



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi histològic i del transport de manosaçàrids dels segments cecals del pollastre

Ruth Ferrer i Roig



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència *Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.*

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia *Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.*

This doctoral thesis is licensed under the *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.*

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

ESTUDI HISTOLÒGIC I DEL TRANSPORT DE MONOSACÀRIDS
DELS SEGMENTS CECALS DEL POLLASTRE

Tesi presentada per la Llda.
Na Ruth Ferrer i Roig, per a
optar al grau de Doctor en
Farmàcia.

Aquest treball ha estat dirigit
per la Dra. Joana M. Planas i
Rosselló i pel Dr. Miquel Moretó
i Pedragosa, Professors Titulars
de Fisiologia.

Barcelona, juny de 1985

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083997



LABORATORIO DE FISILOGIA ANIMAL
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA
BARCELONA-28
(ESPAÑA)

Na JOANA M. PLANAS I ROSSELLO i En MIQUEL MORETO I PEDRAGOSA,
Professors Titulars de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia
de la Universitat de Barcelona,

CERTIFIQUEN: Que la Memòria titulada "ESTUDI HISTOLÒGIC I DEL
TRANSPORT DE MONOSACÀRIDS DELS SEGMENTS CECALS
DEL POLLASTRE" presentada per Na RUTH FERRER I
ROIG per a optar al Grau de Doctor en Farmàcia,
ha estat realitzada sota la nostra direcció al
Departament de Fisiologia Animal d'aquesta Facul-
tat i, considerant-la conclosa, autoritzem la seva
presentació per a ser jutjada pel Tribunal corres-
ponent.

I perquè consti, signo la present a Barcelona, el
vint-i-set de juny de mil nou-cents vuitanta-cinc.

Joana M. Planas

Dra. Joana M. Planas

Dr. Miquel Moretó

Vull expressar el meu agraïment a la Dra. Joana M. Planas i al Dr. Miquel Moretó per la direcció d'aquesta Tesi. Ells m'han permès participar en els seus projectes i il·lusions i gràcies a la seva vàlua científica hem aconseguit desenvolupar aquest treball devers el fi desitjat.

Al Dr. Antonio Torralba per haver posat a la nostra disposició tots els mitjans necessaris.

A la Dra. Mercè Durfort, perquè gràcies als seus ensenyaments he pogut veure d'aprop l'intestí de pollastre.

Al Dr. Joaquim Brufau, per haver-nos proporcionat els pollastres i per la seva orientació i ajut en la recia dels animals.

Al Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona i molt especialment al Dr. Robert Barga-lló, al Dr. Ramon Fontarnau i al Dr. Jordi López, per haver-nos acostat al món de la ultraestructura.

No voldria deixar de regraduar en Joaquín Ariño, en Pere G. Demestres, en Josep Garcia, el Dr. Antonio Garfia, n'Elena Sagristà i na M. Carme Villà, per tot l'ajut que d'ells he rebut.

I a tots els companys del Departament i en especial a tots els que formen part del grup d'absorció intestinal, perquè han estat per a mi un suport sense el qual hauria estat molt difícil de treballar.

Aquest treball ha estat subvencionat per l'ajut n. 3099-83 de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Educación y Ciencia i per un Ajut per a l'Acabament de la Tesi Doctoral del Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya.

INDEX

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	1
2. HISTOLOGIA DE L'INTESTÍ DE POLLASTRE	4
2.1. <u>MATERIAL I MÈTODES</u>	8
2.1.1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	8
2.1.2. APARELLS	8
2.1.3. REACTIUS I PRODUCTES	10
2.1.4. OBSERVACIÓ MACROSCÒPICA DEL TEIXIT	10
2.1.4.1. <u>Momificació del teixit</u>	10
2.1.5. OBSERVACIÓ MICROSCÒPICA DEL TEIXIT	10
2.1.5.1. <u>Microscòpia electrònica de rastreig (MER)</u> ...	10
2.1.5.2. <u>Microscòpia electrònica de transmissió (MET)</u> .	11
2.1.5.3. <u>Microscòpia òptica (MO)</u>	12
2.1.5.4. <u>Tractament estadístic dels resultats</u>	12
2.2. <u>RESULTATS</u>	12
2.2.1. ANATOMIA MACROSCÒPICA	12
2.2.1.1. <u>Llargària dels cecs</u>	12
2.2.1.2. <u>Morfologia de la superfície luminal dels cecs</u>	13
2.2.2. ANATOMIA MICROSCÒPICA	13
2.2.2.1. <u>Microscòpia electrònica de rastreig</u>	15
2.2.2.1.1. Jejú	15
2.2.2.1.2. Ili	15
2.2.2.1.3. Unió ili-cec-recte	17
2.2.2.1.4. Recte	17
2.2.2.1.5. Cec	17
2.2.2.1.5.1. Cec proximal	17
2.2.2.1.5.2. Cec medial i distal	19
2.2.2.2. <u>Microscòpia òptica</u>	21
2.2.2.3. <u>Microscòpia electrònica de transmissió</u>	26
2.2.2.3.1. Cèl.lules principals	26

2.2.2.3.2. Unions intercel·lulars	36
2.2.2.3.3. Cèl·lules caliciformes o cèl·lules de goblet	38
2.2.2.3.4. Cèl·lules endocrines	38
3. ABSORCIÓ INTESTINAL DE MONOSACÀRIDS	44
3.1. <u>REVISIÓ DE LES CARACTERÍSTIQUES DE L'ABSORCIÓ INTESTINAL DE MONOSACÀRIDS</u>	45
3.1.1. TRANSPORT MITJANÇAT CONCENTRATIU	46
3.1.1.1. <u>Acoblament energètic del transport actiu</u>	51
3.1.1.2. <u>Mecanisme del cotransport de monosacàrids i Na⁺</u>	55
3.1.2. TRANSPORT MITJANÇAT EQUILIBRATIU	68
3.1.3. CINÈTIQUES DELS TRANSPORTS MITJANÇATS	69
3.1.4. DIFUSIÓ SIMPLE	72
3.1.5. IMPORTÀNCIA DE LES TRES VIES EN L'ACUMULACIÓ DE MONOSACÀRIDS	72
3.2. <u>AÏLLAMENT DE CÈL·LULES EPITELIALS INTESTINALS</u> ...	73
3.2.1. TÈCNiques D'AÏLLAMENT	74
3.2.1.1. <u>Mètodes mecànics</u>	74
3.2.1.2. <u>Mètodes químics i enzimàtics</u>	76
3.2.2. PROVES DE VIABILITAT	79
3.3. <u>MATERIAL I MÈTODES</u>	81
3.3.1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	81
3.3.2. APARELLS	81
3.3.3. REACTIUS I PRODUCTES	82
3.3.4. AÏLLAMENT DE LES CÈL·LULES EPITELIALS INTESTINALS	84
3.3.4.1. <u>Obtenció dels segments de cec i jejú</u>	84
3.3.4.2. <u>Incubació del teixit en el medi d'aïllament</u> .	85
3.3.4.3. <u>Rentat de la suspensió cel·lular</u>	87
3.3.4.4. <u>Quantificació de la proteïna cel·lular</u>	90
3.3.5. PROPIETATS DELS ENTEROCITS AÏLLATS	91
3.3.5.1. <u>Integritat de la membrana cel·lular</u>	91

3.3.5.2.	<u>Consum d'oxigen</u>	92
3.3.5.3.	<u>Producció d'àcid làctic</u>	93
3.3.5.4.	<u>Nivells d'ATP</u>	94
3.3.5.5.	<u>Acumulació d'α-metil-D-glucòsid com a índex de viabilitat</u>	95
3.3.6.	ACUMULACIÓ DE MONOSACÀRIDS EN CÈL.LULES AÏLLADES.	95
3.3.6.1.	<u>Centrifugació en fred</u>	96
3.3.6.2.	<u>Centrifugació a través d'olis inerts</u>	97
3.3.6.3.	<u>Determinació de la radioactivitat</u>	102
3.3.6.4.	<u>Determinació del volum cel.lular</u>	103
3.3.6.5.	<u>Expressió del resultats</u>	103
3.3.7.	PREPARACIÓ DE LES SUSPENSIONS CÈL.LULARS PER A LA SEVA OBSERVACIÓ AL MER I MET	104
3.3.8.	TRACTAMENT ESTADÍSTIC DELS RESULTATS	104
3.4.	<u>RESULTATS</u>	104
3.4.1.	ACUMULACIÓ DE 3-OXI-METIL-D-GLUCOSA PER ENTERÒCITS CECALS AÏLLATS AMB HIALURONIDASA: EXPERIMENTS PREVIS	104
3.4.2.	PROPIETATS DELS ENTERÒCITS AÏLLATS AMB TRES MÈTODES DIFERENTS. RECERCA DE LA TÉCNICA IDÒNIA PER A L'AÏLLAMENT D'ENTERÒCITS CECALS	105
3.4.2.1.	<u>Integritat de la membrana cel.lular</u>	108
3.4.2.2.	<u>Consum d'oxigen</u>	110
3.4.2.3.	<u>Producció d'àcid làctic</u>	117
3.4.2.4.	<u>Nivells d'ATP</u>	117
3.4.2.5.	<u>Acumulació de sucres</u>	124
3.4.2.6.	<u>Elecció del medi d'aïllament</u>	129
3.4.3.	MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG I DE TRANSMISSIÓ: ESTUDI DEL PROCÉS D'AÏLLAMENT I DELS ENTERÒCITS AÏLLATS	129
3.4.4.	CARACTERISTIQUES DE L'ACUMULACIÓ DE SUCRES EN ELS ENTERÒCITS CECALS	142
3.4.4.1.	<u>Estudi regional sobre la capacitat d'acumulació d'α-MG en el cec</u>	142
3.4.4.1.1.	Acumulació d' α -MG en cèl.lules del cec proximal, medial i distal	143

3.4.4.1.2. Cinètica del transport d' α -MG	150
3.4.4.2. <u>Característiques de l'acumulació de monosacà-</u> <u>rids en el cec proximal</u>	160
3.4.4.2.1. Capacitat d'acumulació de monosacàrids	160
3.4.4.2.1.1. Acumulació d' α -MG: efecte de la florricina i de diferents concentracions externes del ió sodi	161
3.4.4.2.1.2. Acumulació d' α -MG: competició amb altres monosacàrids	162
3.4.4.2.1.3. Acumulació de 3-OMG: efecte del 2,4-dinitro- fenol i de l'ouabaïna	168
3.4.4.2.1.4. Acumulació de 3-OMG: efecte de la teofil.li- na i de la citocalasina B	173
3.4.4.2.2. Fluxos de monosacàrids a través de la via dependent de Na^+	187
3.4.4.2.2.1. Fluxos inicials d'entrada d' α -MG: efecte de la florricina	187
3.4.4.2.2.2. Fluxos inicials d'entrada d' α -MG: efecte de la citocalasina B	190
3.4.4.2.3. Fluxos de monosacàrids a través de la via independent de Na^+	190
3.4.4.2.3.1. Fluxos de 2-DOG: efecte de la teofil.lina i de la citocalasina B	190
4. DISCUSSIÓ	204
4.1. <u>ESTUDI HISTOLÒGIC</u>	205
4.2. <u>TRANSPORT DE MONOSACÀRIDS</u>	213
5. CONCLUSIONS	240
6. BIBLIOGRAFIA	245

INDEX DE FIGURES

Figura 1.- Esquema de la secció de la unió ili-cec- recte	6
Figura 2.- Estudi comparatiu al MET de la llargària de les microvellositats	33
Figura 3.- Estudi comparatiu al MET del diàmetre de les microvellositats	34
Figura 4.- Representació de Haworth amb els requeri- ments bàsics dels monosacàrids que utilit- zen la via del transport mitjançat concen- tratiu de la membrana luminal	49
Figura 5.- Representació esquemàtica dels mecanismes implicats en l'absorció intestinal de mo- nosacàrids	52
Figura 6.- Model proposat per CRANE (1965) per tal d'explicar la "hipòtesi del gradient iònic" ..	58
Figura 7.- Model "refinat" de CRANE (1977)	60
Figura 8.- Esquema de l'estructura probable del com- plex ternari, proposat per CRANE i DORANDO (1980)	62
Figura 9.- Model de cotransport proposat per ALVARADO i LHERMINIER (1982) tant per a sucres com per a aminoàcids	63
Figura 10.- Model de cotransport proposat per KESSLER i SEMENZA (1983)	66
Figura 11.- Model proposat per HOPFER i GROSECLOSE (1980) per a explicar el cotransport de glucosa i Na ⁺	67

Figura 12.- Representació de Haworth amb els requeriments estructurals dels monosacàrids que utilitzen la via del transport mitjançat equilibratiu de la membrana basolateral	70
Figura 13.- Esquema de la tècnica seguida per a l'aïllament dels enteròcits	89
Figura 14.- Esquema de la separació de la suspensió cel.lular del medi radioactiu pel mètode de centrifugació en fred	99
Figura 15.- Esquema de la separació de la suspensió cel.lular del medi radioactiu pel mètode de centrifugació a través d'olis inerts	101
Figura 16.- Acumulació de 3-OMG 0,1 mmol/l per enteròcits de cec sencer i jejú aïllats amb hialuronidasa	107
Figura 17.- Consum d'oxigen al llarg del temps d'incubació, en presència de glucosa 10 mmol/l, en cèl.lules del cec sencer obtingudes amb tres medis diferents d'aïllament	112
Figura 18.- Consum d'oxigen al llarg del temps d'incubació, en presència de glucosa 10 mmol/l, en cèl.lules del jejú obtingudes amb tres medis diferents d'aïllament	114
Figura 19.- Consum d'oxigen en presència de glucosa 10 mmol/l, en cèl.lules del cec sencer i del jejú, obtingudes amb hialuronidasa, citrat trisòdic i EDTA	116
Figura 20.- Producció d'àcid làctic al llarg del temps d'incubació, en presència de glucosa 10 mmol/l, en cèl.lules del cec sencer obtingudes amb tres medis diferents d'aïllament ...	119
Figura 21.- Producció d'àcid làctic al llarg del temps	

	d'incubació, en presència de glucosa 10 mmol/l, en cèl.lules del jejú obtingudes amb tres medis diferents d'aïllament	121
Figura 22.-	Producció d'àcid làctic, en presència de glucosa 10 mmol/l, en cèl.lules del cec sencer i del jejú, aïllades amb hialuronidasa, citrat trisòdic i EDTA	123
Figura 23.-	Nivells d'ATP al llarg del temps d'incubació, en presència de glucosa 10 mmol/l, en cèl.lules del cec sencer i del jejú, obtingudes amb tres medis diferents d'aïllament	126
Figura 24.-	Nivells d'ATP, en presència de glucosa 10 mmol/l, a temps zero de la incubació, en cèl.lules del cec sencer i del jejú	128
Figura 25.-	Acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en cèl.lules del cec sencer aïllades amb tres medis diferents	131
Figura 26.-	Acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l, en cèl.lules del jejú aïllades amb tres medis diferents	133
Figura 27.-	Acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en animals de 4 a 7 setmanes, en cèl.lules del jejú, cec proximal, cec medial i cec distal	145
Figura 28.-	Acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en animals de 16 setmanes d'edat, en cèl.lules del jejú, cec proximal i cec medial	148
Figura 29.-	Fluxos d' α -MG en el jejú, als 60 s d'incubació, en presència de diferents concentracions de monosacàrid	152
Figura 30.-	Fluxos d' α -MG en el cec proximal, als 60 s	

	d'incubació, en presència de diferents concentracions de monosacàrid	154
Figura 31.-	Fluxos d' α -MG en el cec medial, als 60 s d'incubació, en presència de diferents concentracions de monosacàrid	156
Figura 32.-	Fluxos d' α -MG en el cec distal, als 60 s d'incubació, en presència de diferents concentracions de monosacàrid	158
Figura 33.-	Efecte de la florricina 0,2 mmol/l i de diferents concentracions externes de l'ió sodi sobre l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l, en cèl.lules del cec proximal	164
Figura 34.-	Efecte de la florricina 0,2 mmol/l i de diferents concentracions externes de l'ió sodi sobre l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l, en cèl.lules del jejú	166
Figura 35.-	Efecte de la 3-OMG 10 mmol/l sobre l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en cèl.lules del cec proximal	170
Figura 36.-	Efecte de la 3-OMG 10 mmol/l sobre l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en cèl.lules del jejú	172
Figura 37.-	Efecte del DNP 0,2 mmol/l i de l'ouabaïna 0,25 mmol/l sobre l'acumulació de 3-OMG 0,1 mmol/l en cèl.lules del cec proximal	175
Figura 38.-	Efecte del DNP 0,2 mmol/l i de l'ouabaïna 0,25 mmol/l sobre l'acumulació de 3-OMG en cèl.lules del jejú	177
Figura 39.-	Efecte de la teofil.lina 7,5 mmol/l sobre l'acumulació de 3-OMG 0,1 mmol/l en cèl-	

	lules del cec proximal	180
Figura 40.-	Efecte de la teofil.lina 7,5 mmol/l sobre l'acumulaci6 de 3-OMG 0,1 mmol/l en c6l.lules del jejú	182
Figura 41.-	Efecte de la citocalasina B 0,1 mmol/l sobre l'acumulaci6 de 3-OMG en c6l.lu- les del cec proximal	184
Figura 42.-	Efecte de la citocalasina B 0,1 mmol/l sobre l'acumulaci6 de 3-OMG 0,1 mmol/l en c6l.lules del jejú	186
Figura 43.-	Efecte de la florricina 0,2 mmol/l sobre els fluxos inicials d' α -MG 0,1 mmol/l, en c6l.lules del cec proximal i del jejú	189
Figura 44.-	Efecte de la teofil.lina 7,5 mmol/l sobre els fluxos inicials d' α -MG 0,1 mmol/l en c6l.lules del cec proximal i del jejú	192
Figura 45.-	Efecte de la citocalasina B 0,1 mmol/l sobre els fluxos inicials d' α -MG 0,1 mmol/l	194
Figura 46.-	Efecte de la teofil.lina 7,5 mmol/l sobre els fluxos inicials de 2-DOG 0,1 mmol/l en c6l.lules del cec proximal	196
Figura 47.-	Efecte de la teofil.lina 7,5 mmol/l sobre els fluxos inicials de 2-DOG 0,1 mmol/l en c6l.lules del jejú	198
Figura 48.-	Efecte de la citocalasina B 0,1 mmol/l so- bre els fluxos de 2-DOG 0,1 mmol/l en c6l- lules del cec proximal	200
Figura 49.-	Efecte de la citocalasina B 0,1 mmol/l sobre els fluxos inicials de 2-DOG 0,1 mmol/l en c6l.lules del jejú	202

INDEX DE TAULES

Taula	I.- Composició i ingredients de les dietes Iniciarina i Gordina per a pollastres	9
Taula	II.- Escala d'afinitat per al transportador de la vora "en raspall"	50
Taula	III.- Escala d'afinitat envers el transpor- tador de la vora basolateral	71
Taula	IV.- Estudi mitjançant el mètode del blau de trypan, de la integritat de la membrana cel.lular	109
Taula	V.- Acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l, als 60 min d'incubació, i efecte de la flo- rricina 0,2 mmol/l en cèl.lules del jejú, cec proximal i cec medial, en animals de 4-7 setmanes i 16 setma- nes d'edat	149
Taula	VI.- Constants cinètiques aparents del flux d'entrada d' α -MG en cèl.lules del jejú, cec proximal, cec medial i cec distal	159
Taula	VII.- Efecte de la florricina 0,2 mmol/l i de diferents concentracions de NaCl sobre l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l als 60 min d'incubació, en cèl.lules del cec proximal i del jejú	167
Taula	VIII.- Resultats obtinguts en cèl.lules del jejú a les proves de viabilitat rea- litzades per determinar el millor me- di d'aïllament	223

Taula	IX.- Resultats obtinguts en cèl.lules del cec a les proves de viabilitat realitzades per determinar el millor medi d'aïllament	224
-------	--	-----

INDEX DE FOTOGRAFIES

Fotografia	1.- Cec sencer obert longitudinalment i sotmès al procés de momificació	14
Fotografia	2.- Observació al MER de l'intestí de pollastre	16
Fotografia	3.- Observació al MER de les zones del cec .	18
Fotografia	4.- Detall de la superfície de la vellositat del cec proximal	20
Fotografia	5.- Secció transversal de la regió proximal del cec, observada al MO	22
Fotografia	6.- Imatge d'un fol·licle limfàtic de la tonsil·la cecal obtinguda al MO	23
Fotografia	7.- Secció transversal de la regió medial del cec observada al MO	25
Fotografia	8.- Secció transversal de la regió distal del cec observada al MO	27
Fotografia	9.- Observació de l'epiteli de la punta de la vellositat del cec proximal al MET ..	29
Fotografia	10.- Ultraestructura de l'epiteli de la base de la vellositat del jejú	30
Fotografia	11.- Detall d'una inclusió lipídica present en el cec distal	32
Fotografia	12.- Microvellositats de la punta de la vellositat del jejú i de les diverses zones del cec	35
Fotografia	13.- Detall de l'epiteli de la meitat de la vellositat del cec proximal, amb les unions intercel·lulars	37

Fotografia 14.- Imatge corresponent a la punta de la vellositat del cec medial en la que s'observa un desmosoma localitzat a la zona basal de la membrana basolateral	39
Fotografia 15.- Ultraestructura d'una cèl.lula caliciforme present a la meitat de la vellositat del cec proximal	40
Fotografia 16.- Detall d'una cèl.lula caliciforme de la meitat de la vellositat del cec proximal	41
Fotografia 17.- Imatge d'una cripta del cec proximal ...	42
Fotografia 18.- Fragments del jejú i del cec proximal incubats en el medi d'aïllament amb citrat trisòdic i observats al MER	136
Fotografia 19.- Enteròcit procedent del cec proximal observat al MER	137
Fotografia 20.- Enteròcit del jejú observat al MER	138
Fotografia 21.- Cèl.lula aïllada del cec proximal observada al MET	139
Fotografia 22.- Cèl.lules del jejú observades al MET ...	140
Fotografia 23.- Detall d'una cèl.lula del cec proximal incubada durant 60 min en presència de 3-OMG	141

ABREVIATURES

ADP	Adenosina 5' difosfat
ATP	Adenosina 5' trifosfat
BSA	Albúmina sèrica bovina
^{14}C	Carboni 14
DMF	Dimetilformanmida
DMS	Dimetilsulfòxid
2-DOG	2-Deoxi-D-glucosa
dpm	Desintegracions per minut
EDTA	Etilen diamino tetraacetat
EGTA	Etilenglicol bis(β -aminoetil éter) N,N'-tetraacetat
ES	Error estàndard
g	Gravetats
^3H	Triti
kBq	Quilo Bequerelis
Km	Constant de Michaelis
m	Mitjana
MER	Microscopi electrònic de rastreig
MET	Microscopi electrònic de transmissió
α -MG	α -Metil-D-glucòsid
MO	Microscopi òptic
n	Nombre de dades
NAD^+	Nicotinamido adenina dinucleòtid
NADH	Nicotinamido adenina dinucleòtid reduït
NADP^+	Nicotinamido adenina dinucleòtid fosfat
NADPH	Nicotinamido adenina dinucleòtid fosfat reduït
3-OMG	3-Oxi-metil-D-glucosa
PEG-4.000	Polietilen glicol 4.000
PPO	2,5-Difeniloxazol
Tris	Tris (hidroximetil)aminometà
V_m	Velocitat màxima

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

L'intestí gruixut del pollastre està format pel recte, la cloaca i els cecs. Aquests darrers són un parell de ben desenvolupats diverticles que es troben connectats a la resta del tracte digestiu en el punt d'unió de l'ili amb el recte.

Malgrat que no es coneix la significació fisiològica real dels segments cecals, se'ls ha atribuït nombroses funcions. Així, hi ha evidència que s'hi produeixen grans quantitats d'àcids grassos volàtils, vitamines i la hidròlisi de carbohidrats i proteïnes (McNAB, 1973). Els cecs també tenen un paper important en l'osmoregulació de l'organisme, ja que s'hi produeix l'absorció d'aigua i electròlits, tant de procedència urinària com intestinal (SKADHAUGE, 1981).

Quant a l'absorció de no electròlits, les dades que fins ara es tenen són bastant limitades. HOLDSWORTH i WILSON (1967) trobaren que el transport actiu de sucres i aminoàcids en el cec de pollastre, hi era present només durant els tres primers dies després de l'eclosió de l'ou, desapareixent posteriorment. En el 1975, LERNER *et al.* confirmaren les dades anteriors utilitzant metionina com a substrat. Tanmateix, aquests resultats són diferents dels obtinguts en el nostre Laboratori, en els quals es demostra l'existència d'un mecanisme de transport mitjançat concentratiu per a monosacàrids en aquests segments intestinals i en animals de 4 a 7 setmanes.

Donada doncs la manca d'informació i les discrepàncies amb la bibliografia, ens proposarem realitzar un estudi dels

sistemes de transport presents en aquests segments, complementat per un estudi histològic per si fos oportú correlacionar l'estructura amb la capacitat d'acumulació de monosacàrids.

El que hom pretén és avaluar els diferents mecanismes existents a l'enteròcit, implicats en l'absorció intestinal de sucres. És a dir, el transport mitjançat concentratiu de la membrana luminal, el transport mitjançat equilibratiu de la membrana basolateral i la difusió simple existent a ambdues membranes.

L'existència d'un mecanisme de transport actiu per a monosacàrids en el cec, suposaria la recuperació dels nutrients que escapen de l'absorció a l'intestí prim a més de significar una modificació important en el concepte del paper que juguen els cecs en la nutrició del pollastre.

2. HISTOLOGIA DE
L'INTESTÍ DE POLLASTRE

L'aparell digestiu de les aus es diferencia del dels mamífers perquè és relativament més curt i perquè presenta un seguit d'estructures diferents, tals com: transformació dels maxil·lars en el fonament del bec, adopció per part del pedrer de les funcions de la dentadura que és absent, presència del pap, disposició cenyida del tub intestinal, desenvolupament de dos cecs i formació de la cloaca.

En alguns tipus d'aus, els cecs no són suficientment desenvolupats per poder ésser considerats com a parts funcionals del tracte digestiu, quedant reduïts a òrgans limfàtics. La correlació entre la llargària dels cecs i l'hàbit alimentari de l'animal no està encara establerta, però en termes generals hom accepta que els animals vegetarians tenen els cecs més desenvolupats que no pas els carnívors. En les aus, el major desenvolupament es presenta en herbívors i omnívors i, en menys grau, en graminívors. En les aus gal·lifformes com el pollastre, de règim omnívor, els cecs constitueixen un parell de ben desenvolupats divertícles que es troben connectats ventro-lateralment a la resta del tracte digestiu en el punt d'unió de l'ili amb el recte. A la zona d'unió amb els cecs, l'ili presenta un replegament anomenat anell muscular (CLARKE, 1978) que es projecta caudalment cap a la llum del recte i per sota del qual es troben les abocadures dels cecs (figura 1). En tota la

seva longitud i, més íntimament en la zona pròxima a l'obertura, els cecs estan units a l'ili per mesenteri que conté vasos sanguinis i nervis. Les parts distals són tancades, lliures i doblegades sobre si mateixes de manera que la seva direcció es torna caudal.

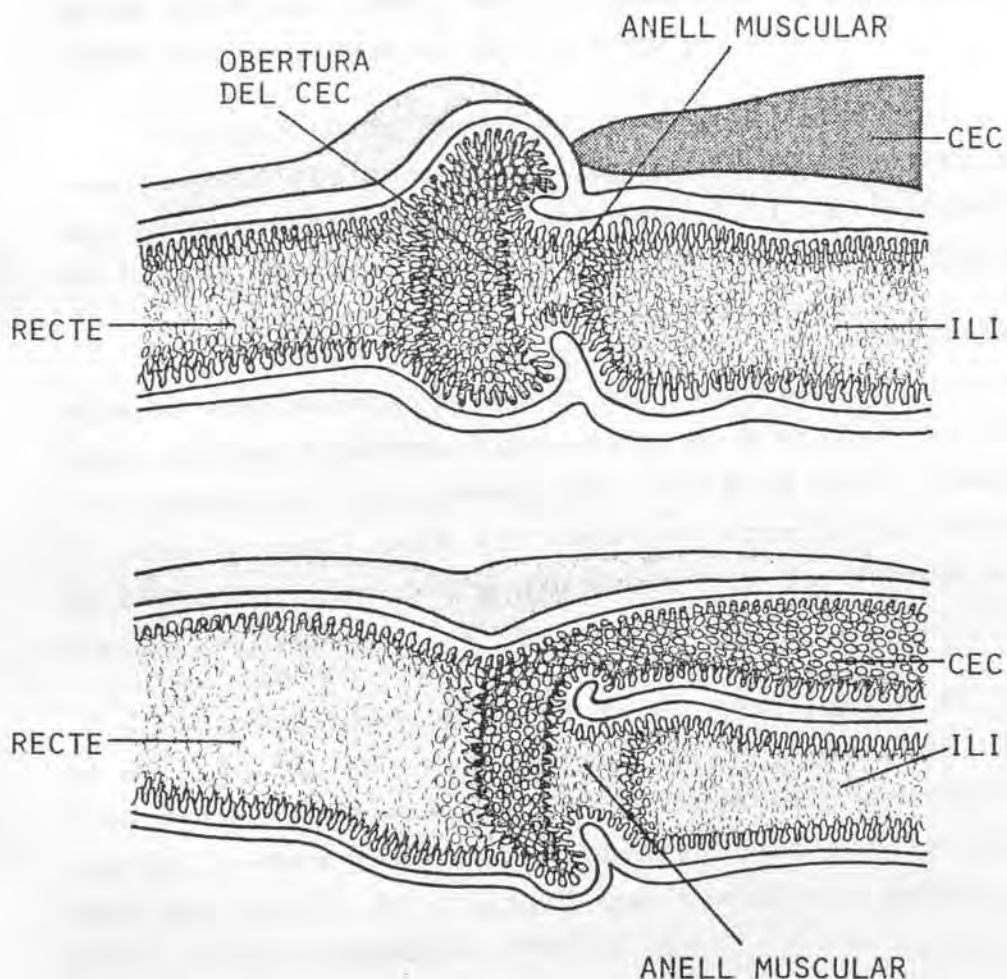


Figura 1.- ESQUEMA DE LA SECCIÓ DE LA UNIÓ ILI-CEC- RECTE. En la part superior es mostra la posició de l'anell muscular i en la inferior, a més, s'observa la secció d'un cec.

MAUMUS (1902) va dividir els cecs desenvolupats de les aus en tres regions diferents: proximal (*basis cecii*) a la zona de l'obertura, medial (*corpus cecii*) i distal (*apex cecii*). La proximal, contreta i exempta de material fecal, presenta un diàmetre extern més petit que el de l'intestí prim, i es va engrandint fins a la zona distal, distesa i plena de material fecal, amb un diàmetre extern unes dues vegades més gran que el de la zona proximal.

La porció de mesenteri que uneix els cecs a l'ili constitueix els anomenats lligaments ileocecal. A més, el cec esquerre està unit, junt amb l'ili, al segment inicial de l'ansa duodenal pel lligament duodenal (SCHWARZE, 1980).

Quant a la irrigació, als dos terços distals dels cecs hi arriba sang a través de nombroses arterioles procedents de les branques ileocecal de l'artèria celíaca que, a la vegada, és una branca de l'artèria aorta descendent. La zona proximal està irrigada per arterioles procedents de l'artèria ileocòlica que procedeix de l'artèria mesentèrica cranial que, a més vascularitza l'ili.

La sang dels cecs, en part, junt amb la de l'ili i la del pàncreas és drenada per la vena pancreàticoduodenal fins a la vena porta dreta i l'altra part és drenada a través de la vena mesentèrica cranial junt amb la sang procedent del jejú i de l'ili, i que també va a parar a la vena porta dreta (SCHWARZE, 1980).

Respecte a la innervació, els cecs, com la resta del tracte digestiu, presenten la innervació intrínseca constituïda pels plexes situats a la paret intestinal i la innervació extrínseca formada per fibres simpàtiques, parasimpàtiques i sensorials aferents (SCHOFIELD, 1968) que arriben al budell a través del nervi vague, nervis mesentèrics i

nervis pèlvics (GABELLA, 1981).

2.1. MATERIAL I METODES

2.1.1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

S'han utilitzat pollastres mascles blancs, de la raça Leghorn, línia comercial Shaver-Starcross-288, procedents de la Cooperativa Comarcal d'Avicultura de Reus. Els experiments s'han realitzat amb animals d'edats compreses entre les 4 i les 7 setmanes. En alguns casos concrets, també s'han emprat animals adults (16 setmanes d'edat) tal i com quedarà expressament indicat en el text.

La cria dels pollastres des del primer dia després de l'eclosió fins al moment de l'experiment s'ha dut a terme a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Els animals han estat mantinguts en condicions de temperatura i humitat adequades, amb cicles de llum-fosc de 12 hores. Els pollets joves han gaudit, durant la primera setmana de vida, d'una font addicional de calor.

Durant els primers trenta dies de vida se'ls ha nodrit amb pinso Iniciarina (Purina, Gallina Blanca) i a partir d'aquesta edat, amb pinso Gordina (Purina, Gallina Blanca), amb lliure accés a l'aigua. La composició de les dues dietes es mostra a la taula I.

Tots els experiments s'han realitzat amb animals sacrificats entre les 9 i les 10 hores del matí, sense haver estat sotmesos a dejuni previ.

2.1.2. APARELLS

- Metal·litzador Polaron, model E 5000 Sputering.
- Microscopi electrònic de rastreig Cambridge, model S.4.
- Microscopi electrònic de transmissió Philips, model EM 200.
- Microscopi òptic Leitz Wetzlar, model Dialux.

TAULA I .- COMPOSICIÓ I INGREDIENTS DE LES DIETES INICIARINA I GORDINA PER A POLLASTRES.

COMPOSICIÓ NUTRITIVA	INICIARINA	GORDINA
substància seca	874,4 g/kg	864,4 g/kg
cendres	59,4 g/kg	54,4 g/kg
proteïna bruta	218,6 g/kg	200,6 g/kg
proteïna digerible	175,0 g/kg	160,0 g/kg
greixos bruts	60,0 g/kg	90,0 g/kg
M.E.L.N.	503,7 g/kg	484,8 g/kg
fibra bruta	32,7 g/kg	34,6 g/kg
unitats alimentàries	1.060,0 g/kg	1.090,0 g/kg
proteïna digerible per U.A.	165,0 g	147,0 g
clorur sòdic	5,4 g/kg	5,2 g/kg
calci	7,9 g/kg	8,1 g/kg
fòsfor	5,5 g/kg	4,9 g/kg
vitamina A	14.100,0 UI/kg	12.100,0 UI/kg
vitamina D	1.410,0 UI/kg	1.210,0 UI/kg
vitamina E	32,0 mg/kg	33,0 mg/kg

INGREDIENTS	INICIARINA	GORDINA
cereals	580,0 g/kg	580,0 g/kg
farina de lleguminosa	10,0 g/kg	20,0 g/kg
gluten de blat de moro	10,0 g/kg	10,0 g/kg
farina de llavors oleaginoses	280,0 g/kg	240,0 g/kg
farina proteica animal	70,0 g/kg	60,0 g/kg
greixos bruts	30,0 g/kg	70,0 g/kg
corrector mineral	10,0 g/kg	10,0 g/kg
corrector vitamínic	10,0 g/kg	10,0 g/kg
Nitrovin	15,0 mg/kg	15,0 mg/kg
coccidiostàtic	125,0 mg/kg	125,0 mg/kg

- Microtom Reichert-Jung, model 1140/Autocut.
- Ultramicrotom Reichert, model 316 615.

2.1.3. REACTIUS I PRODUCTES

- Equip per a la inclusió de les mostres per a la realització dels talls histològics, Kulzer and Co. GmbH., Alemanya. Article Technovit 7100.
- Etanol min. 99,5 %, E. Merck, Alemanya. Article 966, lot 3947658.
- Formaldehid p.a., E. Merck, Alemanya. Article 4003.
- Glutaraldehyd, E. merck, Alemanya. Article 12179.
- 2-Propanol p.a., E. Merck, Alemanya. Article 9634.

2.1.4. OBSERVACIÓ MACROSCÒPICA DEL TEIXIT

2.1.4.1. Momificació del teixit

Per a l'observació macroscòpica del teixit s'ha realitzat la seva momificació segons la tècnica descrita per SNIPES (1978). Un cop rentat l'intestí amb sèrum salí a 4 °C i obert longitudinalment, es fixa en un bastidor de suro per tal d'evitar el recargolament del teixit que té lloc durant el procés. Aleshores es submergeix tot el sistema en formaldehid amortit, a pH 7,4 durant un o dos dies a 4 C. A continuació el teixit es renta amb aigua corrent i es submergeix en alcohol isopropílic al 100 % durant dos dies a 4 °C. Un cop transcorregut aquest temps es deixa assecar a l'aire lliure.

D'aquesta manera, el teixit queda rígid, de color un xic més pàl·lid i consistència apergaminada.

2.1.5. OBSERVACIÓ MICROSCÒPICA DEL TEIXIT

2.1.5.1. Microscòpia electrònica de rastreig (MER)

En primer lloc es procedeix a la fixació del teixit

amb glutaraldehyd al 2,5 % en solució amortidora de fosfats 0,1 mmol/l, pH 7,4, durant una hora i mitja a temperatura ambient. A continuació es renta amb solució amortidora de fosfats 0,2 mmol/l, pH 7,4, durant dues hores a temperatura ambient. El tractament posterior s'ha dut a terme al Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona. La deshidratació del teixit es fa mitjançant el pas per una sèrie gradual d'alcohol etílic i el dessecat es fa pel punt crític del CO₂ emprant acetat d'amil com a líquid de transferència. La mostra es munta, aleshores, amb plata col·loïdal i es metal·litza amb or mitjançant l'aparell Polaron E 5000 Sputering, formant-se un recobriment de 30 a 50 nm de guix. Les mostres ja són aleshores llestes per a la seva observació al microscopi, operant-se amb acceleracions de 10 a 30 kV.

2.1.5.2. Microscòpia electrònica de transmissió (MET)

Per a l'observació del teixit al MET s'ha realitzat la fixació amb glutaraldehyd i el rentat amb solució amortidora de fosfats tal com s'ha procedit per al MER. La resta del procés s'ha dut a terme al Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

La post-fixació es realitza amb tetraòxid d'osmi al 2 % en solució amortidora de fosfats a 4 °C i a continuació es renta el teixit amb solució amortidora de fosfats. Posteriorment es realitza la deshidratació del teixit en una sèrie gradual d'acetona, a temperatura ambient. Aleshores ja es procedeix a la inclusió del teixit en Araldita. Dels blocs obtinguts se'n fan talls ultrafins mitjançant l'ultramicrotom per tal d'obtenir seccions d'uns 60 nm de gruix. El contrastat es realitza amb acetat d'uranil i citrat de plom segons la tècnica descrita per REYNOLDS (1963). Les observacions s'han realitzat tot operant amb acceleracions de 100 kV.

2.1.5.3. Microscòpia òptica (MO)

Per a l'observació del teixit al MO, els segments intestinals, un cop nets, es deixen 24 hores en formaldehid, a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, es renten amb aigua destil·lada i es procedeix a la deshidratació en una sèrie gradual d'etanol. Aleshores s'inclouen les mostres en metacrilat d'hidroxietilè (Technovit 7.100) i dels blocs obtinguts se'n fan talls de 2 µm de gruix que es teñeixen amb blau de metilè-bòrax.

També s'han realitzat seccions dels blocs d'Araldita obtinguts en el procés de preparació de les mostres per a la seva observació al MET. En aquest cas, les seccions han estat de 1 µm i també s'ha tenyit amb blau de metilè-bòrax.

2.1.5.4. Tractament estadístic dels resultats

En l'estudi estadístic, les diferències entre dues mitjanes s'ha avaluat amb el test de la "t" d'Student. En el cas de la comparació entre tres mitjanes, s'ha emprat el mètode de Sheffé. En tots els casos, es va acceptar com a significatiu un nivell de probabilitat inferior o igual al 5 %.

2.2. RESULTATS

2.2.1. ANATOMIA MACROSCÒPICA

2.2.1.1. Llargària dels cecs

En els pollastres de 4 a 7 setmanes d'edat, els cecs, un cop oberts longitudinalment i netejats amb sèrum fisiològic a 4 °C, mesuren $87,9 \pm 1,2$ mm (mitjana \pm error estàndard de 54 dades).

2.2.1.2. Morfologia de la superfície luminal dels cecs

L'estudi de la morfologia luminal dels cecs s'ha realitzat en el teixit sotmès al procés de momificació. D'aquesta manera, s'hi poden observar dues zones ben diferenciades: una, corresponent al cec proximal i l'altra que agrupa la zona medial i distal. La zona proximal (fotografia 1) presenta un aspecte molt semblant al de l'intestí prim, és a dir, totalment llis i vellutat. En les preparacions de jejú, no s'han observat els plecs macroscòpics anomenats vàlvules connivents, *plicae circulares* o *plicae intestinales submucosae*, presents en la majoria de mamífers i que TURK (1982) tampoc troba en les diferents regions de l'intestí prim de pollastre.

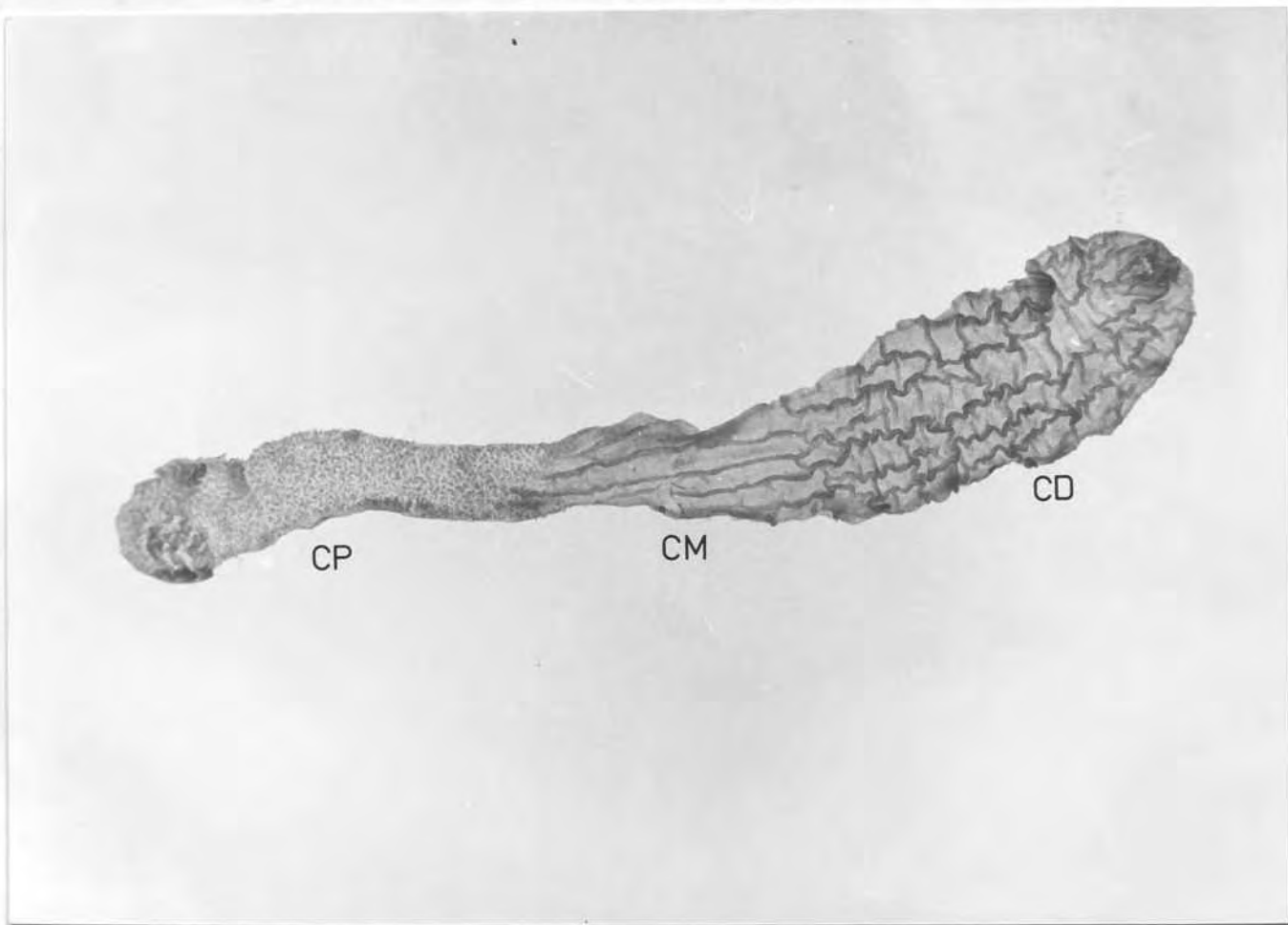
A uns 2 mm del punt d'inserció del cec a la resta de l'intestí, hi ha un engruiximent de color rogenc en forma de cercle, anomenat tonsil·la cecal i que correspon a una zona rica en teixit limfàtic.

En l'altra regió (cec medial i distal) hi són presents uns replegaments molt característics que recorren el cec longitudinalment i que malgrat la seva disposició CALHOUN (1932) va anomenar *plicae circulares*.

2.2.2. ANATOMIA MICROSCÒPICA

Per tal de fer un estudi microscòpic dels cecs, s'han realitzat observacions al MER amb l'objecte de caracteritzar les vellositats i els replegaments dels cecs i poder-los comparar amb els presents a la resta de l'intestí.

Després s'han realitzat talls semifins de les tres regions cecals amb l'objecte de posar de manifest les possibles diferències existents en les capes que formen part de la paret intestinal.



Fotografia 1.- CEC SENCER OBERT LONGITUDINALMENT I SOTMÈS AL PROCES DE MOMIFICACIÓ. CP, cec proximal; CM, cec medial i CD, cec distal.

Per últim, s'ha realitzat un estudi al MET de l'epiteli amb l'objecte de matisar les diferències cel·lulars que es presenten en les diferents zones del cec i en el jejú, així com al llarg de la vellositat. Per això s'han caracteritzat les cèl·lules que formen part de l'epiteli: cèl·lules absorbents, cèl·lules caliciformes i cèl·lules endocrines. A més, en les cèl·lules absorbents o enteròcits s'han fet mesures de la llargària, diàmetre i densitat de les microvellostats.

2.2.2.1. Microscòpia electrònica de rastreig

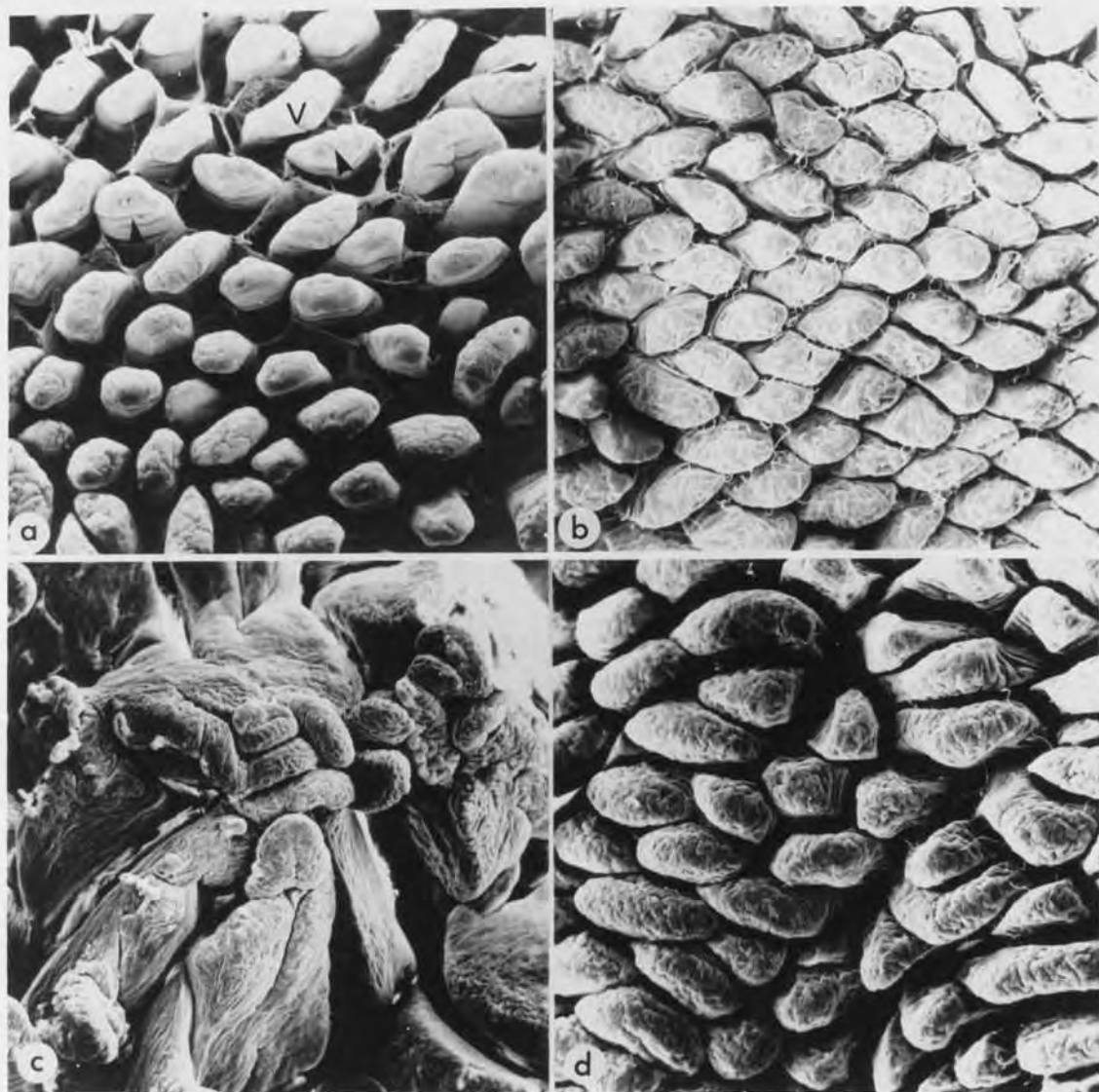
2.2.2.1.1. Jejú

En el jejú, totes les vellositats són d'igual longitud i se'n poden trobar de dues formes. Unes són cilíndriques i les altres, més abundants, són aplanades lateralment, és a dir, el·lipsoïdals.

La superfície de les vellositats està solcada per uns endinsaments transversals (*plicae intestinales villosae* o *villi*) que són més freqüents a la zona apical, rodejant la línia d'extrusió, punt on es produeix la descamació de les cèl·lules envellides (fotografia 2a). La quantitat de vellositats presents en aquesta zona és de 45,88 vellositats/mm² de teixit i la seva llargària és de 525,3 ± 7,8 µm (mitjana ± error estàndard de 8 dades).

2.2.2.1.2. Ili

Les vellositats de l'ili són molt semblants a les del jejú però la seva disposició és més atapeïda (59,49 vellositats/mm² de teixit). En la seva superfície, els endinsaments transversals són més nombrosos que en el jejú, essent també més abundants en la zona apical. És en aquest darrer punt on es troben tot un seguit de filaments bacterians inclosos en el teixit (fotografia 2b).



Fotografia 2.- OBSERVACIÓ AL MER DE L'INTESTÍ DE POLLASTRE.
 a: jejú; V, vellositat i les fletxes indiquen la línia d'ex-
 trusió i els endinsaments transversals. X 66.
 b: ili; les fletxes indiquen els filaments bacterians. X 66.
 c: unió ili-cec-recte. X 36.
 d: recte. X 66.

2.2.2.1.3. Unió ili-cec-recte

Aquesta zona, en la que es localitza l'anomenat anell mucular, presenta les vellositats de diferents tamanys, forma i orientacions, donant una imatge de total desordre (fotografia 2c).

2.2.2.1.4. Recte

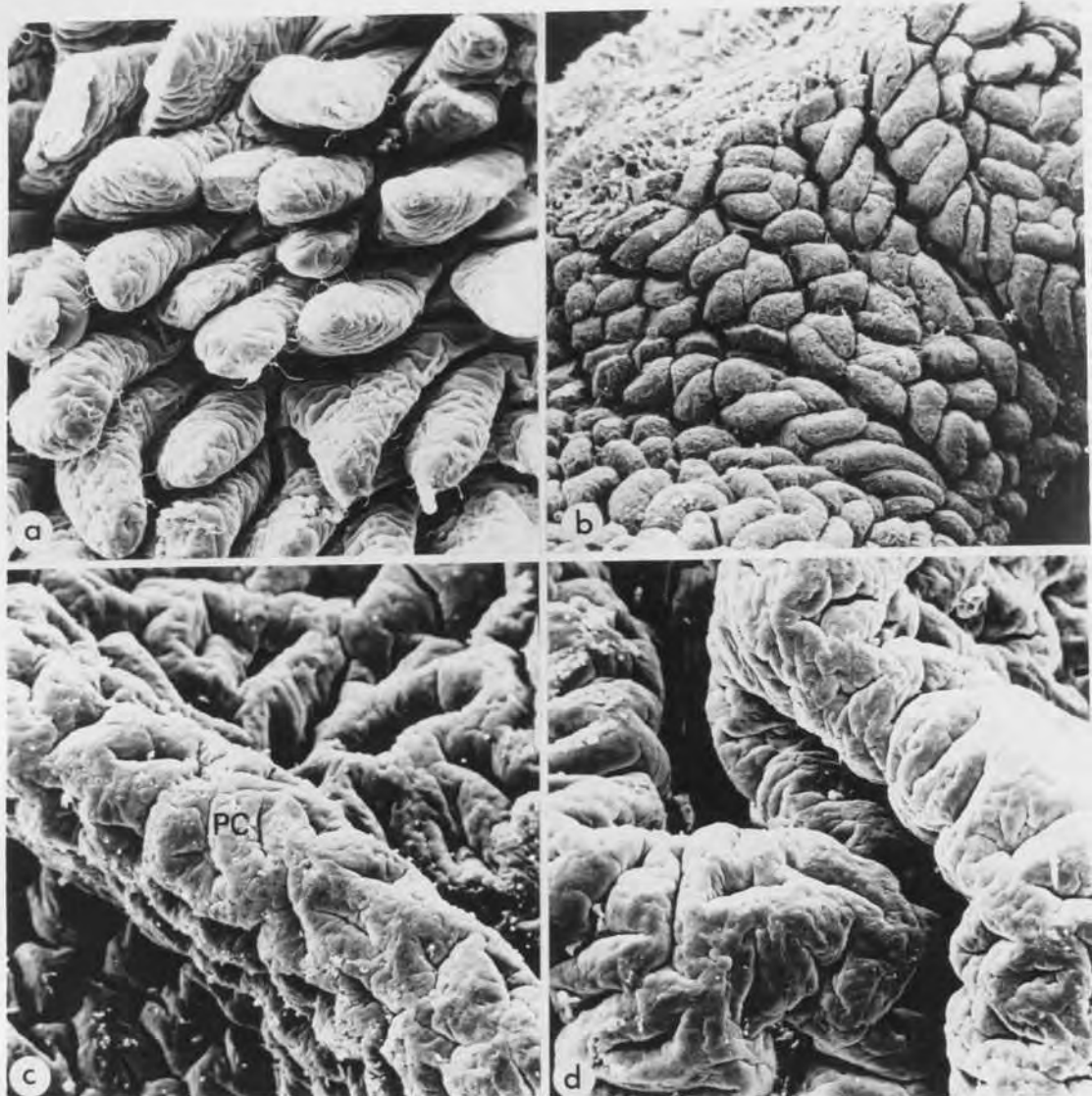
En el recte, les vellositats tornen a ésser totes de la mateixa longitud, $265,6 \pm 12,0 \mu\text{m}$ (mitjana \pm error estàndard de 3 dades). Quant a la forma, hi predominen les el·lipsoïdals, en les quals el diàmetre menor és a vegades bastant més llarg que en el jejú. La seva densitat és menor a la de les altres zones (39,08 vellositats/ mm^2 de teixit). Pel que fa als endinsaments transversals de la superfície són més nombrosos i marcats que no pas en el jejú i l'ili. A la zona apical hi són presents nombrosos filaments bacterians (fotografia 2d).

2.2.2.1.5. Cec

2.2.2.1.5.1. Cec proximal

Fa més de mig segle, BROWNW (1922) i CALHOUN (1932) i més recentment HODGES (1974), en estudis al microscopi òptic, varen suggerir una certa similitud en la morfologia de les vellositats entre el cec proximal i altres zones de l'intestí prim.

Posteriorment, amb la finalitat de completar diversos estudis sobre la fisiologia dels cecs, (FENNA i BOAG, 1974; BAYER *et al.*, 1975; WITLOCK *et al.*, 1975; CLARKE, 1978 i FERRER *et al.*, 1984) s'ha utilitzat el MER degut al seu gran poder de resolució per poder confirmar i precisar els resultats obtinguts al MO anteriorment. D'aquesta manera, s'ha pogut veure un elevat grau de similitud entre



Fotografia 3.- OBSERVACIÓ AL MER DE LES ZONES DEL CEC.

a: cec proximal. X 65.

b: tonsil.la de la zona proximal. X 30.

c: cec medial; PC, *plicae circulares*. X 65.

d: cec distal. X 65.

el cec proximal, l'intestí prim i el recte.

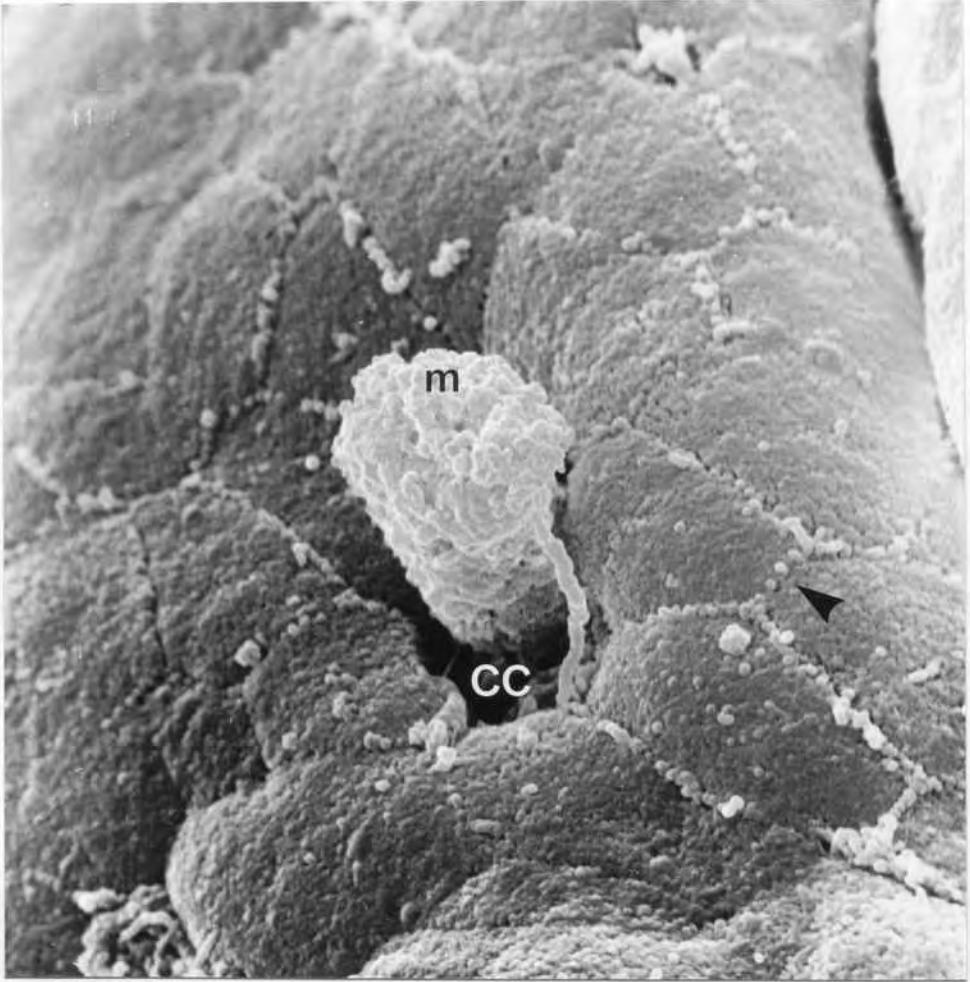
La llargària de les vellositats presenta una variabilitat bastant acusada essent la mitjana de $363,6 \pm 21,8 \mu\text{m}$ (mitjana \pm error estàndard de 3 dades). Pel que fa a la forma, n'hi ha de digitiformes però la majoria són el·lipsoïdals. Ambdós tipus mostren la zona apical més estreta que no pas la basal, i així, la zona d'extrusió és més puntiforme que no pas linial com a les altres zones estudiades. La superfície de les vellositats es veu solcada per endinçaments transversals, en nombre i profunditat més elevades que no pas en el jejú i en l'ili i semblants al recte. El nombre de vellositats és de 24,00 vellositats/ mm^2 de teixit i els bacteris hi són bastant abundants, trobant-se exclusivament a la zona apical (fotografia 3a).

A més augments, s'observa que el contorn cel·lular és poligonal, acostant-se a un model hexagonal (fotografia 4). També s'hi poden trobar cèl·lules caliciformes en procés de secreció.

La morfologia de la superfície de la tonsil·la cecal és molt semblant a la resta del cec proximal. En les imatges obtingudes al MER es pot observar que les vellositats són el·lipsoïdals, amb l'eix major més gran que no pas a la resta de la zona proximal. El que hem trobat característic d'aquesta zona és la perfecta disposició de les vellositats en rengleres (fotografia 3b).

2.2.2.1.5.2. Cec medial i distal

Les imatges obtingudes al MER de la zona medial i distal, no revelen cap diferència notable entre aquestes dues zones, ans al contrari, a aquest nivell apareix una estructura morfològica bastant contínua que conforma una única regió. Es a d'altres nivells que hom dóna suport a la diferenciació del cec medial i distal.



Fotografia 4.- DETALL DE LA SUPERFÍCIE DE LA VELLOSIAT DEL CEC PROXIMAL. CC, cèl.lula caliciforme en procés de secreció de mucus (m). La fletxa indica el contorn cel.lular. X 6.410.

En tota la superfície del cec medial i distal, així com en els *plicae circulares* no s'observen autèntiques vellositats. Es tracta de petites protuberàncies romes i aplanades, separades per invaginacions allargades a modus de criptes (fotografies 3c i 3d).

2.2.2.2. Microscòpia òptica

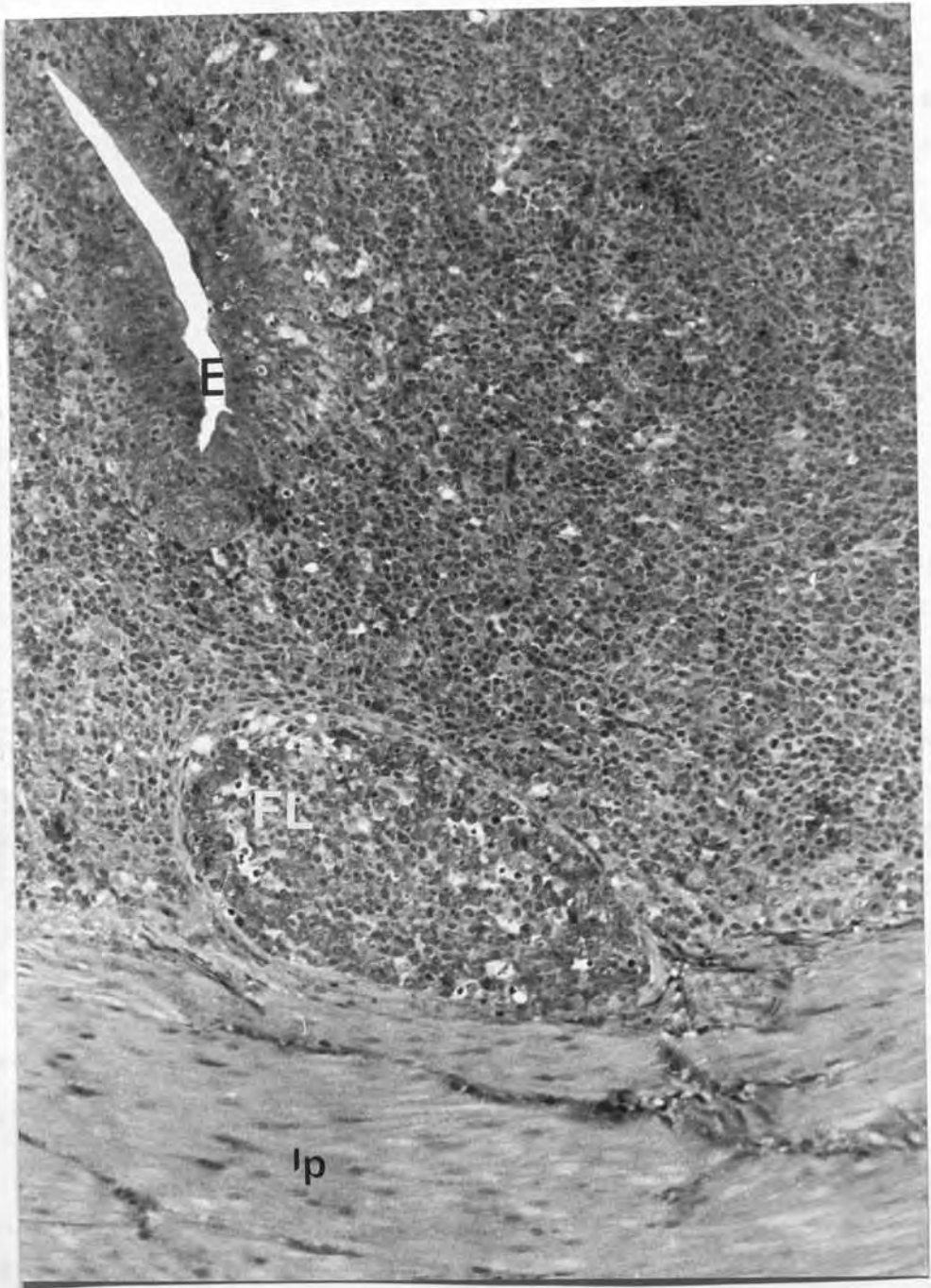
Fonamentalment, els cecs presenten les mateixes característiques histològiques que la resta del tracte digestiu. Per tant, des de l'exterior fins a la llum, s'hi troben quatre capes: serosa, muscular externa (composta per una capa de musculatura longitudinal externa i una de circular interna), submucosa que és molt poc desenvolupada en els cecs i mucosa. Aquesta darrera, a la vegada, està constituïda per tres subcapes: *muscularis mucosae*, que en els cecs, segons CALHOUN (1932) consta d'una capa externa de musculatura circular i una d'interna de musculatura longitudinal i que segons HODGES (1974) l'externa és la longitudinal i la interna és la circular. Damunt la *muscularis mucosae* es situa la làmina pròpia que forma el cor de les vellositats i en la que s'excaven les criptes de Lieberkühn. En el pollastre, en la làmina pròpia, no hi ha vasos limfàtics a diferència dels mamífers en els que hi ha vasos limfàtics a més de vasos sanguinis (GRANEY, 1967; HODGES, 1974 i HUMPHREY i TURK, 1974).

