small fraction of the observed net J_w . It could then be asked if we can explain the absence of a net J_w in HKD rats as due to an increase in the J_{wts} observed in control animals. However, several differences appeared: a net absorptive J_w developed in HKD rats in the absence of Cl^- but not in the absence of HCO_3^- (Table I). To give consistence to our results we must accept that sodium absorption becomes bicarbonate sensitive in HKD rats. Furthermore, a net K^+ secretion was observed (see later). Perhaps two different J_{wts} could be present in the cecum of HKD rats, as recently proposed by us for the human large intestine (3): one linked to HCO_3^- secretion and the other linked to K^+ (KCl ?) secretion.

Ionic movements across the cecum of HKD rats

In addition to the increase in the net Na^+ absorption, a net K^+ (Rb^+) secretion was observed in the cecum of HKD rats. This K^+ secretion can be associated with a J_{wts} . If we accept that the J_{wts} is the one observed in the presence of SO_4^- and the J_{wts} has, in the standard conditions, similar values, we must conclude that the K^+ concentration in the secreted fluid must be very low.

The net Cl^- movement observed in control rats (under short circuit conditions) disappeared after potassium loading. We can speculate that the possible Cl^- secretion that could accompany K^+ efflux can not be detected with isotope measurements, because of the important paracellular permeability to Cl^- .

Previous experiments with HKD rats have shown, in the distal colon of the rat, an increase in the absorptive Na^+ flux together with no changes in the net absorptive Cl^- movement (2). This was associated with a net increase in the transepithelial PD, a reduction in the transepithelial resistance (9), and an increase in K^+ secretion (10). The results reported here indicate that, regarding ion movements, the response of the rat cecum has similarities and differences with other parts of the colon. Nevertheless, the obtained results are strikingly similar to those observed in the rat distal colon after continuous infusion of aldosterone for seven days; this treatment produced the induction of both active, electrogenic, amiloride-sensitive sodium absorption and active, electrogenic potassium secretion, as well as an

inhibition of electroneutral NaCl absorption (12).

Two observations can be possibly related to the state of the paracellular pathway in the cecum of HKD rats: 1) the strong reduction in the hydraulic permeability observed when SO_4^- replaced Cl^- ions in the bath. 2) The time course evolution of the transepithelial potential in the presence of SO_4^- , as compared with the control rats. Both results can be interpreted as a lower permeability to SO_4^- of the paracellular pathways in HKD rats.

In summary, we can conclude that K^+ adaptation in the rat cecum implicates the development of a secretory transport associated water movement, coupled to K^+ secretion. Simultaneously, a shift from a non electrogenic NaCl reabsorption (Fig. 3a) to an amiloride sensitive Na^+ entry (Fig. 3b), together with a reduction in the paracellular permeability, was observed.

1. BOURGUET J, JARD S. Un dispositif automatique de mesure et d'enregistrement du flux net d'eau à travers la peau et la vessie des amphibiens. *Biochim Biophys Acta* 88: 442-444 (1964)
2. BUDINGER ME, FOSTER ES, HAYSLETT JP, BINDER HJ. Sodium and chloride transport in the large intestine of potassium loaded rats. *Am J Physiol* 240: F257-f268 (1986)
3. ESCOBAR E, GALINDO F, PARISI M. Water handling in the distal colon in vitro: role of Na⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻. *Biochim Biophys Acta* 1027: 257-263 (1990)
4. ESCOBAR E, IBARRA C, TODISCO E, PARISI M. Water and ion handling in the rat caecum. *Am J Physiol* 259: G786-G791 (1990)
5. HAYSLETT JP, BINDER HJ. Mechanism of potassium adaptation. *Am J Physiol* 243: F103-F112 (1982)
6. KASHGARIAN M, TAYLOR CR, BINDER HJ, HAYSLETT JP. Amplification of cell membrane surface in potassium adaptation. *Lab Invest.* 42:581--588 (1980)
7. PARISI M, CANCELA L. Time course studies on phosphate

transfer in frog urinary bladder. *Kidney Int* 33: 58-63
(1988)

8. RASTEGAR A, BIEMESDERFER D, KASHGARIAN M, HAYSLETT JP.
Changes in membrane surfaces of collecting ducts cells
in potassium adaptation. *Kidney Int.* 18: 293-301 (1980)

9. SANDLE GI, FOSTER ES, LEWIS SA, BINDER HJ, HAYSLETT JP.
The electrical basis for enhanced potassium secretion
in rat distal colon during dietary potassium loading.
Pflugers Arch 403: 433-439 (1985)

10. SIGA EL, MARTIN RS, IBARRA C, VERON D, IBARRA F,
GIMENEZ M, PARISI M, ARRIZURIETA E. Voltage dependence
and barium sensitivity of colonic K⁺ secretion in renal
failure. *Am J Physiol* 256: F490-F496 (1989)

11. TATCHER JC, RADIKE AW. Tolerance to potassium
intoxication in the albino rat. *Am J Physiol* 151:138-
146 (1947)

12. TURNAMIAN SG, BINDER HJ. Regulation of active sodium
and potassium transport in the distal colon of the rat.
Role of aldosterone and glucocorticoid receptors. *J
Clin Invest* 84: 1924-1929 (1989)

13. TYOR N.P., AND ELRIDGE J. S. A comparison of the

metabolism of rubidium 86 and potassium 42 following simultaneous injection in the man. Am. J. Med. Sci. 232: 186-202 (1956)

14. WADE JB, O'NEIL RG, PRYOR JL, BOULPAEP EL. Modulation of cell membrane area in renal collecting tubules by corticosteroid hormones. J Cell Biol 81: 439-445 (1979)

LEGENDS TO FIGURES:

Figure 1: The observed net water movement (J_w) as a function of the applied transepithelial hydrostatic gradient: (●) control rats in standard conditions (n=13), (■) control rats in the absence of sodium (n=6)(data from Escobar et al. 1990), (○) HKD rats in control condition (n=11), (□) HKD rats in the absence of sodium (n=5).

