

Efecto del ácido deoxicólico sobre la regulación del transporte iónico intestinal en la rata

Deoxycholic acid effect on intestinal ionic transport regulation in the rat

Carlos Quintana Villar¹, Pedro Labarca Prado², Ana María Fresno Joannon³, Ricardo Cid Paz⁴, Felipe Cavagnaro Santa María⁵, Ernesto Guiraldes Camerati⁶, Juan Carlos Quintana Fresno⁷, Felipe Bezanilla Mena⁸, Alex Wolf Zabalaga⁹, Luigi Accatino Locatelli¹⁰

¹Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Gastroenterología.

²Centro de estudios científicos de Valdivia.

³Pontificia Universidad Católica de Chile, Laboratorio de Gastroenterología.

⁴Ricardo Cid Tecnologías (RCTEC).

⁵Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo, departamento de Pediatría.

⁶Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Pediatría.

⁷Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Radiología.

⁸Ex alumno de medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

⁹Alumno de medicina de la Universidad Finis Terrae.

¹⁰Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Gastroenterología.

Abstract

The intestine has a very important role in the homeostasis of the internal medium. Bile acids play a regulatory role in the digestion and absorption of nutrients. Among them, deoxycholic acid, when its luminal concentration increases due to bacterial overgrowth, modifies hydroelectrolytic transport, producing an increase in the volume of water and electrolytes in stools.

Key words: deoxycholic acid, sodium transport inhibition, diarrhea.

Resumen

El intestino tiene un papel muy importante en la homeostasis del medio interno. Los ácidos biliares cumplen una función reguladora en la digestión y absorción de nutrientes. Entre ellos el ácido deoxicólico, cuando aumenta su concentración luminal por sobrecrecimiento bacteriano, modifica el transporte hidroelectrolítico produciendo aumento del volumen de agua y electrolitos en las deposiciones.

Palabras claves: ácido deoxicólico, inhibición de transporte de sodio, diarrea.

Introducción

Los ácidos biliares constituyen un elemento fundamental en el proceso digestivo humano. Su función es transformar los lípidos en un complejo de moléculas que les permiten atravesar con eficiencia la capa de agua inmóvil que cubre la superficie del intestino delgado. Los ácidos biliares son sintetizados por el hígado y recirculan al ser absorbidos pasivamente por el intestino delgado alto y activamente por el íleon para ser devueltos al hígado. Por tanto, existe un mecanismo dinámico equilibrado de síntesis, excreción por la vía biliar, acción digestiva en el intestino delgado y recuperación.

El intestino delgado contiene normalmente cierta cantidad de bacterias (microbiota normal). En condiciones patológicas en que se produce un sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado se incrementa la hidroxilación de ácidos biliares.

Se ha demostrado en estudios clínicos y experimentales que los ácidos biliares dihidroxilados, en particular el ácido deoxicólico, disueltos en la solución luminal del intestino actúan sobre la superficie mucosa produciendo un efecto inhibitorio en la absorción de sodio, agua y monosacáridos y estimulador de la secreción de cloro¹⁻⁶.

Por otra parte, se ha observado un efecto de los ácidos biliares sobre el transporte hidrosalino al actuar sobre el polo seroso de la célula epitelial del intestino^{2,7,8}. Al respecto, Berant et al.⁹ usando un modelo experimental *in vivo* en perros, demostraron que concentraciones μM de ácido deoxicólico y cólico en la sangre arterial que irriga el yeyuno reducen la absorción de agua, sodio, glucosa y glicina. Adicionalmente, Free et al.⁷ demostraron que la acción del ácido tauroqueno-deoxicólico sobre el lado seroso del colon del conejo, produce un efecto dosis-respuesta, disminuyendo la absorción de cloruro de sodio y aumentando la conductancia epitelial.

En el presente estudio, analizamos la acción patológica que el ácido deoxicólico ejerce en el equilibrio hidrosalino que existe en el intestino.

Materiales y Metodos

Diseño experimental

En el presente estudio se incubó pared de íleon de ratas macho Sprague-Dowley de un peso aproximado de 250 g, no sometidas a ayuno previo, en cámaras elaboradas de acuerdo con la descripción hecha por Ussing y Zerahn¹⁰. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico intraperitoneal (4,8 mg/100 g peso). Se practicó una laparotomía media y se separaron segmentos de íleon de una longitud aproximada de 3 cm, a partir de los 20 cm proximales de la válvula ileocecal. Cada segmento ileal se abrió rápidamente en forma longitudinal por el lado antimesentérico. En seguida se lavó con una solución enfriada con hielo de Krebs Ringer Bicarbonato en las que el cloro fue reemplazado por sulfato o el sodio por

colina. En este último caso el buffer correspondió a ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etano sulfónico (HEPES) en vez de bicarbonato de sodio, dependiendo del experimento realizado. Inmediatamente, se montó el trozo de íleon en la cámara de incubación, cuya área de exposición corresponde a una abertura circular de 0,636 cm². Todo el proceso tomó menos de 2 min. La cámara de incubación consiste en dos compartimentos iguales que enfrentan al lado mucoso y al lado seroso de la pared intestinal, respectivamente. Cada compartimento está conectado a un sistema de circulación de líquidos mediante burbujeo de gases. Dicho sistema tiene una capacidad útil de 15 ml y se mantiene a una temperatura uniforme de 37°C mediante un baño de incubación dotado de un circuito externo (Heto Lab Equipment, Denmark). Los gases usados para el burbujeo y circulación de las soluciones de incubación fueron: una mezcla de O₂ (95%) y CO₂ (5%) en caso de que el buffer fuera bicarbonato de sodio y oxígeno puro para HEPES. La solución de incubación contenía además D-Glucosa 20 mM, excepto en los casos que se usó igual concentración de fructosa, o en una serie de experimentos con amilorida en los que no se usó ningún azúcar en solución. El pH de las soluciones de incubación se mantuvo permanentemente en 7,4. La diferencia de potencial transmural (PD) se midió utilizando puentes de agar-KCl situados axialmente en la cámara de incubación, a ambos lados de la pared intestinal, de tal modo que su extremidad libre permaneció a 2 mm de la superficie intestinal, mucosa o serosa, respectivamente. El equipo electrónico que incluye amperímetro y voltímetro está dotado de una fuente de corriente eléctrica de cortocircuito automática conectada a electrodos Ag/Ag Cl. En todos los experimentos se midió la resistencia de la solución interpuesta entre el extremo de los puentes de agar y la superficie intestinal. El equipo electrónico fue fabricado por uno de los autores (R. Cid Paz, Figura 1). Las mediciones eléctricas se registraron cada 2 o 3 min. Los experimentos controles demostraron la vitalidad del intestino durante los periodos de incubación que se pro-

