

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA

EFFECTE D'IONÒFORS DE CALCI I D'AMPc SOBRE
EL TRANSPORT DE GALACTOSA.

Memòria presentada per Na Ruth
Ferrer i Roig per a optar al
grau de llicenciat.

Aquest treball ha estat dirigit
per la Dra. Na Joana M. Planas
i Rosselló.

Barcelona, juliol de 1981.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701740845



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

NA JOANA M. PLANAS I ROSSELLÓ, PROFESSOR ADJUNT DE FISILOGIA ANIMAL
DE LA FACULTAT DE FARMÀCIA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA,

CERTIFICA: Que la Memòria titulada "EFECTE D'IONÒFORS DE CALCI I
D'AMPc SOBRE EL TRANSPORT DE GALACTOSA" presentada per
NA RUTH FERRER I ROIG per a optar al Grau de Llicenciat
en Farmàcia, ha estat realitzada al Laboratori de la Cà-
tedra sota la meva direcció i, considerant-la conclosa,
autoritzo la seva presentació per a ser jutjada pel Tri-
bunal corresponent.

I perquè consti, signo la present a Barcelona, el trenta
de juny de mil nou-cents vuitanta-u.

Juan M. Planas Roselló

Voldria expressar el meu agraïment a la Dra. Na Joana M. Planas per la direcció d'aquesta Memòria així com per la il·lustració i l'empenta que m'ha sabut encomanar.

No voldria deixar de regradir:

- al Dr. En Miquel Moretó perquè la seva orientació i ajuda ens ha estat molt valuosa,
- al Dr. En Josep Bolufer pel seu constant assessorament,
- al Prof. Dr. N'Antoni Torralba per haver posat a la nostra disposició tot el que ha requerit aquest treball,
- i a tots els companys pel seu bon acolliment dins del laboratori.

3.3.2.3.- SUBSTITUCIÓ DE CALCI PER ESTRONCI	33
3.4.- TECNIQUES EXPERIMENTALS "IN VITRO"	34
3.4.1.- TÈCNICA DE WILSON I WISEMAN	34
3.4.2.- TÈCNICA DE CRANE-MANDELSTAM	37
3.5.- DETERMINACIÓ DE D-GALACTOSA	38
3.5.1.- FONAMENT DEL PROCÉS DE CENTELLEIG LÍQUID .	39
3.5.2.- COMPOSICIÓ DEL LÍQUID DE CENTELLEIG	39
3.5.3.- CÀLCULS	40
3.6.- TRACTAMENT ESTADÍSTIC	40
4.- <u>RESULTATS I DISCUSSIÓ</u>	41
4.1.- EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE CALCI PRESENT EN EL MEDI D'INCUBACIÓ SOBRE EL TRANSPORT AC- TIU DE D-GALACTOSA	42
4.2.- EFECTE DE LA DISMINUCIÓ DEL CALCI EXTERN SO- BRE EL TRANSPORT DE GALACTOSA EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONS DE SODI VARIABLES.....	50
4.3.- EFECTE DEL CARBACOL SOBRE EL TRANSPORT NET I L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA EN INTESTÍ DE PO- LLASTRE	55
4.4.- EFECTE DE L'A 23187 SOBRE EL TRANSPORT DE D- GALACTOSA	60
4.5.- EFECTE DE LA TEOFIL.LINA SOBRE L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA	64

4.6.- EFECTE DE L'AMPc EXOGEN SOBRE L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA PER ANELLS INTESTINALS DE POLLASTRE	67
4.7.- EFECTE DE LA SUBSTITUCIÓ DEL CALCI DEL ME- DI D'INCUBACIÓ PER ESTRONCI, SOBRE EL TRANS- PORT ACTIU DE D-GALACTOSA	70
5.- <u>CONCLUSIONS</u>	72
6.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	75

Índex de TaulesPàg.

Taula I.-	Efecte de concentracions decreixents de calci en el medi d'incubació sobre la concentració serosal final, transport net i relació serosal/mucosal de D-Galactosa en sacs evertits de pollastre d'una setmana d'edat	45
Taula II.-	Influència de la substitució parcial del sodi en el medi d'incubació sobre el transport net de D-Galactosa en sacs evertits de budell de pollastre de 1-3 dies d'edat	52
Taula III.-	Efecte del carbacol 0,5 mM sobre el transport actiu de D-Galactosa en sacs evertits intestinals de pollastre de 7 dies d'edat, a diverses concentracions de calci en el medi d'incubació	57
Taula IV.-	Efecte de l'A 23187 sobre el transport actiu de D-Galactosa en sacs intestinals de pollastre de set dies d'edat...	61
Taula V.-	Efecte de la substitució del calci del medi d'incubació per estronci sobre la concentració serosal final, el transport net i la relació serosal/mucosal de D-Galactosa	71

Index de FiguresPàg.

Figura 1.- Representació d'una cèl.lula epitelial típica, tal com es veu al microscopi electrònic	13
Figura 2.- Detall de l'omplenat del sac evertit amb ajuda d'una xeringa amb agulla de punta camusa i esquema de l'erlenmeyer d'incubació amb el sac submergit i borbolleig de carbogen	36
Figura 3.- Efecte de la concentració de calci present en el medi d'incubació sobre la concentració serosal final de D-Galactosa en sacs evertits de budell de pollastre de set dies d'edat.	47
Figura 4.- Efecte de la concentració de calci sobre l'acumulació de D-Galactosa en anells intestinals de pollastre de set dies	49
Figura 5.- Efecte de la disminució del calci extern sobre el transport de D-Galactosa en presència de concentracions de sodi variables.	54

- Figura 6.- Efecte del carbacol 0,5 mM sobre l'acumulació de D-Galactosa en presència de calci 0,01 mM i 2,5 mM, en anells intestinals de pollastre de 7 dies d'edat... 59
- Figura 7.- Efecte de l'A 23187 sobre l'acumulació de D-Galactosa en presència de calci 0,01 mM i 2,5 mM, en anells intestinals de pollastre de 7 dies d'edat..... 63
- Figura 8.- Efecte de la teofil.lina 10 mM sobre l'acumulació de D-Galactosa en presència de calci 0,01 mM i 2,5 mM. en anells intestinals de pollastre de 7 dies d'edat 66
- Figura 9.- Efecte de l'AMPC 5 mM sobre l'acumulació de D-Galactosa en presència de calci 0,01 mM i 2,5 mM en anells intestinals de pollastre de set dies d'edat... 69

1.- INTRODUCCIO

Els nutrients no electrolítics travessen l'epiteli intestinal fonamentalment per dos mecanismes: la difusió simple i el transport actiu.

En les fases inicials del desenvolupament, tant en mamífers com en aus, la zona mitjana de l'intestí prim presenta dues característiques importants. En primer lloc, la seva capacitat per a transportar activament sucres i aminoàcids es troba molt augmentada, comparada amb la que es presenta en l'animal adult (2, 8, 52, 57, 42). En segon lloc, el transport actiu és dependent de la concentració del calci extern, dependència que tampoc s'observa en els adults (43, 11).

El calci extern pot tenir, doncs, algun paper mantenint elevada la capacitat de transportar activament els no electròlits durant els dies que segueixen a l'eclosió de les aus o al naixement dels mamífers.

Donat que s'ha proposat el calci com a possible regulador de diferents processos fisiològics, bé sigui pel seu efecte directe a nivell de membrana, bé per actuar com a missatger (conjuntament o no amb els nucleòtids cíclics), hom ha considerat important conèixer el paper que el calci extern té sobre els mecanismes de transport actiu de sucres i aminoàcids en aquesta primera etapa del desenvolupament.

En aquest treball es presenten els resultats obtinguts en pollets de set dies, en els quals el transport de galactosa es troba molt augmentat. Hom ha estudiat l'efecte que tenen alguns ionòfors de calci així com substàncies que incrementen l'AMPC, per tal de poder establir el possible mecanisme pel qual el calci extern afecta la permeabilitat intestinal de galactosa.

2.- PART TEORICA

2.1.- MORFOLOGIA DEL BUDELL PRIM DE POLLASTRE

Prèvia a la descripció morfològica del budell prim de pollastre, hom farà una breu referència al seu origen embriològic. El pollastre és un vertebrat i, com a tal, l'epiteli del seu tracte digestiu és, en tota la seva llargària -a excepció de les dues extremitats- d'origen endoblàstic. Els seus extrems, que són l'estomodeu i el proctodeu, són d'origen ectoblàstic i, al llarg del desenvolupament embriològic, donaran lloc, respectivament, a la cavitat bucal i a una part de la cloaca. Per altra banda, la porció de tracte digestiu d'origen endoblàstic es recobreix per una boixa mesoblàstica periepitelial que donarà lloc a les capes conjuntives i musculars (3).

Morfològicament, el tracte digestiu de pollastre es divideix en budell cefàlic i budell troncal. El primer inclou la cavitat bucal, derivats faríngics i faringe, on neix el budell troncal que es perllonga fins a la cloaca. El budell troncal es diferencia en budell anterior que correspon a la fracció compresa fins al pedrer. La vàlvula o esfínter anomenada pílora el separa del budell postpilòric, el qual acaba a la cloaca.

El budell postpilòric es divideix en dues parts: la mitjana o budell prim, que neix al pedrer i acaba a la bifurcació dels dos cecs, i la posterior o budell gruixut, a partir d'aquest

darrer punt fins a la cloaca i caracteritzada per tenir major diàmetre.

El budell mig o prim està constituït, a les aus, per duodè, jejú i ili. La primera porció -duodè- s'allarga fins a la desembocadura dels conductes biliars i pancreàtics. El límit entre jejú i ili no és gaire visible.

A l'embrió i al pollastre nou nat, a nivell de jejú es troba la implantació de la vesícula vitel·lina. Aquesta desemboca a la llum intestinal pel canal umbilical i és resorbida i digerida en els primers dies de vida. Es en aquesta zona de jejú pròxima al rovell, on el transport actiu es dona en major proporció (20).

La funció del budell prim és de continuar la digestió i absorció de substàncies, ja iniciada a l'estómac. Es per això que requereix una gran superfície, assolida mercès a la longitud i a la particular morfologia de l'epiteli.

La superfície d'absorció intestinal augmenta degut a la presència d'uns plects circulars o espirals de gran tamany, pròxims els uns dels altres, anomenats vàlvules connivents o de Kerkring. Són molt abundants en duodè i jejú. A la vegada, tant la superfície de l'epiteli que recobreix els plects, com la situada entre els mateixos, presenta petites projeccions en tota la seva llargària anomenades vellositats intestinals o villi. La superfície

d'absorció és encara més gran mercès a la presència de microvellositats o microvilli en la superfície lliure de les cèl.lules encarregades de l'absorció o enteròcits. Aquestes microvellositats constitueixen la "vora en raspall".

2.2.- HISTOLOGIA DE LA MUCOSA INTESTINAL

La paret del budell de pollastre està formada per quatre capes principals: mucosa, submucosa, capa muscular externa i serosa. La capa directament implicada en els fenòmens d'absorció intestinal és la mucosa, constituïda, al seu torn, per tres subcapes: epiteli, làmina pròpia i una capa prima de múscul llis anomenada muscularis mucosae.

Damunt la muscularis mucosae es situa la làmina pròpia, sobre la qual s'instal·len les cèl.lules epitelials que són, en realitat, les que es troben en contacte directe amb la llum intestinal. La làmina pròpia es veu moldejada per un relleu de màxima superfície: vellositats i criptes de Lieberkühn. Les vellositats són prolongacions més o menys digitiformes recobertes per cèl.lules epitelials que, a la vegada, presenten en la seva superfície externa els microvilli.

D'altra banda, les criptes de Lieberkühn són excavacions en la làmina pròpia revestides també per cèl.lules epitelials, però de característiques notablement diferents respecte a les vellositats.

2.2.1.- EPITELI

No podem considerar l'epiteli com una única unitat estructural ja que hi són presents un bon nombre de tipus cel.lulars. Una característica diferencial del duodè de pollastre és que el seu epiteli no presenta cèl.lules de Brunner (31). A l'epiteli cal distingir dues porcions clarament diferenciades: epiteli de les vellositats i epiteli de les criptes de Lieberkühn.

2.2.1.1.- Epiteli de les vellositats

Presenta tres tipus de cèl.lules.

a) Cèl.lules cilíndriques, absorbents o enteròcits.

Els enteròcits constitueixen aproximadament el 90% de les cèl.lules de l'epiteli de les vellositats. Són cèl.lules cilíndriques, altes, amb la vora en raspall. El microscopi electrònic mostra que aquesta vora és formada per microvellositats densament apretades que, en pollastre, tenen una llargària de 1000 nm i una amplària de 100 nm (31). Estan formades per la membrana plasmàtica trilaminar que inclou una sèrie de microtúbuls de proteïna que s'uneixen a una xarxa o vel terminal a la base de les microvellositats. Les microvellositats són més curtes a l'extrem de la vellositat i en la cripta (on també es troben cèl.lules

cilíndriques) que no pas en la regió central de la vellositat.

El glicocàlix, capa que recobreix les microvellositats és, en pollastre, més difús que en mamífers (31). Es suposa que està implicat en la digestió d'alguns nutrients i se li atribueix activitat enzimàtica.

Les cèl.lules cilíndriques tenen abundant citoplasma i estan tancades lateralment per membranes cel.lulars molt enroscades. Posseeixen abundants mitocòndries que, a diferència dels mamífers, no tenen grànuls foscos (31).

Els ribosomes lliures hi són escassos. El reticle endoplasmàtic rugós i l'aparell de Golgi, en canvi, són ben desenvolupats en les cèl.lules de la base de les vellositats i van essent cada cop menys manifestos a mesura que ens acostem a la punta de la vellositat. El nucli, a diferència dels enteròcits de mamífers, és més ovoïdal, no estant localitzat tan basalment (31).

b) Cèl.lules caliciformes o de Goblet.

Són cèl.lules mucoses que presenten el vèrtex en distensió ple de glòbuls de mucus que li donen forma de calze.

Tenen l'aparell de Golgi força manifest, on té lloc la sín-

tesi de la glucoproteïna del mucus que s'aglomera en els anomenats glòbuls.