Sobre la làmina pròpia, s'instal·len les cèl·lules epitelials (3era subcapa) que són les que estan en contacte directe amb la llum intestinal.

A la part proximal (fotografia 5), la musculatura externa està formada per la capa interna de musculatura circular que és unes cinc o sis vegades més ampla que l'externa longitudinal i entre les dues hi ha un ben desenvolupat plexe nerviós (HODGES, 1974). La submucosa és molt pri-



Fotografia 5.- SECCIÓ TRANSVERSAL DE LA REGIÓ PROXIMAL DEL CEC, OBSERVADA AL MO. C, cripta i lp, làmina pròpia. La fletxa negra indica una zona clara perifèrica corresponent a les microvellositats i la fletxa blanca indica un endin-sament transversal. X 273.



Fotografia 6.- IMATGE D'UN FOL.LICLE LIMFÀTIC DE LA TONSIL-
LA CECAL OBTINGUDA AL MO. FL, fol.licle limfàtic, lp, là-
mina pròpia i E, epiteli.X 682.

ma, excepte per on circulen els vasos sanguinis. La *muscularis mucosae* és, en el cec molt estreta i inexistent en molts punts. A la làmina pròpia s'hi poden trobar cèl.lules i ganglis limfàtics, tant a la base com al costat de les vellositats. En la zona proximal, la mida i la forma de les vellositats observades al MO, en talls semifins transversals, corresponen a la imatge obtinguda al MER.

Pel que fa a la tonsil·la present a la zona proximal, és fàcilment identificable en els talls transversals. Es tracta d'una estructura semblant a una vellositat però molt més gruixuda i rodejada de vellositats de forma i mida igual a les de la resta de la zona proximal.

La regió subepitelial està formada per una gran massa de limfòcits i un parell o tres de fol·licles limfàtics situats a la zona propera a la làmina pròpia (fotografia 6). Aquests darrers són estructures ovoïdals rodejades per una capa de cèl.lules reticulars. L'epiteli que rodeja la tonsil·la cecal, presenta molts limfòcits i la disposició de les cèl.lules epitelials és bastant desordenada. La làmina basal no és visible i totes les cèl.lules estan col·locades irregularment sobre la zona subepitelial. Les cèl.lules caliciformes són molt menys abundants que a la resta de l'epiteli. Segons BEFUS *et al.* (1980) la zona subepitelial és una àrea rica en limfòcits B, mentre que a la zona central hi ha més limfòcits T.

A la zona medial (fotografia 7), més distesa, la musculatura circular és tan sols unes tres o quatre vegades més gruixuda que la longitudinal. La submucosa és també molt estreta, excepte on es troben els *plicae circulares*. Aquests plecs, presents a la zona medial i distal, estan formats per la membrana mucosa, la *muscularis mucosae* i els engruiximents de la submucosa en forma de triangles. Igual que a la zona proximal, la *muscularis mucosae* és molt estreta.



Fotografia 7.- SECCIÓ TRANSVERSAL DE LA REGIÓ MEDIAL DEL
CEC OBSERVADA AL MO. X 273.

Les vellositats són, a aquest nivell, molt diferents de les de la zona proximal, ja que es tracta de petites protuberàncies romes. A la zona distal (fotografia 8), la musculatura circular ja només és dues o tres vegades més gruixuda que la longitudinal. La submucosa i la *muscularis mucosae* també hi són presents però molt poc desenvolupades.

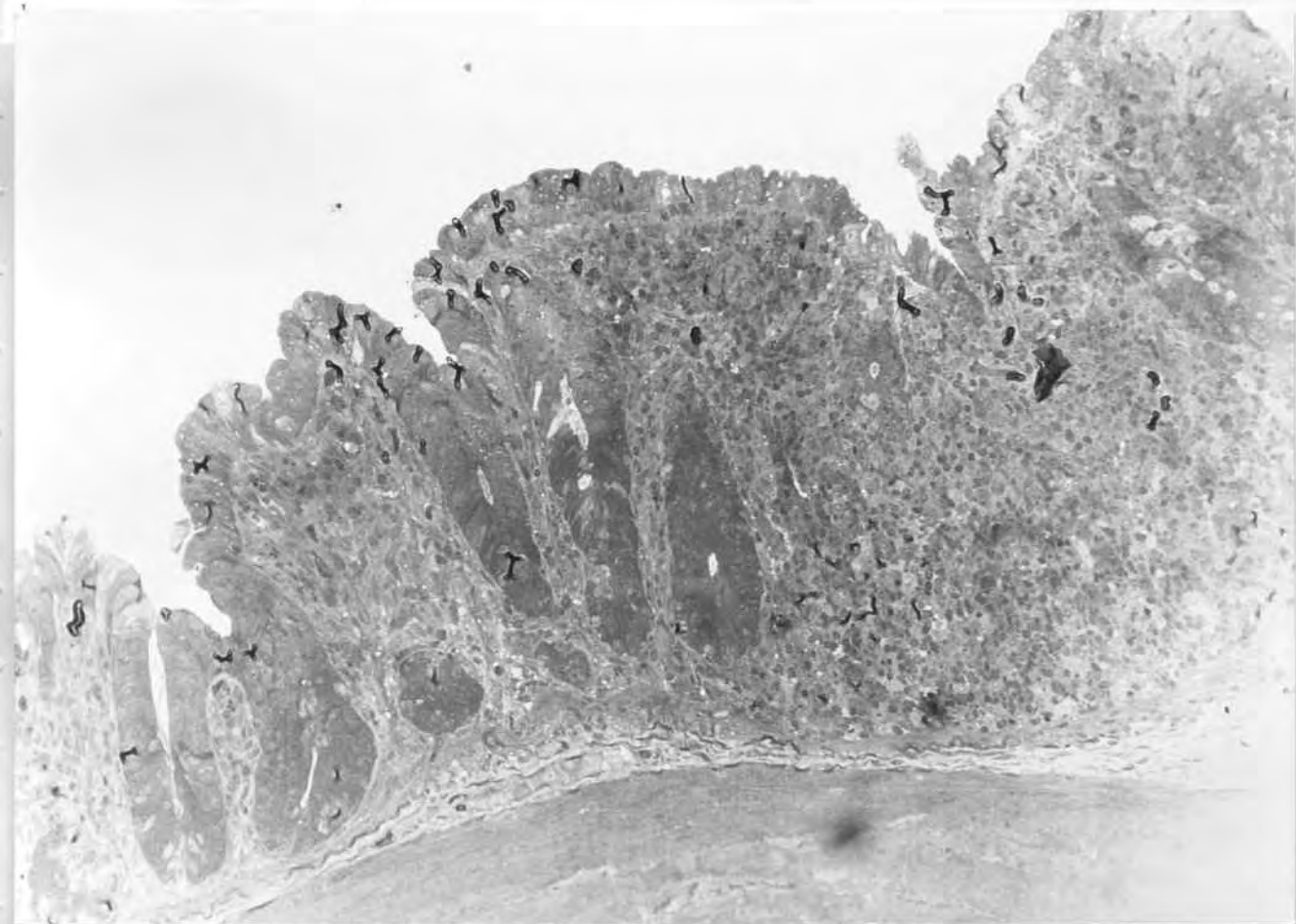
2.2.2.3. Microscòpia electrònica de transmissió

L'epiteli que revesteix les vellositats i les criptes dels cecs de pollastre és bastant semblant al de la resta de l'intestí. Es tracta doncs, d'una capa simple de cèl.lules columnars que fonamentalment poden ésser: cèl.lules principals o enteròcits, cèl.lules de goblet o caliciformes i cèl.lules endocrines. En el tracte digestiu del pollastre, ja sigui en l'intestí prim o gruixut, no s'hi troben glàndules de Brunner (CALHOUN, 1932; HODGES, 1974 i HUMPHREY i TURK, 1974).

Totes les cèl.lules epitelials són produïdes a la base de les criptes i migren gradualment per les parets de les vellositats fins arribar a la zona d'extrusió des d'on són excretades a la llum intestinal. En les aus domèstiques, el temps de renovació de les cèl.lules és de 2 a 5 dies (IMONDI i BIRD, 1966; SPIELVOGEL *et al.*, 1972 i FERNANDO i McCRAW, 1973). Quan més gran, però, és l'animal, més llarg és el temps de renovació ja que si bé la velocitat de migració està augmentada (MOON i SKARTVEDT, 1975), al llarg del temps es produeix un augment en el tamany de les vellositats romanent el nombre d'elles constant (CLARKE, 1967). El mecanisme que controla la renovació de les cèl.lules epitelials no és encara del tot conegut.

2.2.2.3.1. Cèl.lules principals

Les cèl.lules principals o enteròcits de les tres zo-



Fotografia 8.- SECCIÓ TRANSVERSAL DE LA REGIÓ DISTAL DEL
CEC OBSERVADA AL MO. X 273.

nes cecals i del jejú són molt semblants. Es tracta de cèl.lules columnars llargues i estretes. En l'àpex, per tal d'augmentar la superfície d'absorció, presenten les microvellositats, de llargària i diàmetre variable segons la zona de l'intestí que es tracti. Per sota les microvellositats, es troba la zona anomenada xarxa terminal, en la que s'observen les porcions terminals dels filaments de les microvellositats i en la que normalment no hi ha orgànuls cel.lulars.

Els mitocondris són molt abundants en els enteròcits, ja que es tracta de cèl.lules metabòlicament molt actives i estan situades majoritàriament entre el nucli i la xarxa terminal. La seva forma és abastonada o circular.

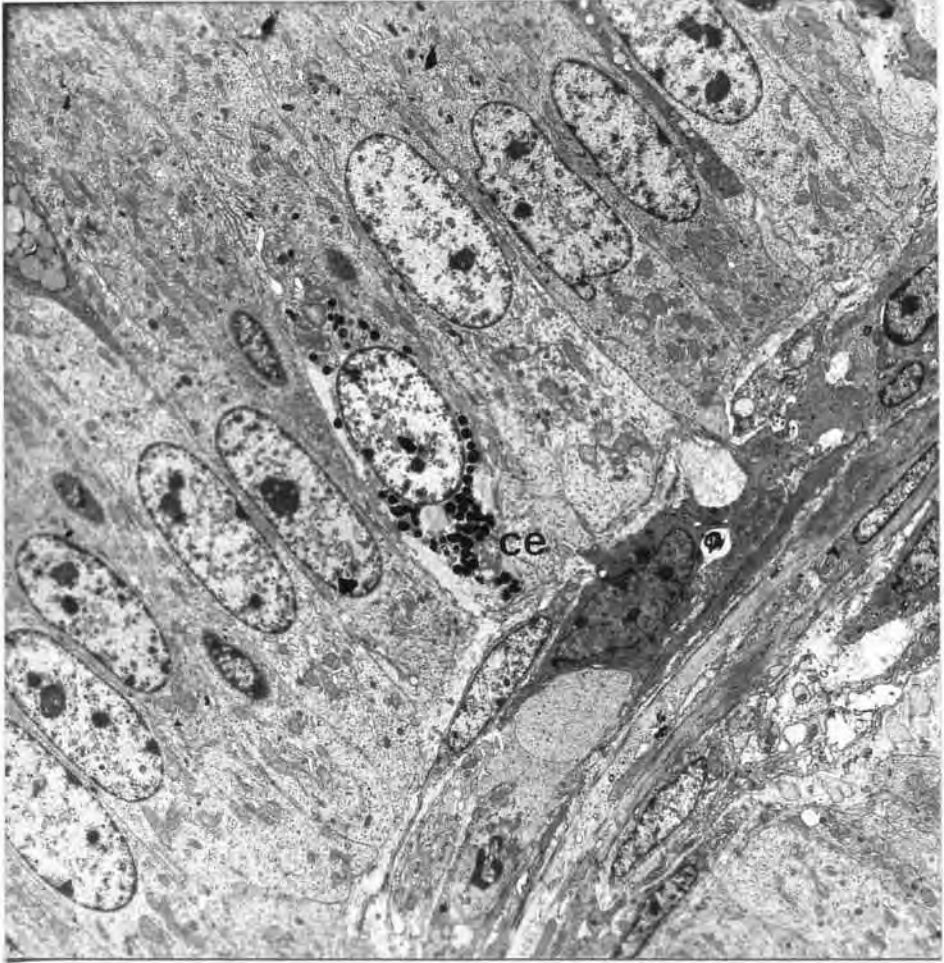
En el citoplasma hi ha reticle endoplasmàtic llis que és més abundant a la zona apical de la cèl.lula. El reticle endoplasmàtic rugós està distribuït més uniformement per tot el citoplasma. També s'hi poden trobar grumolls o rosetes de ribosomes lliures.

El nucli, tant en el cec com en el jejú és oval, amb l'eix major orientat paral·lelament amb l'eix major cel.lular i localitzat en el terç basal de la cèl.lula. En el cec proximal s'ha observat que els nuclis presenten un cert desordre en la seva localització si hom els compara amb els del jejú, on tots estan a la mateixa alçada (fotografies 9 i 10). En el nucli, s'hi poden trobar un o més nuclèols segons la secció aconseguida. Masses d'heterocromatina, denses als electrons, són evidents en la perifèria del nucli i la resta és d'eucromatina, menys densa als electrons.

En la zona supranuclear hi ha una zona clara, corresponent al complex de Golgi, constituït per una xarxa ben desenvolupada amb granulacions dins i al seu voltant. A més, en el citoplasma, s'hi poden veure en la zona apical inclusions lipídiques esfèriques, de mides variables (fotografia



Fotografia 9.- OBSERVACIÓ DE L'EPITELI DE LA PUNTA DE LA VELLOSIAT DEL CEC PROXIMAL AL MET. m, mitocondri; N, nucli; n, nuclèol, xt, xarxa terminal i mi, microvellositats. X 8.160.



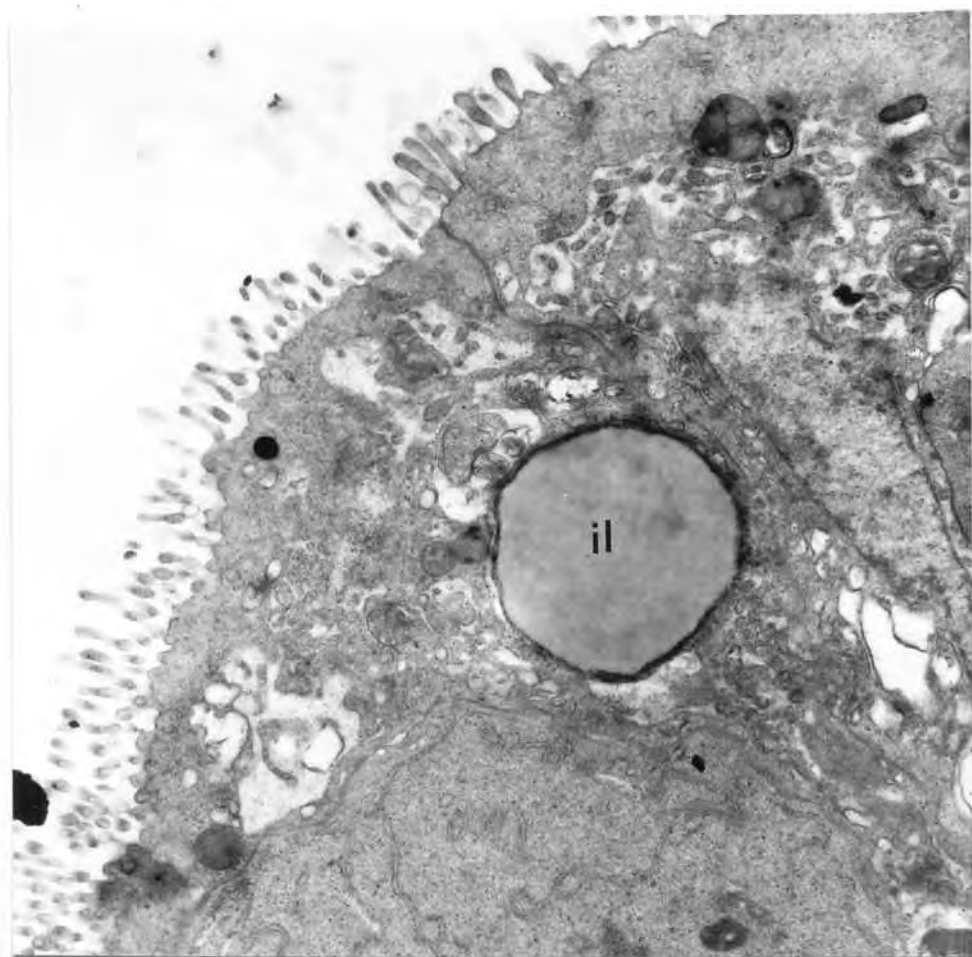
Fotografia 10.- ULTRAESTRUCTURA DE L'EPITELI DE LA BASE DE LA VELLOSTAT DEL JEJÚ. ce, cèl.lula enterocromafina. X 3.744.

11) i cossos multivesiculars (fotografia 13).

En les observacions realitzades al MET de les tres zones del cec i del jejú, s'ha pogut observar certes diferències entre les cèl.lules de la cripta i les de la vellositat. Una de les més notables és el desenvolupament de les microvellositats.

Hom ha pres mesures de la llargària, diàmetre i densitat de les microvellositats en les següents zones: en el cec proximal i en el jejú, s'ha fet a la punta de la vellositat, a la meitat de la vellositat i a la cripta; en el cec medial s'ha fet a la punta de la vellositat i a la cripta i en el cec distal, tan sols a la punta de la vellositat. En els resultats sobre la llargària, que es representen a la figura 2, es pot observar que en el jejú, cec proximal i cec medial hi ha diferència estadísticament significativa en les mesures realitzades al llarg de la vellositat, essent sempre més desenvolupades a la punta de la vellositat. La mida de les microvellositats en la punta de la vellositat és significativament diferent en les quatre zones estudiades, essent l'ordre trobat: jejú > cec proximal > cec medial > cec distal (fotografia 12).

Pel que fa al diàmetre (figura 3) s'ha trobat una disminució des de la punta fins a la cripta que és estadísticament significativa tant en el jejú com en el cec proximal i cec medial. Quant al diàmetre en la punta de la vellositat, no hi ha diferència estadísticament significativa entre el jejú i el cec distal, essent les del cec medial significativament més primes i les del cec proximal, a la vegada significativament més primes que les del cec medial. Quant a la densitat de les microvellositats, no s'ha trobat cap diferència estadísticament significativa ni al llarg de la vellositat ni en les quatre zones estudiades, essent aproximadament de 9 mi-



Fotografia 11.- DETALL D'UNA INCLUSIÓ LIPÍDICA PRESENT EN
EL CEC DISTAL. il, inclusió lipídica. X 18.720.

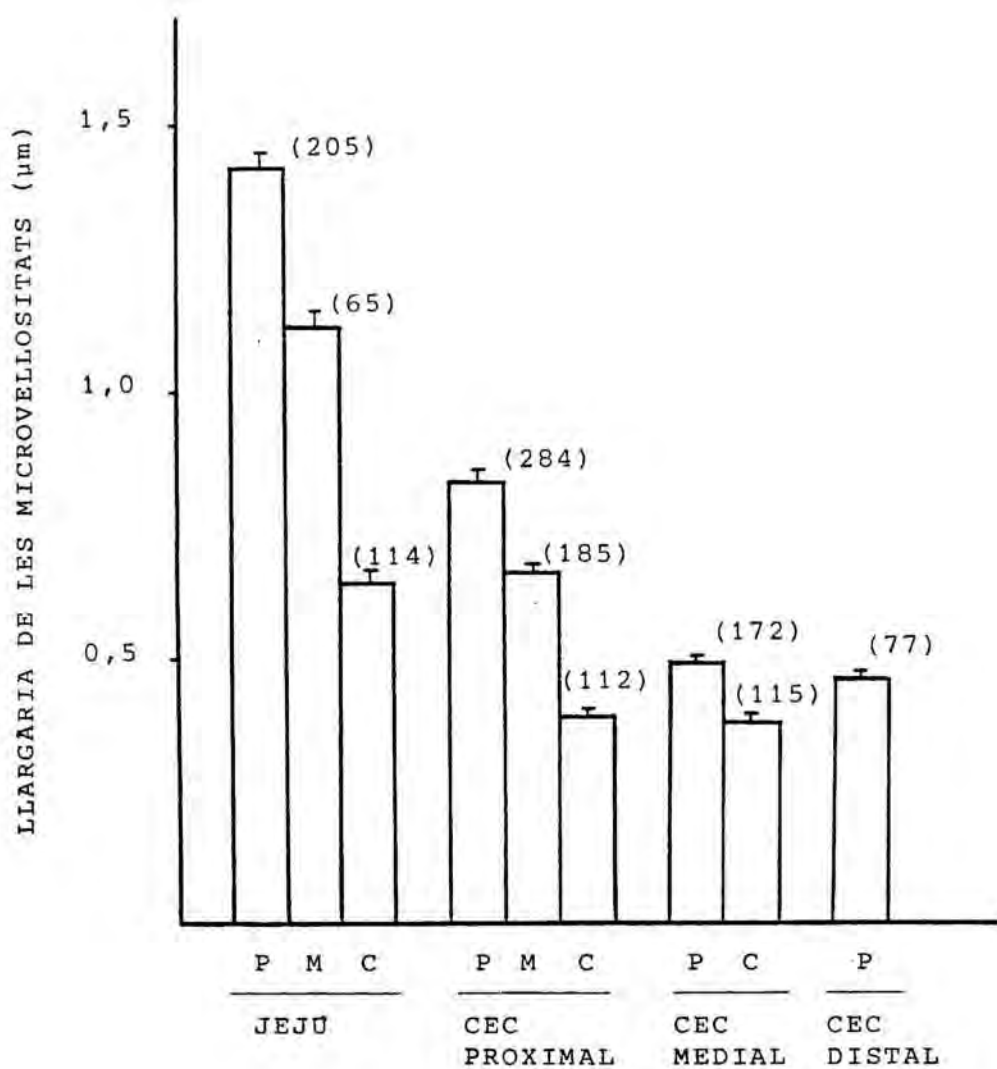


Figura 2.- ESTUDI COMPARATIU DE LA LLARGÀRIA DE LES MICROVELLOSITATS AL MET. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent el número entre parèntesis el nombre de dades. P, punta vellositat; M, meitat vellositat i C, cripta.

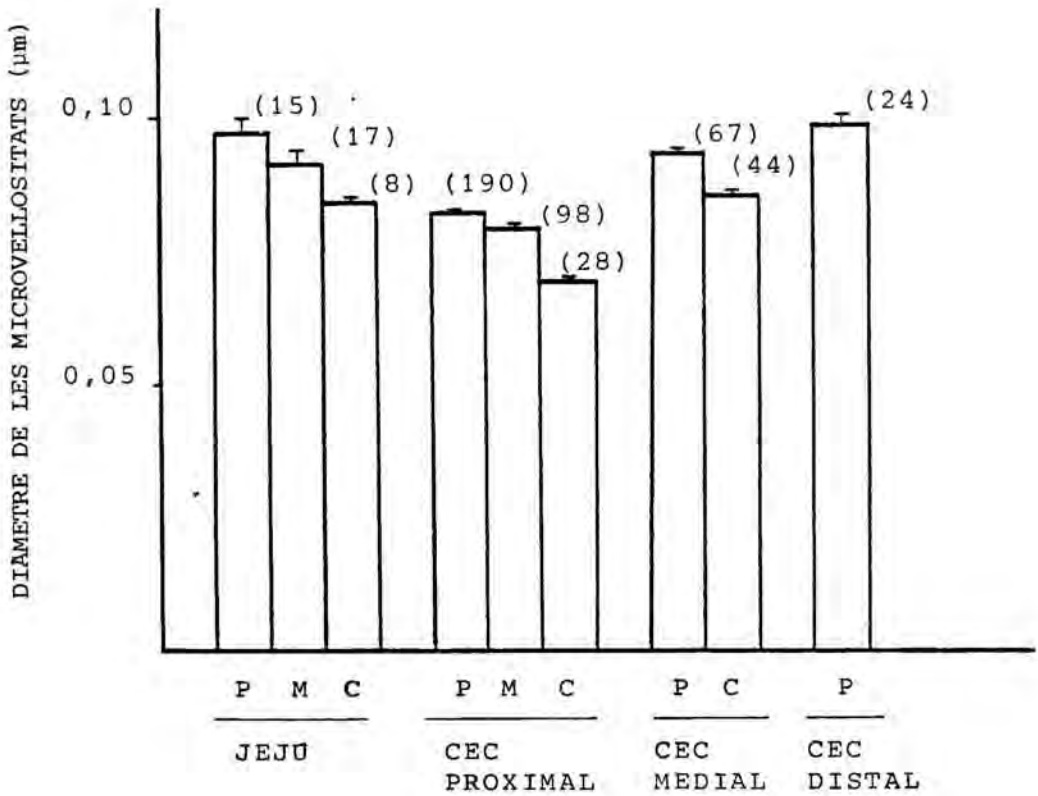
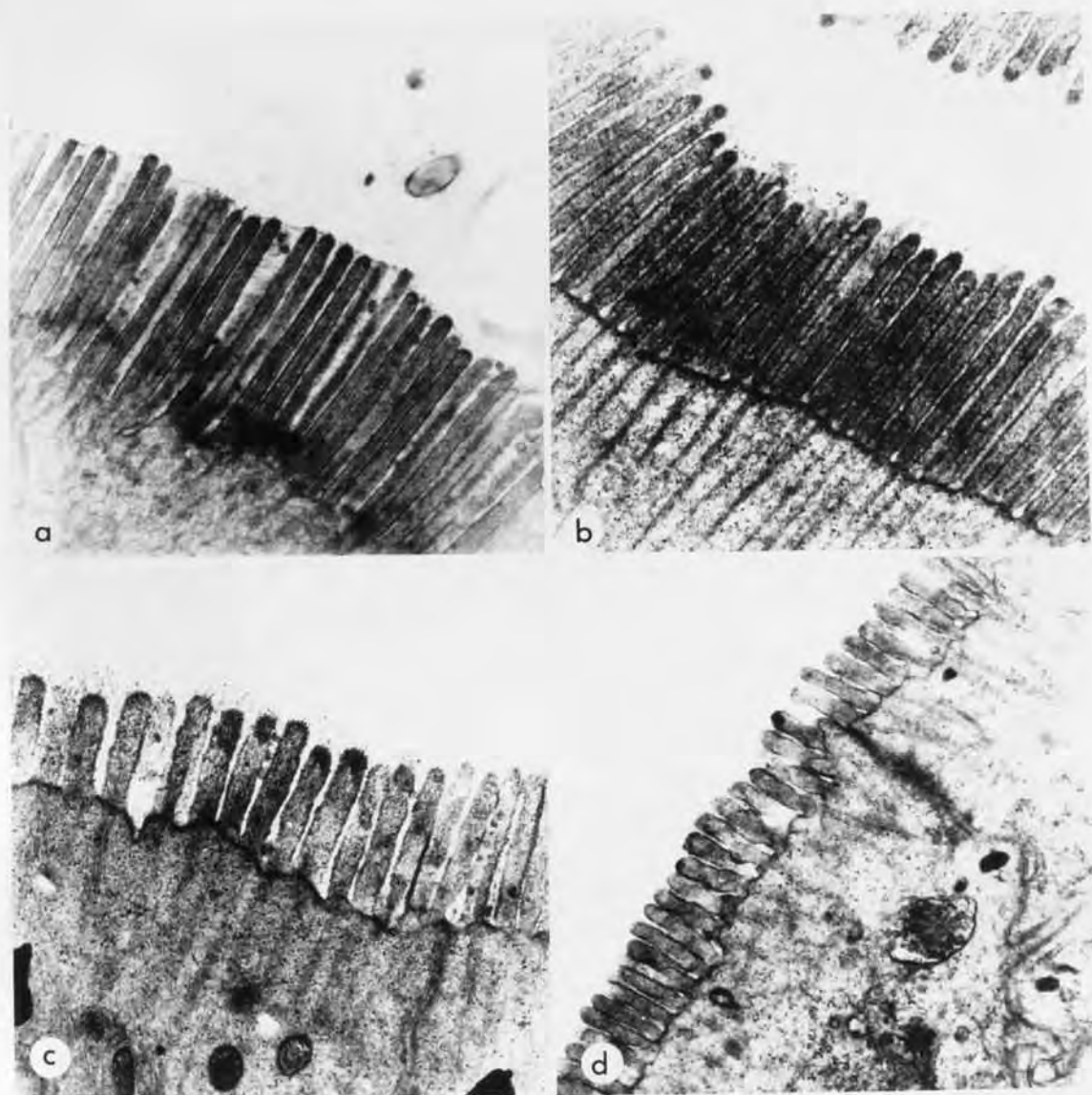


Figura 3.- ESTUDI COMPARATIU DEL DIÀMETRE DE LES MICROVELLOSITATS AL MET. Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard, essent el número entre parèntesis el nombre de dades. P, punta vellositat; M, meitat vellositat i C, cripta.



Fotografia 12.- MICROVELLOSITATS DE LA PUNTA DE LA VELLOSI-
TAT DEL JEJÚ I DE LES DIVERSES ZONES DEL CEC.

a: jejú; la llargària mitjana (l) és de 1,4 μm . X 37.440.

b: cec proximal; l = 0,82 μm . X 62.400.

c: cec medial; l = 0,48 μm . X 62.400.

d: cec distal; l = 0,40 μm . X 48.000.

crovellositats/ μm de teixit.

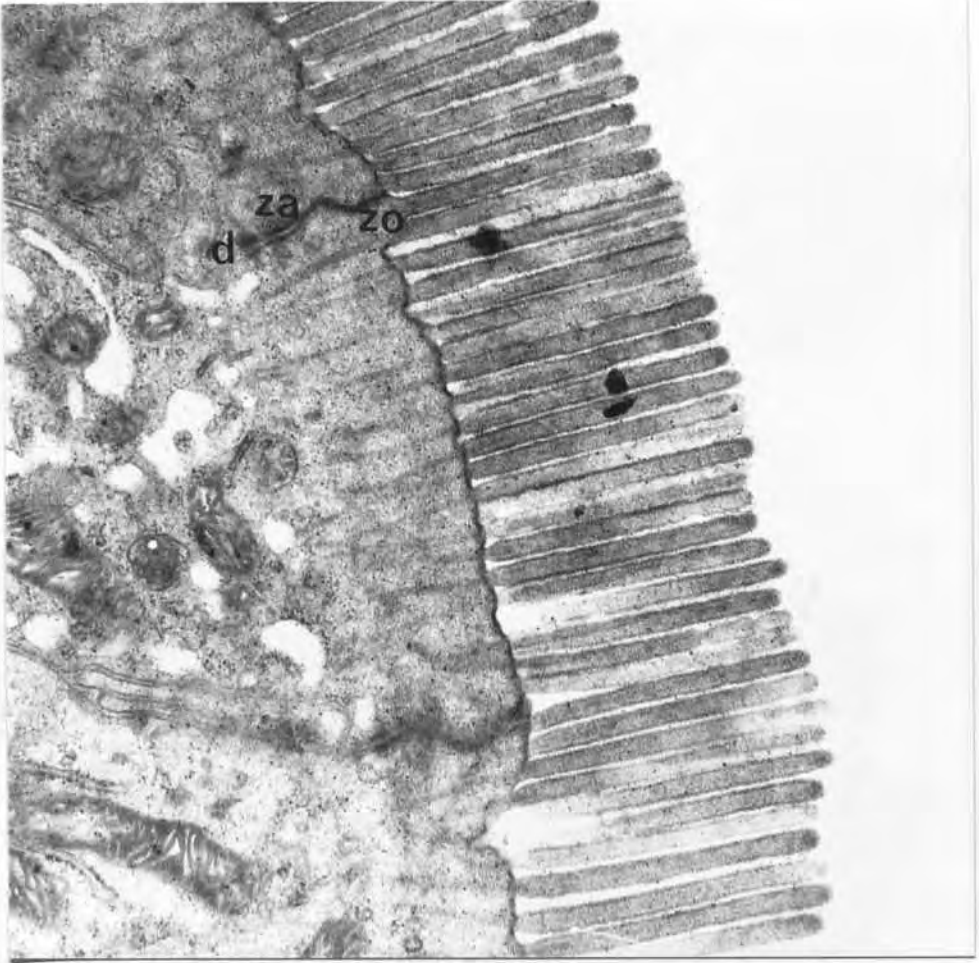
En les cèl.lules de la cripta, el *glicocalix* és també menys desenvolupat, els mitocondris són menys nombrosos, més grans i més irregulars en la forma i el reticle endoplasmàtic és menys desenvolupat. En la zona apical d'aquestes cèl.lules, es poden observar unes granulacions (fotografia 17) que després, a mida que la cèl.lula va migrant, van desapareixent i que segons TRIER i MADARA (1981) són de zimogen, per la qual cosa s'atribueixen funcions secretores a les cèl.lules de la cripta.

2.2.2.3.2. Unions intercel.lulars

En el cec de pollastre, les unions intercel.lulars són com en altres porcions del tracte digestiu i en altres espècies, de tres tipus. A la zona apical s'hi troba l'anomenada *zonula occludens* o unió estreta que és una banda apical circumferencial en la qual les membranes de les cèl.lules adjacents estan íntimament unides, donant la imatge al MET d'ésser una sola membrana (fotografia 13). Immediatament per sota de la unió estreta, hi ha l'anomenada *zonula adherens* o unió intermèdia, que també és una banda circumferencial en la qual les membranes adjacents estan més separades que a la unió estreta i la zona citoplasmàtica és més densa als electrons (fotografia 13). Sembla ésser que és en aquesta zona on van a parar els filaments de la xarxa terminal (TRIER i MADARA, 1981).

Per sota la unió intermèdia, es troba la *macula adherens* o desmosoma, que és una estructura petita i discontinua que no forma un cinturó cel.lular com les altres unions (fotografia 13).

En la membrana basolateral de la cèl.lula, que és on es troben totes aquestes unions, hi ha també interdigita-



Fotografia 13.- DETALL DE L'EPITELI DE LA MEITAT DE LA VE-
LLOSITAT DEL CEC PROXIMAL AMB LES UNIONS INTERCEL.LULARS.
zo, zonula occludens; za, zonula adherens; d, desmosoma.
X 37.440.

cions entre les membranes de cèl.lules adjacents que també ajuden a donar cohesió entre cèl.lules veïnes. Entre les interdigitacions s'hi poden trobar també alguns desmosomes (fotografia 14). En les cèl.lules de la cripta, les interdigitacions són menys desenvolupades que en les cèl.lules de la punta de la vellositat (fotografia 17).

2.2.2.3.3. Cèl.lules caliciformes o cèl.lules de goblet

Són cèl.lules mucoses que presenten el vèrtex en distensió ple de glòbuls de mucus que li donen la forma característica de calze (fotografia 15).

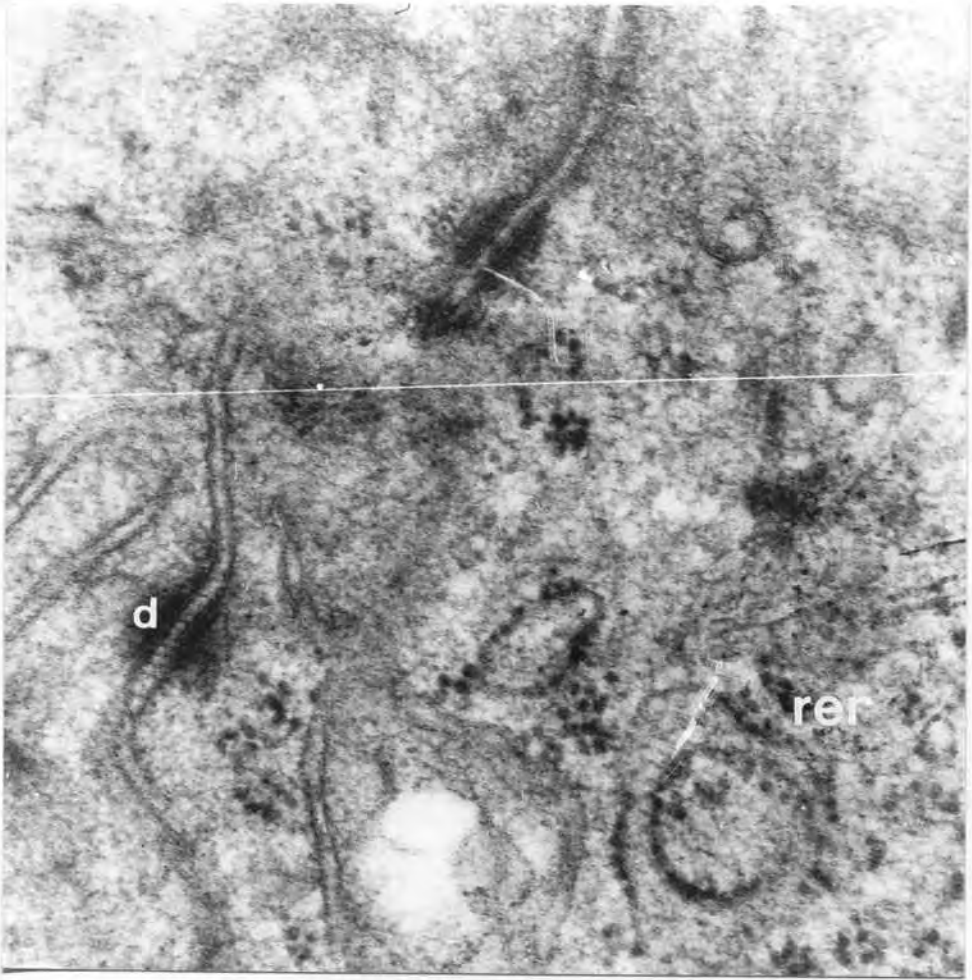
En la base, més estreta, s'hi troba el nucli una mica més petit que el dels enteròcits. Cada glòbul de mucus està rodejat per una membrana unitària. Els òrgans estan localitzats preferentment entre els grànuls de secreció i el nucli. Cal destacar el desenvolupament de l'aparell de Golgi, que està localitzat en la regió propera als grànuls de mucus.

Aquestes cèl.lules també presenten microvellositats en la zona apical que en el moment de secreció de mucus, sembla ésser que són empeses pel mucus cap a la llum intestinal (fotografia 16).

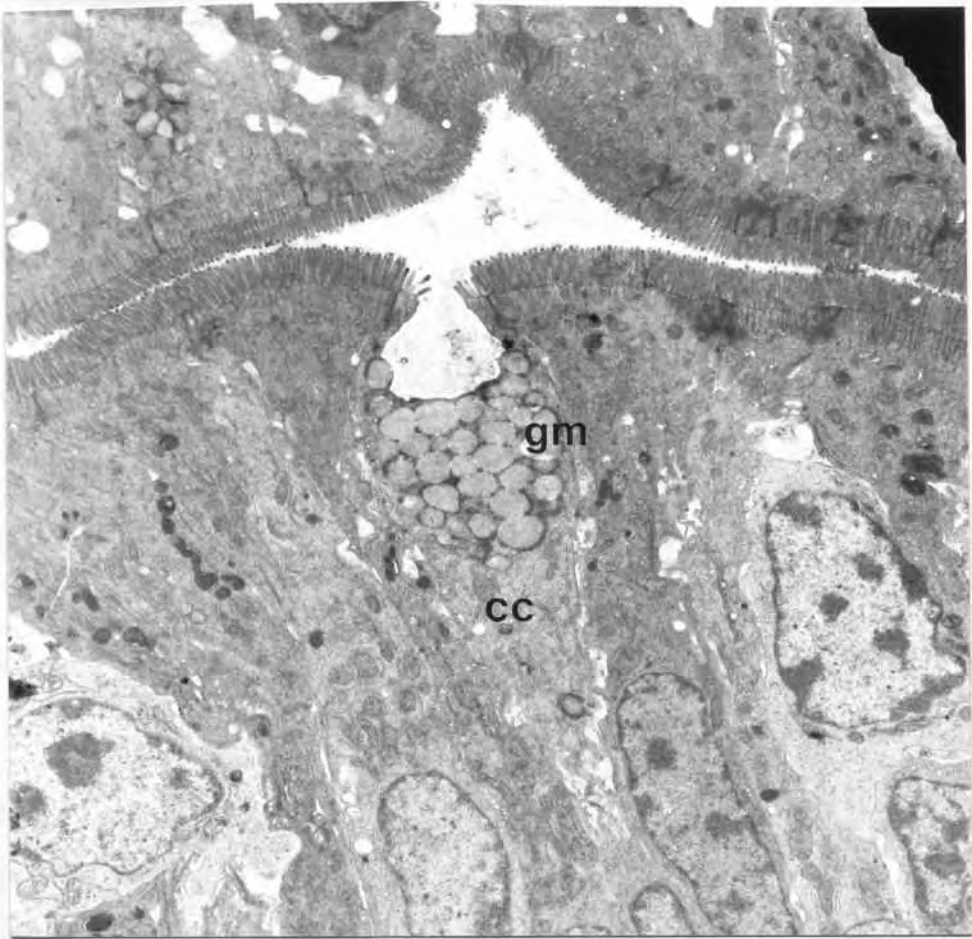
No s'ha trobat cap diferència notable entre les cèl.lules caliciformes de les quatre zones estudiades, ni entre les de la cripta i les de la vellositat.

2.2.2.3.4. Cèl.lules endocrines

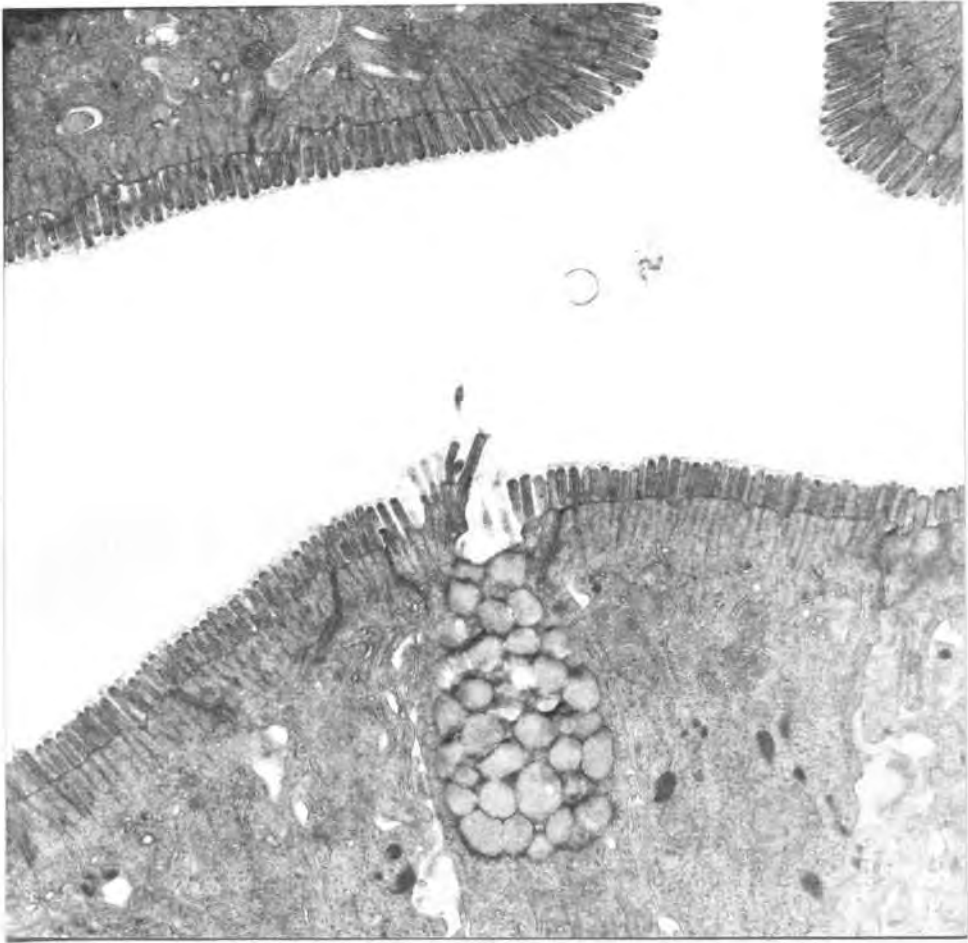
A l'intestí de pollastre s'hi han trobat diversos tipus de cèl.lules endocrines, localitzades sobretot a la cripta. Així, ANDREW (1976) mitjançant preparacions histològiques específiques, va trobar en el duodè de pollas-



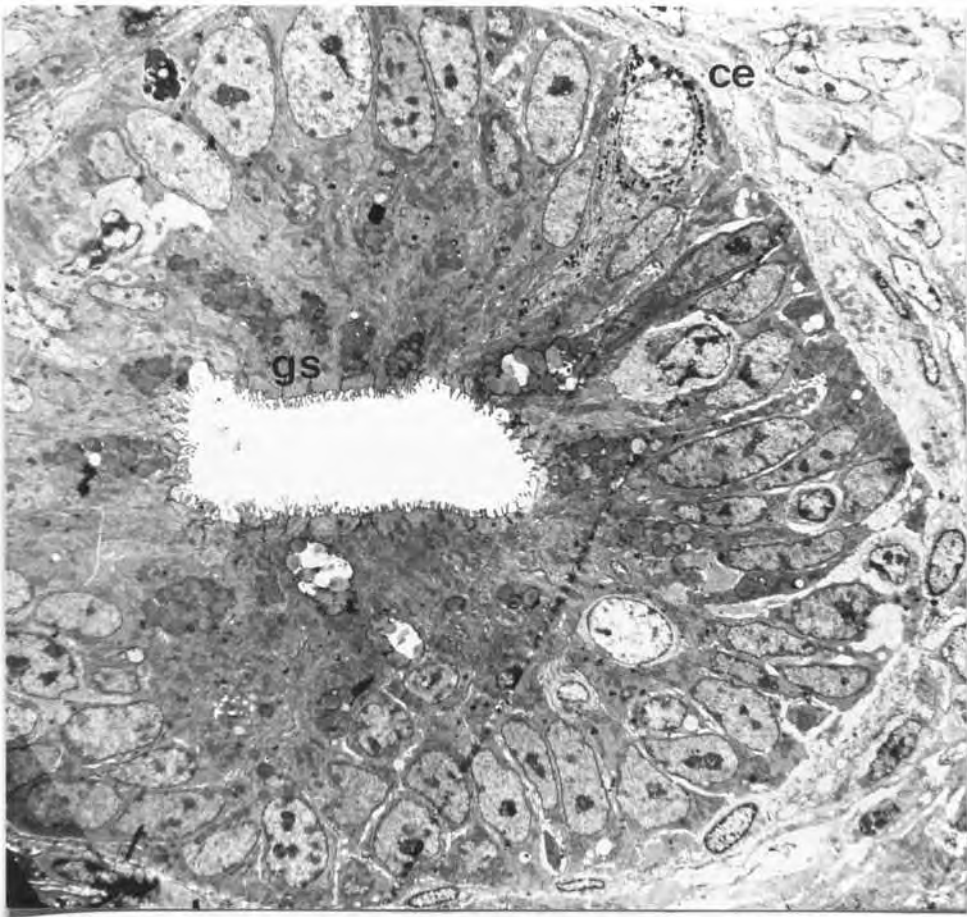
Fotografia 14.- IMATGE CORRESPONENT A LA PUNTA DE LA VELLO-
SITAT DEL CEC MEDIAL EN LA QUE S'OBSERVA UN DESMOSOMA (d)
LOCALITZAT A LA ZONA BASAL DE LA MEMBRANA BASOLATERAL. Tam-
bé hi és molt visible un fragment de reticle endoplasmàtic
rugós (rer). X 93.120.



Fotografia 15.- ULTRAESTRUCTURA D'UNA CÈL.LULA CALICIFORME (CC) PRESENT A LA MEITAT DE LA VELLOSTAT DEL CEC PROXIMAL. gm, grànuls de mucus. X 8.160.



Fotografia 16.- DETALL D'UNA CEL.LULA CALICIFORME DE LA MEITAT DE LA VELLOSIAT DEL CEC PROXIMAL. X 13.440.



Fotografia 17.- IMATGE D'UNA CRIPTA DEL CEC PROXIMAL. gs, grànuls de secreció i ce, cèl.lula enterocromafina. X 3.360.

tre cèl.lules enterocromafines, secretores de serotonina (MONESI, 1960), cèl.lules secretores de secretina, cèl.lules D secretores de somatostatina i, en la porció distal de l'intestí, cèl.lules secretores d'enteroglucagó. SUNDLER (1977) va trobar també a l'intestí de pollastre, cèl.lules secretores de pèptid intestinal vasoactiu.

En aquest estudi, sense utilitzar tincions específiques, s'han trobat cèl.lules enterocromafines, tant en les criptes del cec (fotografia 17) com en el jejú (fotografia 10), no havent-se trobat cap diferència notable entre les cèl.lules d'aquestes dues zones. Es tracta de cèl.lules piramidals, amb l'apex molt estret, tocant a la llum intestinal, on també hi ha microvellositats. El nucli, en disposició basal, està rodejat per nombroses granulacions elipsoïdals, molt denses als electrons amb l'eix major de $381,0 \pm 18,1$ nm (mitjana \pm error estàndard de 13 dades).

3. ABSORCIÓ INTESTINAL DE MONOSACÀRIDS

3.1. REVISIÓ DE LES CARACTERISTIQUES DE L'ABSORCIÓ INTESTINAL DE MONOSACARIDS

L'epiteli intestinal representa una barrera per al moviment de substàncies des de la llum de l'intestí fins a la sang. Així, l'absorció intestinal és constituïda per dos processos seqüencials que inclouen, en primer lloc, el pas de soluts a través de la vora "en raspall" de la cèl.lula epitelial i, en segon lloc, el pas a través de la membrana basolateral de l'enteròcit per anar a parar a la làmina pròpia, des d'on accediran al torrent sanguini per a ésser distribuïts per tot l'organisme.

Aquest epitel·li no pot ésser descrit únicament com una tanca que separa dos medis diferents, ans al contrari es tracta d'una estructura activa a través de la qual s'estableix un continu intercanvi de substàncies entre el contingut intestinal i el líquid extracel·lular de l'organisme. Aquest pas de soluts i aigua és molt selectiu ja que els mecanismes responsables són específics segons l'estructura, solubilitat, forma i càrrega elèctrica de la molècula.

Les cèl.lules absorbents o enteròcits, màximes responsables de l'absorció intestinal són cèl.lules polaritzades. Morfològicament, ja que la membrana luminal presenta microvellositats que són absents a la basolateral (vegeu apartat 2.2.2.3.1.), i funcionalment, a causa de la distinta proporció de proteïnes i fosfolípids que formen les membranes. Això dona lloc a una diferent activitat enzimàtica i dis-

tribució dels mecanismes de pas de substàncies a ambdues membranes (ESPOSITO, 1983). D'aquesta manera, els monosacàrids travessen la vora luminal per transport mitjançat concentratiu i per un procés de difusió simple, mentre que a la basolateral ho fan per transport mitjançat equilibratiu i per difusió simple. Aquesta distribució asimètrica permet el moviment net de monosacàrids des de la banda luminal cap a la serosal de la paret intestinal.

3.1.1. TRANSPORT MITJANÇAT CONCENTRATIU

A la membrana luminal de l'enteròcit existeix un mecanisme de transport actiu, capaç de transferir les molècules de sucre dins la cèl.lula en contra del gradient de concentració. El seu manteniment energètic procedeix, segons hom creu al moment present, del gradient electroquímic de Na^+ , així com del potencial de membrana a través de la membrana cel.lular.

RIKLIS i QUASTEL (1958) varen ésser els primers a observar que aquest procés concentratiu era dependent de Na^+ , i dos anys més tard, CRANE (1962) proposava un model en el qual postulava un mecanisme bàsic per a aquesta dependència. Es tracta de l'anomenada "hipòtesi del gradient iònic", segons la qual l'energia requerida per a l'acumulació de sucres deriva del flux de Na^+ a través de la membrana luminal a favor del seu gradient electroquímic mantingut gràcies a un mecanisme de transport actiu de Na^+ cap a l'exterior de la cèl.lula.

Els enteròcits, com la majoria de les cèl.lules, presenten una proteïna de membrana encarregada del transport actiu acoblat de Na^+ cap enfora de la cèl.lula i K^+ cap endins. Aquesta proteïna, a més, té capacitat per a hidrolitzar l'ATP i obtenir l'energia necessària per al transport. Es tracta de l'anomenada bomba de Na^+ i K^+ que a l'enterò-

cit és localitzada exclusivament a la vora basolateral (FUJITA *et al.*, 1971; STIRLING, 1972; MURER, 1976; MURER i HOPFER, 1977 i DiBONA i MILLER, 1979). Per a CRANE (1962), el flux conjunt de monosacàrid i Na^+ implica l'existència d'uns components de membrana, és a dir transportadors, que aconseguen l'acoblament del pas de Na^+ a favor del gradient amb el pas de sucre en contra del gradient, amb la formació d'un complex ternari, transportador-sucre- Na^+ . D'aquesta manera, el gradient electroquímic és una font d'energia que és utilitzada per a transportar sucres en contra del gradient de concentració.

Posteriorment, es demostrà que el transport de sucres era un procés saturable, que presenta una cinètica de Michaelis-Menten (FISHER i PARSONS, 1949) i és inhibible competitivament pel glucòsid florricina (ALVARADO i CRANE, 1962 i ALVARADO, 1967). A l'intestí prim, aproximadament el 90 % del flux inicial de glucosa és inhibit per la florricina, i l'entrada residual és deguda a un procés no concentratiu i no saturable (ALVARADO i CRANE, 1964).

El descobriment de la florricina com a inhibidor competitiu del transport mitjançat concentratiu va significar un gran avenç en l'estudi d'aquest mecanisme. La seva utilització ha permès la caracterització i quantificació del transport actiu. Tanmateix, no es coneix exactament quina és la interacció de la florricina amb el transportador. Es creu que la seva inhibició és deguda a la presència en la seva molècula d'un grup β -metil-D-glucòsid que té una gran afinitat envers el transportador. La majoria d'autors afirmen que el glucòsid és reconegut pel transportador, però la qüestió està en si és translocat o no a l'interior cel·lular. Per a KESSLER i SEMENZA (1983), la florricina s'uneix al transportador a la banda luminal en lliure competició amb el sucre i sense penetrar dins la cèl·lula. Així, la seva acció seria només de blocatge del transportador. En canvi BROU-LA-ROCHE i ALVARADO (1983) consideren que el glucòsid és trans-

locat a l'interior cel.lular i queda probablement retingut en la xarxa terminal de la zona luminal de l'enteròcit.

El transport mitjançat concentratiu de sucres presenta una elevada especificitat, ja que només pot ésser utilitzat per monosacàrids amb una determinada configuració. CRANE (1960 i 1962) en va establir alguns dels requeriments necessaris, que són els següents:

1. Formar un anell piranòsid amb un grup hidroxil en el carboni 2 en la mateixa orientació que hi ha en la D-glucosa.
2. Tenir un àtom de carboni unit al carboni 5.
3. Ésser de la sèrie dels D-monosacàrids.

En la figura 4 hi ha la representació de Haworth dels requeriments bàsics. En els hidroxils dels carbonis 1, 3 i 4 es permeten substituents així com inversions en la configuració espacial respecte a la glucósa. Això permet la utilització experimental de sucres, que si bé poden utilitzar el sistema de transport, no poden ésser metabolitzats per l'enteròcit. Aquest és el cas de la 3-oxi-metil-D-glucosa (CSÁKY i THALE, 1960), que és de les més emprades per a l'estudi de l'absorció intestinal. També es poden admetre substituents de gran volum en l'hidroxil del carboni 1, ja sigui en la configuració α o β , com ara l' α i el β -metil-D-glucòsid (LANDAU *et al.*, 1962). En els hidroxils dels carbonis 3 i 4, només hi poden haver petits substituents. En el carboni de R_4 (és a dir el carboni 6) l'hidroxil pot ésser reemplaçat per hidrogen o fluor (CRANE i KRANE, 1959 i WILSON i LANDAU, 1960). Alternativament, el carboni 6 pot ésser totalment reemplaçat, com és el cas de la xilosa (CSÁKY i LASSEN, 1964 i ALVARADO, 1966). Finalment, el pont d'oxigen de la piranosa es pot reemplaçar per un carboni (CASPARY i CRANE, 1970) o per un àtom electronegatiu com el sulfur (CRITCHLEY *et al.*, 1969).

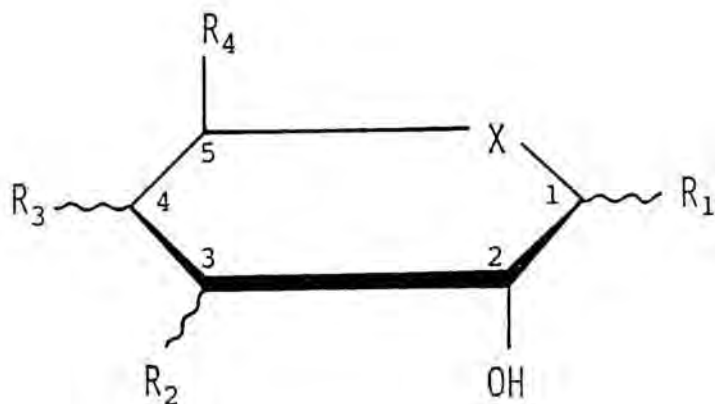


Figura 4.- REPRESENTACIÓ DE HAWORTH AMB ELS REQUERIMENTS BÀSICS DELS MONOSACÀRIDS QUE UTILITZEN LA VIA DEL TRANSPORT MITJANÇAT CONCENTRATIU DE LA MEMBRANA LUMINAL. X, normalment és un àtom d'oxigen, però també pot ésser un sulfur o un carboni. Les línies rectes indiquen les orientacions obligatòries, i les ondulades aquelles en les quals l'orientació és menys crítica.

Tots els monosacàrids, a causa de llur particular estructura molecular, presenten més o menys afinitat envers el transportador. ALVARADO (1966) va proposar l'eliminació de la distinció clàssica entre sucres transportats i no transportats, i proposà també una escala d'afinitat (taula II) en la qual els sucres d'elevada afinitat són aquells que compleixen estrictament els requeriments estructurals abans esmentats,

i a mesura que disminueix l'afinitat es troben aquells monosacàrids que presenten menys requeriments i que, per tant, van deixant d'ésser reconeguts pel transportador. Els sucres del final de l'escala, pràcticament no utilitzen el transport mitjançat concentratiu de la vora "en raspall".

L'especificitat d'aquest mecanisme implica doncs l'existència de competició dels monosacàrids pel transportador, fet ja demostrat per a la glucosa i la galactosa, tant *in vivo* com *in vitro*, per ALVARADO i CRANE (1962).

Darrerament, alguns autors han suggerit l'existència, a la vora "en raspall" de l'enteròcit, de dos tipus de transportadors de monosacàrids, ambdós dependents de l'ió sodi (LYON i

TAULA II.- ESCALA D'AFINITAT PER AL TRANSPORTADOR DE LA VORA "EN RASPALL".

D-glucosa
6-deoxi-D-glucosa
 β -metil-D-glucosa
D-galactosa
 α -metil-D-glucopiranòsid
1,5-anhidro-D-glucitol
3-oxi-metil-D-glucosa
D-fucosa
D-xilosa
D-mannosa, α -metil-D-mannopiranòsid
L-glucosa
D-lixosa, L-ramnosa, 2-deoxi-D-glucosa
D-mannitol, D-sorbitol

Els monosacàrids estan llistats en ordre decreixent d'afinitat (ALVARADO, 1966).

CRANE, 1966a; HONEGGER i SEMENZA, 1973; KAUNITZ i WRIGHT, 1983; DORANDO i CRANE, 1984 i ALVARADO, 1985 comunicació personal). Un d'ells presenta baixa afinitat i elevada capacitat envers la glucosa, elevada sensibilitat envers la florricina i una estequiometria per al Na^+ d'1. L'altre, en canvi, presenta una alta afinitat i baixa capacitat envers la glucosa, baixa sensibilitat envers la florricina i una estequiometria per al Na^+ superior a 1. Aquesta situació seria molt semblant a la descrita per TURNER i MORAN (1982a, b i c) al ronyó, on s'han pogut identificar dos tipus de mecanismes de transport.

L'existència d'aquests dos sistemes de transport a l'intestí prim explicaria, segons CRANE (comunicació personal a SEMENZA *et al.*, 1984), les discrepàncies en les constants cinètiques que es troben a la bibliografia. En el cas de demostrar-se llur existència en l'epiteli intestinal, caldrà reconsiderar molts d'aquests resultats.

3.1.1.1. Acoblament energètic del transport actiu

Durant molts anys, es va creure que el gradient químic de l'ió sodi era la força impulsora primordial del transport actiu de la membrana luminal. Aquest gradient és mantingut per la bomba de Na^+ i K^+ amb la consegüent despesa d'ATP (figura 5).

Tanmateix, recerques ulteriors han aportat noves dades experimentals que fan que alguns autors la considerin insuficient. Així, ja en el 1965 BOSACKOVA i CRANE trobaren que el gradient de Na^+ era suficient sempre i quan el procés funcionés al 100 %, fet que termodinàmicament és bastant poc probable. D'altra banda, KIMMICH (1970b i 1972) observà que en cèl.lules epitelials aïllades, amb el gradient de Na^+ invertit, seguia havent-hi transport de sucres en contra del gradient de concentració per un procés dependent de Na^+ i inhibible per florricina. POTASHNER i JOHNSTONE (1970 i

1971) i JOHNSTONE (1972) trobaren que la capacitat de transport depenia més de la disponibilitat d'ATP que dels gradients dels ions monovalents.

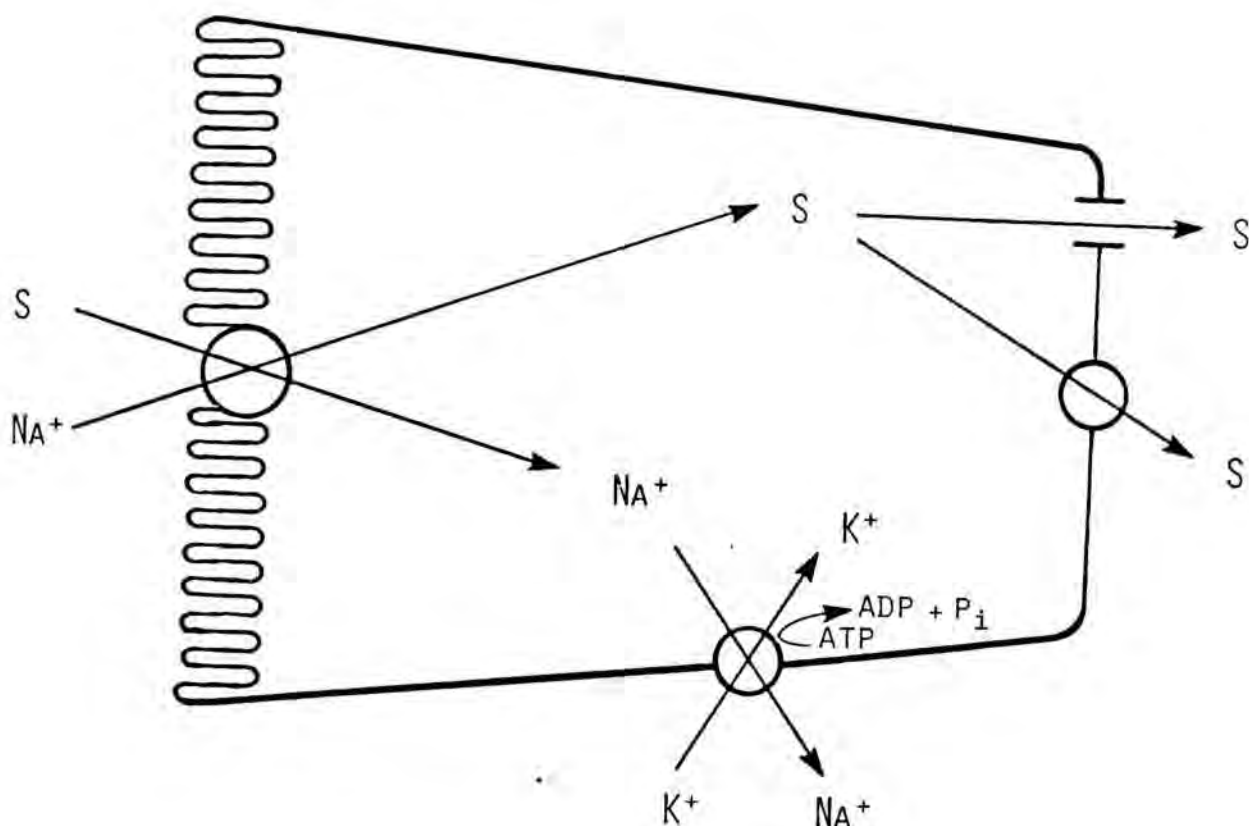


Figura 5.- REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DELS MECANISMES IMPLICATS EN L'ABSORCIÓ INTESTINAL DE MONOSACÀRIDS.

L'esquema mostra el transport mitjançat concentratiu de sucres (S) de la vora luminal impulsat pel flux de l'ió sodi a favor del seu gradient electroquímic, mantingut gràcies a la bomba de Na^+ i K^+ de la membrana basolateral.

La solució al problema energètic va provenir dels experiments realitzats per alguns autors, consistents a alterar el potencial de membrana i veure el seu efecte sobre el transport

actiu de substrats. Així, GIBB i EDDY (1972) en cèl.lules ascítiques exhaurides d'ATP, observaren que la valinomicina (ionòfor específic del K^+) estimulava l'acumulació d'aminoàcids. REID *et al.* (1974), també en cèl.lules ascítiques exhaurides d'ATP, amb el gradient de Na^+ imposat, varen veure que la valinomicina estimulava l'acumulació de metionina fins a nivells semblants als presents en cèl.lules energetitzades.

Aquests resultats, juntament amb els obtinguts per SCHULTZ i ZALUSKY (1963 i 1964), BARRY *et al.* (1965), LYON i CRANE (1966a i b) i QUAY i ARMSTRONG (1969) sobre l'activitat elèctrica de l'epiteli intestinal, suggereixen la participació del potencial de membrana en el transport de sucres. Posteriorment, MURER i HOPFER (1974), HOPFER *et al.* (1975), MURER *et al.* (1975), SIGRIST-NELSON *et al.* (1975), KIMMICH *et al.* (1977), KIMMICH i CARTER-SU (1978) i CARTER-SU i KIMMICH (1978 i 1980) amb tècniques més avançades, posaren de manifest que el gradient electroquímic del Na^+ era tan sols una part de la font energètica necessària per al transport concentratiu i demostraren que el potencial de membrana hi exercia un paper cabdal en crear un gradient elèctric favorable per al transportador.

