



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**



METHODS
METODOLOGIA

Aquest apartat de metodologia inclou un recull general del material i mètodes que s'han utilitzat en tot el període experimental de la tesi doctoral. Tot i que en cada un dels articles i en el manuscrit que s'adjunten es pot consultar el material i mètodes concret, aquí s'ofereix una visió general de tot el treball i una explicació més detallada de les tècniques experimentals utilitzades.

A NIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

Els animals utilitzats en l'estudi han estat rates Sprague-Dawley mascles, subministrades per la casa comercial Harlan Ibèrica, Barcelona. El pes el dia del sacrifici ha estat aproximadament d'entre 200-250 g. El manteniment dels animals s'ha realitzat al Servei d'Estabulari de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona on s'han mantingut en condicions òptimes de temperatura i humitat, amb un cicle de llum-fosc de 12 hores. Tots els protocols d'experimentació utilitzats han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

En tots els períodes experimentals s'ha realitzat un control del pes corporal. Tots els animals s'han mantingut individualment en gàbies metabòliques durant els 3 últims dies abans del seu sacrifici. En aquests tres dies es determinen els efectes de les dietes i tractaments utilitzats. Les gàbies metabòliques permeten la total separació de l'orina i les femtes produïdes. A més, permeten fer estudis de balanç energètic, ja que es pot controlar en tot moment el menjar i la beguda consumits pels animals. Per tant, durant aquest període de tres dies s'ha realitzat el seguiment del pes corporal, del consum de pinso i d'aigua de beguda i del volum d'orina. La recollida d'orina ha permès calcular-ne el volum diari excretat i determinar la concentració dels ions i l'osmolalitat.

D IETES

Tant el pinso com l'aigua de beguda s'han administrat *ad libitum*. La dieta que han rebut els animals consisteix en blat i ordi en proporció 1:1. Aquesta dieta aporta tots els nutrients necessaris per a una dieta equilibrada, però amb continguts baixos de NaCl. Per tal d'establir condicions amb una diferent ingesta de sodi, s'ha modificat la quantitat de NaCl en l'aigua de beguda, obtenint els següents dos tipus de dieta:

• **Dieta amb un alt contingut en sodi (HS, high sodium).** Solució de NaCl 150 mM en aigua desionitzada.

• **Dieta amb un baix contingut en sodi (LS, low sodium).** Solució de NaCl 150 µM en aigua desionitzada.

D ISSENY EXPERIMENTAL

Per assolir els objectius proposats s'han posat a punt 4 models animals.

► Model d'activació del RAAS

A rates mascle Sprague-Dawley se'ls ha administrat la dieta HS. Després de 4 dies, es separen els animals en dos grups, un dels quals continua amb la dieta HS (grup HS), i un segon grup que passa a ser administrat amb la dieta LS (grup LS), durant 3 dies. Per tant, en el grup LS s'estudia l'efecte de la disminució de la ingesta de sodi respecte una condició amb una alta ingesta de l'ió. En l'esquema que es mostra a continuació s'inclou el perfil hormonal que s'obté per a cada grup experimental de la concentració plasmàtica d'angiotensina II (Ang II) i d'aldosterona (Aldo).

Per comprovar la implicació de les hormones del RAAS a alguns animals LS se'ls ha administrat un inhibidor d'algun dels passos de la cascada enzimàtica d'aquest sistema. El captopril (CAP), un inhibidor de l'enzim convertidor d'angiotensina, i el losartan (LOS), un inhibidor del receptor l'angiotensina tipus 1, s'han

administrat en l'aigua de beguda a la dosi de 65 mg/Kg/dia i 30 mg/Kg/dia, respectivament. Finalment, l'espironolactona (SPI), un antagonista del receptor mineralcorticoide, s'administra per via oral dissolt en una solució del 25% de propilenglicol a la dosi de 10 mg/Kg/dia. Els tres tractaments es realitzen durant 3 dies, conjuntament amb la dieta LS.

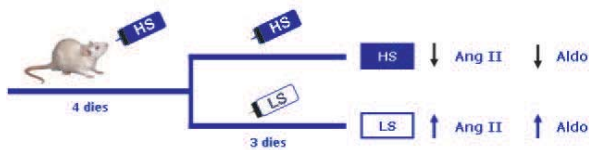


Figura 1-M. Esquema del model experimental d'activació del RAAS on es mostren la dieta i el seu temps d'administració, els grups experimentals i el seu perfil hormonal.



Figura 2-M. Esquema del model experimental amb inhibidors del RAAS on es mostren la dieta i el seu temps d'administració, el tractament inhibidor, els grups experimentals i el seu perfil hormonal.

► Model d'administració d'angiotensina II i d'aldosterona

Per separar les accions de l'angiotensina II i l'aldosterona s'ha posat un punt un model per controlar la concentració plasmàtica de cada una d'aquestes hormones. Per eliminar la síntesi d'aldosterona endògena, es realitza una operació d'adrenalectomia (ADX) i es creen grups experimentals amb un perfil hormonal diferent administrant aldosterona o angiotensina II mitjançant bombes osmòtiques d'alliberació controlada. L'aldosterona (Sigma) s'ha dissolt en propilenglicol i s'ha administrat a la dosi de 450 µg/Kg/dia. L'angiotensina II (Sigma) s'ha dissolt en sèrum fisiològic a la dosi de 288 µg/Kg/dia. Els grups control s'han administrat amb sèrum fisiològic. Després de 4 dies de dieta HS, durant els quals els animals es recuperen de l'operació, la meitat dels animals per a cada un dels tractaments hormonals passen a la dieta LS. En total doncs, l'administració hormonal es realitza durant 7 dies.

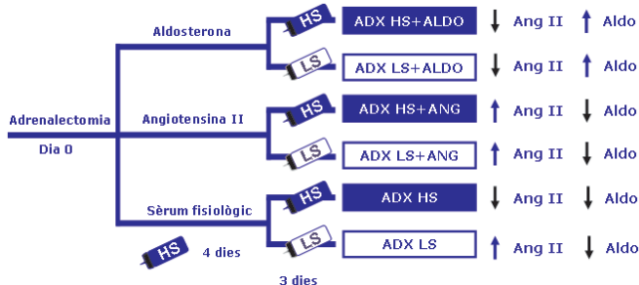


Figura 3-M. Esquema del model experimental per separar les accions de l'angiotensina II i l'aldosterona on es mostren la dieta i el seu temps d'administració, el tractament hormonal, els grups experimentals i el seu perfil hormonal.