Representen aproximadament el 10% restant de les cèl.lules epitelials de la vellositat.

c) Cèl.lules enteroendocrines.

Constitueixen el 0,3% de les cèl.lules de l'epiteli.

2.2.1.2.- Epiteli de les criptes de Lieberkühn

L'epiteli que recobreix les excavacions que profunditzen en la làmina pròpia presenta diversos tipus de cèl.lules que varien amb la profunditat:

a) Cèl.lules de Paneth

Es caracteritzen pels seus grànuls voluminosos i es situen a la part basal de la cripta. Són cèl.lules molt diferenciades, amb un reticle endoplasmàtic rugós molt ben desenvolupat i un aparell de Golgi prominent que produeix grànuls de cimogen, alliberats cap a la llum per exocitosi. La naturalesa del contingut enzimàtic dels grànuls de cimogen és encara obscura. A les cèl.lules de Paneth madures pot observar-se un característic nucli irregular.

b) Cèl.lules cilíndriques de la base de la cripta.

A la base de les criptes i en nombre aproximadament igual a les cèl.lules de Paneth, s'intercalen unes petites cèl.lules cilíndriques amb poc citoplasma, comprimides. A diferència de les cèl.lules cilíndriques de les vellositats, aquestes petites presenten membranes laterals llises. L'ur citoplasma conté poques mitocòndries i cisternes de reticle endoplasmàtic. Un petit aparell de Golgi que és ple de ribosomes lliures és present. Això indica que es troben en un estat relativament indiferenciat i, com és lògic, presenten gran intensitat de divisió.

c) Cèl.lules cilíndriques del coll de la cripta.

Les cèl.lules localitzades per damunt de la base de la cripta són gairebé totes cilíndriques. Mostren una transició gradual entre les cèl.lules cilíndriques de la base de la cripta i les cèl.lules cilíndriques de la vellositat. És a dir: augmenta progressivament el calibre i el nombre de cisternes de reticle endoplasmàtic i disminueix el nombre de ribosomes lliures.

d) Cèl.lules oligomucoses.

Apareixen en les proximitats de les cèl.lules de Paneth i s'hi observen uns pocs glòbuls mucosos. Aquestes cèl.lu-

les neixen per diferenciació d'algunes cèl.lules cilíndriques de la base de la cripta. A més, conserven la capacitat de dividir-se, però només temporalment. Tan aviat com l'acumulació de glòbuls basta per a produir la distensió de la cèl.lula (que podem considerar com a caliciforme) es perd la capacitat de divisió. Apareixen a la meitat inferior de la cripta.

e) Cèl.lules caliciformes.

Originades a partir de cèl.lules oligomucoses. Predominen en la meitat superior de la cripta.

2.2.2. LÀMINA PRÒPIA

Els nuclis de les vellositats estan formats per làmina pròpia. Aquesta està constituïda per teixit connectiu. Entre les fibres de la xarxa que forma aquest teixit, solen trobar-se un bon grapat d'elements cel.lulars: cèl.lules de protoplasma pàl.lid, limfòcits, eritròcits nucleats, eosinòfils, etc.

Les fibres musculars llises, amb eixos paral.lels a la vellositat, estan disposades a la porció central a l'entorn d'un capil·lar limfàtic anomenat quilífer, present en mamífers però que no s'ha pogut observar encara en pollastre (31).

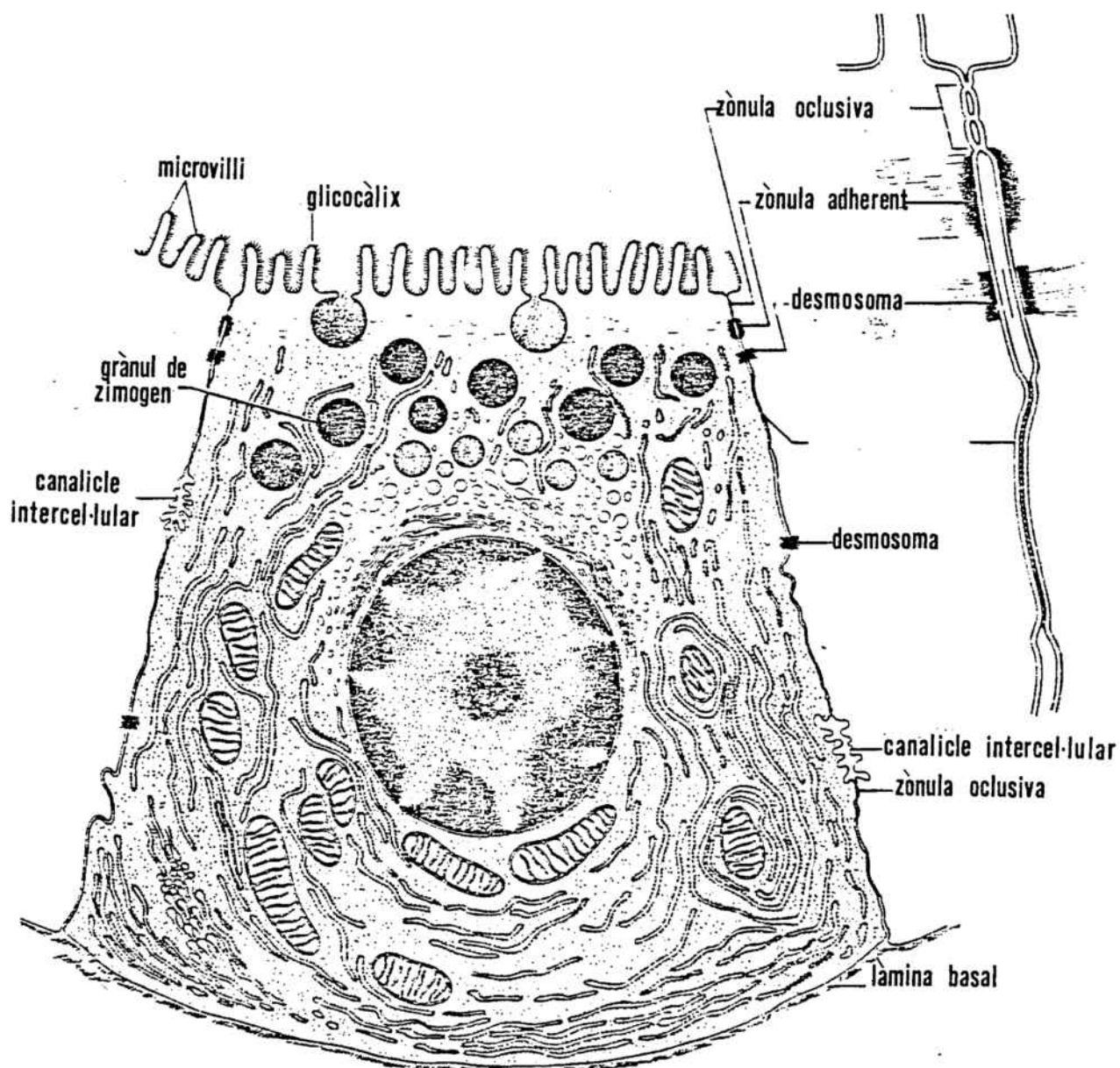


FIGURA 1 : Representació d'una cèl.lula epitelial típica, tal com es veu al microscopi electrònic.

També hi ha una branca arterial única, procedent de la submucosa, que sol travessar la muscularis mucosae per sota de cada vellositat i ascendeix per ella, per acabar en una xarxa capil·lar que s'acosta molt a les cèl·lules epitelials. Contràriament, les criptes de Lieberkühn es veuen irrigades per unes xarxes de capil·lars procedents de diverses branques arterials.

2.2.3.- MUSCULARIS MUCOSAE

Es tracta d'una capa de fibres musculars llises principalment longitudinals, molt més desenvolupades en pollastre que en mamífers. La seva missió és, probablement, la de permetre moviments localitzats de la mucosa.

2.2.4.- UNIONS INTERCEL·LULARS

L'epiteli que revesteix el budell representa una barrera selectiva per a les substàncies contingudes a la llum intestinal. És per això que té una gran importància conèixer la naturalesa de les unions intercel·lulars puix que és una via alternativa de pas per als nutrients.

Aquestes unions són diferents segons el nivell en què es trobin. Així, prop de la base cel·lular hi ha desmosomes, més amunt, unions adherents del tipus "zònula adherent" i, ja en contacte

amb la llum intestinal, es troben unions estretes del tipus "zònula oclusiva" que poden aparèixer també per dessota dels desmosomes.

L'ió Ca^{2+} és part integrant d'aquestes unions intercel·lulars essent fonamental la seva presència per al manteniment de la integritat estructural de la mucosa (9).

2.3.- ABSORCIÓ INTESTINAL: TIPUS I CARACTERISTIQUES

Hom entén com a procés d'absorció el conjunt de fenòmens que tenen lloc quan es produeix el moviment d'aigua i soluts des de la llum intestinal cap al plasma. La naturalesa lipoproteica de la membrana de les cèl·lules epitelials intestinals la fa permeable als soluts segons la seva polaritat, tamany, forma de la molècula i liposolubilitat. En general, quan més liposoluble és la molècula, més facilitat té per a travessar la membrana.

El pas d'electròlits, aigua i algunes substàncies polars de petit tamany té lloc a través dels porus que presenta la membrana. Aquests porus, però, actuen com una barrera selectiva, permetent el pas únicament de certs soluts, depenent de la seva càrrega elèctrica i de llur tamany respecte al porus. Aquest mecanisme d'absorció que rep el nom de difusió simple i que es duu a terme sempre a favor de gradient de concentració limita,

doncs, considerablement l'espectre de nutrients susceptibles de passar del lumen al medi intracel.lular.

Cal recórrer, per tant, a d'altres sistemes d'absorció: el transport facilitat. Es creu (35,41) que aquest tipus de transport compromet un determinat element de la membrana (anomenat "carrier" o "transportador") que és capaç d'associar-se al substrat per unions no covalents i introduir-lo a l'interior de la cèl.lula absorbent, retornant a la posició inicial iniciant-se aleshores, de nou, el cicle. Aquests processos de transport facilitat presenten tres característiques:

- a) Són processos molt específics, requerint una particular configuració de les molècules que utilitzaran el "carrier".
- b) Actuen conforme a una cinètica de Michaelis-Menten, amb possibilitat, per tant, de saturació.
- c) Poden ser inhibits per anàlegs estructurals del substrat.

Hom pot considerar dos tipus de transport facilitat: transport facilitat passiu i transport facilitat actiu.

El transport facilitat passiu es caracteritza per induir el moviment net a través d'una membrana a favor d'un gradient de concentració. Aquests sistemes permeten conduir el substrat en ambdues direccions, és a dir, el transportador és completament re-

versible. Un cop s'ha atès l'equilibri i la concentració de solut és la mateixa a tots dos costats, s'atura la difusió facilitada passiva. Aquests processos de transport passiu no comporten cap despesa energètica per a la cèl.lula i no són, per tant, bloquejats pels inhibidors metabòlics que interfereixen la producció d'energia.

A diferència de l'anterior, el transport facilitat actiu requereix una despesa d'energia metabòlica per tal com el solut és transportat contra un gradient de concentració. Aquest procés, a més, és unidireccional o vectorial, és a dir, impulsa el substrat a través de la membrana en una sola direcció. El bombeig actiu d'una sola substància cap al medi extracel.lular pot proporcionar la força impulsora per al transport actiu d'altres substàncies cap a l'interior cel.lular. D'aquesta manera, el bombeig actiu de sodi cap a l'exterior, és l'empenta que necessita el bombeig cap a l'interior de potassi, aminoàcids i també de sucres.

La bomba de sodi actua com a productora de l'energia necessària per a l'entrada del substrat, utilitzant com a combustible generalment admès l'ATP. La hidròlisi de l'ATP es produeix per una ATPasa, enzim activat per la presència d'ions Mg^{2+} , K^+ i Na^+ que ha estat localitzada a la mucosa intestinal, suposant la seva ubicació a la membrana basolateral de l'enteròcit (19).

Mentre la bomba de sodi funcioni, existirà un gradient electroquímic favorable al retorn del sodi al medi intracel·lular. És precisament aquest retorn el que és aprofitat per certs sucres capaços d'unir-se al mateix carrier que el sodi, produint-se un transport "acoblat". D'aquí, doncs, la importància que es mantingui el gradient de sodi per acció de la bomba Na^+/K^+ .

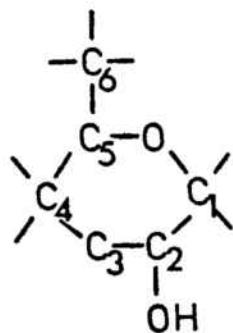
2.4.- ABSORCIO INTESINAL DE SUCRES

Segons HAMILTON (28) el glicocàlix té un paper important en l'absorció dels monosacàrids que es veu condicionada per dos factors:

- a) El gran increment en la superfície de la membrana cel·lular degut als villi, que afavoreix al màxim la possibilitat que els monosacàrids arribin als llocs específics per al transport.
- b) El segon factor seria la possibilitat que el glicocàlix actués com a barrera de difusió, especialment en els indrets on aquest és més dens, és a dir, a les projeccions dels villi. És aquí on s'acumularien els sucres abans d'ésser transportats cap a l'interior.

El transport actiu de sucres presenta una certa especificitat tant in vivo com in vitro. Els requeriments estructurals segons

CRANE (17) i WILSON (55) es veuen representats pel següent esquema:



Segons aquests autors, la configuració del sucre ha d'ésser la d'un anell piranòsic amb un grup hidroxil lliure en C₂ i un carboni unit en posició 5 i pertànyer a la sèrie D-monosacàrids. Aquesta configuració la presenten D-glucosa, D-galactosa i α-metilglucosa.

FISHER & PARSON (25) comprovaren que el transport actiu de sucres seguia una cinètica de saturació tipus Michaelis-Menten, degut a que la velocitat de transport ateny un valor límit a concentracions altes de substrat. A més, s'ha vist que, entre dos hidrats de carboni que es transporten activament, pot existir una mútua inhibició competitiva confirmada en el cas de glucosa i galactosa tant in vivo com in vitro (1).

