

Comportamiento bioeléctrico de la pared intestinal de la lombriz de tierra *Scherotheca sp.*

A. Berjón, R. Jordana y F. Ponz

Departamento de Investigaciones Fisiológicas, C.S.I.C.
Universidad de Navarra
Pamplona (España)

(Recibido el 16 de agosto de 1978)

A. BERJON, R. JORDANA and F. PONZ. *Bioelectric Behaviour of Intestinal Wall in the Earthworm Scherotheca sp.* Rev. esp. Fisiol., 35, 105-110. 1979.

Transmural potential difference (TPD) and short circuit current in the *Scherotheca sp.* intestinal wall in *in vitro* preparations have been studied, as well as their variations as related to ionic substitutions. Sodium ion seems to participate the most in the genesis of registered potential, so that its total substitution in the medium brings about the disappearance of the potential. Transmural potential relies on metabolic energy and is inhibited by N_2 , 2,4-DNP and CNK.

Ouabain inhibits TPD only when present on the serosal side. This might indicate the existence on that side of a Na^+ pump responsible for the active transport of the cation from mucosal.

En un trabajo anterior se había puesto de manifiesto (2) la incapacidad del intestino de *Scherotheca sp.* para transportar activamente sustratos metabólicos. Sin embargo, la regulación del medio interno se ve favorecida por una permeabilidad selectiva de la mucosa intestinal para los distintos iones. En el presente trabajo se mide una diferencia de potencial eléctrico transmural (PD_t) dependiente del flujo iónico entre ambos lados de la pared del intestino, que se ve influida por la composición iónica del medio y por la disponibilidad energética del intestino, que parece atribuible al transporte activo de Na.

Material y métodos

Se utilizaron ejemplares de *Scherotheca sp.* L. recogidos cerca de Pamplona, que se mantenían en el laboratorio con tierra procedente del lugar de recolección. Cuatro días antes de su utilización se pasaban a una cubeta con papel de filtro humedecido, con el fin de eliminar la mayor parte del contenido intestinal, manteniendo las condiciones de humedad.

Después de incisión longitudinal, se disecaba y aislaba el intestino procediendo a su lavado con la solución fisiológica de trabajo (17). Se tomaban fragmentos in-

testinales evertidos, de unos 4 cm de longitud, y se montaban sobre una cánula en U con una de sus ramas interrumpidas; la cánula con el fragmento intestinal montado se llenaba con la solución fisiológica y se introducía en una copa que contenía la misma solución, amortiguada con Tris/CIH a pH 6,9 que es el que corresponde al intestino (18). El burbujeo constante de oxígeno en la copa garantizaba la supervivencia del tejido a lo largo del período experimental. La solución de la copa y de la cánula bañaban respectivamente los compartimientos mucosal y serosal; la temperatura del medio de incubación se mantuvo a 18° C.

La medida de la diferencia de potencial transmural (PD_t) entre los compartimientos mucosal y serosal se hacía mediante dos electrodos de calomelanos (10, 15) conectados a un amplificador-electrómetro (W. H. Associates A-35) de 5×10^9 ohmios de impedancia de entrada, un amplificador-registrador (Harvard-Apparatus Mod. 350) y quimógrafo (Mod. 450). La corriente de cortocircuito (I_{sc}) (22) se medía con electrodos de calomelanos, usando una fuente de alimentación de corriente continua de 45 voltios, una resistencia variable apropiada y un microamperímetro. Los electrodos se conectaban con la solución a través de puentes salinos de agar-ClK.

El flujo iónico neto se calculaba a partir de los valores de la I_{sc} , supuesta una sola especie iónica, referidos a unidad de superficie de intestino, para lo cual se tuvo en cuenta la relación: $1 \mu A = 3,73 \times 10^{-2} \mu Eq/hora$.

El pH de la solución se determinaba con un pH-meter 52b Radiometer. En los experimentos en que se llevaron a cabo sustituciones iónicas se mantuvo constante la osmoticidad del medio.