► Model de deshidratació amb activació del RAAS

Amb les mateixes dietes i la mateixa pauta que el model d'activació del RAAS, s'ha estudiat l'efecte de la deshidratació mitjançant 24 h de restricció d'aigua. Així doncs, les últimes 24 h de dieta els animals no tenen accés a l'aigua de beguda. Per inhibir la síntesi d'aldosterona en el grup LS s'ha administrat captopril en l'aigua de beguda a la dosi de 65 mg/Kg/dia durant la dieta LS. La participació de cada un dels receptors de vasopressina s'ha estudiat mitjançant l'administració d'un antagonista específic dels receptors V1 (VR1), el Manning peptide (Sigma) a la dosi de 1 µg/Kg per via intraperitoneal, i l'administració d'un antagonista específic dels receptors V2 (VR2), el Tolvaptan (donació d'Otsuka Pharmaceutical Co., Japó), dissolt en hidroxipropilmetilcel·lulosa a la dosi de 5 mg/Kg per via oral. La pauta hormonal que s'indica en l'esquema fa referència a la concentració plasmàtica de vasopressina (AVP) i d'aldosterona.

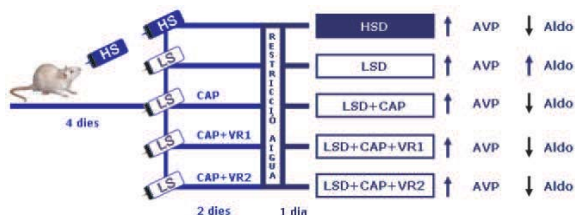


Figura 4-M. Esquema del model experimental de deshidratació on es mostren la dieta i el seu temps d'administració, el tractament farmacològic, els grups experimentals i el seu perfil hormonal.

► **Model d'administració de vasopressina**

Per augmentar la concentració plasmàtica de vasopressina en animals alimentats amb dietes LS i HS, s'ha administrat Arg-AVP (Sigma) mitjançant bombes osmòtiques d'alliberació controlada per via subcutània. La pauta d'administració de vasopressina, que s'ha dissolt en sèrum fisiològic, és de 1 ng/Kg/min durant 3 dies. En el grup HS s'ha estudiat l'efecte del receptor V2 mitjançant l'administració de Tolvaptan amb la mateixa pauta que la descrita en el punt anterior. En el grup LS, s'ha inhibït la síntesi d'aldosterona mitjançant l'administració de captopril, també amb la mateixa pauta que la descrita anteriorment.

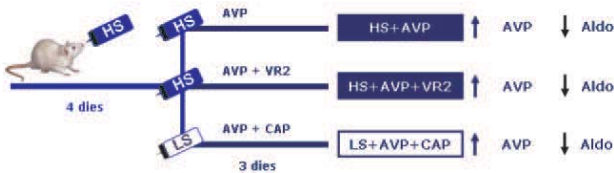


Figura 5-M. Esquema del model experimental d'augment de la concentració plasmàtica de vasopressina on es mostren la dieta i el seu temps d'administració, el tractament farmacològic, els grups experimentals i el seu perfil hormonal.

PROTOCOL EXPERIMENTAL

► **Adrenalectomia**

Totes les operacions d'adrenalectomia s'han realitzat de 8 a 9 hores del matí. Abans d'administrar l'anestèsia, s'ha administrat als animals metamizol magnèsic (Nolotil® ampolles, Boehringer Ingelheim, Espanya) com a analgèsic per via subcutània a la dosi de 5 mg/kg. L'anestèsia s'ha realitzat amb gas isofluorà 4% per via respiratòria, emprant un equip d'anestèsia per inhalació (Hallowell, Pittsfield, EUA), en el servei d'estabulari.

Per realitzar l'operació s'afaita el pèl del dors de l'animal i es desinfecta la pell amb solució de iode (Betadine®, Viatrix Pharmaceuticals, Espanya). Amb el material quirúrgic degudament esterilitzat amb iode i alcohol, es realitza un sol tall dorsal longitudinal mig. Es desplaça la pell lateralment i, a cada cantó, es realitza el mínim tall possible per tal de localitzar les glàndules adrenals i extreure-les. Es cusen els dos talls i s'espolsa sobre la capa muscular pols de

sulfanilàmida (Azol® polvo), per prevenir infeccions locals. Es cus la pell amb grapes quirúrgiques i es desinfecta la zona amb iode. Així doncs, mitjançant aquesta operació s'elimina el principal lloc de síntesi d'aldosterona a l'organisme. Per comprovar l'eficàcia de l'operació es determina la concentració plasmàtica d'aldosterona de tots els animals mitjançant radioimmunoassaig.

L'extracció de les glàndules adrenals implica, a més, l'eliminació de la síntesi de glucocorticoids. Per aquest motiu, a tots els animals adrenalectomitzats se'ls ha administrat una dosi mínima de dexametasona (Sigma), 12 µg/Kg/dia amb les bombes osmòtiques, per no afectar el creixement dels animals, la taxa de filtració glomerular (GFR) i la concentració d'insulina i glucosa, com s'ha descrit anteriorment (Stanton et al., 1985).

► **Administració hormonal**

Tots els tractaments hormonals s'han realitzat mitjançant bombes d'alliberació controlada. Les bombes osmòtiques utilitzades (ALZET® Mini-osmotic Pumps model 2002) tenen una pauta d'alliberació de 0,5 µL/h durant 14 dies (12 µL/dia). Les bombes s'omplen en condicions estèrils sota campana de flux amb 200 µL de la solució hormonal. El control de volum es realitza pesant les bombes abans i després d'omplir-les. Aquestes bombes es poden implantar subcutàniament en rata i ratolí o per via intraperitoneal en rata.



Figura 6-M. Mini-osmotic Pumps model 2002 ALZET®.

► **Obtenció i tractament de les mostres**

Tots els animals es sacrifiquen entre les 9 i les 11 hores del matí per tal d'evitar possibles influències de l'hora del sacrifici en les variables fisiològiques. Els animals s'anestésien amb solució de Ketamina (90 mg/kg, Imalgène 1000®, Merial Laboratories, S.A., França) i Xilacina (10 mg/kg, Rompún®, Bayer, Alemanya) per via intraperitoneal.

La mort dels animals es produeix a causa de la hipovolèmia deguda a l'extracció de sang per punció

cardíaca. Els tubs on es recull la sang contenen EDTA a la concentració de 1.5 mg/mL per evitar-ne la coagulació i inhibidors de proteases (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma), en concret de les serines, cisteïnes, aspàrtic i metaloproteases, per evitar la degradació de proteïnes. El procés es realitza en fred i amb la precaució de no hemolitzar la sang. La sang es centrifuga a 4000 rpm durant 20 minuts a 4°C (Megafuge 2.0R, Heraeus). El plasma es reparteix en alíquotes que es congelen a -80°C fins que es realitzen la determinació d'hormones i d'ions.

