



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia

**ADAPTACIONS DEL CÒLON DE RATA
AL CONTINGUT EN SODI DE LA DIETA:
PAPER DEL SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA
I DE LA VASOPRESSINA**

**ESTHER CRISTIÀ CIVIT
2006**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia

Programa de doctorat: Medicaments, Alimentació i Salut
Bienni 2002-2004

**ADAPTACIONS DEL CÒLON DE RATA
AL CONTINGUT EN SODI DE LA DIETA:
PAPER DEL SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA
I DE LA VASOPRESSINA**

**Memòria presentada per Esther Cristià Civit per optar al títol
de doctor per la Universitat de Barcelona**

Signatura del Director:

Signatura de la doctoranda:

Dr. Miquel Moretó Pedragosa

Esther Cristià Civit

**ESTHER CRISTIÀ CIVIT
2006**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Fisiologia

Facultat de Farmàcia
Edifici B, 3a planta
08028 Barcelona

Tel. 93 402 45 05
Fax 93 403 59 01

En Miquel Moretó Pedragosa, Catedràtic de Fisiologia del Departament de Fisiologia (Farmàcia) de la Universitat de Barcelona,

INFORMA:

Que la memòria titulada "Adaptacions del còlon de rata al contingut en sodi de la dieta: paper del sistema renina-angiotensina-aldosterona i de la vasopressina" presentada per ESTHER CRISTIÀ CIVIT per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona ha estat realitzada sota la meva direcció al Departament de Fisiologia (Farmàcia) i, considerant-la conclosa, autoritzo la seva presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per què així consti, signo la present a Barcelona, el dia 29 de juny de 2006.

Dr. Miquel Moretó Pedragosa

Aquest treball ha estat finançat pel projecte "*Mecanismo de acción de la aldosterona en la regulación de los transportadores intestinales de hexosas*", Programa Nacional de Promoción General del Conocimiento (BFI 2003-5124). El grup de recerca de Fisiologia i Nutrició Experimental rep un ajut de la Generalitat de Catalunya per potenciar els grups de recerca consolidats (2001SGR00142). L'Esther Cristià ha gaudit d'una beca de "*Formación de Profesorado Universitario*" (FPU) del Ministeri d'Educació i Cultura (MEC), durant el període 2002-2006. Aquesta tesi s'ha realitzat al Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i, durant quatre mesos, al Physiology Department del King's College London gràcies a una beca d'estades breus del MEC.

QUAN FA UNS NOU ANYS A LA CLASSE DE Fisiologia Cel·lular de primer de Farmàcia una professora amb accent marcadament mallorquí ens va animar a descobrir el treball de laboratori als mesos d'estiu, ningú es podia imaginar que aquella proposta seria la meua porta d'entrada al departament de Fisiologia i que acabaria en una tesi doctoral. Pel camí queden dos treballs pràctics, una beca de col·laboració, un màster i quatre anys de tesi doctoral, amb una estada al King's College de Londres inclosa. Sou molts als que us he d'agrair la vostra ajuda durant aquests anys, a tots els qui dia a dia heu fet possible que aquesta tesi es fes realitat.

Miquel Moretó, gràcies per la teua excel·lent direcció. T'agraeixo que creguessis en mi i que em donessis l'oportunitat de formar part del teu projecte. Gràcies per la teua dedicació en tots els moments compartits en aquests últims anys, en projectes i experiments, en sessions de microscopi, hores de reunions i congressos. Gràcies pel teu tracte afable i el teu bon humor.

Richard Naftalin, it has been a privilege to know you and to join you in your research. You have always been there, also on Saturdays, to answer all my questions and doubts. Thank you for your hospitality in my stage in London, to show me the real English way of life and to try to understand my English. It has been a pleasure to work with you.

Joana Planas, gràcies a tu es va iniciar tot aquest viatge i em vaig introduir en el món de la investigació. Gràcies pels teus consells i la teua ajuda.

Conxita Amat, gràcies per estar sempre disposada a donar un cop de mà quan el temps t'ho ha permès, per les hores de microscopi i pels molts consells.

Debbie Baines, thank you for giving me the opportunity to work in your group, for your sympathy and hospitality, and for the incredible roast beef.

Anna Pérez, gràcies per la teua ajuda incondicional, pels mil consells per a cada tècnica, per l'exemple de professionalitat i de feina ben feta. Hem compartit feina, converses i il·lusions, i me n'emporto una amiga.

