

Flujos transmurales de D-galactosa en yeyuno de ratas jóvenes con una nueva cámara de perfusión*

M. Moretó, E. Botey, Juana M. Planas y J. Bolufer**

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Farmacia
08028 Barcelona

(Recibido el 15 de julio de 1983)

M. MORETO, E. BOTEY, J. M. PLANAS and J. BOLUFER. *Transmural Fluxes of D-Galactose in Jejunum from Young Rats in a New Perfusion Chamber*. Rev. esp. Fisiol., 40, 417-414, 1984.

The chamber used allows the simultaneous but separated incubation of two intestinal segments (approximately 4 cm in length) *in vitro* and is especially suited for its application to studies on young animals. Segments are perfused with the help of a peristaltic pump (6 ml/h) without recycling.

D-galactose fluxes across rat jejunum have been studied in everted jejunal segments from 19-21 day-old rats. Transmural fluxes (J_{m}^{Gal}) were determined using four external mucosal galactose concentrations (0.2, 2, 10 and 20 mM). The ratios of passive J_{m}^{Gal} were 1 : 11 : 49.7 : 96.7. Those due to active transport of the substrate were 1 : 7.1 : 14.6 : 18.8, indicating saturation. The active component of total J_{m}^{Gal} fluxes was 80 %, 72 %, 54 % and 44 %, respectively. Comparison of transmural galactose fluxes in noneverted segments from 20 day-old (suckling) and 25 day-old rats, showed that there is a marked reduction in both passive and active components of substrate flux across the intestine at the time of weaning.

Key words: Galactose transport, Rat jejunum.

Existen numerosas técnicas para el estudio experimental de los procesos de difusión y transporte de no electrolitos,

* Realizado con la ayuda económica de la CAYCIT (n.º 3963), Ministerio de Educación y Ciencia, y de un «Ajut a la Investigació Científica» de la Universidad de Barcelona.

** Dirección actual: Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

cada una aplicable a la investigación de problemas concretos. Así, el uso de sistemas simples como los enterocitos aislados y las vesículas de membrana permite, por ejemplo, la determinación de constantes cinéticas sin los inconvenientes que conlleva la utilización de epitelios o tejidos intactos. En contrapartida, las técnicas *in vivo* (7, 12, 13) y algunas técnicas *in vitro* (3, 14, 16) permiten trabajar en condiciones similares a las

fisiológicas y calcular parámetros que no se pueden determinar en modelos más simplificados.

En el presente trabajo se describe una técnica de perfusión intestinal *in vitro* basada en el mismo principio que la descrita por FISHER y PARSONS (3), pero con notables ventajas. Consta de una cámara de metacrilato en la que se pueden incubar simultáneamente dos segmentos intestinales por separado, perfundidos mediante una bomba peristáltica. La técnica ha sido aplicada a la determinación de flujos transmurales de D-galactosa en intestino delgado de rata en el período próximo al destete.

Material y metodos

Cámara. Se ha construido utilizando láminas de metacrilato transparentes, de 2 a 4 mm de espesor (fig. 1). Consta de dos compartimientos de incubación separados por un tabique perforado con sendas aberturas en la parte inferior, destinadas a la oxigenación de las soluciones de incubación. Las zonas laterales e inferior de los compartimientos están sumergidas en una cámara de termostatación por la que circula agua a 37° C. Cada compartimiento de incubación comunica con el exterior por dos orificios, de entrada y salida, de 3 mm de diámetro interno que sirven, respectivamente, para la conexión con una cámara anexa, de calentamiento de las soluciones de perfusión, y para contener los tubos de salida por donde se realiza la toma de muestras de la solución de perfusión. La cámara anexa, intercalada en el mismo circuito que el compartimiento de termostatación, contiene en su interior dos serpentines de tubo Portex[®] conectados a una bomba peristáltica de flujo regulable (Gilson, Minipuls II). En las cámaras de incubación los segmentos intestinales se sujetan en tubos de Teflón[®] que ajustan en los orifi-

cios laterales de la cámara. La longitud máxima de los segmentos que pueden montarse en la cámara es de 4,5 cm.

Animales. Se han utilizado ratas Wistar machos y hembras de edades comprendidas entre 19 y 25 días. Los animales, destetados a partir del día 22, fueron alimentados con pienso estándar U.A.R. tipo A.03. En todos los experimentos los animales fueron utilizados sin ayuno previo.