A continuació, es realitza una laparotomia i s'extreu el còlon distal. Seguidament es renta el teixit amb PBS i s'obre longitudinalment. Pels estudis d'electrofisiologia s'utilitza el teixit sencer. Per la resta d'estudis, l'estudi de l'acumulació de Na⁺ pericriptal, la permeabilitat al dextrà i l'estudi immunohistoquímic, es realitza un raspat de la mucosa per tal de separar-ne la capa serosal. Totes les manipulacions del teixit es realitzen en fred, en un bany de gel.

DETERMINACIONS EN PLASMA I ORINA

▶ **Determinació de l'osmolalitat**

L'osmolalitat de l'orina i del plasma es determina mitjançant un osmòmetre (Osmomat 030, Gonotec). La determinació de l'osmolalitat total en solucions aquoses es realitza en relació amb el punt de congelació de l'aigua. L'aigua pura té un punt de congelació de 0°C i una solució amb una concentració de sal de 1 Osmol/kg té un punt de congelació de -1,856°C.

El principi de l'osmòmetre es basa en la congelació de la mostra, mentre que al mateix temps es mesura electrònicament la seva temperatura. Quan la mostra arriba a una temperatura per sota del punt de congelació de l'aigua, la cristallització de la solució s'inicia automàticament. Aquesta temperatura és la que utilitza l'aparell per realitzar els càlculs. La disminució del punt crioscòpic es produeix en funció de la concentració de soluts osmòticament actius de la solució, donant lloc a la determinació de l'osmolalitat.

S'ha determinat l'osmolalitat tant del plasma com de l'orina. Per fer-ho es necessiten 50 µL de mostra. Cada determinació s'ha fet per duplicat per a cada animal, i amb el promig per a cada rata s'ha calculat la mitjana del grup experimental.

▶ **Determinació d'ions**

La concentració de Na⁺ i de K⁺ en orina s'ha determinat per espectroscòpia d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament (ICP-OES) als Serveis Científic-Tècnics (SCT) de la Universitat de Barcelona. L'aparell utilitzat és un espectròmetre d'ICP-OES Thermo Jarrell Ash model ICAP 61E (Genesis Laboratories Systems Inc., Colorado, EUA). Aquesta tècnica es basa en la vaporització, dissociació i ionització dels diferents elements químics de la mostra en l'interior d'un plasma. Dins el plasma els àtoms neutres i ions s'exciten i durant el procés de desexcitació emeten radiació electromagnètica en la zona de l'ultraviolat visible. Aquestes radiacions, característiques de cada element, es separen en funció de la seva longitud d'ona i finalment se'n mesura la intensitat.

Pel que fa als ions plasmàtics, la concentració de Na⁺, K⁺ i Cl⁻ s'ha determinat per potenciometria directa mitjançant elèctrodes selectius a ions (Hitachi 717, Beckman Coulter Corporation, EUA) a l'Hospital General de Granollers. Els mètodes potenciomètrics es basen en la mesura de la diferència de potencial entre dos elèctrodes. Aquesta diferència de potencial és la que es relaciona proporcionalment amb la concentració de l'ió.

▶ **Determinació hormonal**

La determinació d'aldosterona, angiotensina II i vasopressina s'ha determinat per radioimmunoassaig, tant en mostres d'orina com en mostres de plasma. Els radioimmunoassaigs són mètodes de valoració quantitativa de substàncies presents en mostres biològiques. Aquesta tècnica es basa en afegir a la mostra problema una certa quantitat de la mateixa substància que es vol valorar però marcada amb un element radioactiu. L'isòtop I¹²⁵ emet fotons gamma i és un dels traçadors

que s'utilitza per marcar substàncies radioactivament. El conjunt es fa reaccionar amb un anticòs específic, al qual s'uniran tant la substància present inicialment a la mostra (no radioactiva) com la radioactiva. El complex antigen-anticòs es pot separar mitjançant diferents procediments com, per exemple, precipitació, filtració, adsorció, cromatografia o electroforesis i es mesura la radioactivitat de la mostra final. La determinació exacta de la concentració de substància a la mostra es realitza per interpolació en la recta patró obtinguda amb solucions de concentració coneguda.

Els RIA tenen una gran sensibilitat, arribant a detectar quantitats de l'ordre del picogram. A més, tenen una gran especificitat, podent determinar una substància amb el mínim d'interferències. Actualment es valoren per aquest mètode un gran nombre de substàncies, principalment hormones (tiroides, hipofisàries, pancreàtiques, suprarenals, sexuals), enzims, immunoglobulines i fàrmacs.

►RIA aldosterona

La quantificació de la concentració d'aldosterona en plasma s'ha realitzat mitjançant un radioimmunoassaig competitiu (Aldosterone Radioimmunoassay (RIA) kit, Immunotech). El principi de l'assaig es basa en incubar les mostres i els estàndards d'aldosterona en tubs recoberts d'anticòs específic contra aldosterona amb un traçador d'aldosterona marcat amb I^{125} . El traçador consisteix en aldosterona marcada amb I^{125} en presentació líquida amb un suport de proteïnes i un colorant.

Les concentracions d'estàndards d'aldosterona que s'han utilitzat són les següents (pg/mL): 12, 40, 160, 600 i 2000. El volum de mostra necessari és de 50 μ L. Després de 3 hores d'incubació entre 18-25°C i en moviment, s'aspira el contingut dels tubs. L'aldosterona present a les mostres s'uneix a l'anticòs que recobreix el tub i queda marcada amb I^{125} , que emet la radioactivitat que a continuació es determina en un comptador gamma. La sensibilitat del kit és de 6 pg/mL. Totes les mostres s'han processat per duplicat. El comptatge s'ha realitzat en un comptador de

centelleig sòlid (1282 Compugamma CS Universal Gamma Counter, Wallac) del Servei de Radioisòtops de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Les mostres s'han comptat durant 3 minuts obtenint-se el registre de l'activitat, expressada en cpm, de tots els tubs.