Resultados

La PD_t del intestino de *Scherotheca sp.* se mantenía sin variaciones estadística-

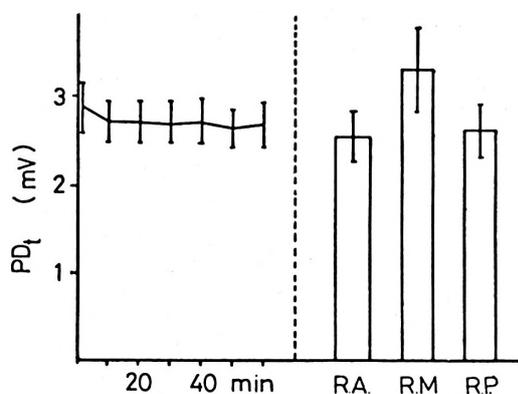


Fig. 1. Variación de la diferencia de potencial transmural (PD_t) en intestino de *Scherotheca sp.* en función del tiempo y de la región intestinal.

R. A., región anterior; R. M., región media; R. P., región posterior.

mente significativas durante una hora, tiempo máximo de duración de los experimentos. Su valor medio era de $2,9 \pm 0,4$ mV ($n = 38$), con signo positivo en el compartimiento serosal respecto del mucosal.

Si se divide el intestino en tres regiones (anterior, media y posterior), la zona

Tabla 1. Efecto de la sustitución total de Na^+ , K^+ o Cl^- sobre la PD_t (mV) en preparados intestinales de *Scherotheca sp.*

Los valores medios de la PD_t se expresan con su error típico. El número de experimentos se indica entre paréntesis. M y S indican, respectivamente, los compartimientos mucosal y serosal en los que se ha hecho la sustitución iónica.

PD_t medio completo	PD_t medio sin Na^+	PD_t medio completo
$2,8 \pm 0,4$ (10)	M, S $0,0 \pm 0,2$ (10)	$1,8 \pm 0,3$ (10)
$2,8 \pm 0,2$ (10)	S $2,6 \pm 0,2$ (10)	$1,2 \pm 0,1$ (10)
$2,8 \pm 0,2$ (10)	M $0,1 \pm 0,2$ (10)	$1,2 \pm 0,1$ (10)
	medio sin K^+	
$1,8 \pm 0,2$ (21)	M, S $1,5 \pm 0,2$ (21)	$1,5 \pm 0,2$ (21)
	medio sin Cl^-	
$2,6 \pm 0,3$ (16)	M, S $2,7 \pm 0,3$ (16)	$2,4 \pm 0,3$ (16)

media parece mostrar valores algo más altos de la PD_i si bien las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (fig. 1). La adición de glucosa, galactosa, fructosa o leucina no modifica la PD_i .

Efecto de la sustitución de Na^+ , K^+ y Cl^- sobre la PD_i . La sustitución total de Na^+ por Tris en el medio, en ambos lados de la pared intestinal, o solamente en el compartimiento mucosal, produce una caída rápida de la PD_i que llega a anularse a los 10 o 20 minutos. La misma sustitución del Na^+ en el compartimiento

serosal no produce, en cambio, variaciones apreciables en la PD_i (tabla I).

La sustitución de K^+ por Tris a ambos lados de la pared intestinal no produce cambio alguno en la PD_i . Tampoco se observan cambios cuando el Cl^- es sustituido por SO_4^- , en ambos lados (tabla I).

Efecto de la anoxia sobre la PD_i y la I_{sc} . La incubación de asas intestinales en la solución de trabajo con burbujeo constante de nitrógeno muestra que la PD_i se inhibe en un 56,7 %, inhibición muy parecida a la que se observa en el

Tabla II. Efecto del 2,4-DNP, CNK y ouabaína sobre la PD_i y de la anoxia sobre la PD_i y la I_{sc} a través de la pared intestinal de *Scherotheca* sp.

Los valores medios se expresan con el error típico. El número de experimentos se indica entre paréntesis. M y S indican los compartimentos, mucosal y serosal respectivamente, en el que se añade el inhibidor.