Soluciones. Como medio de incubación se ha utilizado Krebs-Henseleit bicarbonato, con la siguiente composición (mM): NaCl, 118,5; KCl, 6,2; CaCl₂, 2,5; KH₂PO₄, 1,25; MgSO₄, 1,1; NaHCO₃, 25 (Merck). En algunos experimentos el sodio fue sustituido por colina (Merck) y se adicionó florricina (Sigma) a la concentración 10 μM. Ambas soluciones tienen un pH de 7,4, cuando se equilibran con 5% de CO₂ en O₂.

Substrato. Se ha utilizado D-galactosa (Merck) con D (1-¹⁴C)-galactosa (Amersham) como trazador.

Cuantificación de las muestras. Se disolvieron en un líquido de centelleo a base de tolueno, Tritón X-100 y PPO, y su actividad se determinó en un contador Nuclear Chicago, modelo Mark II.

Método experimental. Se colocan 22 ml de la solución de Krebs en ambos compartimientos de incubación y seguidamente se procede al sacrificio del animal por dislocación cervical. Se extraen unos 15 cm de la porción del intestino delgado correspondiente a yeyuno medio y se lava con solución salina (NaCl 0,9%). El segmento intestinal se evierte (en su caso) y se cortan dos segmentos de unos 4 cm de longitud, que se sujetan a los tubos de Teflón[®] de la cámara. A continuación se inicia la perfusión del

segmento y simultáneamente se adicionan 0,2 ml de solución concentrada de D-galactosa marcada a los 22 ml de medio de incubación que bañan cada segmento intestinal, para que quede a la concentración final adecuada. Las soluciones perfundidas se recogen durante períodos de 5 min y de cada fracción se toman 0,1 ml para la cuantificación de la radiactividad.

La oxigenación de los compartimientos de incubación, así como la de los reservorios de las soluciones de perfusión, se mantiene a lo largo de todo el período de experimentación (usualmente 100 min) con el objeto de mantener la viabilidad del tejido y para asegurar la distribución homogénea del sustrato en la solución. Los compartimientos de incubación se tapan para evitar pérdidas por evaporación.

Al principio y al final de la incubación se toman muestras del medio de incubación para la determinación inicial y final de la actividad específica del sustrato. Una vez terminada la perfusión se extraen los segmentos intestinales que se abren longitudinalmente, se secan con papel de filtro y se pesan. Posteriormente se desecan en una estufa a 90° C hasta peso constante.

Los resultados de los flujos netos transmurales de galactosa se expresan en μmol de sustrato por g de tejido seco cada 5 min.

El tratamiento matemático de los resultados se ha realizado en un microordenador Sharp MZ-80B.

Resultados

Se han realizado dos tipos de experimentos, uno con segmentos intestinales evertidos y otro sin evertir. En el primer caso se utilizan ratas de 19 a 21 días de edad, y se determina los flujos netos de galactosa desde el compartimiento mucosal (externo) hasta el serosal. Las concentraciones iniciales de galactosa en el medio mucosal fueron 0,2, 2, 10 y 20 mM determinándose, en todos los casos, el flujo transmural de galactosa total (J_{ms}^{Gal} total) y el flujo pasivo (J_{ms}^{Gal} pasivo), este último mediante la sustitución en el medio de incubación del sodio por colina y en presencia de florricina 10 μM . En ambas condiciones los flujos de galactosa alcanzan un valor estable a los 20-40 min, dependiendo de la concentración inicial del sustrato.

El ajuste de los valores experimenta-

Tabla I. *Flujos transmurales de D-galactosa desde el compartimiento mucosal al serosal, en yeyuno evertido de rata.*

Cada segmento intestinal se perfunde con Krebs-Henseleit sin galactosa (6 ml/h), sin recirculación. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. En cada segmento, los flujos se calculan a partir de las asíntotas obtenidas ajustando los datos experimentales a ecuaciones hiperbólicas. n = número de experimentos; DP = flujo pasivo del sustrato, determinado en presencia de florricina; TA = flujo debido al transporte activo del sustrato; T = flujo total.