Els càlculs per obtenir la concentració d'aldosterona consisteixen en calcular les cpm promig dels duplicats i restar-hi les cpm promig del blanc per tal d'obtenir les cpm netes de cada tub. Seguidament, es calcula el percentatge d'unió (B/T) dividint les cpm netes de cada tub per les cpm netes dels tubs de radioactivitat total (T), els quals tan sols contenen el traçador i, per tant, es consideren com el 100% de radioactivitat. La fórmula que s'obté, per tant, és la següent:

$$B/T (\%) = \text{cpm netes} / \text{cpm T netes} \times 100$$

En la recta patró es representen els percentatges d'unió en l'eix vertical i les concentracions d'aldosterona dels estàndards en l'eix horitzontal, podent-se interpolar els valors obtinguts de percentatge d'unió de les diferents mostres obtenint finalment la concentració d'aldosterona.

►RIA angiotensina II i vasopressina

Per a la determinació de la concentració d'angiotensina II en plasma, s'ha utilitzat un radioimmunoassaig de doble anticòs (RIA I^{125} Ang II, Böhmann Laboratories). El principi de l'assaig es basa en una modificació del mètode descrit per Emanuel i col·laboradors (1973).

Les mostres de plasma extret amb EDTA i els estàndards s'incuben durant 16 hores amb un anticòs anti-Ang II. S'hi afegeix I^{125} -Ang II, que competeix amb l'Ang II present en les mostres pels mateixos llocs d'unió de l'anticòs en un segon pas d'incubació de 6 hores. A continuació s'afegeix un segon anticòs a la mescla, anticòs contra conill unit a fase sòlida, i s'incuba durant 30 minuts. La fracció unida a l'anticòs sedimenta mitjançant centrifugació i es compta la radioactivitat que emet mitjançant un comptador gamma. La sensibilitat del mètode és de 0,7 pg/mL. Els estàndards d'angiotensina II utilitzats tenen les concentracions següents (pg/mL): 2, 5, 20, 100 i 500. El volum de mostra necessari és de 500 μ L. Totes les mostres s'han processat per duplicat.

El comptatge s'ha realitzat en un comptador de centelleig sòlid (1282, Compugamma CS Universal Gamma Counter, Wallac) del Servei de Radioisòtops de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Les mostres s'han comptat durant 3 minuts.

Els càlculs per obtenir la concentració d'angiotensina consisteixen en calcular les cpm promig dels duplicats i restar-hi les cpm promig del blanc per tal d'obtenir les cpm netes de cada tub. Seguidament, es calcula el percentatge d'unió (B/B_0) dividint les cpm netes de cada tub per les cpm netes dels tubs de màxima unió (MB), els quals es consideren com el 100% d'unió:

$$B/B_0 = \text{cpm netes} / \text{cpm MB netes} \times 100$$

En la recta patró es representen els percentatges d'unió en l'eix vertical i les concentracions d'angiotensina dels estàndards en l'eix horitzontal, podent-se interpol·lar els valors obtinguts de percentatge d'unió de les diferents mostres obtenint finalment la concentració d'angiotensina.

ELECTROFISIOLOGIA

La determinació de les propietats elèctriques intestinals es pot realitzar mitjançant les anomenades cambres d'Ussing, en honor a la gran contribució que el doctor Ussing va aportar en el camp de l'electrofisiologia (Ussing i Zerahn, 1951). Les cambres d'Ussing són un sistema de cambres de metacrilat que permeten separar el cantó mucosal i el cantó serosal de la paret intestinal. D'aquesta manera, permeten incubar fragments intestinals amb diferents solucions i tractaments a cada cantó intestinal. El teixit es manté en condicions fisiològiques mitjançant un bany de calor, que permet mantenir la temperatura a 37°C, i un circuit d'aire, que permet carbogenar el teixit. Dins els pous, i en contacte amb la solució, es connecten elèctrodes que s'encarreguen de fer les mesures elèctriques. Aquests elèctrodes normalment són de clorur de plata, dos dels quals mesuren el potencial i la resta mesuren la intensitat de corrent. Els elèctrodes poden anar connectats a un sistema d'enregistrament i processament de les dades automàtic.

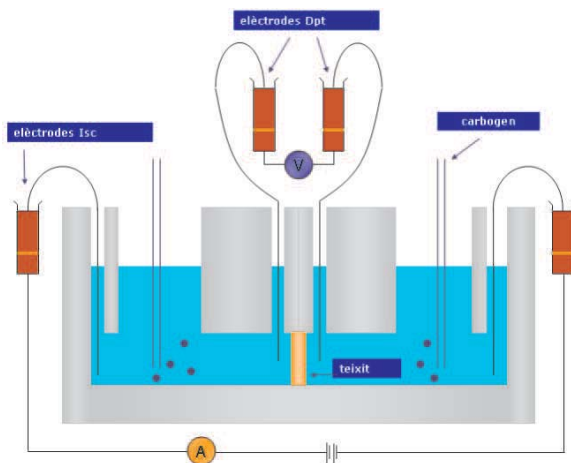


Figura 7-M. Esquema del funcionament de les cambres d'Ussing on es mostren els dos compartiments d'una cambra, on es col·loca el teixit, el sistema de carbogenació i els elèctrodes.

► Medis

Medi PBS pH 7,4 (mM): 154 NaCl, 4 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 16 Na_2HPO_4 en aigua desionitzada MilliQ (Millipore, Massachussets, EUA). El pH es valora amb un pH-metre Micro-pH 2001 (Crisson Instruments, S.A., Espanya).

Medi Krebs pH 7,4 (mM): 115 NaCl, 25 NaHCO_3 , 2 KH_2PO_4 , 8 KCl, 1,2 CaCl_2 , 1,1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en aigua desionitzada MilliQ. El pH es valora després de carbogenar la solució.

► Procediment

Un cop extret el còlon distal i s'ha rentat en PBS, es munta en les cambres d'Ussing (Dipl.-Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanya), tenint en compte la posició del cantó mucosal i del cantó serosal. Entre l'extracció i el muntatge no passen més de 5 minuts. Sempre s'han escollit els últims 5 cm de còlon distal. Un cop muntats els teixits, els dos cantons de cada cambra s'omplen al mateix temps, per evitar diferències osmòtiques i danys al teixit, amb 4 mL de solució tamponada de Krebs, pH 7.4. Al cantó serosal s'afegeix una solució de glucosa 10 mM que es compensa osmòticament amb solució de mannitol 10 mM al cantó mucosal. Els teixits es mantenen a 37°C i es carbogenen (95% O_2 -5% CO_2) contínuament. Les cambres estan connectades a un sistema d'enregistrament (Clamp v.2.14, Aachen, Alemanya) que mesura les següents variables elèctriques: la diferència de potencial (PD, mV), el corrent de curt-circuit (I_{sc} , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) i la

resistència transmural (TER, $\text{ohm}\cdot\text{cm}^2$). Després d'uns 30 minuts d'estabilització, quan l'enregistrament és prou estable, es comencen a tenir en compte les mesures i es pot estudiar l'acció de diferents tractaments sobre les 3 variables elèctriques. Per inhibir els canals ENaC i, per tant, inhibir el transport electrogènic de sodi, s'afegeix solució d'amilorida a la concentració de 0,1 mM al cantó mucosal. En la següent figura es pot apreciar un exemple d'enregistrament de l'Isc i l'efecte de l'amilorida.