Inhibidor	[moles/l]	Solución fisiológica + Inhibidor		Completa	Inhibición %
		Completa	PD _i (mV)		
2,4-DNP	S 10^{-4} (5)	2,4±0,2	2,1±0,2	2,2±0,2	N.S.*
	M 10^{-4} (4)	2,8±0,2	2,8±0,1	2,8±0,1	N.S.*
	S 5×10^{-4} (7)	2,7±0,4	0,5±0,5	1,8±0,3	80,3
	M 5×10^{-4} (5)	2,5±0,3	1,4±0,3	1,8±0,4	43,3
	S 10^{-3} (10)	2,5±0,2	-2,4±0,3	0,1±0,5	Inv. pot.
	M 10^{-3} (5)	3,7±0,6	1,2±0,4	1,7±0,5	67,2
CNK	M, S 5×10^{-4} (5)	2,6±0,4	1,7±0,4	2,2±0,5	32,8
	M, S 5×10^{-3} (9)	2,3±0,3	0,7±0,2	1,6±0,3	70,0
	S 5×10^{-3} (6)	2,8±0,3	0,9±0,2	2,0±0,2	69,1
	M 5×10^{-3} (6)	2,8±0,3	1,7±0,2	2,3±0,3	38,8
	M, S 10^{-2} (13)	2,3±0,3	0,0±0,1	1,2±0,2	105,0
	S 10^{-2} (6)	2,1±0,3	0,1±0,1	1,3±0,1	95,3
	M 10^{-2} (6)	2,1±0,3	1,1±0,2	1,8±0,2	45,7
Ouabaína	M 5×10^{-4} (8)	2,7±0,3	2,6±0,4	2,8±0,3	N.S.*
	S 5×10^{-4} (8)	2,8±0,3	1,0±0,2	2,4±0,3	64,3
	M 10^{-3} (6)	2,8±0,3	2,7±0,3	2,7±0,2	N.S.*
	S 10^{-3} (6)	2,7±0,3	0,9±0,1	2,2±0,2	66,7
	M 5×10^{-3} (6)	2,9±0,3	2,8±0,3	2,9±0,3	N.S.*
	S 5×10^{-3} (6)	2,9±0,3	0,9±0,1	2,4±0,3	69,0
N ₂	saturación (12)	3,0±0,3	1,3±0,2	2,4±0,3	56,7
		9,3±0,9	I_{sc} (μ/Acm^2) 4,0±0,6	6,1±0,9	57,0

* N.S.: no significativo.

valor de la I_{sc} . El posterior burbujeo de oxígeno permite una recuperación parcial de los valores de ambos parámetros (tabla II). El flujo iónico neto en condiciones control se puede estimar en $22,8 \times 10^{-2} \mu\text{Eq}/\text{cm}^2 \text{ hora}$.

Efecto del 2,4-dinitrofenol, CNK ouabaína sobre la PD_t . Se ha estudiado el efecto de estos inhibidores metabólicos en función de su concentración y del compartimiento (mucosal o serosal) al que se adicionaban. Después del registro gráfico de la PD_t en condiciones control durante 10 minutos, se añadía el inhibidor y se registraban sus efectos durante un período de 20 minutos para volver, a continuación, a las condiciones iniciales. Tanto el 2,4-dinitrofenol como el CNK inhiben la PD_t , efecto que aumenta con la concentración y que se observó independientemente del comportamiento en el que se añadiera el inhibidor; aunque era algo más acusado cuando estaba en el compartimiento serosal (tabla II).

La ouabaína también producía inhibición, pero solamente cuando se añadía al compartimiento serosal. No se observaron variaciones significativas en el grado de inhibición dentro del rango de concentraciones ensayadas (tabla II).

Discusión

Los preparados de intestino de *Scherotheca sp.* desarrollan una PD_t con negatividad mucosal. No se han observado diferencias significativas entre distintas regiones intestinales.

La constancia de la PD_t a lo largo del tiempo (60 minutos) ha permitido abordar con mayores garantías sus relaciones con el ambiente iónico y su variación por la adición de algunos inhibidores metabólicos.