[Mucosal D-galactosa] (mM)	n	J_{ms}^{Gal} ($\mu\text{mol/g}$ tejido seco/5 min)			
		DP	T	TA	TA/DP
0,2	5	0,03 \pm 0,001	0,15 \pm 0,016	0,12 \pm 0,019	4,0
2	6	0,33 \pm 0,04	1,18 \pm 0,08	0,85 \pm 0,07	2,6
10	4	1,49 \pm 0,19	3,24 \pm 0,26	1,75 \pm 0,21	1,2
20	6	2,90 \pm 0,58	5,15 \pm 0,75	2,25 \pm 0,32	0,8

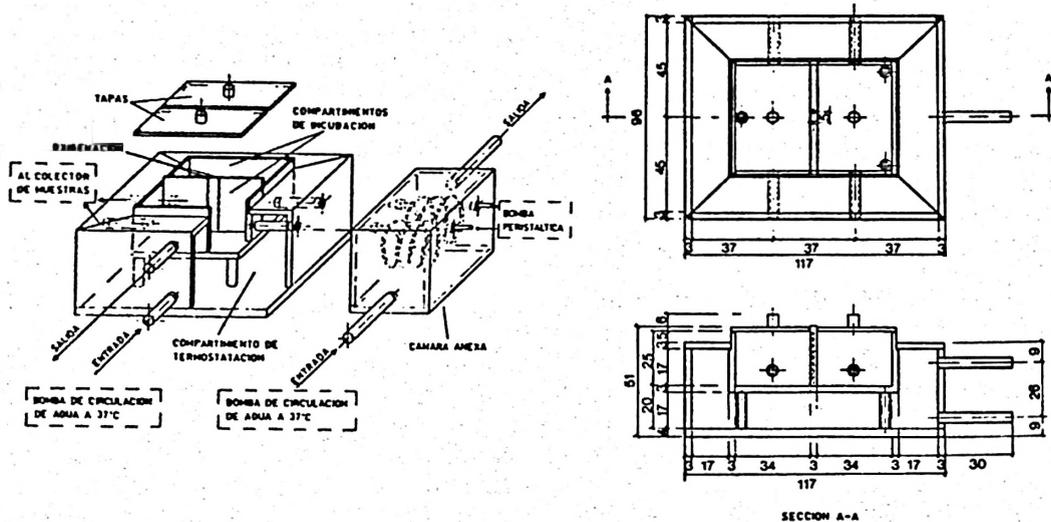


Fig. 1. Cámara de perfusión intestinal. Izquierda: Visión global. Derecha: Visión superior y lateral (sección A-A). Las medidas están expresadas en mm.

les a diversas ecuaciones ha puesto de manifiesto que la curva que mejor se adapta es una hipérbola con una asíntota paralela al eje de las X, de ecuación $(y-A) \cdot X = B$, siendo A el valor de la ordenada en el origen. Los valores de las asíntotas de dichas curvas corresponden, por tanto, a los flujos netos transmurales del monosacárido en el estado estacionario (tabla I). El J_{ms}^{Gal} activo se ha determinado a partir de la curva obtenida restando los valores individuales de los J_{ms}^{Gal} pasivos de los J_{ms}^{Gal} totales. A partir de los valores de J_{ms}^{Gal} activo se han calculado las constantes cinéticas del transporte de galactosa, obteniéndose una V_{max} de $2,6 \mu\text{mol/g tejido seco/5 min}$ y una K_m aparente de $4,1 \text{ mM}$ (fig. 2). En la tabla I se indica también la relación TA/DP correspondiente a la relación entre los J_{ms}^{Gal} atribuibles a procesos activos y pasivos, respectivamente.

En un segundo tipo de experimentos, en segmentos intestinales sin evertir, se determinan los flujos transmurales de galactosa desde el compartimento serosal al mucosal en ratas de 20 y 25 días

de edad. En dichos experimentos el compartimento que se perfunde es el mucosal y el sustrato se añade al medio serosal (compartimento externo) a la concentración de 10 mM . En estas condiciones se determina el flujo neto del monosacárido desde el lado serosal al mucosal (J_{sm}^{Gal}), que será la diferencia entre el J_{sm}^{Gal} pasivo y el J_{sm}^{Gal} activo. El J_{sm}^{Gal} pasivo se determina perfundiendo el