S'ha comprovat, també, la necessitat d'un aport mínim d'O₂ per tal que tingui lloc el transport actiu de monosacàrids (20) que cal afegir al requeriment d'un acoblament d'energia metabòlica.

Es a dir, depèn del metabolisme cel.lular ja que els inhibidors metabòlics bloquegen, al seu temps, el transport de glucosa i galactosa (17, 36).

D'altra banda, el transport actiu de sucres és dependent del sodi en funció de la concentració d'aquest ió que influeix en la velocitat de penetració, nivell d'acumulació i velocitat d'intercanvi en estat estacionari. Aquesta dependència del sodi no existeix per als sucres que no són transportats activament (23, 6).

BIHLER & col. (5,7) han estudiat in vitro la cinètica d'absorció de sucres. Per mitjà del mètode de Lineweaver-Burk, s'observa que els resultats obtinguts mostren la mateixa velocitat màxima, siguin o no activament transportats, variant la K_t segons pertanyin a un o altre grup. Tanmateix, quan el sodi no existeix al medi d'incubació, totes les gràfiques són semblants. Es suggereix que, en absència de sodi, l'afinitat del transportador per als sucres, activament transportats o no, és la mateixa i molt baixa, mentre que, quan hi ha presència de sodi, s'incrementa l'afinitat per a alguns d'aquests sucres, precisament els activament transportables.

Sembla que el transport actiu té lloc quan la relació

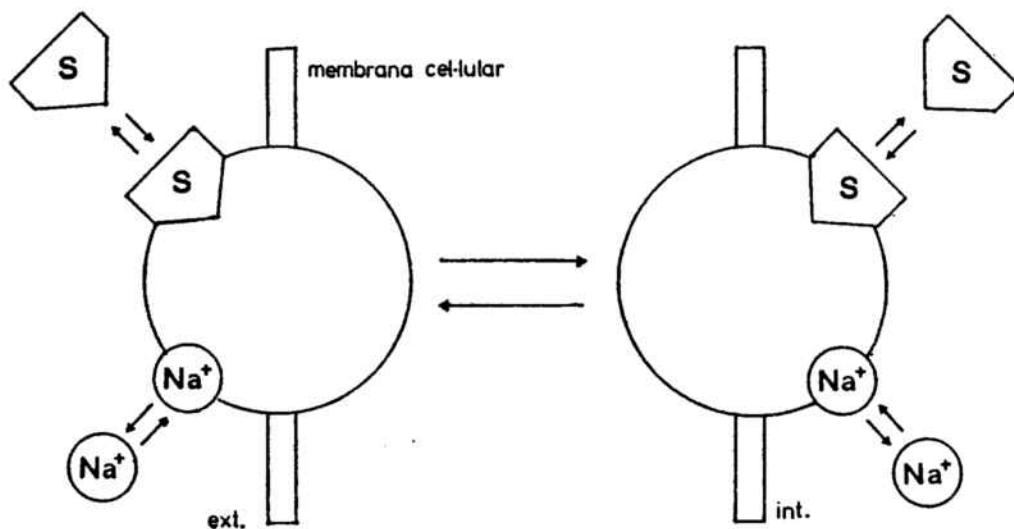
$\frac{K_t \text{ (sense Na}^+)}{K_t \text{ (amb Na}^+)}$ és més gran que 3-5, mentre que els sucres no ac-

tivament transportables no mostren una alteració significativa en llurs K_t per presència o absència de sodi.

S'ha vist que aquest requeriment de gradient electroquímic favorable ha d'ésser degut al sodi, no podent ser reemplaçat per cap altre catió (19).

CRANE (18) postulà un model cinètic segons el qual el carrier formaria un complex ternari, en unir-se al substrat i al sodi.

Les constants de dissociació d'aquest complex a una i altra banda de la membrana dependrien de les respectives concentracions de substrat i sodi, segons el següent esquema:



Així doncs, per a l'entrada del sucre és fonamental l'existència d'un gradient electroquímic transmembrana per al sodi, tenint en compte la dependència de la concentració de Na^+ a l'exterior, la velocitat a la qual el sodi que entra és expulsat cap a fora i el "pull" intracel.lular d'aquest ió.

El gradient electroquímic crea un potencial format per dos components:

- Potencial químic, dependent de la relació entre concentracions o activitats de sodi i substrat (S) a l'exterior i a l'interior, és a dir:

$$\frac{[\text{Na}^+]_e}{[\text{Na}^+]_i} \quad i \quad \frac{[\text{S}]_e}{[\text{S}]_i}$$

- Potencial elèctric, que pot influir principalment en la relació d'activitat transmembrana de l'ió, en la mobilitat de l'ió i en la mobilitat del carrier si en algun moment es troba carregat.

2.5.- CALCI EN EL TRANSPORT ACTIU INTESTINAL

L'absorció intestinal de no electròlits es troba fortament influenciada pel contingut iònic del medi d'incubació. L'efecte que tenen alguns ions sobre el funcionament dels mecanismes actius intestinals ha estat molt estudiat (50, 34), amb especial atenció, els que tenen lloc quan es produeix una substitució de l'ió sodi per altres cations (51, 40, 45).

Així com ha quedat ben establert que el transport actiu és dependent de la concentració de sodi en el medi d'incubació, no és tant clar, en canvi, quin és el paper de l'ió calci en el medi d'incubació. Per a alguns autors, l'omissió de calci augmenta el transport actiu de sucres (30), mentre que per a d'altres no té efecte in vivo (53), ni in vitro (22).

HAYS i col. (29), en els seus experiments amb bufeta urinària de galàpet, troben que l'absència de calci en el medi d'incubació provoca una ràpida baixada del corrent de curt circuit (SCC), fet que atribueixen a la ruptura de les unions existents entre les cèl.lules epitelials de la bufeta. Per altra banda, BOLUFER i col. (10) troben que, quan no hi ha calci en el medi, es produeix sols un 40% de disminució en el SCC quan és utilitzat budell de pollastre. Aquest efecte del calci no és, doncs, atribuït pels autors a la ruptura de les unions intercel.lulars, sinó a una acció del calci directament sobre el transport actiu de sucres. Aquesta activitat es suggereix que podria ser també

deguda a que l'omissió de l'ió calci indueix alteracions en el flux de diversos ions responsables de l'activitat elèctrica de l'intestí i, per tant, també en el transport de no electròlits.

En anteriors treballs realitzats al nostre laboratori (43, 11), s'ha comprovat que existeix una forta inhibició en el transport actiu de D-galactosa i de L-leucina quan es redueix la concentració de calci en el medi d'incubació a 10^{-5} M. Aquest efecte apareix tant en pollastres com en rates durant la primera etapa de la seva vida desapareixent quan els animals són adults. Així, en pollastre, la inhibició màxima té lloc entre el primer i tercer dia, disminuint al llarg dels vint-i-vuit dies següents. En pollastres de vuitanta dies, no s'observa cap efecte de la quasi ommissió de l'ió calci.

Aquests estudis indueixen a pensar que aquest catió és necessari per al normal transport de no electròlits al menys durant el primer període que segueix al neixement dels esmentats animals. Si bé s'han comprovat aquests efectes, no queda clar quin és el mecanisme pel qual la baixa concentració de calci redueix el transport net de certs soluts.

El paper que té el calci en diversos processos fisiològics ha estat molt estudiat darrerament, suposant-se que aquest catió pot actuar com a regulador, bé sigui pel seu efecte directe a nivell de membrana o bé per actuar de segon missatger conjuntament o no amb els nucleòtids cíclics (26, 48).

S'ha demostrat que l'efecte de calci i d'AMPC són complementaris en certs processos com, per exemple, l'estimulació de la secreció de fluids per glàndula salivar de mosca (46) o de l'amilasa pel pàncreas exocrí (54), mentre en altres processos els seus efectes són antagònics (4). Qualsevol intent per a comprendre com l'AMPC i el calci regulen les funcions cel·lulars ha de tenir en compte l'existència de complexes relacions de retroalimentació negativa operant entre ambdós mediadors intracel·lulars. Per exemple, la 5-hidroxi-triptamina indueix un augment en la concentració intracel·lular d'AMPC en absència de calci (47). Això suggereix que el calci pot exercir un control per retroalimentació negativa sobre l'activitat de l'adenilciclasi, tal com ha estat descrit en cor (39) i en ronyó (38). En glàndules salivars aïllades s'ha vist que l'EGTA estimula la secreció de fluid i que aquest efecte es pot explicar per l'augment en AMPC resultant d'una desinhibició de l'adenilciclasi en ser retirat el calci del medi d'incubació (46).

En el camp de l'absorció intestinal són pocs els estudis realitzats sobre l'efecte del calci i el seu paper regulador, encara que s'ha descrit que el transport de sucres per a eritròcits de colom així com per a d'altres teixits es troba estimulat pel calci citosòlic (14) degut a la seva actuació sobre la permeabilitat de la membrana cel·lular. No es pot, doncs, excloure la possibilitat que el calci, en mecanismes de transport intestinal, intervingui regulant o essent regulat per AMPC.

3.- MATERIAL I METODES

3.1.- ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

Hem utilitzat pollastres de raça híbrida PETER-60 procedents de la planta d'incubació SANCO (Santa Coloma de Gramenet, Barcelona) mascles i femelles, d'edats compreses entre un i set dies.

Foren mantinguts a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia (Barcelona) sota condicions de temperatura i humitat adequades i nodrits amb pinso Iniciarina (Purina, Gallina Blanca).

S'han realitzat els experiments a la tarda no havent estat els animals sotmesos a dejuni previ.

3.2.- SUBSTÀNCIES UTILITZADES

S'han emprat les següents substàncies, per ordre alfabètic:

- A 23187 (P.M. = 523). Calbochem, La Jolla, Ca, art. 100105, lot 902866. Soluble en metanol i etanol. Es guarda entre 4º i 16º C a la foscor.
- Àcid adenosin-3',5'-fosfòric (AMPc; P.M.= 329,2). Sigma, Saint Louis, Mi., art. 9501, lot 36 C-0168. Soluble en

aigua, molt soluble en àlcali. Es guarda a -20° C.

- Bicarbonat sòdic, p.a. (NaCO_3H ; P.M.= 84,01). E. Merck, Darmstadt, art. 6329, lot 8617337.
- Carbacol (Clorhidrat de carbamil colina; P.M.= 182,65). Sigma Chem. Comp., Mi., art. C-4382, lot 19 C-0171.
- Clorhidrat de colina (P.M.= 139,63). E. Merck, Darmstadt.
- Clorur de calci dihidratat crist. pa. ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; P.M.= 147,02). E. Merck, Darmstadt, art. 2382, lot 5109411.
- Clorur d'estronci hexahidratat, p.a. ($\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; P.M.= 266,62). E. Merck, Darmstadt, art. 7863.
- Clorur de potassi, p.a. (KCl ; P.M.= 74,56). E. Merck, Darmstadt, art. 4936, lot 0043727.
- Clorur de sodi, p.a. (NaCl ; P.M.= 58,44). E. Merck, Darmstadt, art. 6404, lot 0083357.
- EGTA (Àcid etilenglicol-bis (β -aminoetileter)N,N'-tetraacètic; P.M.= 308,4). Sigma Chem. Comp., Saint Louis, art. E-4378, lot 70 F-5070. Insoluble en aigua i soluble en àlcali.

- Fosfat monopotàssic p.a. (KH_2PO_4 ; P.M.=136,09). E. Merck, Darmstadt, art. 4873, lot 5239361.

- D-galactosa (P.M.=180). E. Merck, Darmstadt.

- D-galactosa marcada amb ^{14}C en el carboni 1. Activitat específica 2,22 GBq/mmol. Amersham, Gran Bretanya.

- Sulfat de magnesi heptahidratat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; P.M.=246,48). E. Merck, Darmstadt, art. 5886, lot 8571823.

- Teofil.lina anhidra (1,3 -Dimetilxantina; P.M.= 180,2). Sigma, Saint Louis, Mi., art. T-1633, lot 107 C-0064.

3.3.- MEDIS D'INCUBACIÓ

S'han utilitzat els medis KREBS-HENSELEIT (33) tampó bicarbonat i diversos medis KREBS-HENSELEIT modificats, tots ells a pH = 7,4 i que han estat sotmesos a carbogenació prèvia (95% d'O₂ i 5% de CO₂) durant 10 minuts per tal que, en iniciar-se la incubació dels sacs, l'oxigen ja hi sigui dissolt. Un cop preparats els medis s'hi ha dissolt D-galactosa fins a una concentració 5 mM.

3.3.1.- MEDI DE KREBS-HENSELEIT, TAMPÓ BICARBONAT

Per a la seva preparació es parteix de les següents solucions, que cal mantenir a la nevera:

1.- Na Cl	9,00 %
2.- K Cl	1,5 %
3.- Ca Cl ₂	1,22 %
4.- KH ₂ PO ₄	2,11 %
5.- MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3,82 %
6.- NaCO ₃ H	1,3 %

Es prenen 10 ml. de la solució 1 i s'enrasen fins a 100 ml. amb aigua destil.lada. Aquesta solució es passa a un erlenmeyer al qual s'afegeixen els següents volums de les altres solucions:

- 4 ml de la solució 2.
- 3 ml de la solució 3.
- 1 ml de la solució 4.
- 1 ml de la solució 5.
- 21 ml de la solució 6.

de tal manera que les concentracions finals de les sals veran ésser les següents:

NaCl	118,5	mM
KCl	6,2	mM
CaCl ₂	2,5	mM
KH ₂ PO ₄	1,25	mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,1	mM
NaCO ₃ H	25,0	mM

3.3.2.- MEDIS KREBS-HENSELEIT MODIFICATS

S'han preparat una sèrie de medis KREBS-HENSELEIT modificats, en els quals s'ha variat la concentració d'alguns electròlits o s'ha substituït per un altre.

3.3.2.1.- Variació en la concentració de calci del medi d'incubació.

a) Medi KREBS-HENSELEIT modificat 0 mM de calci.