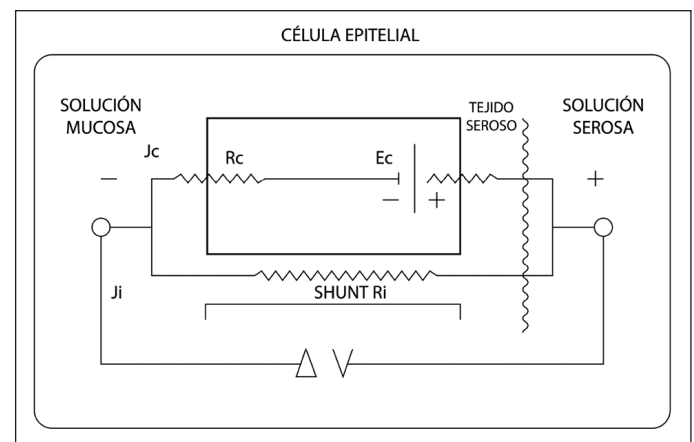


Figura 1. Modelo eléctrico de la célula epitelial intestinal, basado en Schultz y cols¹⁴. Determinación de NA-K-ATPasa y actividad enzimática

longaron en algunos casos hasta 60 min. En todos los experimentos se tuvo un periodo de equilibrio inicial de 10 min. En las incubaciones experimentales se agregó el ácido biliar correspondiente (Sigma Chemical Company, cuya pureza se comprobó mediante GLC) a los 10 min de incubación, de tal modo de obtener concentraciones (0,5; 1,0; 1,5; 2,3 o 4 mM) ya sea en el medio mucoso o seroso, según el tipo de experimento. En una serie de experimentos se agregó Amilorida (Sigma Chemical Company) a los 10 min de incubación en el medio mucoso, de tal modo de alcanzar una concentración de 0,5 mM. Previamente se habían realizado experimentos con diversas concentraciones, tratando de establecer una curva dosis-respuesta y se determinó ésta como la concentración adecuada. En otra serie de experimentos se agregó Ouabaina en el medio seroso (Concentración 1,5 mM) a los 10 min de incubación (Sigma Chemical Company).

La determinación de Na-K-ATPasa se realizó de acuerdo con el método de Ismail Beigi y Edelman¹¹. Brevemente, se separó mucosa de íleon mediante raspado y se homogenizó con un Dounce utilizándose una solución de bicarbonato 1 mmol (1/10 P/V) en hielo. El homogenizado se dejó toda la noche a -20°C. Al día siguiente, ésta se descongeló rápidamente en un baño a 37°C, se agitó en un vortex y se filtró a través de una aguja n°20. Luego se incubaron alícuotas en una solución de bicarbonato de 1 mM por 20 min a 37°C en un baño de agitación. Posteriormente se procedió a la determinación de la Na-K-ATPasa según el método descrito¹¹ a los 10 y 20 min de incubación. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry¹² y el fósforo por el método de Fiske y Subbarow¹³. Se determinó también esta actividad enzimática en experimentos con Ouabaina 1,5 mmol y deoxicolato 1,5 y 3,0 mmol. Finalmente, a otra serie de ensayos se agregó Ouabaina 1,5 mmol y a los 10 min deoxicolato 3 mmol.

Flujos de sodio y cloro

Los flujos unidireccionales de los iones sodio y cloro se determinaron utilizando los isótopos radioactivos ²²Na y ³⁶Cl, respectivamente. Como primer paso se realizaron experimentos para determinar el tiempo necesario para que el flujo del isótopo fuera estable. Para esto, por ejemplo, en la determinación del flujo mucoso-seroso, se agregó una traza de isótopo (3 μCi en el caso de ²²Na y 1 μCi en el ³⁶Cl) a un volumen conocido en el compartimento mucoso y se tomaron alícuotas de 0,5 ml cada 5 min del compartimento seroso por un periodo de 60 min.

La cantidad retirada se repuso con solución fresca para mantener un volumen constante. Se tomaron alícuotas del medio mucoso al comienzo y al final del experimento. El ³⁶Cl se midió en un contador para radiación gamma modelo Autologic (Abbot Laboratories). Las muestras se contaron por 5 min. De acuerdo con el tiempo requerido para alcanzar un movimiento de iones estable, se realizaron experimentos para determinar flujos iónicos bajo las siguientes condiciones: controles con Krebs Ringer glucosa 20 mmol, Krebs Ringer sin glucosa, Krebs Ringer glucosa con deoxicolato de

1,5 mmol tanto para el lado mucoso y deoxicolato 1,5 mmol en el lado seroso. En general, el procedimiento fue el mismo que el ya descrito, sólo que la primera muestra se tomó 10 a 20 min después de haber agregado el isótopo radioactivo. Los experimentos sin glucosa tuvieron una duración de 30 min.

El flujo unidireccional se calculó en base a ecuación descrita por Schultz y Zalusky¹⁴ y el flujo neto (Jnet) correspondió a la diferencia entre el flujo mucoso-seroso (Jms) y el flujo seroso-mucoso (Jms). Se registraron, además, la corriente de cortocircuito (ISC), la diferencia de potencial transmural y la resistencia del tejido (R) como se explicó anteriormente.

Análisis estadístico

En los cálculos estadísticos se utilizó la prueba de t de Student para comparar los valores continuos y se consideraron significativos aquellos resultados con $p < 0,05$.