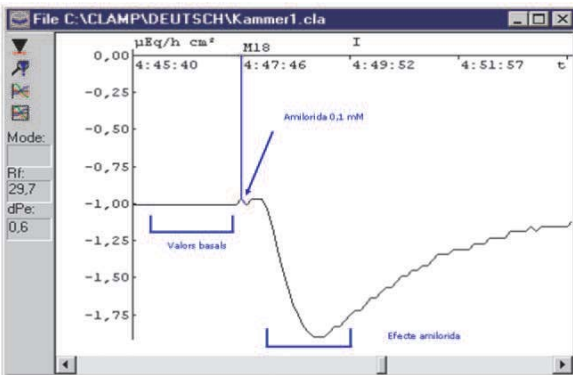


Figura 8-M. Mesura de la Intensitat pel programa Clamp connectat a les cambres Ussing.

L'anàlisi dels resultats s'ha realitzat comparant els valors basals abans d'afegir el tractament amb els valors de després del tractament. Les mesures basals corresponen al promig de les mesures dels 5 últims minuts abans de l'inhibidor. Un cop es fa el promig dels 5 minuts següents d'afegir l'amilorida es calcula l'increment d'Isc, de PD i de TER respecte les mesures basals, per comparar l'efecte de l'inhibidor en els diferents grups experimentals.

DETERMINACIÓ DE Na^+ A LA ZONA PERICRIPTAL

Aquesta tècnica s'utilitza per mesurar l'acumulació de sodi que es concentra en l'espai pericriptal mitjançant microscòpia confocal. El fonament es basa en utilitzar un cromòfor sensible al Na^+ de poca afinitat (Sodium Red) i un cromòfor insensible al Na^+ (BODIPY-fl) units a unes bases de poliestirè (*beads*) (Jayaraman *et al.*, 2001). Quan hi ha sodi al medi, aquest ió s'uneix al Sodium Red i s'obté fluorescència. La ratio entre el Sodium red i el BODIPY dóna lloc a un augment en la fluorescència a mesura que augmenta la concentració de sodi. La tècnica utilitzada és una modificació de la descrita per Thiagarajah i col·laboradors (2001b).

► Medis

Medi Earl pH 7,4 (mM): 115 NaCl, 6,2 KCl, 2,5 CaCl₂, 2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄·7H₂O, 24,8 NaHCO₃, 0,5 -hidroxibutirat sòdic, 2,5 L-glutamina, 5 D-glucosa en aigua desionitzada MilliQ. El pH es valora després de carbogenar la solució.

► Preparació del complex cromòfors-*beads*

S'utilitzen *beads* de 50 nm de diàmetre en suspensió a l'1% en una solució al 2% d'aigua/metanol. En un primer pas, a la suspensió s'hi afegeix una solució 5 mM de BODIPY-fl (Sigma) en DMSO i es centrifuguen 10 minuts a 4°C. Seguidament, en el pellet s'hi afegeix una solució 1 mM de Sodium red (Molecular Probes, Eugene, OR) dissolt en etanol i es realitza una segona centrifugada durant 30 minuts a 4°C. La relació final en els *beads* entre el BODIPY i el Sodium red ha de ser de 1:5. Els cromòfors queden immobilitzats a la base de poliestirè durant més de dos mesos si es mantenen a 4°C i en foscor.

► Procediment

Un cop s'ha rentat el còlon distal en PBS i s'ha realitzat el raspallat, es retalla un fragment de teixit, d'uns 0,5 cm² de superfície, i es col·loca amb la superfície mucosal cap avall en una placa d'incubació (Mat Tek Corporation, Ashland, EUA) banyat amb medi Earl saturat d'O₂. Tot seguit s'hi afegeixen 200 μL de la suspensió preparada de cromòfors-*beads* i es preincuba durant 30 min a 37°C i amb ambient humit en el microscopi, per tal que el colorant penetri a l'espai pericriptal. Als 30 minuts es prenen imatges mitjançant microscòpia confocal. S'obtenen imatges

per a cada 5 µm dels 0 als 40 µm de profunditat, per a cada un dels cromòfors, és a dir, de la mateixa profunditat s'obtenen parelles d'imatges, una per al Sòdium red (fluorescència vermella) i una pel BODIPY-fl (fluorescència verda).

Per obtenir una recta patró es realitzen mesures idèntiques amb 4 solucions de concentracions conegudes de NaCl (mM): 70, 140, 250 i 500. Es col·loquen 50 µL de solució de NaCl a la placa d'incubació i 10 µL de la suspensió de cromòfors-*beads* i s'obtenen imatges de fluorescència pel Sòdium red i pel BODIPY-fl.

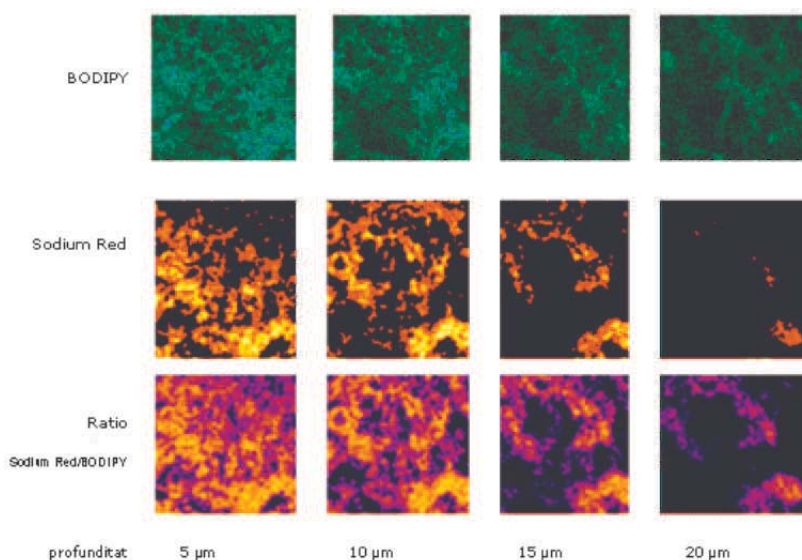


Figura 9-M. Exemple d'imatges obtingudes per a cada cromòfor a diferents profunditats i la imatge que s'obté de la ratio entre Sòdium Red i Bodipy.