A tots els qui heu contribuït en algun moment en les meves investigacions us he d'agrair la vostra ajuda. A la Carme Villà per les múltiples determinacions en el teu temps lliure. A la Susanna Castel i a la Raquel Garcia, del servei de microscòpia confocal dels Serveis Científico-Tècnics, pel vostre assessorament i ajuda en l'obtenció d'imatges i, sobretot a la Raquel, la teua paciència en les nostres sessions maratonianes de dextrà i sodium red. A tots els qui formeu part de l'estabulari, Xavi Cañas, Teresa Rodrigo, Cristina, Carme, Pilar, Marta, Raquel, Luisa, a qui us he d'agrair la vostra ajuda en les innumerables hores que he compartit amb vosaltres. A la Marta i la Lluïsa, les meves "treballs dirigits", per ajudar-me en els experiments. Gracias a la doctora Maria Balda por proporcionarnos el anticuerpo de claudina. Thank you to Otsuka Pharmaceuticals Co, from Japan, for giving us the Tolvaptan.

Carlos, gracias por tu gran ayuda y dedicación en el diseño y maquetación de la tesis.

Maria Vicario, no crec que hagués pogut començar amb una professora millor, gràcies pel teu exemple, per tenir sempre temps pels demés, per omplir de bon humor el laboratori i tenir tanta paciència. Simplement, gràcies per ser com ets.

Diana, Vero, Lourdes i Vanesa, hem compartit mil dinars, converses, riures, sopars, viatges i balls. Gràcies per la vostra amistat, per ser còmplices dels bons i dels mals moments i per viure juntes aquesta època de la nostra vida.

Anna Vila, gràcies per l'any compartit, per la teua simpatia, bon humor i amistat.

Emília, Carles i Laia, encara ara, quan miro les fotografies del congrés a Guilford i de Londres, no puc evitar un somriure. Gràcies per la vostra ajuda i consells. Emília, gràcies pel teu bon humor i la teva alegria, fins i tot en els mals moments.

Ruth, Raquel i M.José, gràcies per compartir amb mi uns dies a Sevilla, per gaudir plegades del carro de cavalls, de les tapes i d'aquells xurros amb xocolata. A tu Raquel, t'he d'agrair especialment la teva ajuda amb el "papeleo" de la tesi, sempre disposada a dedicar-me una estona del teu temps.

Uri i Naxo, gràcies per omplir el laboratori de rialles i bons moments en aquest últim tram del recorregut.

Manel, Montse Mitjans, Montse Anclès, Francisco, Ana, Sílvia, Emma, Juan, Montse Miró, Sònia... A tots els membres del departament, a tots els incondicionals però també a tots aquells que heu anat formant-ne part durant un temps. Com a testimonis tenim les múltiples festes, amb les seves fotografies corresponents, els mil jocs i els bons moments compartits. Gràcies per tots els moments que hem compartit.

Mireia, aquests quatre anys de feina no haurien estat iguals sense els nostres dinars i "cafès" de deu minuts, sense les converses i els consells de tantes tardes. Cristina, moltes gràcies pels ànims i per tots els dies que ens has baixat a veure tot i la distància. Gràcies a les dues per la vostra amistat, per recordar vells temps de la facultat, per confiar sempre en mi.

Anna Bach, una de les millors coses de tots aquests anys ha estat conèixer i poder compartir tants moments inoblidables. Gràcies per la teva amistat i la teva ajuda i, t'he de confessar que no em faria res que realment fóssim germanes.

Pares, Pere, Marta, Gemma i també tu Xavi, gràcies per ser com sou, per viure una vida junts, per les estones caòtiques i divertides, perquè sempre hi ha alguna cosa a dir, a comentar, a celebrar. Gràcies perquè sempre ens tindrem els uns als altres. I avis, gràcies per la vostra comprensió i la vostra estima.

A tu, Víctor, gràcies per tot, per ser sempre al meu costat, per la teva ajuda i el teu amor. Perquè sempre has cregut en mi, m'has donat suport i m'has incentivat a tirar endavant, creient en aquest projecte, a vegades, més fins i tot que jo mateixa.

A tots vosaltres... Gràcies.

*Als meus pares i germans i al Víctor.
Sense vosaltres, els meus,
res hauria estat possible.*