Resultados

Efecto del deoxicolato sobre el lado mucosa del íleon de rata

Efecto de diversas concentraciones de deoxicolato en Ringer normal

Los resultados obtenidos por nosotros en estudios preliminares demostraron que la mucosa del íleon de rata, montada en una cámara de Ussing, sometida al efecto de concentraciones milimolares de deoxicolato (DC) experimentan una inhibición de la ISC. La Figura 2 compara la disminución de la ISC a lo largo del tiempo en tejidos controles y en tejidos bajo el efecto de DC 1,5 mM o 4 mM. Tal como se observa, el valor promedio de la ISC medida 10 min después del comienzo del experimento (después del periodo de equilibrio) corresponde a 94% del valor promedio inicial en los controles. En cambio, estas mediciones en tejidos sometidos al efecto de DC 1,5 o 4 mM, revelan valores promedio, a los 10 min de observación, de 66% y 40% respectivamente de las mediciones iniciales. Por lo tanto, el DC a estas concentraciones produce una inhibición de la ISC, desde ahora en adelante este efecto será llamado "efecto inhibitorio del DC sobre la ISC".

La Figura 3 resume los resultados obtenidos en nuestro estudio del efecto de diversas concentraciones de DC sobre la ISC a los 10 min de exposición de la superficie mucosa intestinal. Ya que los valores de ISC varían de tejido a tejido, los resultados experimentales se expresan como el promedio de las razones entre la ISC a los 10 min de los experimentos y la ISC al momento inicial de cada experimento (ISC 10'/ISC 0').

Los resultados experimentales señalados demuestran que la inhibición de la ISC por DC es concentración-dependiente, tal como se observa en la Figura 3. Además de inhibir la ISC, el DC (1-4mM) produce un leve aumento de la resistencia eléctrica transmural. Así, la resistencia de tejidos controles,

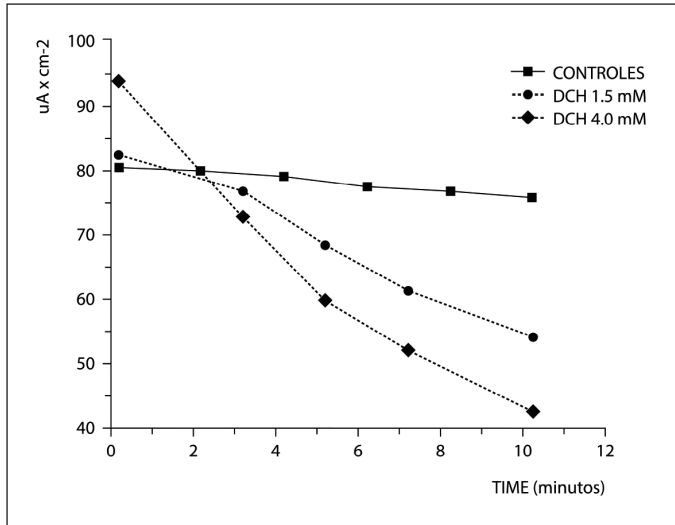


Figura 2. Efectos del deoxicolato mucosal en el ISC.

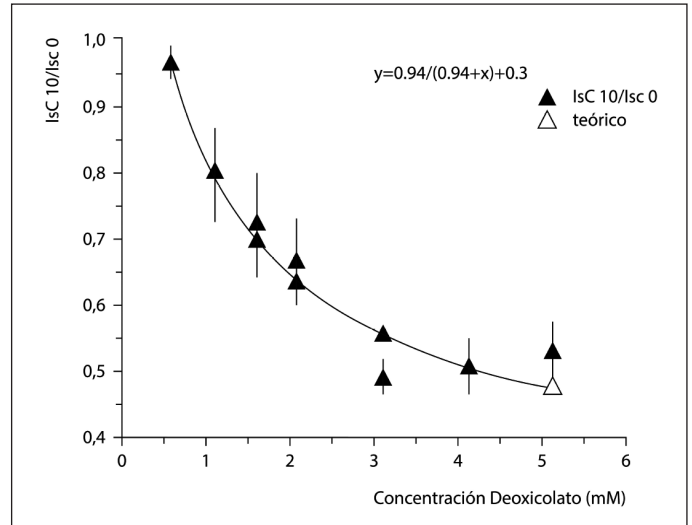


Figura 3. Efecto del deoxicolato mucosal sobre ISC. Efecto de la concentración luminal de DC sobre la corriente de cortocircuito (ISC), a los 10 minutos de incubación. $ISC_{10'}/ISC_{0'}$ ($\bar{x} \pm$ error estándar).

medida 10 min después del comienzo del periodo experimental, corresponde a un promedio $66,37 \pm 2,95 \text{ Ohm/cm}^2$ ($n = 20$), en cambio los valores obtenidos 10 min después de la exposición de la mucosa a DC 4 mM promedian $80,60 \pm 7,80 \text{ Ohm/cm}^2$ ($n = 6$, $p < 0,1$).

Se realizó otra serie de experimentos para comprobar si el efecto inhibitorio del DC era también producido por otros ácidos biliares. Tal como se observa en la Tabla 1, entre los ácidos biliares estudiados a una concentración 1,5 mM, solamente el ácido glicodeoxicólico, pero no el tauroqueno-deoxicólico ni el taurodeoxicólico, son capaces de inhibir la ISC. Dicha inhibición es inferior a la observada por el DC a la misma concentración, pero también es significativa ($p < 0,02$). Este efecto inhibitorio del glicodeoxicolato es también concentración dependiente.

Experimentos con sustitución de iones

El trabajo se continuó con otros estudios en los que se usó la sustitución de iones con el fin de comprobar si el efecto inhibitorio del DC sobre la ISC depende de la pre-

sencia del ion sodio en la solución mucosa. Se observó que el reemplazo del sodio por colina en el lado mucoso y el bicarbonato por HEPES en ambas soluciones (mucosa y serosa) produce una inversión del signo de la ISC (Tabla 2). En estas condiciones el DC hasta una concentración de 4mM en la solución mucosa tiene un efecto leve en la ISC, aumentando su negatividad sólo en los primeros minutos de incubación (Tabla 2). Si en estas incubaciones se reemplaza el ion sodio en ambas soluciones mucosa y serosa la ISC se hace prácticamente cero.

Por otra parte, cuando el cloro se reemplaza casi totalmente por sulfato (se mantiene el CaCl_2 en el Ringer) en la solución mucosa o en ambas soluciones, el DC disuelto en la solución mucosa produce el efecto inhibitorio en la ISC ya descrito con la solución Ringer normal (Figura 4 y Tabla 3). También se observa en estos experimentos un efecto dosis-respuesta.