Termodinàmicament, la relació entre el gradient electroquímic, el potencial de membrana i el gradient de solut que una cèl.lula pot arribar a establir queda reflectit en la següent desigualtat (KIMMICH, 1981):

$$v_{Na^+} + (RT \ln \frac{a_{Na^+}^m}{a_{Na^+}^c} + FV_{mc}) \geq RT \ln \frac{a_S^c}{a_S^m}$$

essent:

v_{Na^+} , el coeficient d'acoblament, és a dir els mols d'ió sodi

que són transportats per cada mol de sucre,
 R , la constant dels gasos perfectes,
 T , la temperatura absoluta,
 $a_{Na^+}^m$ i $a_{Na^+}^c$, les activitats de l'ió sodi en els compartiments luminal i cel·lular, respectivament,
 F , la constant de Faraday,
 V_{mc} , el potencial de membrana existent a través de la membrana luminal i
 a_S^c i a_S^m , les activitats del monosacàrid en els compartiments cel·lular i luminal, respectivament.

Els termes de l'esquerra de l'equació representen l'energia mínima requerida per a establir el gradient de solut de la dreta.

Durant molt de temps s'ha confós la concentració intracel·lular de Na^+ amb la seva activitat, fet que conduïa a considerar el gradient de Na^+ més petit d'allò que en realitat és. En els darrers anys, aquest problema s'ha evitat amb la utilització de microelèctrodes.

El coeficient d'acoblament entre el sucre i el Na^+ segueix essent, a l'actualitat, un punt de discussió i té una gran importància, puix que la força impulsora del transport és el producte d'aquest coeficient i del gradient electroquímico. Clàssicament ha estat calculat en teixit sencer, mesurant simultàniament l'entrada unidireccional de solut i de Na^+ . D'aquesta manera, majoritàriament s'ha trobat que l'estequiometria del transport pel que fa als sucres és 1:1 (CURRAN *et al.*, 1967; GOLDNER *et al.*, 1969; SCHULTZ i CURRAN, 1970; SEPULVEDA i SMITH, 1981 i ALVARADO i LHERMINIER, 1982). Aquests resultats són corroborats pels obtinguts mitjançant vesícules de la vora "en raspall" (HOPFER, 1978; HOPFER i GROSECLOSE, 1980 i MURER i KINNE, 1980). Tenint en compte un coeficient 1, l'energia és suficient per a mantenir el gradient de no-electròlits obser-

vats. Hi ha d'altres autors que, de llurs resultats cinètics, n'extrauen un coeficient d'acoblament de 2 (KIMMICH i RANGLES, 1980; KAUNITZ *et al.*, 1982; KESSLER i SEMENZA, 1983 i WRIGHT *et al.*, 1983). KIMMICH i RANGLES (1979), utilitzant inhibidors de la difusió facilitada de la vora basolateral, obtenen un gradient de sucre que excedeix el gradient electroquímic, per la qual cosa consideren que obligatòriament el coeficient d'acoblament ha d'ésser superior a 1.

Es difícil doncs de determinar si aquestes discrepàncies obeeixen a diferències específiques o metodològiques, per la qual cosa cal esperar resultats més concloents.

3.1.1.2. Mecanisme del cotransport de monosacàrids i Na⁺

Malgrat que ja ha estat acceptat el gradient electroquímic com a font energètica del cotransport de sucres i Na⁺, no se sap encara quin és el mecanisme exacte pel qual es produeix l'acoblament, és a dir, de quina manera l'aportació energètica afecta la interacció entre el transportador, el sucre i l'ió sodi.

Per tal d'aclarir aquest procés han estat proposats, en els darrers anys, nombrosos models que d'alguna manera expliquen el mecanisme bàsic de cotransport. En termes generals, en aquests models es considera el transportador com a una proteïna penetrant de la membrana capaç d'unir-se al sucre i a l'ió sodi i transportar-los cap a l'interior de la cèl.lula. Des de fa uns anys s'estan realitzant molts esforços per aïllar el transportador i determinar-ne l'estructura. En l'actualitat, tan sols se sap que es tracta d'una glicoproteïna a la qual uns autors atribueixen un pes molecular de 160.000 (MALATHI *et al.*, 1980 i KANO-KAMEYANA i HOSHI, 1983) mentre que d'altres proposen un pes molecular de 72.000 (KLIP *et al.*, 1980; HOSANG *et al.*, 1981 i SEMENZA *et al.*, 1984) i de 71.000 (PEERCE i WRIGHT, 1984).

Tanmateix, cal remarcar que els mateixos SEMENZA *et al.* (1984) no asseguren que es tracti del transportador sencer sinó potser d'una subunitat.

Funcionalment, es considera que la translocació, és a dir, el pas dels cosubstrats des de la llum intestinal fins a l'interior de la cèl.lula, pot dur-se a terme de dues maneres diferents:

1. Mitjançant un transportador mòbil en el qual els *loci* per als cosubstrats puguin ésser ocupats a una banda de la membrana i ésser físicament moguts cap a l'altra banda; o bé
2. que es tracti d'un canal o porus, en el qual la translocació sigui deguda a un canvi conformacional en la proteïna que el forma.

En l'actualitat, es pensa que la primera opció no és viable, és a dir, s'exclou la possibilitat del funcionament del transportador mòbil, que pot tenir un moviment de "difusió" o de "rotació" dins la membrana. Això no vol dir, però, que el transport no vagi acompanyat de moviment. Així, dins l'opció d'un porus o canal s'introdueix la idea del transportador "mòbil", no com a concepte físic sinó com a concepte cinètic. Per a LÄUGER (1980), cinèticament i termodinàmicament, un transportador mòbil és aquell que pot presentar els *loci* d'unió dels cosubstrats a ambdues cares de la membrana, però mai simultàniament. D'aquesta manera, el concepte de translocació és sinònim d'accessibilitat, de la qual es considera responsable un canvi conformacional de la proteïna. D'una manera senzilla es podria dir que els *loci* estan sempre al mateix lloc, però que el canvi conformacional de la proteïna, provocat per la seva unió als cosubstrats, els pot deixar al descobert a un costat o a l'altre de la membrana.

A l'hora d'explicar el mecanisme de transport a nivell molecular, cal considerar les premisses que aniran configu-

rant els diferents models i que són enumerades a continuació:

1. La capacitat i velocitat de translocació del transportador lliure (T), dels complexos binaris T-substrat (S) i $T-Na^+$ i del complex ternari $T-S-Na^+$.
2. L'ordre seqüencial de la unió i desunió dels cosubstrats al transportador.
3. Si les reaccions d'unió dels cosubstrats al transportador són simètriques a ambdues cares de la membrana.
4. La càrrega elèctrica del transportador lliure i l'efecte del potencial de membrana.
5. El coeficient d'acoblament.
6. Les reaccions limitants del procés, que fonamentalment poden ésser la unió dels cosubstrats al transportador o la translocació del complex ternari.

El 1965, CRANE va proposar un model bàsic per al funcionament del transport mitjançat concentratiu d'acord amb la "hipòtesi del gradient iònic" postulada per ell mateix uns anys abans. Segons aquest model (figura 6) a la membrana hi hauria uns transportadors amb un *locus* d'unió per a l'ió sodi i un altre per al sucre, de manera que quan s'uneixen es forma un complex ternari ió-sucre-transportador, a l'exterior de la cèl.lula que es transloca cap a l'interior, on allibera ambdós substrats. L'afinitat del transportador envers el sucre a ambdues cares de la membrana és diferent, ja que és la unió del Na^+ al transportador la que determina l'afinitat envers el monosacàrid. Així, en el medi extracel.lular, ric en Na^+ , l'afinitat envers el sucre és gran; i en el medi intracel.lular, pobre en Na^+ , l'afinitat és petita. D'aquesta manera, un cop format el complex ternari aquest es transloca cap a la cara citoplasmàtica de la membrana a favor del gradient de Na^+ . Aleshores, el Na^+ es dissocia i això fa que l'afinitat del transportador envers el sucre disminueixi i

aquest quedi lliure en el citosol.

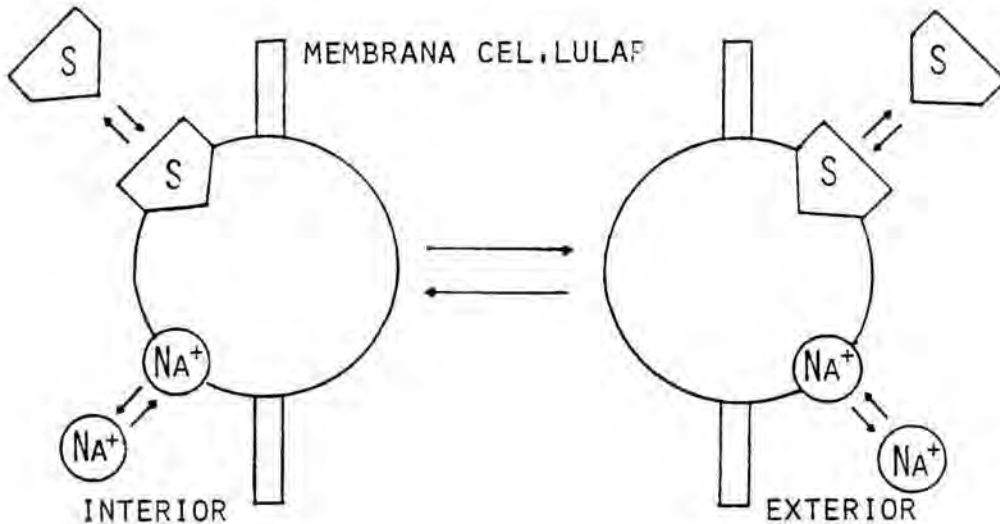
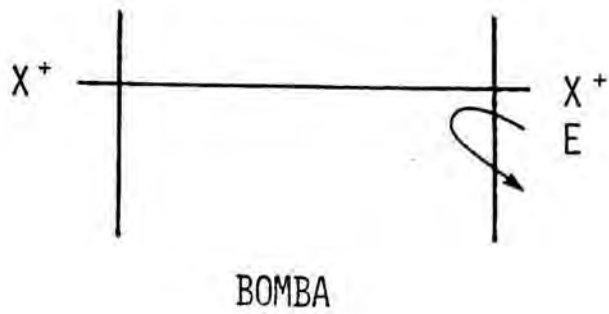
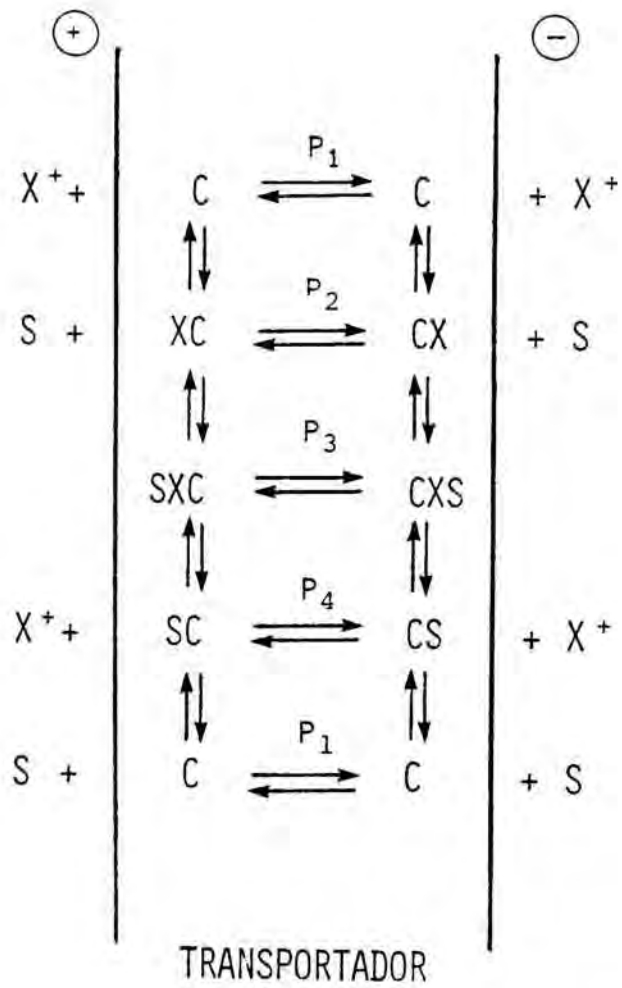


Figura 6.- MODEL PROPOSAT PER CRANE (1965) PER TAL D'EXPLICAR LA "HIPÒTESI DEL GRADIENT IÒNIC". A la membrana cel·lular hi ha uns transportadors capaços d'unir-se al substrat (S) i a l'ió sodi per tal de formar el complex ternari.

CRANE (1977) considera que el seu model bàsic ha d'ésser expandit per a poder explicar amb més profunditat el mecanisme de transport, i així proposa un model que anomena "refinat" i acabà de perfilar el 1980 (CRANE i DORANDO, 1980). Aquest model "refinat", que és esquematitzat a la figura 7, indica que el transportador pot unir-se primer al catió i després al substrat per a formar el complex ternari, o bé indistintament, unir-se primer al substrat i després al catió. Basant-se en els seus resultats experimentals, arriba a la conclusió que

Figura 7.- MODEL "REFINAT" DE CRANE (1977). En aquest model, el transportador (C) es pot unit primer al substrat o a l'ió sodi (X^+) per a formar el complex binari, i després al segon cosubstrat, i així donar lloc al complex ternari. P_1 , P_2 , P_3 i P_4 són les constants de permeabilitat que determinen la capacitat de translocació del transportador lliure i dels complexos binaris i ternari. També s'esquematitza la funció de la bomba de Na^+ i K^+ , que amb la despesa d'energia (E) manté el gradient de Na^+ i el potencial de membrana.



l'ordre seqüencial d'unió dels cosubstrats es produeix a l'atzar tot donant lloc en termes enzimàtics a una cinètica ordenada a l'atzar "bi-bi" (bisubstrat i biproducte). En aquest model es veu que els complexos binaris podrien translocar-se segons unes constants P_2 i P_4 . Tanmateix, aquestes constants serien molt petites i CRANE (1977) i CRANE i DORANDO (1980) assumeixen que els compostos binaris no es transloquen. Els únics que ho poden fer són doncs el portador lliure i el complex ternari.

Segons el model "refinat" de CRANE (1977) el transportador lliure és neutre i el coeficient d'acoblament és 1, de manera que el complex ternari està carregat positivament i pot translocar-se a favor del gradient elèctric. L'existència del potencial de membrana afavoreix que la concentració de Na^+ augmenti a la cara luminal de la membrana a les proximitats del transportador, la qual cosa facilita la unió del Na^+ al transportador.

El 1980, CRANE i DORANDO proposen un *locus* d'unió comú per al Na^+ i per al monosacàrid, que implica una interacció química entre ambdós substrats, característica del model totalment innovadora (figura 8). Pel que fa al funcionament, suggereixen que el transportador és fix i que es comporta com un ionòfor de glucosa dependent de Na^+ que no té cap moviment ni de translocació ni de rotació.

ALVARADO i LHERMINIER (1982) proposen un model (figura 9) que presenta l'avantatge de poder explicar el mecanisme de transport per als sucres així com també per als aminoàcids neutres. Les característiques bàsiques són que els complexos binaris no tenen capacitat de translocació, la cinètica és ordenada a l'atzar "bi-bi", el transportador és neutre i l'estequiometria és 1. Així, el complex ternari carregat positivament pot entrar dins la cèl.lula a favor del gradient elèctric, essent aquest el pas limitant del procés. Una de les característiques fonamentals del model és que consideren la

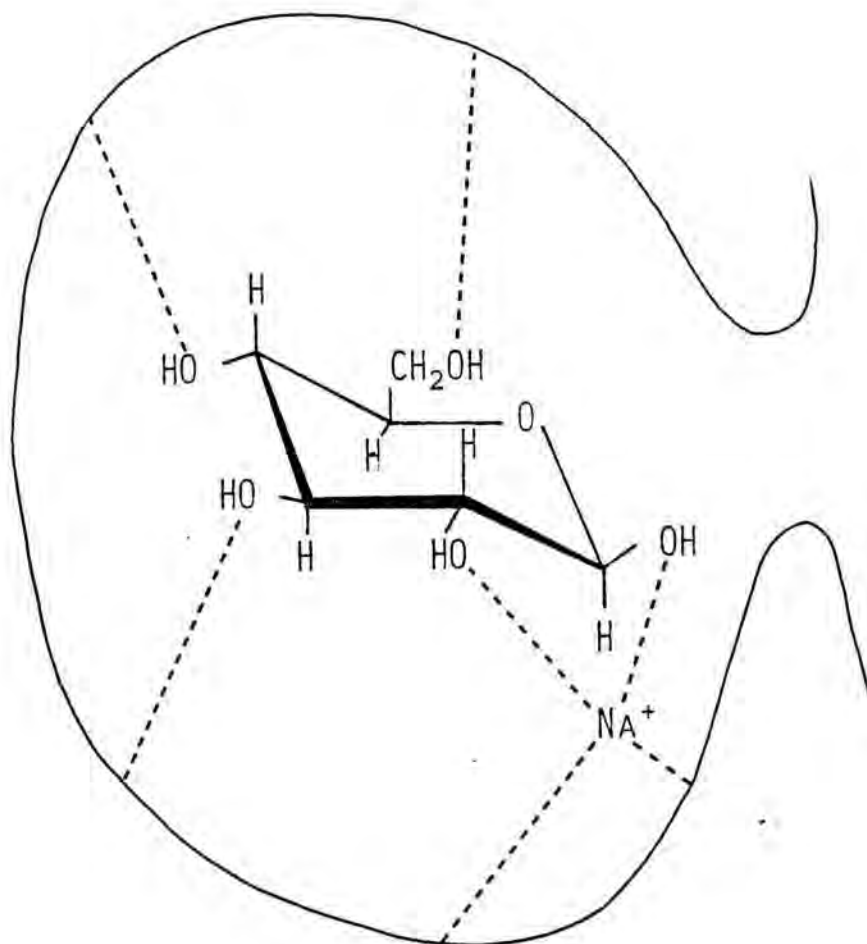


Figura 8.- ESQUEMA DE L'ESTRUCTURA PROBABLE DEL COMPLEX TERNARI, PROPOSAT PER CRANE I DORANDO (1980).

translocació del complex ternari com a irreversible. És a dir, per aquest mecanisme no pot sortir sucre de dins la cèl·lula, de manera que tan sols el transportador lliure pot realitzar aquest moviment. Aquests autors no donen cap detall del procés de translocació.

Un altre model existent a la bibliografia és el de KESSLER i SEMENZA (1983). Basant-se en llurs resultats experimentals conclouen que la permeabilitat dels complexos bina-

ris és pràcticament nul·la, la cinètica més probable seria l'ordenada a l'atzar "bi-bi", el transportador ha d'estar carregat negativament i el coeficient d'acoblament ha d'ésser 2. Funcionalment, consideren el transportador com un porus o canal amb comporta (figura 10). Aquesta comporta té una o dues càrregues negatives, i assumeixen que és on es

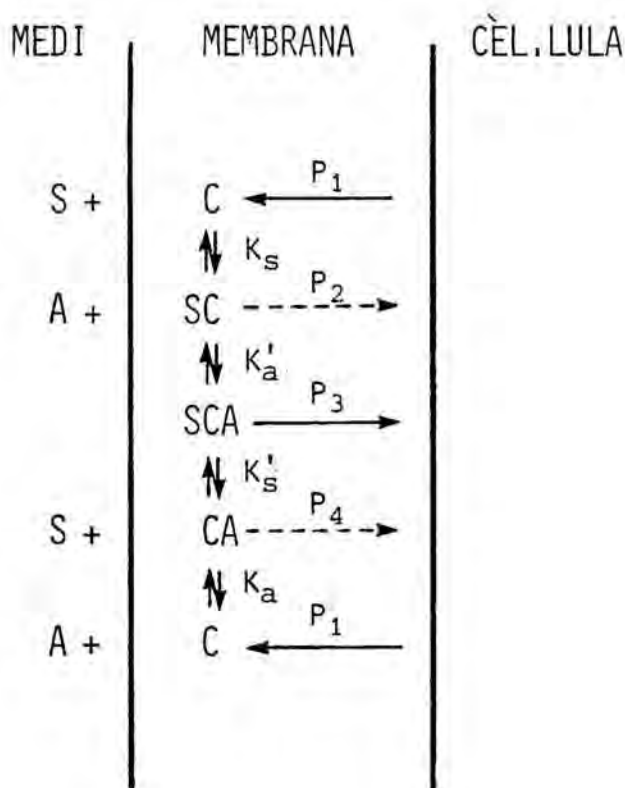





Figura 9.- MODEL DE COTRANSPORT PROPOSTAT PER ALVARADO I LHERMINIER (1982) TANT PER A SUCRES COM PER A AMINOÀCIDS NEUTRES. C és el transportador, S el substrat i A representa el Na^+ . Les constants de permeabilitat del transportador lliure, complexos binaris i ternari són P_1 , P_2 , P_3 i P_4 .

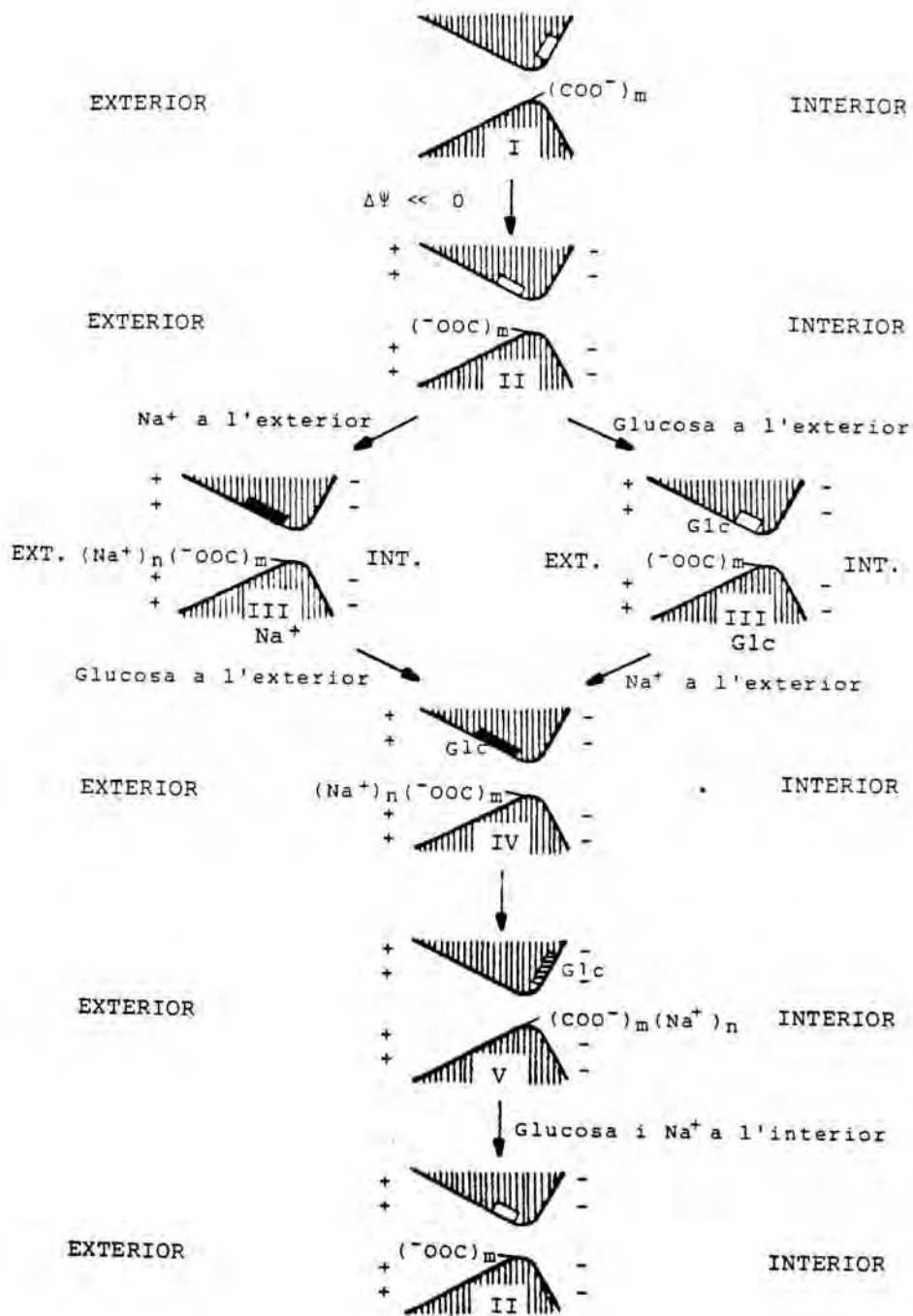
troba el *locus* d'unió per al Na^+ . En el que podriem dir la zona fixa del transportador, hi ha el *locus* per al sucre. Quan existeix una diferència de potencial a través de la membrana, essent l'interior cel.lular negatiu, aleshores la comporta, per atracció de càrregues, té tendència a estar orientada cap enfora i a permetre que s'uneixin el Na^+ i el sucre. Però quan s'anul.la la diferència de potencial, aleshores la comporta té una tendència intrínseca a estar orientada cap endins.

En condicions fisiològiques, es produeix la unió del sucre i del Na^+ , augmentant aquest darrer l'afinitat envers el primer. Si el coeficient d'acoblament és 2 i la comporta té una sola càrrega negativa, el complex ternari queda carregat positivament, amb la qual cosa el potencial de membrana afavoreix el seu desplaçament cap a la cara citoplasmàtica de la membrana. El sucre i el Na^+ són alliberats en el citoplasma en un ordre desconegut, i aleshores la comporta, carregada negativament, es desplaça cap enfora per tal de tornar a començar el cicle. Si el coeficient d'acoblament fos 1, o en el cas que la comporta tingués dues càrregues negatives i el coeficient fós 2, el potencial de membrana tan sols tindria efecte sobre el retorn de la comporta buida cap a la cara externa de la membrana.

Malgrat alguns detalls que són encara foscos, el model de KESSLER i SEMENZA (1983) permet l'explicació de la majoria de les característiques del cotransport, i constitueix un model que es troba recolzat pràcticament en la seva totalitat pels resultats experimentals.

HOPFER i GROSECLOSE (1980) també proposen un mecanisme de porus amb comporta en el qual la translocació dels substrats transportats es duu a terme mitjançant un canvi conformational de la proteïna que canvia la permeabilitat per als

Figura 10.- MODEL DE COTRANSPORT PROPOSAT PER KESSLER I SEMENZA (1983). Es tracta d'un porus amb comporta sensible a la diferència de potencial existent a la membrana luminal ($\Delta\Psi$). El locus d'unió per a la glucosa és indicat així:  (baixa afinitat),  (elevada afinitat) i  (afinitat indefinida). La comporta, carregada negativament, per la presència d'un grup carboxil, és el *locus* d'unió de l'ió sodi.



soluts (figura 11). Troben que la unió dels cosubstrats s'ha de produir d'una manera ordenada, la qual cosa dóna lloc a una cinètica del tipus ordenat "bi-bi". No poden esbrinar, però, si s'uneix primer la glucosa o el Na^+ . Sí que afirmen, però, que el primer a unir-se és també el primer a dissociar-se a l'interior de la cèl.lula. Proposen una estequiometria 1, i el pas limitant de la reacció és la dissociació del Na^+ .

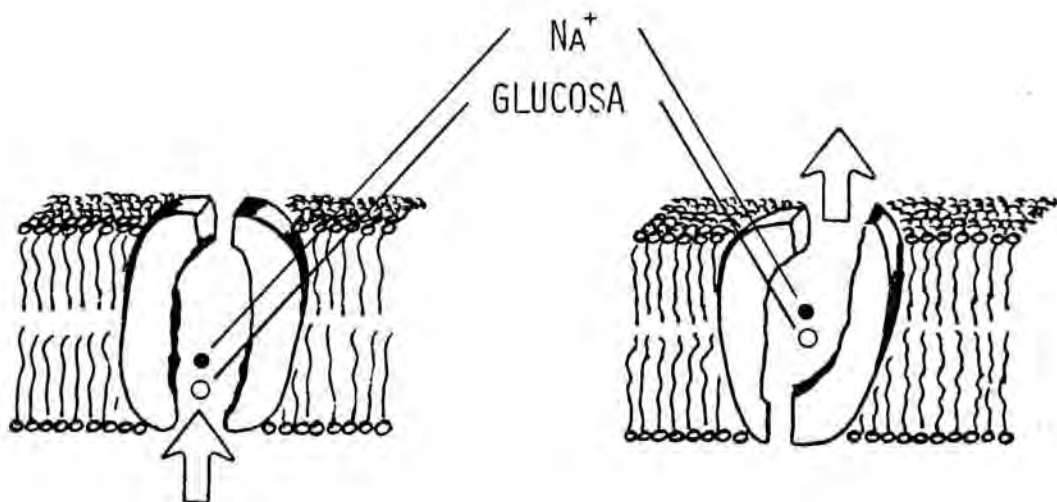


Figura 11.- MODEL PROPOSAT PER HOPFER I GROSECLOSE (1980) PER A EXPLICAR EL COTRANSPORT DE GLUCOSA I Na^+ .

Hi ha molts altres autors, que si bé no arribaren a proposar un model complet per al transport, feren notables aportacions parcials que intuïen o confirmaren les dades experimentals, basant-se en les quals es proposaren els models abans esmentats. Així, KIMMICH i RANGLES (1980) proposaren un transportador carregat negativament, amb una estequiometria 2 i la unió dels cosubstrats a l'atzar, essent aquest darrer el pas limitant de la reacció. Per a ells els complexos binaris no són permeables. La formació d'un complex ternari carregat po-

sitivament dóna peu a l'efecte del potencial de membrana sobre el transport.

TURNER i SILVERMAN (1980) consideren que el transportador ha d'ésser carregat negativament. MURER i KINNE (1980) proposen un coeficient d'acoblament 1, mentre que KAUNITZ *et al.* (1982) i WRIGHT *et al.* (1983) consideren que és de 2. TURNER i SILVERMAN (1980) i FREEL i GOLDNER (1981) creuen que el pas limitant és el de la translocació, i els darrers afegeixen a més que la unió s'ha de produir a l'atzar.

3.1.2. TRANSPORT MITJANÇAT EQUILIBRATIU

Els primers indicis de l'existència d'aquesta via varen ésser els aportats per BIHLER i CYBULSKI (1973), en trobar a les cèl.lules intestinals un mecanisme independent de Na^+ , insensible a la florricina i inhibible per elevades concentracions d'altres sucres.

Treballs recents realitzats amb vesícules confirmen la hipòtesi original que aquest sistema de transport és localitzat exclusivament a la membrana basolateral (HOPFER *et al.*, 1973; KINNE i MURER, 1976 i MURER i HOPFER, 1977). Així, doncs, es tracta d'un sistema de transport de monosacàrids localitzat a la vora serosal, la funció fonamental del qual seria la de transferir, a favor de gradient de concentració, els soluts acumulats dins la cèl.lula, cap a la làmina pròpia. És un procés mitjançat no concentratiu, poc sensible a la florricina però totalment inhibible per la floretina (KIMMICH i RANGLES, 1975). Un altre inhibidor específic d'aquesta via és la teofil.lina. El seu efecte va ésser descrit per primera vegada per HOLMAN i NAFTALIN (1975). En cèl.lules intestinals de pollastre inhibeix en un 50 % la difusió facilitada (RANGLES i KIMMICH, 1978). L'únic agent conegut capaç d'inhibir-la totalment sense exercir els efectes metabòlics que presenta la floretina, és la citocalasina B (KIMMICH i RANGLES, 1979).

L'especificitat d'aquest mecanisme independent de Na^+ és diferent a la del transport actiu de la membrana luminal, ja que és capaç d'utilitzar 2-deoxi-D-glucosa, D-mannosa i D-fructosa (BIHLER i CYBULSKI, 1973). Pel que fa als requeriments estructurals, són bàsicament els següents (KIMMICH, 1981):

1. Formar un anell piranòsid.
2. Ésser de la sèrie dels D-monosacàrids.
3. Presentar un hidroxil lliure en el carboni 1.
4. L'orientació del substituent en el carboni 5 ha d'ésser la mateixa que la present a la D-glucosa.

Aquests requeriments queden reflectits a la figura 12. Aquest sistema no accepta monosacàrids amb substituents a l'hidroxil del carboni 1 en posició α ni β tals com l' α -metil-D-glucòsid. El carboni 2 accepta un gran espectre en la configuració. Segons aquest mateix autor, l'ordre d'afinitat seria l'establert a la taula III. La ribosa, fucosa, L-sorbo-
sa, D-glucosamina i α -metil-D-glucòsid no interaccionen amb el transportador. Hi ha sucres com la galactosa, glucosa i 3-oxi-metil-D-glucosa capaços de satisfer ambdues vies.

Utilitzant 3-oxi-metil-D-glucosa com a substrat, KIMMICH i RANGLES (1975) troben que es tracta d'un sistema mitjançat de baixa afinitat i alta capacitat, si es compara amb les característiques cinètiques del transport actiu de la membrana luminal.

3.1.3. CINÈTIQUES DELS TRANSPORTS MITJANÇATS

Tant el transport mitjançat concentratiu de la membrana luminal com l'equilibratiu de la membrana basolateral segueixen una cinètica de Michaelis-Menten. Aquests sistemes, doncs, es caracteritzen pel fet de tenir una V_m que dóna idea de la capacitat de transport del sistema i una K_m que

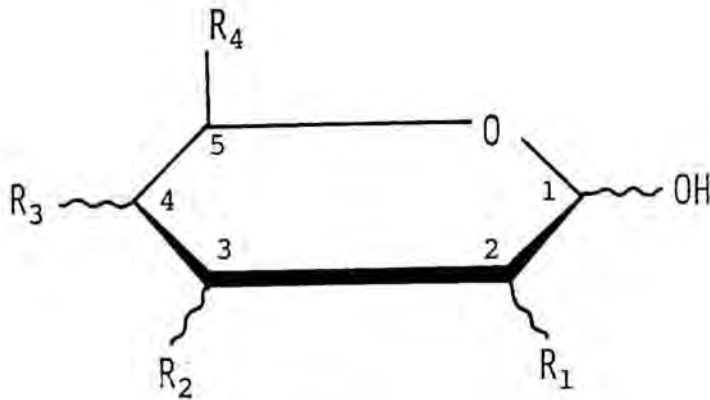


Figura 12.- REPRESENTACIÓ DE HAWORTH AMB ELS REQUERIMENTS BÀSICS DELS MONOSACÀRIDS QUE UTILITZEN LA VIA DEL TRANSPORT MITJANÇAT EQUILIBRATIU DE LA MEMBRANA BASOLATERAL. Les línies rectes indiquen les orientacions obligatòries, i les ondulades aquelles en les quals l'orientació és menys crítica.

ho fa de l'afinitat entre el substrat i el transportador. Fonamentalment les diferències cinètiques entre el sistema de transport luminal i el basolateral són que el transport dependent de Na^+ és un mecanisme d'elevada afinitat i baixa capacitat, mentre que el transport independent de Na^+ posseeix una baixa afinitat i una elevada capacitat (KIMMICH i RANGLES, 1978).

A més la cinètica del transport mitjançat concentra-
tiu es veu afectada pel gradient de Na^+ existent a través
de la membrana. Per a GOLDNER *et al.* (1969), KIMMICH i RANDLES
(1975) i HOPFER i GROSECLOSE (1980), la concentració externa
de Na^+ varia la V_m del sistema sense modificar pràcticament
la K_m . Es tracta de l'anomenada cinètica del tipus V. En
canvi CRANE *et al.* (1965), CURRAN *et al.* (1967), ALVARADO
(1976) i ROBINSON (1978) troben que el gradient de Na^+ afec-
ta la K_m sense modificar la V_m , és a dir, una cinètica del
tipus K. Aquestes diferències cinètiques tan notables confi-
guren models molt diferents a l'hora d'explicar el cotrans-
port de monosacàrids i Na^+ . Per a KIMMICH (1981), el tipus
de cinètica és determinada per l'espècie animal i per la tèc-
nica experimental utilitzada. En canvi ALVARADO I LHERMINIER
(1982) consideren que tots els sistemes han d'ésser mixtos
i les diferències abans esmentades són degudes tan sols a la
tècnica experimental utilitzada, que pot arribar a emmasca-
rar l'efecte del Na^+ sobre una determinada constant.

Un altre factor que cal tenir en compte a l'hora de
considerar les constants cinètiques d'un sistema, és la pos-

Taula III.- ESCALA D'AFINITAT ENVERS EL TRANSPORTADOR DE LA
VORA BASOLATERAL.

2-deoxi-D-glucosa
D-glucosa
D-galactosa, 3-oxi-metil-D-glucosa
D-mannosa
D-xilosa
D-fructosa

Els monosacàrids estan llistats en ordre decreixent d'afi-
nitat (KIMMICH, 1981).

sible existència de l'anomenada capa no agitada que s'interposa entre el medi d'incubació i la membrana de l'enteròcit. Per a THOMSON *et al.* (1982), aquest fenomen dóna lloc a una infravaloració dels processos passius i a una supravaloració de la Km. Avui en dia, les tècniques experimentals més modernes permeten d'eliminar la capa no agitada, o bé de calcular-la per tal de poder-hi fer les correccions adients.

3.1.4. DIFUSIÓ SIMPLE

A les cèl.lules epitelials intestinals existeix una tercera ruta per al moviment de monosacàrids a través de la membrana, la difusió simple.

És un mecanisme caracteritzat pel fet de no ésser sensible a cap inhibidor conegut, no ésser saturable i no presentar competició amb altres sucres. La velocitat de difusió d'un substrat és donada, segons la llei de Fick, pel gradient electroquímic a través de la membrana i pel coeficient de difusió del substrat. Aquesta constant dóna idea de la permeabilitat de la membrana a un determinat substrat. Així, doncs, la constant de difusió variarà segons el monosacàrid i l'espècie animal estudiats (THOMSON *et al.*, 1982). Numèricament, la constant de difusió és el pendent de la recta obtinguda en avaluar la velocitat de difusió en presència de diferents concentracions de substrat.

3.1.5. IMPORTÀNCIA DE LES TRES VIES EN L'ACUMULACIÓ DE MONOSACÀRIDS

Finalment, a causa de la intervenció de tres vies diferents d'entrada de monosacàrids a l'enteròcit, cal establir quina és la participació de cadascuna d'elles en el procés d'absorció intestinal. Així, KIMMICH i RANGLES (1973) troben en cèl.lules aïllades de jejú de pollastre, que el flux d'entrada de 3-oxi-metil-D-glucosa 0,1 mmol/l, es produeix en un 94 % a través de la via dependent de Na⁺, un

4 % per difusió facilitada i un 2 % per difusió simple. Un cop assolit l'estat estacionari, en el qual la concentració de monosacàrid intracel.lular és més gran que la del medi d'incubació, la sortida de monosacàrid es produeix en un 10 % per la via dependent de Na^+ , un 64 % per difusió facilitada i un 26 % per difusió simple.

3.2. AILLAMENT DE CÈL.LULES EPITELIALS INTESTINALS

Tradicionalment, l'estudi de l'absorció intestinal s'ha dut a terme mitjançant tècniques *in vivo* amb animals anestesiats, sotmesos o no a una operació quirúrgica prèvia. Aquests experiments constituïren la base de les primeres investigacions, i suposaren un gran avenç en el tema (vegeu CRANE, 1968).

El reconeixement, que el teixit, un cop aïllat de l'animal podia sobreviure durant un temps prolongat, va representar un gran avantatge ja que podia ésser fàcilment manipulat i permetia de modificar àmpliament les condicions experimentals. Això va donar peu al disseny de nombroses tècniques *in vitro* (PARSONS, 1968). Un esforç pioner va ésser el de REID, el 1901, que amb un segment circular de paret intestinal col.locat entre dos compartiments de vidre, va demostrar l'absorció de fluids a favor de gradient de pressió hidrostàtica.

El manteniment de la viabilitat del teixit i per tant de la seva capacitat per a transportar, durant tot el temps d'experimentació, va ésser solventat per FISHER i PARSONS (1949) en oxigenar les solucions que estaven en contacte amb el teixit.

BIHLER i CRANE (1962) i SCHULTZ *et al.* (1966) incubant per un costat làmines de mucosa i per l'altre la resta del teixit, exempt doncs de mucosa, demostraren que són les cèl.lules columnars epitelials de la mucosa, o enterò-

cits, les principals implicades en els processos d'absorció intestinal, ja que només les làmines de mucosa eren capaces d'acumular sucres en contra de gradient de concentració. Aquest és un procés dependent de l'ió sodi, inhibible per ouabaïna i per inhibidors del metabolisme cel·lular. La resta de la paret intestinal lliure de mucosa no presentava capacitat per a acumular soluts. Així, doncs, es feia responsable l'epiteli intestinal de la capacitat per a concentrar soluts, que després es difondrien a la làmina pròpia, d'on podrien accedir al torrent sanguini.

A partir d'aquest moment hom va fixar més l'atenció en la funcionalitat dels enteròcits, l'esforç científic es va centrar en el coneixement dels mecanismes moleculars pels quals aquestes cèl·lules tenen una capacitat de transport tan elevada. És per això que la utilització de les cèl·lules epitelials aïllades suposà un gran avenç en la metodologia de l'estudi sobre l'absorció de no-electròlits. Es tracta d'un model experimental que conserva les característiques del transport present al teixit sencer. Els enteròcits constitueixen la unitat funcional més petita del teixit, ja que s'elimina la problemàtica de l'existència del teixit connectiu intersticial i de les diverses capes de musculatura serosal. Pel que fa a la separació dels mecanismes de la membrana mucosal i basolateral, només pot ésser duta a terme sempre i quan es pugui discernir la polaritat dels processos a l'enteròcit.

3.2.1. TÈCNIQUES D'AILLAMENT

3.2.1.1. Mètodes mecànics

La relativa facilitat amb la qual la mucosa intestinal de rata es pot separar de la resta de la paret, va donar lloc a la utilització de la mucosa aïllada com a punt de partida per a l'obtenció d'enteròcits aïllats. Un dels

primers intents fou realitzat per DICKENS i WEIL-MALHERBE en el 1941, per tal d'estudiar el metabolisme cel.lular en raspat de mucosa. Els resultats foren molt semblants als obtinguts per altres autors *in vivo*. Al llarg del temps d'incubació, però, observaren que l'activitat glucolítica minvava, alhora que les làmines d'epiteli perdien grandària i pes. Com que aquesta degradació no era present en incubar el teixit sencer, l'atribuïren a l'alliberament d'enzims proteolítics per part de les cèl.lules malmeses en el procés d'aïllament.

Les preparacions de mucosa aïllada no tornaren a ésser utilitzades fins 25 anys després, quan SCHULTZ *et al.* (1966) demostraren que era a l'epiteli on es localitzaven els processos intestinals reponsables d'acumular sucres i aminoàcids en contra del gradient de concentració. En aquest treball, els autors indiquen la possibilitat de fraccionar l'epiteli en cèl.lules individuals per tal de facilitar la presa de mostres i la determinació de la concentració intracel.lular de solut.

Els esforços més productius per tal d'obtenir cèl.lules epitelials aïllades per mètodes mecànics, foren realitzats per SJÖSTRAND (1968) i HARRISON i WEBSTER (1969). SJÖSTRAND (1968) desenvolupà una tècnica consistent a aplicar una força de rotació a l'intestí de rata evertit que es trobava posat en una vareta de vidre. Tot el sistema era submergit en sèrum fisiològic. De primer, amb grans acceleracions i desacceleracions, aconseguia eliminar el mucus, i posteriorment obtenia les cèl.lules.

La tècnica de HARRISON i WEBSTER (1969), ideada per a l'aïllament de cèl.lules de la cripta, consistia en sotmetre l'intestí, submergit en una solució d'EDTA, a un moviment de vibració. Al principi s'elimina el mucus i, després es desprenen les cèl.lules de la punta i parets de la vellositat. Per aconseguir les cèl.lules de la cripta,

distendien l'intestí evertit amb aire a pressió i el sotmetien al moviment de vibració.

IEMHOFF *et al.* (1970) varen fer un estudi metabòlic de les cèl.lules obtingudes per mitjà de les dues tècniques mecàniques. Per a aquests autors, la tècnica de vibració de HARRISON i WEBSTER (1969) proporciona suspensions en millors condicions metabòliques.

Tanmateix, les tècniques mecàniques no han estat gaire utilitzades i s'han anat substituint per mètodes químics i enzimàtics. El gran desavantatge que presenten és que el tractament mecànic és massa sever i això dona lloc a cèl.lules bastant malmeses. EADE *et al.* (1981) estudiaren la viabilitat de suspensions cel.lulars, fonamentalment pel que fa a la integritat de la membrana cel.lular, obtingudes amb tècniques mecàniques, químiques i enzimàtiques. Llurs resultats indiquen que els mètodes mecànics donen lloc a un nombre molt elevat de cèl.lules amb la membrana malmesa, en relació amb la resta de tècniques assajades.

3.2.1.2. Mètodes químics i enzimàtics

Durant el primer decenni dels anys seixanta, es varen començar a descriure les tècniques per a l'aïllament de cèl.lules epitelials consistents en el tractament del teixit amb un agent quelant de l'ió calci o amb un enzim.

HARRER *et al.* (1964) proposaren una tècnica per a l'aïllament enteròcits de rata consistent en la incubació de sacs intestinals en un medi sense Ca^{2+} ni Mg^{2+} i en presència d'una mescla d'enzimsproteolítics. En el 1965, STERN i REILLY feren un estudi metabòlic de les cèl.lules obtingudes per aquesta tècnica, tot comprovant que, un cop aïllades, eren capaces de mantenir intacta llur activitat glucolítica durant llargs períodes d'incubació. STERN (1966),

considerant que el tractament amb enzims era potser massa fort, va substituir aquests agents per citrat trisòdic. Per a aquest autor, el Ca^{2+} té un paper cabdal en les uions intercel.lulars, sobretot a la membrana basolateral. És per això, que considera més fisiològic d'utilitzar un agent quelant de l'ió calci que no pas un enzim. STERN (1966) va ésser un dels primers autors a estudiar la capacitat de les cèl.lules epitelials aïllades per a acumular monosacàrids. Dels seus resultats es desprèn que les cèl.lules poden mantenir un gradient de concentració per a la glucosa, per un procés dependent de l'energia metabòlica, però independent de la concentració de l'ió sodi en el medi d'incubació.

En el 1967, SOGNET va proposar un nou mètode consistent en el tractament del teixit amb EDTA. Es preparava un sac intestinal i s'incubava en una solució salina amb EDTA, exempta de Ca^{2+} i Mg^{2+} . Les suspensions cel.lulars així obtingudes eren capaces de mantenir petits gradients de concentració per a la glicina que no eren dissipats per la presència de 2,4-dinitrofenol. Aquestes cèl.lules, però, varen ésser incapaces d'acumular 3-oxi-metil-D-glucosa en contra del gradient de concentració.

PERRIS (1966) fou el primer autor a utilitzar hialuronidasa per a l'obtenció de suspensions cel.lulars de l'intestí. La tècnica consistia a incubar un segment intestinal en presència de l'enzim. Va realitzar un estudi metabòlic de les suspensions cel.lulars i observà que, amb BSA a la concentració de 10 g/l en el medi d'incubació, l'activitat respiratòria en presència de glucosa millorava notablement. Les raons de l'efecte d'aquesta proteïna, segons PERRIS (1966), podrien estar relacionades amb les observacions realitzades per NAKAMURA *et al.* (1959). Segons aquests autors, quan s'homogeneïtza la mucosa intestinal de rata es produeix un gran alliberament d'àcids grassos, els quals

inhibeixen l'enzim succinoxidasa. L'efecte de l'albúmina seria degut a la seva capacitat per a fixar els àcids grassos, per la qual cosa aquests ja no poden afectar el metabolisme cel.lular.

KIMMICH (1970a) va descriure una tècnica específica per a l'aïllament de cèl.lules epitelials de l'intestí de pollastre. De fet suposava una innovació, ja que fins al moment totes les tècniques existents eren descrites per a mamífers. Es tractava d'incubar porcions de l'intestí evertides, en una solució salina en la qual hi havia BSA 1 g/l i hialuronidasa. Aquest autor inclou BSA en totes les seves preparacions per a disminuir l'autòlisi que es produeix quan les cèl.lules malmeses durant el procés d'aïllament alliberen enzims proteolítics. També va realitzar un estudi metabòlic de les seves suspensions. Aquesta tècnica li ha permès, al llarg dels anys, de caracteritzar el transport mitjançat cocentratiu de la membrana luminal i el transport mitjançat equilibratiu de la basolateral, per a monosacàrids i aminoàcids.

En els darrers anys, no hi ha hagut grans innovacions en les tècniques per a l'aïllament de cèl.lules epitelials intestinals. La majoria de contribucions s'han orientat, més aviat, cap a la modificació d'alguna de les tècniques ja existents, d'acord amb les necessitats experimentals. Així, l'EDTA ha estat utilitzat per EVANS *et al.* (1971) per a l'aïllament de cèl.lules de l'intestí prim de conill d'Indies i fer-ne un estudi metabòlic; MITJAVILA *et al.* (1973) en estudis sobre l'efecte de divesos agents tensioactius sobre el metabolisme i la lisi de cèl.lules d'intestí prim de rata; RAUL *et al.* (1978) per a aïllar cèl.lules de l'intestí prim de rata i posteriorment cultivar-les i WATFORD *et al.* (1979) van aïllar cèl.lules de l'intestí prim de rata i de pollastre i en van fer un acurat estudi metabòlic. Pel que fa al citrat trisòdic, WEISER (1973) l'utilitzà per a

obtenir-ne cèl.lules de l'intestí prim de rata i estudiar-ne la síntesi de glicoproteïnes, i LAWSON *et al.* (1982) per a aïllar cèl.lules de la cripta del jejú i de l'ili de rata i fer-ne un estudi histològic i metabòlic. I així, hi ha tot un seguit d'autors que utilitzen les cèl.lules epitelials aïllades com a material d'experimentació.

Quant a la possibilitat d'obtenir cèl.lules d'altres segments intestinals que no siguin l'intestí prim, cal esmentar els treballs de CULLING *et al.* (1973) que utilitzen una mescla d'EDTA i hialuronidasa per a aïllar cèl.lules del còlon de rata, i el de BRASITUS (1982) que utilitza citrat trisòdic per a obtenir cèl.lules de la cripta del còlon proximal i del cec de rata.

En aquesta memòria, amb l'objecte de trobar una tècnica adient per a aïllar cèl.lules epitelials del cec de polastre, s'ha realitzat un estudi comparatiu amb tres medis d'aïllament diferents. Tenint en compte que els mètodes mecànics donen lloc a poblacions cel.lulars molt malmeses, ha estat triat un medi enzimàtic amb hialuronidasa 0,5 g/l i dos de químics, l'un amb citrat trisòdic 27 mmol/l i l'altre amb EDTA 5 mmol/l. Han estat triats aquests agents a aquestes concentracions ja que són els més utilitzats a la bibliografia. Bàsicament, la pauta experimental és la descrita per KIMMICH (1970a) en la qual s'han realitzat diverses modificacions en el medi d'aïllament i de rentat per tal de substituir l'enzim pels agents quelants (vegeu apartat 3.3.4.).

3.2.2. PROVES DE VIABILITAT

En cop seleccionada la tècnica d'aïllament que *a priori* hom consideri més adient per al teixit utilitzat, cal sotmetre les cèl.lules a tot un seguit de proves que permetin d'assegurar que la suspensió cel.lular es troba en condicions tan semblants com sigui possible a les del tei-

xit sencer.

Fonamentalment, es tracta de conèixer la integritat de la membrana cel.lular després de l'aïllament, el manteniment del metabolisme cel.lular i la capacitat de les cèl.lules per a acumular un substrat en contra del gradient de concentració. Les diverses proves existents a la bibliografia són molt nombroses, i hom ha triat les que a continuació s'esmenten.

Per a la determinació de la integritat de la membrana cel.lular, ha estat triada la tècnica d'exclusió del blau de trypan segons GIRARDI *et al.* (1956). Es tracta d'una tècnica molt estesa i que ha estat molt utilitzada per a cèl.lules intestinals (KIMMICH, 1970a; CULLING *et al.*, 1973; RAUL *et al.*, 1978; EADE *et al.*, 1981; BRASITUS *et al.*, 1982 i LAWSON *et al.*, 1982)

L'activitat metabòlica de les cèl.lules és un paràmetre de gran importància, sobretot si aquestes han d'ésser emprades posteriorment per a l'estudi de processos dependents de l'energia metabòlica com ara el transport mitjançat concentratiu de monosacàrids. Generalment, s'estudia la glicòlisi a través del consum d'oxigen (HUANG, 1965; PERRIS, 1966; STERN, 1966; KIMMICH, 1970a; EVANS, 1971; MITJAVILA *et al.*, 1972; TOWLER *et al.*, 1978 i WATFORD *et al.*, 1979) i de la producció d'àcid làctic (STERN, 1966; IEMHOFF *et al.*, 1970; KIMMICH, 1970a; HÜLSMANN, 1977; TOWLER *et al.*, 1978 i WATFORD *et al.*, 1979).

Un altre paràmetre metabòlic que també s'estudia són els nivells cel.lulars d'ATP (IEMHOFF *et al.*, 1970; KIMMICH, 1975; HÜLSMANN, 1977; TOWLER *et al.*, 1978 i WATFORD *et al.*, 1979).

En termes generals hom accepta que el metabolisme cel.lular es manté en bones condicions si les cèl.lules, en

presència de glucosa consumeixen molt d'oxigen, produeixen elevades quantitats d'àcid làctic i presenten uns nivells alts d'ATP.

Finalment, la darrera prova duta a terme ha estat la determinació de la capacitat de les cèl.lules per a transportar monosacàrids en contra del gradient de concentració (HUANG, 1965; STERN, 1966; KIMMICH, 1970a i TOWLER *et al.*, 1978). En quantificar aquest paràmetre, hom avalua, a més de l'activitat metabòlica de la cèl.lula, l'estat dels transportadors de sucres, ja que, a causa de la seva naturalesa proteica, poden ésser fàcilment malmesos.

3.3. MATERIAL I MÈTODES

3.3.1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

Els animals emprats han estat els mateixos que els de l'apartat 2.1.1.

3.3.2. APARELLS

- Bany orbital termostatitzat Selecta, model Unitronic-320.
- Centrífuga Beckman, model J-21 amb rotors JA-20 i JA-14.
- Centrífuga Eppendorf, model 5414 S.
- Colorímetre Bausch and Lomb, model Spectronic 100.
- Comptador LKB Wallac, model 1217 RackBeta.
- Espectrofotòmetre Beckman, model DB-G.
- Homogeneïtzador Kontes, vas de vidre model K-885482-0021 i pistil de tefló model K-885480-0021.
- Metal.litzador Polaron, model E 5000 Sputering.
- Microscopi electrònic de rastreig Cambridge, model S.4.
- Microscopi electrònic de transmissió Philips, model EM 200.
- Microscopi òptic Leitz Wetzler, model Dialux.
- Osmòmetre Knauer.
- Respiròmetre Warburg B. Braun, model V.
- Ultramicrotom Reichert, model 316615.

3.3.3. REACTIUS I PRODUCTES

- Acid perclòric, E. Merck, Alemanya. Article 519, lot 1477 0102.
- Albúmina sèrica bovina (BSA), Sigma Chemical Company, E.U.A. Article 4503, lot 53C-1330.
- ATP, Boehringer Mannheim GmbH, Alemanya. Article 519 979.
- Blau de trypan, Dr. G. Grübler and Co., Alemanya.
- Citocalasina B, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article C-6762, lot 102F-4004.
- Citrat trisòdic, Carlo Erba, Itàlia. Article 479485, lot G38111.
- Controls de qualitat per a la determinació de l'àcid làctic, Boehringer Mannheim GmbH, Alemanya. Precipath U, article 171760 i Precinorm U, article 171735.
- 2-Deoxi-D-glucosa, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article D-6134, lot 40F-5077.
- 2-Deoxi-D-(¹⁴C)glucosa, Amersham International, Anglaterra. Article CFB. 181, lots B7 i B17.
- Dibutilftalat, Fluka AG, Suïssa. Article 89102, lot 243331.
- N,N'-Dimetilformamida p.a., Panreac, Espanya. Article 131785.
- Dimetilsulfòxid, p.a. Panreac, Espanya. Article 131954.
- 2,4-Dinitrofenol, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article D-7004, lot 19C-01441.
- Dinonilftalat, Fluka AG, Suïssa. Article 80072, lot 208417.
- EDTA, Carlo Erba, Itàlia. Article 405491, lot G26824.
- EGTA, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article E-4387, lot 70F-5070.
- Equip per a la determinació de l'àcid làctic, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article 826A, lot 43C-6390.
- Etanol min 99,5 %, E. Merck, Alemanya. Article 966, lot 3947568.
- Florricina, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article P-3377, lot 51F-0505.
- Folin-Ciocalteu, E. Merck, Alemanya. Article 9001, lot

- 42264637.
- D-Glucosa, E. Merck, Alemanya. Article 8342, lot 701494 426.
 - Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, Boehringer Mannheim GmbH, Alemanya. Article 127 047, lot 1954437.
 - Glutaraldehyd, E. Merck, Alemanya. Article 12179.
 - Hexokinasa, Boehringer Mannheim GmbH, Alemanya. Article 127175, lot 10554447.
 - Hialuronidasa, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article H-2251, lot 91F-0501.
 - Indicador universal de pH, Panreac, Espanya. Article 171370.
 - Liquid scintillation Carbon-14 quenched standard set, Amersham Searle Corp., E.U.A. Article 180050.
 - Membrana per filtració de policarbonat amb porus de 0,2 µm, Nuclepore, E.U.A. Article 181006.
 - D-Mannitol, E. Merck, Alemanya. Article 5980, lot 426 K444.
 - α-metil-D-glucòsid, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article M-9376, lot 22F-0489.
 - Metil (alfa-D-(U-¹⁴C)glucosa, Amersham International, Anglaterra. Article CFB. 76, lots B23, B24, B25 i B26.
 - NADP, Boehringer Mannheim GmbH, Alemanya. Article 128 031, lot 1423172.
 - Ouabaïna, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article O-3125, lot 59C-0102.
 - 3-Oxi-metil-D-glucosa, Koch-Light Laboratories Ltd., Anglaterra. Article 3832-00, lot 89991.
 - 3-O-metil-D-(U-¹⁴C)glucosa, Amersham International, Anglaterra. Article CFB.141, lots B22, B23, B24 i B28.
 - (1,2-³H) Polietilen glicol 4000, New England Nuclear, E.U.A. Article NET-405, lot 1516-212.
 - PPO, Koch-Light Laboratories Ltd., Anglaterra. Article 2335-00, lots 91533 i 91560.
 - Teofil.lina, Sigma Chemical Company, E.U.A. Article T-1633, lot 107C-0064.

- Toluè, Panreac, Espana. Article 141745.
- Triton X-100, Rohm and Hass, França.
- Sals per a la preparació de les solucions fisiològiques, E. Merck, Alemanya.

3.3.4. AÏLLAMENT DE LES CÈL·LULES EPITELIALS INTESTINALS

La metodologia emprada ha estat, a grans trets, la descrita per KIMMICH (1970a), en la que ha calgut realitzar algunes modificacions per tal d'adaptar-la als segments cecals.

3.3.4.1. Obtenció dels segments de cec i jejú

Els animals es decapiten i es dessagnen. Se'ls practica una laparatomia i es localitzen els cecs i el diverticle de Meckel a nivell de jejú. S'extreuen els cecs, tallant per la zona de la unió ili-cec-recte procurant que el teixit limfàtic, present a la zona proximal, no es perdi ni es malmeti. Del jejú, se'n pren una porció corresponent als 100 mm situats a ambdós costats de la implantació del rovell.

Els segments intestinals, així obtinguts, es col·loquen sobre una placa de vidre humitejada amb sèrum fisiològic fred i se'ls extreu amb molta cura el mesenteri, que generalment és molt abundant. Aleshores es procedeix al rentat d'aquests segments intestinals. En el jejú, el contingut intestinal s'elimina fent-hi passar tres vegades, amb l'ajut d'una xeringa, 20 ml de sèrum fisiològic fred. Després s'obre longitudinalment i es talla en seccions d'aproximadament 30 mm.

En el cas del cec, degut a la consistència pastosa del seu contingut, és necessari primer, obrir-lo longitudinalment i després netejar-lo per agitació en un vas de precipitats amb sèrum fisiològic. Si l'experiment es vol realitzar amb el cec sencer, aquest es talla en seccions d'uns

30 mm. Però si el que es desitja, és obtenir per separat cèl.lules aïllades del cec proximal, medial i distal, aleshores es separa cadascun d'aquests segments.

3.3.4.2. Incubació del teixit en el medi d'aïllament

Un cop obtinguts els segments intestinals, es col·loquen en flascons de plàstic en els que hi ha 40 ml de medi d'aïllament. A partir d'aquest punt, totes les manipulacions es realitzen amb material de plàstic o de vidre siliconat, ja que les cèl.lules epitelials intestinals s'agreguen en contacte amb el vidre.

Aleshores, es procedeix a la incubació dels flascons que contenen el medi d'aïllament i el teixit, en un bany orbital termostatitzat a 37 °C, amb agitació de 2 Hz, durant 30 min.

En aquest treball, s'han provat tres medis d'aïllament diferents, un enzimàtic i dos de químics. L'enzimàtic és el medi de KIMMICH (1970a) que conté hialuronidasa 0,5 g/l i els químics són dues modificacions de l'anterior, en les quals s'ha retirat els ions calci i magnesi i l'enzim s'ha substituït per un agent quelant del Ca^{2+} : citrat trisòdic 27 mmol/l o EDTA 5 mmol/l. L'osmolaritat dels medis s'ha mantingut a 320 mOsm/l variant la concentració de mannitol i s'ha comprovat per mitjà de mesures realitzades a l'osmòmetre.

La composició dels tres medis d'aïllament és la següent:

a) medi d'aïllament amb hialuronidasa 0,5 g/l

NaCl	80	mmol/l
K_2HPO_4	3	mmol/l
EGTA	0,1	mmol/l
Tris-HCl	20	mmol/l, pH 7,4

BSA	1	g/l
CaCl ₂	2,5	mmol/l
MgCl ₂	1	mmol/l
hialuronidasa	0,5	g/l
mannitol	100	mmol/l

b) medi d'aïllament amb citrat trisòdic 27 mmol/l

NaCl	80	mmol/l
K ₂ HPO ₄	3	mmol/l
EGTA	0,1	mmol/l
Tris-HCl	20	mmol/l, pH 7,4
BSA	1	g/l
citrat trisòdic	27	mmol/l
mannitol	37	mmol/l

c) medi d'aïllament amb EDTA 5 mmol/l

NaCl	80	mmol/l
K ₂ HPO ₄	3	mmol/l
EGTA	0,1	mmol/l
Tris-HCl	20	mmol/l, pH 7,4
BSA	1	g/l
EDTA	5	mmol/l
mannitol	100	mmol/l

Un cop transcorregut el temps de l'aïllament, ja s'han després algunes poques cèl.lules epitelials, però per obtenir-ne la majoria, és necessari agitar amb una pipeta de plàstic els segments intestinals dins del medi d'aïllament.

La suspensió cel.lular obtinguda es filtra en una xarxa de nyló per tal de separar-ne el teixit intacte i de dispersar millor la població cel.lular. El material filtrat es recull en tubs de centrifuga, de plàstic de 50 ml.

i es procedeix aleshores, al rentat de la suspensió.

3.3.4.3. Rentat de la suspensió cel.lular

Aquesta operació té com a objecte l'eliminació de l'agent utilitzat per a l'aïllament (hialuronidasa, citrat trisòdic i EDTA), puix que si restés en contacte amb les cèl.lules les podria arribar a malmetre.

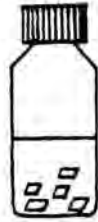
El rentat es realitza per centrifugació en fred, durant 1 min a 100 g (centrífuga Beckman, rotor JA-20), amb 20 ml de l'anomenat medi de rentat. L'operació es repeteix dues vegades amb el medi de rentat i una tercera amb el medi d'incubació (figura 13).

La composició del medi de rentat varia segons l'emprat per a l'aïllament. Per al medi amb hialuronidasa, el medi de rentat és el mateix de l'aïllament, però, sense l'enzim. Per als medis químics, el medi de rentat és el mateix que l'emprat a l'aïllament, sense l'agent quelant, mantenint-se l'osmolaritat a 320 mOsm/l variant la concentració de mannitol. La composició dels medis de rentat és la següent:

a) si l'aïllament s'ha realitzat amb hialuronidasa,

NaCl	80	mmol/l
K ₂ HPO ₄	3	mmol/l
EGTA	0,1	mmol/l
Tris-HCl	20	mmol/l, pH 7,4
BSA	1	g/l
CaCl ₂	2,5	mmol/l
MgCl ₂	1	mmol/l
mannitol	100	mmol/l

Figura 13.- ESQUEMA DE LA TÈCNICA SEGUIDA PER A L'AÏLLA-
MENT DELS ENTEROCITS.



40 ml medi d'aïllament amb el segment intestinal



incubació durant 30 min a 37 °C amb agitació de 2 Hz



filtració de la suspensió cel.lular a través de la xarxa de nyló



centrifugació a 100 g durant 1 min



sobrenedant



sediment cel.lular



+ 20 ml de medi de rentat i en el darrer rentat amb medi d'incubació



1 ml per a la determinació de proteïnes



1 o 2 ml

incubació de la suspensió a 37 °C amb agitació de 0,5 Hz

x 3

b) si l'aïllament s'ha realitzat amb citrat trisòdic o EDTA,

NaCl	80	mmol/l
K ₂ HPO ₄	3	mmol/l
EGTA	0,1	mmol/l
Tris-HCl	20	mmol/l, pH 7,4
BSA	1	g/l
mannitol	110	mmol/l

El darrer rentat es fa amb el medi d'incubació, que és el mateix per als tres medis d'aïllament. La seva composició és la següent:

NaCl	80	mmol/l
K ₂ HPO ₄	3	mmol/l
EGTA	0,1	mmol/l
Tris-HCl	20	mmol/l, pH 7,4
BSA	1	g/l
CaCl ₂	2,5	mmol/l
MgCl ₂	1	mmol/l
mannitol	100	mmol/l

Un cop realitzada l'operació de rentat, el sediment cel.lular es resuspen amb el volum desitjat de medi d'incubació i la suspensió ja és a punt per a la seva utilització experimental. D'aquesta suspensió se'n pren una mostra per determinar-hi la concentració proteica.

3.3.4.4. Quantificació de la proteïna cel.lular

Per a la quantificació de la proteïna cel.lular s'ha emprat el mètode de LOWRY *et al.* (1951).