Figure 2: Effect of amiloride and replacement of Cl^- by SO_4^{2-} on the transepithelial PD. Upper curve; HKD rats; lower curve: control rats (data from Escobar et al, 1990:)

Figure 3; Proposed model for the effect of potassium adaptation in the rat cecum: most cells would shift from left to right situation.

TABLE I

		Jwt ($\mu\text{l}/\text{min}.\text{cm}^2$)	Phydr. (cm/s)	PD (mV)
NaCl	1) control	0.17 ± 0.03 (13)	0.16 ± 0.02 (13)	3.7 ± 0.5 (7)
	2) HKD	0.06 ± 0.06 (11)	0.19 ± 0.03 (11)	7.5 ± 1.1 (11)
	diff	-0.11 ± 0.02 P < 0.01	$+0.03 \pm 0.03$ NS	$+4.20 \pm 1.4$ P < 0.02
Na ₂ SO ₄	3) control	0.25 ± 0.03 (14)	0.18 ± 0.06 (5)	0.5 ± 0.2 (11)
	4) HKD	0.39 ± 0.09 (7)	-0.003 ± 0.03 (7)	13.8 ± 0.6 (8)
	diff.	$+0.14 \pm 0.08$ NS	-0.18 ± 0.06 P < 0.02	$+13.3 \pm 0.45$ P < 0.001
Choline-Cl	5) control	0.04 ± 0.03 (6)	0.22 ± 0.04 (6)	0.1 ± 0.1 (6)
	6) HKD	0.01 ± 0.03 (5)	0.21 ± 0.04 (5)	0.1 ± 0.1 (7)
	diff.	-0.03 ± 0.04 NS	$+0.01 \pm 0.06$ NS	0.0 ± 0.2 NS
Tris-Hepes	7) control	0.26 ± 0.04 (7)	0.20 ± 0.05 (5)	0.7 ± 0.2 (4)
	8) HKD	0.07 ± 0.05 (4)	0.16 ± 0.04 (4)	0.1 ± 0.1 (3)
	diff.	-0.19 ± 0.07 P < 0.05	-0.04 ± 0.07 NS	-0.6 ± 0.2 NS
	diff 4-2	$+0.33 \pm 0.08$ P < 0.001	$+0.19 \pm 0.04$ P < 0.001	-6.3 ± 1.4 P < 0.001
	diff 6-2	$+0.05 \pm 0.09$ NS	-0.02 ± 0.05 NS	$+7.4 \pm 1.4$ P < 0.001
	diff 8-2	-0.01 ± 0.06 NS	$+0.03 \pm 0.05$ NS	$+7.4 \pm 2.2$ P < 0.01

Table I; Transport associated Jw (Jwt), hydraulic permeability (Phydr.) and transepithelial potential difference (PD) in the cecum of HKD rats. Control values (*) were taken from Escobar et al. 1990b. NaCl standard buffer on both sides of the tissue; Na₂SO₄: Sulphate replaced chloride in the media; Choline-Cl: choline replaced Na⁺ in the media; Tris-Hepes buffer replaced HCO₃⁻ buffer (see Methods).

TABLE II

			J_{ms}	J_{sm} uEq/(h.cm ²)	J_{net}	PD (mV)	Isc uA/cm ²
Na ⁺	control	6	5.92 ± 0.55	3.55 ± 0.34	2.37 ± 0.68	3.4 ± 0.5	23.4 ± 3.2
	HKD	4	7.55 ± 0.91	3.06 ± 0.26	4.49 ± 0.44	6.8 ± 0.6	56.6 ± 7.1
	diff		1.60 ± 0.60*	-0.49 ± 0.42	2.12 ± 0.78*	3.4 ± 0.78*	33.2 ± 6.8*
Cl ⁻	control	6	11.61 ± 1.02	8.16 ± 1.05	3.45 ± 1.46		
	HKD	8	5.96 ± 1.01	6.28 ± 1.30	-0.33 ± 1.65	5.8 ± 0.4	36.9 ± 3.9
	diff		-5.65 ± 1.43*	-1.88 ± 1.67	-3.78 ± 2.20		
Rb ⁺	control	6	0.169 ± 0.022	0.144 ± 0.021	0.0025 ± 0.023		
	HKD	8	0.104 ± 0.010	0.140 ± 0.015	-0.036 ± 0.009	5.8 ± 0.4	36.9 ± 3.9
	diff		-0.065 ± 0.02*	-0.004 ± 0.026	-0.038 ± 0.009*		

*P < 0.05, t test for non paired data.

Table II: Unidirectional and net ionic fluxes, PD and SCC in the cecum of HKD rats. Control values are from Escobar et al. 1990b. Cl⁻ and Rb⁺ fluxes were performed, in HKD rats, in doubly marking experiments.