Estos resultados indican que el efecto del DC, en el lado mucoso del íleon de rata sobre la ISC depende del ion sodio y no del cloro.

Tabla 1 Efectos del deoxicolato mucosal y otros ácidos biliares 1,5 mM en ISC ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)

	CONTROL N=20	DC N=6	GDC N=5	TC N=3	TQDC N=3	TDC N=3
0'	78.78 ± 3.36	81.26 ± 7.512	64.18 ± 6.80	89.51 ± 0.55	91.93 ± 15.79	83.49 ± 11.07
10'	74.48 ± 3.81	52.86 ± 5.60	49.03 ± 4.49	97.57 ± 1.82	90.46 ± 19.62	78.35 ± 14.18
ISC 10'/ISC 0'	0.945 ± 0.019	0.644 ± 0.075	0.764 ± 0.027	1.090 ± 0.027	0.968 ± 0.049	0.936 ± 0.132

Tabla 2.

ISC, REEMPLAZO DEL SODIO POR COLINA EN EL MEDIO MUCOSO			
ISC/10'	CONTROL	DC 1.5 mM	DC 4mM
ISC/0'	n=5	n=8	n=5
	0.99 ± 0.05	1.05 ± 0.08	1.14 ± 0.13

TABLA 2

Efecto del DC mucoso en la corriente de cortocircuito, en concentraciones de 1.5 y 4 mM, en la que el Na⁺ ha sido reemplazado por Colina en el medio mucoso, comparado con Controles, (no hay diferencia significativa).

Tabla 3 ISC. Reemplazo de cloro por sulfato en el medio mucoso y seroso. Efecto del DC mucoso en concentraciones de 1.5mM y 4 mM, sobre la corriente de cortocircuito a los 10 minutos, comparada con controles, en un medio de incubación en el que el cloro ha sido reemplazado por sulfato (p < 0,005)

ISC. REEMPLAZO DE CLORO POR SULFATO EN EL MEDIO MUCOSO Y SEROSO			
ISC/10'	CONTROL	DC 1.5mM	DC 4mM
ISC/0'	n=5	n=6	n=5
	0.898 ± 0.36	0.569 ± 0.32	0.472 ± 0.26

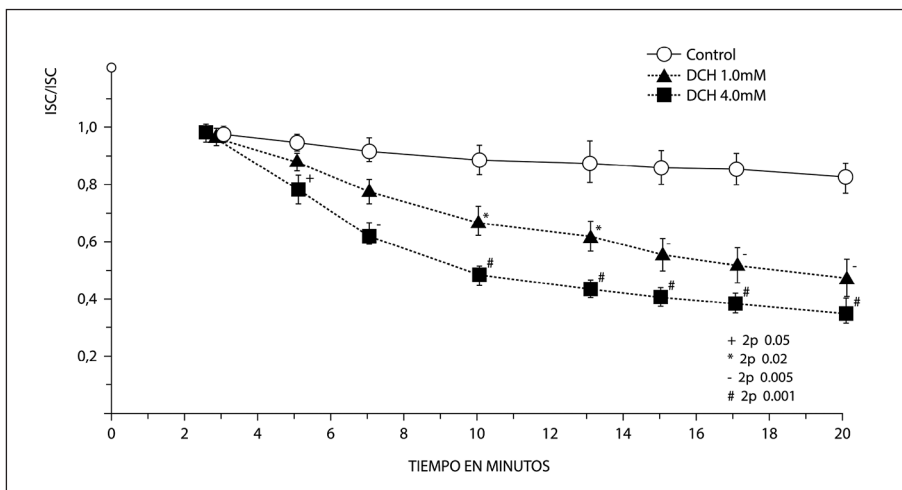


Figura 4. Efecto del deoxicolato mucosal en la ISC incubado con SO₄ en reemplazo de Cl⁻, a ambos lados de la pared ileal.

Efecto de la amilorida

Ya que la presencia del sodio en el medio de incubación mucoso parece ser un requisito para la inhibición de la ISC, pareció de interés comprobar si tal inhibición se producía en circunstancias en las que la ISC se deprimía con amilorida, que es un bloqueador del transporte de sodio en epitelios. Inesperadamente, encontramos que la inhibición de la ISC por amilorida depende de la presencia o no de glucosa en la solución mucosa. Tal como muestra en el Figura 5, en una solución de Ringer normal con D-glucosa (20 mM), amilorida 0,5 mM mucoso inhibe la ISC sólo en aproximadamente un 24% después de 20 min de incubación; mientras que en el Ringer sin glucosa la inhibición llega a ser aproximadamente un 43%. Al reemplazar la D-Glucosa por fructosa 20 mM, el efecto inhi-

bitorio se produce en forma semejante a las sin glucosa. Sin embargo, los valores promedios de ISC en las preparaciones con Ringer sin glucosa son significativamente menores que aquellos obtenidos con soluciones de Ringer con glucosa. En preparaciones sin glucosa en el medio de incubación y en las que la ISC se habrá inhibido con amilorida (0,5 mM) en el medio mucoso, el DC en lado mucoso no tuvo efecto sobre la ISC (1,5 mM). Tal como se documenta en la Figura 6, el grado de inhibición a lo largo del tiempo obtenido con amilorida 0,5 mM (círculos) no difiere significativamente de la inhibición que se obtiene si la amilorida se agrega 10 min después de DC 0,5 mM (triángulos). Estos resultados sugieren que el DC y la amilorida pueden afectar un componente común en los procesos del transporte transepitelial de sodio.