La sustitución en el medio de incubación de Na^+ o K^+ por Tris y del Cl^- por SO_4^{2-} , muestra que, de estos tres iones, sólo el Na^+ parece vinculado al efecto

electrogénico, de modo que su ausencia produce anulación completa del potencial, lo que no sucede por sustitución del K^+ o Cl^- . Como la sustitución del Na^+ en el lado serosal no modificaba la PD_t , mientras que su sustitución en el compartimiento mucosal ejercía el mismo efecto que cuando se sustituía simultáneamente en ambos lados de la pared intestinal, la PD_t depende de la presencia del Na en el lado mucosal. Estos hechos inducían a pensar en la existencia de un transporte activo de Na desde el lado mucosal hacia el serosal, responsable de la positividad serosal. Este comportamiento es similar al observado por SCHULTZ y ZALUSKY (21) en íleon de conejo, CLARKSON y ROTHSTEIN (5) y CURRAN *et al.* (7) en íleon de rata con preparaciones *in vitro*.

Al restituir el Na^+ en el medio, la recuperación de la PD_t es sólo parcial, lo que podría deberse a alteraciones metabólicas poco reversibles inducidas durante el período de incubación sin Na^+ , en congruencia con la disminución de oxígeno observada (2). Una disminución análoga al consumo de oxígeno observaron JORDANA y PONZ (14) en yeyuno de rata.

La adición de glucosa, galactosa, fructosa o leucina, a la solución mucosal, no tiene efecto alguno sobre la PD_t , lo que puede estar en relación con la incapacidad del intestino de *Scherotheca* para transportar activamente estos sustratos (2), a diferencia de lo observado cuando el transporte activo de no electrólitos depende del Na^+ (1, 12, 19).

La incubación de preparados intestinales en anaerobiosis inhibe la PD_t y el flujo iónico, pero sin llegar a su anulación, sugiriendo que el tejido intestinal de *Scherotheca sp.* es capaz de mantener cierto nivel de bombeo de Na^+ mediante fuentes energéticas derivadas de vías metabólicas anareobias. Efectos similares han observado HASKELL y CLEMONS (8) en *Hyalophora cecropia*.

El efecto desacoplante del 2,4-DNP

sobre la fosforilación oxidativa provoca una inhibición del potencial proporcional a la concentración del desacoplante. El hecho de que el DNP llegue a anular, e incluso invertir, el potencial parece indicar que, además de su efecto desacoplante, pudiera afectar también a la permeabilidad del tejido, tal vez por un efecto a nivel de la membrana. Esta hipótesis estaría apoyada por la inhibición ejercida por el DNP en la difusión de glucosa (2). Por otro lado, parece que el DNP es más penetrante desde el lado serosal que desde el mucosal, ya que la inhibición producida cuando se encuentra en el lado serosal es más intensa; análogos resultados observan OSHY y KOMATSU (11) en *Bufo vulgaris* y HASKELL y CLEMONS (8) en *Hyalophora cecropia*, si bien los efectos observados por estos autores son completamente reversibles y no así en *Scherotheca sp.*, donde al igual que en rata (20) el efecto sólo es parcialmente reversible.

No deja de ser sorprendente que la inhibición producida por el CNK llegue a provocar la anulación total de la PD_i a pesar de que el bombeo iónico puede, en parte, mantenerse con energía obtenida por vía anaerobia. Sin embargo, IRVING y PHILLIPS (13) observan en ampolla rectal de *Schistocerca gregaria* una anulación del flujo de Na en presencia de CNK y resultados análogos encuentran BRICKER y KLHAR (4) en vejiga de tortuga, donde la anulación del flujo de Na tiene lugar a pesar de que se produce glicolisis anaerobia con acumulación de ácido láctico.

