

Departamento de Fisiología y Bioquímica (C.S.I.C.)
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona)

Observaciones al método de Wilson y Wiseman para el estudio del transporte activo de azúcares por el intestino de rata *in vitro*

por

J. Nadal* y F. Ponz

(Recibido para publicar el 15 de abril de 1965)

Uno de los métodos más utilizados en los últimos años para el estudio *in vitro* de la absorción intestinal ha sido el de WILSON y WISEMAN (7) que como es bien conocido consiste en el empleo de pequeños segmentos de intestino evertido (al que se ha dado la vuelta) y cuyo interior (lado serosal) se llena con una solución que queda encerrada dentro del saco por dos ligaduras en sus extremos. Los sacos se suspenden en un medio exterior (mucosal). Las ventajas que ofrece son la simplicidad en operaciones y equipo (un erlenmeyer y un baño termostático), la facilidad con que se producen cambios de concentración en el espacio serosal por el pequeño volumen que tiene y las buenas condiciones de acceso del oxígeno a las células epiteliales.

Con el fin de analizar el efecto de diversos agentes sobre el transporte activo de azúcares hicimos uso de este método y en su aplicación a las ratas hemos realizado algunas observaciones y modificaciones que puede ser útil dar a conocer.

Material y métodos

Se han utilizado ratas blancas de 100 a 160 gr de peso, de ambos sexos, mantenidas en ayuno de 24 horas.

La realización de la técnica de absorción se ha hecho según la descripción original de los autores (7), salvo las especificaciones que se señalan. Los segmentos se tomaron siempre del yeyuno, a partir del extremo proximal y se mantenían en solución Krebs-Ringer-Bicarbonato libre de azúcar y en frío (unos 6° C) hasta el comienzo del experimento. Con cierta práctica, se consiguió que el peso fresco de los segmentos fuera bastante uniforme entre los 180 y 200 miligramos. Con estas características de tamaño se disponían siempre, mediante jeringa 0,3 ml de solución ahora ya con azúcar en el interior (serosal) del saco. También se introducía una burbuja de carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂) de 0,1 ml. El volumen del medio mu-

* Trabajo realizado con la ayuda de una beca de Protección Escolar.

cosal fue siempre de 5 ml de solución Krebs-Ringer-Bicarbonato con azúcar, en matraces Erlenmeyer de 50 ml de capacidad. La gasificación se ha hecho por burbujeo de gas carbógeno en cada uno de los matraces, a flujo constante de $8 \pm 0,2$ l/hora, conseguido desde envase a presión y regulado mediante gasómetro Afora 8508/2 calibrados en el laboratorio.

El montaje de los distintos sacos se hacía con la mayor rapidez posible, de modo que el tiempo O para cada uno de ellos comenzaba ordinariamente con una diferencia de unos 3 minutos entre dos consecutivos.

Los matraces se mantenían en baño termorregulado a $38^{\circ} C \pm 0,2$. La media del volumen serosal inicial y final se hacía por pesada. Para ello se determinaba el peso del saco vacío (P_0), el del saco lleno inmediatamente antes de comenzar el experimento (P_1) y el del saco lleno al final del mismo (P_2). Estos pesos se obtenían después de eliminar el líquido exterior retenido entre las vellosidades, mediante suave aplicación del saco sobre papel del filtro. Como volumen serosal inicial se ha tomado $P_1 - P_0$ y como volumen serosal final, $P_2 - P_0$. La diferencia de densidad entre el líquido serosal y el agua es suficientemente pequeña para permitir no hacer la correspondiente corrección. $P_2 - P_1$ daba una medida de la transferencia de agua entre el lado mucosal y el serosal.

El volumen mucosal inicial fue siempre de 5 ml. El final era ligeramente menor, debido fundamentalmente a la evaporación.

La concentración inicial de azúcar era la misma en ambos lados mucosal y serosal. La final se determinaba para ambos compartimentos.

El azúcar se valoró fotométricamente según SOMOGYI (6) y frente a tres concentraciones patrón que abarcaban las concentraciones problema.

Podían así determinarse los volúmenes

serosal y mucosal iniciales y finales, las concentraciones inicial y final de azúcar en el líquido serosal y mucosal y el cambio de volumen de agua en el lado serosal. Ocasionalmente se ha determinado también el volumen mucosal final por diferencias de pesada.