El medi d'incubació KREBS-HENSELEIT modificat 0 mM de calci consisteix en un medi KREBS-HENSELEIT tampó bicarbonat en el qual no s'inclou la solució 3 de Cl_2Ca 1,22 %.

b) Medis KREBS-HENSELEIT modificats 0,01; 0,1; 1; 2,5; 5 i 10 mM de calci.

Tots aquests medis s'han preparat partint d'un medi KREBS-HENSELEIT modificat 0 mM de calci al qual s'ha afegit, en cada cas, un determinat pes de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ per a obtenir la concentració final de calci desitjada.

3.3.2.2.- Variació en la concentració de sodi.

S'ha anat eliminant el sodi que conté el medi KREBS-HENSELEIT

tampò bicarbonat (143 meq Na^+ /l.) i s'ha substituït per clorhidrat de colina, que presenta les propietats elèctriques del Na^+ però no les químiques. Segons la concentració de sodi i la presència o no de calci, els medis preparats han estat:

- Dos medis amb 118 meq Na^+ /l., un d'ells 0,01 mM de calci i, l'altre, 2,5 mM de calci.
- Dos medis amb 25 meq Na /l., un d'ells 0,01 mM de calci i, l'altre, 2,5 mM de calci.
- Dos medis 0 meq Na /l., un d'ells 0,01 mM de calci i, l'altre, 2,5 mM de calci.

En aquest últim medi, exempt de sodi, ha estat necessària la substitució del NaCO_3H per KCO_3H 25 mM.

3.3.2.3.- Substitució de calci per estronci

S'han preparat diversos medis KREBS-HENSELEIT modificats 2,5; 5 i 10 mM d'estronci. Aquests medis s'han preparat partint d'un medi KREBS-HENSELEIT modificat 0,1 mM de calci als quals s'ha afegit, en cada cas, un determinat pes de $\text{ClSr. 6 H}_2\text{O}$ i quantitat suficient d'EGTA per a segrestar tot el calci que duu el clorur d'estronci com a impuresa.

3.4.- TECNQUES EXPERIMENTALS "IN VITRO"

3.4.1.- TECNICA DE WILSON I WISEMAN

Una tècnica experimental utilitzada ha estat la dels sacs evertits de WILSON & WISEMAN (56).

Els animals es decapiten i es dessagnen. Se'ls practica una laparotomia i es localitza el rovell. Aquest es troba unit al budell prim mitjançant un lligament a nivell de jejú. El fragment de budell que s'utilitza correspon als 5 cm. situats a ambdós costats de la implantació del rovell i que correspon a la fracció de budell on els mecanismes de transport actiu es troben augmentats en pollastre (20).

Es rebutja el rovell i es renta l'intestí extret amb sèrum fisiològic.

A continuació es procedeix a l'eversió amb l'ajut d'una barnilla de vidre de punta camusa. Tot seguit, el budell net i evertit es talla en seccions d'aproximadament 3 cm que es sequen amb paper de filtre prèviament mullat amb sèrum fisiològic i es pesen individualment, obtenint el valor P_1 . L'omplenat del sac es duu a terme lligant amb un fil de seda un extrem del tros de budell; després, es lliga l'altre extrem amb un nus obert que permeti la introducció d'una agulla de punta camusa unida a una xeringa. Aquesta conté el medi d'incubació que, un cop injectat dins el

sac, constituirà el líquid serosal, anomenat així per romandre en contacte amb la serosa. El sac ja ple (després de secar-lo com s'ha descrit per a P_1) es pesa, obtenint el valor P_2 . La diferència $P_2 - P_1$ és l'equivalent al volum de medi injectat.

Aquest volum ha d'ésser el just per tal que es produeixi l'adequada distensió del teixit de manera que la separació de les vellositats sigui aparent a simple vista i permeti l'accés de l'oxigen i del substrat a la superfície d'absorció.

S'introdueix, aleshores, cada sac en erlenmeyers que contenen 10 ml de medi prèviament col·locats en un bany termostàtic a 38° C i borbollejats amb carbogen durant tot l'experiment. Aquest medi s'anomena mucosal (Concentració inicial serosal = concentració inicial mucosal).

El temps d'incubació ha d'ésser suficient per a assolir l'estat d'equilibri en la difusió del sucre, paràmetre que depèn del tram de budell, del seu gruix i del substrat. Per a les nostres condicions, el temps ha estat de 45 minuts.

Un cop transcorregut aquest temps, s'extreu cada sac del seu medi, s'asseca amb paper de filtre prèviament mullat amb sèrum fisiològic i es pesa, obtenint aleshores, P_3 . Es practica una incisió al sac i es recull el líquid serosal en un tub cònic que es conserva per a la valoració del sucre. Posteriorment, es renta el sac buit, s'asseca i es pesa, obtenint P_4 . La diferèn-

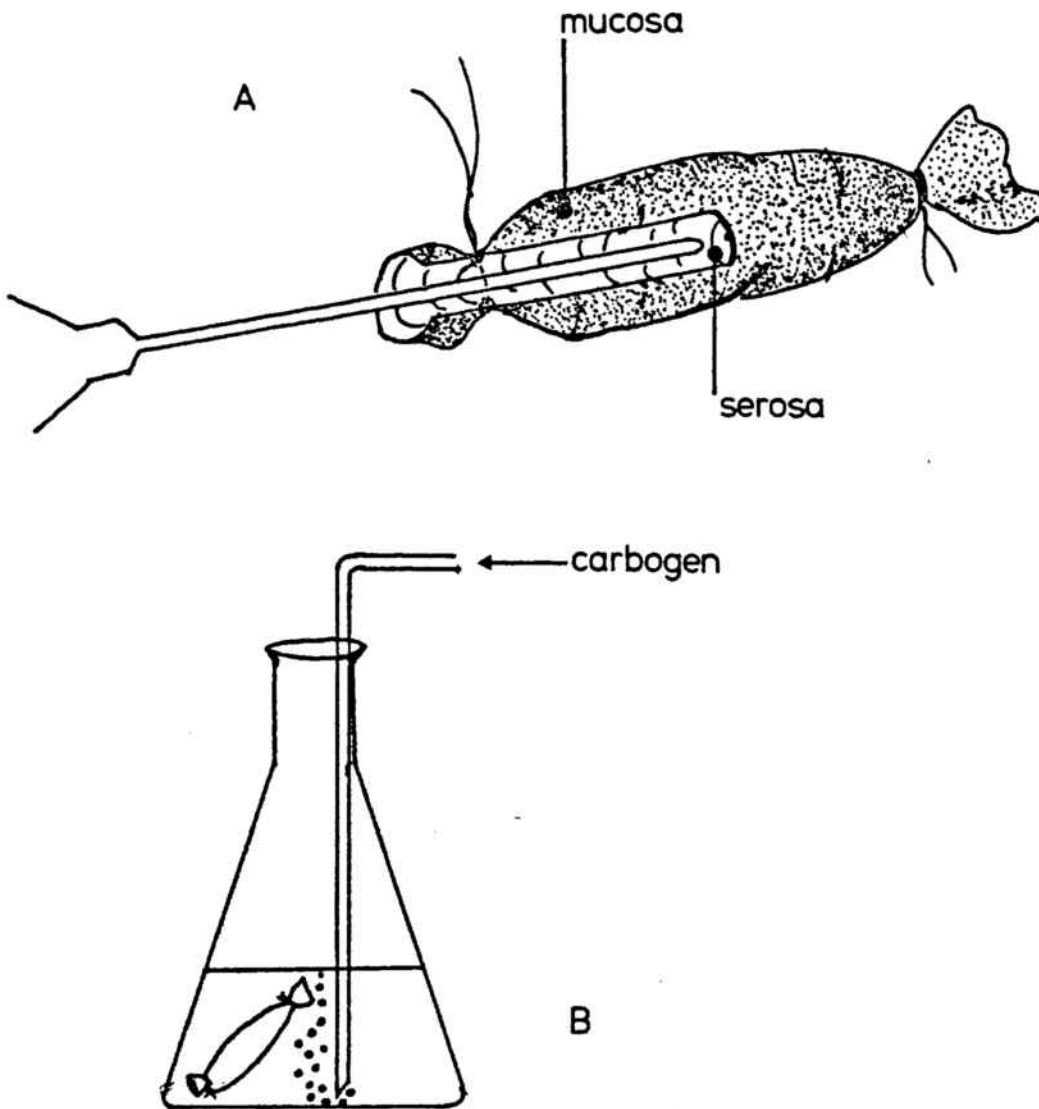


Fig. 2.- A: Detall de l'omplenat del sac evertit amb ajuda d'una xeringa amb agulla de punta camusa.

B: Esquema de l'erlenmeyer d'incubació amb el sac submergit i borbolleig de carbogen.

cia entre P_3 i P_4 equival al volum de líquid serosal final, anomenat V_f .

A fi de conèixer l'acumulació de sucre en el teixit, es procedeix a la seva extracció amb 2 ml de HNO_3 0,1 M amb agitació en càmera freda durant una nit. Després es pren una alíquota del líquid serosal final, del líquid mucosal final i del líquid d'extracció, en els quals es procedeix a la valoració de galactosa. En el nostre cas, hem realitzat el comptatge pel mètode de centelleig líquid.

3.4.2.- TECNICA DE CRANE-MANDELSTAM (20)

En absència de circulació vascular, els substrats són acumulats en la paret intestinal. Les dades d'acumulació d'una substància en la paret intestinal es poden utilitzar com a mesura de la proporció d'absorció en teixit intestinal in vitro.

A la tècnica d'acumulació en anells intestinals, descrita per CRANE & MANDELSTAM, es realitza la laparotomia i posterior eversió del budell prim de la mateixa manera que a la tècnica descrita anteriorment. Un cop obtinguda la porció de jejú es procedeix al fraccionament en seccions de 0,5 cm de llargada.

La retracció dels músculs longitudinals i transversals que té lloc després d'ésser tallats els anells, provoca la separació

adequada de les vellositats per tal d'assegurar un accés idoni d'oxigen i substrat.

Els anells s'introdueixen en erlenmeyers amb 10 ml dels diversos medis d'incubació, prèviament col·locats en bany termostàtic a 38°C i borbolejant amb carbogen durant tot l'experiment. S'introdueixen 20 anells a cada erlenmeyer i, al temps 1, 5, 25 i 45 minuts, se n'extreuen un nombre determinat. Es renten ràpidament amb sèrum fisiològic, s'eixuguen amb paper de filtre prèviament mullat amb sèrum i es pesen individualment.

Seguidament es procedeix a l'extracció del sucre acumulat en el teixit amb 1 ml de HNO_3 0,1 M per agitació en càmera freda durant una nit. Es pren una alíquota del líquid d'extracció i es procedeix a la valoració de la galactosa (comptatge pel mètode de centelleig líquid).

3.5.- DETERMINACIÓ DE D-GALACTOSA

En tots els medis d'incubació, a l'inici de l'experiment, la concentració de galactosa era 5 mM. Transcorreguts els períodes d'incubació, s'han mesurat les variacions en la concentració de sucre tant del líquid mucosal i serosal com en teixit, pel mètode de comptatge per centelleig líquid.

3.5.1.- FONAMENT DEL PROCÉS DE CENTELLEIG LÍQUID

La valoració del sucre s'ha realitzat mitjançant el comptatge de partícules β emeses per l'àtom de ^{14}C en posició 1 a la galactosa.

Aquestes partícules, no poden ser mesurades directament per l'aparell de comptatge, requereixen la presència d'un centellejador primari que és una substància luminescent capaç de produir llambreigs lluminosos en incidir sobre ella les partícules β .

L'aparell de comptatge consta d'un tub fotomulticador, la missió del qual és ampliar els senyals lluminosos convertint-los en impulsos elèctrics. Aquests són captats pels discriminadors, associats a la unitat de coincidència que permet solament la mesura d'impulsos compresos entre certes alçades. Els senyals passen al circuit electrònic que avalua i enregistra el nombre d'impulsos.

3.5.2.- COMPOSICIÓ DEL LÍQUID DE CENTELLEIG

S'ha emprat com a líquid de centelleig una mescla en forma d'emulsió que conté:

centellejador primari : 15 g de P.P.O.

dissolvent: 2 l. de tolué

emulgent: trit6-X-100

fase aquosa: q.s. per a obtenir l'emulsió.

Cada vial de centelleig contenia 10 ml. de l'emulsió. Les mostres s'han comptat durant 10 minuts a eficiència constant, en un aparell de centelleig líquid MARCK-II de Nuclear Chicago.

3.5.3.- CALCULS

Un cop realitzat el comptatge de cadascun dels vials, obtenim la mitja de radioactivitat per cada problema expressada en c.p.m. Aleshores, coneixent el nombre de c.p.m. corresponent a la concentració de sucre 5 mM es pot determinar el transport net i les concentracions finals existents en els diversos compartiments.

3.6.- TRACTAMENT ESTADÍSTIC

En l'estudi estadístic, les diferències entre les mitges dels diversos grups s'han realitzat i avaluat amb el test "t" d'Student. En tots els casos es va acceptar com a significatiu un nivell de probabilitat inferior o igual al 5%.

4.- RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1.- EFFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE CALCI PRESENT EN EL MEDI D'INCUBACIÓ SOBRE EL TRANSPORT ACTIU DE D-GALACTOSA.

Hom ha avaluat l'efecte de diverses concentracions de calci en el medi d'incubació sobre el transport de D-galactosa en sacs evertits. Els sacs es varen obtenir de pollastres d'una setmana d'edat i se'n van preparar quatre de cada animal.

L'absència total de calci en estudis de transport in vitro pot donar lloc a una disrupció de cèl.lules de la capa mucosa de l'epiteli intestinal, tal com s'ha descrit en ili de conill (9) i en bufeta urinària de galàpet (29). Per aquesta raó, la menor concentració de calci utilitzada ha estat de 0,01mM i, per tant, els efectes observats no poden ser atribuïts a un efecte sobre la integritat del teixit (26).