De primer, s'homogeneïtza 1 ml de la suspensió cel.lular i es dilueix fins al volum desitjat amb aigua destil.lada. Aleshores, es mescla 1 ml de la solució proteica diluï-

da amb 5 ml d'una solució que conté: tartrat sòdic-potàssic 0,2 g/l, carbonat sòdic 10 g/l, sosa 4 g/l i sulfat de coure pentahidratat 0,1 g/l. Als 10 min s'afegeix, tot agitant, 0,5 ml del reactiu de Folin Ciocalteu, prèviament diluït fins a una acidesa d'1 mol/l. La mescla es deixa 45 min a les fosques, fins que es forma el complex colorejat. L'extinció es mesura en un colorímetre a 750 nm.

El càlcul de la concentració de proteïna es realitza en base a les dades obtingudes, paral·lelament, amb solucions de concentració coneguda de BSA.

3.3.5. PROPIETATS DELS ENTERÒCITS AILLATS

3.3.5.1. Integritat de la membrana cel·lular

Aquesta prova de viabilitat s'ha realitzat mitjançant la tècnica d'exclusió del blau de trypan, descrita per GIRARDI *et al.* (1956).

Un ml de la suspensió cel·lular es mescla amb 2 ml d'una solució de blau de trypan 20 g/l en aigua destil·lada. Es pren una alíquota i es col·loca en una cambra de Burker per al comptatge de cèl·lules, prèviament siliconada, per tal d'evitar l'agregació cel·lular.

Les cèl·lules tenyides de blau són aquelles que no mantenen la integritat de la membrana. Es tracta de realitzar un recompte de les cèl·lules no tenyides i expressar-ho com a tant per cent respecte al nombre total de cèl·lules.

Malgrat la utilització de material de plàstic o de vidre siliconat, les cèl·lules s'agreguen espontàniament, per la qual cosa, i seguint el criteri d'EADE *et al.* (1981), els agregats de més de tres cèl·lules són exclosos del comptatge.

3.3.5.2. Consum d'oxigen

La respiració cel.lular s'ha determinat segons la tècnica de Warburg (UMBREITT *et al.*, 1959).

Les cèl.lules es resuspenen fins a un volum de 2,5 ml amb medi d'incubació, suplementat amb BSA fins a 10 g/l. L'elevada concentració de proteïna és recomenada per KIMMICH (1970a) en base als resultats de DICKENS I WEIL-MALHERBE (1941) en mucosa raspada i PERRIS (1966) en cèl.lules aïllades d'intestí prim de rata, que observen una notable millora de la respiració cel.lular en presència de BSA.

La suspensió es col.loca en els matrassos, prèviament siliconats, per tal d'evitar l'agregació cel.lular. Al braç lateral del matràs s'hi posa 0,5 ml d'una solució concentrada de glucosa (60 mmol/l), l'osmolaritat de la qual s'ha mantingut reduint la concentració de manitol. D'aquesta manera, la concentració de sucre en els 3 ml de suspensió cel.lular serà de 10 mmol/l. S'ha emprat aquesta elevada concentració de glucosa, per tal que la quantitat de sucre no sigui un factor limitant en les reaccions metabòliques cel.lulars (SRIVASTAVA i HÜBSCHER, 1966; IEMHOFF *et al.*, 1970; KIMMICH, 1970a; ANDERSON, 1974; LEESE i BRONK, 1975; PRITCHARD i PORTEOUS, 1977 i WATFORD *et al.*, 1979).

La incubació dels matrassos es realitza a 37 °C, amb agitació de 2 Hz i 35 mm d'amplitud, durant períodes de fins a 1 h 30 min, fent-se lectures cada 10 min. La fase gasosa és oxigen al 100 % i el diòxid de carboni format queda atrapat en el pou central del matràs, en el que hi ha paper de filtre impregnat amb 0,2 ml de potassa 5 g/l.

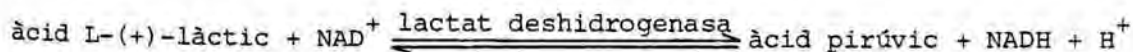
Els resultats s'expressen com a $\mu\text{l O}_2/\text{mg proteïna}$, essent Q_{O_2} la quantitat d' O_2 consumit al llarg d'una hora d'incubació ($\mu\text{l O}_2/\text{mg proteïna} \cdot \text{h}$).

3.3.5.3. Producció d'àcid làctic

S'ha determinat la producció d'àcid làctic en presència de glucosa 10 mmol/l al llarg del temps d'incubació.

A un vas de precipitats de plàstic de 50 ml, s'afegeixen 3 ml de medi d'incubació amb glucosa 13,3 mmol/l, mantenint-se l'osmolaritat reduint la concentració de manitol. Aquest medi també conté el suplement de BSA fins a 10 g/l. Els vasos i la suspensió cel.lular es col.loquen en un bany orbital termostatitzat i un cop assolida la temperatura de 37 °C s'afegeix a cadascun 1 ml de la suspensió cel.lular, moment en el qual s'inicia la incubació. Aquesta es duu a terme a 37 °C, durant 1 h 30 min amb agitació de 0,5 Hz. Als 30, 60 i 90 min d'incubació es prenen mostres de 0,3 ml que ràpidament es mesclen amb 0,6 ml d'àcid perclòric a 4 °C, per tal de precipitar les proteïnes. La mescla s'agita enérgicament durant 1 min i després es deixa reposar en fred durant 5 min. Un cop transcorregut aquest temps, es centrifuga en fred a 3.000 g durant 5 min (centrífuga Beckman amb rotor JA-14) i en el sobrenedant s'hi quantifica l'àcid làctic, ja sigui al moment o després d'haver-lo emmagatzemat a 20 °C sota zero, durant no més d'una setmana, per tal d'evitar la seva degradació.

La determinació de l'àcid làctic es realitza mitjançant un equip comercial, per a mostres desproteïnitzades, basat en la següent reacció enzimàtica:



en la qual, l'àcid làctic és oxidat a pirúvic per l'enzim lactat deshidrogenasa, en medi bàsic, en presència d'un excès de NAD^+ i quantitat suficient d'hidrazina per segrestar l'àcid pirúvic format. Per cada mol d'àcid làctic oxidat es forma 1 mol de NADH que es mesura espectrofotomètri-

ment a 340 nm.

Paral.lelament, es realitza una corba patró i dos controls de sèrum patró de concentracions diferents d'àcid làctic, prèviament sotmesos a desproteïnitziació.

Els resultats s'expressen com a nmol àcid làctic/mg proteïna, essent Q_L la quantitat d'àcid làctic produïda en una hora d'incubació (nmol àcid làctic/mg proteïna · h)

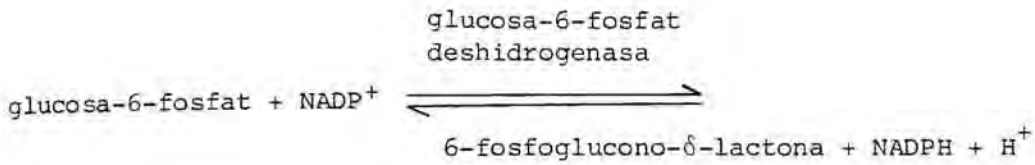
3.3.5.4. Nivells d'ATP

S'han determinat els nivells d'ATP en les cèl.lules epitelials, al llarg del temps d'incubació, en presència de glucosa 10 mmol/l.

La suspensió cel.lular es col.loca en un bany orbital termostatitzat a 37 °C amb agitació de 0,5 Hz, en el qual també hi ha els vasos de plàstic on es realitzarà la incubació. Aquests vasos contenen 2 ml de medi d'incubació amb glucosa 20 mmol/l en els quals s'ha mantingut l'osmolaritat variant la concentració de manitol. Quan les cèl.lules assoleixen la temperatura de 37 °C, se'n prenen 2 ml que s'afegeixen als 2 ml de medi d'incubació que contenen el sucre; és el temps zero de la incubació. Aquesta s'allarga fins a 30 min, durant els quals es prenen mostres de 1 ml, als 0, 10 i 30 min. Les mostres s'afegeixen a 0,5 ml d'àcid perclòric (0,8 mmol/l), a 4 °C. Tot seguit, la mescla s'agita enèrgicament durant 1 min i es centrifuga en fred a 10.000 g durant 10 min (centrífuga Beckman amb rotor JA-14) i en el sobrenedant s'hi determina la concentració d'ATP segons la tècnica de LAMPRECHT i TRAUTSCHOLD (1974).

Es tracta d'un mètode enzimàtic basat en les següents reaccions:





En primer lloc, la glucosa és fosforilada per l'hexokinasa a partir de l'ATP present en la solució i després la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa l'oxida cap a 6-fosfoglucono- δ -lactona amb formació de NADPH el qual es quantifica espectrofotomètricament a 340 nm. Paral·lelament, es realitza una corba patró, amb solucions de concentració coneguda d'ATP. Les determinacions s'han realitzat tot seguit després de la incubació, per tal d'evitar la degradació del nucleòtid. La quantificació de cada mostra es fa per duplicat i els resultats s'expressen com a nmol/mg proteïna.

3.3.5.5. Acumulació d' α -metil-D-glucòsid com a índex de viabilitat

Els experiments realitzats sobre la capacitat de les cèl·lules obtingudes amb els tres medis diferents d'aïllament per acumular monosacàrid, i utilitzats com a criteri per a determinar el millor medi d'aïllament, s'han dut a terme amb la mateixa metodologia emprada en l'estudi sobre la capacitat dels cecs per acumular sucres, la qual es descriu a continuació (vegeu apartat 3.3.6.).

3.3.6. ACUMULACIÓ DE MONOSACÀRIDS EN CÈL·LULES AÏLLADES

Per tal de determinar la capacitat de les cèl·lules aïllades per acumular sucres, s'ha realitzat experiments d'acumulació a temps llargs (60 min d'incubació) i fluxes inicials unidireccionals (60s d'incubació). En ambdós casos la metodologia és la mateixa, tan sols varia el temps d'incubació i els intervals de presa de la mostra.

La incubació es duu a terme en un bany orbital termostatitzat a 37 °C amb agitació de 0,5 Hz. En aquest bany s'hi col·loca la suspensió cel·lular i els vasos de plàstic en els quals es realitzarà la incubació. Aquests vasos contenen 3 ml de medi d'incubació amb el substrat a la concentració adequada i , de 6,3 a 48,8 kBq del mateix substrat marcat amb ^{14}C . D'aquests 3 ml de medi, se'n prenen 0,05 ml i es porten a comptar per centelleig líquid. L'addició d'altres substàncies es fa als 3 ml de medi, en volums tan petits com sigui possible i la seva concentració es refereix al volum final d'incubació (4 ml). Als controls s'afegeix el mateix volum del solvent en el qual està dissolta la substància a estudiar.

En el moment que la suspensió assoleix els 37 °C, se'n pren 1 ml, que s'afegeix a cada vas d'incubació, moment en el qual s'inicia la mateixa.

A intervals de temps prefixats, es pren una mostra de 0,2 ml de cada vas d'incubació. Aleshores, per tal de separar les cèl·lules del medi radioactiu en el que estan suspeses, aquest volum es pot processar de dues formes. Una, és la de centrifugació en fred de KIMMICH (1975) i va ésser cronològicament la primera utilitzada. L'altra, la de centrifugació a través d'olis inerts de SEPÚLVEDA i BROWN (1982), va substituir a la primera per la seva senzillesa i per l'estalvi de temps que significava. En un estudi realitzat sobre els resultats obtinguts mitjançant ambdues tècniques, s'observa que no hi ha diferència estadísticament significativa entre els resultats obtinguts mitjançant les dues tècniques emprades.

3.3.6.1. Centrifugació en fred

Aquest procediment consisteix en diluir la mostra de

0,2 ml en 2 ml de medi d'incubació mantingut a 4 °C i exempt de sucre i de substrat marcat radioactivament (vegeu figura 14). La suspensió diluïda es centrifuga en fred a 4.000 g durant 1 min (Beckman, rotor JA-14). Aleshores, es desprecia el sobrenedant i s'afegeixen al sediment cel.lular, 2 ml del mateix medi d'incubació fred sense substrats. S'agita i es torna a centrifugar, repetint-se l'operació dues vegades. Segons KIMMICH (1975), després de dos rentats, en el sediment cel.lular tan sols hi resten 0,01 µl del medi d'incubació original.

Després del rentat, s'afegeixen 0,2 ml d'àcid perclòric 30 ml/l al sediment cel.lular, i aleshores s'agita enèrgicament per tal d'extraure'n el sucre intracel.lular. La suspensió es centrifuga en fred a 4.000 g durant 10 min, (Beckman, rotor JA-14) i del sobrenedant se'n prenen 0,1 ml que es porten a comptar per centelleig líquid.

3.3.6.2. Centrifugació a través d'olis inerts

A temps prefixats, els 0,2 ml de suspensió es col.loquen en un tub Eppendorf en el que hi ha 0,5 ml d'una mescla d'olis inerts i 0,5 ml de medi d'incubació sense sucre ni substrat marcat, mantinguts en fred (veure figura 15). Els olis utilitzats són el dinonilftalat i el dibutilftalat barrejats en les proporcions adequades per tal que a 4 °C, la seva densitat (1,03 kg/l) sigui intermèdia a la del medi d'incubació i les cèl.lules. Així, a l'hora d'afegir la mostra, l'oli queda al fons del tub i el medi d'incubació per damunt d'ell, de manera que la suspensió cel.lular queda diluïda i refredada pels 0,5 ml de medi d'incubació. Es centrifuga el tub durant 12 s, en una centrífuga Eppendorf, model 5414 S, caracteritzada per assolir les 12.000 g en 5 s. Durant el temps que dura la centrifugació, les cèl.lules són filtrades a través de l'oli, de manera que s'elimina la radioactivitat

Figura 14.- ESQUEMA DE LA SEPARACIÓ DE LA SUSPENSIO CEL-
LULAR DEL MEDI RADIOACTIU PEL MÈTODE DE CEN-
TRIFUGACIÓ EN FRED.

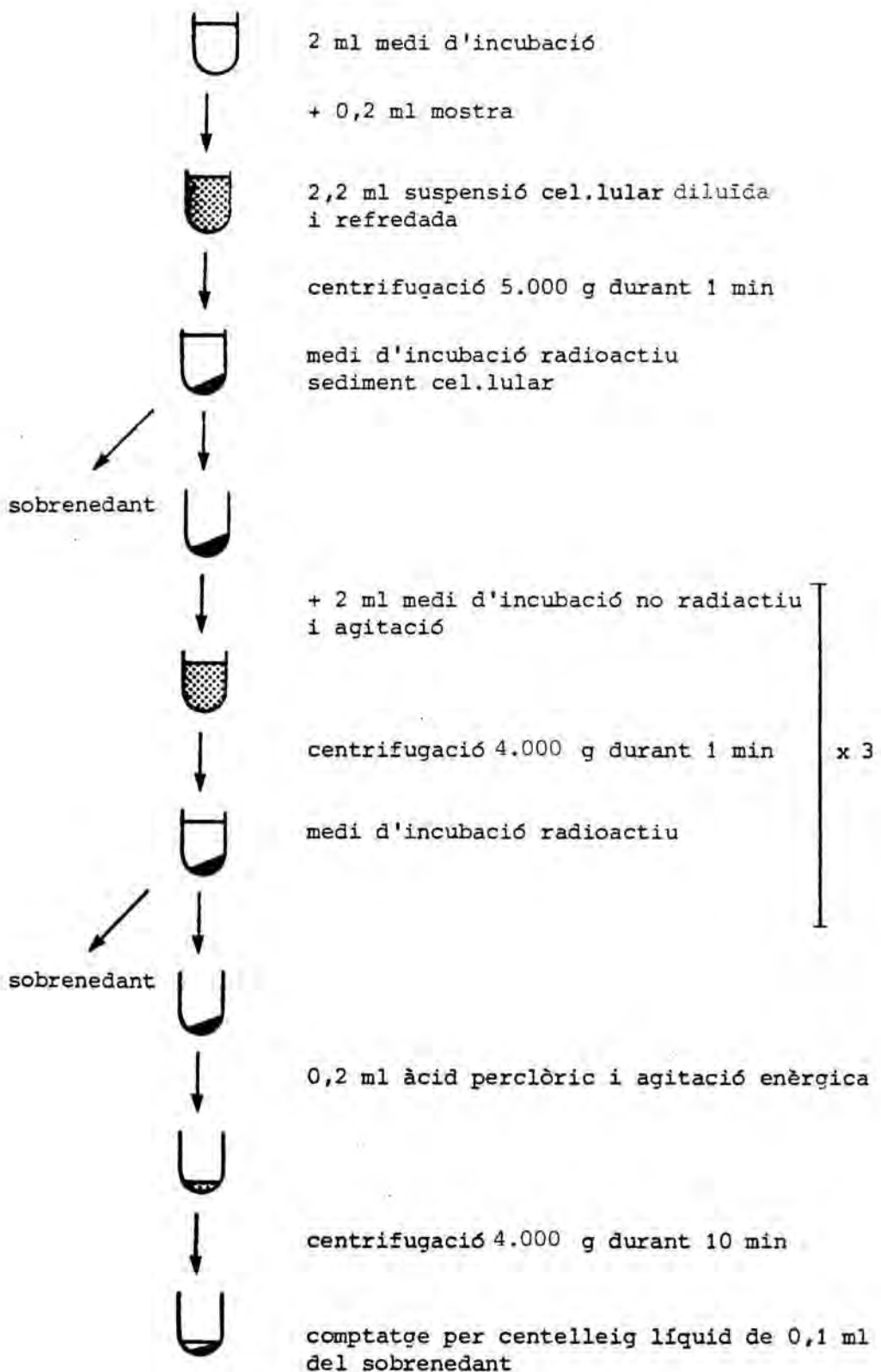
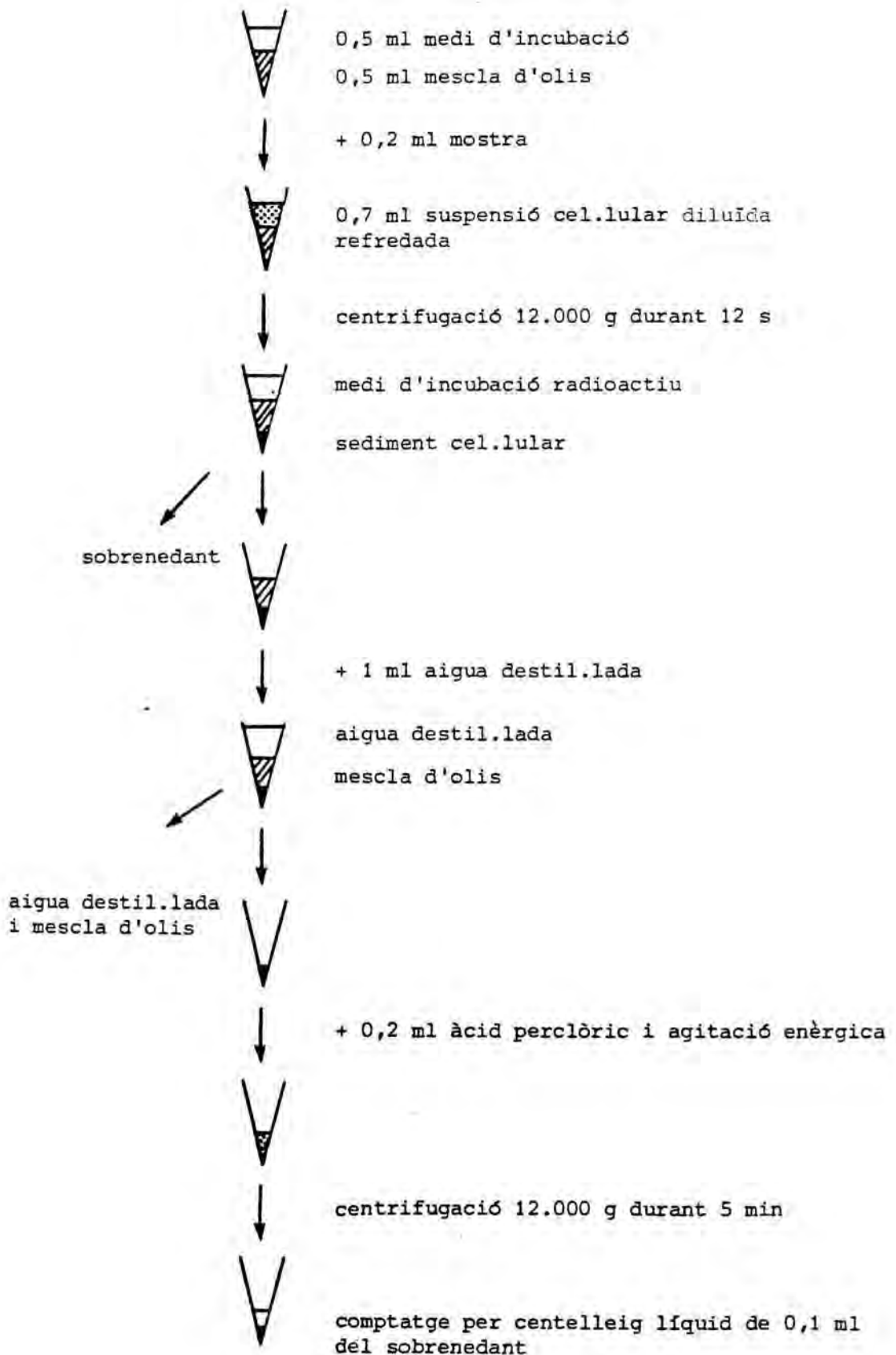


Figura 15.- ESQUEMA DE LA SEPARACIÓ DE LA SUSPENSIO CEL-
LULAR DEL MEDI RADIOACTIU PEL MÈTODE DE CEN-
TRIFUGACIÓ A TRAVÉS D'OLIS INERTS.



extracel.lular. Al final, s'obté un botó cel.lular al fons del tub, per sobre l'oli i per sobre d'aquest, el medi d'incubació radioactiu. Aquest darrer es rebutja i les parets del tub i la superfície de l'oli es renten una vegada amb aigua destil.lada. Després es rebutja l'oli i el sediment cel.lular es trenca amb 0,2 ml d'àcid perclòric 30 ml/l.

La suspensió s'agita enèrgicament, per tal d'extraure'n el sucre, i després es centrifuga durant 5 min a 12.000 g i del sobrenedant se'n prenen 0,1 ml que es porten a comptar per centelleig líquid.

S'ha comprovat que amb un rentat amb aigua destil.lada ja n'hi ha prou per eliminar la radioactivitat remanent en el tub ja que a l'oli, després de centrifugar, no hi ha traces del sucre marcat radioactivament.

3.3.6.3. Determinació de la radioactivitat

La radioactivitat de les mostres s'ha determinat mitjançant espectrometria de centelleig líquid.

El comptatge es realitza en un comptador LKB Wallac, amb vials de vidre que contenen 10 ml de líquid de centelleig de preparació pròpia. La seva composició és la següent:

5 g/l de PPO

2 l de toluè

1 l de Tritó X-100

aigua destil.lada, quantitat suficient per obtenir una emulsió transparent.

Les corbes d'eficiència s'han establert aplicant el mètode del patró extern, utilitzant els patrons Amersham. En tots els comptatges realitzats, s'ha controlat els blancs corresponents a les mostres estudiades.

3.3.6.4. Determinació del volum cel.lular

Per a la determinació del volum cel.lular, la suspensió d'enteròcits s'incuba amb 200 kBq de ^3H -PEG 4.000 i 3-OMG 0,1 mmol/l amb 10 kBq ^{14}C 3-OMG, en presència i en absència de florricina 0,2 mmol/l.

Als 60 min d'incubació es prenen mostres de 0,2 ml i es centrifuguen a través d'olis inerts, tal com es descriu a l'apartat 3.3.6.2., però amb algunes modificacions. En el tub Eppendorf, tan sols hi ha 0,5 ml de la mescla d'olis als que s'afegeixen els 0,2 ml de mostra. Es centrifuga, i aleshores es prenen alíquotes del sobrenedant 0,1 ml que es porten a comptar per centelleig líquid. El sobrenedant es rebutja i es renten les parets del tub i la superfície de l'oli amb aigua destil.lada. Un cop eliminat l'oli, el sediment cel.lular es tracta amb àcid perclòric, s'agita, es centrifuga i del sobrenedant es pren una alíquota de 0,1 ml per portar a comptar per centelleig líquid.

De les dpm (desintegracions per minut) de ^{14}C obtingudes en presència de florricina, es calcula el volum total del sediment cel.lular, obtingut després de la centrifugació a través dels olis inerts, i de les dpm de ^3H , es calcula el volum d'aigua atrapat en el sediment cel.lular. Per diferència, es calcula el volum d'aigua intracel.lular que s'expressa com a $\mu\text{l H}_2\text{O}/\text{mg proteïna}$.

3.3.6.5. Expressió dels resultats

A partir de les dpm de ^{14}C obtingudes del medi d'incubació radioactiu que no conté encara les cèl.lules (vegeu apartat 3.3.6.) i de les dpm trobades a l'àcid perclòric (apartats 3.3.6.1. i 3.3.6.2.) es calcula la quantitat de sucre acumulat en les cèl.lules, que s'expressa com a nmol/mg proteïna. Coneixent el volum cel.lular, la concentració intracel.lular de monosacàrid es pot expressar en mmol/l.

3.3.7. PREPARACIÓ DE LES SUSPENSIONS CEL·LULARS PER A LA SEVA OBSERVACIÓ AL MER I MET

La preparació del teixit intestinal així com de les cèl·lules aïllades per a la seva observació al MER i MET, s'ha dut a terme de la forma ja descrita als apartats 2.1.5.1. i 2.1.5.2. L'única diferència a ressaltar és que, en el cas de l'observació de les cèl·lules aïllades al MER, el punt crític del CO₂ s'ha realitzat dipositant-se les cèl·lules sobre una membrana per filtració, de policarbonat amb porus de 0,2 µm.

3.3.8. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DELS RESULTATS

El tractament estadístic realitzat ha estat el mateix que el de l'apartat 2.1.5.4.

3.4. RESULTATS

3.4.1. ACUMULACIÓ DE 3-OXI-METIL-D-GLUCOSA PER ENTERÒCITS CECALS AÏLLATS AMB HIALURONIDASA: EXPERIMENTS PREVIS

En començar aquest treball hom creia que la tècnica de KIMMICH (1970a) descrita per a l'aïllament d'enteròcits en el jejú de pollastre, seria també la més adequada per aïllar les cèl·lules de l'epiteli cecal, per la qual cosa fou inicialment la tècnica d'elecció.

També, i donat que els estudis histològics estaven tan sols encetats, no es va considerar que hi podria haver una diferent estructura cel·lular que comportés uns canvis en la capacitat per acumular sucres segons la zona del cec. És per això que hom va decidir aïllar enteròcits del cec sencer, mitjançant l'esmentada tècnica, estudiant-hi l'acumulació de 3-oxi-metil-D-glucosa 0,1 mmol/l al llarg del temps d'incubació. Els resultats del cec sencer es varen comparar amb els obtinguts en cèl·lules aïllades del jejú, per tal de fer un estudi comparatiu entre els dos segments intestinals.

S'ha emprat la 3-OMG ja que es tracta d'un sucre no metabolitzable que satisfà els requeriments estructurals tant del transportador dependent de Na^+ de la membrana luminal com de l'independent de Na^+ de la membrana basolateral (RANGLES i KIMMICH, 1978). La concentració de sucre utilitzada és baixa (lluny de la K_m) per tal d'obtenir un elevat gradient de concentració del substrat entre les cèl.lules i el medi d'incubació. També s'ha estudiat l'efecte de l'inhibidor florricina a la concentració 0,2 mmol/l. Es va escollir aquesta concentració perquè provoca una inhibició maximal del transport actiu en el jejú, sense afectar els nivells d'ATP (KIMMICH, 1975).

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 16. La quantitat de 3-OMG present en els enteròcits cecals, als 60 min d'incubació és de $1,88 \pm 0,20$ nmol/mg proteïna, $n = 5$ (mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades), valor significativament inferior a l'obtingut en el jejú ($5,04 \pm 0,30$ nmol/mg proteïna, $n = 3$). El sucre acumulat a l'interior de les cèl.lules en presència de florricina 0,2 mmol/l, als 60 min d'incubació, és de $0,30 \pm 0,03$ nmol/mg proteïna, $n = 5$ en el cec, valor que no difereix significativament de l'obtingut en el jejú ($0,30 \pm 0,04$ nmol/mg proteïna, $n = 3$).

L'estat estacionari de l'acumulació de 3-OMG s'assoleix en el cec sencer als 50 min i en el jejú als 30 min de l'inici de la incubació.

3.4.2. PROPIETATS DELS ENTERÒCITS AILLATS AMB TRES MÈTODES DIFERENTS. RECERCA DE LA TÈCNICA IDÒNIA PER A L'AÏLLAMENT D'ENTERÒCITS CECALS

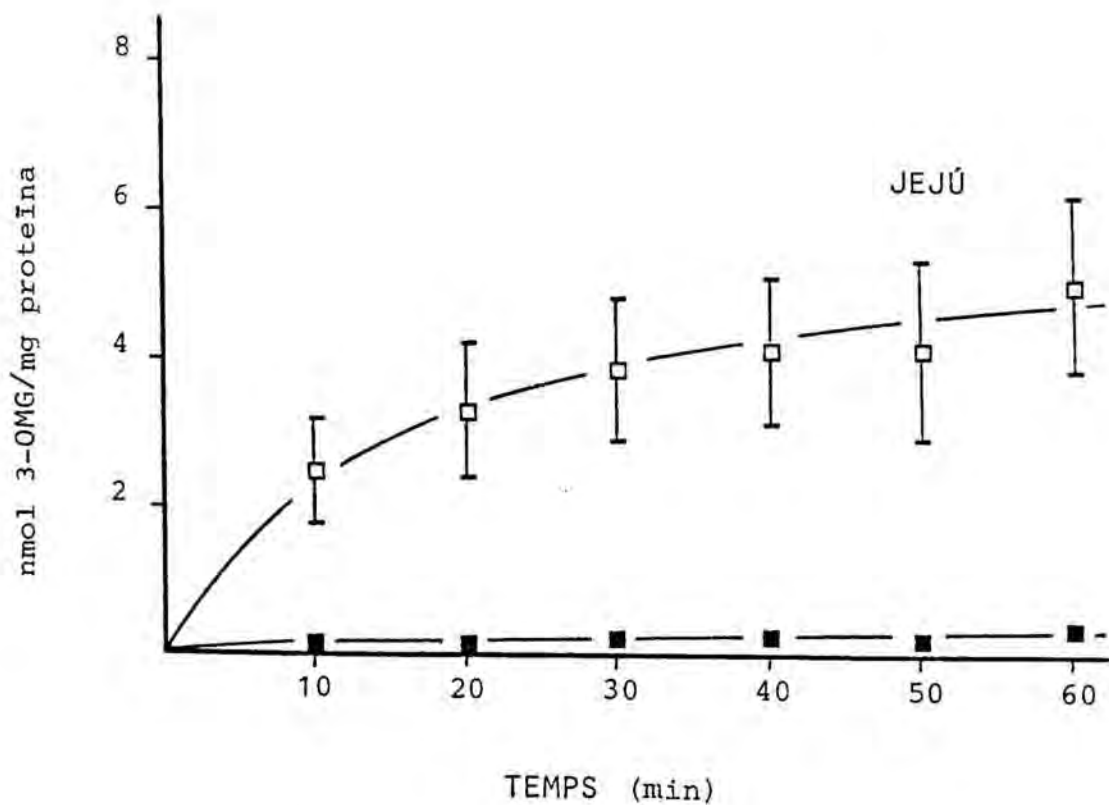
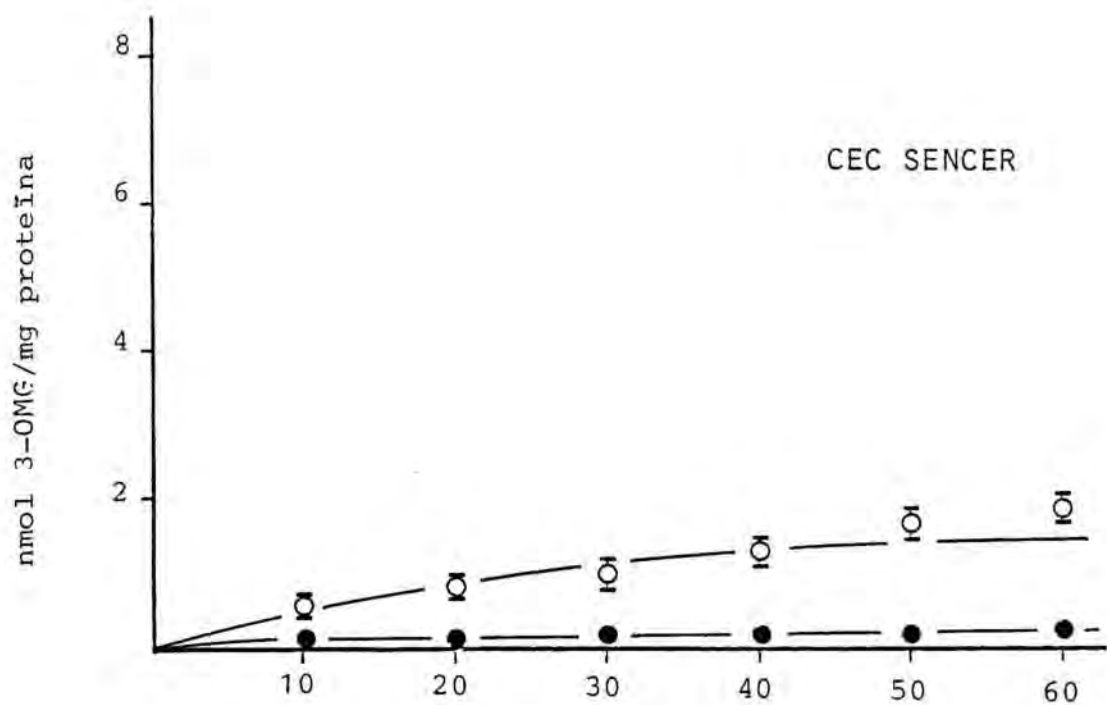
La tècnica de KIMMICH (1970a) per a l'aïllament d'ente-

Figura 16.- ACUMULACIÓ DE 3-OMG 0,1 mmol/l PER ENTEROCITS DE CEC SENCER I DE JEJÚ AÏLLATS AMB HIALURONIDASA.

CEC SENCER Cada punt representa la mitjana \pm error estàndard de 5 dades. Control (○) i floricina 0,2 mmol/l (●).

JEJÚ $m \pm ES$ de 3 dades. Control (□) i floricina 0,2 mmol/l (■).

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



ròcits ens va permetre posar de manifest l'existència en el cec de pollastre, d'un mecanisme de transport mitjançat concentratiu per a monosacàrids. Aquesta tècnica enzimàtica, descrita per al jejú, presentava l'inconvenient de proporcionar molt poques cèl.lules en ésser utilitzada en el cec. Per aquesta raó es cercaren altres medis d'aïllament que donessin lloc a suspensions cel.lulars més nombroses i que, a més, les cèl.lules, un cop aïllades, presentessin unes condicions funcionals molt semblants a les fisiològiques. Es triaren dos medis químics, un amb citrat trisòdic 27 mmol/l i l'altre amb EDTA 5 mmol/l, ja que són els més emprats a la bibliografia.

Amb les cèl.lules del cec i del jejú obtingudes mitjançant aquests dos medis i l'enzimàtic de KIMMICH (1970a), es realitzaren tot un seguit de proves de viabilitat, els resultats de les quals varen ésser utilitzats com a criteri per determinar el millor medi d'aïllament.

3.4.2.1. Integritat de la membrana cel.lular

S'ha realitzat un estudi comparatiu sobre la integritat de la membrana cel.lular mitjançant la tècnica del blau de trypan (GIRARDI *et al.*, 1956), en enteròcits del cec sencer i del jejú obtinguts amb hialuronidasa 0,5 g/l, citrat trisòdic 27 mmol/l i EDTA mmol/l.

L'observació al microscopi òptic de les suspensions cel.lulars revela, en totes elles, l'existència de cèl.lules cilíndriques i cuboides o esfèriques, en les que fàcilment s'hi pot veure la vora "en raspall". També hi són presents agregats i làmines cel.lulars i alguns eritròcits.

Els resultats obtinguts amb la tècnica d'exclusió del colorant es troben a la taula IV. El medi d'aïllament amb citrat proporciona, tant en el cec sencer com en el jejú, el major nombre de cèl.lules amb la membrana intacta. Els resul-

TAULA IV .- ESTUDI MITJANÇANT EL MÈTODE DEL BLAU DE TRYPAN,
DE LA INTEGRITAT DE LA MEMBRANA CEL.LULAR

MEDI D'AILLAMENT	% D'EXCLUSIÓ DEL COLORANT	
	CEC SENCER	JEJÚ
HIALURONIDASA 0,5 g/l	49,71 ± 0,76 ^a (4)	46,91 ± 0,76 (3)
CITRAT TRISÒDIC 27 mmol/l	67,60 ± 3,67 (3)	62,95 ± 0,05 ^b (3)
EDTA 5 mmol/l	66,82 ± 6,10 (3)	47,98 ± 3,20 (3)

Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard. El número entre parèntesis és el nombre de dades. a: $p < 0,05$, en el cec sencer i b: $p < 0,05$, en el jejú.

tats obtinguts amb hialuronidasa són més baixos, essent les diferències, en ambdós segments intestinals, estadísticament significatives, respecte al citrat. Pel que fa a l'EDTA, en el cec sencer dóna un elevat tant per cent de viabilitat que no difereix significativament del citrat i el en jejú, els resultats són inferiors, no variant significativament respecte a la hialuronidasa.

3.4.2.2. Consum d'oxigen

L'avaluació de l'activitat respiratòria d'una suspensió cel·lular es duu a terme a través de la quantitat d'oxigen consumit per les cèl·lules en una hora d'incubació (Q_{O_2} , $\mu l O_2 / mg \text{ proteïna} \cdot h$). Un altre factor a tenir en compte² i que és indicatiu d'un bon funcionament metabòlic és la capacitat de les cèl·lules per consumir oxigen linealment amb el temps d'incubació (PRIOR *et al.*, 1974; KIMMICH, 1975; HÜLSMANN, 1977 i TOWLER *et al.*, 1978).

En el cas del consum d'oxigen, en presència de glucosa 10 mmol/l, KIMMICH (1970a) obté valors lineals de fins dues hores, mentre que d'altres autors tan sols els obtenen durant els 30 o 60 primers minuts d'incubació (STERN i REILLY, 1965; PERRIS, 1966; PORTEOUS, 1977; TOWLER *et al.*, 1978 i WATFORD *et al.*, 1979). En el nostre cas, a l'estudi comparatiu realitzat amb els tres medis d'aïllament i també en presència de glucosa 10 mmol/l, en els dos segments intestinals s'ha obtingut en tots els casos, tal com s'observa a les figures 17 i 18, una linealitat durant 1 h 30 min.

Pel que fa a la Q_{O_2} , els resultats es mostren a la figura 19. Les cèl·lules del cec sencer aïllades amb hialuronidasa i citrat consumeixen significativament més oxigen que les obtingudes amb EDTA. En el jejú, són les cèl·lules aïllades amb hialuronidasa, les que consumeixen significativament més oxigen, respecte als altres dos agents.

Figura 17.- CONSUM D'OXIGEN ($\mu\text{l}/\text{mg}$ proteïna) AL LLARG DEL TEMPS D'INCUBACIÓ, EN PRESENCIA DE GLUCOSA $10 \text{ mmol}/\text{l}$, EN CÈL.LULES DEL CEC SENCER OBTINGUES AMB TRES MEDIS DIFERENTS D'AILLAMENT. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

Hialuronidasa (\square) $0,5 \text{ g}/\text{l}$, $n = 5$, $r = 0,9840$
i $P = 1,0$.

Citrat trisòdic (Δ) $27 \text{ mmol}/\text{l}$, $n = 5$, $r = 0,9985$
i $P = 1,0$.

EDTA (\circ) $5 \text{ mmol}/\text{l}$, $n = 6$, $r = 0,9992$ i $P = 1,0$.

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

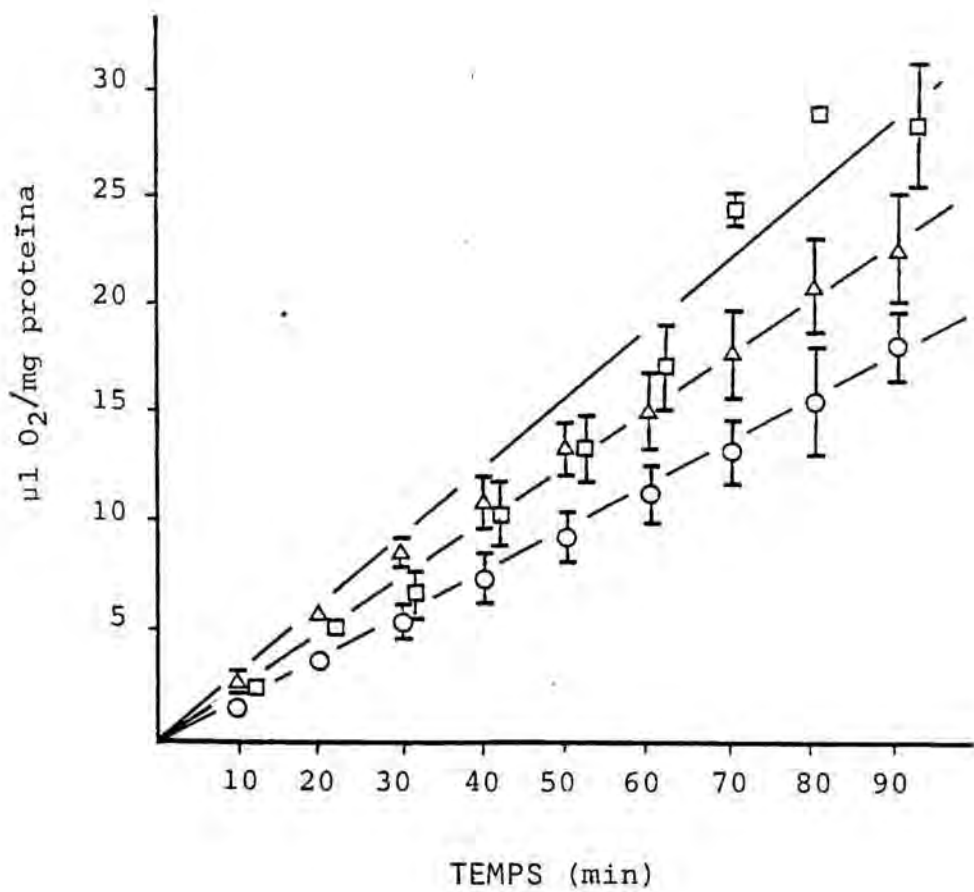


Figura 18.- COMSUM D'OXIGEN ($\mu\text{l}/\text{mg}$ proteïna) AL LLARG DEL TEMPS D'INCUBACIÓ, EN PRESENCIA DE GLUCOSA $10 \text{ mmol}/\text{l}$, EN CÈL.LULES DEL JEJÚ OBTINGUDES AMB TRES MEDIS DIFERENTS D'AÏLLAMENT. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

Hialuronidasa (■) $0,5 \text{ g}/\text{l}$, $n = 4$, $r = 0,9964$
i $P = 1,0$.

Citrat trisòdic (▲) $27 \text{ mmol}/\text{l}$, $n = 4$,
 $r = 0,9948$ i $P = 1,0$.

EDTA (●) $5 \text{ mmol}/\text{l}$, $n = 6$, $r = 0,9817$ i $P = 1,0$.

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

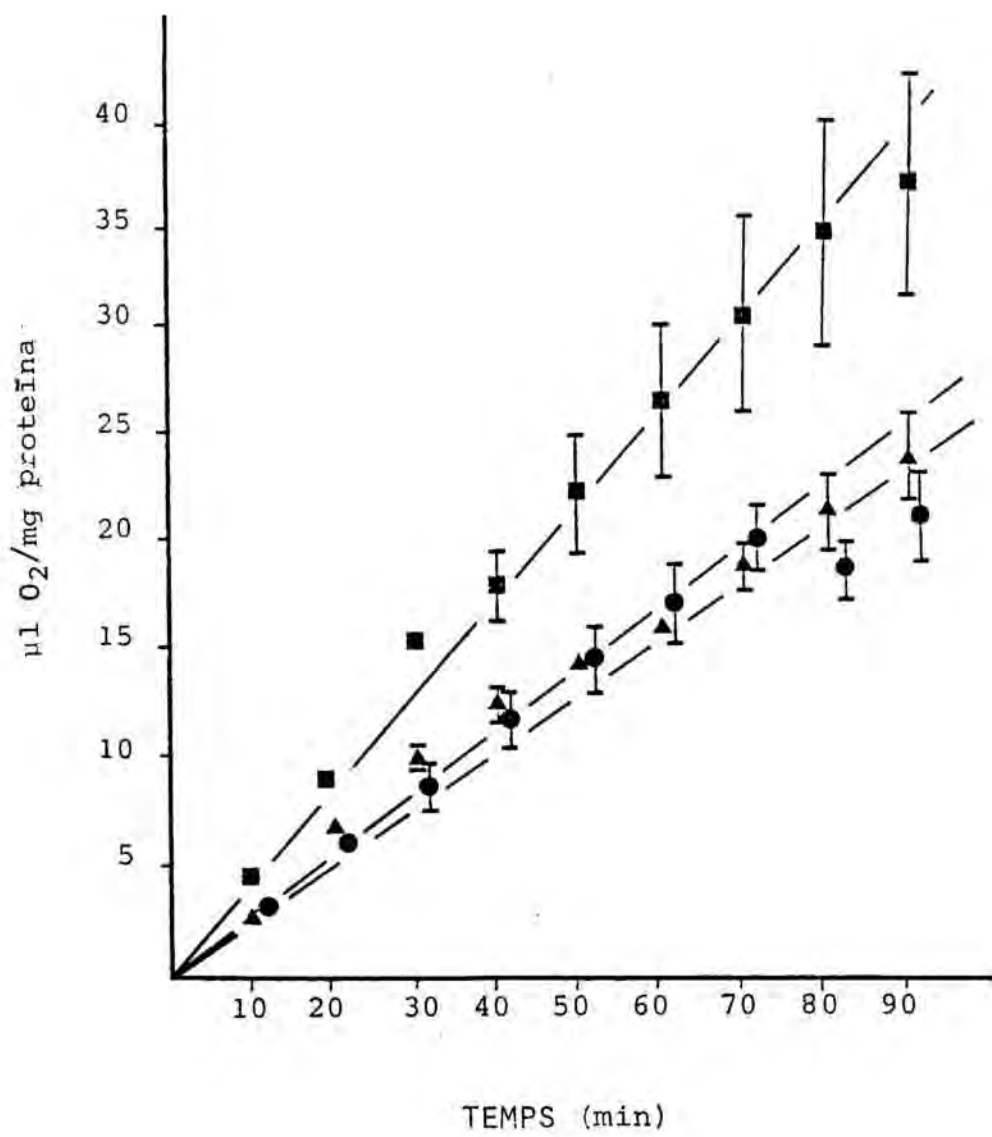
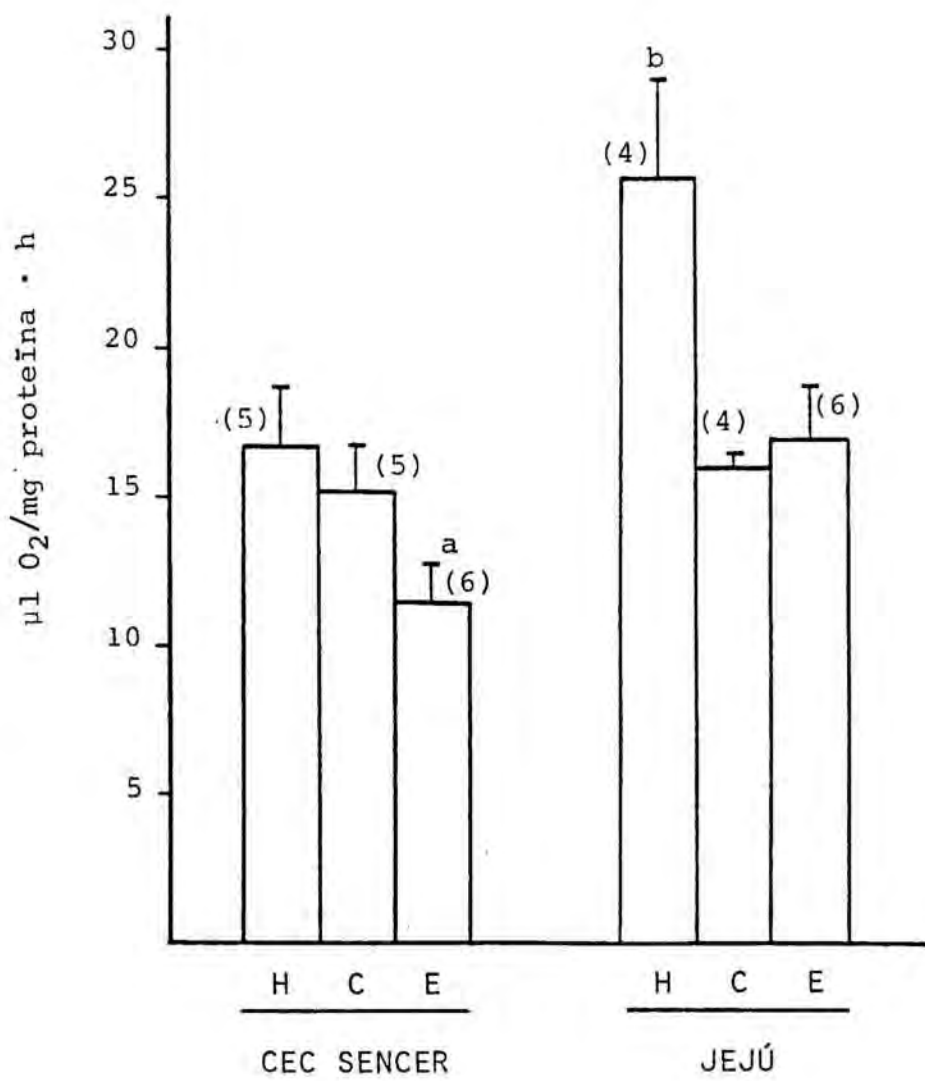


Figura 19.- CONSUM D'OXIGEN (Q_{O_2} , $\mu\text{l}/\text{mg}$ proteïna \cdot h) EN PRESENCIA DE GLUCOSA 10 mmol/l, EN CÈL.LUES DEL CEC SENCER I DEL JEJÚ, OBTINGUDES AMB HIALURONIDASA (H) 0,5 g/l, CITRAT TRISÒDIC (C) 27 mmol/l i EDTA (E) 5 mmol/l. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent el número entre parèntesis el nombre de dades. a: $p < 0,05$, en el cec sencer i b: $p < 0,05$, en el jejú.



3.4.2.3. Producció d'àcid làctic

L'avaluació de l'activitat glicolítica d'una suspensió cel·lular es duu a terme a través de la quantitat d'àcid làctic produïda en una hora d'incubació (Q_L , nmol àcid làctic/mg proteïna · h). En aquest cas, de la mateixa manera que en el consum d'oxigen, la capacitat de les cèl·lules per produir àcid làctic linealment amb el temps d'incubació és ja indicativa d'un bon funcionament metabòlic.

KIMMICH (1970a) i PRIOR *et al.* (1974) obtenen, en presència de glucosa 10 mmol/l, valors lineals al menys durant 2 h, mentre TOWLER *et al.* (1978) i WATFORD *et al.* (1979) tan sols els conseqüeixen durant 30 min. En el nostre cas, també en presència de glucosa 10 mmol/l i tal com s'observa a les figures 20 i 21, s'ha obtingut una producció d'àcid làctic lineal durant 1 h 30 min.

Pel que fa a la Q_L (nmol àcid làctic/mg proteïna · h) els resultats es mostren a la figura 22. En el cec sencer, les cèl·lules aïllades amb hialuronidasa produeixen significativament més àcid làctic que no pas la resta. En canvi, en el jejú, són les cèl·lules aïllades amb citrat les que produeixen significativament més àcid làctic. Tal com es pot observar, no hi ha una diferència notable entre els resultats del cec sencer i els del jejú.

3.4.2.4. Nivells d'ATP

Hom ha realitzat un estudi comparatiu sobre els nivells d'ATP assolits, en presència de glucosa 10 mmol/l, al llarg de 30 min d'incubació.

Els resultats es mostren a la figura 23, en la que s'observa que les cèl·lules del cec sencer obtingudes amb citrat trisòdic i les del jejú amb hialuronidasa, pateixen en els 10

Figura 20.- PRODUCCIÓ D'ÀCID LÀCTIC (nmol/mg proteïna) AL LLARG DEL TEMPS D'INCUBACIÓ, EN PRESENCIA DE GLUCOSA 10 mmol/l, EN CÈL·LULES DEL CEC SENCER OBTINGUDES AMB TRES MEDIS DIFERENTS D'AILLAMENT. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

Hialuronidasa (\square) 0,5 g/l, n = 7, r = 0,9979
i P = 0,9979.

Citrat trisòdic (Δ) 27 mmol/l, n = 6,
r = 0,9866 i P = 0,9866.

EDTA (O) 5 mmol/l, n = 6, r = 0,9918 i
P = 0,9918.

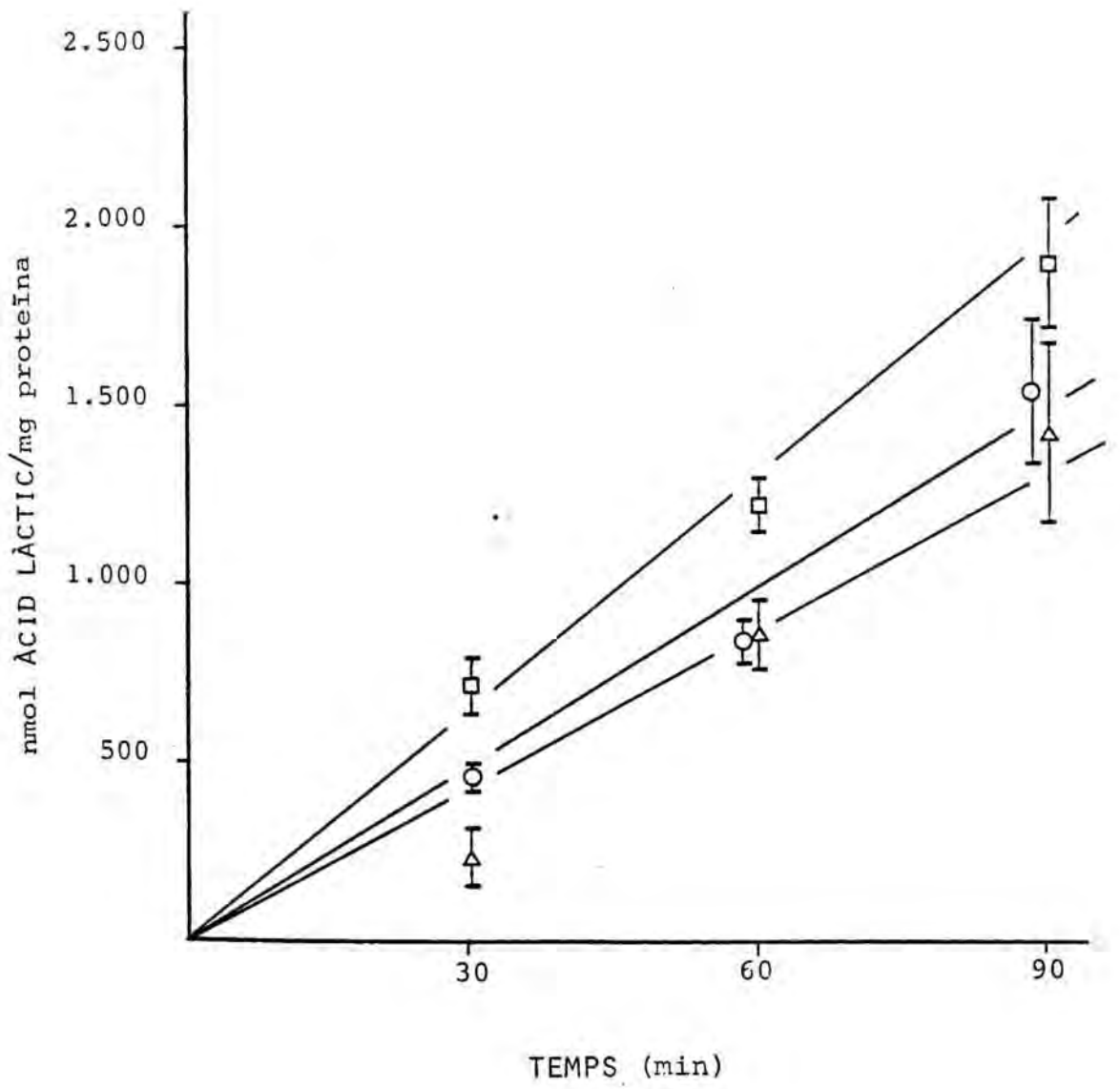


Figura 21.- PRODUCCIÓ D'ÀCID LÀCTIC (nmol/mg proteïna) AL LLARG DEL TEMPS D'INCUBACIÓ, EN PRESENCIA DE GLUCOSA 10 mmol/l, EN CÈL·LULES DEL JEJÚ OBTINGUES AMB TRES MEDIS DIFERENTS D'AÏLLAMENT. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

Hialuronidasa (■) 0,5 g/l, n = 5, r = 0,9864
i P = 0,9864.

Citrat trisòdic (▲) 27 mmol/l, n = 5,
r = 0,9977 i P = 0,9977.

EDTA (●) 5 mmol/l, n = 8, r = 0,9954 i
P = 0,9954

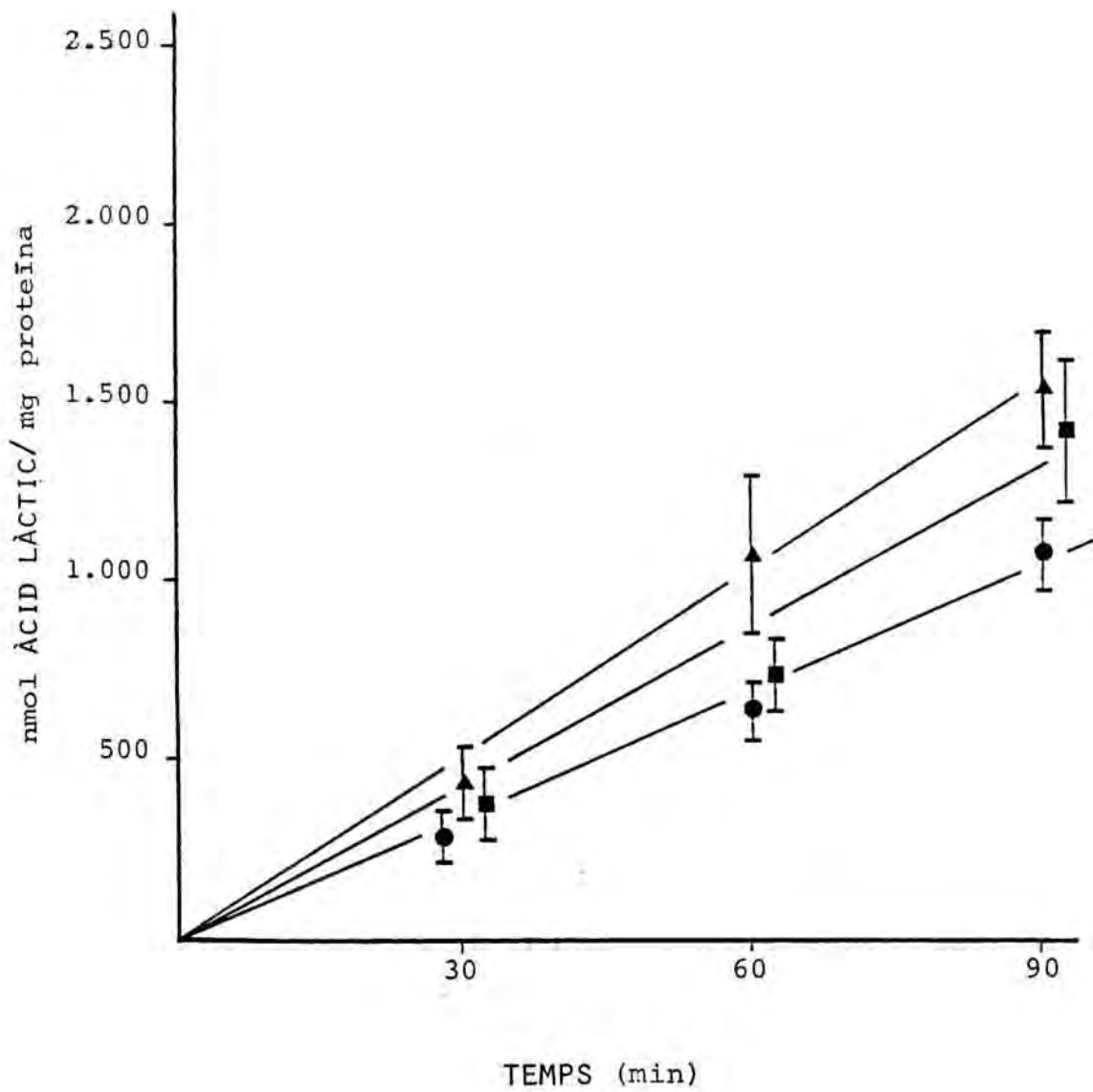
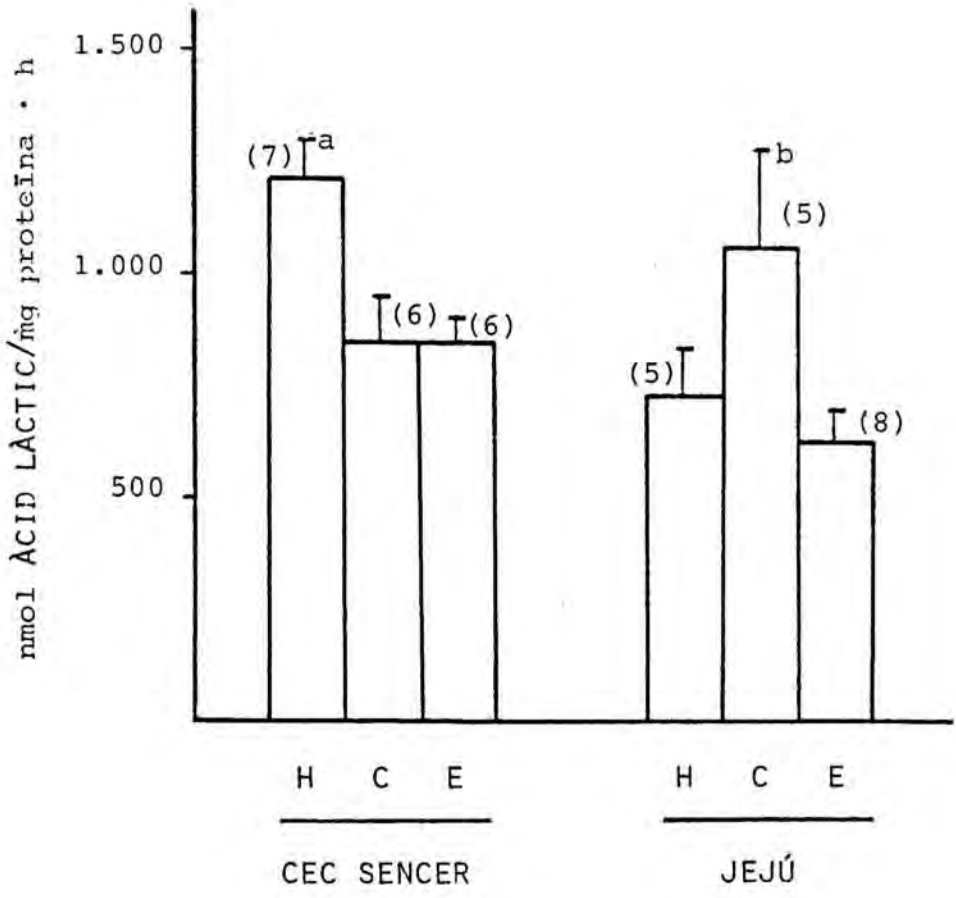


Figura 22.- PRODUCCIÓ D'ÀCID LÀCTIC (Q_L , nmol/mg proteïna), EN PRESENCIA DE GLUCOSA 10 mmol/l, EN CEL·LULES DEL CEC SENCER I DEL JEJÚ, AÏLLADES AMB HIALURONIDASA (H) 0,5 g/l, CITRAT TRISÒDIC (C) 27 mmol/l I EDTA (E) 5 mmol/l. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent el número entre parèntesis, el nombre de dades. a: $p < 0,05$, en el cec sencer i b: $p < 0,05$, en el jejú.



primers minuts d'incubació, una gran pèrdua de nucleòtid. En la resta de les suspensions cel·lulars, en aquest període de temps, els nivells decreixen molt poc. Després de mitja hora d'incubació, no hi ha diferència estadísticament significativa, tant en el cec com en el jejú, entre les dades obtingudes amb els diversos medis d'aïllament.

A temps zero (figura 24) les cèl·lules del cec sencer aïllades amb citrat, presenten significativament més ATP que no pas les obtingudes amb hialuronidasa i EDTA. En el jejú, són les cèl·lules obtingudes amb l'enzim les que tenen significativament més ATP.

Tal com s'observa a la figura 24, el resultat no varien notablement entre el cec sencer i el jejú.

3.4.2.5. Acumulació de sucres

Donat que l'objecte d'aquest treball és el de realitzar un estudi sobre la capacitat dels cecs per a absorbir sucres, la prova més concloent per a determinar el millor medi d'aïllament és, doncs, l'avaluació de l'acumulació de monosacàrids en les cèl·lules de cec sencer i de jejú, obtingudes amb hialuronidasa, citrat i EDTA.

Els experiments s'han realitzat a temps llargs (60 min d'incubació) amb α -metil-D-glucòsid (α -MG) 0,1 mmol/l. S'ha emprat aquest sucre ja que no és metabolitzable i no utilitza la via de la difusió facilitada de la membrana basolateral (KIMMICH i RANGLES, 1981). D'aquesta manera, la utilització de la florricina 0,2 mmol/l permet la quantificació del transport mitjançat concentratiu de la vora luminal. Aquest paràmetre dóna idea de la funcionalitat metabòlica de la cèl·lula i de l'estat dels transportadors.