PERMEABILITAT AL DEXTRÀ

La permeabilitat de la paret de la cripta es determina mesurant el flux d'un traçador d'elevat pes molecular. En aquest cas hem utilitzat dextrà de pes molecular 10 kDa conjugat a isotiocianat de fluoresceïna (FITC) segons la tècnica descrita per Naftalin i Pedley (1999).

▶ **Medis**

Medi Earl pH 7,4 (mM): 115 NaCl, 6,2 KCl, 2,5 CaCl₂, 2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄·7H₂O, 24,8 NaHCO₃, 0,5 -hidroxibutirat sòdic, 2,5 L-glutamina, 5 D-glucosa en aigua desionitzada MilliQ. El pH es valora després de carbogenar la solució.

▶ **Procediment**

El tractament del teixit és idèntic al descrit en la determinació de Na⁺ a la zona pericriptal. Un cop es té el teixit en una placa d'incubació banyat en medi Earl s'hi afegeixen 10 µl d'una

solució 20 µM de FITC-dextrà (Sigma) en aigua desionitzada i es deixa a 35°C en atmosfera de carbogen durant uns minuts per tal de mantenir el teixit en condicions fisiològiques i atemperarlo.

En afegir el dextrà al teixit, aquest entra a la llum de les criptes i passa progressivament per la via paracel·lular cap a l'espai pericriptal a favor del seu gradient de concentració. El procediment es visualitza en el microscopi confocal al llarg del temps. Les mesures de fluorescència es realitzen cada 5 minuts durant un període màxim de 20 minuts al llarg de tota la profunditat de la cripta. Per a cada teixit s'obtenen mesures de 5 µm al llarg de la cripta. Transcorreguts els 20 minuts s'obté el recull d'imatges per a cada profunditat i per cada temps. La següent figura mostra un exemple de la galeria d'imatges que s'obté per a cada teixit. Es pot observar com hi ha 5 quadrats amb 7 imatges cadascun d'ells. Cada quadrat correspon a les imatges obtingudes per a cada

temps, per tant, tenim els quadrats dels 0, 5, 10, 15 i 20 minuts. Les 7 imatges de cada temps corresponen a diferents profunditats del teixit. Per tant, per a una mateixa profunditat obtenim les imatges de dextrà al llarg del temps, podent observar en una mateixa profunditat com el dextrà va penetrant a la cripta i passa a l'espai pericriptal.

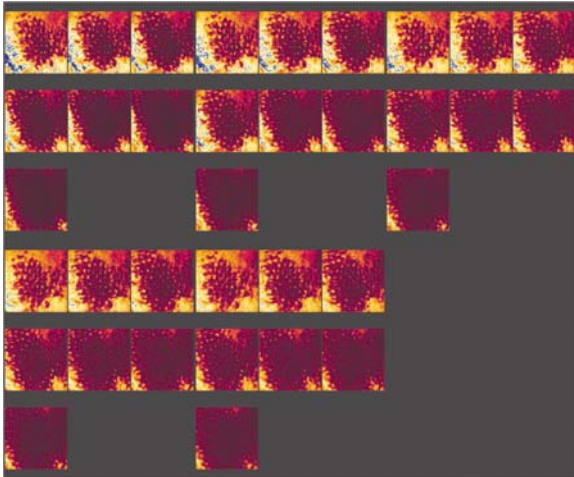


Figura 10-M. Exemple de la galeria d'imatges que s'obté amb el microscopi confocal per a cada teixit. Observem 5 quadrats, un per a cada temps (0, 5, 10, 15, 20 min), cadascun d'ells amb 7 imatges, corresponents a les diferents profunditats.

MMUNOHISTOQUÍMICA

Aquesta tècnica permet localitzar una determinada proteïna en una mostra de teixit mitjançant l'especificitat de la unió antígen-anticòs. El marcatge s'ha realitzat mitjançant la incubació de la mostra amb un anticòs específic, anomenat primari, per a la proteïna que es vol determinar. Aquest anticòs primari és reconegut per un segon anticòs, anomenat secundari, conjugat a un fluorocrom. Els fluorocroms presenten la propietat que poden ser excitats a una determinada longitud d'ona i emeten fluorescència a una longitud d'ona més llarga, que pot ser detectada per un microscopi de fluorescència.

► Medis

Solució de blocatge: PBS suplementat amb 1% d'albumina sèrica bovina (BSA, Sigma) i glicina.

Solució de permeabilització: 0,2% Tritó (Sigma) en solució de blocatge.

Solució d'anticossos primaris:

- **ENaC:** dilució 1/100 de l'anticòs sintetitzat en conill contra la subunitat γ -ENaC de rata (Alpha Diagnostics Intl., San Antonio, TX, EUA).
- **SMA:** dilució 1/100 de l'anticòs monoclonal contra α -actina de múscul llis clon IA4 (Sigma, Sant Louis, Missouri, EUA).
- **Col·lagen IV:** dilució 1/100 de l'anticòs sintetitzat en conill contra col·lagen tipus IV (Chemicon, Califòrnia, EUA).
- **ACE:** dilució 1/100 de l'anticòs sintetitzat en ratolí contra l'enzim convertidor d'angiotensina (Chemicon, Califòrnia, EUA).
- **OB-caderina:** dilució 1/100 de l'anticòs contra OB-caderina (Santa Cruz, Califòrnia, EUA).
- **E-caderina:** dilució 1/100 de l'anticòs contra E-caderina (Research diagnostics, Anglaterra).
- **ATr1:** dilució 1/100 de l'anticòs monoclonal sintetitzat en conill contra el receptor de l'Ang II de tipus 1 (Chemicon, Califòrnia, EUA).
- **Receptor TGF- β :** dilució 1/100 de l'anticòs sintetitzat en conill contra el receptor 1 del factor de creixement tumoral β (Santa Cruz, Califòrnia, EUA).
- **Claudina 4:** dilució 1/100 de l'anticòs contra claudina 4 (donació de la Dr. Maria Balda).
- **AQP-2:** dilució 1/50 de l'anticòs sintetitzat en conill contra el canal aquaporina-2 (Sigma, Sant Louis, Missouri, EUA).

Solució d'anticossos secundaris:

- **Alexa 488 NeutrAvidin:** dilució 1/100 de l'anticòs contra conill Alex-488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA).
- **Texas Red:** dilució 1/100 de l'anticòs contra IgG de ratolí (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA).