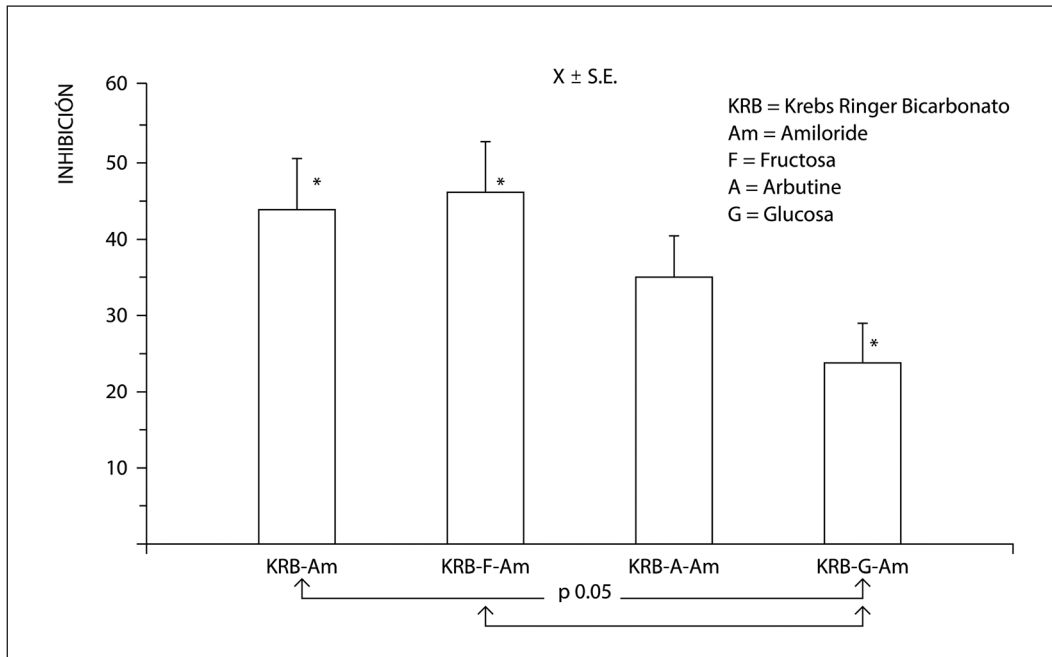


Figura 5. Inhibición de ISC por amiloride a 20 minutos de la incubación.

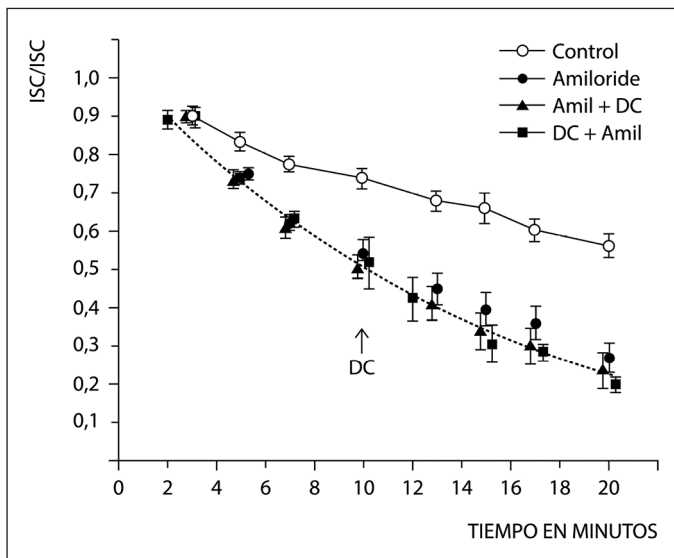


Figura 6. Efecto del amiloride, 0,5 mM en el medio mucoso, sobre la corriente de cortocircuito (ISC), comparada con controles y con otras preparaciones a las que se agregó DC 1,5 mM en el medio mucoso. El medio de incubación no tenía glucosa.

Efecto de ouabaína

Ya que se ha demostrado efecto inhibitorio de la Na-K-ATPasa por el DC, también se estudió el efecto del DC en preparaciones de ileon de rata, en las que la Na-K-ATPasa se había incubado con ouabaína 1,5 mM en el medio seroso. En la Tabla 3 se describe este efecto inhibitorio sobre la ISC. Esta inhibición alcanza un 30%, medida 10 min después de agregarse la ouabaína. Por otra parte, el DC agregado al

medio mucoso (1,5 mM), después de obtenerse el efecto inhibitorio con la ouabaína, tiene a su vez un claro y significativo efecto inhibitorio sobre la ISC, que se observa en exceso del obtenido con ouabaína solamente (Figura 7 y Tabla 4). El DC inhibe cerca del 50% de la ISC que persiste bajo la acción de la ouabaína.

Efecto del deoxicolato sobre el lado seroso del ileon de rata

Efecto del deoxicolato en el medio seroso con Ringer normal

La exposición del lado seroso a concentraciones milimolares de DC en presencia de Ringer normal, en ambas caras del epitelio, da como resultado una estimulación de la ISC. Dicha estimulación se observa en el rango 0,5-1,5 mM de DC. Concentraciones de DC mayores que 1,5 mM no producen estimulación significativa (Figura 8). El efecto máximo ocurre a una concentración de 1mM corresponde a un aumento de un 30% de ISC respecto del valor normal (a los 10 min de exposición al DC) sin cambios significativos en los valores de la resistencia eléctrica transmural.

Efecto del deoxicolato seroso en medios de incubación con sustitución de iones

Se llevaron a cabo experimentos para investigar el posible rol de los iones sodio en el efecto estimulador observado sobre la ISC por la acción del deoxicolato seroso, en un medio Ringer en el que el sodio ha sido totalmente reemplazado por colina en el lado mucoso y el bicarbonato por HEPES en

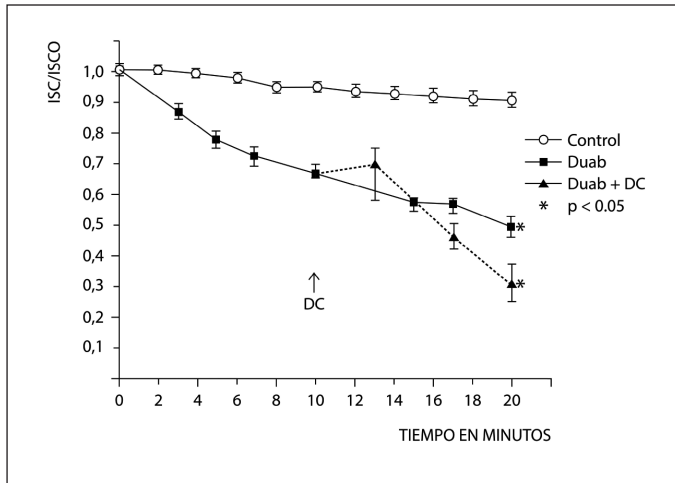


Figura 7. Efecto de la ouabaina 1,5 mM en el medio seroso sobre la corriente de cortocircuito comparada con controles y con preparaciones a las que se agrega DC 1,5 mM a los 10' de incubación.