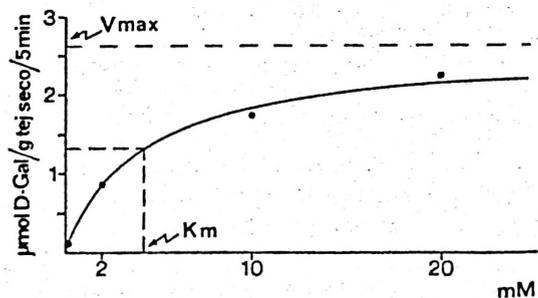


Fig. 2. Relación entre los flujos activos de galactosa y la concentración mucosal del sustrato. La curva se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten con un $r = 0,9967$ ($p < 0,001$). $V_{max} = 2,6 \mu\text{mol/g tejido seco/5 min}$; $K_m = 4,1 \text{ mM}$.

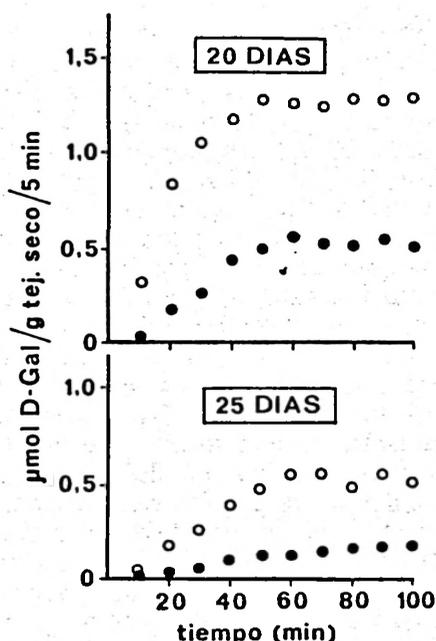


Fig. 3. Flujos netos serosal-mucosal de D-galactosa en yeyuno no evertido de rata con (○) o sin (●) inhibición del transporte activo.

La concentración inicial de galactosa en el medio serosal fue de 10 mM. Cada punto es la media de 4 experimentos.

segmento con un medio en el que se ha sustituido el sodio por colina y con florricina 10 μ M (figura 3). Los flujos transmurales de galactosa tardan más en estabilizarse (unos 50 min) que en los experimentos con segmentos evertidos, debido a que el J_{ms}^{Gal} activo del substrato va en sentido opuesto al flujo pasivo del mismo. Los flujos transmurales calculados mediante el ajuste matemático de las curvas en las distintas condiciones experimentales se muestran en la tabla II, hallándose marcadas diferencias en los flujos pasivos y activos de galactosa en ambos grupos de animales.

Discusión

En el presente trabajo se han determi-

Tabla II. Flujos transmurales de D-galactosa en yeyuno no evertido de rata.

Cada segmento intestinal se perfunde con Krebs-Henseleit sin galactosa (6 ml/h), sin recirculación. La concentración del substrato en el medio serosal es 10 mM y los resultados se expresan como media \pm error estándar. Número de experimentos por grupo = 4. DP: flujo serosal-mucosal (J_{sm}^{Gal}) pasivo, determinado en presencia de florricina en el lado mucosal; DP-TA: flujo serosal-mucosal del substrato determinado en ausencia de inhibidor del transporte activo. En estas condiciones el flujo neto es menor, debido a que el flujo atribuible al transporte activo (TA) de galactosa va en sentido opuesto (J_{ms}^{Gal}) al flujo pasivo de la misma. Todos los flujos se calculan a partir de las asíntotas obtenidas ajustando los datos experimentales a ecuaciones hiperbólicas.

Edad (días)	J_{ms}^{Gal} (μ mol/g tejido seco/5 min)		
	J_{sm}^{Gal}		J_{ms}^{Gal}
	DP	DP-TA	TA
20	1,31 \pm 0,12	0,48 \pm 0,11	0,83 \pm 0,14
25	0,51 \pm 0,07	0,10 \pm 0,01	0,37 \pm 0,08

nado los flujos transmurales de galactosa en una cámara de perfusión de diseño propio y en condiciones que permiten la separación de los flujos transmurales pasivos de los debidos a procesos de transporte activo.