Tots els anticossos, tant els primaris com els secundaris, s'han diluït en solució de blocatge.

► Fixació de les mostres

Els teixits raspats es retallen en fragments d'uns 0,5 cm² de superfície i es fixen amb paraformaldehid (Sigma) al 4% durant 24 hores a 4°C. A les 24 hores els teixits es renten 3 cops amb PBS i es mantenen en aquest medi a 4°C fins a realitzar la immunohistoquímica.

► **Procediment del marcatge**

Els teixits fixats s'incuben en la solució de permeabilització durant 30 minuts a temperatura ambient. Aquesta solució bloqueja els possibles llocs d'unió inespecífica a l'anticòs primari i alhora permeabilitza la mostra. A continuació, es renten 3 vegades amb PBS a temperatura ambient. A continuació les mostres s'incuben amb la solució d'anticossos primaris durant 90 minuts a temperatura ambient. El control negatiu s'ha fet incubant dos fragments amb solució de blocatge sense anticòs. Es torna a realitzar el pas de rentat anterior i s'incuben els teixits amb l'anticòs secundari corresponent durant 1 hora a temperatura ambient. Durant aquesta incubació les mostres han estat protegides de la llum. Després d'un pas final de rentat els teixits es munten en un medi que les protegeix de la decaiguda de la fluorescència (Mowiol 488, Calbiochem, Alemanya). Les mostres es deixen durant 2 h a temperatura ambient per tal que el Mowiol polimeritzi i es guarden a 4°C fins al moment d'observar-les al microscopi confocal. Les dilucions d'anticòs utilitzades són les que s'han considerat més òptimes després de fer les corresponents proves prèvies de dilució.

MICROSCÒPIA CONFOCAL

Un fluorocrom absorbeix llum a una longitud d'ona i emet l'energia absorbida en forma de llum fluorescent a una longitud d'ona superior. La microscòpia de fluorescència utilitza aquest fenomen per poder observar i obtenir imatges d'una mostra marcada amb fluorescència. Els fluorocroms poden ser intrínsecs a la mateixa mostra (autofluorescència natural) o poden ser fluorocroms que s'utilitzen per marcar estructures i/o processos d'interès dins de la mostra. Utilitzant tècniques de marcatges fluorescents, es poden combinar fluorocroms amb diferents longituds d'ona d'excitació i emissió i obtenir imatges de marcatges múltiples.

La microscòpia confocal, a diferència de la

microscòpia de fluorescència convencional, permet eliminar el senyal fluorescent provinent d'una mostra semitranslúcida i que està fora de focus, amb la qual cosa s'aconsegueixen, de manera no destructiva, seccions òptiques a diferents plans de la mostra. Aquestes seccions poden ser utilitzades per fer-ne una anàlisi tridimensional o per a l'observació d'una part interna de la mostra. Per tant, és imprescindible per a treballar amb teixit sencer i permet obtenir imatges d'un sol pla focal.

La microscòpia confocal produeix un augment significatiu de la resolució òptica i del contrast de les imatges, avantatges que la converteixen en una eina imprescindible en l'obtenció d'imatges d'alta resolució i en estudis de col·localització. Les seccions òptiques que se n'obtenen contenen la informació per a poder fer posteriorment una anàlisi tridimensional: quantificació volumètrica, distribució de la fluorescència, anàlisi de la col·localització entre d'altres.

► **Obtenció de les imatges**

L'equip que s'ha utilitzat és el Microscopi Confocal Leica SPII, dels SCT de la Universitat de Barcelona. Es tracta d'un microscopi invertit automatitzat DM IRBE. Consta d'un sistema amb detecció de fluorescència selectiva des de 400 fins a 800 nm, amb quatre canals de fluorescència més un canal per contrast de fases. El sistema és automatitzat en totes les direccions, permet l'adquisició en temps real i estudis en 4D. També disposa de cambra climàtica amb control de temperatura i CO₂ i sistema de microinjecció aplicat a la microscòpia.



Figura 11-M. Microscopi confocal Leica SPII.

Totes les imatges obtingudes s'han agafat sempre

amb les mateixes condicions òptiques, *gain* i tamany de secció, per tal de poder-les comparar entre elles. Les imatges s'han captat a 400 Hz de velocitat (a més velocitat, menys soroll de fons), a una resolució de 1024 per 1024 bytes i són imatges de 8 bits, és a dir, tenen 256 nivells de grisos.

► **Anàlisi de les imatges**

L'anàlisi de les imatges que s'han obtingut per microscòpia confocal es realitza mitjançant el programa de quantificació d'imatges de domini públic Image J (Image J 1.32, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). En els següents apartats es detalla l'anàlisi específica per a cadascuna de les tècniques.

►► **Estimació de la concentració de Na⁺ pericriptal**

El programa Image J permet obrir per separat les imatges de fluorescència vermella (Sodium red) de les imatges de fluorescència verda (BODIPY) obtingudes per cada teixit. El parell d'imatges obtingudes, que inclouen imatges de les diferents profunditats, es promitgen obtenint una nova imatge amb la integració de les dues fluorescències. A continuació es realitza una projecció Z, que consisteix en agrupar en una mateixa imatge totes les profunditats. A partir d'aquesta imatge es selecciona una cripta i el seu espai pericriptal i el programa dóna un llistat de valors que representen la intensitat obtinguda per cada nombre de píxels. Entre ells, la intensitat que té el major nombre de píxels és el valor modal. A partir d'aquí es realitza una normalització dels píxels que consisteix en dividir el nombre de píxels de cada una de les intensitats pel valor modal. La suma dels píxels normalitzats dóna un valor a cada cripta. Per a cada teixit es quantifiquen entre 3 i 4 criptes i se'n calcula la mitjana.

Tots aquests passos es realitzen també a partir de les imatges de les solucions de concentració coneguda de NaCl. La suma de píxels normalitzats per a cada concentració de sodi permet establir una recta patró i extrapolar els valors de cadascuna de les mostres desconegudes per establir la concentració de Na⁺ a la zona pericriptal de cada una d'elles. En la figura 8-M es mostra

un exemple de representació de la relació entre el nombre de píxels normalitzats i la intensitat per a cada una de les solucions patró i una recta de calibració on es relaciona la suma de píxels normalitzats i la concentració de sodi en la zona pericriptal.