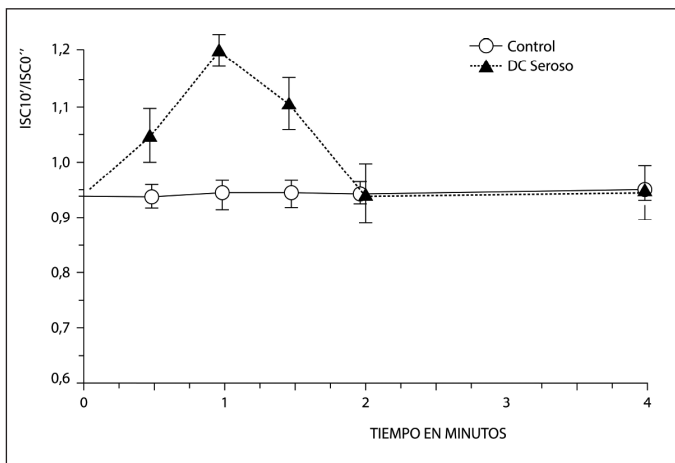


Figura 8. Efecto del DC seroso en concentraciones de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 4 mM sobre la corriente de cortocircuito a los 10 min, comparada con controles.

ambos medios de incubación. Tal como se puede observar en la Tabla 5 el DC seroso 0,5 mM aumenta significativamente la magnitud de la ISC –que es negativa en estas preparaciones– con respecto a los controles a los 10 min de incubación. En cambio, el DC seroso 1,5 mM, solamente a los 20 min de incubación aumenta la ISC, en un grado menor.

En otras incubaciones en las que se reemplazó el ion sodio sólo en el medio seroso por colina y también se usó HEPES como buffer en ambas soluciones; la ISC fue positiva (89,27 ± 14,57 uA/cm²) y aumentó significativamente, en un 35% (p < 0,01), a los 10 min de agregarse DC 1,5 mM al medio seroso. Esto significaría que es necesaria la presencia del ion sodio en el medio mucoso para que se produzca el incremento de la ISC de signo positivo.

Al reemplazar el ion cloro por sulfato en el medio mucoso y agregarse DC 1,5mM al medio seroso, no se observó

Tabla 4. Efecto de la ouabaina 1.5 mM en el medio ser corriente de cortocircuito (U.A. cm²), comparada ... y en preparaciones en las que se agregó, además ... el medio mucoso

	CONTROLES	1.5 mM OUABAINA	1.5 mM OUABAINA + DC
ISC (uA/cm ²)	71.32 ± 4.08	42.01 ± 4.84 *	42.01 ± 4.84 *
n	20	12	12
		□ p < 0.001	* p < 0.05

TABLA 4
Efecto de la ouabaina 1.5 mM en el medio ser corriente de cortocircuito (U.A. cm²), comparada y en preparaciones en las que se agregó, además el medio mucoso.

Tabla 5. Effect of serosal deoxycholic acid on ISC mucosal solution without Na+

TIME	ISC (uA/cm ²)		
0'	X ± S.E.		
n° = 22	67.94 ± 7.63		
	CONTROLS	DCH 0.5 mM	DCH 1.5 mM
N	10	3	9
Isc 10'	0.881 ± 0.045	1.350 ± 0.092 *	0.924 ± 0.034
Isc 0'			
Isc 20'/0'	0.794 ± 0.042	- - -	1.085 ± 0.057 °

* 2p < 0.001
° 2p < 0.005

cambios significativos en la ISC. Tampoco se observaron cambios al reemplazarse el ion cloro por sulfato en el medio seroso y agregarse DC 1,5 mM a esta solución. La interpretación de estos resultados apuntaría a lo siguiente: 1) que es necesaria la presencia de ion cloro en el medio seroso y 2) simultáneamente es necesaria la presencia de ion sodio y cloro en el medio mucoso para que se produzca un incremento de la ISC de signo positivo.

Efecto del DC seroso en presencia de amilorida y ouabaina

En condiciones en que la ISC ha sido inhibida por amilorida 0,5 mM en el lado mucoso, el DC 1,5 mM en el lado seroso produce un marcado incremento en la ISC. Este incremento no sólo revierte el efecto inhibitorio de amilorida, sino que da como resultado valores de ISC que son en promedio,

significativamente más altos (aprox. 25%) que los valores de los controles obtenidos en ausencia de amilorida (Experimentos sin glucosa).

Control (n = 8). Isc 20' / Isc 0' = $0,547 \pm 0,033$ (29,14 uA/ cm²)
 Amil. + DC seroso (n = 7) Isc 20' / Isc 0' = $0,691 \pm 0,017$ (36,57 uA/ cm²)
 2p < 0,005)

Por su parte el DC 1,5 mM seroso también tiene un efecto estimulador de ISC en condiciones que la Na-K-ATPasa ha sido inhibida por ouabaina (1,5 mM) serosa. Este efecto estimulador es de aproximadamente un 41% respecto de las preparaciones con ouabaina sola, pero no alcanza los valores controles.

Control (n = 20) Isc 20' / Isc 0' = $0,897 \pm 0,028^{\circ}$
 Ouabaina (n = 12) Isc 20' / Isc 0' = $0,489 \pm 0,034^*$
 Ouab. + DC ser. (n = 7) Isc 20' / Isc 0' = $0,690 \pm 0,040^{*o}$
 *2p < 0,005
 °2p < 0,001

Por tanto, estos resultados sugieren que el DC seroso es capaz de revertir, pero sólo en forma parcial el efecto inhibitorio de la ISC producida por la Na-K-ATPasa.

Actividad de Na-K-ATPasa y Deoxicolato

En incubaciones *in vitro* el DC 1,0 mM inhibe la actividad de la Na-K-ATPasa en un grado similar al obtenido con ouabaina 1,5 mM, DC 3mM o la acción simultanea de DC 3 mM + ouabaina 1,5 mM (Tabla 6). Esto sugeriría que nuestros experimentos, cuando se utilizan en los medios de incubación, concentraciones de DC de 1,0 mM o mayores se obtiene una inhibición similar a la obtenida con ouabaina 1,5 mM y que

la acción conjunta de ouabaina y deoxicolato no aumenta la inhibición de dicha enzima.