Discusión del método

1. CAMBIOS DE PESO DEL SACO DEBIDOS A LA EVAPORACIÓN

Supone variaciones de escasa importancia si se procura dejar siempre intervalos de tiempo entre las operaciones aproximadamente iguales. Diferencias de 2 minutos en realizar pesadas de un mismo saco expuesto al aire de la habitación, representaron diferencias entre 1,5 y 2,2 mg., lo mismo fueran vacíos o llenos, lo que sólo influye en la medida de volumen serosal de modo despreciable (1,5 a 2,2 μ l.).

2. CAMBIOS DE PESO DEBIDOS A DIFERENCIAS EN EL SECADO DEL INTestino SOBRE PAPEL DE FILTRO

Antes de cada pesada se elimina el agua que empapa exteriormente el saco por apoyo suave en papel de filtro. Si se toma un mismo saco vacío y se pesa de este modo, y luego se vuelve a sumergir en el medio y se repite la operación, se obtienen apreciables diferencias de peso. En distintos casos y con diferentes sacos se ha podido estimar que el modo de realizar el secado del saco es causa de un cierto error que puede evaluarse en aproximadamente un $\pm 7\%$ respecto del peso del saco vacío, lo que representa en la medida del volumen serosal final un error de un orden similar.

3. PÉRDIDAS DE TEJIDO DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL

Durante el tiempo experimental tiene lugar una cierta pérdida de material ce-

lular del saco, debido a efectos naturales y mecánicos de descamación, que se evaluaron por centrifugación del líquido al final del experimento. Suponen menos de un 5 % del peso inicial del intestino.

4. ERRORES EN LA EVALUACIÓN DEL VOLUMEN SEROSAL

Se han encontrado diferencias en el volumen serosal final, según se midiere por diferencias de pesada, como se ha indicado ($P_2 - P_0$), o por vaciado del contenido sobre vidrio de reloj tarado y pesada de éste con el líquido drenado. Por este último procedimiento se deducían valores algo más altos que por el primero. Esto puede atribuirse a pérdidas de tejido durante el experimento, a drenado de líquido serosal junto con alguna pequeña cantidad de líquido mucosal, etc. Las diferencias podrán alcanzar hasta un 15 %. El conjunto de estos diferentes factores que influyen en la medida de volumen serosal inicial y final en proporción variable, hace que estos valores vengán afectados de un conjunto de errores que limitan notablemente la posibilidad de hacer deducciones sobre transferencias absolutas de agua o de azúcar entre mucosal y serosal. Los resultados sobre estas magnitudes no pueden considerarse precisas, sino simplemente orientadoras.

5. PÉRDIDAS DE VOLUMEN MUCOSAL DURANTE EL EXPERIMENTO

En nuestro caso, operando con matraces abiertos para gasificación continua, los volúmenes mucosales han disminuído a lo largo del tiempo por evaporación del agua. Esta pérdida supone, en nuestras condiciones de trabajo, de 0,25 a 0,35 ml. en experimentos de 60 minutos. Determinaciones cuidadosas durante 90 minutos de mantenimiento de los matraces a la temperatura del baño con burbujeo constante de gas carbógeno han revelado una buena linealidad de la pérdida de

peso por evaporación en función del tiempo. Esto explica que cuando se trabaja con azúcares poco o nada utilizables por el tejido, las concentraciones finales de azúcar pueden ser algo mayores que las iniciales. Con 5 ml. de solución inicial 5 mM, si se pierde por evaporación 0,35 ml de agua, la solución final puede quedar en 5,38 mM.

6. TIEMPO DE ESPERA HASTA LA UTILIZACIÓN DE LOS SACOS

Los sacos de intestino, conservados en Krebs-Ringer-Bicarbonato sin sustrato, pueden esperar cierto tiempo a ser utilizados. Sin embargo, si se conservan a la temperatura de la habitación (18-20°), la capacidad de transporte ya disminuye mucho en una hora. A 6-9° C pueden, en cambio, mantenerse durante casi dos horas sin apreciable disminución de la capacidad de transporte activo.

7. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN Y DE LA NATURALEZA DEL AZÚCAR

El intestino de rata presenta una buena capacidad de transporte activo de azúcares con este método, aunque es inferior a la que se encuentra en el hamster, como ya fue observado. El gradiente de concentración serosal/mucosal que se desarrolla depende de la naturaleza del azúcar y de su concentración.