Les concentracions de calci assajades han estat: 0,01; 0,1; 1 i 2,5 mM. A la taula I s'indica la concentració serosal final, el transport net i la relació serosal/mucosal de galactosa corresponent a cada concentració de calci. L'estudi estadístic d'aquests resultats demostra que, a mesura que disminueix la concentració de calci en el medi d'incubació, disminueix el transport actiu de galactosa. Aquesta disminució és significativa quan la concentració de calci es redueix de 0,1 a 0,01 mM. ($p < 0,01$).

En la figura 3 es representen les concentracions serosals finals de galactosa en funció del logaritme de la concentració de calci present en el medi d'incubació. L'estudi estadístic dels resultats indica que, en sacs evertits de jejú de pollastre d'una setmana d'edat, hi ha una relació linial entre aquests dos paràmetres, a concentracions baixes de calci.

En augmentar, en el medi d'incubació, la concentració de calci fins a 5 mM, els valors obtinguts no difereixen dels corresponents a 2,5 mM. Així, en una sèrie d'experiments realitzats en presència de calci 5 mM, la concentració serosal final trobada ha estat de $8,62 \pm 0,22$ mM (n=12), expressada com a mitja \pm error estàndard i, entre parèntesi, el nombre de dades, valor que no difereix significativament de $8,88 \pm 0,41$ mM (n=34) obtinguda en presència de calci 2,5 mM.

L'efecte de la disminució de la concentració de calci extracel·lular sobre el transport de galactosa també ha estat estudiat en anells intestinals de pollastre.

Amb aquesta tècnica es mesura l'acumulació de sucre en el teixit, a diferència de la tècnica dels sacs evertits en què es mesurava el flux transepitelial del substrat. Els resultats (Fig. 4) indiquen que, a partir dels 15 min. d'incubació, l'acumulació de galactosa es veu augmentada en presència de 0,01 mM de calci.

Aquest efecte es pot explicar suposant que davant d'una baixa concentració de calci disminueix la permeabilitat basolateral dels enteròcits per a la galactosa sense que es modifiqui el transport actiu cap a l'interior. El resultat seria un augment en la concentració intracel·lular del sucre en disminuir el seu flux de sortida a través de l'esmentada membrana basolateral. La disminució d'aquesta permeabilitat explicaria la reducció en el flux transepitelial de galactosa observat en sacs evertits. Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts per HERZBERG i HOWLAND (30). Aquests autors observaren que l'omissió de calci en el medi extern augmenta l'acumulació de 3-oxi-metil-glucosa (3-OMG) en segments intestinals de ratolí. Per altra banda, BOLUFER i LARRALDE (12) van observar que l'acumulació de galactosa en anells intestinals de pollastre d'una setmana està inhibida en un 30% per l'absència de calci. Aquest efecte va ser atribuït a una disminució de l'afinitat del transportador per al sucre en absència del catió calci.

TAULA I:

EFFECTE DE CONCENTRACIONS DECREIXENTS DE CALCI EN EL MEDI D'INCUBACIÓ SOBRE LA CONCENTRACIÓ SEROSAL FINAL, TRANSPORT NET I RELACIÓ SEROSAL/MUCOSAL DE D-GALACTOSA EN SACS EVERTITS DE PELLASTRE D'UNA SETMANA D'EDAT.

CONC. DE CALCI EN EL MEDI (mM)	CONC.SEROSAL FINAL (mM)	$\mu\text{mol GAL./}$ 100 mg TEIXIT	S/M
2,50	8,88 \pm 0,41 (34)	0,60 \pm 0,09 (34)	2,5 \pm 0,11 (34)
1,00	8,26 \pm 0,58 (6)	0,48 \pm 0,08 (6)	2,1 \pm 0,10 (6)
0,10	7,42 \pm 0,53 (10)	0,38 \pm 0,09 (10)	1,76 \pm 0,11 (10)
0,01	6,05 \pm 0,19 (33)	0,19 \pm 0,04 (33)	1,4 \pm 0,07 (33)

Cada valor s'expressa com a mitja \pm error estàndard dels resultats obtinguts. El nombre de experiments es troba entre parèntesi. El temps d'incubació va ser de 45 min.

FIG. 3.- EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE CALCI PRESENT EN EL MEDI D'INCUBACIÓ SOBRE LA CONCENTRACIÓ SEROSAL FINAL DE D-GALACTOSA EN SACS EVERTITS DE BUDELL DE POLLASTRE DE SET DIES D'EDAT.

Ordenades: concentració serosal final de galactosa després de 45 minuts d'incubació.

Abscisses: logaritme de la concentració de calci en el medi d'incubació.

La línia discontinua indica la concentració inicial de galactosa en els medis mucosal i serosal. La recta ho és amb una $p < 0,01$. Cada punt és el promig de 6-34 experiments.

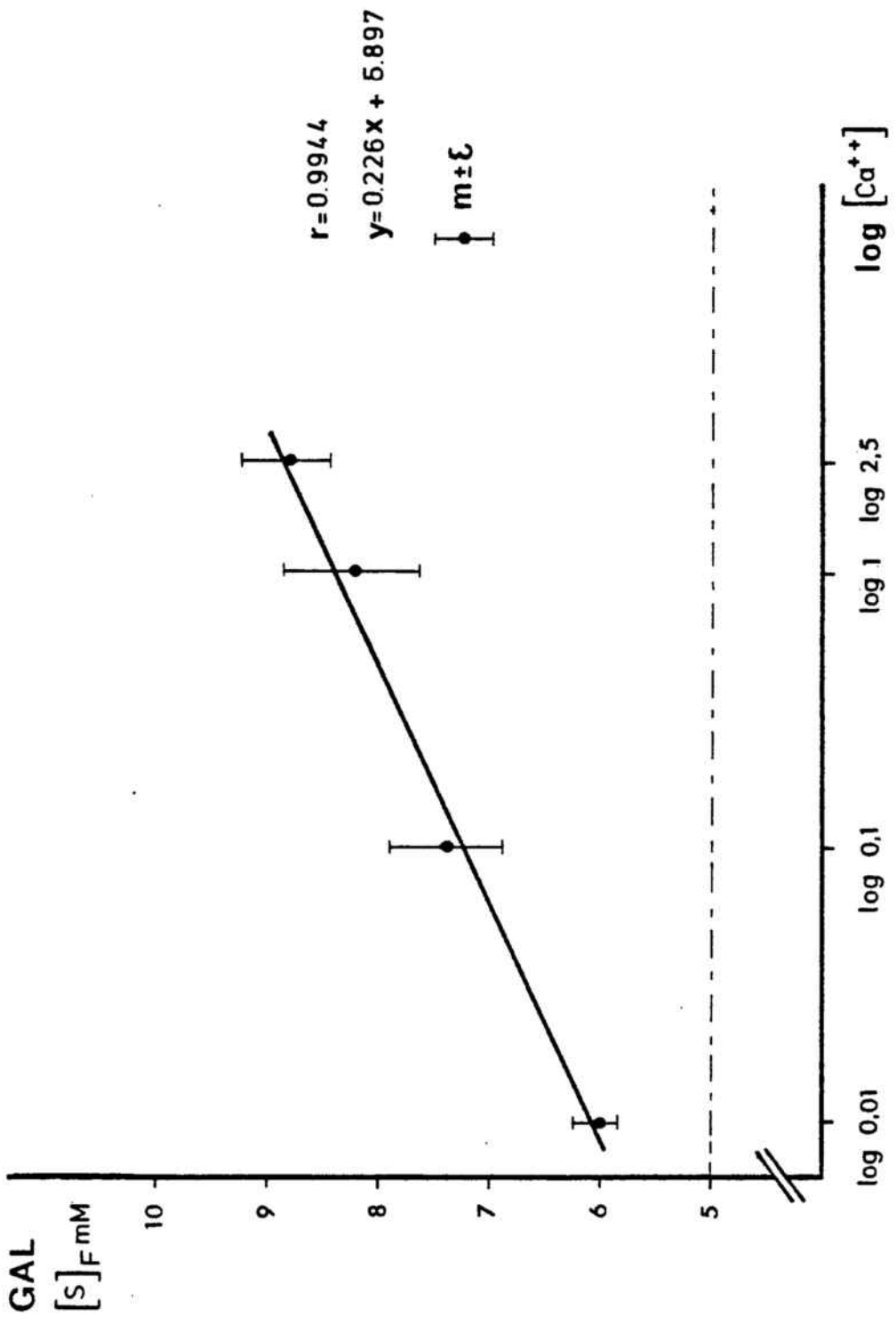


FIG. 4.- EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE CALCI SOBRE L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA EN ANELLS INTESTINALS DE POLLASTRE DE SET DIES.

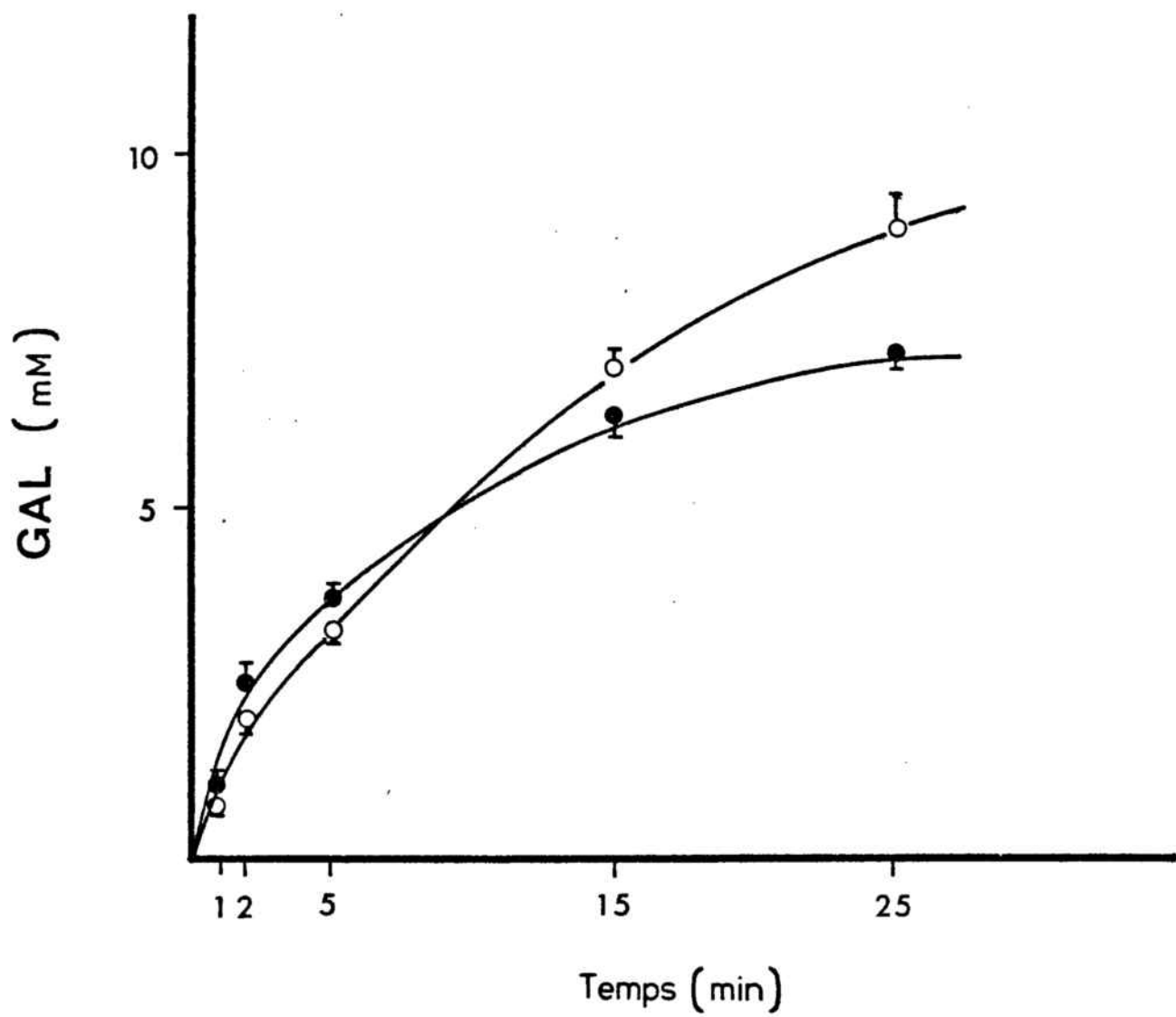
Ordenades: concentració de galactosa en el teixit (mM).

Abscisses: temps d'incubació (min.).

Els resultats s'expressen com a mitja \pm error estàndard de 13-29 experiments.

(●) Calci 2,5 mM

(○) Calci 0,01 mM



4.2.- EFFECTE DE LA DISMINUCIO DEL CALCI EXTERN SOBRE EL TRANSPORT DE GALACTOSA EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONS DE SODI VARIABLES.

Hom ha avaluat l'efecte de concentracions decreixents de catió sodi en el medi d'incubació, en presència de 2,5 i 0,01 mM de calci, sobre el transport de galactosa en sacs evertits intestinals. Hom ha triat un grup de pollastres de 1 a 3 dies d'edat degut a que, en aquest interval, apareixen inhibicions del transport de galactosa superiors al 50% en presència de 0,01mM de calci, podent així posar millor de manifest l'efecte de l'ió sodi.

Es van preparar medis amb sodi a concentracions de 140, 70, 25 i 0 mM, tant amb calci a concentració normal (2,5 mM) com a baixa (0,01 mM). Els resultats es mostren a la taula II i a la figura 5. L'estudi estadístic indica que el transport de galactosa és, com era d'esperar, dependent de la concentració externa de sodi i que el transport residual de galactosa en presència de calci 0,01 mM segueix essent dependent de la concentració de sodi en el medi d'incubació.

Es sabut que el transport actiu de galactosa en budell d'aus i mamífers és dependent del sodi extracel.lular. Quan aquest catió es substitueix per un altre catió monovalent, com per exemple el liti, el transport es veu marcadament inhibit (21). Aquesta inhibició es produeix tant in vivo com in vitro. CRANE i

col.laboradors (19) han postulat que el lloc d'interacció del sodi es troba localitzat a la vora en raspall de l'eritròcit i que la unió del sodi amb el transportador activa el desplaçament del complex transportador-substrat-sodi a través de la membrana. En absència de sodi, el transportador és, per raons desconegudes, menys eficient en la transferència dels substrats.