| | |
|---------------------------------------------------------------|------------|
| Abreviatures / Abbreviations..... | III |
| OBJECTIUS / AIMS | 1 |
| INTRODUCCIÓ / INTRODUCTION | 5 |
| FISIOLOGIA INTESTINAL | 7 |
| FUNCIÓ ABSORTIVA | 7 |
| Epiteli intestinal..... | 7 |
| Miofibroblasts intestinals..... | 8 |
| Absorció d'electròlits i d'aigua..... | 9 |
| Absorció d'electròlits | 9 |
| Absorció d'aigua..... | 11 |
| Propietats elèctriques intestinals | 12 |
| FUNCIÓ DE BARRERA | 13 |
| Permeabilitat intestinal | 13 |
| Defensa intestinal mucosal | 15 |
| SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA..... | 16 |
| ANGIOTENSINA II | 17 |
| Receptors d'angiotensina II..... | 17 |
| Accions de l'angiotensina II..... | 18 |
| ALDOSTERONA | 19 |
| Receptors d'angiotensina II..... | 20 |
| Accions de l'aldosterona | 21 |
| VASOPRESSINA | 22 |
| Receptors de vasopressina | 23 |
| Accions de la vasopressina | 24 |
| EFECTE DEL CONTINGUT EN SODI DE LA DIETA EN EL CÒLON | 25 |
| METODOLOGIES / METHODS..... | 27 |
| ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ | 29 |
| DIETES | 29 |
| DISSENY EXPERIMENTAL..... | 29 |
| Model d'activació del RAAS..... | 29 |
| Model d'administració d'angiotensina II i d'aldosterona | 30 |
| Model de deshidratació amb activació del RAAS | 30 |
| Model d'administració de vasopressina..... | 31 |
| PROTOCOL EXPERIMENTAL | 31 |
| Adrenalectomia | 31 |
| Administració hormonal | 31 |
| Obtenció i tractament de les mostres..... | 31 |
| DETERMINACIONS EN PLASMA I ORINA..... | 32 |
| Determinació de l'osmolalitat | 32 |
| Determinació d'ions | 32 |
| Determinació hormonal | 32 |
| RIA aldosterona | 33 |
| RIA angiotensina II i vasopressina..... | 33 |
| ELECTROFISIOLOGIA | 34 |
| Medis | 34 |
| Procediment..... | 34 |
| DETERMINACIÓ DE Na ⁺ A LA ZONA PERICRIPTAL..... | 35 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Medis | 35 |
| Preparació reactiu | 35 |
| Procediment..... | 35 |
| PERMEABILITAT AL DEXTRÀ | 36 |
| Medis | 36 |
| Procediment..... | 36 |
| IMMUNOHISTOQUÍMICA | 37 |
| Medis | 37 |
| Fixació de les mostres | 37 |
| Procediment del marcatge..... | 38 |
| MICROSCÒPIA CONFOCAL | 38 |
| Obtenció de les imatges..... | 38 |
| Anàlisi de les imatges..... | 39 |
| Estimació de la concentració de Na ⁺ pericriptal..... | 39 |
| Estimació de la fluorescència de FITC-dextrà | 39 |
| Estimació de la fluorescència en els marcatges..... | 40 |
| ANÀLISI ESTADÍSTICA | 40 |
| ARTICLES / PAPERS | 41 |
| Paper de l'aldosterona i de l'angiotensina II en la permeabilitat | 43 |
| Resum article 1 | 47 |
| Article 1 | 49 |
| Paper de l'aldosterona i de l'angiotensina II en la fibrosi pericriptal | 59 |
| Resum article 2 | 63 |
| Article 2 | 65 |
| MANUSCRIT / MANUSCRIPT | 73 |
| Paper de la Vasopressina en el còlon distal..... | 75 |
| Resum manuscrit..... | 79 |
| Manuscrit | 81 |
| RESULTATS I DISCUSSIÓ / RESULTS & DISCUSSION..... | 93 |
| CONCLUSIONS / CONCLUSIONS..... | 103 |
| BIBLIOGRAFIA / REFERENCES | 107 |
| ANNEX / ANNEXE..... | 127 |