Dada la longitud de los segmentos intestinales que se utilizan en las cámaras (aproximadamente 4 cm), la velocidad de perfusión tiene que ser necesariamente lenta. En experimentos preliminares se eligió la velocidad de flujo de 6 ml/h porque en estas condiciones los flujos transmurales de substrato reflejan, con elevada sensibilidad, los cambios inducidos en la concentración externa del mismo. Por otra parte, la lenta velocidad de perfusión permite que los flujos netos se estabilicen en un tiempo razonable. Ello se consigue a los 20-40 min del comienzo de la perfusión, cuando los flujos activos y pasivos del substrato entre los compartimientos, mucosal, tisular y serosal alcanzan un

equilibrio dinámico. El tratamiento matemático de dichos procesos es complejo, por lo que se ha optado por calcular el valor del flujo mediante la asíntota del eje de las X de la hipérbola definida por todos los valores experimentales. Dicho valor es fácil de determinar y da, en definitiva, idea de la permeabilidad pasiva o de la capacidad de transporte activo del segmento estudiado. Otro aspecto que cabe mencionar de la técnica es que el compartimiento de incubación tiene un volumen grande respecto al volumen de líquido en el interior del intestino. Por esta razón puede considerarse que la concentración exterior del substrato se mantiene constante durante tiempos prolongados, si bien la concentración del mismo en el líquido que perfunde varía y con ello el gradiente. Es de destacar que en estas condiciones experimentales dicho gradiente siempre es favorable al paso del monosacárido desde el compartimiento externo al de perfusión.

Los resultados de los experimentos realizados con segmentos intestinales evertidos procedentes de ratas de 19 a 21 días, indican que los J_{ms}^{Gal} pasivos y activos dependen de la concentración inicial del monosacárido en el medio mucosal. La relación de los J_{ms}^{Gal} pasivos obtenida con galactosa 0,2, 2, 10 y 20 mM es 1: 11: 49,7: 96,7 respectivamente, proporción similar a la relación de concentraciones iniciales de substrato (1: 10: 50: 100). Ello muestra que existe una proporción directa entre el flujo y la concentración del substrato, como cabe esperar de un proceso pasivo. La relación entre los J_{ms}^{Gal} debidos al transporte activo de la galactosa es de 1: 7,1: 14,6: 18,8 a las concentraciones de substrato mencionadas, como corresponde a un proceso saturable. Del cálculo de constantes cinéticas cabe destacar que en este trabajo se ha determinado una Km para la galactosa de 4,1 mM, valor inferior al de 35 mM obte-

nido por FISHER y PARSONS (4). Esta diferencia puede deberse en parte a la mayor afinidad de las hexosas por el transportador observada en animales lactantes, comparado con la de animales adultos (11, 17). La relación TA/DP, entre flujos activos y pasivos (tabla I), disminuye al aumentar la concentración externa del substrato, siendo el componente activo del 80 % del J_{ms}^{Gal} total con galactosa 0,2 mM y del 72 %, 54 % y 44 % con el substrato a 2, 10 y 20 mM, respectivamente. Estos resultados confirman la importancia del componente de difusión en la absorción intestinal de los monosacáridos, similar al componente activo con galactosa 10 mM y superior al mismo con el substrato a la concentración de 20 mM. Estos resultados concuerdan con los hallados en intestino de rata *in vivo* por otros autores (5, 8) y refuerzan la hipótesis de que cuando el substrato se halla en el lumen a una concentración superior a la del plasma, la difusión pasiva tiene un papel significativo. Por otra parte, el transporte activo tiene la función de asegurar la completa absorción de los monosacáridos cuando éstos se hallan a baja concentración en la luz intestinal, así como la de reabsorber la glucosa secretada en los periodos interdigestivos.

Una de las ventajas de las técnicas *in vitro* es poder realizar estudios de difusión de un substrato desde el compartimiento serosal al mucosal. En el presente trabajo se ha aplicado esta metodología al estudio de la permeabilidad intestinal a la D-galactosa en ratas lactantes de 20 días de edad y en ratas de 25 días alimentadas con pienso estándar. La diferencia entre los J_{sm}^{Gal} obtenidos con o sin inhibición del transporte activo es más marcada en los animales de 20 días, lo que está de acuerdo con anteriores resultados (9) en que la capacidad de transporte contra gradiente es mayor en animales lactantes que en destetados. Estos cambios funcionales

coinciden con marcados cambios estructurales del epitelio, caracterizados por una disminución de la fluidez de la membrana del enterocito (1). La mayor cohesión de los componentes de la membrana puede explicar la disminución de los flujos pasivos transmurales de galactosa en ratas de 25 días respecto a las de 20 días. Por otra parte, dado que una fracción del movimiento transmural por difusión de los monosacáridos es paracelular (2, 6), no puede descartarse un aumento de la «firmeza» de las uniones estrechas intercelulares coincidente con el cambio de dieta en la edad del destete.