BOSAČKOVA i CRANE (13) van estudiar l'efecte d'una sèrie d'ions sobre la transferència de sucres a cèl.lules epitelials d'hàms-ter. Van trobar que K^+ , Li^+ , Rb^+ , Cs^+ i NH_4^+ inhibien el transport actiu i que aquesta inhibició era directament relacionada amb una inhibició de l'entrada de sodi a les cèl.lules. Aquests autors van concloure que la inhibició era el resultat d'una interacció competitiva dels cations monovalents per al locus del sodi en el transportador.

TAULA II:

INFLUÈNCIA DE LA SUBSTITUCIÓ PARCIAL DEL SODI EN EL MEDI D'INCUBACIÓ
 SOBRE EL TRANSPORT NET DE D-GALACTOSA EN SACS EVERTITS DE BUDELL DE
 POLLASTRE DE 1-3 DIES D'EDAT.

		μmol/ 100 mg teixit / 45 min		
CONCENTRACIÓ DE CALCI EN EL MEDI (mM)	[Na ⁺] (mEq/l): 140	70	25	0
2,50	2,03 ± 0,33 (9)	1,50 ± 0,12 (6)	0,72 ± 0,13 (7)	nul
0,01	1,12 ± 0,34 (6)	0,74 ± 0,15 (8)	0,45 ± 0,04 (5)	nul

Cada valor s'expressa com a mitja ± error estàndard. Nombre de da-
 des entre parèntesi.

FIG. 5.- EFECTE DE LA DISMINUCIÓ DEL CALCI EXTERN SOBRE EL TRANSPORT DE D-GALACTOSA EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES DE SODI VARIABLES.

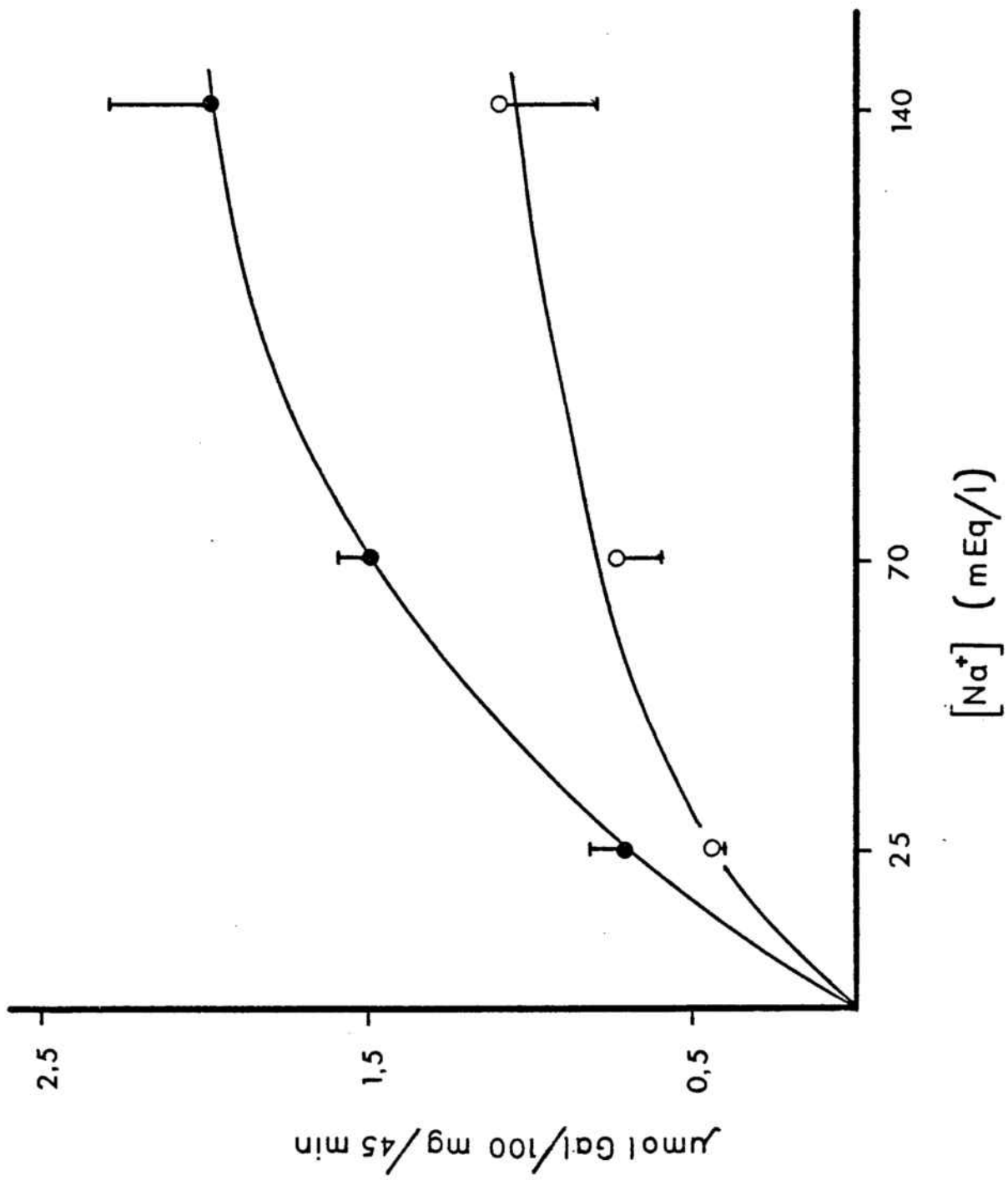
Ordenades: flux net de D-galactosa en sacs evertits intestinals de pollastres de 1-3 dies d'edat.

Abscisses: concentració de sodi en el medi d'incubació.

Cada punt és la mitja \pm error estàndard de 5-9 experiments.

(●) Calci 2,5 mM

(○) Calci 0,01 mM



4.3.- EFFECTE DEL CARBACOL SOBRE EL TRANSPORT NET I L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA EN INTESTI DE POLLASTRE.

L'increment dels nivells citoplasmàtics de calci pot actuar com a desencadenant d'un cert nombre de processos cel.lulars (contracció, secreció, activació d'enzimas, percepció de la llum, etc.). En el múscul de rata, l'augment en el calci lliure citosòlic forma part del mecanisme de regulació del transport de glucosa (15).

Després de veure l'efecte de baixes concentracions de calci extern en el transport i l'acumulació de galactosa, hem estudiat l'efecte d'augmentar el calci citosòlic utilitzant ionòfors del calci.

El carbacol o carbamilcolina és un agonista colinèrgic que, a elevades concentracions actua com a ionòfor del calci en el teixit intestinal (44). Als apartats anteriors s'ha posat de manifest la influència d'una disminució de calci extracel.lular sobre el transport net i l'acumulació de la galactosa. Amb els experiments que ara es descriuen hem volgut estudiar l'efecte sobre el transport quan incrementem, amb l'ajut d'un ionòfor, la concentració citosòlica de calci.

En primer lloc, els experiments consistiren en comparar, en sacs evertits obtinguts d'un mateix pollastre, el transport actiu del sucre en absència i en presència de carbacol 0,5 mM, mantenint constant la concentració de calci. En diferents experiments es

van assajar concentracions de 0.01: 2.5 i 5 mM de calci. A la taula III s'indica la concentració serosal final, el transport net i la relació serosal/mucosal de galactosa en les esmentades condicions experimentals. L'estudi estadístic dels resultats obtinguts indica que el carbacol no modifica el transport de galactosa en cap de les tres concentracions de calci considerades.

Es feren també experiments veient l'efecte del carbacol sobre l'acumulació de galactosa en anells intestinals de pollastre, en presència de calci 0,01 i 2,5 mM. Els resultats s'indiquen a la Fig. 6 on pot observar-se que el carbacol no té efecte sobre l'acumulació del sucre a cap dels diversos temps d'incubació estudiats.

D'aquests resultats es desprèn que, en budell de pollastres d'una setmana, l'increment en el calci citosòlic induït per carbacol no modifica la capacitat d'acumulació i transport de la galactosa pel teixit.

TAULA III:

EFFECTE DEL CARBACOL 0,5 mM SOBRE EL TRANSPORT ACTIU DE D-GALACTOSA EN SACS EVERTITS INTESTINALS DE POLLASTRE DE 7 DIES D'EDAT, A DIVERSES CONCENTRACIONS DE CALCI EN EL MEDI D'INCUBACIÓ

CONDICIONS	CONC.SEROSAL FINAL (mM)	μ mol GAL./ 100 mg TEIXIT	S/M
0,01 mM Ca ²⁺	6,07 ± 0,22 (4)	0,26 ± 0,08 (4)	1,32 ± 0,09 (4)
0,01 mM Ca ²⁺ +	7,18 ± 0,63 (4)	0,42 ± 0,09 (4)	1,60 ± 0,15 (4)
0,50 mM Carbacol			
2,5 mM Ca ²⁺	8,15 ± 0,21 (4)	0,74 ± 0,15 (4)	1,76 ± 0,06 (4)
2,5 mM Ca ²⁺ +	8,51 ± 0,19 (4)	0,74 ± 0,05 (4)	1,84 ± 0,07 (4)
0,5 mM carbacol			
5 mM Ca ²⁺	8,6 ± 0,56 (4)	0,72 ± 0,14 (4)	1,76 ± 0,10 (4)
5 mM Ca ²⁺ +	9,1 ± 0,38 (4)	0,53 ± 0,12 (4)	1,75 ± 0,15 (4)
0,5 mM carbacol			

Cada valor s'expressa com a mitja ± error estàndard. Nombre de dades entre parèntesi. Temps d'incubació: 45 minuts.

FIG. 6.- EFECTE DEL CARBACOL 0,5 mM SOBRE L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA EN PRESENCIA DE CALCI 0,01 mM i 2,5 mM, EN ANELLS INTESTINALS DE POLLASTRE DE 7 DIES D'EDAT.

Ordenades: concentració de galactosa en el teixit (mM)

Abcisses: temps d'incubació (min.)

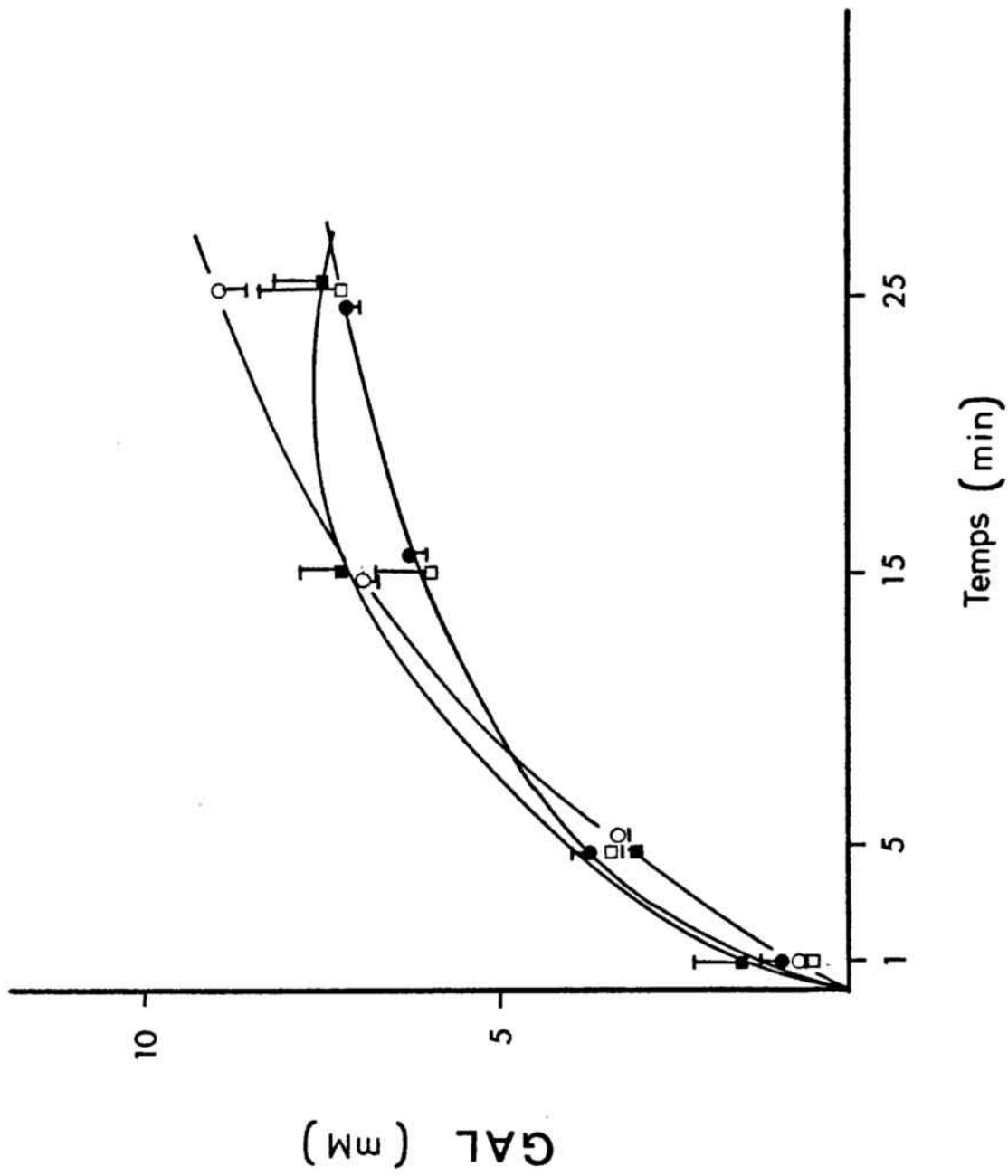
Els resultats s'expressen com a mitja \pm error estàndard de 4 experiments.

(●) Calci 2,5 mM.

(○) Calci 0,01 mM.

(■) Calci 2,5 mM + carbacol 0,5 mM.

(□) Calci 0,01 mM + carbacol 0,5 mM.