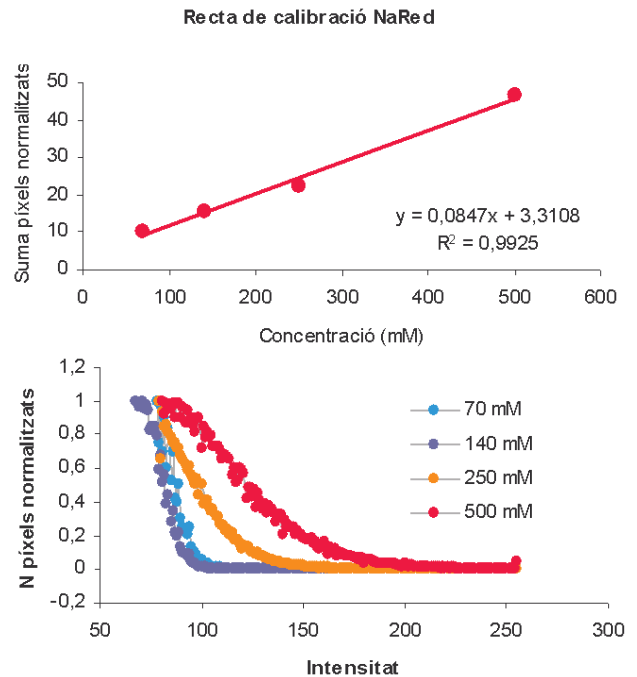


Figura 12-M. Representació de la relació entre el nombre de píxels normalitzats i la intensitat per a cada una de les solucions patró. Exemple d'una recta de calibració del Sodium red on a partir del valor de la suma de píxels normalitzats es pot extrapolar la concentració de sodi en la zona pericriptal per a cada grup experimental.

► **Estimació de la fluorescència de FITC-dextrà**

A partir dels canvis de concentració del dextrà pericriptal es pot determinar la permeabilitat de l'epiteli al traçador. El programa d'anàlisi d'imatges permet diferenciar entre la zona de la llum de la cripta i l'espai pericriptal. Per a la quantificació es calcula la relació entre la mitjana de la fluorescència de la llum de la cripta i la de l'espai pericriptal per a cada temps. Per cada teixit es quantifiquen 4 o 5 criptes i s'escull sempre un mateix rang de profunditat. La fórmula que s'aplica és la següent:

$$t_x = \text{Ln} (1 - (B / A))$$

on:

t_x = relació obtinguda a cada temps x (on x pot ser 0, 5, 10, 15 o 20 min)

B = quantitat fluorescència a l'espai pericriptal

A = quantitat fluorescència a la llum de la cripta

Els valors obtinguts als quatre temps estudiats s'ajusten a una recta. El pendent de la recta s'utilitza com a índex de permeabilitat per comparar entre les diferents condicions. Així, en el cas de teixits molt permeables el pendent és molt pronunciat i, a l'inrevés, en teixits poc permeables s'obté un pendent poc pronunciat.

$$x = a + b \cdot t_x$$

on:

x = temps

b = pendent de la recta

a = ordenada en l'origen

$$\text{Índex de permeabilitat} = \text{pendent de la recta} \quad (\text{min}^{-1})$$

La figura 10 mostra un exemple representatiu de les imatges que s'obtenen en el cas de condicions HS i LS a tres temps (5, 10 i 15 minuts). Al llarg del temps s'aprecia el pas del FITC-dextrà (en color vermell) des de la llum de la cripta a l'espai pericriptal.

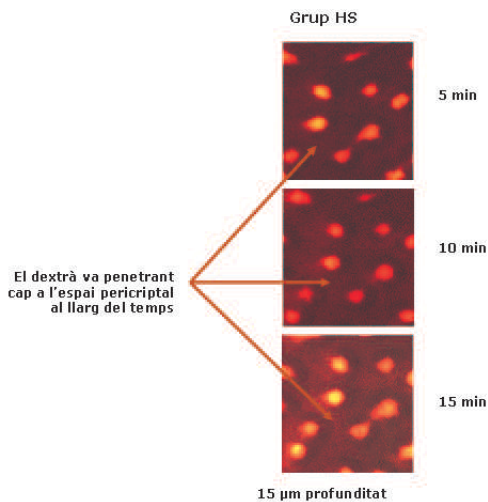


Figura 13-M. Imatges representatives de permeabilitat al dextrà en criptes de còlon obtingudes al llarg del temps en la condició HS.

► Estimació de la fluorescència en els marcatges

El programa d'anàlisi permet quantificar la intensitat de fluorescència per àrea segmentada de cada anticòs, és a dir, quantificar únicament les zones on hi ha anticòs, desestimant les zones sense fluorescència que ens podrien subestimar la quantificació. Tenint en compte els controls negatius, s'estableix un llindar d'intensitat adequat de bins/píxel, considerant tot el que

queda per sota d'aquest llindar com a fons. Per a cada condició es quantifiquen diversos teixits, en els quals s'estableix sempre el mateix rang de profunditat, i es calcula la mitjana per a cada animal. Seguidament es calculen les mitjanes per grup experimental.

En les següents figura es mostra una imatge representativa de tinció de -SMA en criptes de còlon de rata on s'indica la situació de les criptes i de l'espai pericriptal. El marcatge de l'anticòs es representa en color groc-vermellós. Al costat es mostra la imatge obtinguda aplicant el llindar d'intensitat, on tan sols es mostren les zones amb marcatge.

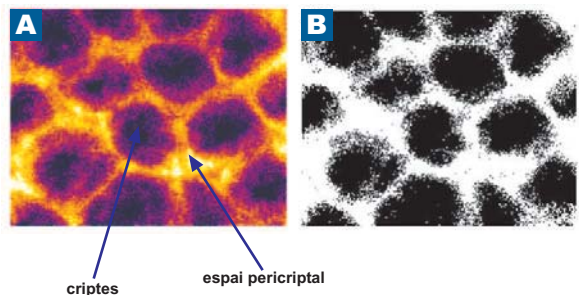


Figura 14-M. Tinció de -SMA en cripta de còlon de rata. A) Imatge real d'un animal del grup LS. B) Imatge resultant de l'aplicació del llindar d'intensitat.

A NÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística dels resultats s'ha realitzat mitjançant l'anàlisi de la variància (ANOVA) utilitzant el programa SPSS (Chicago, Illinois, EUA). Les comparacions múltiples entre els grups s'han realitzat mitjançant la prova post hoc de Scheffe en el cas de variàncies iguals o la prova post hoc T2 de Tamhane, en el cas de no assumir variàncies iguals. En tots els casos s'ha acceptat com a significatiu un nivell de probabilitat inferior o igual al 5%. En cada un dels articles es detallen les comparacions entre els diferents grups experimentals.