La técnica descrita es útil en estudios de absorción intestinal *in vitro*, ya que los resultados obtenidos son similares a los de otras técnicas más experimentadas. Presenta las siguientes ventajas: posibilidad de medir flujos transmurales en ambos sentidos, velocidad de perfusión y temperatura de incubación regulables con precisión, fácil acceso al compartimiento de incubación y que el tejido se mantiene viable durante un tiempo prolongado. Por su diseño, la cámara es de fácil manejo, siendo especialmente adecuada para estudios en intestinos de pequeño diámetro.

Resumen

Se estudian los flujos transmurales de D-galactosa por yeyuno de ratas jóvenes, mediante una cámara de perfusión que permite la incubación simultánea de dos segmentos intestinales, de unos 4 cm de longitud. La perfusión se realiza a una velocidad de 6 ml/h, sin reciclado de la solución. Con segmentos intestinales evertidos de ratas de 19-21 días de edad y concentraciones mucosales de sustrato de 0,2, 2, 10 y 20 mM, la relación de flujos J_{ms}^{Gal} pasivos fue de 1: 11: 49,7: 96,7, mientras que en los J_{ms}^{Gal} activos fue de 1: 7,1: 14,6: 18,8, indicando saturación. El componente

activo representa el 80 %, 72 %, 54 % y 44 % del flujo total, respectivamente.

La comparación de los flujos transmurales entre segmentos intestinales sin evertir, de ratas de 20 días (lactantes) y de 25 días de edad, indica que hay una significativa reducción tanto del componente activo como del pasivo en la edad del destete.

Bibliografía

1. BOUHOURS, D. y BOUHOURS, J. F.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 299-304, 1983.
2. BOYD, C. A. R. y PARSONS, D. S.: *J. Physiol., London*, **287**, 371-391, 1979.
3. FISHER, R. B. y PARSONS, D. S.: *J. Physiol., London*, **110**, 36-46, 1949-50.
4. FISHER, R. B. y PARSONS, D. S.: *J. Physiol., London*, **119**, 224-232, 1953.
5. ILUNDAIN, A., LLUCH, M. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 359-366, 1979.
6. MUNCK, B. G. y RASMUSSEN, S. N.: *J. Physiol., London*, **271**, 473-488, 1977.
7. MUSACCHIA, X. J.: En «Experiments in Physiology and Biochemistry» (Kerkut, G. A., ed.). Academic Press, Nueva York, 1968, vol. 1, pp. 379-388.
8. ORTIZ, M., VÁZQUEZ, M., LLUCH, M. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **38**, 131-141, 1982.
9. PLANAS, J. M., MORETÓ, M. y BOLUFER, J.: *Experientia*, **37**, 864-865, 1981.
10. ROBINSON, J. W. L. y ANTONIOLI, J. A.: *Gastroenterol. Clin. Biol.*, **4**, 78-86, 1980.
11. SCHARRER, E., LIEBICH, H. G., RAAB, W. y PROMBERGER, N.: *Zbl. Vet. Med.*, **26**, 95-105, 1979.
12. SHEFF, M. F. y SMYTH, D. H.: *J. Physiol., London*, **128**, 67 P, 1955.
13. SOLS, A. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **3**, 207-211, 1947.
14. USSING, H. H. y ZERAHN, K.: *Acta Physiol. Scand.*, **23**, 110-127, 1951.
15. VINARDELL, M. P. y BOLUFER, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **39**, 193-196, 1983.
16. WILSON, T. H. y WISEMAN, G.: *J. Physiol., London*, **123**, 116-125, 1954.
17. YOUNOSZAI, M. K.: *J. Pediatr.*, **85**, 446-448, 1974.