Figura 23.- NIVELLS D'ATP (nmol/mg proteïna) AL LLARG DEL TEMPS D'INCUBACIÓ, EN PRESENCIA DE GLUCOSA 10 mmol/l, EN CÈL.LULES DEL CEC SENCER I DEL JEJÚ, OBTINGUDES AMB TRES MEDIS DIFERENTS D'AÏLLAMENT. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

CEC SENCER Hialuronidasa (\square) 0,5 g/l, n = 3, citrat trisòdic (Δ) 27 mmol/l, n = 3 i EDTA (\circ) 5 mmol/l, n = 3.

JEJÚ Hialuronidasa (\blacksquare) 0,5 g/l, n = 4, citrat trisòdic (\blacktriangle) 27 mmol/l, n = 6 i EDTA (\bullet) 5 mmol/l, n = 4.

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

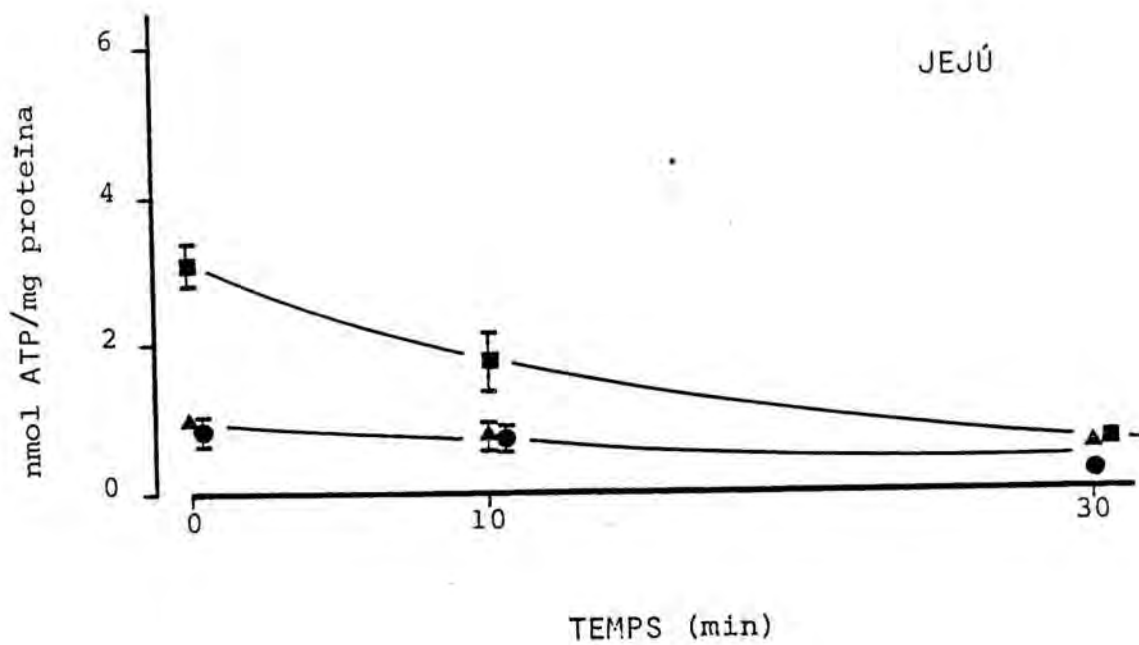
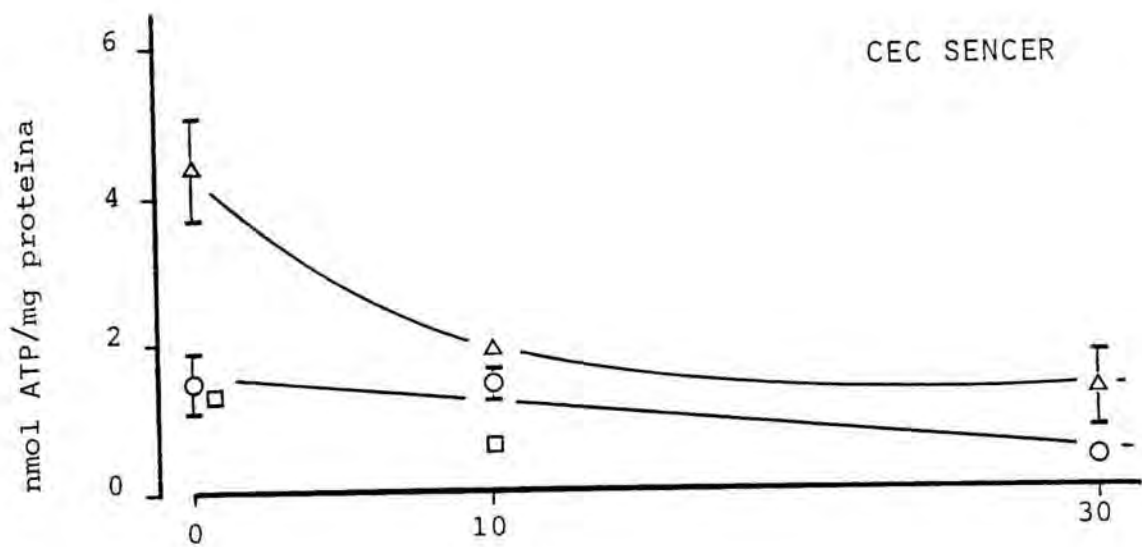
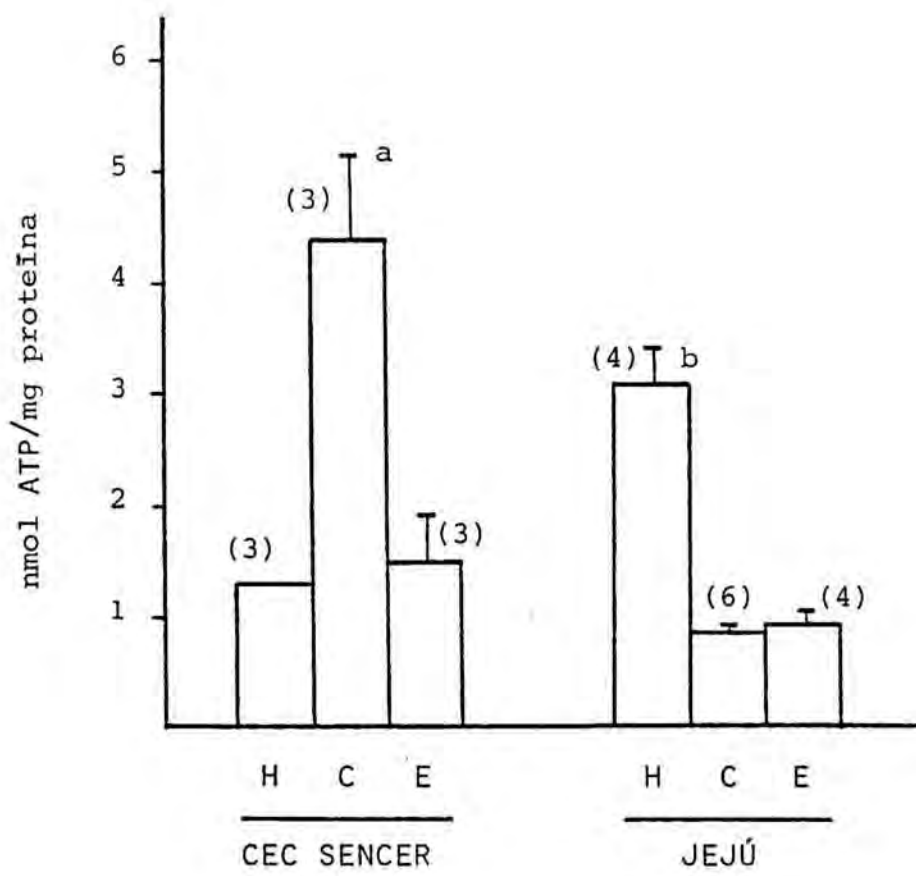


Figura 24.- NIVELLS D'ATP (nmol/mg proteïna), EN PRESENCIA DE GLUCOSA 10 mmol/l, A TEMPS ZERO DE LA INCUBACIÓ, EN CEL·LULES DEL CEC SENCER I DEL JEJÚ AÏLLADES AMB HIALURONIDASA (H) 0,5 g/l, CITRAT TRISÒDIC (C) 27 mmol/l i EDTA (E) 5 mmol/l. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent el número entre parèntesis, el nombre de dades. a: $p < 0,05$, en el cec sencer i b: $p < 0,05$, en el jejú.

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



A les figures 25 i 26 es mostra l'acumulació d' α -MG al llarg del temps d'incubació. En tots els casos estudiats, s'observa l'existència de transport mitjançat concentratiu, tal com es posa de manifest per la inhibició obtinguda amb florricina 0,2 mmol/l. A més, l'entrada per difusió simple no difereix significativament, als 60 min d'incubació, en totes les cèl.lules. La diferent acumulació observada correspon, doncs, a diferències en el component de transport actiu.

L'acumulació d' α -MG, als 60 min d'incubació, és significativament més gran, tant per al cec sencer com per al jejú, en les cèl.lules aïllades amb citrat trisòdic. No hi ha diferència estadísticament significativa entre l'acumulació de les cèl.lules obtingudes amb EDTA i hialuronidasa.

Les diferències observades entre el cec sencer i el jejú es mantenen en els tres medis d'aïllament utilitzats, essent de 2,5 a 3 vegades més gran l'acumulació en el jejú que en el cec sencer.

3.4.2.6. Elecció del medi d'aïllament

Dels tres medis d'aïllament assatjats, el de citrat i el d'EDTA proporcionen moltes més cèl.lules que no pas el d'hialuronidasa. Aquest fet, juntament amb els resultats obtinguts en les proves de viabilitat realitzades, ens han portat a considerar el medi amb citrat com a medi d'elecció. Per aquesta raó, a partir d'aquest punt totes les suspensions cel·lulars han estat obtingudes amb aquest agent.

3.4.3. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG I DE TRANSMISSIÓ: ESTUDI DEL PROCÉS D'AÏLLAMENT I DELS ENTERÒCITS AÏLLATS

S'ha realitzat un seguiment del procés d'aïllament així cop un estudi de les cèl.lules un com aïllades, al microscopi electrònic de rastreig (MER) i de transmissió (MET). L'aïllament s'ha realitzat amb medi amb citrat.

Figura 25.- ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l (nmol/mg proteïna) EN CÈL.LULES DEL CEC SENCER AÏLLADES AMB TRES MEDIS DIFERENTS. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades. L'acumulació en presència de florricina 0,2 mmol/l no varia segons el medi d'aïllament utilitzat, per la qual cosa tots els resultats es mostren en una sola corba. Hialuronidasa (\square) 0,5 g/l, n = 10; citrat trisòdic (Δ) 27 mmol/l, n = 6 i EDTA (\circ) 5 mmol/l, n = 6 i florricina (∇) 0,2 mmol/l, n = 11.

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

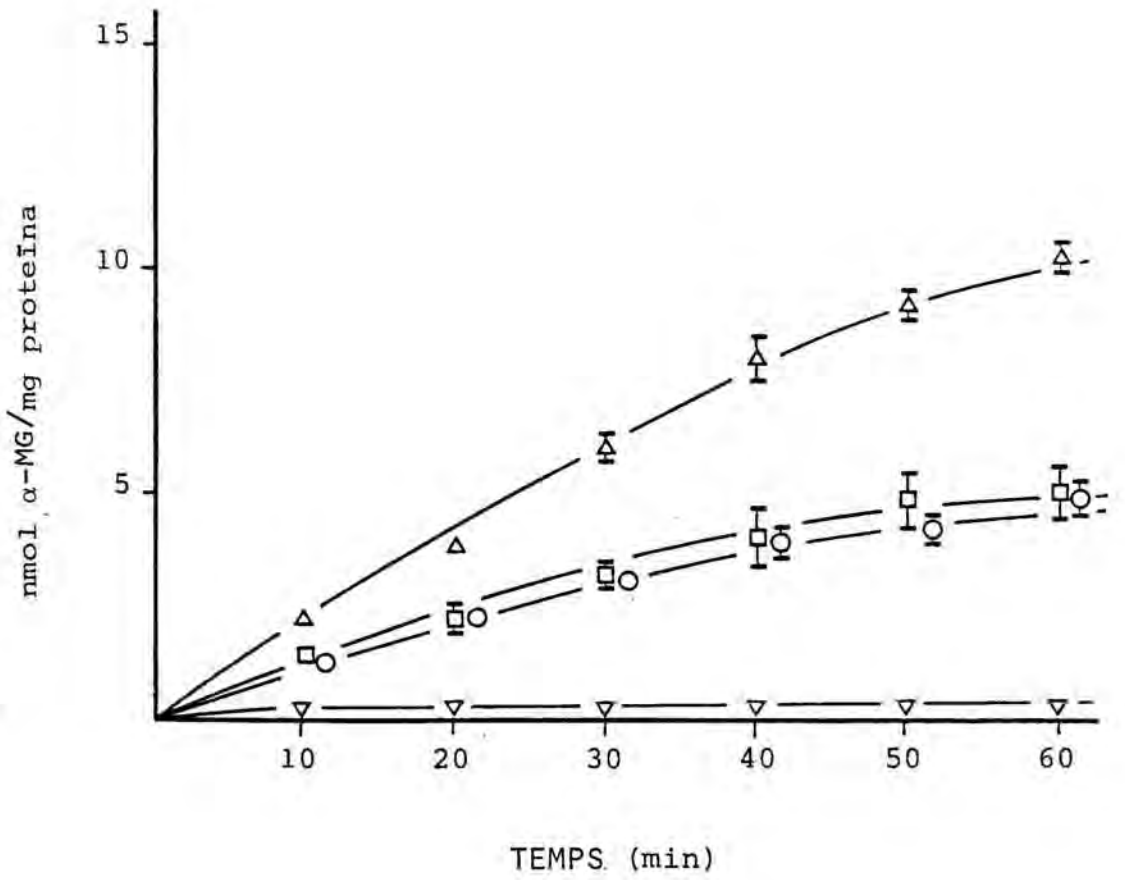
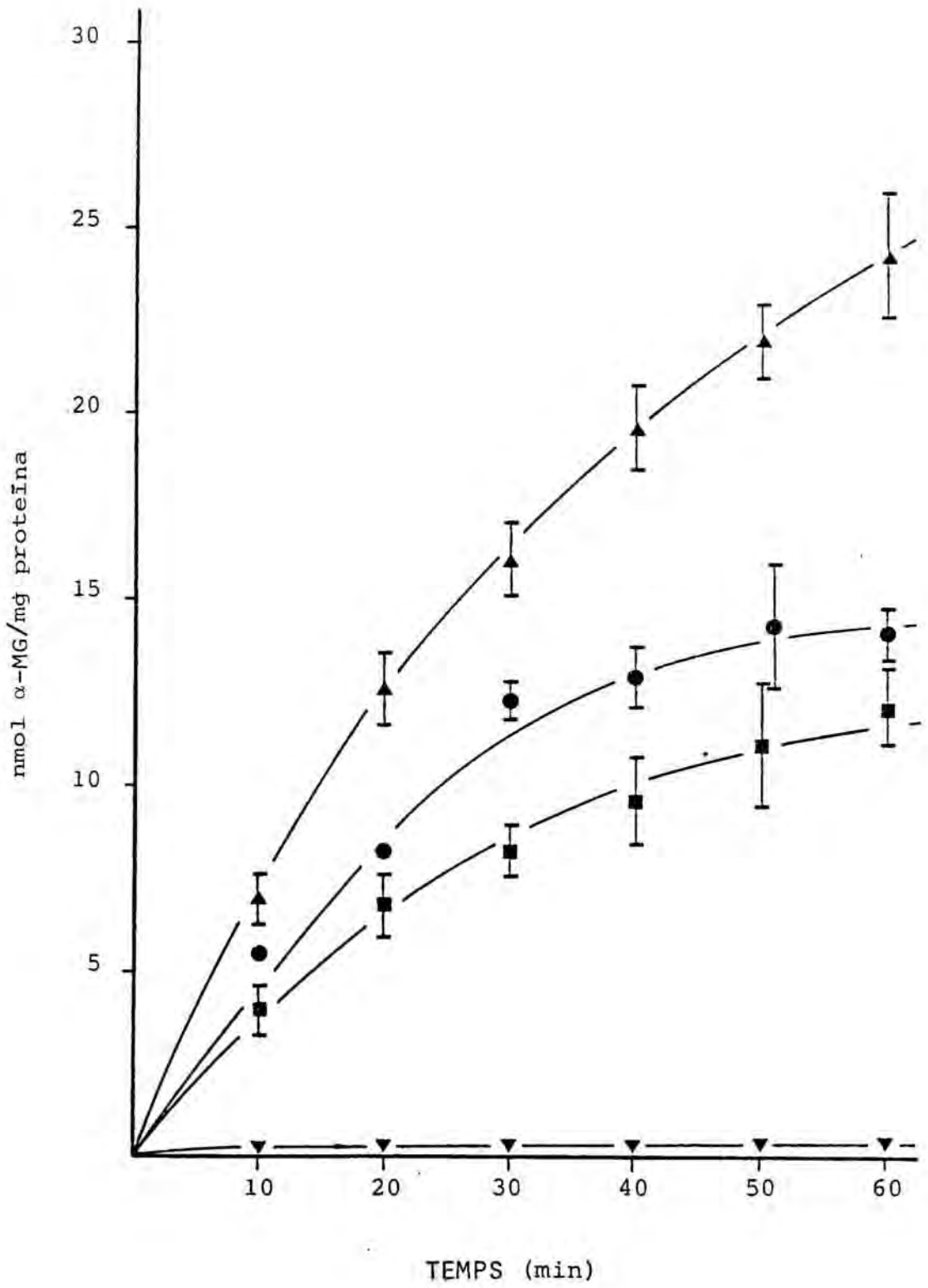


Figura 26.- ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l (nmol/mg proteïna), EN CÈL.LULES DEL JEJÚ AÏLLADES AMB TRES MEDIS DIFERENTS. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades. L'acumulació en presència de florricina 0,2 mmol/l no varia segons el medi d'aïllament utilitzat, per la qual cosa tots els resultats es mostren en una sola corba. Hialuronidasa (■) 0,5 g/l, n = 10; citrat trisòdic (▲) 27 mmol/l, n = 6; EDTA (●) 5 mmol/l, n = 6 i florricina (▼) 0,2 mmol/l, n = 13.

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



Per a l'estudi del procés d'aïllament s'han pres mostres de teixit del cec proximal i del jejú sotmesos a 5, 15 i 30 min de tractament amb el medi d'aïllament. A la fotografia 18a, corresponent als 5 min de tractament del cec proximal, s'observa com ja una part de l'epiteli s'ha després de la vellositat, deixant la làmina pròpia al descobert.

Als 15 min de tractament (fotografia 18b), s'observa l'epiteli inflat i una certa tendència dels enteròcits a individualitzar-se (fotografia 18c). Als 30 min, les vellositats estan totalment pelades, tant en el cec proximal com en el jejú (fotografies 18d i 18e, respectivament).

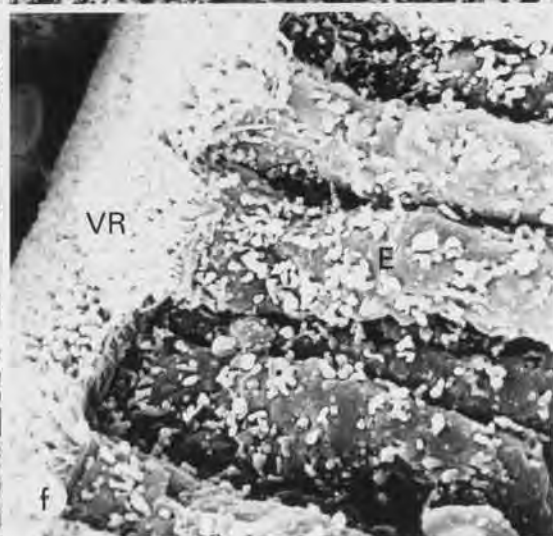
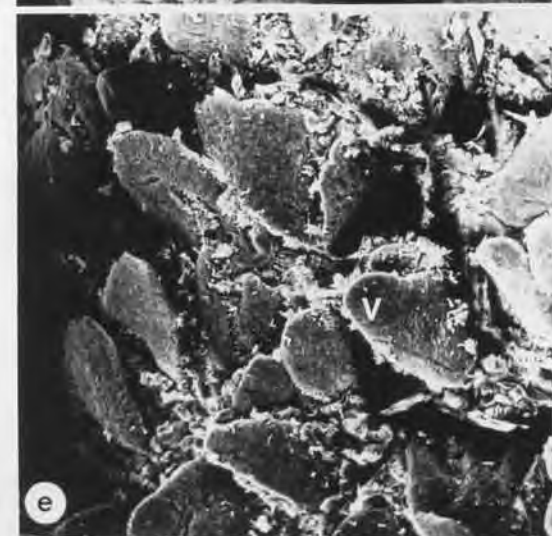
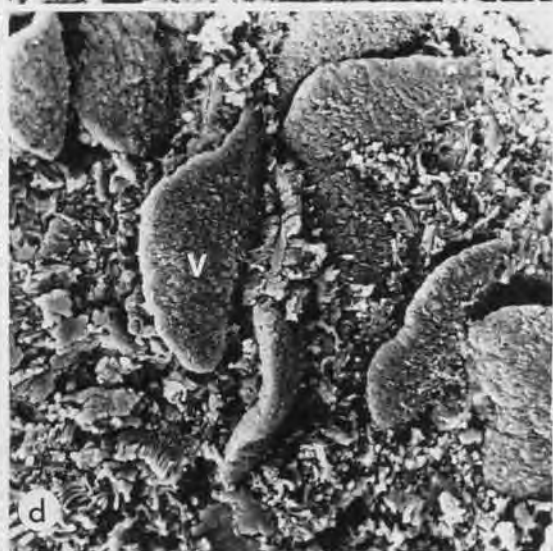
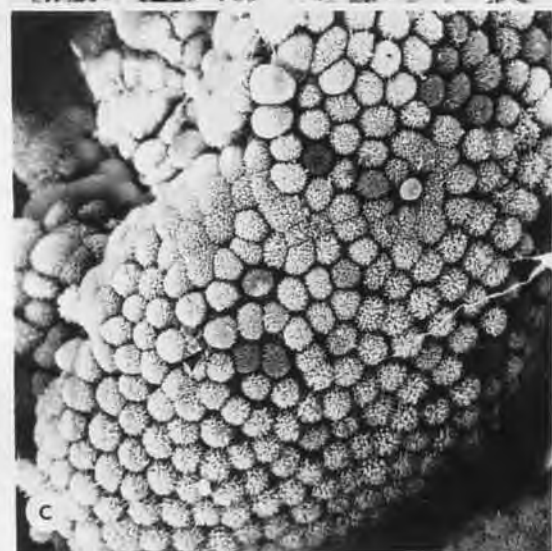
En la fotografia 18f hi ha un detall d'una làmina d'epiteli després de la vellositat, en la que s'observa que el punt d'unió entre els enteròcits sembla ésser a les unions intercel·lulars pròximes a la vora "en raspall".

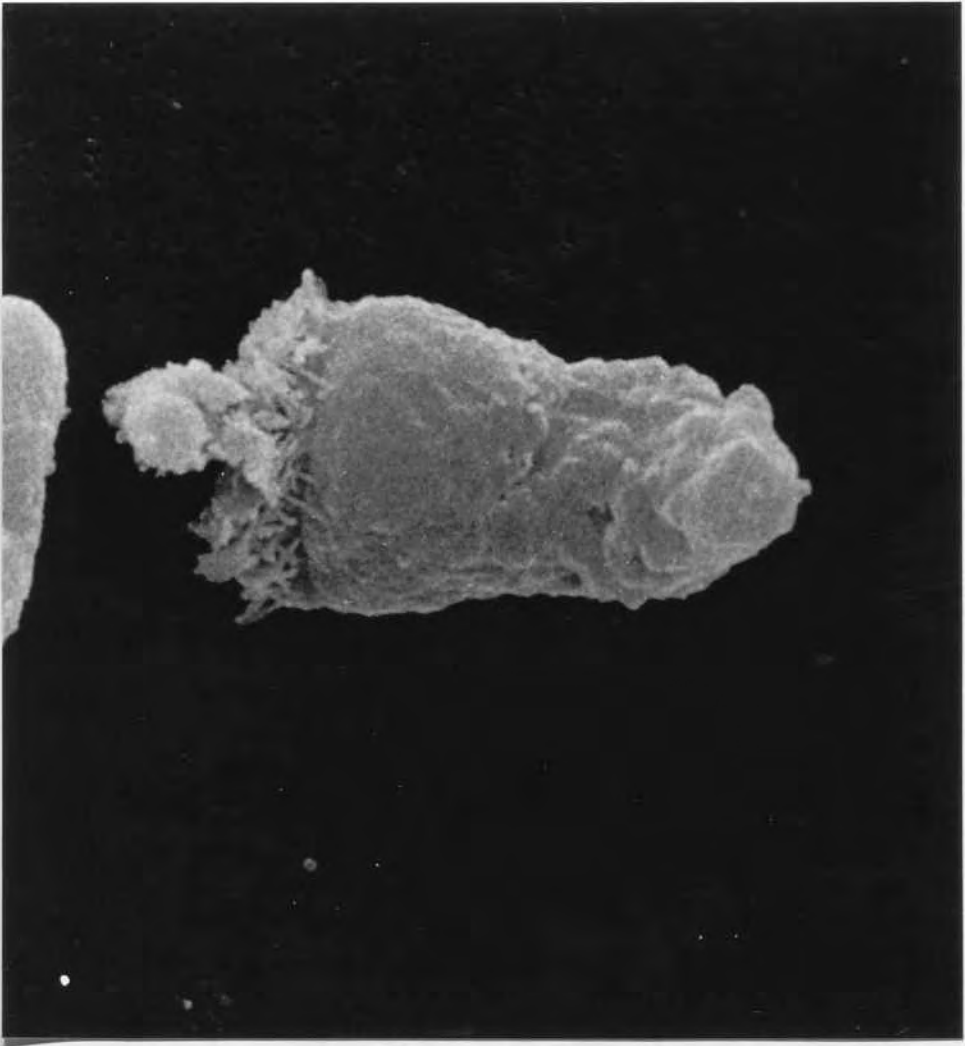
L'observació de la suspensió cel·lular al MER, revela l'existència, en la mateixa, d'enteròcits aïllats, làmines d'enteròcits, alguna cèl·lula caliciforme i alguns eritròcits. En cap cas s'hi han observat bacteris. A les fotografies 19 i 20 es mostra un enteròcit del cec proximal i del jejú respectivament. En ambdós casos, les cèl·lules mantenen la forma cilíndrica, si bé també se n'han observat algunes d'esfèriques. A més, a la vora "en raspall", s'observa com les microvellositats romanen intactes.

Pel que fa a l'observació de la suspensió cel·lular al MET, s'ha realitzat amb cèl·lules acabades d'aïllar i amb cèl·lules incubades durant 60 min en presència de 3-OMG 0,1 mmol/l. Tal com s'observa a la fotografia 21, corresponent al cec proximal, les cèl·lules sense incubar conserven la forma cilíndrica, si bé se n'han trobat també d'esfèriques (fotografia 22, corresponent al jejú).

Fotografia 18.- FRAGMENTS DEL JEJÚ I DEL CEC PROXIMAL INCUBATS EN EL MEDI D'AÏLLAMENT AMB CITRAT TRISÒDIC I OBSERVATS AL MER.

- a: cec proximal sotmès a 5 min de tractament amb el medi d'aïllament; E, epiteli desprenent-se de la vellositat i Lp, làmina pròpia. X 118.
- b: cec proximal (15 min); V, vellositat pelada i la fletxa indica una làmina d'epiteli. X 109.
- c: cec proximal (15 min), la fletxa indica un enteròcit. X 592.
- d: cec proximal (30 min); V, vellositat pelada. X 54.
- e: jejú (30 min); V, vellositat pelada. X 115.
- f: jejú (30 min), làmina d'epiteli; E, enteròcit i VR, vora "en raspall". X 2.962.

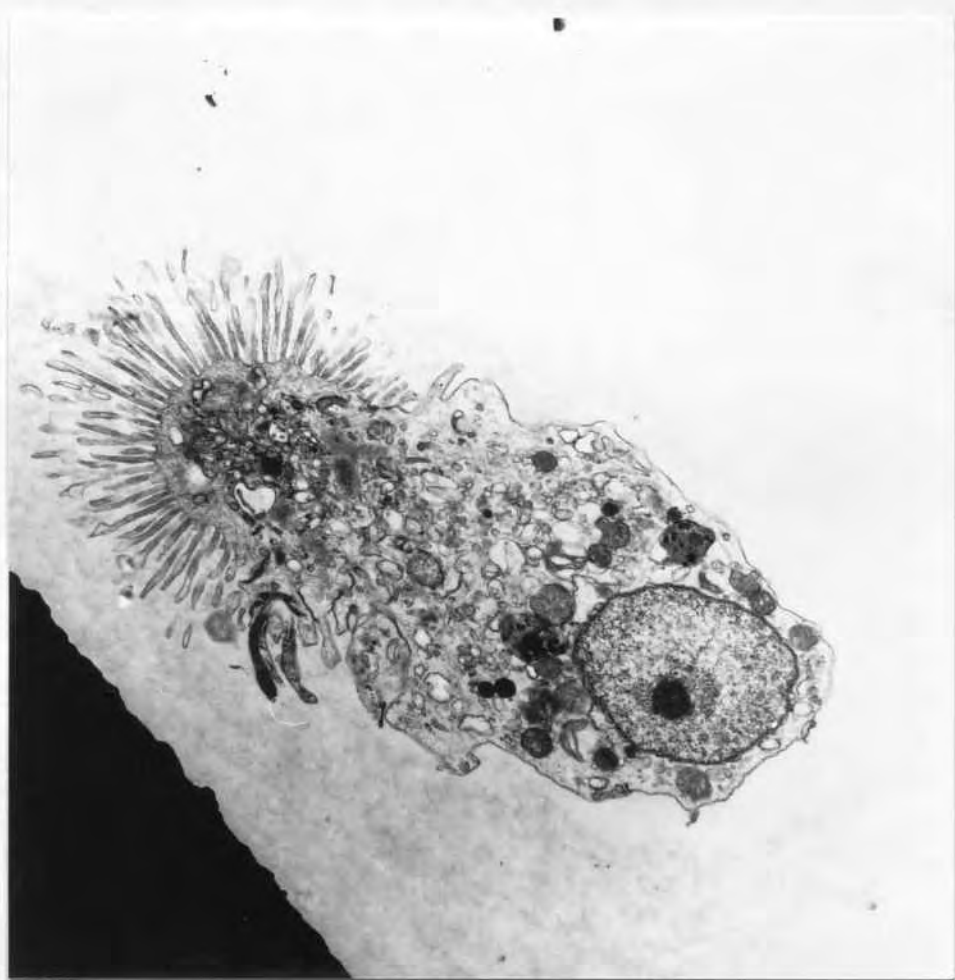




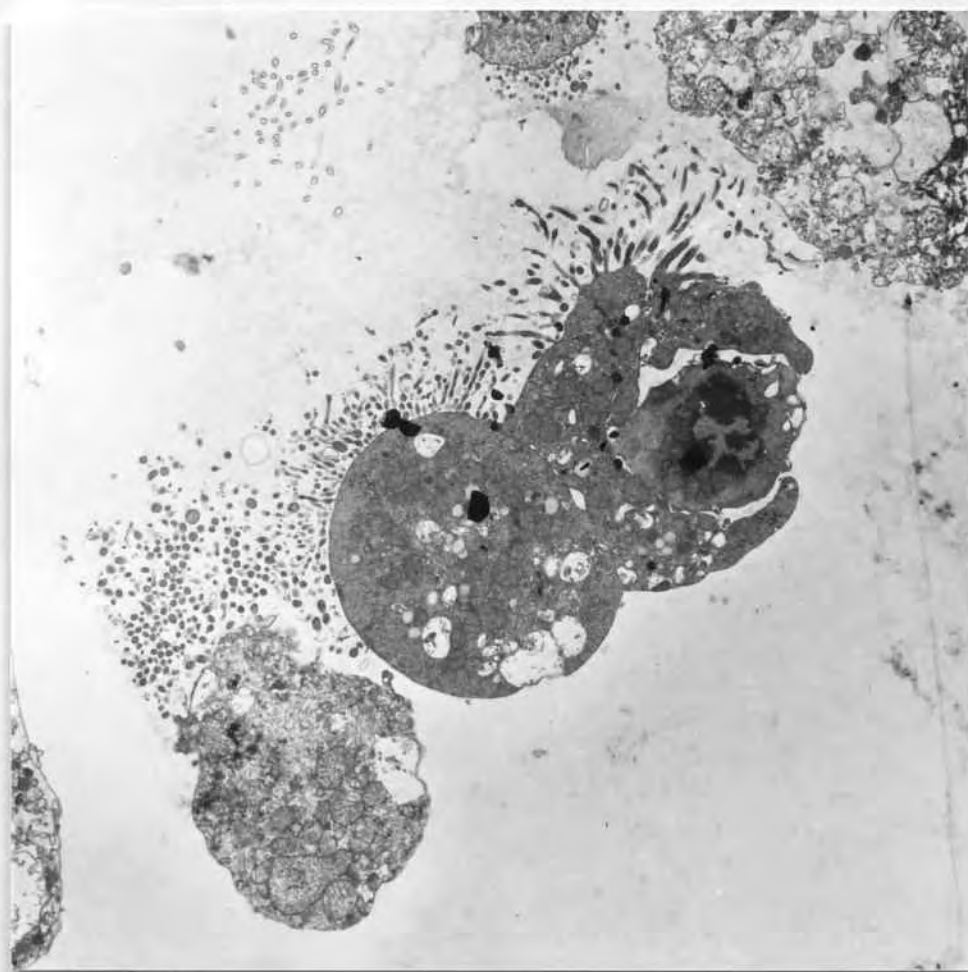
Fotografia 19.- ENTERÒCIT PROCEDENT DEL CEC PROXIMAL, OBSERVAT AL MER. X 6.180.



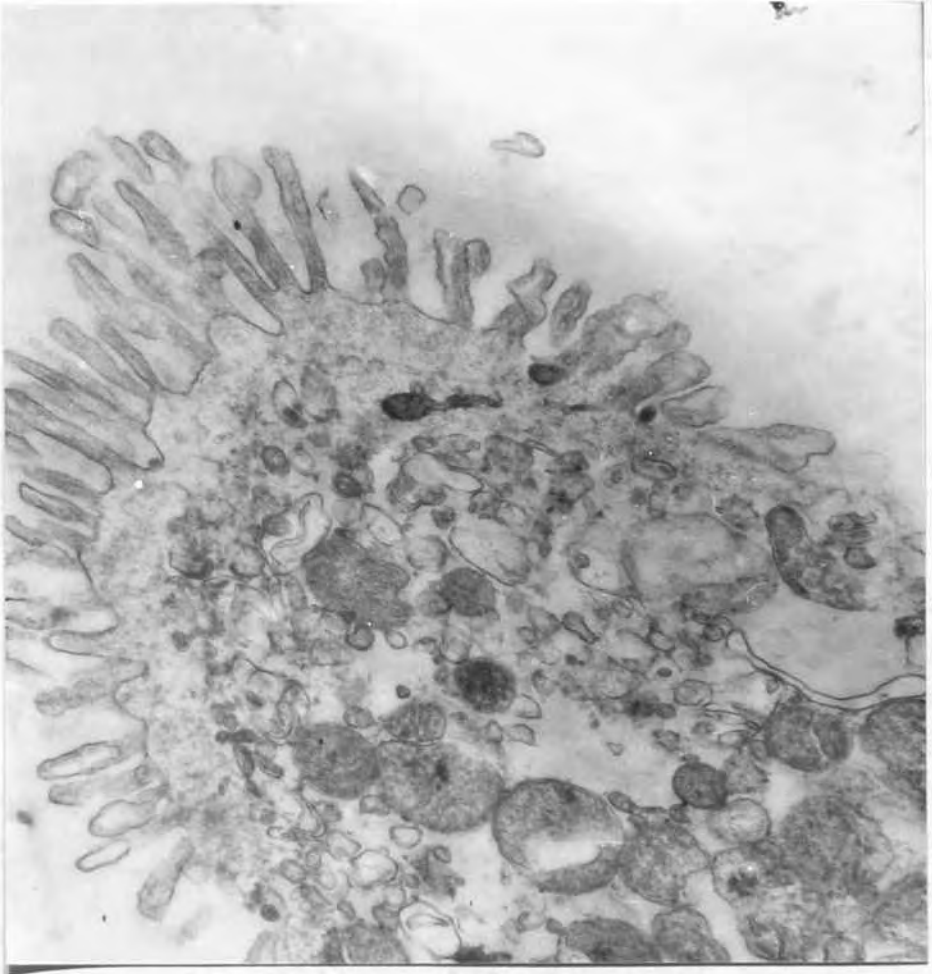
Fotografia 20.- ENTEROCIT DEL JEJÚ OBSERVAT AL MER. X 4.944.



Fotografia 21.- CEL.LULA AILLADA DEL CEC PROXIMAL OBSERVA-
DA AL MET. X 1.000.



Fotografia 22.- CEL.LULES DEL JEJÚ OBSERVADES AL MET.
X 6.067.



Fotografia 23.- DETALL D'UNA CÈL.LULA DEL CEC PROXIMAL INCUBADA DURANT 60 min EN PRESENCIA DE 3-OMG 0,1 mmol/l. MET, X 28.167.

La ultraestructura de les cèl.lules roman bastant intacta. Tal com s'observa a la fotografia 21, el nucli es troba en posició basal i el seu aspecte és l'habitual, els mitocondris estan una mica inflats i prop de la vora "en raspall" s'hi observen alguns vacúols. Pel que fa a les microvellositats, algunes apareixen fragmentades, si bé l'aspecte és també l'habitual.

Pel que fa a les cèl.lules incubades, la majoria ja han perdut la forma cilíndrica. A la fotografia 23 es mostra un detall de la zona pròxima a la vora "en raspall" d'una cèl.lula del cec proximal. La imatge obtinguda en el jejú és molt semblant, i s'observa com les microvellositats, si bé algunes apareixen fragmentades, romanen en la seva majoria bastant intactes.

3.4.4. CARACTERISTIQUES DE L'ACUMULACIÓ DE SUCRES EN ELS ENTEROCITS CECALS

3.4.4.1. Estudi regional sobre la capacitat d'acumulació d' α -MG en el cec

El cec de pollastre presenta tres zones morfològicament molt ben diferenciades: la proximal, molt semblant al jejú i la medial i distal que en són totalment diferents, puix que no presenten vertaderes vellositats i les microvellositats són molt curtes (vegeu apartat 2.2.2.3.). Donat que aquestes diferències estructurals podrien fàcilment estar relacionades amb la capacitat per acumular nonosacàrids, s'ha realitzat un estudi en cèl.lules procedents de les tres regions i del jejú sobre el transport d' α -MG 0,1 mmol/l. S'han dut a terme experiments a temps llargs (60 min d'incubació) sobre l'acumulació d'aquest monosacàrid i experiments a temps curts de fluxos inicials d'entrada, per tal d'obtenir-ne els paràmetres cinètics.

3.4.4.1.1. Acumulació d' α -MG en cèl.lules del cec proximal, medial i distal

La importància de considerar per separat les tres regions cecals es fa palesa en estudiar-hi l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l al llarg de 60 min d'incubació. Aquest estudi regional s'ha dut a terme, també, en pollastres adults (16 setmanes d'edat) per tal d'observar l'efecte de l'edat sobre la capacitat per acumular monosacàrids.

Els resultats obtinguts, en pollastres de 4 a 7 setmanes d'edat, es mostren a la figura 27. Als 60 min d'incubació, l'acumulació d' α -MG en el cec proximal ($29,47 \pm 2,12$ nmol α -MG/mg proteïna, $m \pm ES$, $n = 13$) no difereix significativament de l'obtinguda en el jejú ($25,98 \pm 1,75$ nmol α -MG/mg proteïna, $n = 10$). Les dades del cec medial ($3,93 \pm 0,36$ nmol α -MG/mg proteïna, $n = 5$) són molt inferiors a les dels dos segments anteriors, però, a la vegada, són significativament superiors a les del cec distal ($0,60 \pm 0,09$ nmol α -MG/mg proteïna, $n = 5$). En aquest darrer segment, no hi ha diferència estadísticament significativa en l'acumulació d' α -MG respecte a l'obtinguda en presència de florricina 0,2 mmol/l.

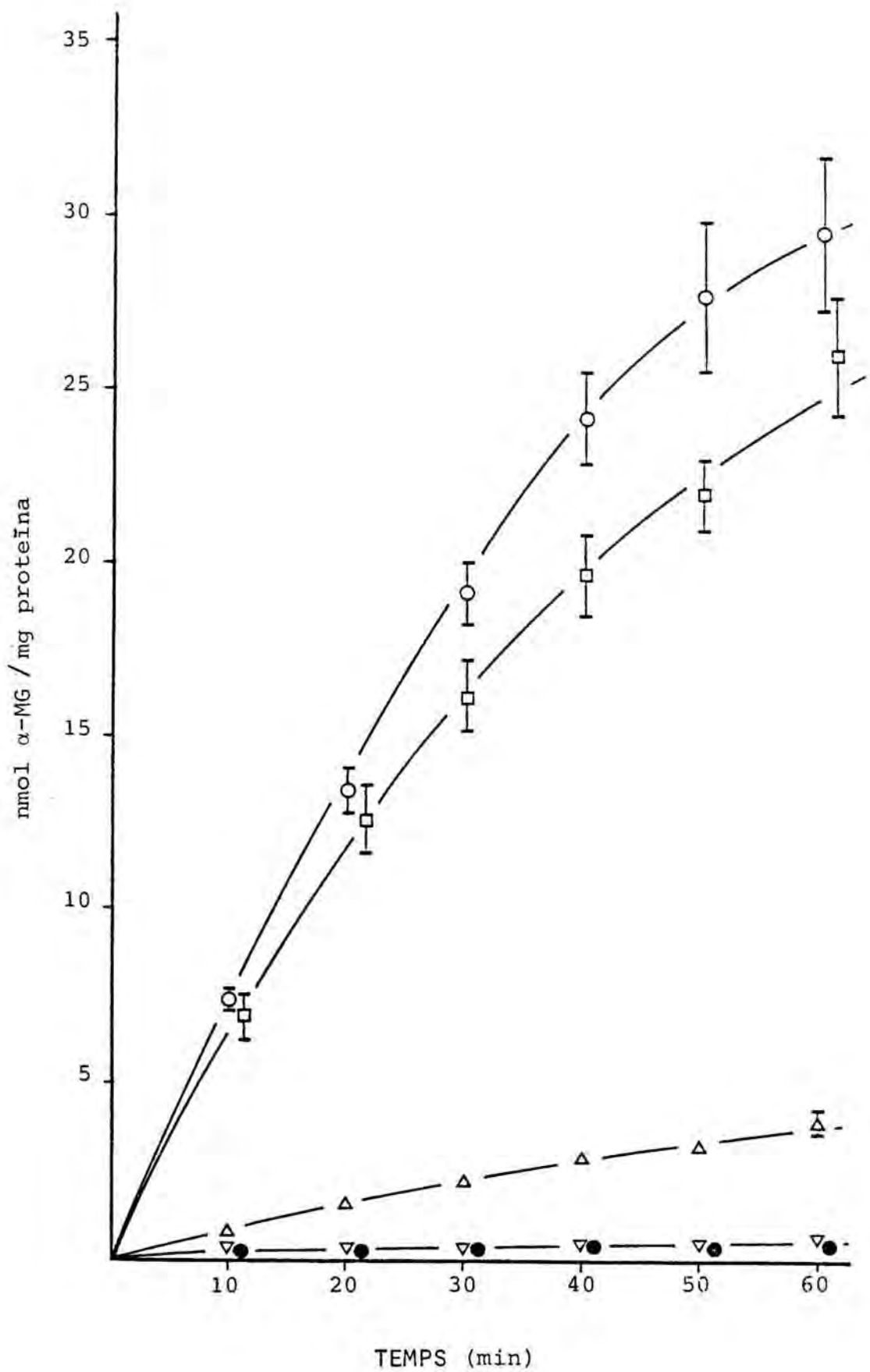
L'acumulació d' α -MG en presència de florricina 0,2 mmol/l no difereix significativament en els quatre segments estudiats, per la qual cosa, a la figura 27, es mostren junts a la mateixa corba.

Així l'ordre d'acumulació d' α -MG, als 60 min d'incubació en els quatre segments intestinals, és el següent: cec proximal = jejú > cec medial > cec distal = cèl.lules tractades amb florricina.

Pel que fa a l'estudi regional en els animals adults, la capacitat de transport de l'intestí prim per a no electròlits en les aus, presenta un màxim dins la primera setmana d'edat,

Figura 27.- ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l ($m \pm ES$, $n =$ nombre de dades) EN ANIMALS DE 4 A 7 SETMANES, EN CÈL.LULES DEL JEJÚ (\square , $n = 10$), CEC PROXIMAL (\circ , $n = 11$), CEC MEDIAL (Δ , $n = 5$) I CEC DISTAL (∇ , $n = 5$). Els resultats d'acumulació d' α -MG en presència de florricina 0,2 mmol/l en les quatre regions estudiades no difereix estadísticament, per la qual cosa estan representats junts en una sola corba (\bullet , $n = 19$).

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



que per alguns autors (BOGNER, 1961; BOGNER i HAINES, 1964 i LERNER *et al.*, 1976) es manté fins a les 7-8 setmanes, mentre que per d'altres (RAHEJA *et al.*, 1977; SHEHATA *et al.*, 1981 i PLANAS *et al.*, 1982) es produeix, a partir d'aquesta primera setmana d'edat, una pèrdua en la capacitat d'absorció que s'estabilitza a l'animal adult. En el nostre cas, l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en el jejú i en el cec proximal no s'ha vist afectada per l'edat de l'animal entre les 4 i les 7 setmanes. Per això, s'ha realitzat un estudi regional sobre la capacitat d'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en el pollastre adult, de 16 setmanes d'edat. D'aquest estudi se n'ha exclòs el cec distal, ja que en els animals de 4 a 7 setmanes ja no presenta capacitat per transportar monosacàrids per transport actiu.

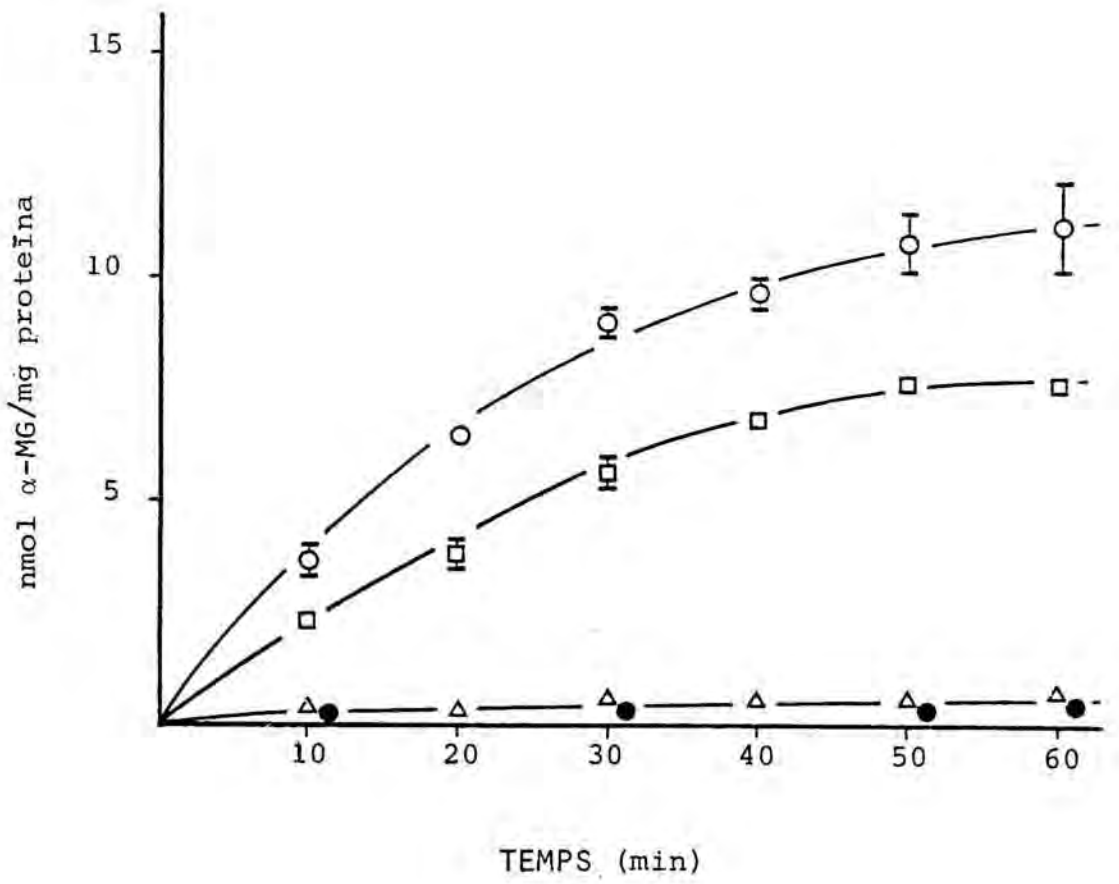
Els resultats es mostren a la figura 28. L'acumulació d' α -MG en les cèl.lules del jejú és tan sols un 29 % de la present als animals de 4 a 7 setmanes. Pel que fa al cec proximal i al cec medial l'acumulació ha quedat reduïda a un 38% i a un 19 %, respectivament (vegeu taula V).

En aquest cas, tampoc hi ha diferència estadísticament significativa a l'acumulació d' α -MG en presència de florricina 0,2 mmol/l, per la qual cosa a la figura 28 es mostren a la mateixa corba. Tampoc hi ha diferència estadísticament significativa entre la mitjana de l'acumulació en presència de florricina dels quatre segments en els pollastres de 4 a 7 setmanes i en els adults.

Així doncs, l'ordre d'acumulació en els pollastres de 16 setmanes d'edat seria: cec proximal > jejú > cec medial = cèl.lules de tots els segments estudiats tractades amb florricina.

Figura 28.- ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l ($m \pm ES$, $n =$ nombre de dades) EN ANIMALS DE 16 SETMANES D'EDAT, EN CÈL.LULES DEL JEJÚ (\square , $n = 3$), CEC PROXIMAL (\circ , $n = 4$) I CEC MEDIAL (Δ , $n = 3$). Els resultats d'acumulació d' α -MG en presència de florricina 0,2 mmol/l no difereixen significativament en les tres regions estudiades per la qual cosa es mostren junts a la mateixa corba (\bullet , $n = 6$).

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



TAULA V .- ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l, ALS 60 min D'INCUBACIÓ, I EFECTE DE LA FLORRICINA 0,2 mmol/l EN CÈL.LULES DEL JEJÚ, CEC PROXIMAL I CEC MEDIAL, EN ANIMALS DE 4-7 SETMANES I 16 SETMANES D'EDAT

SEGMENT INTESTINAL	EDAT DELS ANIMALS	
	4-7 SETMANES	16 SETMANES
CONTROL JEJÚ	25,98 ± 1,75 (10)	7,64 ± 0,04 (3)
JEJÚ + FLORRICINA	0,66 ± 0,06 (6)	1,30 ± 0,14 (2)
CEC PROXIMAL	29,47 ± 2,12 (13)	11,11 ± 1,08 (4)
CEC PROXIMAL + FLORRICINA	0,52 ± 0,06 (8)	0,66 ± 0,26 (2)
CEC MEDIAL	3,93 ± 0,36 (5)	0,76 ± 0,19 (3)
CEC MEDIAL + FLORRICINA	0,28 ± 0,02 (3)	0,77 ± 0,13 (2)

Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard, essent el número entre parèntesis el nombre de dades. La comparació estadística de les mitjanes es troba en el text.

3.4.4.1.2. Cinètica del transport d' α -MG

Hom ha realitzat un estudi cinètic sobre el transport d' α -MG en les cèl.lules aïllades del jejú i de les tres zones del cec. S'han dut a terme experiments de fluxos inicials (20, 40 i 60 s d'incubació) en presència de diferents concentracions de monosacàrid. En tots els casos estudiats, els fluxos són lineals almenys durant els primers 60 s d'incubació, per la qual cosa les constants cinètiques s'han calculat a partir dels resultats obtinguts en aquest interval de temps.

A les figures 29, 30, 31 i 32, corresponent cadascuna a un segment intestinal, es representa la velocitat d'entrada d' α -MG enfornt de concentracions creixents de monosacàrid i i l'efecte de la florricina 0,2 mmol/l. Els fluxos obtinguts en presència d'aquest inhibidor representen l'entrada d' α -MG en les cèl.lules per difusió simple. Restant, doncs, del flux total, l'obtingut en presència de florricina s'obte el flux d'entrada d' α -MG per transport mitjançat concentratiu, del qual es calculen les constants cinètiques.

En tots els segments estudiats, excepte en el cec distal, existeix un mecanisme de transport actiu saturable. En aquest segment cecal no hi ha diferència estadísticament significativa entre el flux total i l'obtingut en presència de florricina.

Les constants cinètiques (K_m i V_m) calculades pel mètode de WILKINSON (1961) es mostren a la taula VI, on també hi és present la constant de difusió (D). Aquesta darrera és el pendent de la recta corresponent a la difusió simple.

La K_m del cec proximal és la més baixa de tots els segments estudiats ($1,02 \pm 0,04$ mmol/l, $n = 3$, mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades), essent del mateix ordre que la del jejú ($1,58 \pm 0,40$ mmol/l, $n = 4$). En canvi, la K_m obtinguda en el cec medial ($24,80 \pm 3,50$ mmol/l, $n = 3$)

Figura 29.- FLUXOS D' α -MG EN EL JEJÚ, ALS 60 s D'INCUBACIÓ, EN PRESENCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE MONOSACÀRID (0,25; 0,50; 1,00; 2,00 i 5,00 mmol/l). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 4 dades. Flux total, \square ; difusió simple obtinguda en presència de florricina 0,2 mmol/l \blacksquare i transport mitjançat concentratiu obtingut per diferència entre els dos anteriors, \bullet .

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

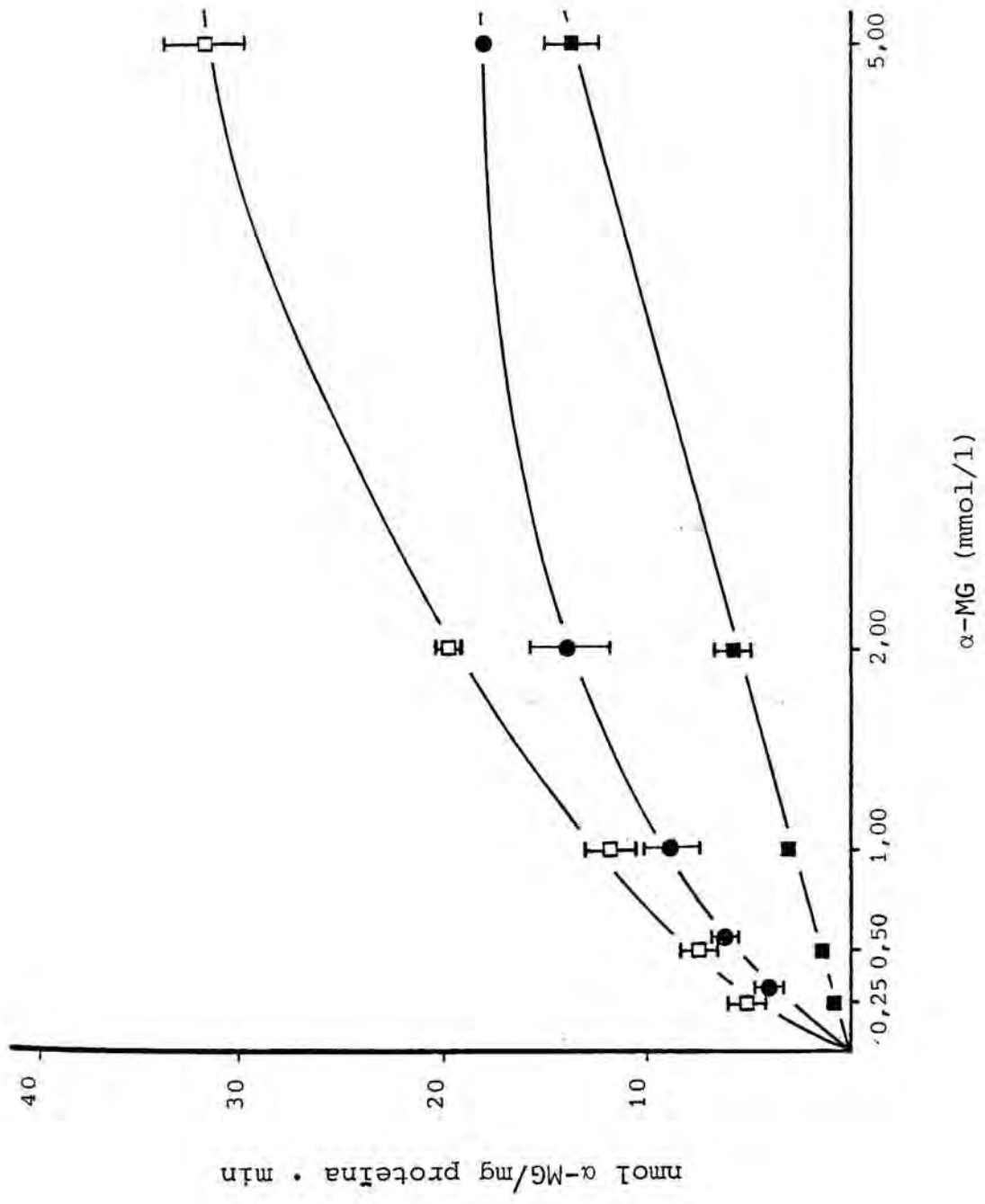


Figura 30.- FLUXOS D' α -MG EN EL CEC PROXIMAL, ALS 60 s D'INCUBACIÓ, EN PRESENCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE MONOSACÀRID (0,25; 0,50; 1,00; 2,00 i 5,00 mmol/l). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 3 dades. Flux total, \circ ; difusió simple obtinguda en presència de florricina 0,2 mmol/l, \bullet i transport mitjançat concentratiu obtingut per diferència entre els dos anteriors, \blacksquare .

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

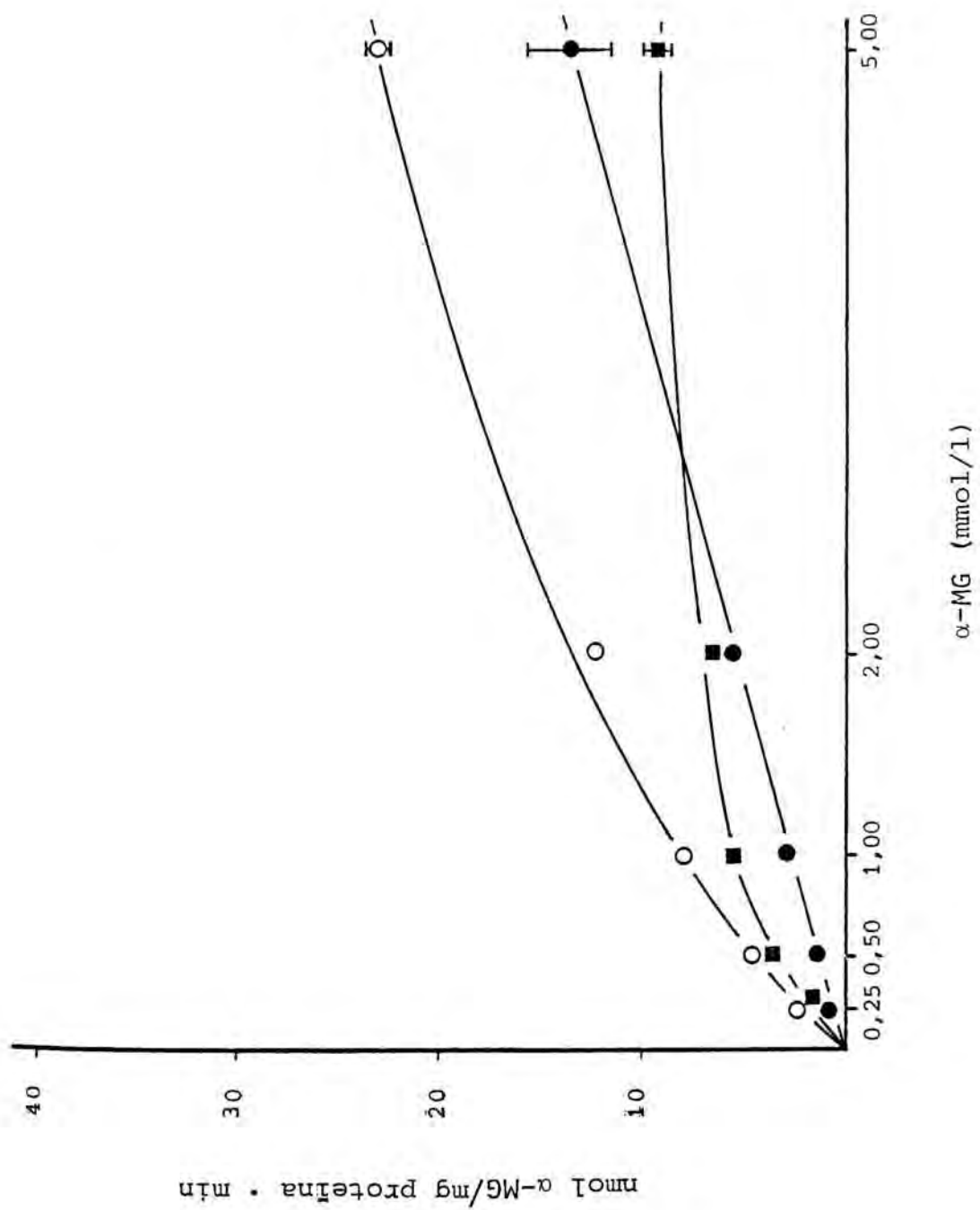


Figura 31.- FLUXOS D' α -MG EN EL CEC MEDIAL, ALS 60 s D'INCUBACIÓ, EN PRESENCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE MONOSACÀRID (1, 2, 5, 10 i 25 mmol/l). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de 3 dades. Flux total, Δ ; difusió simple obtinguda en presència de florricina 0,2 mmol/l, \blacktriangle i transport mitjançat concentratiu obtingut per diferència entre el dos anteriors \bullet .

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

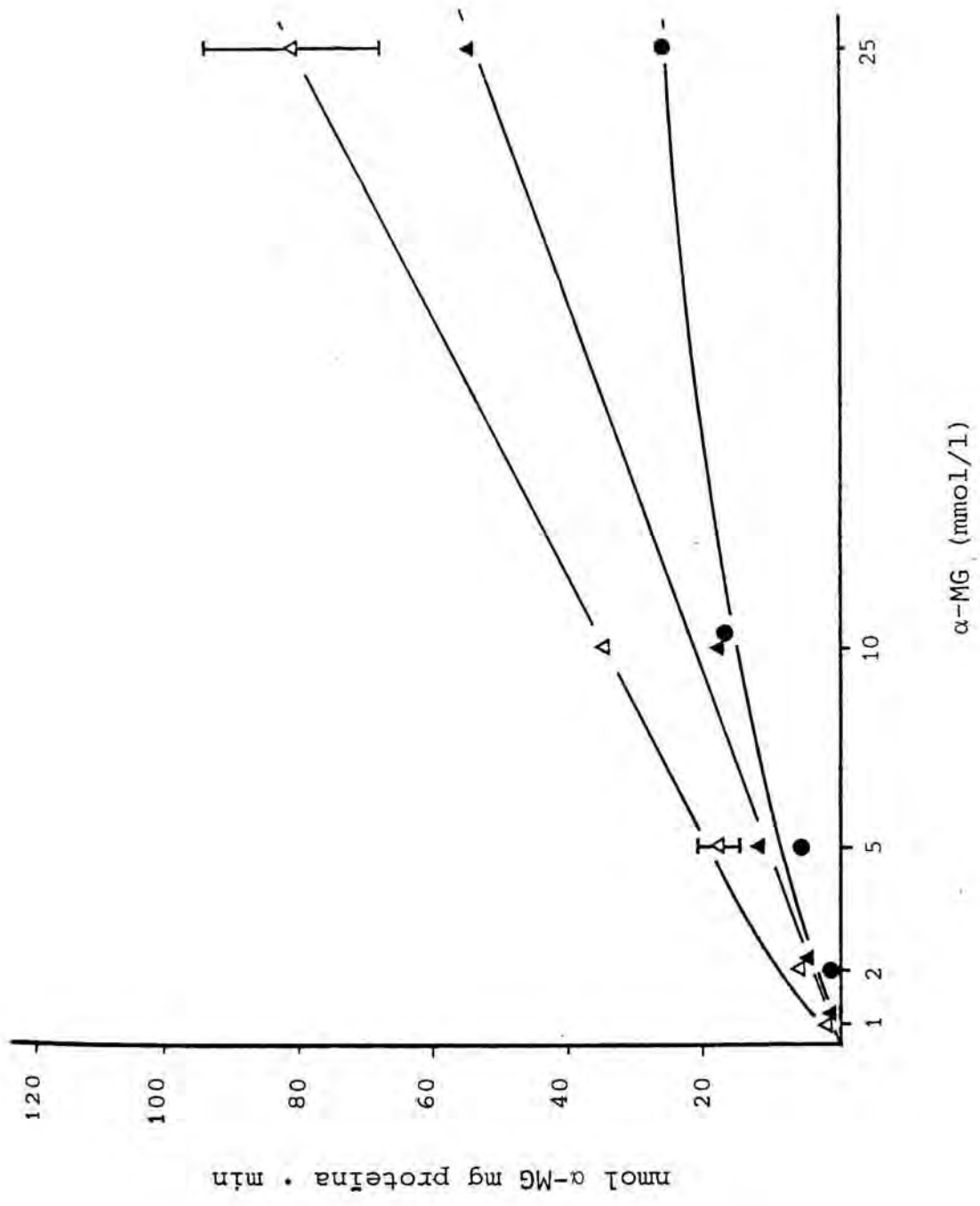
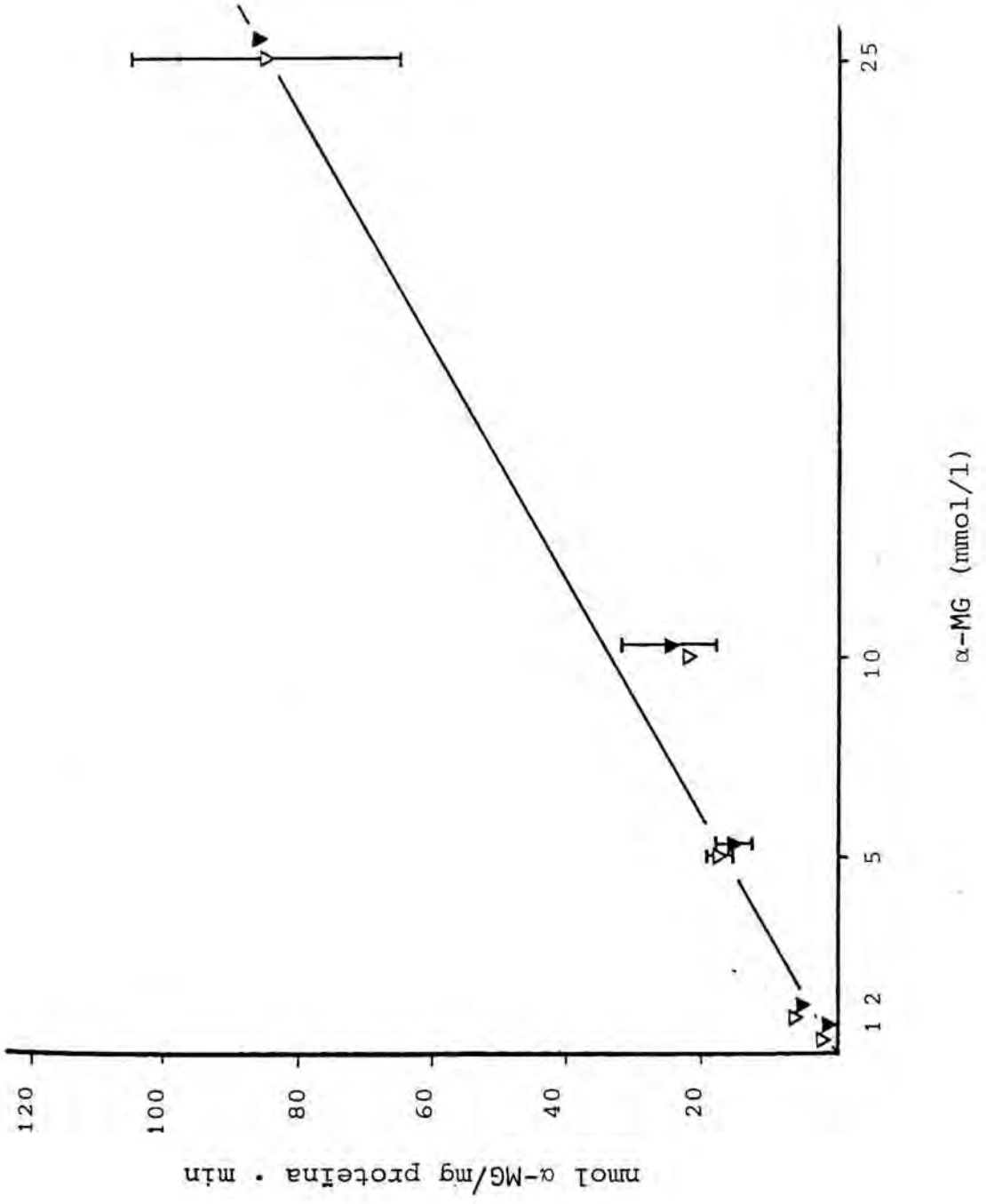


Figura 32.- FLUXOS D' α -MG EN EL CEC DISTAL, ALS 60 s D'INCUBACIÓ, EN PRESENCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE MONOSACÀRID (1, 2, 5, 10 i 25 mmol/l). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, de 2 dades. Flux total, ∇ i difusió simple obtinguda en presència de florricina 0,2 mmol/l, \blacktriangledown .