Flujos de sodio y cloro a través de la pared ileal

La Figura 9 muestra la actividad total del ³⁶Cl en el lado mucoso en función del tiempo después de agregar la marca radioactiva en el compartimento seroso. Se observa que el flujo iónico estable se alcanza entre los 15 y 20 min después de agregar el isótopo.

El tiempo necesario para alcanzar un flujo estable fue similar para todas las mediciones realizadas, tanto para los flujos mucoso-seroso como seroso-mucoso, así como para ²²Na.

En la Tabla 6 se presentan resultados del estudio de flujo de sodio y cloro, mucoso-seroso y seroso-mucoso. Dado que se trata de un número más bien reducido de experimentos, para este tipo de determinaciones, estos resultados pueden considerarse preliminares.

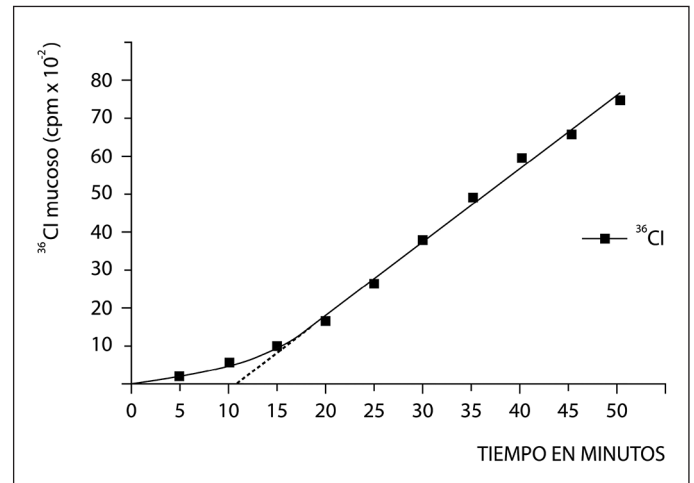


Figura 9. Actividad total de ³⁶Cl en el lado mucoso en función del tiempo, después de agregar el isótopo en el reservorio mucoso (r = 0,997 en el período lineal). El gráfico es similar para las otras determinaciones de flujo estable.

Tabla 6. Actividad Na-K-ATPasa

	Controles		Deoxicolato 1mM		Deoxicolato 3mM		Ouabaina 1.5 mM		DC 3 mM + Ouab. 1.5 mM	
	10'	20'	10'	20'	10'	20'	10'	20'	10'	20'
pi umol/ mg prot/h	2.40 ± 0.336	1.385 ± 0.178	0.698 ± 0.185	0.479 ± 0.094	0.677 ± 0.179	0.388 ± 0.073	0.673 ± 0.047	0.448 ± 0.010	0.546 ± 0.117	0.274 ± 0.092
nº	6	9	4	4	5	6	3	4	5	4
2p respecto controles			< 0.01	< 0.02	< 0.005	< 0.001	< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Entre ellos, el DC mucoso produce una disminución significativa $J_{Na\ m-s}$ que, aunque está acompañada de una disminución de $J_{Na\ s-m}$ (Tabla 7), la supera. Este hecho demostraría la disminución de la ISC constatado en nuestros experimentos.

Los experimentos con DC seroso no demostraron cambios significativos en esta serie de experimentos. El DC mucoso produjo una disminución significativa de $J_{Na\ m-s}$, y también, de $J_{Na\ s-m}$, junto a una menor secreción de cloro (Tabla 8), lo que lleva a un promedio de flujo neto de cloro cercano a cero.

Los experimentos con amilorida mucoso y DC seroso, demuestran un flujo de cloro mucoso-seroso menor y una mayor secreción de cloro lo que es concordante con los experimentos anteriores en los que se ve descrito un aumento ISC (con signo negativo).

En cuanto al DC mucoso y seroso produce una significativa secreción de Cloro (Tabla 8) lo que explicaría su efecto clínico de diarrea.

Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar los mecanismos por los cuales el DC produce variaciones en la ISC en preparaciones de íleon de rata montadas en cámaras de Ussing Zerhan¹⁰. La ISC corresponde al flujo neto de iones que ocurre a través de la pared intestinal. De acuerdo con los objetivos específicos presentados en el proyecto, con los resultados obtenidos, creemos haber aclarado los siguientes puntos:

1. La disminución de la ISC observada, cuando se expone el lado mucoso de la pared intestinal a DC, se debería a un efecto inhibitorio sobre el mecanismo transportador del ion sodio. Esta inhibición parece ser competitiva con la amilorida, pero a diferencia de ésta, afectaría tanto los canales de sodio como los transportadores acoplados a glucosa. Al respecto, es interesante que en nuestros experimentos la amilorida actúa sólo débilmente en preparaciones con glucosa en el medio de incubación. En segundo lugar, también influye en esta disminución de la ISC una inhibición de la Na/K-AT PASA de la mucosa, tal como lo observamos en nuestros experimentos. Sin embargo, esta contribución parece ser inferior a la producida sobre los transportadores.
2. En cuanto al efecto del DC sobre el lado seroso de la mucosa, demostramos un incremento de la ISC, lo que explica la mayor secreción de cloro acompañado de agua lo que podría causar diarrea en los casos experimentales referidos anteriormente. Por otra parte, el reemplazo de cloro por sulfato en el medio de incubación seroso anula este efecto, sin embargo, también es necesaria la presencia de sodio y cloro en el medio mucoso para que se produzca este efecto. Del mismo modo, ha sido inesperado el efecto del DC seroso cuando se agrega amilorida al medio mu-

Tabla 7. Flujos bidireccionales de Na^+ expresados como $uEq/cm^2 \times hora$ en preparaciones con DC mM en el medio mucoso, comparados con controles ($p < 0,01$)

FLUJOS BIDIRECCIONALES DE Na^{+22}		
	Na J_{ms}	Na J_{sm}
Controles	13.7 ± 1.3 n = 7	12.8 ± 0.8 n = 7
DC 1.5 mM	$6.1 \pm 0.8^*$ n = 11	$5.9 \pm 0.9^*$ n = 7