Con glucosa 2 a 5 mM se encuentran gradientes S/M algo mayores que con galactosa a iguales concentraciones. Aparte de diferencias de afinidad entre ambos azúcares respecto del sistema de transporte, un factor que influye es la notable cantidad de glucosa utilizada y transformada por el tejido, que determina descensos importantes de concentración en el medio mucosal. Estos descensos no aparecen cuando se trabaja con galactosa, que se metaboliza muy débilmente (1, 2, 5), ni cuando se parte de glucosa 20 mM en que el consumo su-

TABLA I

Valores de desviación típica (σ) y error típico de la media (ϵ) correspondientes a los gradientes de concentración S/M en experimentos de transporte activo de azúcares por sacos evertidos de yeyuno de rata, según se utilicen 1, 2 ó 4 sacos de un mismo animal, σ y ϵ se expresan en por ciento de la media respectiva.

| Azúcar | Concentración | N.º de sacos | | σ | ϵ |
|-----------|---------------|--------------|------------|----------|------------|
| | | Totales | Por animal | | |
| glucosa | 2 mM | 21 | 1 | 51,85 | 11,7 |
| glucosa | 2 mM | 8 | 2 | 11,7 | 5,85 |
| glucosa | 5 mM | 24 | 2 | 10,— | 2,9 |
| glucosa | 20 mM | 20 | 2 | 3,8 | 1,1 |
| galactosa | 5 mM | 36 | 2 | 9,9 | 2,3 |
| galactosa | 20 mM | 8 | 4 | 0 | 0 |
| galactosa | 5 mM | 24 | 8 | 15,6 | 5,9 |

pone sólo muy débiles variaciones de concentración mucosal.

Si se comparan los gradientes obtenidos partiendo de glucosa o galactosa 20 mM con los que se encuentran operando con concentraciones iniciales más bajas (5 mM), se observa que a concentraciones altas los gradientes son menores, de acuerdo con lo que cabe esperar al seguir el transporte activo una cinética de saturación (3, 4).

8. VARIABILIDAD CORRESPONDIENTE A DIFERENTES ANIMALES Y ENTRE SACOS DE UN MISMO INTESTINO

La capacidad de transporte activo de glucosa expresada por la relación de concentraciones finales serosal/mucosal, muestra notable variabilidad individual. En experimentos con glucosa de 2 mM inicial se obtuvo un cociente serosal/mucosal medio de 5,44 con $\sigma \pm 2,8$ y error standard de la media $\epsilon = \pm 0,63$. Si la media set oma como 100, $\sigma = \pm 51,8\%$ y $\epsilon = \pm 11,7\%$. Como se ve, los valores presentaron amplia dispersión, con un margen de 10,4 entre 1,4 y 11,8. Resulta así difícil poder demostrar diferencias significativas entre 2 valores medios, como no sean muy marcados, tales como cuando se comparan controles con sacos en anaerobiosis o en otras condiciones

que afecten en alto grado al metabolismo y supriman prácticamente la capacidad de transporte activo.

En cambio, sacos preparados del mismo intestino y de una misma región — a partir de una misma longitud de 20 a 30 cm. de yeyuno — muestran mucha mayor coincidencia de resultados. Con glucosa 2, 5 y 20 mM. se han encontrado dispersiones del cociente S/M de 2, 4 u 8 sacos tomados de un mismo animal mucho menores que cuando se trata de sacos de animales diferentes. Para referir estadísticamente estos resultados de modo que sólo quede implicada la variabilidad de los sacos de un mismo intestino y no la debida al empleo de distintos animales, se ha acudido al artificio de referir en cada animal los valores de los distintos sacos en por ciento de la medida aritmética respectiva. De este modo, la media aritmética de todos los sacos de todos los animales será de 100 y la desviación típica dará buena idea de la dispersión global, siempre expresada en tanto por ciento.

Los resultados obtenidos en un cierto número de experimentos, expresados como se acaba de indicar, se recogen en la tabla I. como de ella se deduce, la desviación típica referida a cien correspondiente al comportamiento de sacos de un

mismo animal no es superior a $\pm 15,6\%$.