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



TAULA VI .- CONSTANTS CINÈTIQUES APARENTS DEL FLUX D'EN-
TRADA D' α -MG EN CÈL.LULES DEL JEJÚ, CEC PROXIMAL, CEC
MEDIAL I CEC DISTAL.

SEGMENT INTESTINAL	CONSTANTS		
	Km	Vm	D
JEJÚ	1,58 \pm 0,40 (4)	24,72 \pm 2,27 ^b (4)	2,70 \pm 0,28 (4)
CEC PROXIMAL	1,02 \pm 0,04 (3)	10,74 \pm 1,31 ^b (3)	2,81 \pm 0,26 (3)
CEC MEDIAL	24,80 \pm 3,50 ^a (3)	56,66 \pm 6,56 ^b (3)	2,27 \pm 0,24 (3)
CEC DISTAL	-	-	3,01 \pm 0,22 (2)

Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent el número entre parèntesis el nombre de dades. Les unitats per a cada constant són: Km, mmol/l; Vm, nmol/mg proteïna \cdot min i D, ml/mg proteïna \cdot min \cdot 10³. a: p < 0,05, per a la Km i b: p < 0,05, per a la Vm.

és significativament major que les anteriors.

El cec medial presenta la Vm més gran ($56,66 \pm 6,56$ nmol/mg proteïna \cdot min, $n = 3$), essent significativament superior a la del jejú ($24,72 \pm 2,27$ nmol/mg proteïna \cdot min, $n = 4$) la qual, a la vegada, és significativament més gran que la del cec proximal ($10,74 \pm 1,31$ nmol/mg proteïna \cdot min, $n = 3$).

Pel que fa a les constants de difusió, no difereixen significativament en els quatre segments estudiats.

3.4.4.2. Característiques de l'acumulació de monosacàrids en el cec proximal

Els enteròcits del cec proximal presenten un sistema de transport mitjançat concentratiu per l' α -MG amb unes característiques cinètiques i una capacitat d'acumulació molt semblants a les del jejú i totalment diferents a les de la resta del cec (vegeu apartat 3.4.4.1.). Aquesta va ésser la raó per la qual es va començar un estudi per tal de conèixer, amb més profunditat, el transport actiu de la membrana luminal, la difusió facilitada de la membrana basolateral i la difusió simple per monosacàrids en cèl.lules procedents del cec proximal.

3.4.4.2.1. Capacitat d'acumulació de monosacàrids

De primer, en les cèl.lules del cec proximal es va estudiar la capacitat per acumular monosacàrids al llarg del temps d'incubació i l'efecte que sobre la captació de sucre hi poden tenir tot un seguit d'inhibidors, tant de l'entrada luminal de sucres com de la basolateral.

3.4.4.2.1.1. Acumulació d' α -MG: efecte de la florricina i de diferents concentracions externes de l'ió sodi

Des que RIKLIS I QUASTEL (1958) descobriren que l'absorció intestinal de monosacàrids era dependent de la presència de l'ió sodi en el medi d'incubació, s'han realitzat nombrosos esforços per tal de conèixer el paper que aquest catió exerceix en el procés. En l'actualitat ja es coneixen moltes de les propietats del mecanisme de cotransport de monosacàrids i de l'ió sodi, existent a la membrana luminal de l'enteròcit, en moltes espècies animals i en la majoria dels segments intestinals.

Així doncs, s'ha realitzat un estudi sobre l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en presència de diferents concentracions de l'ió sodi en el medi d'incubació, en cèl·lules del cec proximal, per tal d'esbrinar si el mecanisme de transport mitjanat concentratiu de monosacàrids present en aquest segment intestinal és dependent, també, de la presència d'aquest catió. S'han emprat concentracions de NaCl en el medi d'incubació de 80,50, 20 i 0 mmol/l, mantenint-se l'osmolaritat, variant la concentració de manitol.

Els resultats del cec proximal s'han comparat amb els obtinguts en el jejú, segment en el qual KIMMICH (1970a) va descriure en profunditat la interacció entre monosacàrids i Na^+ . També s'ha determinat l'efecte de la florricina 0,2 mmol/l quan la concentració de l'ió sodi és de 80 mmol/l, per tal de comprovar si en absència d'aquest catió la inhibició del transport mitjanat concentratiu és la mateixa que l'obtinguda en presència de florricina, inhibidor competitiu d'aquest mecanisme.

Els resultats obtinguts es mostren a les figures 33 i 34, en les que s'observa que tant en el cec proximal com en el jejú, l'acumulació d' α -MG és dependent de la concentració

de NaCl present en el medi d'incubació. Així doncs, paral·lelament a que la concentració de NaCl va decreixent també ho fa la quantitat de sucre captada pels enteròcits.

En el cec proximal, quan la concentració de NaCl és de 50 mmol/l, l'acumulació d' α -MG, als 60 min d'incubació, és d'un 62 % respecte a l'obtinguda en presència de NaCl 80 mmol/l. A 20 mmol/l i 0 mmol/l de NaCl l'acumulació és respectivament d'un 33 % i d'un 8 %. En el jejú, els resultats són del mateix ordre ja que l'acumulació obtinguda en presència de les diferents concentracions externes de NaCl, és respectivament, d'un 74 %, 25 % i 13 % de l'obtinguda a 80 mmol/l de NaCl.

Pel que fa l'efecte de la florricina 0,2 mmol/l, quan el NaCl present és de 80 mmol/l, tant en el cec proximal com en el jejú, l'acumulació d' α -MG, als 60 min d'incubació, és inferior (2 % i 3 %, respectivament) a l'obtinguda en absència de Na^+ , essent la diferència en ambdós casos estadísticament significativa, tal com es mostra a la taula VII.

3.4.4.2.1.2. Acumulació d' α -MG: competició amb altres monosacàrids

Una de les característiques del transport mitjançat concentratiu de la membrana luminal és la competició envers el transportador entre diferents monosacàrids.

Així doncs, s'ha estudiat l'efecte de la presència de 3-OMG 10 mmol/l en el medi d'incubació, sobre l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l, en cèl·lules aïllades del cec proximal i del jejú. L'osmolaritat del medi 3-OMG 10 mmol/l s'ha mantingut variant la concentració de manitol.

La 3-OMG s'ha afegit als 0 min i 25 min d'iniciada la incubació. Els resultats s'han comparat amb els obtinguts

Figura 33.- EFECTE DE LA FLORRICINÀ 0,2 mmol/l I DE DIFERENTS CONCENTRACIONS EXTERNES DE L'IO SODI SOBRE L'ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l, EN CÈL·LULES DEL CEC PROXIMAL. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

- 80 mmol/l NaCl, n = 3
- 50 mmol/l NaCl, n = 3
- △ 20 mmol/l NaCl, n = 3
- ▽ 0 mmol/l NaCl, n = 3
- 80 mmol/l NaCl i florricina 0,2 mmol/l, n = 11.

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

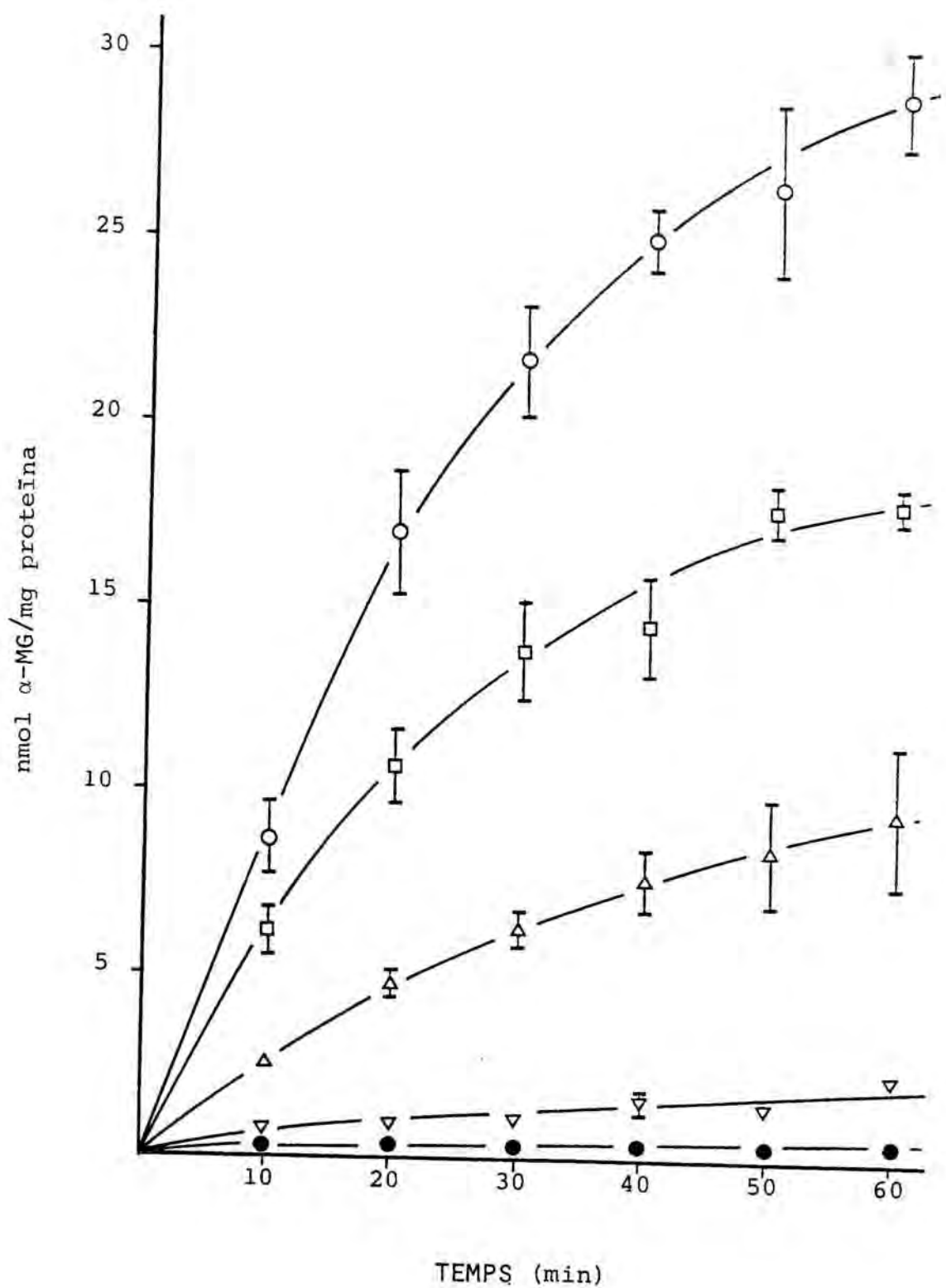
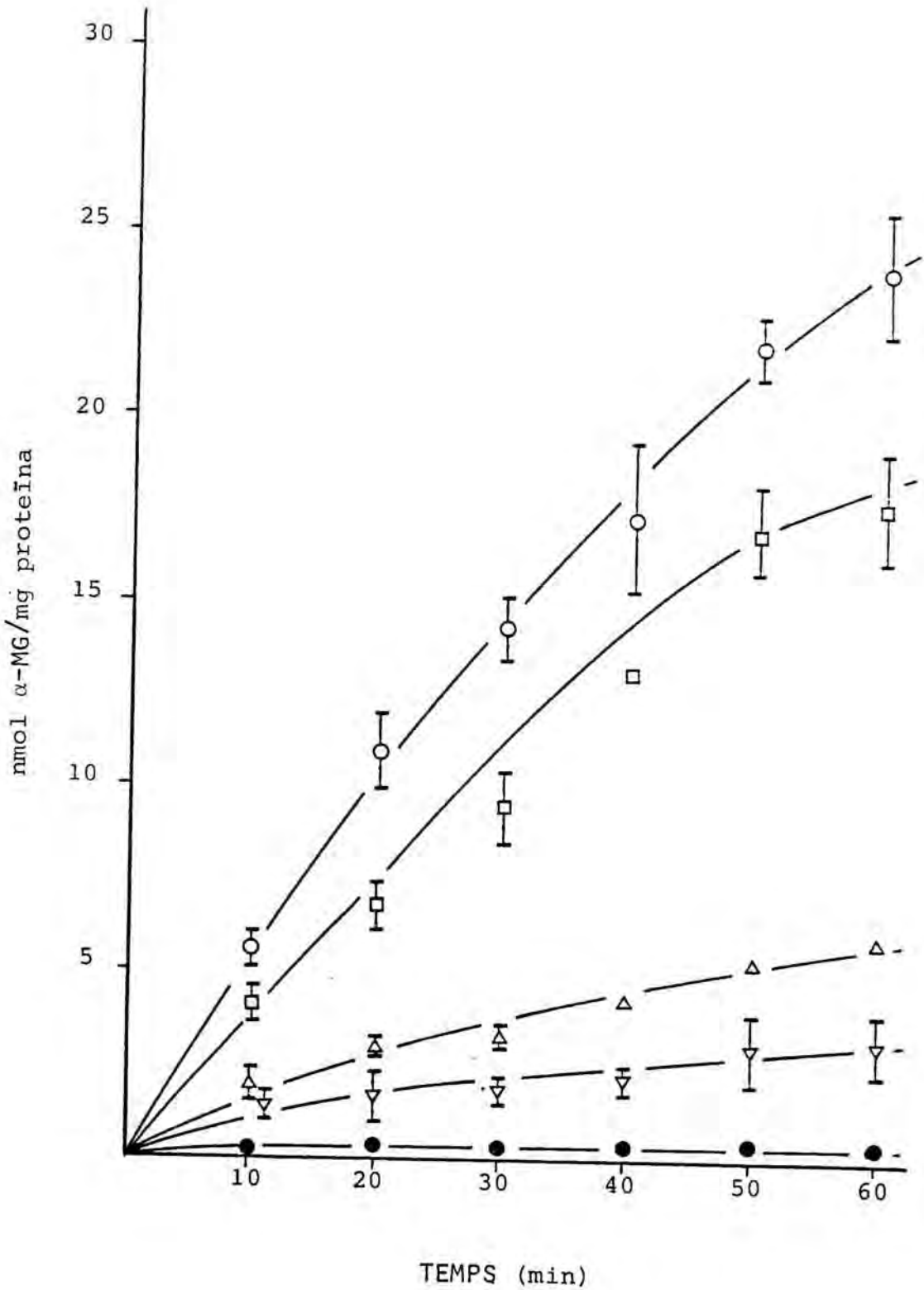


Figura 34.- EFECTE DE LA FLORRICINA 0,2 mmol/l I DE DIFERENTS CONCENTRACIONS EXTERNES DE L'IO SODI SOBRE L'ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l EN CÈL.LULES DEL JEJÚ. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

- 80 mmol/l NaCl, n = 3
- 50 mmol/l NaCl, n = 3
- △ 20 mmol/l NaCl, n = 3
- ▽ 0 mmol/l NaCl, n = 3
- 80 mmol/l NaCl i florricina 0,2 mmol/l, n = 7.

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



TAULA VII .- EFECTE DE LA FLORRICINA 0,2 mmol/l I DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE NaCl SOBRE L'ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l ALS 60 min D'INCUBACIÓ, EN CÈL·LULES DEL CEC PROXIMAL I DEL JEJÚ

NaCl PRESENT EN EL MEDI D'INCUBACIÓ	SEGMENT INTESTINAL	
	CEC PROXIMAL	JEJÚ
80 mmol/l	28,80 \pm 1,30 (3)	24,06 \pm 1,74 (3)
50 mmol/l	17,80 \pm 0,42 (3)	14,80 \pm 3,01 (3)
20 mmol/l	9,46 \pm 1,84 (3)	5,97 \pm 0,01 (3)
0 mmol/l	2,40 \pm 0,05 (3)	3,20 \pm 0,85 (3)
80 mmol/l i florricina 0,2mmol/l	0,59 \pm 0,06 (11)	0,69 \pm 0,05 (7)

Els resultats (nmol α -MG/mg proteïna) s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent el número entre parèntesis el nombre de dades.

en presència de florricina 0,2 mmol/l.

Tal com s'observa a les figures 35 i 36, la presència de 3-OMG des de l'inici de la incubació redueix l'acumulació d' α -MG, als 60 min d'incubació, fins a un 13 % en el cec proximal i fins a un 14 % en el jejú, respecte als valors controls. Per altra banda, en afegir 3-OMG als 25 min d'incubació s'observa en ambdós segments intestinals una dràstica reducció en la concentració d' α -MG, que als 60 min d'incubació, s'aproxima als valors obtinguts quan la 3-OMG es troba des del minut zero.

L'acumulació d' α -MG en presència de flòrricina 0,2 mmol/l és significativament diferent a l'obtinguda en presència de 3-OMG 10 mmol/l ja sigui des del minut 25 o des del min 0, tant en el cec proximal com en el jejú.

3.4.4.2.1.3. Acumulació de 3-OMG: efecte del 2,4-dinitrofenol i de l'ouabaïna

El transport mitjançat concentratiu per a monosacàrids de la membrana luminal és un mecanisme de transport actiu secundari, ja que depèn de l'activitat de la bomba de Na^+ i K^+ de la membrana basolateral, la qual a la vegada, requereix de la presència d'ATP per al seu funcionament (vegeu apartat 3.1.1.).

El 2,4-dinitrofenol (DNP) és un agent desacoblant del metabolisme oxidatiu que en minvar la disponibilitat cel·lular d'ATP inhibeix l'activitat de la bomba de Na^+ i K^+ (KIMMICH, 1975).

L'ouabaïna també inhibeix l'activitat d'aquesta proteïna transportadora de cations, però d'una forma més específica ja que s'uneix a la cara externa de la subunitat α de la bomba de Na^+ i K^+ bloquejant el seu funcionament.

Figura 35.- EFECTE DE LA 3-OMG 10 mmol/l SOBRE L'ACUMULACIO D' α -MG 0,1 mmol/l EN CEL.LULES DEL CEC PROXIMAL. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

- O Control, n = 3
- 3-OMG 10 mmol/l afegida als 0 min, n = 3
- 3-OMG 10 mmol/l afegida als 25 min, n = 3
- florricina 0,2 mmol/l, n = 11

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

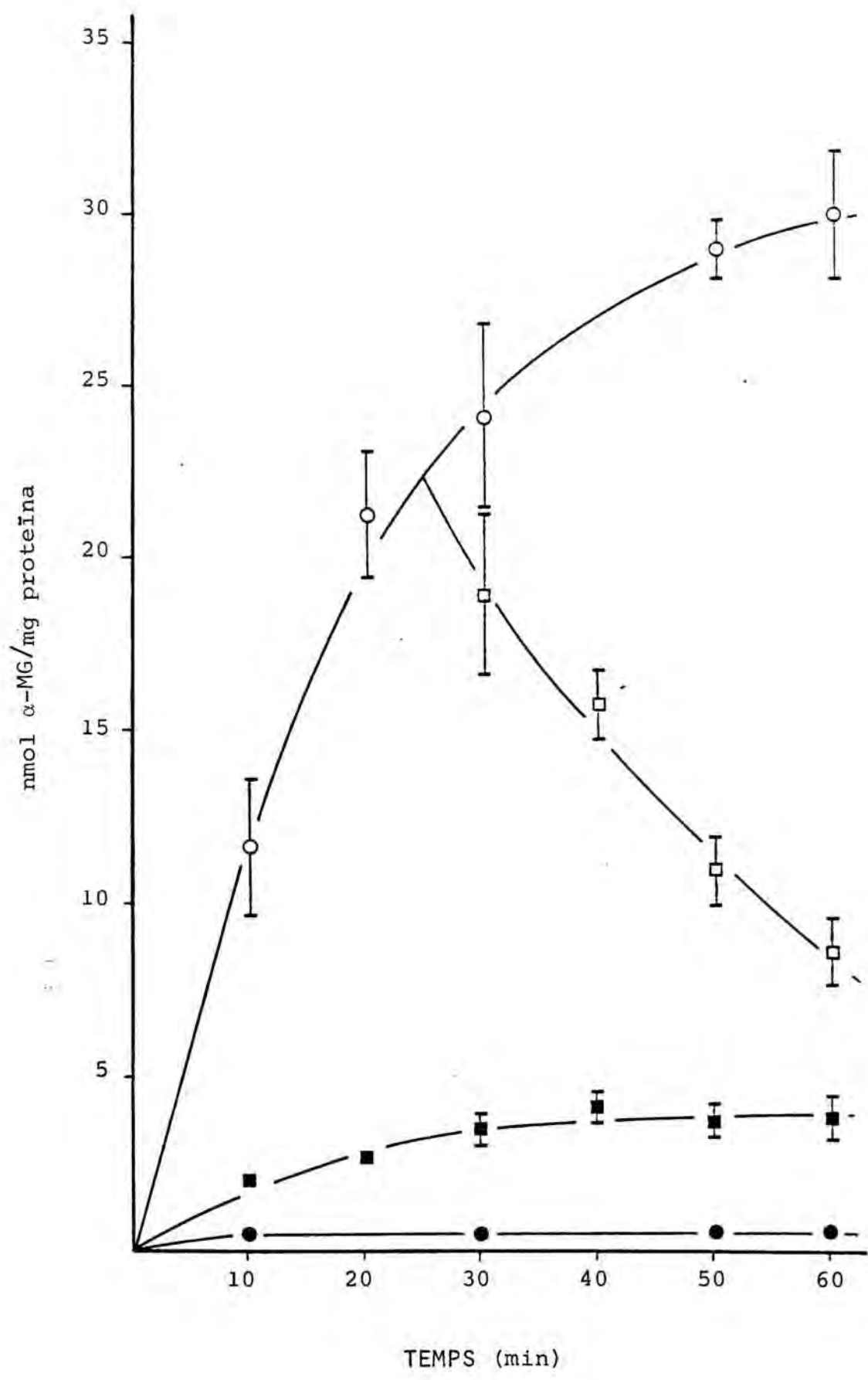


Figura 36.- EFECTE DE LA 3-OMG 10 mmol/l SOBRE L'ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l EN CEL.LULES DEL JEJÚ. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

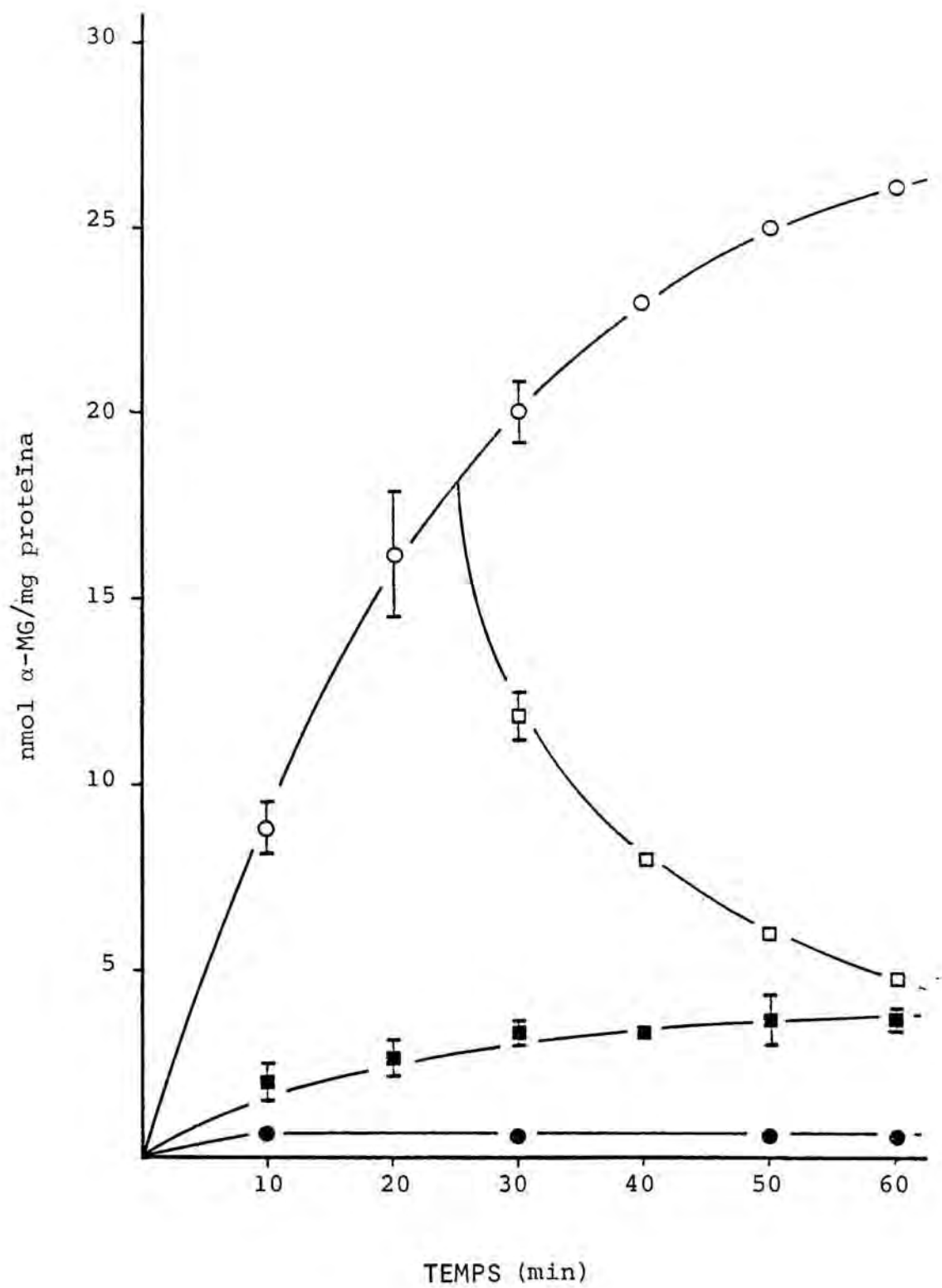
○ Control, n = 3

■ 3-OMG 10 mmol/l afegida als 0 min, n = 3

□ 3-OMG 10 mmol/l afegida als 25 min, n = 3

● florricina 0,2 mmol/l, n = 7

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



El tractament dels enteròcits amb aquests dos agents, provoca la dissipació del gradient de Na^+ i del potencial de membrana, existents a través de la membrana cel.lular, la qual cosa impedeix que les cèl.lules puguin transportar sucres activament (KIMMICH, 1970b).

S'ha estudiat l'efecte del DNP 0,2 mmol/l i de l'ouabaïna 0,25 mmol/l sobre l'acumulació de 3-OMG 0,1 mmol/l en cèl.lules del cec proximal i del jejú.

Els resultats es mostren a les figures 37 i 38 i s'han comparat amb els obtinguts paral.lelament amb florricina. En el cas del cec proximal, als 10 min d'incubació, les cèl.lules són encara capaces d'acumular 3-OMG en contra de gradient de concentració, quan hi són presents el DNP i l'ouabaïna, perdent aquesta capacitat als 50 min. Aquest fenomen no s'observa en el jejú.

3.4.4.2.1.4. Acumulació de 3-OMG: efecte de la teofil.lina i de la citocalasina B

El gradient de concentració de 3-OMG entre el medi d'incubació i l'interior cel.lular, que les cèl.lules intestinals assoleixen a l'estat estacionari, és el resultat de la participació de les tres vies existents a l'enteròcit per al moviment de monosacàrids. La inhibició de la difusió facilitada de la membrana basolateral, que a l'estat estacionari és una via de sortida per a la 3-OMG, dona lloc a un increment del gradient de monosacàrid, mantingut pel transport mitjançat concentratiu de la membrana luminal.

La floretina és un dels agents més potents a l'hora d'inhibir la difusió facilitada, però presenta l'inconvenient d'ésser un inhibidor metabòlic, ja que redueix els nivells intracel.lulars d'ATP i augmenta la concentració intracel.lular de l'ió sodi. Com a conseqüència d'aquests efectes, la

Figura 37.- EFECTE DEL DNP 0,2 mmol/l I DE L'OUABAÏNA 0,25 mmol/l SOBRE L'ACUMULACIÓ DE 3-OMG 0,1 mmol/l EN CÈL.LULES DEL CEC PROXIMAL. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

- Control, n = 3
- DNP 0,2 mmol/l, n = 3
- ▲ ouabaïna 0,25 mmol/l, n = 3
- florricina 0,20 mmol/l, n = 8

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

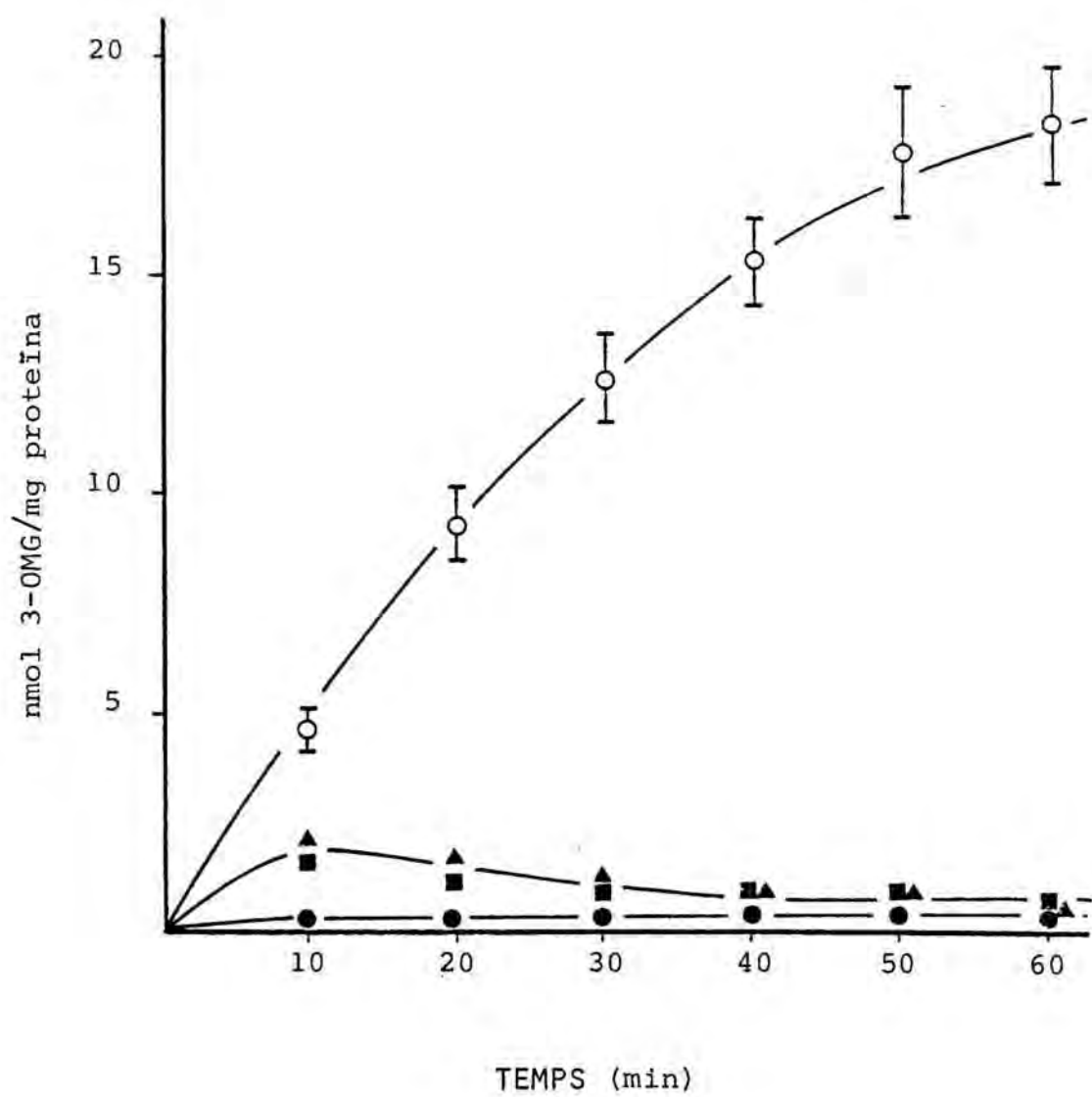
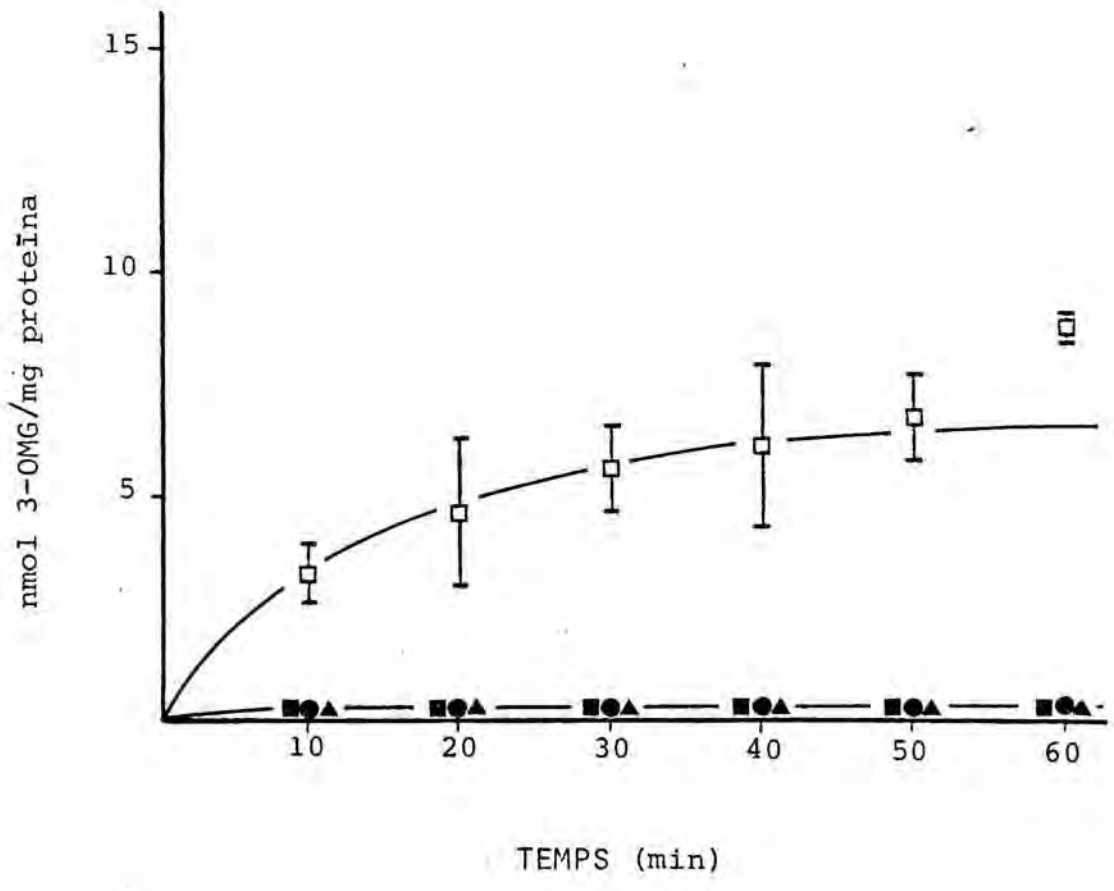


Figura 38.- EFECTE DEL DNP 0,2 mmol/l I DE L'OUABAÏNA 0,25 mmol/l SOBRE L'ACUMULACIÓ DE 3-OMG 0,1 mmol/l EN CÈL.LULES DEL JEJÚ. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

- Control, n = 3
- DNP 0,2 mmol/l, n = 3
- ▲ ouabaïna 0,25 mmol/l, n = 3
- florricina 0,2 mmol/l, n = 7

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



floretina inhibeix a més, el transport mitjançat concentra-
tiu de la membrana luminal (RANGLES i KIMMICH, 1978).

Els altres dos agents més emprats són la teofil.lina i la citocalasina B, que si bé no són tan potents com la floretina a l'hora d'inhibir la difusió facilitada, no presenten els seus inconvenients metabòlics. Per altra banda, encara que la teofil.lina inhibeixi el transport acoblat de NaCl (NELLANS *et al.*, 1973 i 1974) per a RANGLES i KIMMICH (1978) aquest efecte sembla no afectar el transport actiu de la mem-
brana luminal, tal com també observaren HOLMAN i NAFTALIN (1975) i MORETÓ *et al.* (1984). A més la citocalasina B és molt insoluble en aigua i cal dissoldre-la en un solvent orgànic que a la vegada pot tenir algun efecte sobre l'acumulació de monosacàrids. Pel que fa al dissolvent d'entre els més emprats (dimetilformamida, DMF; dimetilsulfòxid, DMS i etano), s'ha triat el que afecta menys l'acumulació de 3-OMG 0,1 mmol/l. Als 60 min d'incubació, el DMS redueix notablement l'acumulació de 3-OMG i la DMF i l'etanol no l'afecte per res. D'entre aquests dos darrers dissolvents, s'ha elegit la DMF ja que la citocalasina B hi és més soluble que no pas en l'etanol. En tots els experiments en que s'utilitza la citocalasina B, en els controls s'ha afegit el mateix volum de DMF que en les condicions de citocalasina B.

A les figures 39 i 40 es mostren els resultats obtinguts sobre l'efecte de la teofil.lina 7,5 mmol/l sobre l'acumulació de 3-OMG 0,1 mmol/l en cèl.lules del cec proximal i del jejú. En el cec proximal, la teofil.lina no afecta d'acumulació de 3-OMG al llarg de 60 min d'incubació. En el jejú l'acumulació de monosacàrid es veu incrementada, assolint-se un màxim als 50 min, on, en presència de teofil.lina, l'acumulació és un 35 % superior al control.

En el cas de la citocalasina B, els resultats es mostren a les figures 41 i 42. En el cec proximal, als 60 min d'incubació, la citocalasina B 0,1 mmol/l incrementa l'acumulació

Figura 39.- EFECTE DE LA TEOFIL.LINA 7,5 mmol/l SOBRE L'ACUMULACIÓ DE 3-OMG 0,1 mmol/l EN CEL.LULES DEL CEC PROXIMAL. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

○ Control, n = 6

● teofil.lina 7,5 mmol/l, n = 6

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

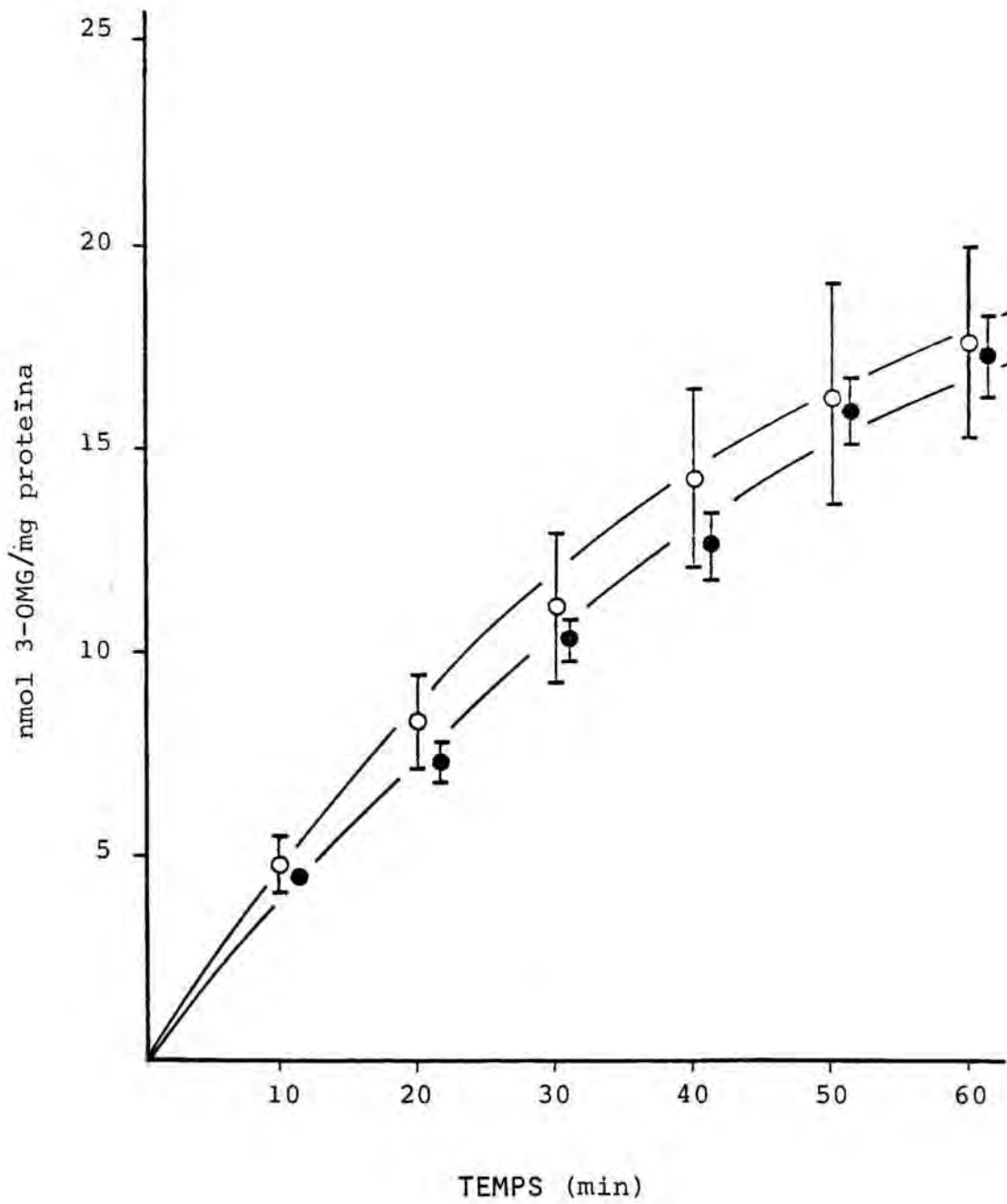


Figura 40.- EFECTE DE LA TEOFIL.LINA 7,5 mmol/l SOBRE L'ACU-
MULACIÓ DE 3-OMG 0,1 mmol/l EN CÈL.LULES DEL JE-
JÚ. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm
error estàndard.

□ Control, n = 6

■ teofil.lina 7,5 mmol/l, n = 6

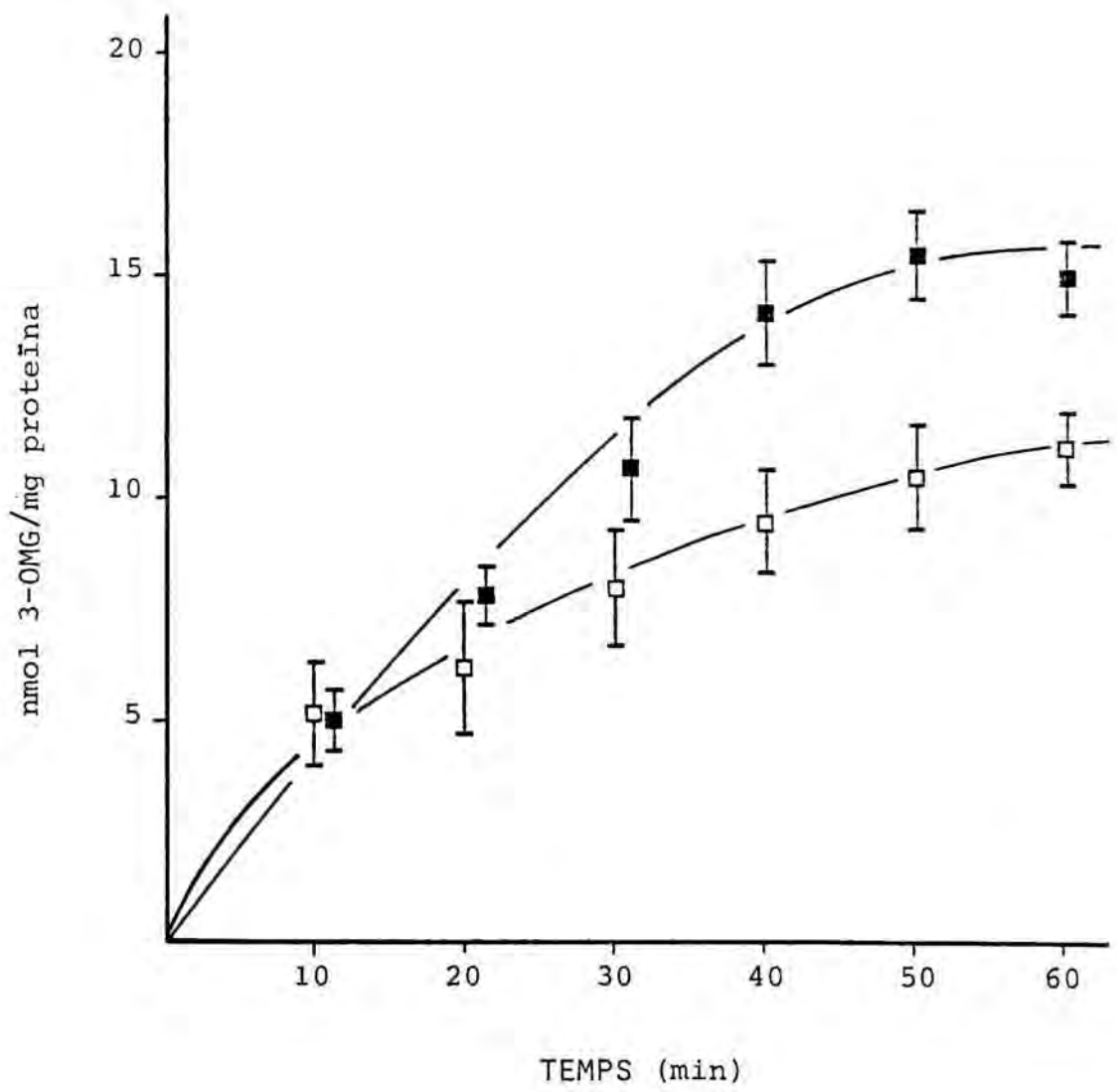


Figura 41.- EFECTE DE LA CITOCALASINA B 0,1 mmol/l SOBRE L'ACUMULACIÓ DE 3-OMG 0,1 mmol/l EN CÈL.LULES DEL CEC PROXIMAL. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

○ Control + 24 μ l DMF, n = 5

● citocalasina B 0,1 mmol/l, n = 6

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

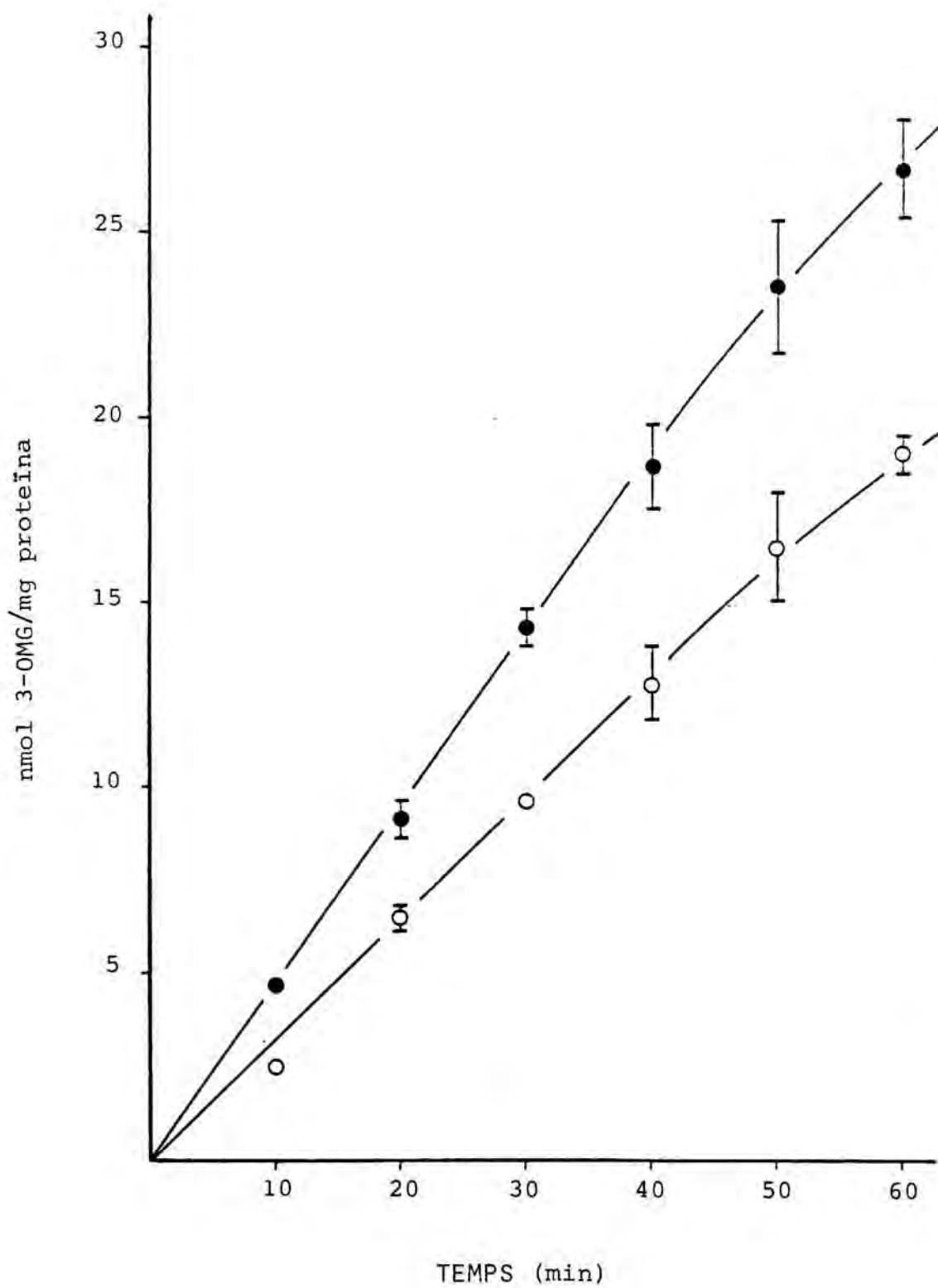
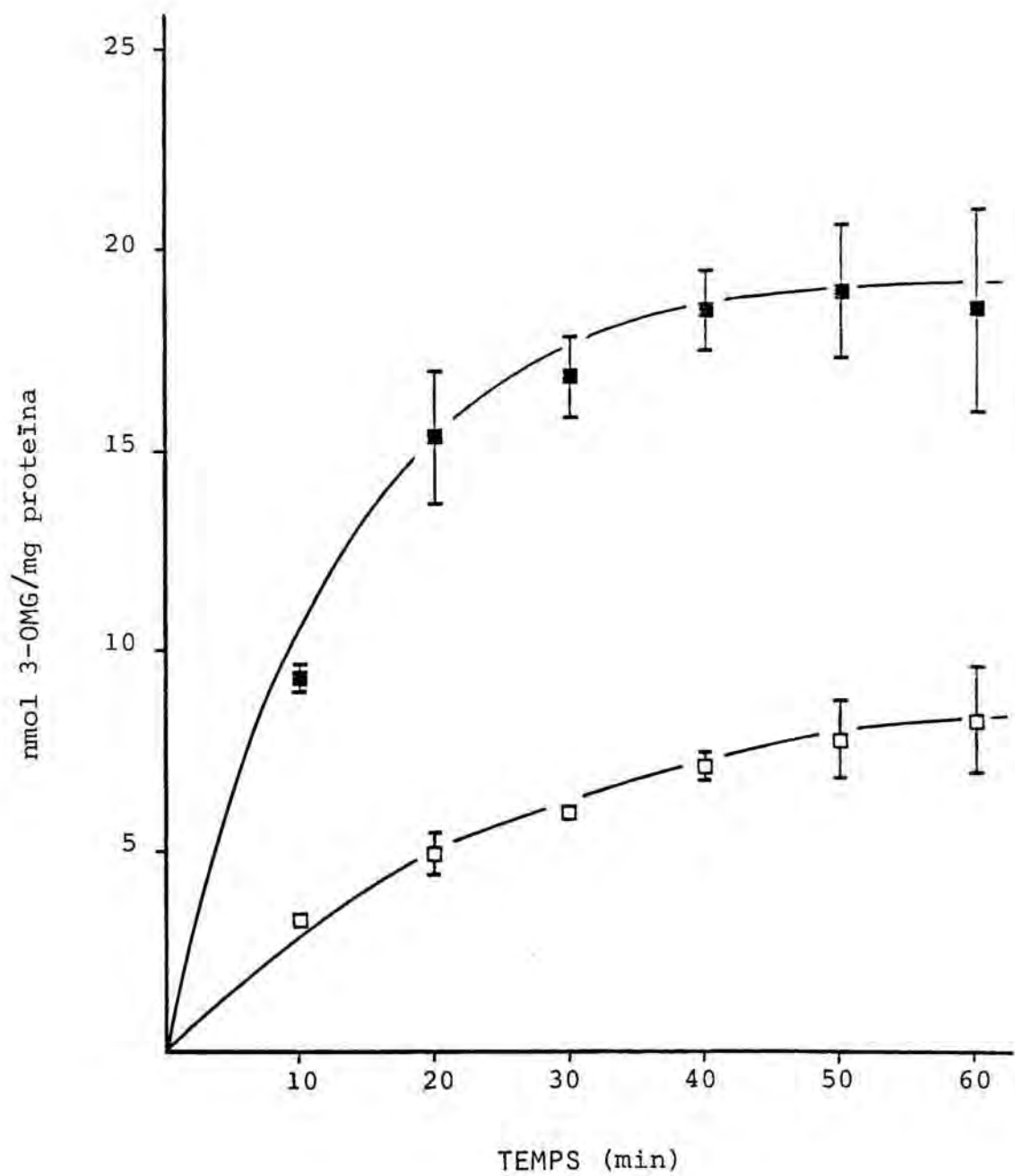


Figura 42.- EFECTE DE LA CITOCALASINA B 0,1 mmol/l SOBRE L'ACUMULACIÓ DE 3-OMG 0,1 mmol/l EN CÈL.LULES DEL JEJÚ. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

- Control + 24 μ l DMF, n = 5
- citocalasina B 0,1 mmol/l, n = 5

Només es representen els errors estàndard que superen els símbols.



de 3-OMG 0,1 mmol/l en un 43 %. En el jejú l'increment és d'un 127 % respecte a les dades del control.

3.4.4.2.2. Fluxos de monosacàrids a través de la via dependent de Na^+

Per tal d'estudiar els fluxos d'entrada de monosacàrids a l'enteròcit per transport mitjançat concentratiu, s'ha emprat l' α -MG ja que es tracta d'un sucre no metabolitzable que tan sols utilitza aquesta via i la de la difusió simple (KIMMICH i RANGLES, 1981). S'han estudiat els fluxos d' α -MG 0,1 mmol/l en cèl.lules aïllades del cec proximal i del jejú i l'efecte de la florricina 0,2 mmol/l. També s'han assajat altres substàncies, la teofil.lina i la citocalasina B, que si bé són inhibidors específics de la difusió facilitada de la membrana basolateral, calia comprovar si exerceixen, també, algun efecte sobre el transport mitjançat concentratiu de la membrana luminal.

3.4.4.2.2.1. Fluxos inicials d'entrada d' α -MG: efecte de la florricina.

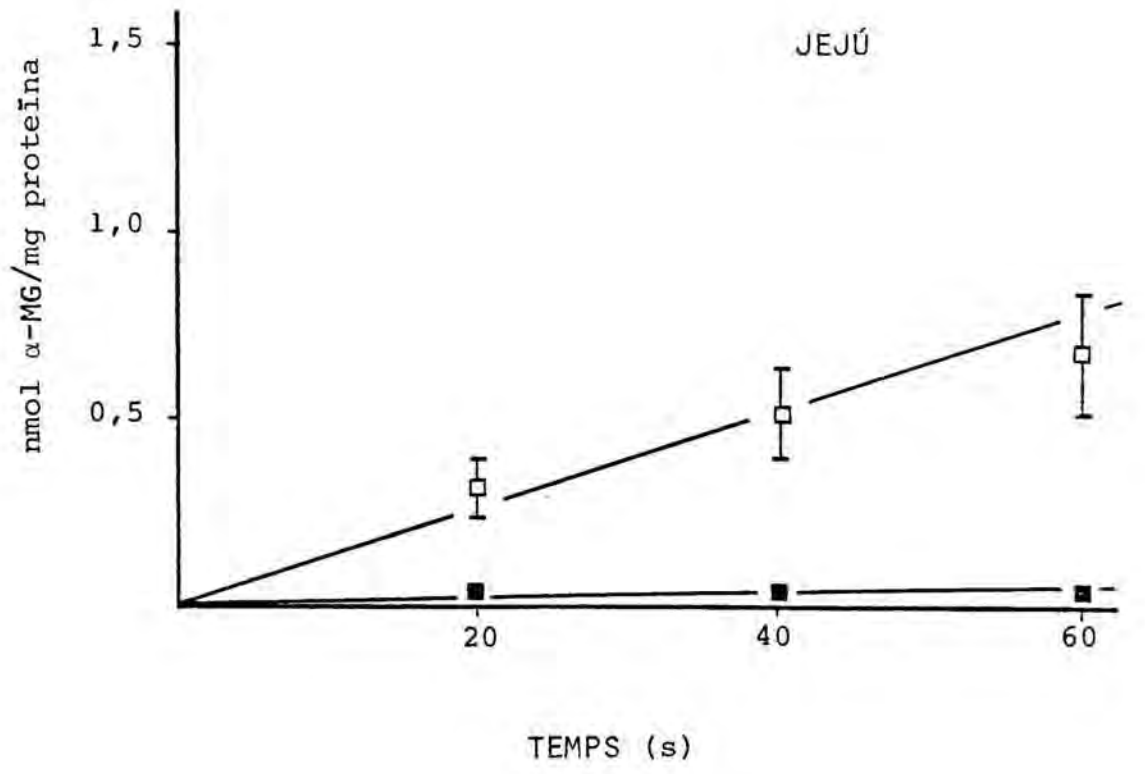
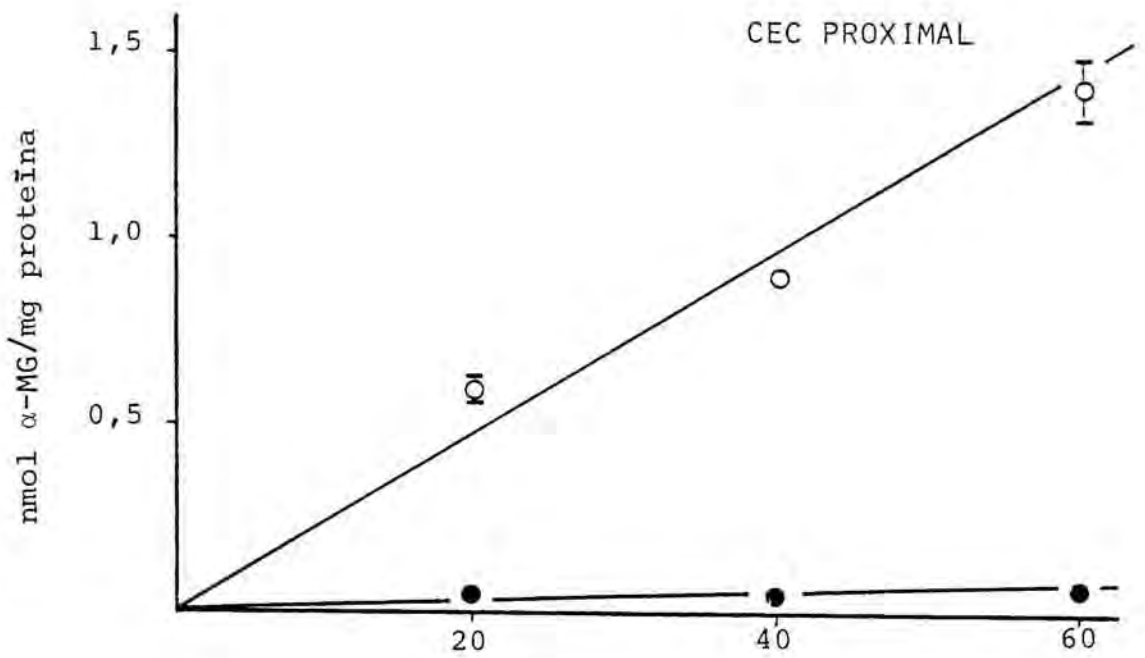
Els resultats de l'efecte de la florricina 0,2 mmol/l sobre els fluxos d' α -MG 0,1 mmol/l, es mostren a la figura 43. Tal com s'observa, als 60 s d'incubació, els fluxos d' α -MG són significativament més grans en el cec proximal ($1,40 \pm 0,07$ nmol/mg proteïna, $n = 4$) que no pas en el jejú ($0,69 \pm 0,15$ nmol/mg proteïna, $n = 4$). Els fluxos obtinguts en presència de florricina, és a dir l'entrada de monosacàrid per difusió simple, no presenten diferència estadísticament significativa entre ambdós segments intestinals. En el cec proximal, la florricina inhibeix els fluxos de monosacàrid en un 96 % i en el jejú en un 94 %.

Figura 43.- EFECTE DE LA FLORRICINA 0,2 mmol/l SOBRE ELS FLUXOS INICIALS D' α -MG 0,1 mmol/l. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

CEC PROXIMAL O control, n = 4
 ● florricina 0,2 mmol/l, n = 4

JEJU □ control, n = 4
 ■ florricina 0,2 mmol/l, n = 4

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



3.4.4.2.2.2. Fluxos inicials d'entrada d' α -MG: efecte de la teofil.lina i de la citocalasina B

Pel que fa a l'efecte de la teofil.lina 7,5 mmol/l i de la citocalasina B 0,1 mmol/l sobre els fluxos d' α -MG 0,1 mmol/l, els resultats es mostren a les figures 44 i 45. Tan sols la teofil.lina, i en el cec proximal, produeix una inhibició de l'entrada de monosacàrid, que és del 23 % i és significativament diferent respecte al control.

De la mateixa manera que en els experiments realitzats a temps llargs (apartat 3.4.4.2.1.4.), també s'ha assajat l'efecte de la DMF sobre els fluxos d' α -MG. Aquest dissolvent no va exercir cap efecte. Malgrat això, els controls sempre s'han realitzat en presència de DMF.

3.4.4.2.3. Fluxos de monosacàrids a través de la via independent de Na^+

La 2-deoxi-D-glucosa (2-DOG) és un monosacàrid no metabolitzable que tan sols utilitza la via de la difusió facilitada i la de la difusió simple (KIMMICH i RANGLES, 1976). La seva utilització en les cèl.lules aïllades en experiments a temps curts permet, amb l'ajut d'inhibidors específics de la difusió facilitada, la quantificació de la participació d'aquesta via en l'acumulació de monosacàrids.

3.4.4.2.3.1. Fluxos de 2-DOG: efecte de la teofil.lina i de la citocalasina B

S'ha estudiat els fluxos de 2-DOG 0,1 mmol/l en cèl.lules del cec proximal i del jejú i l'efecte de la teofil.lina 7,5 mmol/l (figures 46 i 47) i de la citocalasina B 0,1 mmol/l (figures 48 i 49). Tal com s'observa a les dues figures, els fluxos de 2-DOG són significativament més grans, als 60 s d'incubació, en el jejú que no pas en el cec proximal.