4.4.- EFFECTE DE L'A 23187 SOBRE EL TRANSPORT DE D-GALACTOSA

L'A 23187 és un ionòfor que indueix el transport de calci cap a l'interior que les cèl.lules de la mucosa intestinal sense modificar els nivells d'AMPc (9,26). En alguns teixits, l'increment de calci citosòlic induït per A 23187 dóna lloc a un augment de la difusió facilitada de glucosa (49).

Vàrem avaluar l'efecte d'afegir A 23187 $6 \mu\text{M}$ al medi serosal de sacs evertits sobre el transport net i la concentració serosal final de galactosa en pollastres d'una setmana d'edat. Es van fer experiments en presència de 2,5 i 0,01 mM de calci. Els resultats (Taula IV) indiquen que l'ionòfor no té efecte sobre els dos paràmetres esmentats a cap de les dues concentracions de calci utilitzades.

També es van fer experiments incubant anells intestinals de pollastre de la mateixa edat amb A 23187, a les mateixes dues concentracions de calci. Els resultats (Fig. 7) confirmen els descrits prèviament en sacs evertits.

Aquests resultats, juntament amb els obtinguts per al carbacol (apartat 4.3) indiquen que l'increment del calci lliure en el citosol no modifica la capacitat de transport i acumulació de l'epiteli intestinal.

TAULA IV:

EFFECTE DE L'A 23187 SOBRE EL TRANSPORT ACTIU DE D-GALACTOSA EN SACS INTESTINALS DE POLLASTRE DE SET DIES D'EDAT.

CONDICIÓ	CONC. SEROSAL FINAL (mM)	$\mu\text{mol GAL.}/$ 100 mg TEIXIT	S/M
0,01 mM Ca^{2+}	6,31 \pm 0,55 (5)	0,23 \pm 0,03 (3)	1,31 \pm 0,09 (5)
0,01 mM Ca^{2+} 6 μM A 23187	7,01 \pm 0,88 (5)	0,48 \pm 0,14 (3)	1,46 \pm 0,18 (5)
2,5 mM Ca^{2+}	11,62 \pm 1,55 (6)	1,16 \pm 0,26 (6)	2,76 \pm 0,37 (6)
2,5 mM Ca^{2+} 6 μM A 23187	11,76 \pm 1,12 (6)	1,30 \pm 0,27 (6)	2,75 \pm 0,33 (6)

Cada valor s'expressa com a mitja \pm error estàndard. Nombre de experiments entre parèntesi. Temps d'incubació: 45 minuts.

FIG. 7.- EFECTE DE L'A 23187 SOBRE L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA EN PRESENCIA DE CALCI 0,01 mM i 2,5 mM, EN ANELLS INTESTINALS DE POLLASTRE DE 7 DIES D'EDAT.

Ordenades: concentració de galactosa en el teixit (mM)

Abscisses: temps d'incubació (min.).

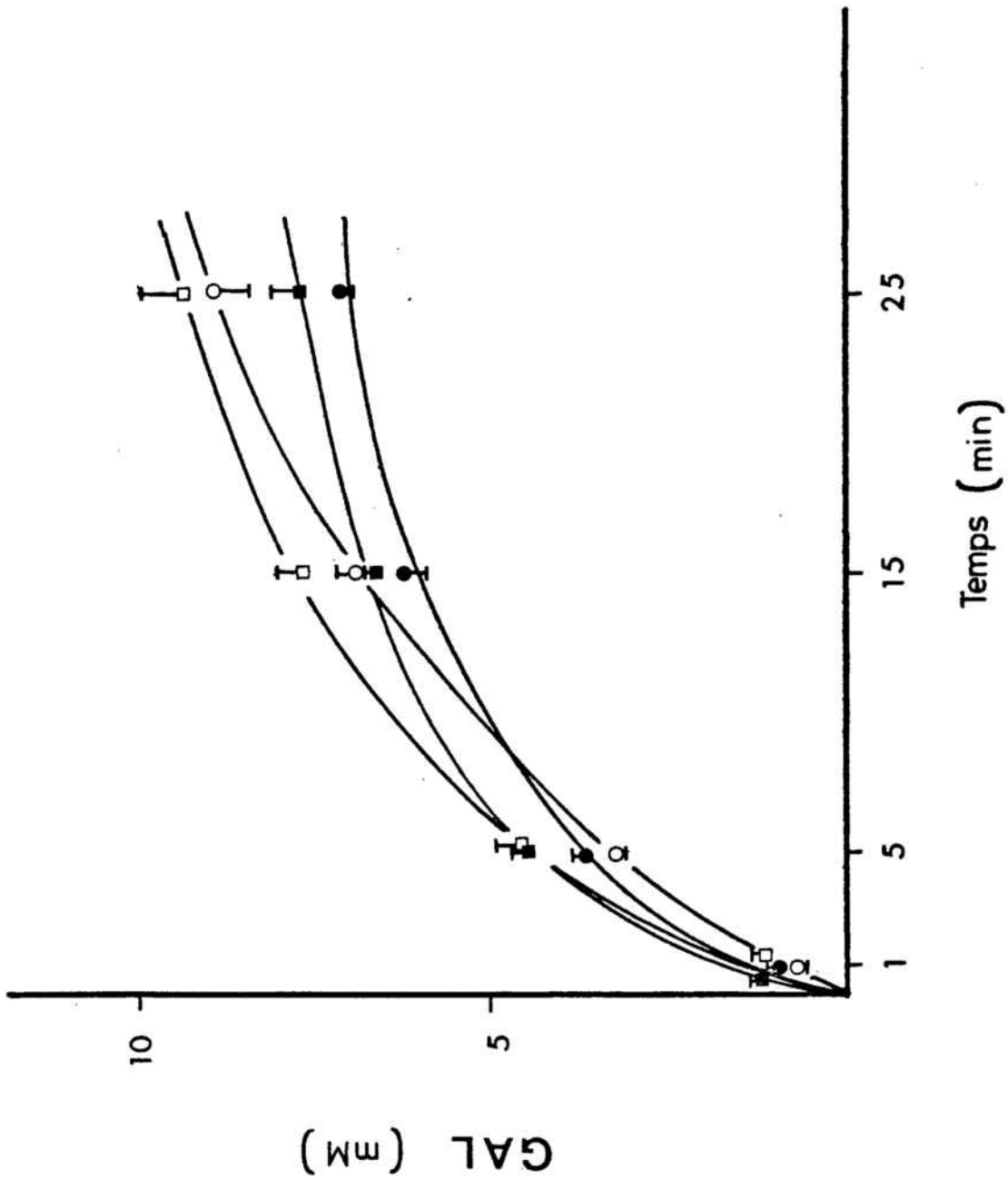
Els resultats s'expressen com a mitja \pm error estàndard de 12-21 experiments.

(●) Calci 2,5 mM

(○) Calci 0,01 mM

(■) Calci 2,5 mM + A 23187 6 μ M

(□) Calci 0,01 mM + A 23187 6 μ M



4.5.- EFFECTE DE LA TEOFIL.LINA SOBRE L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA

Després de veure que l'increment del calci citosòlic no modifica els paràmetres del transport actiu de galactosa estudiats, hem utilitzat la teofil.lina, substància que mobilitza el calci dels dipòsits cel.lulars (32) i que, a més, incrementa els nivells d'AMPc per ser un potent inhibidor de la fosfodiesterasa.

Vàrem estudiar l'efecte de la teofil.lina present en el medi d'incubació a una concentració de 10 mM, sobre l'acumulació de galactosa per anells intestinals de pollastre de quatre dies d'edat.

Els experiments van consistir en comparar l'acumulació del sucre a diverses concentracions de calci, en presència i absència de teofil.lina. Les concentracions de calci en el medi d'incubació assajades, foren 0,01 i 2,5 mM. Per a cada condició es van prendre quatre segments intestinals.

A la Fig. 8 es representa l'efecte de la teofil.lina sobre l'acumulació de galactosa a través del temps d'incubació. La teofil.lina incrementa significativament l'acumulació del sucre a partir del minut 15 des de l'inici de la incubació. Aquest efecte és, doncs, atribuïble a l'increment citosòlic d'AMPc induït per la teofil.lina i és independent del calci extracel.lular donat que no hi ha diferències en l'efecte de la teofil.lina a les dues concentracions de calci.

FIG. 8.- EFECTE DE LA TEOFIL.LINA 10 mM SOBRE L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA EN PRESENCIA DE CALCI 0,01 mM I 2,5 mM, EN ANELLS INTESTINALS DE POLLASTRE DE 7 DIES D'EDAT.

Ordenades: concentració de galactosa en el teixit (mM)

Abcisses: temps d'incubació (min.)

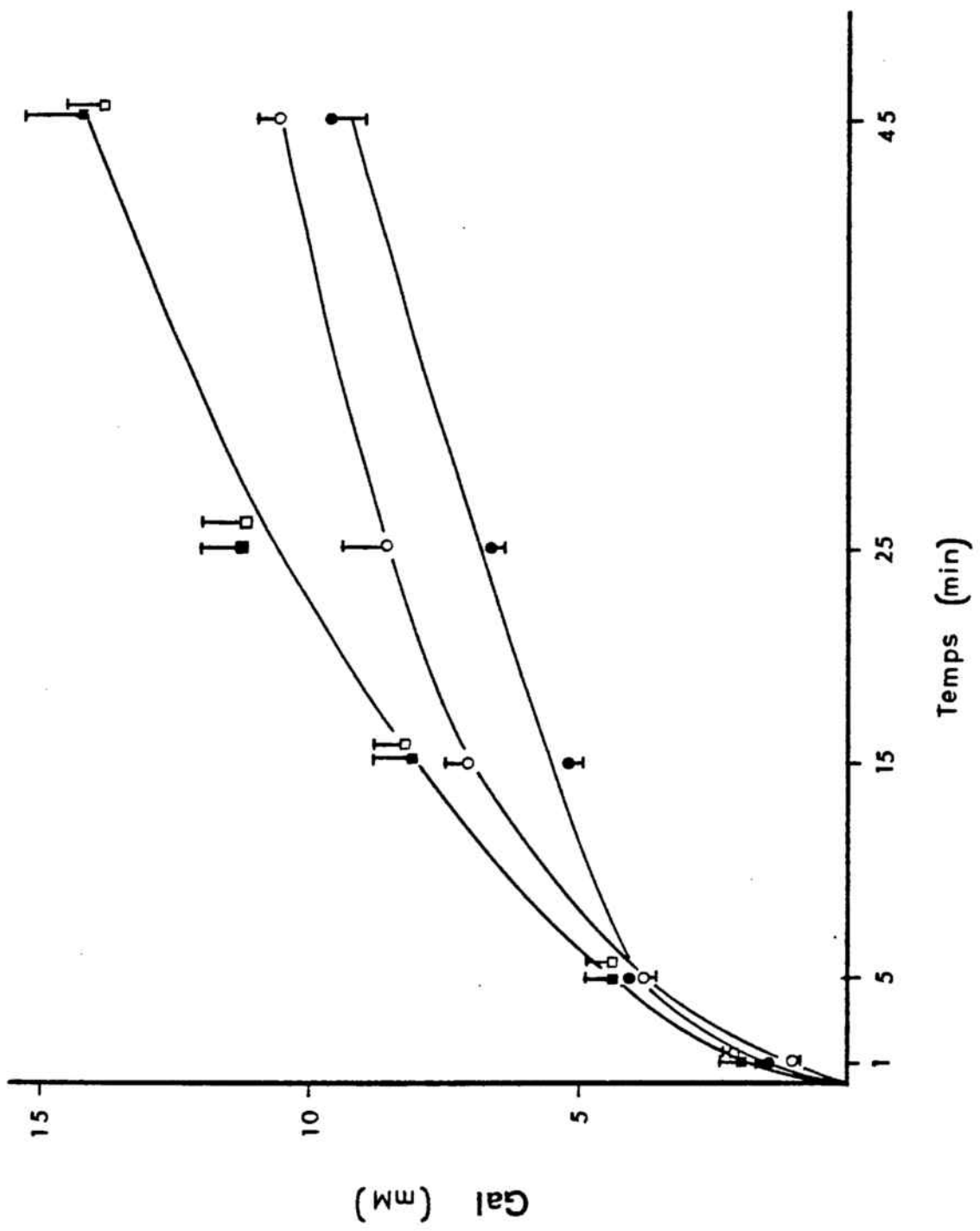
Els resultats s'expressen com a mitja \pm error estàndard de 12 experiments.

(●) Calci 2,5 mM

(○) Calci 0,01 mM

(■) Calci 2,5 mM + teofil.lina 10 mM

(□) Calci 0,01 mM + teofil.lina 10 mM



4.6.- EFFECTE DE L'AMPc EXOGEN SOBRE L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA PER ANELLS INTESTINALS DE POLLASTRE.

Després de veure l'efecte de la teofil.lina, vam voler confirmar que aquest era degut a l'increment d'AMPc induït per la inhibició de la fosfodiesterasa, per la qual cosa vam fer experiments en presència d'AMPc exogen.

Vam avaluar l'efecte de l'AMPc, present en el medi d'incubació a una concentració de 5 mM, sobre l'acumulació de galactosa per anells intestinals de pollastre d'una setmana d'edat. Cal emprar concentracions d'AMPc elevades degut a la poca liposolubilitat d'aquesta substància. Els experiments van consistir en comparar l'acumulació del sucre a diferents concentracions de calci, en presència i absència d'AMPc. Les concentracions de calci en els medis d'incubació foren 0,01 mM i 2,5 mM. Per a cada condició es prengueren quatre anells intestinals.

Els resultats s'indiquen a la Fig. 9 on pot veure's que l'AMPc exogen incrementa significativament l'acumulació de galactosa, tant en presència de 2,5 com de 0,01 mM de calci. És a dir, l'efecte de l'AMPc és independent del calci extracel.lular. Aquests resultats són, doncs, anàlegs als obtinguts amb teofil.lina (apartat 4.5).

FIG. 9.- EFECTE DE L'AMPc 5 mM SOBRE L'ACUMULACIÓ DE D-GALACTOSA EN PRESENCIA DE CALCI 0,01 mM i 2,5 mM EN ANELLS INTESTINALS DE POLLASTRE DE SET DIES D'EDAT.