| | |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AC | Adenilat ciclase • <i>Adenylate cyclase</i> |
| ACTH | Hormona adrenocorticotròpica • <i>Adrenocorticotropic hormone</i> |
| ADX | Adrenalectomia • <i>Adrenalectomy</i> |
| AE1 | Anió intercanviador tipus 1 • <i>Anion exchanger 1</i> |
| Aldo | Aldosterona • <i>Aldosterone</i> |
| AM | Adrenomedulina • <i>Adrenomedullin</i> |
| ANF | Factor natriurètic atrial • <i>Atrial natriuretic factor</i> |
| Ang II | Angiotensina II • <i>Angiotensin II</i> |
| ANP | Pèptid natriurètic atrial • <i>Atrial natriuretic peptide</i> |
| AQP | Aquaporina • <i>Aquaporin</i> |
| AVP | Vasopressina • <i>Vasopressin</i> |
| BSA | Albúmina sèrica bovina • <i>Bovine serum albumin</i> |
| CAP | Captopril • <i>Captopril</i> |
| CFTR | Regulador del transport transmembrana de fibrosis quística • <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> |
| CHIF | Factor inductor de l'hormona corticosteroide • <i>Corticosteroid hormone-induced factor</i> |
| ECA | Enzim convertidor d'angiotensina • <i>Angiotensin converting enzyme (ACE)</i> |
| ECM | Matriu extracel·lular • <i>Extracellular matrix</i> |
| EGF | Factor de creixement epidèrmic • <i>Epidermal growth factor</i> |
| ENaC | Canal epitelial de sodi • <i>Epithelial sodium channel</i> |
| EPHESUS | Estudi neurohormonal d'eficàcia i supervivència de l'epilerona • <i>Eplererone neurohormonal efficacy and survival study</i> |
| EP₃R | Receptor prostaglandina E ₂ • <i>Prostaglandin E₂ receptor</i> |
| FAE | Epiteli associat al fol·licle • <i>Follicle-associated epithelium</i> |
| FITC | Isotiocianat de fluoresceïna • <i>Fluorescein isothiocyanate</i> |
| GALT | Teixit limfoide associat a l'intestí • <i>Gut associated lymphoid tissue</i> |
| GC | Guanilat ciclase • <i>Guanylate cyclase</i> |
| GFR | Taxa de filtració glomerular • <i>Glomerular filtration rate</i> |
| GR | Receptor glucocorticoide • <i>Glucocorticoid receptor</i> |
| HPMC | Hidroxipropilmetilcel·lulosa • <i>Hydroxipropylmethylcellulose</i> |
| HS | Alt contingut de sodi • <i>High sodium</i> |
| ICC | Cèl·lules intersticials de Cajal • <i>Interstitial cells of Cajal</i> |
| ICP-OES | Espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament • <i>Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy</i> |
| iECA | Inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina • <i>Angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI)</i> |
| IELs | Limfòcits intraepitelials • <i>Intraepithelial lymphocytes</i> |
| IFN-γ | Interferó gamma • <i>Interferon gamma</i> |
| IGF | Factor de creixement d'insulina • <i>Insulin-like growth factor</i> |
| IL | Interleucina • <i>Interleucine</i> |
| Isc | Intensitat de corrent de curt-circuit • <i>Short-circuit current</i> |
| ISEMf | Miofibroblasts subepitelials intestinals • <i>Intestinal subepithelial myofibroblasts</i> |

| | |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LEC | Líquid extracel.lular • <i>Extracellular fluid (ECF)</i> |
| LOS | Losartan • <i>Losartan</i> |
| LS | Baix contingut de sodi • <i>Low sodium</i> |
| MMP | Metaloproteïnasa • <i>Metalloproteinases</i> |
| MR | Receptor mineralcorticoide • <i>Mineralcorticoid receptor</i> |
| NHE | Intercanviador de sodi/protons • <i>Na⁺/H⁺ Exchanger</i> |
| NO | Òxid nítric • <i>Nitric oxide</i> |
| PD | Diferència de potencial • <i>Potential difference</i> |
| PGE₂ | Prostaglandina E ₂ • <i>Prostaglandin E₂</i> |
| PI3-K | Fosfoinositol-3 quinasa • <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> |
| PKC | Proteïna quinasa C • <i>Protein Kinase C</i> |
| PM | Pes molecular • <i>Molecular weight (MW)</i> |
| PP | Plaques de Peyer • <i>Peyer's patches</i> |
| RAAS | Sistema renina-angiotensina-aldosterona • <i>Renin-angiotensin-aldosterone system</i> |
| RALES | Estudi randomitzat d'avaluació d'aldactona • <i>Randomized Aldactone Evaluation Study</i> |
| RIA | Radioimmunoassaig • <i>Radioimmunoassay</i> |
| SCT | Serveis Científic-Tècnics |
| SED | Volta subepitelial • <i>Subepithelial dome</i> |
| Sgk | Quinasa regulada per sèrum i glucocorticoids • <i>Serum- and glucocorticoid-regulated kinase</i> |
| α-SMA | Alfa actina de múscul llis • <i>Alpha smooth muscle actin</i> |
| SNC | Sistema nerviós central • <i>Central nervous system (CNS)</i> |
| SNP | Sodi nitroprusid • <i>Sodium nitropruside</i> |
| SPI | Espironolactona • <i>Spironolactone</i> |
| TER | Resistència transepitelial • <i>Transepithelial electrical resistance</i> |
| TGF-β | Factor transformador del creixement beta • <i>Transforming growth factor beta</i> |
| TIMP | Inhibidors de metaloproteïnases en teixit • <i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> |
| TNF-α | Factor de necrosi tumoral alfa • <i>Tumor necrosis factor alfa</i> |
| VR1 | Antagonista receptor V ₁ • <i>V₁ receptor antagonist</i> |
| VR2 | Antagonista receptor V ₂ • <i>V₂ receptor antagonist</i> |
| 11β-HSD | 11beta-hidroxiesteroid deshidrogenasa • <i>11beta-hydroxysteroid dehydrogenase</i> |