Figura 44.- EFECTE DE LA TEOFIL.LINA 7,5 mmol/l SOBRE ELS FLUXOS INICIALS D' α -MG 0,1 mmol/l. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

CEC PROXIMAL ○ control, n = 8
 ● teofil.lina 7,5 mmol/l,
 n = 8

JEJU □ control, n = 8
 ■ teofil.lina 7,5 mmol/l, n = 8

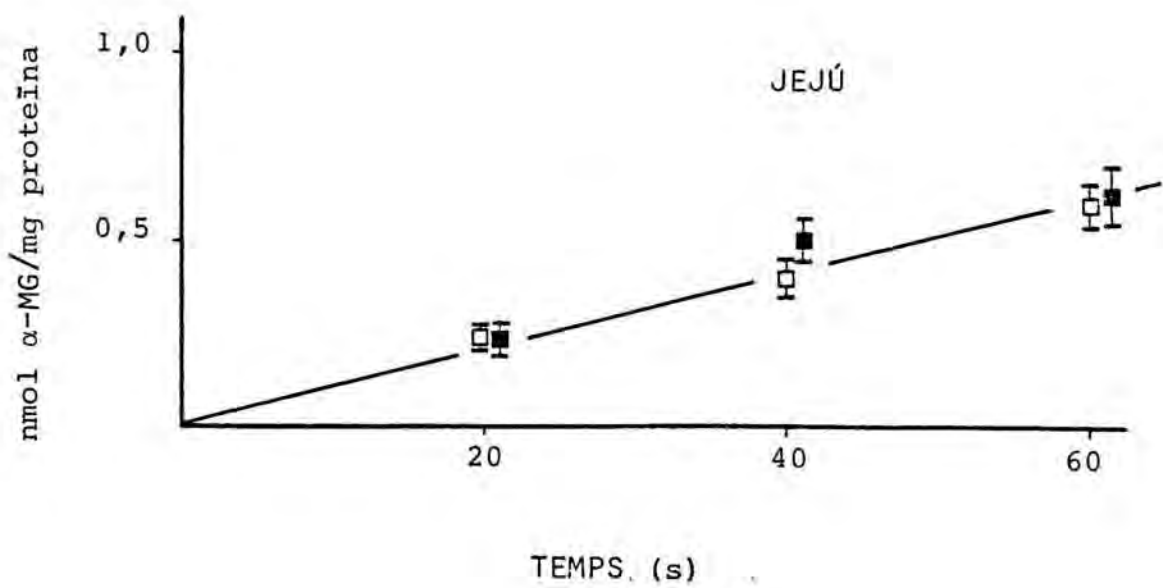
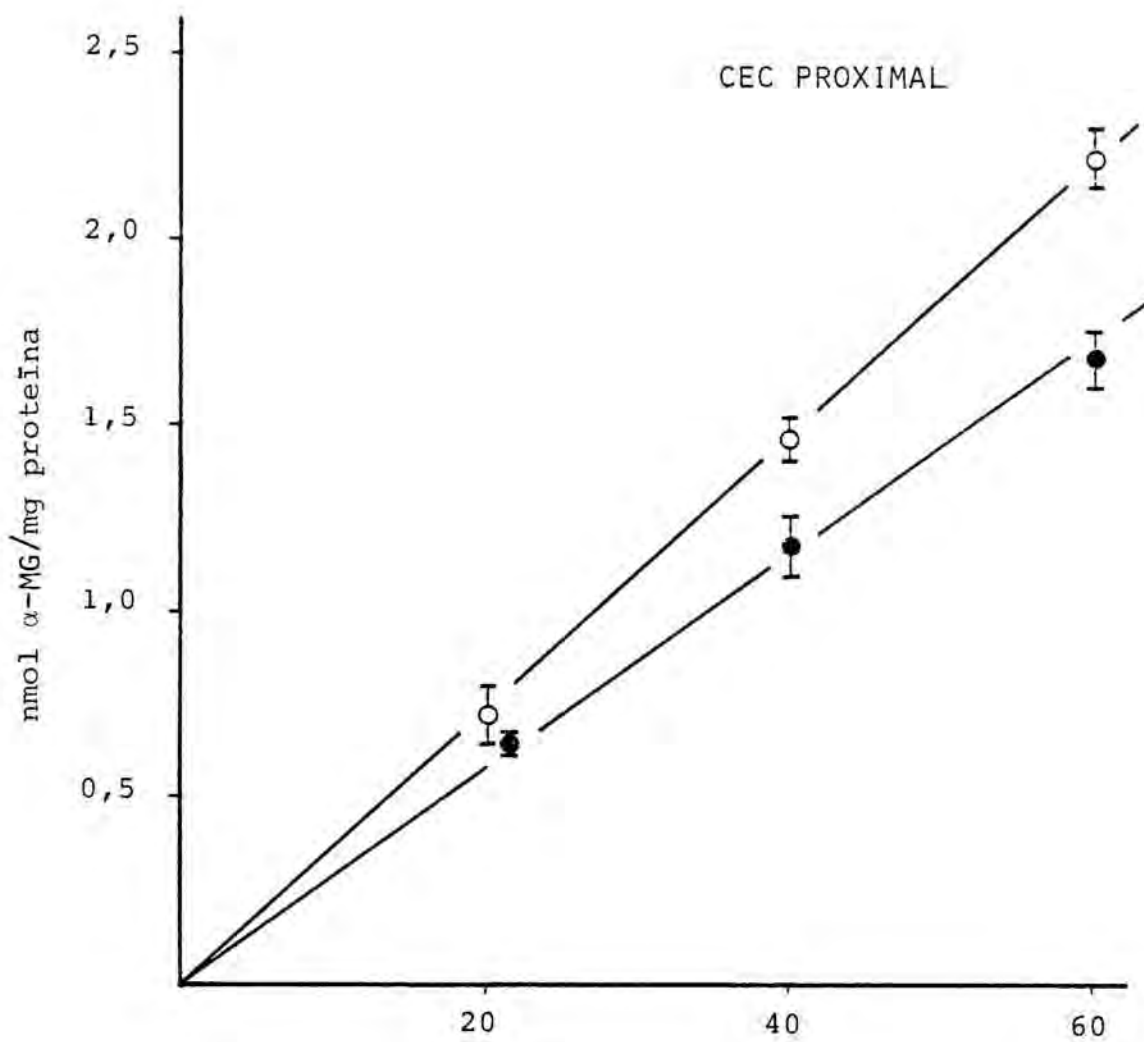
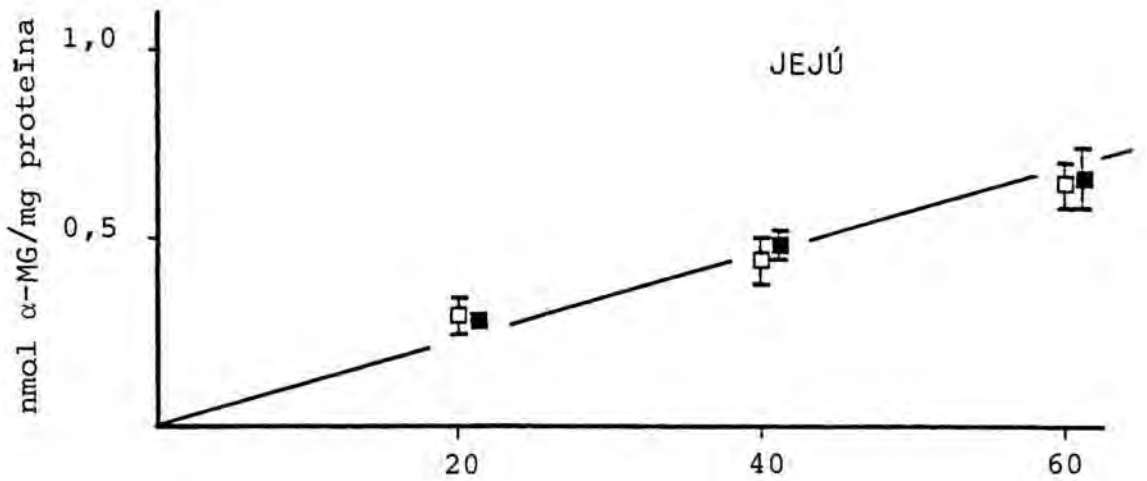
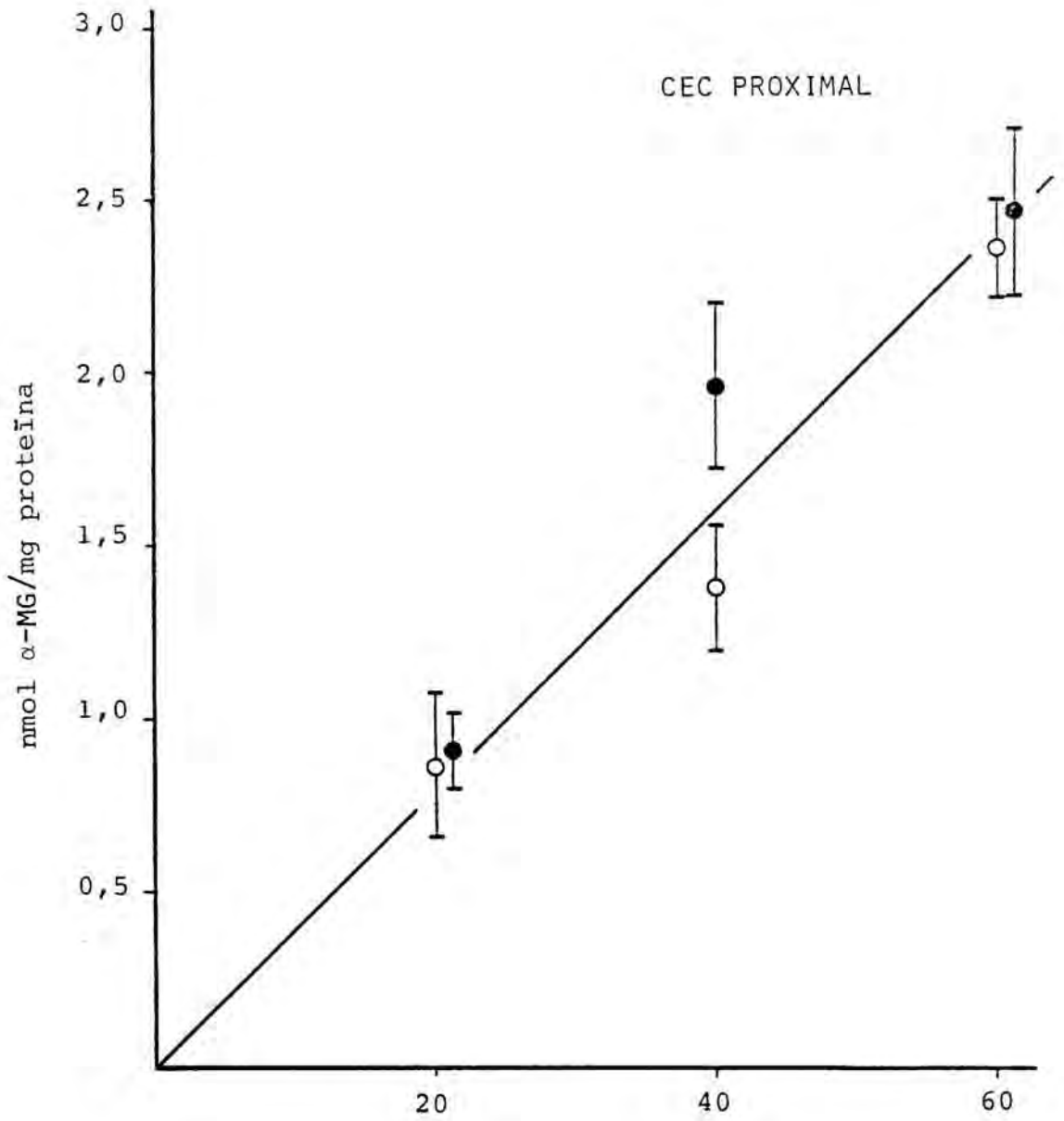


Figura 45.- EFECTE DE LA CITOCALASINA B 0,1 mmol/l SOBRE ELS FLUXOS INICIALS D' α -MG 0,1 mmol/l. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

CEC PROXIMAL O control + 24 μ l DMF, n = 8
 ● citocalasina B 0,1 mmol/l,
 n = 8

JEJU □ control + 24 μ l DMF, n = 8
 ■ citocalasina B 0,1 mmol/l, n = 8

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.



TEMPS (s)

Figura 46.- EFECTE DE LA TEOFIL.LINA 7,5 mmol/l SOBRE ELS FLUXOS INICIALS DE 2-DOG 0,1 mmol/l EN CÈL.LULES DEL CEC PROXIMAL. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

O Control, n = 4

● teofil.lina 7,5 mmol/l, n = 4

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

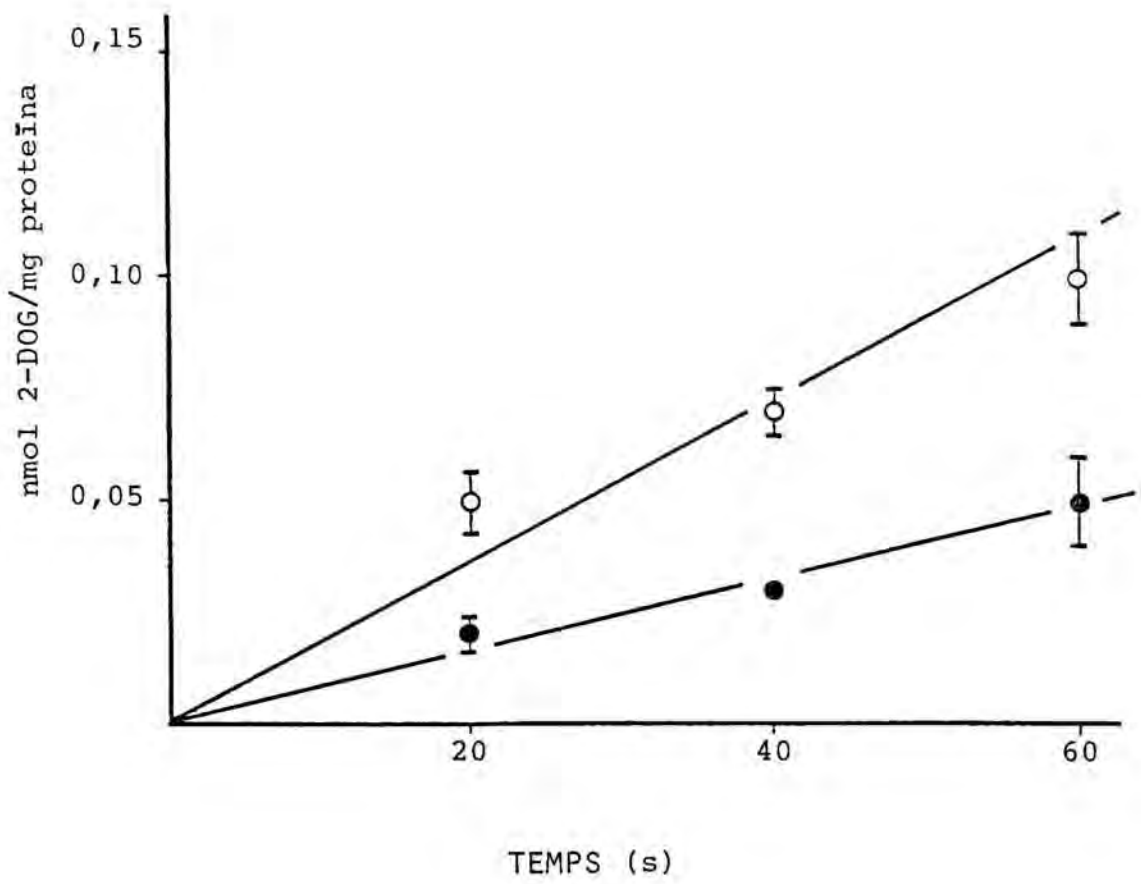


Figura 47.- EFECTE DE LA TEOFIL.LINA 7,5 mmol/l SOBRE ELS FLUXOS INICIALS DE 2-DOG 0,1 mmol/l EN CEL.LULES DEL JEJÚ. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

□ Control, n = 8

■ teofil.lina 7,5 mmol/l, n = 8

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

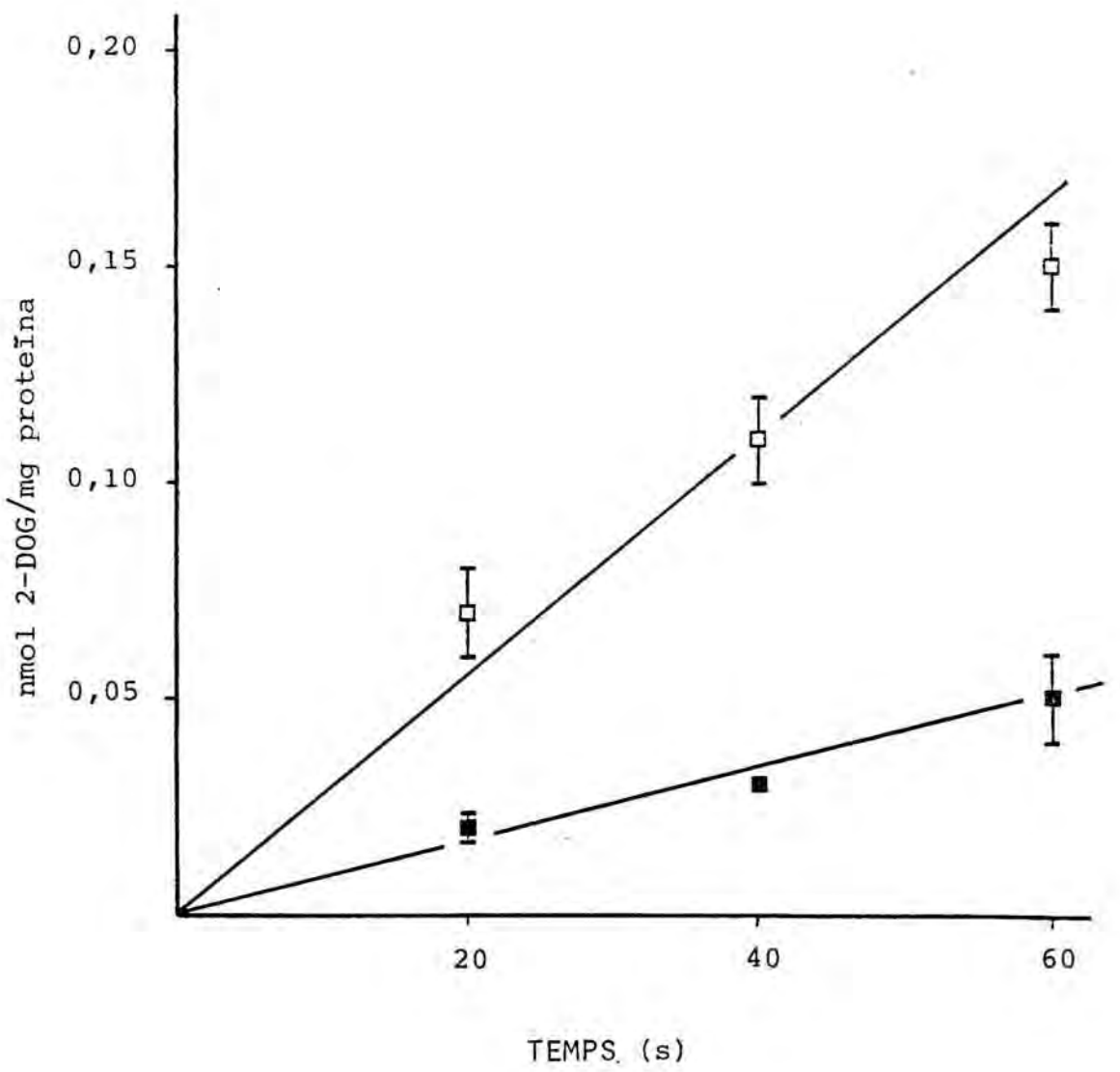


Figura 48.- EFECTE DE LA CITOCALASINA B 0,1 mmol/l SOBRE ELS FLUXOS INICIALS DE 2-DOG 0,1 mmol/l EN CEL·LULES DEL CEC PROXIMAL. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

- O Control + 24 μ l DMF, n = 7
- citocalasina B 0,1 mmol/l, n = 7

Només es representen els errors estàndard que superen la mida dels símbols.

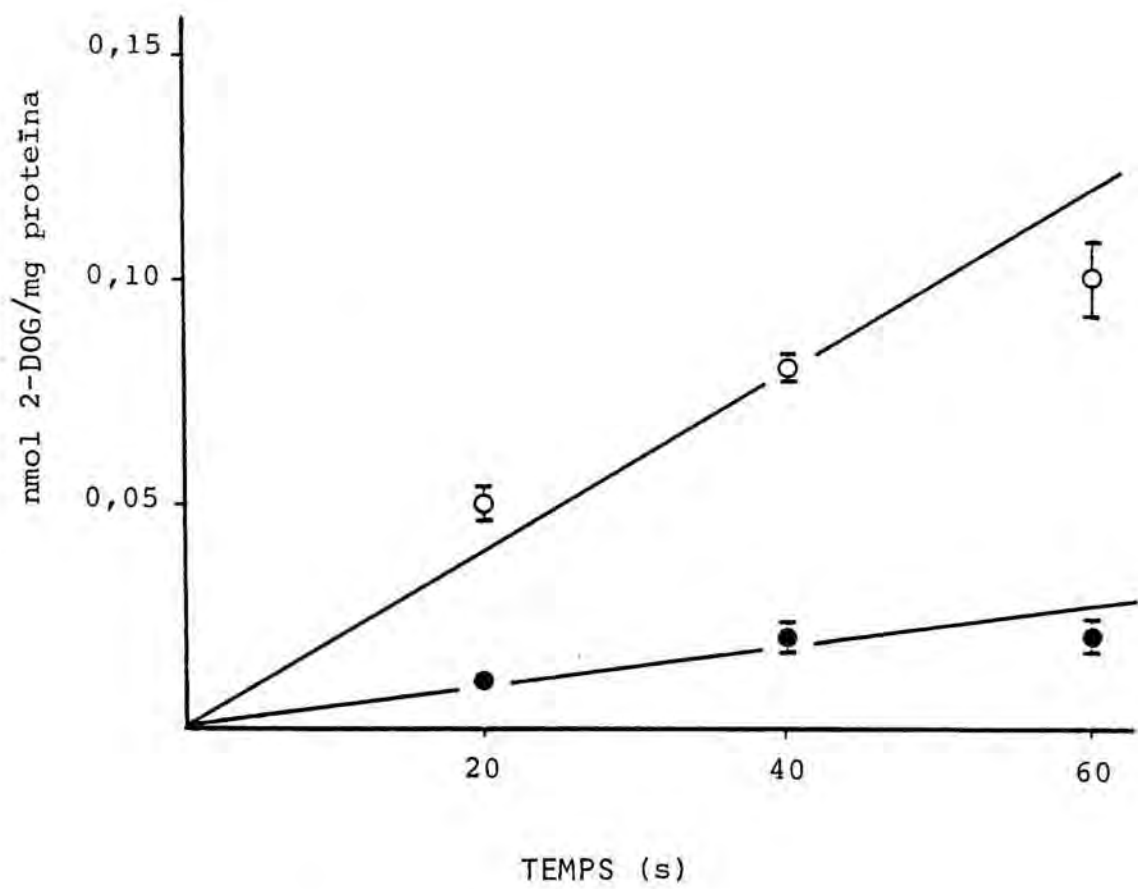
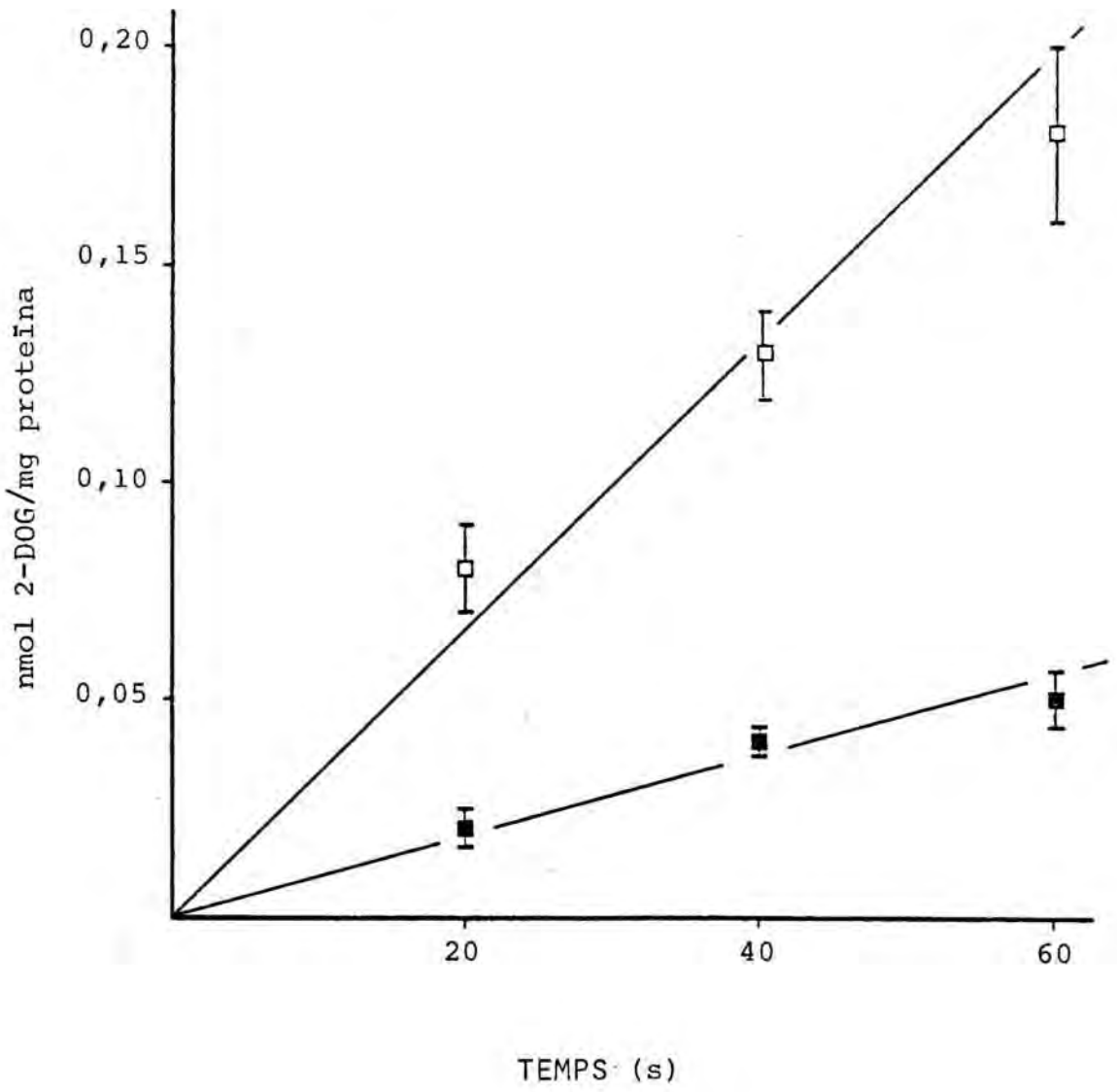


Figura 49.- EFECTE DE LA CITOCALASINA B 0,1 mmol/l SOBRE ELS FLUXOS INICIALS DE 2-DOG 0,1 mmol/l EN CÈL.LULES DEL JEJÚ. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard, essent n el nombre de dades.

□ Control + 24 l DMF, n = 8

■ citocalasina B 0,1 mmol/l, n = 8



La teofil.lina redueix els fluxos de 2-DOG als 60 s, en un 50 % en el cec proximal i en un 67 % en el jejú. La citocalasina B, inhibidor més potent, provoca una reducció del 80 % en el flux de 2-DOG, en el cec proximal i del 72 % en el jejú. La DMF no exerceix cap efecte sobre els fluxos de 2-DOG.

Pel que fa a l'entrada de 2-DOG per difusió simple no hi ha diferència estadísticament significativa entre el cec proximal i el jejú, ja sigui amb teofil.lina o amb citocalasina B.

4. DISCUSSIO

4.1.- ESTUDI HISTOLÒGIC

Hom ha realitzat un estudi histològic dels cecs per tal d'obtenir una informació complementària que ens permeti correlacionar l'estructura d'aquests segments intestinals amb llur capacitat per absorbir monosacàrids i, d'aquesta manera, assolir un coneixement més profund de la fisiologia d'aquesta regió del tracte digestiu tan poc estudiada. A més del cec, també s'han estudiat altres zones, tant de l'intestí prim (jejú i ili) com del gruixut (recte), per tal de fer-ne un estudi comparatiu amb les característiques del cec.

Els cecs són un parell de diverticles que neixen en el punt d'unió de l'ili amb el recte i que, en els pollastres de 4 a 7 setmanes d'edat hom ha trobat que mesuren 87,9 mm de mitjana. Aquesta dada és inferior a l'obtinguda per ORR (1931) en animals de 35 dies, per als quals troba una mida de 144 mm, però es manté dins els límits exposats per KERNSTEN (1912). Aquest autor, en un estudi realitzat al llarg del desenvolupament, dóna una llargària de 48 mm per als cecs de pollastres de 4 setmanes i de 115 mm per als de 7 setmanes, el que suposa una gran variabilitat al costat dels nostres resultats, en què aquest paràmetre oscil·la entre 81 i 95 mm. ALVAREZ (1976) observa com, en incrementar la quantitat d'hidrats de carboni de la dieta, hi ha un augment notable en la longitud d'alguns segments del tracte digestiu, fet que és bastant marcat en el cas dels cecs. Per a aquest autor, la raó de la variació en les di-

mensions és deguda a un increment en l'activitat bacteriana. Així, doncs, el diferent grau de desenvolupament dels cecs descrit a la bibliografia, no és d'estranyar, ja que es tracta d'un paràmetre que, a més de venir determinat per influències filogenètiques es troba, en gran mesura, condicionat per l'hàbit alimentari.

Macroscòpicament, s'ha observat que el cec de pollastre presenta dues zones ben diferenciades. La proximal, propera a la unió ili-cec-recte, que correspon a un terç d'aquest segment intestinal i amb un aspecte molt semblant al del jejú (fotografia 1). L'altra zona, que inclou el cec medial i distal, es caracteritza per la presència dels *plicae circulares*, formacions absents en la resta del tracte digestiu. Es tracta d'uns particulars replegaments del teixit que només són presents en aquestes zones de l'intestí, anomenats per CALHOUN (1932) amb aquest terme puix que s'assemblen bastant a les vàlvules connivents. Tanmateix, aquestes estructures tenen una disposició longitudinal per la qual cosa no sembla que aquest nom sigui del tot adequat. Aquesta discrepància en la nomenclatura és posada també de manifest per HODGES (1974) i BAYER *et al.*, (1976).

Pel que fa a l'anatomia microscòpica, les imatges obtingudes al MER (fotografia 3), també revelen l'existència d'aquestes dues zones. Una zona proximal, amb vertaderes vellositats, i les zones medial i distal amb *plicae circulares* recobertes per estructures semblants a les vellositats. WITLOCK *et al.* (1975), BAYER *et al.* (1976) i TURK (1982) descriuen el cec medial i distal com regions amb la superfície llisa, solcada únicament per endinsaments corresponents a les criptes. Les nostres observacions demostren, ultra la presència de les criptes, l'existència d'ondulacions, constituïdes per protuberàncies romes i aplanades equivalents a vellositats, bé que escassament desenvolupades.

HOLDSWORTH i WILSON (1967), en relacionar la superfície intestinal exposada amb llur capacitat per acumular monosacàrids, atribueixen la pèrdua de la capacitat de transport dels cecs, al llarg del desenvolupament de l'animal, a una reducció de la llargària de les vellositats. Tanmateix, les imatges obtingudes al nostre Laboratori revelen que, en animals d'un dia d'edat, tampoc hi ha vellositats en el cec medial i distal, essent les del cec proximal molt similars a les dels animals de 4 a 7 setmanes. Per tant, l'absència de vellositats en el cec medial i distal no pot ésser atribuïda a una degeneració del teixit, tal com proposen HOLDSWORTH i WILSON (1967), sinó més aviat al fet que en aquestes dues zones, la distensió que exerceix el material fecal dóna lloc a una reducció d'aquestes estructures (HODGES, 1974).

Al llarg de l'intestí de pollastre es produeix una disminució en la llargària de les vellositats (CALHOUN, 1932; MICHAEL i GUTTE, 1971; HODGES, 1974; WITLOCK i RUFF, 1977 i TURK, 1982). Les mesures realitzades en les nostres imatges demostren també una disminució des del jejú fins al recte, essent les del cec proximal de dimensions intermèdies a les d'aquests segments. Els resultats obtinguts sobre la llargària de les vellositats venen a confirmar les dades de MICHAEL i GUTTE (1971), també en el pollastre.

També s'ha determinat la densitat de les vellositats en el cec proximal i des del jejú fins al recte. En aquest cas, no s'ha pogut establir cap relació respecte a la zona estudiada. Cal esmentar, però, que el cec proximal presenta la densitat més baixa de tots els segments estudiats. Aquest resultat difereix de l'observat en relació amb la llargària de les vellositats, ja que pel que fa a aquest últim paràmetre s'ha trobat una relació, amb la seva localització, existint una reducció de les vellositats en direcció caudal.

Quant a la forma de les vellositats, les del cec proximal coincideixen amb les de la resta dels segments estudiats, és a dir, són majoritàriament elipsoïdals i, en menor proporció, digitiformes. Alguns autors han fet una descripció semblant per a les vellositats del jejú (BAYER *et al.*, 1975; MICHAEL i HODGES, 1975; WITLOCK i RUFF, 1977 i McLELLAND, 1979). La irregularitat en la forma i mida de les vellositats de la unió ili-cec-recte (fotografia 2c) es contradiu totalment amb les imatges obtingudes per CLARKE (1978) que observa una mucosa del tot homogènia i molt semblant a la de l'intestí prim.

Les vellositats, estructures destinades a augmentar la superfície d'intercanvi entre el medi intern i el contingut intestinal, presenten també uns endinsaments transversals (fotografia 2a) que contribueixen a afavorir els processos d'intercanvi intestinal. El nombre d'aquests endinsaments transversals de les vellositats augmenta del jejú al recte, essent aquest en el cec proximal semblant al recte. Així doncs, al llarg de l'intestí de pollastre, paral·lelament a la disminució de la mida de les vellositats, es produeix un augment en el nombre d'endinsaments transversals.

S'han trobat bacteris a l'ili, al recte i al cec proximal, localitzats exclusivament a la punta de la vellositat. En observacions realitzades en el cec proximal, s'ha vist que aquests microorganismes s'endinsen en el teixit pels espais intercel·lulars. Per a GLICK *et al.* (1978), es tracta de bacils que no es troben mai ni a la cripta ni a la zona més baixa de la vellositat i que es fixen al teixit per un procés encara desconegut. Aquests bacils es troben fortament units a l'epiteli però no penetren dins la cèl·lula, tal i com es desprèn de les nostres observacions al MER.

L'observació de la superfície de la vellositat al MER posa de manifest l'existència de formes poligonals, properes a un model hexagonal i que corresponen al contorn cel.lular (vegeu fotografia 4). No se sap per quina raó les microvellositats presents en els punts de contacte entre dues cèl.lules, tenen un aspecte particular en ésser observades al MER. MICHAEL I HODGES (1975) i WITLOCK i RUFF (1977) en duodè de pollastre obtenen imatges semblants, essent el contorn també hexagonal.

L'estudi dels talls transversals de les tres zones cecals al MO, confirma l'estructura de les vellositats observada al MER. Així, en el cec proximal aquestes són ben desenvolupades i els endinsaments transversals són molt visibles. En el cec medial i distal es presenten les vellositats molt poc desenvolupades i es comprova que els endinsaments de la superfície, observats al MER, corresponen a les criptes.

Pel que fa a les capes subepitelials, s'observa una progressiva disminució en la gruixària de la musculatura circular respecte a la longitudinal, des del cec proximal fins al distal. HODGES (1974) atribueix aquest fet a l'augment de la distensió que hi ha al llarg del cec i que fa aprimar la musculatura circular.

La tonsil.la cecal, present en el cec proximal, forma part del teixit limfàtic distribuït al llarg de tot el tracte digestiu. La seva estructura és una mena de vellositat molt engruixida, formada per teixit limfàtic difós, amb fol·licles limfàtics situats prop de la làmina pròpia (fotografia 6). Es correspon força amb la descripció que BEFUS *et al.* (1980) fan del teixit limfàtic present a la resta del tracte digestiu. Les tonsil.les cecals són una font important d'anticossos. A més de presentar resposta a una immunitat general, jutamente amb els altres focus limfoïdes in-

testinals, tenen una funció immunològica en relació amb els bacteris i altres substàncies antigèniques presents dins de l'intestí (PAYNE, 1971).

Les observacions de l'epiteli cecal realitzades al MET, posen de manifest unes característiques bastant similars a les del jejú. Així doncs, fonamentalment hi ha cèl.lules absorbents o enteròcits, cèl.lules caliciformes i cèl.lules enterocromafines.

Pel que fa a les cèl.lules de Paneth, s'han trobat en algunes aus, però no en el pollastre (CLARA, 1926; AITKEN, 1958 i HODGES, 1974). Tan sols HUMPHREY i TURK (1974) parlen de la seva existència en el budell de pollastre però no en donen detalls ja que es tracta d'imatges obtingudes al microscopi òptic. En el nostre treball, no s'han observat cèl.lules de Paneth en cap de les zones estudiades.

Les cèl.lules caliciformes (fotografia 15), secretores de mucus, presenten en les tres zones cecals una estructura idèntica a les del jejú. El mateix succeeix amb les cèl.lules enterocromafines localitzades en el cec proximal i en el jejú (fotografies 10 i 17). El diàmetre de les granulacions presents en aquestes cèl.lules és bastant pròxim al que dona ANDREW (1976) per una de les dues poblacions de cèl.lules enterocromafines que descriu en el duodè de pollastre.

En relació amb les cèl.lules principals o enteròcits hom disposa d'alguns caràcters que permeten diferenciar-les segons la zona estudiada i que, a més, podrien intervenir d'una forma decisòria en la fisiologia d'aquests segments intestinals.

Pel que fa al nucli d'aquestes cèl.lules, HUMPHREY i TURK (1974) descriuen com, en el budell prim de pollastre, aquest és més petit i localitzat en posició més basal que en mamífers. Per TRIER i MADARA (1981), en l'intestí prim dels mamífers, les cèl.lules de les parets de les vellositats presenten el nucli situat en el terç basal, mentre que en les cèl.lules de la punta de les vellositats es troba en el terç medial. Tanmateix, aquestes diferències en el si d'una mateixa vellositat no han estat observades ni en el cec ni en el jejú, corroborant l'opinió de HUMPHREY i TURK (1974) en el sentit que els nuclis ocupen sempre una posició basal. En canvi, hom ha detectat una particularitat notable en l'arranjament general dels nuclis en els dos segments intestinals estudiats. En efecte, les cèl.lules epitelials del jejú presenten tots els nuclis a la mateixa alçada (fotografia 10) mentre que en el cec, tot i estant a la zona basal, la seua localització és més irregular, (fotografia 9).

D'una rellevància més gran cal considerar les diferències observades al MET pel que fa al desenvolupament de les microvellositats dels enteròcits de diverses zones del cec i del jejú. En aquest darrer segment, les microvellositats són llargues i gruixudes mentre que en el cec hom pot proposar un gradient de variació propi, amb microvellositats llargues i primes al cec proximal i curtes i gruixudes al cec distal (vegeu figures 2 i 3).

La disminució observada en la llargària de les microvellositats, des de la punta de la vellositat fins a la cripta, és un fet també detectat per HODGES i MICHAEL (1975) en el duodè de pollastre i per Iemhoff *et al.* (1970) a l'intestí prim de rata. Aquest diferent desenvolupament de les microvellositats es correspon amb un diferent grau de maduresa de les cèl.lules epitelials.

Així, les cèl.lules de les zones altes de la vellositat, implicades sobretot en els processos d'absorció, presenten les microvellositats més llargues, existint doncs una relació entre la superfície exposada i la funció.

Pel que fa a la disminució en la mida de les microvellositats des del jejú fins al cec distal, de la qual no s'ha trobat cap referència bibliogràfica, hom pot especular sobre una possible regionalització de les funcions del cec de pollastre. Així, a la zona proximal, les microvellositats són d'estructura més pròxima (encara que no idèntica) a les del jejú. El notable desenvolupament de les microvellositats d'aquesta zona fa pensar que podrien estar implicades en processos on la superfície disponible hi jugués un paper important, com és el cas de l'absorció de nutrients, en detriment de les regions medial i distal on la superfície que ofereixen és sensiblement menor. Això és encara més significatiu si tenim en compte que el mateix model es repeteix amb les dimensions de les vellositats. És a dir, en el cec proximal les vellositats i les microvellositats presenten un grau de desenvolupament semblant al del jejú. En canvi, en el cec medial i distal no hi ha vertaderes vellositats i les microvellositats són poc desenvolupades.

Així doncs, hom disposa de tres criteris morfològics que justifiquen la diferenciació del segment cecal en dues zones, la proximal i l'altra, que inclou les porcions medial i distal. El primer criteri és macroscòpic i coincideix amb les observacions de CALHOUN (1932), el segon es basa en el diferent grau de desenvolupament de les vellositats, observades al MER, i el tercer basat en les diferències en l'estructura de les microvellositats.

Un cop definides les propietats de cadascuna de les

diverses regions del cec, s'ha procedit a la descripció del transport de monosacàrids en els enteròcits cecals.

4.2. TRANSPORT DE MONOSACÀRIDS

La regió cecal del tracte digestiu del pollastre ha estat considerada tradicionalment, com una zona d'interés per a la nutrició de l'animal únicament en relació amb l'absorció d'aigua i electròlits (SKADHAUGE, 1981) i àcids grassos (ANNISON *et al.*, 1968).

HOLDSWORTH i WILSON, (1967) posaren de manifest l'existència a l'epiteli cecal d'un mecanisme de transport actiu per a monosacàrids i aminoàcids. No obstant, aquests processos s'observaren tan sols en animals de 1 a 3 dies d'edat, perdent aparentment aquesta capacitat després d'una setmana de vida. Posteriorment, IERNER *et al.* (1975) confirmaren en part els resultats anteriors utilitzant l'aminoàcid metionina com a substrat.

Contràriament, els resultats obtinguts en el nostre Laboratori en el decurs dels primers experiments (apartat 3.4.1.), sobre la capacitat de les cèl.lules epitelials aïllades dels cecs de pollastres de 4 a 7 setmanes d'edat, ja demostren l'existència, en aquest segment intestinal, d'un mecanisme de transport mitjançat concentratiu per a monosacàrids. Aquesta evidència, observada en animals més grans de 3 dies suposa una important modificació en el concepte del paper que els cecs poden jugar en la nutrició del pollastre.

L'acumulació de 3-OMG en el cec sencer ha resultat ésser inferior a l'obtinguda paral·lelament en el jejú. Als 60 min d'incubació, les cèl.lules aïllades del cec han assolit 1,88 nmol/mg proteïna valor significativament

inferior a l'obtingut en les cèl.lules del jejú (5,04 nmol/mg proteïna).

Els resultats obtinguts en el jejú (figura 16) són molt similars als de KIMMICH i RANGLES (1980), assolits en condicions experimentals semblants. En presència de 3-OMG 0,1 mmol/l, obtenen, als 50 min d'incubació, una acumulació de 3,0 a 3,6 nmol/mg proteïna per als controls i de 0,2 a 0,4 nmol/mg proteïna quan hi és present la florricina, inhibidor competitiu del transport actiu de monosacàrids, a la concentració de 0,2 mmol/l. En el nostre cas, als 50 min, l'acumulació de 3-OMG 0,1 mmol/l ha estat de 4,04 nmol/mg proteïna i 0,24 nmol/mg proteïna, en absència i en presència, respectivament, de florricina 0,2 mmol/l. KIMMICH i RANGLES (1980) assoleixen l'estat estacionari als 10 min d'iniciada la incubació, en els nostres experiments no s'hi arriba fins als 50 min.

Aquest paral·lelisme entre els resultats del jejú amb els obtinguts per KIMMICH i RANGLES (1980) demostren que la tècnica per a l'aïllament d'enteròcits descrita per aquest autor en el 1970, s'ha adaptat correctament a les nostres necessitats experimentals. A més, ens ha permès posar de manifest, per primera vegada, l'existència d'un mecanisme de transport mitjançat concentratiu per a monosacàrids en les cèl.lules del cec sencer de pollastre. Malgrat això, en ésser utilitzada en el cec, presenta l'inconvenient d'aïllar molt poques cèl.lules. Per aquesta raó va ésser necessari assajar altres medis d'aïllament que donessin lloc a suspensions cel·lulars més nombroses i on a més, les cèl.lules, un cop aïllades, presentessin unes condicions funcionals el més semblant possible a les fisiològiques. S'han triat un enzim, la hialuronidasa i dos agents quelants de l'ió calci, el citrat trisòdic i l'EDTA, ja que són les substàncies que,

segons les dades presents a la bibliografia, proporcionen suspensions cel·lulars en les millors condicions funcionals. El medi d'aïllament enzimàtic és el de KIMMICH (1970a) i els químics són dues modificacions que s'han realitzat d'aquest, en les que s'han retirat els ions calci i magnesi i l'enzim s'ha substituït per citrat trisòdic 27 mmol/l o EDTA 5 mmol/l, mantenint-se l'osmolaritat variant la concentració de manitol.

Amb les cèl·lules del cec i del jejú obtingudes mitjançant aquests tres medis es realitzaren tot un seguit de proves de viabilitat, els resultats de les quals varen ésser utilitzats com a criteri per determinar el millor medi d'aïllament (vegeu l'apartat 3.4.2.).

De primer, s'ha quantificat la proporció de cèl·lules aïllades que mantenen la integritat de la membrana cel·lular. La tècnica emprada ha estat la d'exclusió del blau trypan. Aquesta tècnica presenta l'avantatge de la seva senzillesa i rapidesa. Presenta, però, els inconvenients d'estar sotmesa a la subjectivitat de l'observador i de que no es tenyeixen totes les cèl·lules que presenten la membrana malmesa (TENNANT, 1964). Per tant, la seva fiabilitat és relativa per la qual cosa es fa necessari realitzar d'altres proves de viabilitat.

En la prova de la integritat de la membrana cel·lular, els resultats obtinguts indiquen que el medi amb citrat és el que proporciona un major nombre de cèl·lules amb la membrana intacta, en el cec i en el jejú. Amb el medi que conté hialuronidasa s'obtenen els valors més baixos de viabilitat mentre que amb el medi que conté EDTA tan sols s'obtenen bons resultats en el cec (taules VIII i IX).

En la confrontació dels nostres resultats amb els provinents de la bibliografia s'han observat diverses discordàncies. KIMMICH (1970a) i PRIOR *et al.* (1974) havien obtingut, en condicions experiemntals similars (hialuronidasa 0,5 g/l) i també en el jejú de pollastre, suspensions cel.lulars amb una viabilitat de 80 % i del 70 % respectivament. Ambdós autors presenten valors notablement superiors als obtinguts per nosaltres en el jejú (47 % de cèl.lules viables). Tot i així, EADE *et al.* (1981) realitzaren un estudi comparatiu sobre la integritat de la membrana cel.lular en suspensions obtingudes amb diversos medis d'aïllament, en intestí prim de rata amb resultats semblants als del nostre Laboratori. Així, amb hialuronidasa obtenen un 41 % de viabilitat i amb EDTA un 38 %. Es de destacar, que si al medi amb EDTA hi afegeixen citrat trisòdic 27 mmol/l, aleshores els resultats assoleixen el 70 % de viabilitat. Les dades d'EADE *et al.* (1981) donen suport a la bondat del citrat com agent per a l'aïllament, pel que fa a la integritat de la membrana cel.lular.

La linealitat en el consum d'oxigen al llarg de 1 h 30 min d'incubació i els valors de Q_{O_2} obtinguts, en presència de glucosa 10 mmol/l, indiquen² ja un bon funcionament metabòlic de totes les suspensions cel.lulars. En el cec, les cèl.lules obtingudes amb hialuronidasa i amb citrat són les que presenten una millor activitat respiratòria, mentre que en el jejú ho són les aïllades amb hialuronidasa (taules VIII i IX).

De les dades bibliogràfiques se'n desprèn, també, un major consum d'oxigen per a les cèl.lules obtingudes amb citrat. Així, TOWLER *et al.* (1978) reporten, en el jejú de rata, uns valors aproximats de Q_{O_2} de 28,7 μ l/mg proteïna \cdot h. Les cèl.lules aïllades amb hialuronidasa

són les que presenten una menor Q_{O_2} . PERRIS (1966) en jejú de rata obté 15 $\mu\text{l}/\text{mg proteïna}^2 \cdot \text{h}$ i KIMMICH (1970a) en jejú de pollastre, 1,4 $\mu\text{l}/\text{mg proteïna} \cdot \text{h}$. Pel que fa a l'EDTA, els resultats varien molt segons la concentració d'aquest agent quelant utilitzat. Mentre SOGNET (1967) amb EDTA 5 mmol/l obté, en intestí prim de rata, 12,5 $\mu\text{l}/\text{mg proteïna} \cdot \text{h}$, MITJAVILA *et al.* (1972) amb una concentració de 2 mmol/l, en la mateixa espècie animal, obtenen unes dades de 21,7 a 27,3 $\mu\text{l}/\text{mg proteïna} \cdot \text{h}$. Els nostres resultats oscil·len entre 11,6 $\mu\text{l}/\text{mg proteïna} \cdot \text{h}$ en les cèl·lules del cec obtingudes amb EDTA i 25,7 $\mu\text{l}/\text{mg proteïna} \cdot \text{h}$ en les cèl·lules del jejú aïllades amb hialuronidasa.

De la mateixa manera que el consum d'oxigen, la producció d'àcid làctic a partir de glucosa 10 mmol/l, presenta, en totes les suspensions estudiades, una bona linealitat al llarg del temps d'incubació així com uns valors per a la Q_L que són més elevats que els presents a la bibliografia.

TOWLER *et al.* (1978) són els autors que obtenen valors més alts (2.125 nmol/mg proteïna \cdot h), en cèl·lules del jejú de rata obtingudes amb citrat trisòdic 27 mmol/l. En el nostre cas, i en condicions experimentals similars, les cèl·lules del jejú produeixen 1.073 nmol/mg proteïna \cdot h. Els autors que utilitzen hialuronidasa 0,5 g/l, obtenen una Q_L molt més baixa. Així, KIMMICH (1970a), amb l'enzim obté de 300 a 500 nmol/mg proteïna \cdot h i PRIOR *et al.* (1974) en intestí prim de rata, en condicions experimentals semblants obtenen 500 nmol/mg proteïna \cdot h (734,7 nmol/mg proteïna \cdot h, en el nostre cas). Pel que fa a l'EDTA 5 mmol/l, en el jejú, la producció d'àcid làctic és de 633,8 nmol/mg proteïna \cdot h, valor superior als obtinguts per WATFORD *et al.* (1979) en jejú de pollastre (130 nmol/mg proteïna \cdot h) i HÜLSMANN (1977) en jejú de rata (409 nmol/mg proteïna \cdot h).

Així doncs, en el jejú la màxima producció la presenten les cèl.lules obtingudes amb citrat mentre que en el cec ho són les aïllades amb hialuronidasa (taules VIII i IX).

Una altra prova de viabilitat consisteix en avaluar la quantitat d'ATP present en les cèl.lules aïllades. El que més es valora són els nivells de nucleòtid a temps zero ja que al llarg de la incubació decreixen notablement. Així, BRONK i LEESE (1973) veuen que tan sols en el procés d'obtenció de làmines de mucosa de jejú de rata, hi ha una pèrdua general de nucleòtids que, en el cas de l'ATP, és del 20%. Aquest decreixement s'agreuja encara més durant el temps que la preparació tarda en assolir la temperatura de 37 °C, per tal d'iniciar-se la incubació. Després de 4 min d'incubació en presència de glucosa 11,1 mmol/l, observen que en el teixit tan sols hi resta un 14 % de l'ATP inicial. Incubacions posteriors no tenen efecte sobre el nivell d'ATP.

WATFORD *et al.* (1979), en cèl.lules d'intestí prim de rata, incubades durant 10 min en presència de glucosa 10 mmol/l, tan sols els resta un 50 % de l'ATP present al començament de la incubació. La situació és bastant diferent per a les cèl.lules de pollastre on, després d'incubar-les 10 min en els mateixes condicions que les de rata, hi resta un 87 % de l'ATP inicial.

Aquesta és la raó per la qual en aquest treball s'ha donat una importància cabdal als valors obtinguts a temps zero.

Pel que fa als resultats presents a la bibliografia, amb EDTA 5 mmol/l a temps zero de la incubació, en presència de glucosa 10 mmol/l, WATFORD *et al.* (1979) en intestí prim de pollastre, obtenen 14,9 nmol/mg proteïna

i HULSMANN (1977) en cèl.lules d'intestí prim de rata, 7,0 nmol/mg proteïna.

Per a cèl.lules aïllades amb hialuronidasa existeixen poques referències a la bibliografia. Únicament KIMMICH (1975) en cèl.lules del jejú de pollastre obté de 3,4 a 4,3 nmol/mg proteïna. En els nostres experiments en jejú, és la hialuronidasa la que proporciona un nivell més elevat d'ATP (3,1 nmol/mg proteïna) mentre que en el cec és el citrat (4,4 nmol/mg proteïna) (taules VIII i IX). No s'ha detectat cap referència bibliogràfica respecte al citrat.

La determinació de la capacitat de les cèl.lules per acumular monosacàrids és una prova de gran importància per a la caracterització d'una població cèl.lular intestinal tant pel que fa a la integritat de la membrana cèl.lular com a l'activitat metabòlica. Malgrat el seu valor potencial, no ha estat gaire utilitzada (HUANG, 1965; KIMMICH, 1970a; STERN, 1966 i TOWLER *et al.*, 1978).

En el nostre cas, són les cèl.lules aïllades amb citrat, del cec i del jejú, les que presenten una major acumulació d' α -MG. En les cèl.lules obtingudes amb hialuronidasa i amb EDTA no hi ha diferència estadística significativa en l'acumulació de substrat (taules VIII i IX). El fet que amb citrat trisòdic s'aïllin moltes cèl.lules, podria fer pensar que en les suspensions obtingudes amb aquest agent hi hagués molts més énteròcits procedents de la base de la vellositat o de les criptes. Les cèl.lules d'aquestes zones, però, són immadures i la seva capacitat de transport està minvada. Per tant, i tenint en compte la gran acumulació d' α -MG obtinguda en les cèl.lules aïllades amb citrat hom pot assumir que aquest agent proporciona moltes cèl.lules madures, en unes condicions excel.lents per al transport de mono-

sacàrids.

L'acumulació d' α -MG en les cèl.lules aïllades amb hialuronidasa, en ambdós segments intestinals, és superior a l'obtinguda amb 3-OMG (apartat 3.4.1.). Aquest fet és degut a que l' α -MG no utilitza la via de la difusió facilitada per la qual cosa els gradients de concentració assolits són més grans amb aquest sucre que no pas amb 3-OMG (KIMMICH i RANGLES, 1981).

KIMMICH i RANGLES (1981) obtenen, en cèl.lules de jejú de pollastre aïllades amb hialuronidasa, una acumulació per l' α -MG 0,1 mmol/l als 50 min d'incubació, de 16,6 nmol/mg proteïna per als controls i de 0,4 nmol/mg proteïna per a la florricina 0,2 mmol/l, assolint-se l'estat estacionari en el minut 40. En els nostres experiments, l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l va resultar ésser, als 50 min d'incubació i també per a les cèl.lules del jejú aïllades amb l'enzim, de $11,23 \pm 1,66$ nmol/mg proteïna ($n = 5$) per al control i de $0,47 \pm 0,13$ nmol/mg proteïna ($n = 5$) per a la florricina 0,2 mmol/l. L'estat estacionari no es va assolir en els 60 min d'incubació per a les cèl.lules aïllades amb citrat mentre que per a les obtingudes amb els altres medis d'aïllament, l'estat estacionari es va assolir als 40 min d'incubació. Aquest fet, és també indicatiu de què en les cèl.lules aïllades amb citrat, el transport mitjançat concentratiu és més eficient que no pas en suspensions obtingudes amb els altres agents.

En totes les suspensions cel.lulars obtingudes amb els tres medis diferents, l'acumulació d' α -MG en presència de florricina és la mateixa sigui quin sigui el medi d'aïllament i el segment intestinal utilitzat. Aquest fet indica que les diferències observades en l'acumulació total són degudes al transport mitjançat de la vora luminal

i, per tant, atribuïbles a un diferent estat dels transportadors i/o del metabolisme cel.lular. Ultra això, una altra conseqüència que es pot extreure de l'acumulació obtinguda, en presència de florricina, és que el volum cel.lular és el mateix per totes les suspensions.

En determinar la capacitat d'acumulació es posa, doncs, de manifest que el citrat proporciona, tant en el cec com en el jejú, enteròcits en millors condicions que no pas els altres medis d'aïllament.

Tanmateix, les proves de viabilitat realitzades no poden ésser considerades individualment, ja que es fa necessari d'obtenir una correlació entre els diferents paràmetres, per tal d'aconseguir un únic criteri que permeti la selecció del millor medi d'aïllament.

A la mucosa intestinal, una disminució en els nivells d'ATP o un increment en els d'ADP o ambdós factors a la vegada, són senyals importants d'una estimulació de la glicòlisi (KIMMICH, 1975). En aquests casos, la via oxidativa, queda reduïda o no utilitzable i l'ATP requerit per la cèl.lula és obtingut de glicòlisi. El rendiment d'aquesta via és menor i per tant la seva estimulació dona lloc a una elevada producció d'àcid làctic. Així, els nivells baixos d'ATP estan associats a una elevada producció d'àcid làctic, i a l'inrevés. El metabolisme de la mucosa intestinal es caracteritza perquè presenta una elevada glicòlisi en condicions aeròbiques. És a dir, en condicions normals la producció d'àcid làctic a partir de glucosa és molt elevada (DICKENS i WEIL-MALHERBE, 1941; STERN i REILLY, 1965; LOHMAN *et al.*, 1966; ANDERSON, 1974; LEESE i BRONK, 1975 i HANSON i PARSONS, 1976).

KIMMICH (1975) observà que l'ouabaïna, capaç d'atu-

rar l'activitat glicolítica, induïa un increment en els nivells d'ATP. Paral·lelament, una elevada quantitat d'ATP, indicadora d'un bon funcionament de la via oxidativa, anirà acompanyada d'un elevat consum d'oxigen. BROONK i LEESE (1973) no obtenen una bona linealitat en el consum d'oxigen i ho atribueixen a la pèrdua del nucleòtid.

Els resultats obtinguts en tots els paràmetres metabòlics estudiats a l'apartat 3.4.2. són indicatius, segons les dades presents a la bibliografia d'un bon funcionament del metabolisme cel·lular.

Tal com s'observa a les taules VIII i IX, existeix una bona correlació entre la producció d'àcid làctic i els nivells d'ATP, a excepció de les cèl·lules de cec i de jejú, obtingudes amb EDTA, en les quals caldria esperar més ATP. Segons HÜLSMANN (1977), però, la utilització d'EDTA en absència de l'ió calci, com és el nostre cas, dona lloc a cèl·lules poc carregades de nucleòtid. Això pot explicar que tant les cèl·lules del cec com les del jejú aïllades amb EDTA presentin poc ATP.

El citrat pot afectar la glicòlisi (RANDLE *et al.*, 1968) ja que és un inhibidor de l'enzim fosfofructokina-sa. PRITCHARD i LEE (1972) en experiments *in vitro* en mucosa aïllada de pollastre, incubada en presència de citrat trisòdic a concentracions de fins a 50 mmol/l, aquest agent no afecta la producció d'àcid làctic a partir de glucosa. Segons PRIOR *et al.* (1974) aquesta absència d'efecte del citrat podria ésser deguda a que el pH del medi d'incubació determinés un estat d'ionització del citrat que no li permetés la penetració dins la cèl·lula.

Tal com s'observa a les taules VIII i IX, el consum d'oxigen presenta una bona correlació amb els nivells

REALITZADES PER DETERMINAR EL MILLOR MEDI D'AÏLLAMENT

PROVA DE VIABILITAT	MEDI D'AÏLLAMENT		
	HIALURONIDASA 0,5 g/l	CITRAT TRISODIC 27 mmol/l	EDTA 5 mmol/l
INTEGRITAT DE LA LA MEMBRANA CEL·LULAR (%)	46,9 ± 0,8 (3)	63,0 ± 0,1 (3)	48,0 ± 3,2 (3)
CONSUM D'OXIGEN (Q_{O_2} , µl/mg proteïna · h)	25,7 ± 3,7 (4)	16,1 ± 0,4 (4)	17,1 ± 1,8 (6)
PRODUCCIO D'ACID LACTIC (Q_L , nmol/mg proteïna · h)	734,7 ± 103,8 (5)	1072,7 ± 217,7 (5)	633,8 ± 71,6 (8)
NIVELLS D'ATP (nmol/mg proteïna, a temps 0 min)	3,1 ± 1,0 (4)	0,9 ± 0,1 (6)	0,9 ± 0,2 (4)
ACUMULACIO D' α -MG 0,1 nmol/l ALS 60 min (nmol/mg proteïna)	12,1 ± 1,0 (8)	26,0 ± 1,8 (10)	14,9 ± 0,6 (4)

Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard, essent el número entre parèntesis, el nombre de dades.

TAULA IX .- RESULTATS OBTINGUTS EN CEL·LULES DEL CEC A LES PROVES DE VIABILITAT
REALITZADES PER DETERMINAR EL MILLOR MEDI D'AILLAMENT

PROVA DE VIABILITAT	MEDI D'AILLAMENT		
	HIALURONIDASA 0,5 g/l	CITRAT TRISODIC 27 mmol/l	EDTA 5 mmol/l
INTEGRITAT DE LA MEMBRANA CEL·LULAR (%)	49,7 ± 2,8, (4)	67,6 ± 3,7 (3)	66,8 ± 6,1 (3)
CONSUM D'OXIGEN (Q_{O_2} , μ l/mg proteïna · h)	17,2 ± 2,0 (5)	15,2 ± 1,8 (5)	11,6 ± 1,3 (6)
PRODUCCIÓ D'ACID LACTIC (Q_L , nmol/mg proteïna · h)	1218,6 ± 77,1 (7)	852,2 ± 92,5 (6)	846,0 ± 55,9 (6)
NIVELLS D'ATP (nmol/mg proteïna, a temps 0 min)	1,3 ± 0,5 (3)	4,4 ± 0,7 (3)	1,5 ± 0,4 (3)
ACUMULACIÓ D' α -MG 0,1 mmol/l ALS 60 min (nmol/mg proteïna)	3,7 ± 0,7 (10)	10,6 ± 0,4 (6)	4,9 ± 0,4 (6)

Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard, essent el número entre parèn-
tesis, el nombre de dades.

d'ATP i la producció d'àcid làctic, excepte en el cec sencer, on les cèl.lules aïllades amb hialuronidasa consumeixen igual quantitat d'oxigen que les obtingudes amb citrat. Seguint aquests criteris, sembla, doncs, que metabòlicament les cèl.lules amb una millor funcionalitat serien, per al cec, les aïllades amb citrat i per al jejú, les obtingudes amb hialuronidasa. Malgrat això, tots els paràmetres considerats individualment, presenten bons resultats en ambdós segments intestinals.

Si, a més, hom té en compte la integritat de la membrana cel.lular i l'acumulació d' α -MG, que han resultat ésser significativament superiors per a les cèl.lules aïllades amb citrat, el medi d'elecció per al cec, indubtablement és el que conté citrat. En el cas del jejú, tenint en compte que el que es pretenia era relitzar un estudi sobre la capacitat d'acumulació de sucres, és fàcil inclinar-se cap a un medi, que en aquest camp presenta més avantatges. A més, tenint en compte que els resultats obtinguts en el cec sempre es comparen amb els del jejú, es lògic utilitzar per a ambdós segments el mateix medi d'aïllament.

Així doncs, el medi d'aïllament d'elecció per a l'obtenció de cèl.lules del cec i del jejú ha resultat ésser el que conté citrat trisòdic per la qual cosa ha estat l'utilitzat en les experiències posteriors.

Un cop triat el medi d'aïllament idoni, es va realitzar el seguiment del procés d'aïllament de les cèl.lules epitelials al MER i al MET.

Als 5 min de tractament del teixit amb el medi d'aïllament, les cèl.lules es comencen a desprendre en forma de làmines (fotografia 18a) tal com també observaren al mi-

croscopi òptic en jejú de rata STERN, (1966), IEMHOFF *et al.* (1970), TOWLER *et al.* (1978) i HARTMANN *et al.* (1982). Als 30 min de tractament (fotografies 18d i 18e) les vellositats ja estan completament pelades i segons les imatges obtingudes sembla ésser que no s'aïllen cèl·lules de la cripta.

Pel que fa a les cèl·lules ja aïllades, observades al MER i MET, apareixen individualitzades si bé encara resten algunes làmines. Observacions remarcables són que aquestes cèl·lules mantenen la seva morfologia (fotografies 19 i 20) i la seva ultraestructura (fotografia 21), fet de gran interès puix que indica que els elements cel·lulars han sofert poques alteracions durant el procés d'aïllament. Aquests resultats concorden (i, de fet, complementen) els referents al metabolisme cel·lular.

Cal afegir que, igualment com STERN i REILLY (1965), IEMHOFF *et al.* (1970) i TOWLER *et al.* (1978), no s'han trobat bacteris a la suspensió cel·lular.

Tal com s'ha observat a l'apartat 2, referent a la morfologia i histologia dels cecs de pollastre, aquest segment intestinal presenta un epiteli no homogeni, havent pogut diferenciar tres zones: proximal, medial i distal.

La diferent morfologia de les zones cecals esmentades, sobretot pel que fa a la llargària de les vellositats i de les microvellositats, sembla correspondre's també, amb una diferent funcionalitat de llurs enteròcits. Així, les cèl·lules aïllades del cec distal, no són capaces d'acumular α -MG en contra de gradient. L'acumulació del substrat en els enteròcits del cec medial és 8 vegades l'obtinguda en les cèl·lules tractades amb florricina, mentre que en el cec proximal, l'acumulació

d' α -MG és del mateix ordre que l'obtinguda en el jejú (58 vegades l'obtinguda amb florricina per al cec proximal i 40 vegades per al jejú).

Així doncs, les cèl.lules procedents de les zones intestinals on les vellositats són ben desenvolupades (cec proximal i jejú) poden transportar monosacàrids per un procés sensible a la florricina. Aquestes cèl.lules són, a més, les que presenten les microvellositats més llargues (figura 2). Per això podria existir una relació entre l'acumulació i la superfície de la membrana cel.lular, probablement correlacionada amb un major nombre de transportadors.