* $p < 0,01$

Tabla 8. Flujos bidireccionales de Cl^{36} . Flujos bidireccionales de Cl^- expresados como $u/cm^2 \times hora$ en preparaciones con DC 1.5 mM en el medio mucoso comparados con control

	J_{ms}	J_{sm}	
Controles	$5,2 \pm 0,4$ N=6	$6,1 \pm 0,6$ N=6	NS
DC mucoso 1,5 mM	$3,5 \pm 0,7$ N=8	$7,4 \pm 1,4$ N=8	$p < 0,025$
DC seroso 1,5 mM	$7,6 \pm 1,3$ N=9	$9,2 \pm 1,3$ N=7	NS
DC mucoso 1,5 mM	$3,5 \pm 0,7$ N=8	X	$P < 0,005$
DC seroso 1,5 mM	X	$9,2 \pm 1,3$ N=7	

coso, pues en preparaciones sin glucosa la ISC aumenta notoriamente sobre los controles, debiéndose esto a una mayor secreción de cloro.

Aunque los controles revelan cifras que son más elevadas para los flujos mucosos y serosos, las condiciones experimentales de los primeros son distintas a los experimentos con DC, pese a ello, las cifras experimentales nos parecen plenamente válidas, y podrían explicar los efectos clínicos descritos.

Finalmente, comprobamos que DC es la sal biliar que más

efecto tiene junto el ácido glicodeoxicólato, comparados con otros con mínimo o nulo efecto (ácido taurocólico, ácido tauroquenoodeoxicólico, y ácido taurodeoxicólico). Estos efectos se producen con concentraciones milimolares y se ha planteado que ellos pueden ser debido a la actividad de la adenilciclase o cambios en la permeabilidad del epitelio intestinal^{2,4,7,15}. Estos estudios junto al nuestro contribuyen a explicar las alteraciones que se producen en el transporte hidrosalino intestinal en condiciones fisiopatológicas en las que existe un aumento en la concentración luminal de ácidos biliares dihidroxilados deconjugados, en particular ácido deoxicólico, tales como el síndrome de “asa ciega” y la mala absorción de ácidos biliares en afecciones ileales^{5,16}.

Conclusión

Creemos haber cumplido los objetivos propuestos en el proyecto, aunque parece que los estudios de flujos iónicos podrían perfeccionarse en el futuro, pues hemos tenido algunas limitaciones de equipo que impidieron realizar experimentos pareados en la época de realización de los experimentos. El ácido deoxicólico inhibe la absorción tanto de los canales de sodio como de los transportadores acoplados a glucosa y el mismo ácido en el lado seroso hace secretar cloro al íleon.

Addendum

Este trabajo fue terminado hace 32 años, sin embargo, no fue publicado por diversos inconvenientes y razones que son difíciles de explicar ahora. Revisando las referencias sobre el tema de la regulación de transporte intestinal por ácidos biliares ha sido muy escaso posteriormente (25-28). Por consiguiente, nos atrevemos a tratar de publicarlo en la revista *Gastroenterología Latinoamericana*, por la benevolente acogida que nos ha brindado su Editor Dr. Arnoldo Riquelme. Además, quisiéramos destacar nuestro reconocimiento al doctor Pedro Labarca Prado, premio nacional de Ciencias año 2004 por su ayuda y consejos en el trabajo presentado. El Dr. Labarca falleció el año 2019.

Agradecimientos

Se agradece la participación de la bioquímicas Anne Louise Prieto Cruse y Ana Prella por su colaboración al trabajo y al joyero anónimo que donó un rollo de alambre de platino para realizar las mediciones eléctricas.

El trabajo fue financiado por aportes del DIUCE (Dirección de investigaciones de la Universidad Católica) y Fondecyt 700-87 y 0601-89.

Referencias

1. Harries JT, Sladen GE. The effects of different bile salts on the absorption of fluid, electrolytes, and monosaccharides in the small intestine of the rat in vivo. *Gut* 1972;13:596-603.
2. Binder HJ, Rawlins CL. Effect of conjugated dihydroxy bile salts on electrolyte transport in rat colon. *J Clin Invest* 1973;52:1460-6.
3. Wingate DL, Phillips SF, Hofmann AF. Effect of glycine-conjugated bile acids with and without lecithin on water and glucose absorption in perfused human jejunum. *J Clin Invest* 1973;52:1230-6.
4. Guiraldes E, Lamabadusuriya SP, Oyesiku JE, et al. A comparative study on the effects of different bile salts on mucosal ATPase and transport in the rat jejunum in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1975;389:495-505.
5. Krag E, Phillips SF. Effect of free and conjugated bile acids on net water, electrolyte, and glucose movement in the perfused human ileum. *J Lab Clin Med* 1974;83:947-56.
6. Wingate DL. The effect of glycine-conjugated bile acids on net transport and potential difference across isolated rat jejunum and ileum. *J Physiol* 1974;242:189-207.
7. Freel RW, Hatch M, Earnest DL, et al. Dihydroxy bile salt-induced alterations in NaCl transport across the rabbit colon. *Am J Physiol* 1983;245:G808-815.
8. Schwiter EJ, Hepner GW, Rose RC. Effect of bile acids on electrical properties of rat colon: evaluation of an in-vitro model for secretion. *Gut* 1975;16:477-81.
9. Berant M, Diamond E, Alon U, et al. Effect of Infusion of Bile Salts into the Mesenteric Artery in Situ on Jejunal Mucosal Transport Function in Dogs. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1988;7:588.
10. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951;23:110-27.
11. Ismail-Beigi F, Edelman IS. The Mechanism of the Calorigenic Action of Thyroid Hormone. *J Gen Physiol* 1971;57:710-22.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
13. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 1925;66:375-400.
14. Schultz SG, Zalusky R. Ion transport in isolated rabbit ileum. I. Short-circuit current and na fluxes. *J Gen Physiol* 1964;47:567-84.
15. Teichberg S, McGarvey E, Bayne MA, et al. Altered jejunal macromolecular barrier induced by alpha-dihydroxy deconjugated bile salts. *Am J Physiol* 1983;245:G122-132.
16. Desjeux JF, Tai YH, Curran PF. Characteristics of sodium flux from serosa to mucosa in rabbit ileum. *J Gen Physiol* 1974;64:274-92.