El efecto inhibitorio de la ouabaína sobre la ATP-asa dependiente de Na^+ y K^+ se ha demostrado en fracciones celulares y tisulares diferentes en diversidad de especies (3, 6, 16) y hay amplia unanimidad en admitir que la ouabaína inhibe el transporte activo de Na^+ como consecuencia de la inhibición de esta ATP-asa. En el intestino de *Scherotheca* la ouabaína disminuye mucho la PD_i , si bien este efecto sólo se observa cuando el glucósi-

do está en el lado serosal; CSAKY y HARA (6) aportan observaciones análogas con relación al transporte de 3-O-metil-glucosa en *Rana catesbiana* y HERRERA *et al.* (9) en la PD_i de *Schistocerca gregaria*. Estos resultados inducen a pensar en la localización de la bomba de Na en el polo basal de las células epiteliales. La presencia de ouabaína en el lado serosal inhibiría de este modo el transporte activo de Na desde el compartimiento mucosal al serosal, lo que se traduciría en la caída de la PD_i .

Resumen

Se ha medido la diferencia de potencial transmural (PD_i) y corriente de cortocircuito en la pared intestinal de *Scherotheca sp.* en preparados *in vitro*, así como sus variaciones en relación con el ambiente iónico. El principal ion implicado en la génesis del potencial registrado parece ser el sodio, cuya sustitución completa en el medio provoca la anulación del potencial. El potencial transmural es dependiente de energía metabólica y se inhibe por el N_2 , 2,4-DNP y CNK.

La ouabaína inhibe la PD_i cuando está presente en el lado serosal, lo que parece indicar la presencia de una bomba de Na localizada en la membrana serosal, responsable del transporte activo del catión de mucosal a serosal.

Bibliografía

1. BARRY, R. J. C., S. DICKSTEIN y E. M. WRIGHT: *J. Physiol.*, **181**, 410-431, 1965.
2. BERJÓN, A., R. JORDANA y F. PONZ: *Rev. esp. Fisiol.*, **33**, 227-232, 1977.
3. BOLUFER, J., E. ANSELMY y J. LARRALDE: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 267-272, 1973.
4. BRICKER, N. S. y S. KALHAR: *J. Gen. Physiol.*, **49**, 483-499, 1966.
5. CLARKSON, T. W. y A. ROTHSTEIN: *Am. J. Physiol.*, **199**, 898-906, 1960.
6. CSAKY, T. Z. y H. HARA: *Am. J. Physiol.*, **209**, 467-472, 1965.
7. CURRAN, P. F., S. G. SCHULTZ, R. A. CHEZ y R. E. FUZZ: *J. Gen. Physiol.*, **50**, 1261-1270, 1967.
8. HASKELL, J. A. y R. D. CLEMONS: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **65**, 45-55, 1965.

9. HERRERA L. R. JORDANA y F. PONZ: *J. Insect Physiol.*, 23, 677-682, 1977.
10. HILLS, G. J. y D. G. J. IVES: En «References electrodes, Theory and Practice» (D. J. Ives y D. J. Janz, ed.). Academic Press, Nueva York, 1961, p. 127.
11. OSHY, T. y Y. KOMAYSU: *J. Exp. Med.*, 100, 47-59, 1970.
12. HUDSON D. A. y R. J. LEVIN: *J. Physiol.*, 195, 369-385, 1968.
13. IRVINE, H. B. y J. E. PHILLIPS: *J. Insect Physiol.*, 17, 381-383, 1971.
14. JORDANA, R. y F. PONZ: *Rev. esp. Fisiol.*, 25, 225-232, 1969.
15. KENNARD, D. U.: *J. Physiol.*, 120, 39-50, 1953.
16. LLUCH, M. y F. PONZ: *Rev. esp. Fisiol.*, 20, 185-192, 1963.
17. MALUF, N. S. R.: *J. Cell. Comm. Physiol.*, 16, 175-187, 1940.
18. ROBERTSON, J. D.: *J. Exp. Physiol.*, 13, 279-297, 1936.
19. SAITO, Y. y HOSHI, T.: *Jap. J. Physiol.*, 23, 419-434, 1973.
20. SAWADA, M. y T. ASANO: *Am. J. Physiol.*, 204, 105-108, 1963.
21. SCHULTZ, S. G. y R. ZALUSKY: *Natura*, 199, 894-895, 1963.
22. USSING, H. H. y ZERAHN, K.: *Acta Physiol. Scand.*, 23, 110-127, 1951.