Els resultats obtinguts a l'apartat 3.4.2.5., referents a l'acumulació d' α -MG en cèl.lules procedents del cec sencer aïllades amb citrat, es poden interpretar a la vista dels obtinguts en les diverses zones cecals. El valor d'acumulació d' α -MG en el cec sencer correspon a la mitjana de la capacitat per acumular monosacàrids, determinada individualment a les zones cecals. És a dir, en ésser l'acumulació en el cec medial i distal molt inferior a la del cec proximal, quan s'estudia l'acumulació en els segment sencer la gran capacitat de transport del cec proximal resta emmascarada per aquelles. Aquesta podria ésser la raó per la qual el mecanisme de transport mitjançat concentratiu per a monosacàrids, present en el cec proximal, passà desapercebut per a HOLDSWORTH i WILSON (1967) en animals de més d'una setmana d'edat. També cal tenir en compte que aquests autors no especifiquen la zona del cec emprada. Així doncs, bé podria ésser que tan sols consideressin aquestes segones en les que la capacitat de transport estigués reduïda, tal com la medial i distal, per la qual cosa seria explicable que no trobessin acumulació de monosacàrids en animals ja desenvolupats. A més, la tècnica emprada per HOLDSWORTH i WILSON (1967), consistent en la incubació de segments anulars intestinals, presenta l'inconvenient que en haver-hi una gran proporció de teixit no epitelial, es distor-

siona la capacitat d'acumulació de les cèl.lules epitelials.

Segons CLARKE (1978) la presència, en el cec proximal, de vellositats molt ben desenvolupades que pràcticament tanquen la llum intestinal, fa que en aquesta zona es produïxi la filtració del material que entra en els cecs. D'aquesta manera, el contingut intestinal, en travessar aquesta zona, està en íntim contacte amb l'epiteli. Per això, hom pot pensar que gràcies a la disposició de les vellositats i a l'existència del mecanisme de transport actiu per a monosacàrids, gran part de la glucosa que entra en els cecs sigui absorbita ja en el cec proximal.

Si a més hom té en compte que els cecs s'omplen amb material procedent tant de l'ili com de recte (BROWNE, 1922; SKADHAUGE, 1968 i AKESTER *et al.*, 1976), en la zona proximal es produïria l'absorció dels nutrients que han escapat a l'absorció a l'intestí prim. Aquesta funció de recuperació seria anàloga a la proposada per LERNER *et al.* (1975) per a l'ili.

D'aquesta manera, els cecs podrien tenir un paper de primer ordre en la nutrició del pollastre afavorint l'absorció d'aquells sucres que no hagin pogut ésser captats a l'intestí prim o bé els resultants de la hidròlisi de polímers de la glucosa que es produeix en els cecs a càrrec de la flora bacteriana present en aquest segment intestinal (RADEFF, 1928 i MANGOLD, 1934). La glucosa alliberada en aquest procés seria absorbida en el cec proximal en el decurs del buidament cecal, ja que prèviament haurà de travessar aquesta zona.

Pel que fa a l'estudi regional realitzat en animals

adults (16 setmanes d'edat), s'observa que el cec medial ja ha perdut la seva capacitat per acumular monosacàrids per un procés sensible a la florricina. En canvi, les cèl.lules del cec proximal segueixen acumulant α -MG en la mateixa mesura que ho fa el jejú (taula V). En aquestes dues zones, però, la capacitat de transport ha minvat notablement respecte als animals d'edats compreses entre les 4 i les 7 setmanes. Aquest fet coincideix amb les dades del jejú, obtingudes per la majoria d'autors que troben una disminució en la capacitat d'acumulació per a monosacàrids al llarg del desenvolupament (BOGNER, 1961; BOGNER i HAINES, 1964; LERNER *et al.*, 1976; RAHEJA *et al.* (1977), SHEHATA *et al.*, 1981 i PLANAS *et al.*, 1982). Aquesta pèrdua, observada al llarg del desenvolupament, en ésser paral.lela en el jejú i en el cec proximal, posa demanifest que aquest darrer segment intestinal segueix exercint la seva funció de transport en els animals adults.

Pel que fa a l'estudi cinètic realitzat per a l' α -MG en animals de 4 a 7 setmanes d'edat, en les cèl.lules del cec distal els fluxos d' α -MG en presència de concentracions creixents de monosacàrid no es veuen afectats per la presència de florricina (figura 32). Aquest fet, juntament amb els resultats obtinguts sobre l'acumulació d' α -MG a temps llargs, indica doncs la inexistència, en aquest segment intestinal, d'un mecanisme de transport mitjançat concentratiu per a l' α -MG, sensible a la florricina. Conseqüentment, en no existir aquest mecanisme no se n'han pogut calcular les constants cinètiques de transport.

Per als altres segments intestinals, les constants s'han determinat mitjançant el mètode de WILKINSON (1961), que permet fer una estimació acurada de la K_m i de la V_m i proporciona una mesura de la precisió de les determinacions, a diferència dels mètodes gràfics.

Les cèl.lules del cec proximal i les del jejú presenten una afinitat semblant per l' α -MG, ja que la Km per a aquest monosacàrid no difereix significativament en ambdós segments intestinals (taula VI). En canvi, en el cec medial la Km per l' α -MG és molt més elevada per la qual cosa cal deduir que l'afinitat dels enteròcits d'aquest segment per al substrat és molt més baixa que la del cec proximal i del jejú.

Pel que fa a la Vm, aquesta constant és significativament diferent per als tres segments estudiats, essent l'ordre: cec medial > jejú > cec proximal. Malgrat les diferències abans esmentades, la Vm del cec proximal és més propera a la del jejú que no pas a la del cec medial (taula VI).

Les constants de difusió, que també es mostren a la taula VI, no difereixen significativament en les quatre regions estudiades, de la qual cosa es pot concloure una mateixa permeabilitat passiva per l' α -MG.

Així doncs, mitjançant la determinació de les constants cinètiques per l' α -MG es posa de manifest, una vegada més, la similitud existent entre el cec proximal i el jejú. En aquests dos segments intestinals hi ha, doncs, un mecanisme de transport actiu per l' α -MG d'elevada afinitat i capacitat relativament baixa, sobretot si hom les compara amb les del cec medial. En aquesta porció cecal, l'afinitat per l' α -MG és molt baixa i la capacitat, envers aquest mateix monosacàrid és molt elevada. En el cec distal, mitjançant la tècnica de les cèl.lules aïllades, no ha estat possible posar de manifest cap sistema de transport per a l' α -MG, sensible a la florricina.

Les cèl.lules aïllades del cec proximal es caracteritzen, doncs, perquè presenten una capacitat d'acumu-

lació i unes constants cinètiques per a l' α -MG, molt més pròximes a les del jejú que no pas a les de la resta del cec. Aquest fet i la importància nutricional que se'n deriva ens varen circumscriure a l'estudi i caracterització dels processos presents a la membrana de l'enteròcit implicats en l'absorció de monosacàrids, en aquest segment intestinal.

De primer, es va estudiar el transport mitjançat concentratiu de la membrana luminal i tot un seguit de propietats que el defineixen: inhibició per florricina, dependència de l'energia metabòlica, dependència de l'ió sodi, inhibició per oabaïna i competència entre monosacàrids.

Una de les característiques fonamentals del sistema de transport actiu és que dóna lloc a l'acumulació de sucres en contra de gradient de concentració. Si hom té en compte que el volum cel·lular dels enteròcits del cec proximal és de $3,73 \mu\text{l}/\text{mg}$ proteïna, aleshores, la concentració intracel·lular d' α -MG, als 60 min d'incubació, és de $7,9 \text{ mmol}/\text{l}$, les cèl·lules del cec proximal són, doncs, capaces d'acumular α -MG en contra de gradient de concentració, assolint una concentració intracel·lular 79 vegades més gran que la del medi d'incubació.

La florricina, inhibidor competitiu del transport actiu de sucres, redueix un 98 % el flux inicial d' α -MG en el cec proximal i un 94 % en el jejú (figura 43). Aquests resultats són similars als de KIMMICH i RANGLES (1981) que troben un 98 % d'inhibició. Per tant, en presència de florricina $0,2 \text{ mmol}/\text{l}$, tot el transport actiu està inhibit i l'entrada d' α -MG dins la cèl·lula es produeix tan sols per difusió simple. Als 60 min d'incubació de les cèl·lules del cec proximal en presèn-

cia d'aquest inhibidor (figura 27), la concentració intracel·lular d' α -MG assolida és el resultat de l'equilibrament entre el medi d'incubació i el citosol. En aquestes condicions, la concentració dins la cèl·lula hauria d'ésser teòricament de 0,1 mmol/l. Els nostres resultats en el cec proximal s'hi acosten molt ja que la concentració intracel·lular d' α -MG ha resultat ésser de 0,14 mmol/l. La desviació observada respecte a la concentració d' α -MG existent originàriament en el medi d'incubació (0,1 mmol/l) pot ésser deguda, entre d'altres raons, a l'evaporació d'aquest medi amb la consegüent concentració del monosacàrid. D'aquesta manera, la concentració d' α -MG dins les cèl·lules tractades amb florricina ha d'ésser, lògicament superior.

La dependència del transport mitjançat concentratiu de l'energia metabòlica es posa de manifest en incubar les cèl·lules amb DNP. Als 60 min d'incubació, tant en el cec proximal com en el jejú, la presència d'aquest agent redueix l'acumulació de 3-OMG 0,1 mmol/l fins a nivells semblants als obtinguts amb florricina. En presència de l'inhibidor, les cèl·lules del cec proximal són capaces encara, als 10 min d'incubació, d'acumular 3-OMG en contra de gradient de concentració (figura 37). KIMMICH (1970a) en cèl·lules del jejú també observa aquest fenomen i l'atribueix a que el DNP requereix un determinat temps per a dissipar el gradient electroquímico.

Pel que fa a la dependència del ió sodi, a mesura que la seva concentració augmenta en el medi d'incubació també ho fa l'acumulació d' α -MG, tant en les cèl·lules del cec proximal com en les del jejú (figures 33 i 34). En absència de Na^+ , però, l'acumulació de sucre és superior a l'obtinguda en presència de Na^+ i florricina, la qual cosa es contradiu amb la idea generalitzada que no pot existir cotransport de monosacàrids i Na^+ en ab-

sència d'aquest darrer.

Segons ALVARADO i LHERMINIER (1982), quan hom treballa amb teixit sencer, en absència de Na^+ , en realitat, a la vora "en raspall" hi resta l'anomenat reservori de Na^+ . ROBINSON *et al.* (1983) han calculat que a l'intestí de conill d'Indies, aquesta reserva pot arribar a ésser de 4,6 mmol/l. Per a ALVARADO i LHERMINIER (1982) aquest Na^+ és el responsable dels resultats obtinguts per diferents autors, referents a l'efecte del Na^+ sobre les constants cinètiques del transport actiu (vegeu apartat 3.1.3.). En les preparacions de teixit sencer aquest reservori extracel·lular procedeix de l'activitat de la bomba de Na^+ i K^+ , tot travessant després les unions intercel·lulars, o també de la secreció electroneutra de NaCl (ALVARADO i LHERMINIER, 1982). Així doncs, aquest Na^+ és de procedència intracel·lular i és cedit per la cèl·lula al llarg de la incubació.

En el cas de les cèl·lules aïllades, el Na^+ podria procedir també dels dipòsits intracel·lulars si bé cal tenir en compte que l'aïllament d'aquestes cèl·lules s'ha dut a terme en presència de Na^+ 80 mmol/l i, degut a la particular morfologia de la vora "en raspall", capaç de retenir grans quantitats de líquid, hi podria haver restat una determinada quantitat d'aquest catió, que contribuiria a la formació d'aquest reservori extracel·lular.

Tal com era d'esperar en un mecanisme dependent de Na^+ , el transport mitjançat concentratiu de monosacàrids, tant en el cec proximal com en el jejú, és sensible a l'ouabaïna. Als 60 min d'incubació, aquest agent redueix en ambdós segments intestinals l'acumulació de 3-OMG fins a nivells semblants als obtinguts amb floricina i DNP. En el jejú, la inhibició és pràcticament

instantània, mentre que, en el cec proximal, les cèl.lules poden acumular monosacàrid en contra de gradient de concentració, fins als 50 min d'incubació, presentant-se un màxim als 10 min. El perfil de l'acumulació en presència d'ouabaïna, en el cec proximal és molt semblant a l'obtingut per KIMMICH (1970a) en el jejú. En aquest mateix treball, aquest autor fa menció de la rapidesa amb la qual l'ouabaïna dissipa el gradient electroquímic i redueix, per tant, l'acumulació del substrat. EDMONDS i MARRIOT (1968) observen que l'ouabaïna, als 10 min d'incubació, ja anula pràcticament el potencial de membrana i SEPÚLVEDA *et al.* (1982) observen com, després de 2 o 3 min d'iniciada la incubació, l'ouabaïna ja redueix la concentració intracel·lular de K^+ , la qual cosa atribueixen a la inhibició de la bomba de Na^+ i K^+ . Així no és d'estranyar, doncs, la rapidesa amb la que l'ouabaïna provoca una reducció de l'acumulació de monosacàrids. Per altra banda, el fet que el jejú, en presència d'ouabaïna, hagi perdut, ja als 10 min d'incubació, la capacitat per acumular 3-OMG en contra del gradient de concentració, a diferència dels resultats obtinguts per KIMMICH (1970a), podria ésser degut a que aquest darrer autor utilitza l'ouabaïna a una concentració inferior (0,1 mmol/l).

La competició de diferents monosacàrids per un mateix transportador, ja ha estat demostrada extensivament a l'intestí prim (GOLDNER *et al.*, 1969 i KIMMICH, 1975) i en aquest treball s'ha posat de manifest en les cèl.lules del cec proximal.

Tal com s'observa a les figures 35 i 36, la presència de 3-OMG 10 mmol/l, redueix tant en el cec proximal com en el jejú, l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en un 87 % en el primer i en un 86 % en el segon. En afegir la 3-OMG als 25 min d'incubació s'observa com la concentració intracel·lular d' α -MG decreix fins a nivells semblants als obtinguts

quan la 3-OMG hi és present des de l'inici de la incubació. Aquest fet aporta una altra prova que les cèl.lules del cec proximal són capaces d'acumular monosacàrids en contra de gradient de concentració. La presència de 3-OMG, a elevades concentracions, en impedir l'entrada d' α -MG per transport actiu i tenint en compte que, als 25 min d'incubació, la concentració d' α -MG dins les cèl.lules és superior a la del medi, aquest monosacàrid passa per difusió simple des de l'interior de la cèl.lules cap a l'exterior, a favor del gradient de concentració.

Pel que fa a les propietats de la difusió facilitada, en els enteròcits del cec proximal l'existència d'aquest mecanisme es fa ja evident en la diferent acumulació obtinguda amb α -MG i 3-OMG.

Als 60 min d'incubació, l'acumulació d' α -MG 0,1 mmol/l en el cec proximal (figura 27) és de 29,47 nmol/mg proteïna i la de 3-OMG 0,1 mmol/l (figura 37) de 17,78 nmol/mg proteïna. Aquesta diferència, estadísticament significativa, és deguda a que l' α -MG, al contrari de la 3-OMG, no utilitza la via de la difusió facilitada de la membrana basolateral (KIMMICH i RANGLES, 1981). D'aquesta manera, a l'estat estacionari (que en el cas de l' α -MG no s'arriba a assolir en els 60 min d'incubació), la 3-OMG surt de l'enteròcit per difusió facilitada i aquesta pèrdua de monosacàrid fa que la concentració intracel.lular sigui més petita que l'assolida amb α -MG.

De la mateixa manera, l'existència d'aquesta via també es pot posar de manifest amb la utilització d'inhibidors específics. Un exemple n'és la teofil·lina que inhibeix la difusió facilitada de monosacàrids a través de la membrana basolateral. Les cèl.lules incubades amb un substrat que utilitzi la via independent de Na^+ (com la 3-OMG) estableixen, en presència de teofil·lina, un nou estat estacionari en el qual la concentració intracel.lular

de monosacàrid és superior a l'obtinguda en absència de l'inhibidor.

En el cec proximal, però, la teofil.lina no exerceix cap efecte sobre l'acumulació de 3-OMG (figura 39) mentre que en el jejú incrementa aquest paràmetre en un 35 % respecte als valors control (figura 40). Aquesta manca d'efecte sobre la difusió facilitada en el cec proximal va induir a l'anàlisi més directa d'aquesta via, ja que fa pensar que, o bé la difusió facilitada de monosacàrids en els enteròcits cecals és poc sensible a la teofil.lina, o bé que en aquestes cèl.lules el nombre de transportadors és petit comparat amb el jejú. Per això, es varen estudiar els fluxos unidireccionals d'entrada de 2-DOG 0,1 mmol/l, sucre no metabolitzable específic d'aquest mecanisme de transport (KIMMICH i RANGLES, 1976), estudiant-hi l'efecte de la teofil.lina. Els resultats, que es mostren a les figures 46 i 47, indiquen que aquest agent redueix el flux de 2-DOG en un 50 % en el cec proximal i en un 72 % en el jejú. Així doncs, en el cec proximal, la teofil.lina, inhibeix la difusió facilitada, tal com se n'extrau de la reducció que provoca dels fluxos de 2-DOG, si bé menys que en els enteròcits del jejú. El seu efecte, però, no es evident sobre l'acumulació de 3-OMG a temps llargs.

Aquests fets varen fer pensar en la possibilitat que, a més d'interaccionar sobre la via de la difusió facilitada, ho fes també sobre el transport mitjançat concentratiu. Així, doncs, es va estudiar l'efecte de la teofil.lina sobre els fluxos unidireccionals d' α -MG. En el cec proximal, aquests quedaven reduïts en un 23 % per la presència d'aquest agent mentre que en el jejú no es veien afectats (figura 44). KIMMICH i RANGLES (1981) i MORETO *et al.* (1984) tampoc observen cap efecte de la teofil.lina sobre els fluxos d' α -MG en el jejú de pollastre.

La inhibició del transport mitjançat concentratiu en el cec proximal per part de la teofil·lina és un fet notable, ja que és la primera vegada que aquest efecte s'observa en cèl·lules epitelials intestinals. Aquesta inhibició permet explicar que la incubació de les cèl·lules cecals amb l'inhibidor no doni lloc a cap increment en el gradient d'acumulació de 3-OMG a temps llargs, ja que la inhibició de la permeabilitat basolateral es veu contrarrestada per l'efecte sobre l'entrada dependent de Na^+ sensible a la florricina.

Aleshores, es va emprar un altre inhibidor de la difusió facilitada, la citocalasina B, que a més es caracteritza perquè no afecta els nivells d'AMPc, com fa la teofil·lina i ésser més potent com a inhibidor de la via de transport basolateral (KIMMICH i RANGLES, 1979).

L'efecte de la citocalasina B 0,1 mmol/l sobre l'acumulació de 3-OMG és d'un 43 % en el cec proximal i d'un 127 % en el jejú (figures 41 i 42). Tal com era d'esperar, aquest agent va resultar ésser un millor inhibidor dels fluxos de 2-DOG, causant una reducció del 80 % del flux d'entrada del substrat en el cec proximal i del 72 % en el jejú (figures 48 i 49).

La citocalasina B no va provocar cap efecte sobre els fluxos d' α -MG en ambdós segments intestinals (figura 45), la qual cosa fa pensar que no interacciona amb el mecanisme de transport mitjançat concentratiu de la membrana luminal.

A la vista del que precedeix, les cèl·lules del cec proximal són caracteritzades per uns mecanismes de transport actiu, difusió facilitada i difusió simple qualitativament anàlegs als del jejú però amb una participació quantitativament diferent en l'absorció de monosacàrids.

Del punt de vista de la quantificació dels processos analitzats, els valors dels fluxos inicials d' α -MG per transport actiu són notablement més elevats en el cec proximal (1,34 nmol/mg proteïna · min) que no pas en el jejú (0,65 nmol/mg proteïna · min). Aquest paràmetre ha estat calculat per diferència entre el flux total i el flux insensible a la florricina. Per altra banda, els fluxos inicials de 2-DOG per difusió facilitada, calculats per diferència entre el flux total i el flux insensible a la citocalasina B, són més grans en el jejú (0,14 nmol/mg proteïna · min) que no pas en el cec proximal (0,08 nmol/mg proteïna · min). D'aquesta manera, l'entrada de monosacàrids des de la llum intestinal fins a l'interior de l'enteròcit, a través de la vora luminal, és més gran en el cec proximal. En canvi, la transferència del substrat des de l'enteròcit fins al medi extracel·lular, a través de la vora basolateral, és més gran en el jejú.

Aquestes diferències observades entre ambdós segments intestinals, es tradueixen en una diferent capacitat d'acumulació per a un monosacàrid, tal com la 3-OMG que utilitza ambdues vies. Als 60 min d'incubació, l'acumulació de 3-OMG a les cèl·lules del cec proximal és de 17,78 nmol/mg proteïna i en les del jejú és de 8,92 nmol/mg proteïna. Així doncs, en el cec proximal hi ha un predomini de l'entrada del substrat dins la cèl·lula per la qual cosa l'acumulació és més gran i, a més, l'estat estacionari, en el cec proximal ho s'arriba a assolir mentre en el jejú ja és present als 40 min d'incubació.

Globalment, els nostres resultats mostren que la zona proximal del cec de pollastre té una capacitat de transport similar a la del jejú. Degut a que la superfície d'exposició de l'intestí prim és moltes vegades més gran que la del cec proximal, la contribució del cec proximal al transport de no-electròlits ha d'ésser proporcionalment petita. Tan-

mateix, els cecs poden tenir importància en l'absorció d'aquells monosacàrids que no s'hagin pogut absorbir a l'intestí prim o bé als resultants de la hidròlisi de polímers de la glucosa, que s'originen dins d'aquests segments intestinals.

5. CONCLUSIONS

1. Macroscòpicament, els cecs de pollastre presenten dues zones ben diferenciades. El segment proximal, semblant a l'intestí prim i el segment medial-distal, que presenta una estructura pròpia caracteritzada pels *plicae circulares*, absents a la resta del tracte digestiu.
2. Aquesta diferenciació regional també es manifesta a nivell microscòpic. En la zona proximal del cec, les vellositats són ben desenvolupades mentre que en les zones medial i distal, hi ha unes estructures romes i aplanades equivalents a les vellositats.
3. La llargària de les vellositats decreix des del jejú fins al recte, essent les del cec proximal d'una mida intermèdia. En aquesta zona, les vellositats són el·lipsoïdals i presenten una densitat inferior respecte als altres segments intestinals estudiats.
4. Pel que fa el desenvolupament de les microvellositats, les dels enteròcits del jejú són les més llargues i més gruixudes, mentre que en el cec, les de la zona proximal són les més llargues i primes i en el cec distal són les més curtes i gruixudes, essent les del cec medial de dimensions intermèdies.
5. Les cèl.lules caliciformes i enterocromafines del cec no difereixen significativament de les del jejú.

6. Les cèl.lules del cec sencer aïllades amb hialuronidasa presenten un mecanisme de transport mitjançat concentratiu per a la 3-OMG sensible a la florricina. Les cèl.lules cècals presenten una capacitat per transportar en contra de gradient que és un 67 % inferior a la del jejú.
7. A partir dels resultats obtinguts en la prova de la integritat de la membrana cel.lular, consum d'oxigen, producció d'àcid làctic, nivells d'ATP i capacitat per acumular sucres, s'ha triat el medi que conté l'agent disgregant citrat trisòdic 27 mmol/l com a medi d'aïllament idoni per obtenir cèl.lules del cec.
8. Als 30 min d'incubació dels segments del cec proximal i del jejú en el medi d'aïllament amb citrat, les vello-sitats queden despreses de totes les cèl.lules epite-lials.
9. L'observació microscòpica de les cèl.lules aïllades del cec proximal i del jejú amb citrat, demostra que es troben morfològicament i estructural en bones condi-cions.
10. De l'estudi regional realitzat sobre la capacitat dels cecs per acumular monosacàrids, hom pot concloure que l'acumulació d' α -MG en les cèl.lules del cec proximal no difereix significativament de l'obtinguda en el jejú.
11. El fluxos unidireccinals d' α -MG per transport actiu són més petits en el jejú (51%) que en el cec proxi-mal.
12. La capacitat de les cèl.lules del cec medial per acumu-lar α -MG és 8 vegades inferior a l'obtinguda en el cec proximal.

13. En les cèl.lules del cec distal, l'acumulació d' α -MG no difereix de l'obtinguda en presència de florricina.
14. En tots els segments cecals, així com en el jejú, l'acumulació obtinguda en presència de florricina no varia significativament, per la qual cosa les diferències regionals observades són degudes al transport mitjançat concentratiu.
15. En els animals adults, el cec proximal i el jejú transporten monosacàrids per un mecanisme actiu sensible a la florricina. Les cèl.lules del cec medial ja han perdut aquesta capacitat. En tots els segments estudiats, l'acumulació és significativament inferior a l'observada en els animals de 4 a 7 setmanes.
16. Pel que fa a les constants cinètiques, les cèl.lules del cec proximal i les del jejú presenten unes Km per l' α -MG que no difereixen significativament. Les cèl.lules del cec distal es caracteritzen perquè no presenten un mecanisme de transport actiu per l' α -MG. L'afinitat per aquest monosacàrid, en el cec medial, és molt inferior a la del cec proximal i del jejú, ja que la Km és més elevada que en aquests segments intestinals.
17. La V_m , per l' α -MG és més gran en el cec medial que en jejú i la d'aquest segment, a la vegada, és més gran que la del cec proximal.
18. La constant de difusió és igual per a tots els segments estudiats.
19. Altres característiques del sistema de transport actiu per a monosacàrids del cec proximal són, igual com el jejú, que les cèl.lules cecals poden acumular sucres en contra de gradient de concentració per un mecanisme dependent de la con-

centració de l'ió sodi present en el medi d'incubació, dependent de l'energia metabòlica, inhibible per ouabaina i que presenta competició entre diversos monosacàrids.

20. Les cèl.lules del cec proximal, així com les del jejú presenten un mecanisme de transport mitjançat equilibratiu sensible a la teofil·lina i a la citocalasina B, essent aquest darrer un inhibidor més potent.
21. El sistema de transport actiu del cec proximal és en part inhibit per la presència de teofil·lina, no observant-se aquest efecte en el jejú.
22. Els fluxos inicials d'entrada per la via de la difusió facilitada, mesurats amb 2-DOG són un 75 % més grans en el jejú que en el cec proximal.
23. El resultat més sobresortint d'aquest treball és que l'epiteli cecal no és homogeni, tant pel que fa a la seva histologia com a la seva capacitat per transportar monosacàrids. La notable capacitat de transport de la zona proximal confereix a aquest segment intestinal un paper potencial en la nutrició del pollastre.

6. BIBLIOGRAFIA

- AITKEN, R.N.C. (1958),
A histochemical study of the stomach and intestine of the chicken,
J. Anat., 92, 453-456.
- AKESTER, A.R. (1976),
Renal portal shunts in the kidney of the domestic fowl,
J. Anat., 101, 569-594.
- ALVARADO, F. (1966),
D-Xylose active transport in the hamster small intestine,
Biochim. Biophys. Acta, 112, 292-303.
- ALVARADO, F. (1967),
Hypothesis for the interaction of phloridzin and phloretin with
membrane carriers for sugars,
Biochim. Biophys. Acta, 135, 483-495.
- ALVARADO, F. (1985),
Comunicación personal.
- ALVARADO, F. i CRANE, R.K. (1962),
Phoridzin as a competitive inhibitor of the active transport of
sugars by hamster small intestine, *in vitro*,
Biochim. Biophys. Acta 56, 170-172.
- ALVARADO, F. i CRANE, R.K. (1964),
Studies on the mechanism of intestinal absorption of sugars.
VII. Phenylglucoside transport and its possible relationship to
phloridzin inhibition of the active transport of sugar by the
small intestine,
Biochim. Biophys. Acta, 93, 116-135.
- ALVARADO, F. i LHERMINIER, M. (1982),
Phenylalanine transport in guinea pig jejunum. A general mechanism
for organic solute and sodium cotransport,
J. Physiol. (Paris), 78, 131-145.
- ALVAREZ, R. (1976),
Caracteres morfológicos del aparato digestivo de pollos alimen-
tados con dietas de miel final,
Rev. cubana Cienc. agríc., 10, 307-312.

- ANDERSON, J.W. (1974),
Glucose metabolism in jejunal mucosa of fed, fasted, and streptozotocin-diabetic rats,
Am. J. Physiol., 226, 226-229.
- ANDREW, A. (1976),
Intestinal endocrine cells of chick around the time of hatching,
Cell Tiss. Res., 172, 541-551.
- ANNISON, E.F.; HILL, K.J. i KENWORHTY, R. (1968),
Volatile fatty acids in the digestive tract of the fowl,
Br. J. Nutr., 22, 207-216.
- BARRY, R.J.C.; SMYTH, D.H. i WRIGHT, E.M. (1965),
Short-circuit current and solute transfer by rat jejunum,
J. Physiol. (Lond.), 181, 410-431.
- BATT, H.E. (1925),
A study of the normal histology of the fowl,
Report of the Ont. Vet. College, 21-31.
- BAYER, R.C.; CHAWAN, C.B.; BIRD, F.H. i MUSGRAVE, S.D. (1975),
Characteristics of the absorptive surface of the small intestine in the chicken from 1 day to 14 weeks of age,
Poultry Sci., 54, 155-169.
- BAYER, R.C.; CHAWAN, C.B. i BRYAN, T.A. (1976),
Cecal mucosal response to coccidiosis in growing chickens,
Poultry Sci., 55, 1020-1025.
- BEFUS, A.D.; JOHNSTON, N.; LESLIE, D.A. i BIENENSTOCK, J. (1980),
Gut-associated lymphoid tissue in the chicken,
J. Immunol., 125, 2.626-2.632.
- BIHLER, I. i CRANE, R.K. (1962),
Studies on the mechanism of intestinal absorption of sugars:
The influence of several cations and anions on the active transport of sugars, *in vitro*, by various preparations of hamster small intestine,
Biochim. Biophys. Acta, 59, 78-93.
- BIHLER, I. i CYBULSKI, R. (1973),
Sugar transport at the basal and lateral aspect of the small intestinal cell,
Biochim. Biophys. Acta, 298, 429-433.

- BOGNER, P.H. (1961),
Alimentary absorption of reducing sugars by embryos and young chicks,
Proc. Soc. esp. Biol. Med., 107, 263-265.
- BOGNER, P.H. i HAINES, I.A. (1964),
Functional development of active sugar transport in the chick intestine,
Am. J. Physiol., 207, 37-41.
- BOSAKOVA, J. i CRANE, R.K. (1965),
Studies on the mechanism of intestinal absorption of sugars. VIII. Cation inhibition of active sugar transport and $^{22}\text{Na}^+$ influx into hamster small intestine *in vitro*,
Biochim. Biophys. Acta, 102, 423-435.
- BRASITUS, T.A. (1982),
Isolation of proliferative epithelial cells from the rat cecum and proximal colon,
Anal. Biochem., 123, 364-372.
- BRONK, J.R. i LEESE, H.J. (1973),
Changes in the adenine nucleotide content of preparations of the rat small intestine *in vitro*,
J. Physiol. (Lond.), 235, 183-196.
- BROT-LAROCHE, E. i ALVARADO, F.
Mechanisms of sugar transport across the intestinal brush border membrane,
In Intestinal Transport, eds. M. Gilles-Baillien i R. Gilles, Springer-Verlag, Berlin, 1983, 147-169.
- BROWNE, T.G. (1922),
Some observations on the digestive system of the fowl,
J. Comp. Pathol., 35, 12-32.
- CALHOUN, M.L. (1932),
The microscopic anatomy of the digestive tract of *Gallus domesticus*,
Iowa State College J. Sci., 7, 261-381.

- CARTER-SU, C. i KIMMICH, G.A. (1979),
Membrane potentials and sugar transport by ATP-depleted intestinal cells: Effect of anion gradients,
Am. J. Physiol., 237, C67-C74.
- CARTER-SU, C. i KIMMICH, G.A. (1980),
Effect of the membrane potential on Na⁺-dependent sugar transport by ATP-depleted intestinal cells,
Am. J. Physiol., 238, C73-C80.
- CASPARY, W.F. i CRANE, R.K. (1970),
Active transport of myo-inositol and its relation to the sugar transport system of hamster small intestine,
Biochim. Biophys. Acta, 203, 308-316.
- CLARA, M. (1926),
Beiträge zur Kenntnis des Vogeldarmes. I Teil: Mikroskopisch Anatomie,
Zs. mikr, anat. Forsch., 4, 346-416.
- CLARKE, P.L. (1978),
The structure of the ileo-caeco-colic junction of the domestic fowl (*Gallus gallus* L.),
Br. Poult. Sci., 19, 595-600.
- CLARKE, R. (1967),
On the constancy of the number of villi in the duodenum of the post-embryonic domestic fowl,
J. Embryol. exp. Morph., 17, 131-138.
- COATES, M.E.; GREGORY, M.E.; PORTER, J.W.G. i WILLIAMS, A.P. (1963),
Vitamin B₁₂ and its analogues in the gut contents of germ-free and conventional chicks,
Proc. Nutr. Soc., 22, 27-35.
- CRANE, R.K. (1960),
Intestinal absorption of sugars,
Physiol. Rev., 40, 798-825.
- CRANE, R.K. (1962),
Hypothesis for mechanism of intestinal active transport of sugars,
Fed. Proc., 21, 891-895.

- CRANE, R.K. (1965),
Na⁺-dependent transport in the intestine and other animal tissues,
Fed. Proc., 24, 1000-1005.
- CRANE, R.K.,
Absorption of sugars,
In Handbook of Physiology, Section 6: Alimentary Canal, Volume 3:
Intestinal Absorption, ed. C.F. Code, American Physiological
Society, 1968, 1323-1351.
- CRANE, R.K. (1977),
The gradient hypothesis and other models of carrier-mediated
active transport,
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 78, 99-159.
- CRANE, R.K. i DORANDO, F.C. (1980),
On the mechanism of Na⁺-dependent glucose transport,
Ann. N.Y. Acad. Sci., 339, 46-52.
- CRANE, R.K. i KRANE, S.M. (1959),
On the mechanism of intestinal absorption of sugars,
Biochim. Biophys. Acta, 20, 568-574.
- CRITCHLEY, D.R.; EICHOLZ, A. i CRANE, R.K. (1969),
Transport of 5-thio-D-glucose in hamster small intestine,
Biochim. Biophys. Acta, 211, 244-254.
- CSAKY, T.Z. i LASSEN, U.V. (1964),
Active transport of D-xylose,
Biochim. Biophys. Acta, 82, 215-217.
- CSAKY, T.Z. i THALE, M. (1960),
Effect of ionic environment on intestinal sugar transport,
J. Physiol. (Lond.), 151, 59-65.
- CULLING, C.F.A.; REID, P.E.; TRUEMAN, L.S. i DUNN, W.L. (1973),
A simple method for the isolation of viable epithelial cells of
gastrointestinal (GI) tract,
Proc. Soc, exp. Biol. Med., 142, 434-438.

- CURRAN, P.F.; SCHULTZ, S.G.; CHEZ, R.A. i FUISZ, R.E. (1967)
Kinetic relations of the Na⁺-amino acid interaction at the mucosal
border of intestine,
J. Gen. Physiol., 50, 1261-1267.
- DIBONA, D.R. i MILLER, J.W. (1979),
Distribution of Na⁺ pump sites in transporting epithelia,
Fed. Proc., 38, 134-143.
- DICKENS, F. i WEIL-MALHERBE, H. (1941),
Metabolism of normal and tumor tissues. The metabolism of intesti-
nal mucous membrane,
Biochem. J., 35, 7-15.
- DORANDO, F.C. i CRANE, R.K. (1984),
Studies of the kinetics of Na⁺ gradient-coupled glucose transport
as found in brush-border membrane vesicles from rabbit jejunum,
Biochim. Biophys. Acta, 772, 273-287.
- EADE, O.E.; St ANDRE-UKENA, S. i BEEKEN, W.L. (1981),
Comparative viabilities of rat intestinal epithelial cells prepa-
red by mechanical, enzymatic and chelating methods,
Digestion, 21, 25-32.
- EDMONDS, C.J. i MARRIOTT, J. (1968),
Electrical potential and short circuit current of an *in vitro*
preparation of rat colon mucosa,
J. Physiol (Lond.), 194, 479-494.
- ESPOSITO, G. (1983),
Intestinal absorption. 1. General principles of transintestinal
transport,
Il Farmaco, 38, 450-465.
- EVANS, E.M.; WRIGGLESWORTH, J.M.; BURDETT, K i POVER, W.F.R. (1971),
Studies on epithelial cells isolated from guinea-pig small
intestine,
J. Cell Biol., 51, 452-464.
- FENNA, L. i BOAG, D.A. (1974),
Filling and emptying of the galliform caecum
Can. J. Zool., 52, 537-540.

- FERNANDO, M.A. i McCRAW, B.M. (1973),
Mucosal morphology and cellular renewal in the intestine of chicken following a single infection of *Eimeria acervulina*,
J. Parasitol., 59, 493-501.
- FERRER, R.; PLANAS, J.M.; MORETO, M. i TORRALBA, A. (1984),
Caracterización morfológica y funcional del epitelio cecal del pollo (*Gallus gallus domesticus*, L.),
XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Murcia.
- FISHER, R.B. i PARSONS, D.S. (1949),
A preparation of surviving rat small intestine for the study of absorption,
J. Physiol (Lond.), 110, 36-46.
- FREEL, R.W. i GOLDNER, A.M. (1981),
Sodium-coupled nonelectrolyte transport across epithelia: emerging concepts and directions,
Am. J. Physiol, 241, G451-G460.
- FUJITA, M.; MATSUI, H.; NAGANO, K. i NAKAO, M. (1971),
Asymmetric distribution of ouabain-sensitive ATP-ase activity in rat intestinal mucosa,
Biochim. Biophys. Acta, 233, 404-408.
- GABELLA, G.,
Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract,
In Physiology of the Gastrointestinal Tract, Volume 1, ed.
L.R. Johnson, Raven Press, New York, 1981, 197-242.
- GIBB, L.E. i EDDY, A.A. (1972),
An electrogenic sodium pump as a possible factor leading to the concentration of amino acids by mouse ascites tumor cells with reversed sodium ion concentration gradients,
Biochem. J., 129, 979-981.
- GIRARDI, A.J.; McMICHAEL, H. i HENLE, W. (1956),
The use of HeLa cells in suspension for the quantitative study of virus propagation,
Virology, 2, 532-544.

GLICK, N.; HOLBROOK, K.A.; OLAH, I.; PERKINS, W.D. i STINSON, R. (1978),

A scanning electron microscope study of the caecal tonsil: The identification of the caecal tonsil and the possible presence of lymphatics in the caecal tonsil,
Poultry Sci., 57, 1408-1416.

GOLDNER, A.M.; SCHULTZ, A. G. i CURRAN , P.F. (1969),
Sodium and sugar fluxes across the mucosal border rabbit ileum,
J. Gen. Physiol., 53, 362-383.

GRANEY, D.O. (1967),
Electron microscopic observations on the morphology of intestinal capillaries in the chicken and the transcapillary passage of chylomicra during fat absorption,
Anat. Rec., 157, 250-261.

HANSON, P.J. i PARSONS, D.S. (1976),
The utilization of glucose and production of lactate by *in vitro* preparations of rat small intestine: Effects of vascular perfusion,
J. Physiol. (Lond.), 225, 775-795.

HARRER, D.S.; STERN, B.K. i REILLY, R.W. (1964),
Removal and dissociation of epithelial cells from the rodent gastrointestinal tract,
Nature, 203, 319-320.

HARRISON, D.D. i WEBSTER, H.L. (1969),
The preparation of isolated intestinal crypt cells,
Exptl. Cell Res., 55, 257-260.

HARTMANN, F.; OWEN, R. i BISSELL, M (1982),
Characterization of isolated epithelial cells from rat small intestine,
Am. J. Physiol., 242, G147-G155.

HODGES, R.D.,
The digestive system,
In The Histology of the Fowl, Academic Press Inc., London, 1974,
35-112.

- HODGES, R.D. i MICHAEL, E. (1975),
Structure and histochemistry of the normal intestine of the fowl.
III. The fine structure of the duodenal crypt,
Cell Tiss. Res., 160, 125-138,
- HOLDSWORTH, C.D. i WILSON, T.H. (1967),
Development of active sugar and amino acid transport in the yolk
sac and intestine of the chicken,
Am. J. Physiol., 212, 233-240.
- HOLMAN, G.D. i NAFTALIN, R.J. (1975),
D-Galactose accumulation in rabbit ileum. Effect of theophylline
on serosal permeability,
Biochim. Biophys. Acta, 406, 383-401.
- HONEGGER, P. i SEMENZA, G. (1973),
Multiplicity of carriers for free glucalogues in hamster small
intestine,
Biochim. Biophys. Acta, 318, 390-410.
- HOPFER, U. (1978),
Transport in isolated plasma membranes,
Am.J. Physiol., 234, F89-F96.
- HOPFER, U. I GROSECLOSE, R. (1980),
The mechanism of Na⁺-dependent D-glucose transport,
J. Biol. Chem., 255, 4453-4462.
- HOPFER, U.; SIGRIST-NELSON, K. i MURER, H. (1975),
Intestinal sugar transport: Studies with isolated plasma mem-
branes,
Ann. N.Y. Acad. Sci., 264, 414-427.
- HOPFER, U.; SIGRIST-NELSON, K.; PENOTTO, J. i ISSELBACKER, K.J.
(1973),
Glucose transport in isolated brush border membrane from rat
small intestine,
J. Biol. Chem., 248, 25-32.

- HOSANG, M.; MICHAEL-GIBBS, E.; DIEDRICH, D.F. i SEMENZA, G. (1981),
Photoaffinity labeling and identification of (a component of) the small-intestinal Na^+ , D-glucose transport using 4-azidophlorizin, *FEBS Lett.*, 130, 244-248.
- HUANG, K.C. (1965),
Uptake of L-tyrosine and 3-O-methylglucose by isolated intestinal epithelial cells,
Life Sci., 4, 1201-1206.
- HÜLSMANN, W.C.,
Energy metabolism in different preparations of rat small intestinal epithelium,
In Intestinal Permeation, eds. M. Kramer i F. Lauterbach, *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1977, 229-239.
- HUMPHREY, C.D. i TURK, D.E. (1974),
The ultrastructure of normal chick intestinal epithelium,
Poultry Sci., 53, 990-1000.
- IEMHOFF, W.G.J.; Van Den BERG, J.W.O.; PIJPER, A.M. i HÜLSMANN, W.C. (1970),
Metabolic aspects of isolated cells from rat small intestinal epithelium,
Biochim. Biophys. Acta, 215, 229-241.
- IMONDI, A.R. i BIRD, F.H. (1966),
The turnover of intestinal epithelium in the chick,
Poultry Sci., 142-147.
- JOHNSTONE, R.M.,
Transport of amino acids in Ehrlich cells and mouse pancreas. Evidence against the Na^+ or alkali metal gradients hypothesis,
In Na^+ -Linked Transport of Organic Solutes, ed. E. Heinz, Springer-Verlag, Berlin, 1972, 52-67.
- KANO-JAMEYAMA, A. i HOSHI, T. (1983),
Purification and reconstitution of Na^+ /D-glucose cotransport carriers from guinea pig small intestine,
Jap. J. Physiol., 33, 955-970.

- KAUNITZ, J.D.; GUNTHER, R. i WRIGHT, E.M. (1982),
Involvement of multiple sodium ions in intestinal D-glucose
transport,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 2315-2318.
- KAUNITZ, J.D. i WRIGHT, E.M. (1983),
Heterogeneity of the intestinal sodium-D-glucose carrier,
Fed. Proc., 42, 5381 (Resum).
- KERNSTEN, A. (1912),
Die Entwicklung des Blinddarm bei *Gallus domesticus* einer
Berücksichtigung der Ausbildung des gesamten Darmkanals,
Arch. mikr. Anat., 79, 114-175.
- KESSLER, M. i SEMENZA, G. (1983),
The small-intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter: An asymmetric
gated channel (or pore) responsive to $\Delta\Psi$,
J. Membrane Biol., 76, 27-56.
- KIMMICH, G.A. (1970a)
Preparation and properties of mucosal epithelial cells isolated
from small intestine of the chicken,
Biochemistry, 9, 3659-3668.
- KIMMICH, G.A. (1970b),
Active sugar accumulation by isolated intestinal epithelial
cells: A new model for sodium-dependent metabolite transport,
Biochemistry, 9, 3669-3677.
- KIMMICH, G.A.,
Sodium-dependent accumulation of sugars by isolated intestinal
cells. Evidence for a mechanism not dependent on the Na⁺-gradient,
In Na⁺-Linked Transport of Organic Solutes, ed. E. Heinz, Spring-
er-Verlag, Berlin, 1972, 116-129.
- KIMMICH, G.A.,
Preparation and characterization of isolated intestinal epithelial
cells and their use in studying intestinal transport,
In Methods in Membrane Biology, Volume 5, ed. E.D. Korn, Plenum
Press, New York, 1975, 51-115.

KIMMICH, G.A.,

Intestinal absorption of sugar,

Physiology of the Gastrointestinal Tract, Volum 2, ed. L.R.

Johnson, Raven Press, 1981, 1035-1061.

KIMMICH, G.A. i CARTER-SU, C. (1978),

Membrane potentials and the energetics of intestinal Na^+ -dependent transport system,

Am. J. Physiol., 235, C73-C81,

KIMMICH, G.A.; CARTER-SU, C, i RANGLES, J. (1977),

Energetics of intestinal Na^+ -dependent sugar transport by isolated intestinal cells: Evidence for a major role for membrane potentials,

Am. J. Physiol., 233, E357-E362,

KIMMICH, G.A. i RANGLES, J. (1973),

Effect of K^+ and K^+ -gradient on accumulation of sugars by isolated intestinal epithelial cells,

J. Membr. Biol., 12, 23-46.

KIMMICH, G.A. i RANGLES, J. (1975),

A Na^+ -independent phloretin sensitive monosaccharide transport system in isolated intestinal epithelial cells,

J. Membr. Biol., 23, 57-76.

KIMMICH, G.A. i RANGLES, J. (1976),

2-Deoxyglucose transport by intestinal epithelial cells isolated from the chick,

J. Membr. Biol., 27, 363-379.

KIMMICH, G.A. i RANGLES, J. (1979),

Energetics of sugar transport by isolated intestinal epithelial cells: Effects of cytochalasin B,

Am. J. Physiol., 237, C56-C63.

KIMMICH, G.A. i RANGLES, J. (1980a),

Regulation of Na^+ -dependent transport in intestinal epithelial cells by exogenous ATP,

Am. J. Physiol., 238, C177-C183.

- KIMMICH, G.A. i RANGLES, J. (1980b),
Evidence for an intestinal Na^+ : sugar transport coupling
stoichiometry of 2.0,
Biochim Biophys. Acta, 596, 439-444.
- KIMMICH, G.A. i RANGLES, J. (1981),
 α -Metylglucoside satisfies only Na^+ -dependent transport system
of intestinal epithelium,
Am. J. Physiol., 241, C227-C232.
- KIMMICH, G.A. i RANGLES, J. (1984),
Sodium-sugar coupling stoichiometry in chick intestinal cells,
Am. J. Physiol., 247, C74-C82.
- KINNE, R. i MURER, H.,
Polarity of epithelial cells in relation to transepithelial
transport in kidney and intestine,
In Intestinal Ion Transport, ed. J.W.L. Robinson, MTP Press Ltd.,
England, 1976, 79-95.
- KLIP, A.; GRINSTEIN, S. i SEMENZA, G. (1980),
The small-intestinal sodium D-glucose cotransporter is inserted
in the brush border membrane asymmetrically,
Ann. N.Y. Acad. Sci., 358, 374-377.
- LAMPRECHT, W. i TRATSCHOLD, I.,
Adenosine-5'-triphosphate. Determination with hexokinase and
glucose-6-phosphate dehydrogenase,
In Methods of Enzymatic Analysis, ed. H.V. Bergmeyer, Academic
Press, New York, 1974, 2101-2110.
- LANDAU, B.R.; BERNSTEIN, L. i WILSON, T.H. (1962),
Hexose transport by hamster intestine, *in vitro*,
Am. J. Physiol., 203, 237-240.
- LÄUGER, P. (1980),
Kinetic properties of ion carriers and channels,
J. Membr. Biol., 57, 163-178.
- LAWSON, A.J.; SMIT, R.A.; JEFFERS, N.A. i OSBORNE, J.W. (1982),
Isolation of rat intestinal crypt cells,
Cell Tiss. Tissue Kinet., 15, 69-80.

LEESE, H.I. i BRONK, R. (1975),

Lactate formation by rat small intestine *in vitro*,
Biochim. Biophys. Acta, 404, 40-48.

LERNER, J.; BURRIL, P.H.; SATTELMAYER, P.A. i YANICH, C.F.
(1976),

Development patterns of intestinal transport mechanisms in the
chick,

Comp. Biochem. Physiol., 54A, 109-111.

LERNER, J.; SATTELMAYER, P. i RUSH, R. (1975),

Kinetics of methionine influx into various regions of chicken
intestine,

Comp. Biochem. Physiol., 50A, 113-120.

LOHMANN, K.; GRAETZ, H. i LANGEN, P.,

The metabolism of the small intestine,

In Current Aspects of Biochemical Energetics, eds. N.O. Kaplan
i E.P. Kennedy, Academic Press, New York, 1966, 111-126.

LOOPER, J.B. i LOOPER, M.H. (1929),

A histological study of the colic caeca in the bantam fowl,
J. Morphol., 48, 585-609.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. i RANDALL, R.J. (1951),

Protein measurement with the Folin phenol reagent,
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

LYON, I. i CRANE, R.K. (1966a),

Studies on transmural potentials *in vitro* in relation to intestinal
absorption. I. Apparent Michaelis constants for Na⁺-dependent
sugar transport,

Biochim. Biophys. Acta, 112, 278-291.

LYON, I. i CRANE, R.K. (1966b),

Studies on *in vitro* transmural potentials in relation to intestinal
absorption. II. An effect of ouabain on glucose-dependent
measurement of transmural potential of rat small intestine,

Biochim, Biophys. Acta, 126, 146-153.

- MADARA, J.L.; TRIER, J.S. i NEUTRA, M.R. (1980),
Structural changes in the plasma membrane accompanying differentiation of epithelial cells in human and monkey small intestine, *Gastroenterology*, 78, 963-975.
- MALATHI, P.; PREISE, R.H. i CRANE, R.K. (1980),
Protease-resistant integral brush border membrane protein and their relationship to sodium-dependent transport of D-glucose and L-alanine,
Ann. N.Y. Acad. Sci., 358, 253-266.
- MANGOLD, E. (1934),
The digestion and utilization of crude fibre,
Nutrition Abs. and Rev., 3, 647-657.
- MAUMUS, J. (1902),
Les caecums des oiseaux,
Annls. Sci. nat. Zool., 15, 1-148.
- McLELLAND, J.,
Digestive system,
In Forms and Function in Birds, volum 1, eds. A.S. King i J. McLelland, Academic Press, London i New York, 1979, 69-182.
- McNAB, J.M. (1973),
The avian caeca: a review,
World's Poultry Sci. J., 29, 251-263.
- MICHAEL, E. i HODGES, R.D. (1975),
Scanning electron microscopy of the duodenal mucosa of chickens infectet with *Eimeria acervulina*,
Parasitology, 71, 229-237.
- MICHAEL, G. i GUTTE, G. (1971),
Zur mikroskopischen Anatomie und Histochemie des Darmkanals von Huhn und Ente,
Arch. esp. Vet. Med., 25, 601-613.
- MITJAVILA, M.T.; MITJAVILA, S. i DERACHE, R. (1972),
Mesure de la dégradation cellulaire lors de l'incubation des cellules épithéliales isolées de l'intestin du rat et nouvelle définiton du coefficient respiratoire,
Biol. Gastro. Enterol., 5, 273-280.

- MITJAVILA, M.T.; MITJAVILA, S. i DERACHE, R. (1973),
Mesures du métabolisme et de la lyse des cellules épithéliales
isolées de l'intestin du rat incubées en présence de divers dé-
tergents,
Toxicology, 1, 237-248.
- MONESI, V. (1960),
The appearance of enterochromaffin cells in the intestine of the
chick embryo,
Acta anat., 41, 97-114.
- MOON, H.W. i SKARTVEDT, S.M. (1975),
Effect of age on epithelial cell migration in small intestine of
chickens,
Am. J. vet. Res., 36, 213-215.
- MORETO, M.; PLANAS, J.M.; DE GABRIEL, C. i SANTOS, F.J. (1984),
Involvement of cellular cyclic AMP in theophylline-induced
sugar accumulation in chicken intestinal epithelial cells,
Biochim. Biophys. Acta, 771, 68-73.
- MURER, H. i HOPFER, U. (1974),
Demonstration of electrogenic Na⁺-dependent D-glucose transport
in intestinal brush border membranes,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 71, 484-488.
- MURER, H. i HOPFER, U.,
The functional polarity of the intestinal epithelial cell: Studies
with isolated plasma membrane vesicles,
In Intestinal Permeation, eds. M. Kraner i F. Lauterbach, Excerpta
Medica, Amsterdam, 1977, 294-312.
- MURER, H. i KINNE, R. (1980),
The use of isolated membrane vesicles to study epithelial
transport processes,
J. Membr. Biol., 55, 81-95.
- MURER, H.; SIGRIST-NELSON, K. i HOPFER, U. (1975),
On the mechanism of sugar and amino acid interaction in intestinal
transport
J. Biol. Chem., 250, 2392-2396.

- NAKAMURA, M.; PICHETTE, P.; BRITMAN, S.; BEZMAN, A.L.; ZAMCHECK, N. i VITALE, J.J. (1959),
Studies on the inhibitory effect of intestinal mucosa on succin-
oxidase activity,
J. Biol. Chem., 234, 206-210.
- NELLANS, H.N.; FRIZZELL, R.A. i SCHULTZ, S.G. (1973),
Coupled sodium chloride influx across the brush border rabbit
ileum,
Am. J. Physiol., 225, 467-475.
- NELLANS, H.N.; FRIZZELL, R.A. i SCHULTZ, S.G. (1974),
Brush border processes and transepithelial Na⁺ and Cl⁻ transport
by rabbit ileum,
Am. J. Physiol., 226, 1131-1141.
- NITSAN, Z. i ALUMOT, E. (1963),
Role of the cecum in the utilization of raw soybean in chicks,
J. Nutr., 81, 299-304.
- ORR, H.W. (1931),
Comunicaci6 personal, In CALHOUN, M.L. (1932).
- PARSONS, D.S.,
Methods for investigation of intestinal absorption,
In Handbook of Physiology, Section 6: Alimentaty Canal, Volume
3: Intestinal Absorption, ed. C.F. Code, American Physiological
Society, 1968, 1177-1216.
- PAYNE, L.N.
The lymphoid system,
Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, Volum 2,
eds. D.J. Bell i B.M. Freeman, Academic Press, 1971, 985-1037.
- PEERCE, E.B. i WRIGHT, E.M. (1984),
Conformational changes in the intestinal brush border sodium-
glucose cotransporter labeled with fluorescein isothiocyanate,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 2223-2226.
- PERRIS, A.D. (1966),
Isolation of the epithelial cells of the rat small intestine,
Can. J. Biochem., 44, 687-693.

- PLANAS, J.M.; MORETÓ, M.; GAZA, E. i BOLUFER, J. (1982),
Changes in intestinal galactose and leucine transport during
development in the chick. Effect of low external calcium,
Poultry Sci., 61, 1094-1098.
- PORTEOUS, J.W.,
The regulation of glucose metabolism during its oxygen-dependent
translocation through the columnar absorptive cells of rat jejunum,
In Intestinal Permeation, eds. M. Kramer i F. Lauterbach, Excerpta
Medica, Amsterdam, 1977, 241-261.
- POTASHNER, S.J. i JOHNSTONE, R.M. (1970),
Cation transport and exchange diffusion of methionine in Ehrlich
ascites cells,
Biochim. Biophys. Acta, 203, 445-456.
- POTASHNER, S.J. i JOHNSTONE, R.M. (1971),
Cation gradients, ATP and amino acid accumulation in Ehrlich
ascites tumor cells,
Biochim. Biophys. Acta, 233, 91-103.
- PRIOR, R.L.; TOPPING, D.C. i VISEK, W.J. (1974),
Metabolism of isolated chick small intestinal cells. Effects of
ammonia and various salts,
Biochemistry, 13, 178-183.
- PRITCHARD, P.J. i LEE, D.J.W. (1972),
The effect of dietary citrate on glycolysis in the intestinal
mucosa and liver of the chicken (*Gallus domesticus*),
Int. J. Biochem., 3, 322-328.
- PRITCHARD, P.J. i PORTEOUS, J.W. (1977),
Steady-state metabolism and transport of D-glucose by rat small
intestine *in vitro*,
Biochem. J., 164, 1-14.
- QUAY, J.F. i ARMSTRONG, W.Mc.D. (1969),
Enhancement of net Na⁺ transport in isolated bullfrog intestine
by sugars and amino acids,
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 131, 46-51.

- RADEFF, T. (1928),
Über die Rohfaserverdauung beim Huhn und die hierbei dem Blinddarm
Zukommende Bedeutung,
Biochem. Z., 193, 192-196.
- RAHEJA, K.L.; TEPPERMAN, J. i TEPPERMAN, H.M. (1977),
The effect of age on intestinal glucose transport in the chick
(*Gallus domesticus*),
Comp. Biochem. Physiol., 58A, 245-248.
- RANDLE, P.J.; DENTON, R.M. i ENGLAND, P.J.,
Citrate as a metabolic regulator in muscle and adipose tissue,
In Metabolic Roles of Citrate, ed. T.W. Goodwin, Academic Press,
New York, 1968, 87-103.
- RANDLES, J. i KIMMICH, G.A. (1978),
Effects of phloretin and theophylline on 3-O-methylglucose
transport by intestinal epithelial cells,
Am. J. Physiol., 234, C64-C72.
- RAUL, F.; KEDINGER, M.; SIMON, P.; GRENIER, J. i HAFFEN, K.
(1978),
Behaviour of isolated rat intestinal cells mantained in suspension
or monolayer cultures,
Biol. Cellulaire, 33, 163-168.
- REID, E.W. (1901),
Transport of fluid by certain epithelia,
J. Physiol. (Lond.), 26, 436-444.
- REID, M.; GIBB, L.E. i EDDY, A.A. (1974),
Ionophore-mediated coupling between ion fluxes and amino acid
absorption in mouse ascites tumor cells. Restoration of the
physiological gradients of methionine by valinomycin in the
absence of adenosine triphosphate,
Biochem. J., 140, 383-393.
- REYNOLDS, E.S. (1963),
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain
in electron microscopy,
J. Cell Biol., 17, 208-212.

- RIKLIS, E. i QUASTEL, J.H. (1958),
Effects of cations on sugar absorption by isolated surviving
guinea pig intestine,
Can. J. Biochem. Physiol., 36, 347-362.
- ROBINSON, J.W.L.; VAN MELLE, G. i JOHANSEN, S.,
Statistical analysis of solute influx kinetics,
In Intestinal Transport, eds. M. Gilles-Baillien i R. Gilles,
Springer-Verlag, Berlin, 1983, 64-75.
- SHOFIELD, G.C.,
Anatomy of muscular and neural tissues in the alimentary canal,
In Handbook of Physiology, Section 6: Alimentary Canal, Volume
4: Motility, ed. C.F. Code, American Physiological Society,
1968, 1579-1627.
- SCHULTZ, S.G. i CURRAN, P.F. (1970),
Coupled transport of sodium and organic solutes,
Physiol. Rev., 50, 637-718.
- SCHULTZ, S.G.; FUISZ, R.E. i CURRAN, P.F. (1966),
Amino acid and sugar transport in rabbit ileum,
J. Gen. Physiol., 49, 849-866.
- SCHULTZ, S.G. i ZALUSKY, R. (1963),
The interacion between active sodium transport and active sugar
transport in the isolated rabbit ileum,
Biochim. Biophys. Acta, 71, 503-505.
- SCHULTZ, S.G. i ZALUSKY, R. (1964),
Ion transport in isolated rabbit ileum. II. The interaction
between active sodium and active sugar transport,
J. Gen. Physiol., 47, 1043-1059.
- SCHWARZE, E.,
Anatomia de las aves,
Compendio de Anatomía Veterinaria, ed. Acribia, Zaragoza.
- SEMENZA, G.; KESSLER, G.; HOSANG, M.; WEBER, J. i SCHMIDT, U.
(1984),
Biochemistry of the Na⁺, D-glucose cotransporter of the small
intestinal brush-border membrane. The state of the art in 1984,

Biochim. Biophys. Acta, 779, 343-379.

SEPÚLVEDA, F.V.; BURTON, K.A. i BROWN, P.D. (1982),
Relation between sodium-coupled amino acid and sugar transport
and sodium/potassium pump activity in isolated intestinal epithelial cells,
J. Cell. Physiol., 111, 303-308.

SEPÚLVEDA, F.V. i SMITH, M.W. (1981),
New evidence for the hypothesis that Na⁺ and non-electrolyte
coupled entry into enterocytes takes place with a stoichiometry
of one,
J. Physiol. (Lond.), 320, 134P-135P.

SHEHATA, A.T.; LERNER, J. i MILLER, D.S. (1981),
Development of brush-border membrane hexose transport system
in chick jejunum,
Am. J. Physiol., 240, G102-G108.

SIGRIST-NELSON, K.; MURER, H. i HOPFERF, U. (1975),
Active alanine transport in isolated brush border membranes,
J. Biol. Chem., 250, 5674-5680.

SJÖSTRAND, F.S. (1968),
A simple and rapid method to prepare dispersions of columnar
epithelial cells from the rat intestine,
J. Ultrastruct. Res., 22, 424-442.

SKADHAUGE, E. (1968),
Cloacal storage of urine in the rooster,
Comp. Biochem. Physiol., 24, 7-18.

SKADHAUGE, E. (1973),
Renal and cloacal salt and water transport in the fowl (*Gallus
domesticus*),
Dan. Med. Bull., 20, 1-82.

SKADHAUGE, E.,
Uptake through the gut,
In Osmoregulation in Birds, ed. D.S. Farner, Springer-Verlag,
Berlin, 1981, 30-40.

- SNIPES, R.L. (1978),
Anatomy of the rabbit cecum,
Anat. Embryol., 155, 57-80.
- SOGNEN, E. (1967),
A method for the preparation of suspensions of intestinal mucosal
cells by means of calcium chelators,
Acta Vet. Scand., 8, 76-82.
- SPIELVOGEL, A.M.; FARLEY, R.D. i NORMAN, A.W. (1972),
Studies on the mechanism of action of calciferol. V. Turnover
time of chick intestinal epithelial cells in relation to the in-
testinal action of vitamin D,
Expl. Cell Res., 74, 359-366.
- SRIVASTAVA, L.M. I HÜBSCHER, G. (1966),
Glucose metabolism in the mucosa of the small intestine,
Biochem. J., 100, 458-466.
- STERN, B.K. (1966),
Some biochemical properties of suspensions of intestinal epithelial
cells,
Gastroenterology, 51, 855-867.
- STERN, B.K. i REILLY, R.W. (1965),
Some characteristics of the respiratory metabolism of suspensions
of rat intestinal epithelial cells,
Nature, 205, 563-565.
- STRILING, C.E. (1972),
Radioautographic localization of sodium pump sites in rabbit ileum,
J. Cell. Biol., 53, 704-717.
- SUNDLER, F.; HAKANSON, R; HAMMER, R.A.; ALUMETS, J.; CARRAWAY,
R.; LLEMAN, S.E. I ZIMMERMAN, E.A. (1977),
Immunohistochemical localization of neurotensin in endocrine cells
of the gut,
Cell Tiss. Res., 178, 313-321.
- TENNANT, J.R. (1964),
Evaluation of the trypan blue technique for determination of
cell viability,
Transplantation, 2, 685-694.

- THOMSON, A.B.R.; HOTKE, C.A. i WEINSTEIN, W.M. (1982),
Comparison of kinetic constants of hexose uptake in gour animal
species and man,
Comp. Biochem. Physiol., 72A, 225-236.
- TOWLER, C.M.; PUGH-HUMPHREYS, G.P. i PORTEOUS, J.W. (1978),
Characterization of columnar absorptive epithelial cells isolated
from rat jejunum,
J. Cell Sci., 29, 53-75.
- TRIER, J.S. i MADARA, J.L.,
Functional morphology of the mucosa of the small intestine,
In Physiology of the Gastrointestinal Tract, Volum 1, ed. L.R.
Johnson, Raven Press, 1981, 925-962.
- TURK, D.E. (1982),
The avian gastrontestinal tract and digestion. The anatomy of the
avian digestive tract as related to feed utilization,
Poultry Sci., 61, 1225-1244.
- TURNER, R.J. i MORAN, A. (1982a),
Heterogeneity of sodium dependent D-glucose transport sites along
the proximal tubule: Evidence from vesicle studies,
Am. J. Physiol., 242, F406-F414.
- TURNER, R.J. i MORAN, A. (1982b),
Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush border
membrane D-glucose transporter,
J. Membrane Biol., 67, 73-80.
- TURNER, R.J. i MORAN, A (1982c),
Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glu-
cose transport heterogeneity,
J. Membrane Biol., 70, 37-45.
- TURNER, R.J. i SILVERMAN, M. (1980),
Testing carrier models of cotransport using the binding kinetics
of non-transported comperitive inhibitors,
Biochim. Biophys. Acta, 596, 272-291.

- UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H. i STAUFFER, J.F.,
Manometric techniques,
Burgess Publishing Co., Minneapolis, (1959).
- WATFORD, M.; LUND, P. i KREBS, H.A. (1979),
Isolation and metabolic characteristics of rat and chicken
enterocytes,
Biochem. J., 178, 589-596.
- WEISER, M.M. (1973),
Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthe-
sis. I. An indicator of cellular differentiation,
J. Biol. Chem., 248, 2536-2541.
- WILKINSON, G.N. (1961),
Statistical estimations in enzyme kinetics,
Biochem. J., 80, 324-332.
- WILSON, T.H. i LANDAU, B.R. (1960),
Specificity of sugar transport by hamster intestine,
Am. J. Physiol., 198, 99-106.
- WITLOCK, D.R.; LUSHBAUGH, W.B. DANFORTH, H.D. i RUFF, M.D. (1975),
Scanning electron microscopy of the cecal mucosa in *Eimeria*
tenella-infected and uninfected chickens,
Avian Dis., 19, 293-304.
- WITLOCK, D.R. i RUFF, M.D. (1977),
Comparison of the intestinal surface damage caused by *Eimeria*
mivati, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti* and *E. acervulina*
by scanning electron microscopy,
J. Parasitol., 63, 193-199.
- WRIGHT, E.M.; GUNTHER, R.D.; KAUNITZ, J.D.; STEVENS, B.R.;
HARMS, H.J. i SCHELL, R.E.,
In Intestinal Transport, eds. M. Gilles-Baillien i R. Gilles,
Springer-Verlag, Berlin, 1983, 122-132.
- ZIETSCHMANN, O. (1911),
Der Verdauungsapparat der Vogel,
Ellenberger's Handbook der vergleichenden mikroskopischen
Anatomie der Haustierer, 3, 377-416.