9. ESTUDIO DE DIFERENCIAS EN LA CAPACIDAD DE TRANSPORTE POR VARIACIÓN DE ALGUNA CONDICIÓN EXPERIMENTAL

De acuerdo con lo que acaba de indicarse, resulta difícil comparar diferencias debidas a algún factor experimental que se quiera investigar, mediante la obtención de los valores medios correspondientes a una y otra condición y análisis del significado estadístico de tal diferencia, puesto que las desviaciones típicas por el uso de diversos animales serán siempre altas y enmascararán las debidas a la condición experimental en estudio. Sólo en caso de diferencias muy grandes (p. ej. transporte activo o no transporte activo), será posible encontrar significación.

Es preferible operar de modo que se utilicen varios sacos tomados de posiciones adyacentes de intestino, — 2,4,6,8 — empleando con cada animal una parte de ellos para estudiar el transporte en condición control (c) y otra parte para ver el transporte en la condición a investigar (P). El mismo experimento se habrá de repetir con un número suficiente de animales. Si los resultados con cada saco se expresan en por ciento del valor de la media aritmética correspondiente a los sacos testigo del mismo animal, se podrá ahora calcular la media aritmética de todos los sacos testigo que será 100, con su desviación típica, y la media de todos los sacos problema también con su desviación típica. La diferencia entre ambas medias, expresada en tanto por ciento de aumento o disminución respecto de los testigos, será así fácilmente analizada en cuanto a su significación estadística. De este modo puede alcanzarse una sensibilidad de la técnica notablemente mayor, que permite distinguir diferencias a partir de un 25 %.

Como la inhibición total (100 %) del transporte activo corresponde a un gradiente S/M de 1, la expresión de las inhibiciones resulta más adecuada comparando no directamente los gradientes sino las relaciones $\frac{S-M}{M}$.

Resumen

Se discuten algunos aspectos relativos al uso del método de Wilson y Wiseman para estudio del transporte activo de azúcares por el intestino de rata *in vitro*.

Dificultades en la reproducibilidad de las pesadas de los sacos por diversos factores, afectan al cálculo del volumen serosal inicial y final, lo que limita en cierto grado las deducciones acerca de movimiento de líquido y de azúcar entre ambos compartimentos, que sólo pueden considerarse orientadoras. Tiene, sin embargo, pleno significado para demostrar la producción o no de gradientes de concentración.

La comparación de capacidades de transporte activo en dos condiciones experimentales diferentes se puede hacer mejor con sacos contiguos de un mismo intestino. Se da un procedimiento para calcular la significación estadística de las diferencias en por ciento de la capacidad testigo, a partir de datos de un mismo tipo de experimento practicado con un grupo de animales, soslayando la variabilidad en la capacidad normal debida a diferentes animales.

Summary

Observations on the Wilson and Wiseman method for the study of the active transport of sugars through the intestine of the rat *in vitro*

This is a discussion of certain aspects which are relative to the use of the Wilson & Wiseman method for the study of the active transport of sugars through the intestine of the rat *in vitro*.

Difficulties in reproducing the weights of the sacs according to various factors

have affected the calculation of the initial and final serosal volume, and this limits to some degree the deductions reached as to the movement of liquid and sugar between the two compartments, which can only be considered as a help in «finding one's bearings». This, however, is quite significant in that it shows production or non-production of gradients of concentration.

A comparison of the capacities of active transport of two different experimental conditions can be more effectively made with contiguous sacs of the same intestine. Thus we have a procedure for calculating the statistical significance of the percentage differences of the evidential capacity, starting from data of the same type of experiment practised on a group of animals, and

leaving on one side the variability in normal capacity due to different animals.

Bibliografía

- (1) BALASCH, J. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **19**, 177, 1963.
- (2) CRANE, R. K. and MANDELSTAM, P. : *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 460-476, 1960.
- (3) FISHER, R. B. and PARSONS, D. S. : *J. Physiol.*, **119**, 210-223, 1953.
- (4) FISHER, R. B. and PARSONS, D. S. : *J. Physiol.*, **119**, 224-232, 1953.
- (5) LANDAU, B. R. and WILSON, T. H. : *J. Biol. Chem.*, **234**, 749-753, 1959.
- (6) SOMOGYI, M. : *J. Biol. Chem.*, **160**, 69, 1945.
- (7) WILSON, T. H. and WISEMAN, G. : *J. Physiol.*, **123**, 116-125, 1954.
- (8) WILSON, T. H. and VINCENT, T. N. : *J. Biol. Chem.*, **216**, 851-866, 1955.