Ordenades: concentració de galactosa en el teixit (mM).

Abscisses: temps d'incubació (min.)

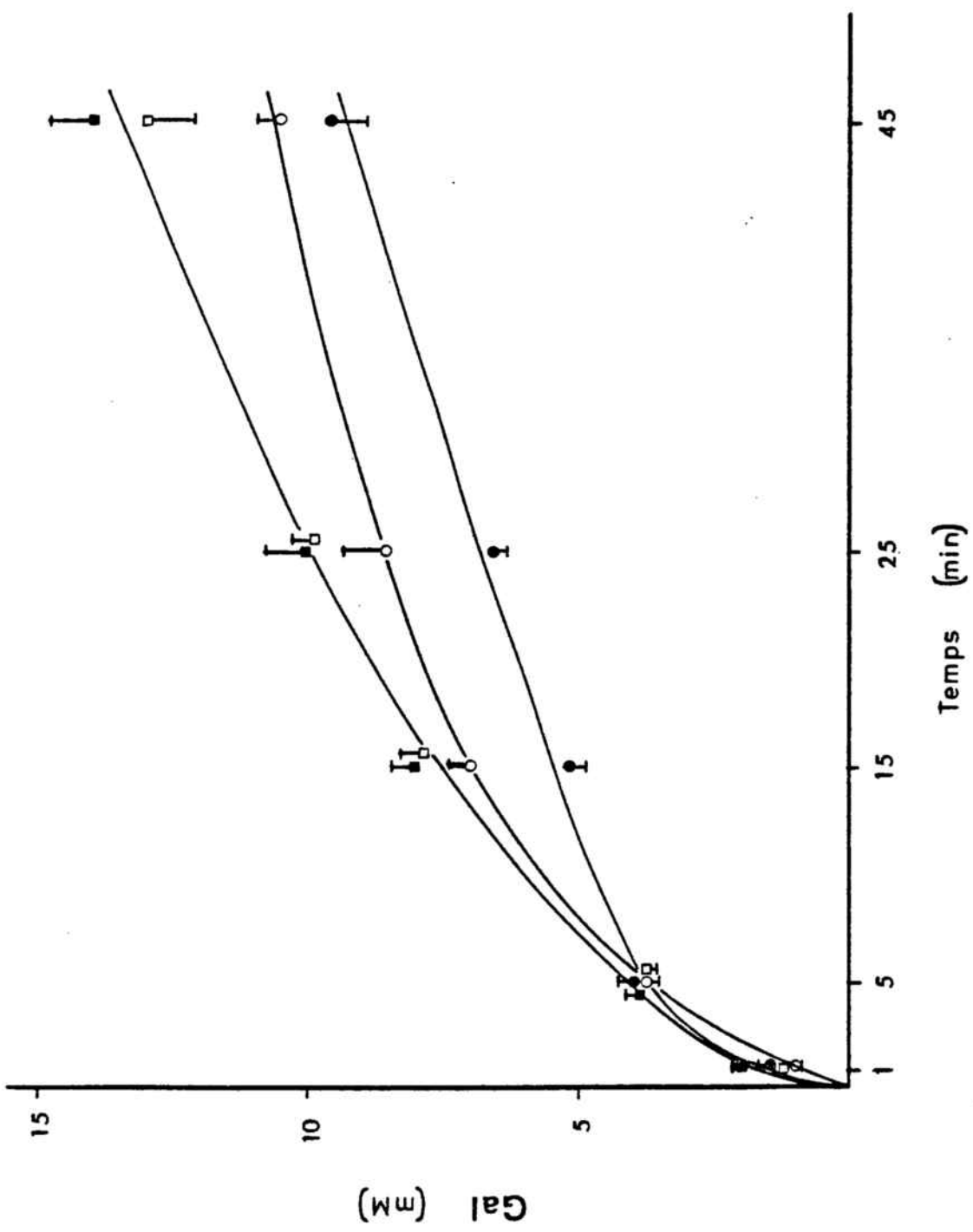
Els resultats s'expressen com a mitja \pm error estàndard de 4 experiments.

(●) Calci 2,5 mM

(○) Calci 0,01 mM

(■) Calci 2,5 mM + AMPc 5 mM

(□) Calci 0,01 mM + AMPc 5 mM.



4.7.- EFECTE DE LA SUBSTITUCIÓ DEL CALCI DEL MEDI D'INCUBACIÓ
PER ESTRONCI, SOBRE EL TRANSPORT ACTIU DE D-GALACTOSA

L'estronci (Sr^{2+}) substitueix el calci en diverses respostes cel·lulars. Per exemple, la resposta secretora de les glàndules salivals de mosca a la 5-hidroxi-triptamina no es produeix quan manca calci al medi d'incubació; la resposta, però, es restaura quan es posa Sr^{2+} en lloc de Ca^{2+} (46). Efectes similars de l' Sr^{2+} s'han descrit en ili de conill (9) i en còlon de rata (37).

Nosaltres hem estudiat el transport de galactosa en sacs ever-tits en medis d'incubació en els quals el calci es substituït per l'estronci. Els primers experiments es van fer amb estronci a la mateixa concentració que el calci, és a dir, 2 mM. Els resultats (Taula V) indicaren que l'estronci, a aquesta concentració, no substitueix el calci. Quan la concentració d' Sr^{2+} , en canvi, s'augmenta fins a 10 mM, el budell és capaç d'acumular i transportar galactosa amb la mateixa eficiència que quan hi ha calci present en el medi d'incubació. En una paraula, els requeriments de calci no són totalment específics ja que la seva substitució per estronci 10 mM permet mantenir plenament el transport actiu de galactosa.

TAULA V:

EFFECTE DE LA SUBSTITUCIÓ DEL CALCI DEL MEDI D'INCUBACIÓ PER ESTRONCI SOBRE LA CONCENTRACIÓ SEROSAL FINAL, EL TRANSPORT NET I LA RELACIÓ SEROSAL/MUCOSAL DE D-GALACTOSA.

CONC. DE CALCI (mM)	CONC. D'ESTR- TRONCI (mM)	CONC. SEROSAL FINAL (mM)	$\mu\text{mol}/\text{GAL.}/$ 100 mg teixit	S/M
0,01	0	5,22 ± 0,16 (8)	0,17 ± 0,05 (8)	1,06 ± 0,01 (8)
2,50	0	7,99 ± 0,46 (8)	0,52 ± 0,12 (6)	1,63 ± 0,08 (6)
0,01	2,5	5,52 ± 0,30 (8)	0,42 ± 0,02 (8)	1,13 ± 0,06 (8)
10,00	0	8,91 ± 0,51 (4)	0,60 ± 0,09 (4)	1,29 ± 0,24 (4)
0,01	10	9,62 ± 0,99 (8)	0,62 ± 0,13 (8)	2,02 ± 0,26 (5)

Cada valor s'expressa com a mitja ± error estàndard dels resultats obtinguts. El nombre de dades es troba entre parèntesi. Temps d'incubació: 45 minuts.

5.- CONCLUSIONS

1.- El transport actiu de D-galactosa per sacs evertits de pollastre d'una setmana és funció linial del logaritme de les concentracions de calci entre 0,01 i 2,5 mM. Així com disminueix la concentració de calci, disminueix el transport actiu de galactosa.

2.- L'acumulació de Galactosa per anells de pollastre d'una setmana es troba afectada per la concentració de calci en el medi d'incubació. Quan en el medi hi ha calci 0,01 mM, la concentració de galactosa assolida en teixit a partir dels 15 min. d'incubació, és superior a l'obtinguda en presència de calci 2,5 mM.

3.- El transport residual de Galactosa en presència de calci 0,01 mM segueix essent dependent de la concentració de sodi en el medi d'incubació.

4.- El carbacol no presenta cap efecte sobre el transport net i l'acumulació de Galactosa en l'intestí de pollastre d'una setmana, tant en presència de calci 0,01 com 2,5 mM.

5.- L'increment en el calci citosòlic induït per ionòfor A 23187 no modifica la capacitat d'acumulació i transport de la galactosa pel teixit intestinal.

- 6.- La teofil.lina produeix un augment de l'acumulació de galactosa per anells intestinals de pollastre d'una setmana.
- 7.- L'AMPc exogen produeix un augment significatiu de l'acumulació de galactosa per anells intestinals de pollastre.
- 8.- L'augment de l'acumulació de galactosa induït per teofil.lina i AMP exogen és independent del calci extracel.lular. Aquests agents possiblement actuarien disminuint la permeabilitat de la membrana basolateral.
- 9.- L'estronci 10 mM en el medi d'incubació substitueix l'efecte que té el calci 2.5 mH.

6.- BIBLIOGRAFIA

1. ALVARADO, F. i CRANE, R.K. (1962): Biochim. Biophys. Acta, 56, 170.
2. BATT, E.R. i SCHACHTER, D. (1969): Am.J. Physiol., 216, 1064.
3. BEAUMONT, A. i CASSIER, P: Biologie Animale: Les Cordés. Anatomie comparée des vertébrés. Ed. Dunod, Paris, 1972.
4. BERRIDGE, M.J. (1975): Adv. Cyclic Nucl. Res., 6, 1.
5. BIHLER, I. (1969): Biochim. Biophys. Acta. 183, 169.
6. BIHLER, I. HOWKINS, K.A. i CRANE, R.K. (1962): Biochim. Biophys. Acta, 59, 94.
7. BIHLER, I. KIM, N.D. i SAWH, P.C. (1969): Can. J. Pharmacol., 47, 525.
8. BOGNER, P.H. (1966): Biol. Neonat., 9, 1.
9. BOLTON, J.E. i FIELD, M. (1977): J. Membrane Biol., 35, 159.
10. BOLUFER, J., BERJON, A. i LARRALDE, J. (1977): Poult. Sci., 56, 1512.

11. BOLUFER, J., GAZA, E., GUERRERO, M.C., MORETÓ, M. i PLANAS, J.M. (1980): XVIII Intern. Congr. Physiol. Sci., Budapest (A.942).
12. BOLUFER, J. i LARRALDE, J. (1977): Comp. Biochem. Physiol., 58 (a), 75.
13. BOSÁČKOVA, J. i CRANE, R.K. (1965): Biochim, Biophys. Acta, 102, 423.
14. CARRUTHERS, A. i SIMONS, T.J.B. (1978): J. Physiol. (London), 248, 498.
15. CLAUSEN, T., ELBRINK, J. i DAHL-HANSEN, A.B. (1975): Biochim. Biophys. Acta, 375, 292.
16. CORDERO, N.T. i WILSON, T.H. (1961): Gastroenterol., 41, 500.
17. CRANE, R.K. (1960): Physiological Rev., 40, 789.
18. CRANE, R.K. (1965): Fed. Proc., 24, 1000.
19. CRANE, R.K.: Handbook of Physiology, vol. 3, cap. 69. Ed. C.F. CODE. Washington D.C., 1968.
20. CRANE, R.K. i MANDELSTAM, P. (1960): Biochim. Biophys. Acta, 45, 460.

21. CSAKY, T.Z. i ZOLLICOFFER, L. (1960): Am. J. Physiol., 198, 1056.
22. DARLINGTON, W.A. i QUASTEL, J.H. (1953). Arch. Biochem. Biophys., 42, 194.
23. FAUST, R.G. (1962): Biochim. Biophys. Acta, 60, 604.
24. FISHER, R.B. i PARSONS, D.S. (1949) . J. Physiol. (London), 110, 281.
25. FISHER, R.B. i PARSONS, D.S. (1953). J. Physiol. (London), 119, 224.
26. FRIZZELL, R.A. (1977): J. Membrane Biol., 35, 175.
27. GRASSE, P.P. i DEVILLERS, C.H.: Zoologie: Vertébrés. Masson et Cie. Editeurs. Paris, 1965.
28. HAMILTON, J.D. i Mc MICHAEL, B.H. (1968): Lancet, 20, 154.
29. HAYS, R.M., SINGER, B. i MALAMED, S. (1965): J. Cell Biol., 25, 195.
30. HERZBERG, G.R. i HOWLAND, J.L. (1974): Comp. Biochem. Physiol., 47 (a), 1191.
31. HUMPHREY, C.D. i TURK, D.E. (1974): Poult. Sci., 53, 990.

32. ILUNDAIN, A. i NAFTALIN, P.J. (1979): J. Physiol., 296, 101.
33. KREBS, H.A. i HENSELEIT, Z. (1932): Fisiol. Chem. Hoppe-Seylers, 210, 33.
34. LARRALDE, J., FERNANDEZ OTERO, P. i BELLO, J. (1961): Rev. esp. Fisiol., 18, 128.
35. LASZT, L. i VERZAR, F. (1937): Biochem. Ztschr., 292, 159.
36. LEHNINGER, A.L.: Transporte activo a través de membranas, en Bioquímica, Cap. 27. Ed. Omega, Barcelona, 1972.
37. MUNDAY, K.A., PARSONS, B.J., POAT, J.A. i SMITH, D.J. (1973): Proc. Physiol. Soc., 232, 89 P.
38. NAGATA, N. i RASMUSSEN, H. (1970): Proc. Natn. Acad. Sci., 65, 368.
39. NAMM, D.H., MAYER, S.E. i MALTBIE, M. (1968): Molec. Pharmacol., 4, 522.
40. ORTIZ, M., LLUCH, M. i PONZ, F. (1979): Rev. esp. Fisiol., 35, 367.
41. OVERTON, J. i SHOUP, J. (1964): J. Cell Biol., 21, 75.
42. PLANAS, J.M., MORETÓ, M. i BOLUFER, J. (1981): Experientia, en premsa.

43. PLANAS, J.M., MORETÓ, M. i BOLUFER, J. (1981): Rev. esp. Fisiol., en premsa.
44. PLANAS, J.M., MORETÓ, M. i NAFTALIN, R. (1980): XXVIII Intern. Congr. Physiol. Sci., Budapest (A.2797).
45. PONZ, F. i LLUCH, M. (1964): Rev. esp. Fisiol., 20, 179.
46. PRINCE, W.T. i BERRIDGE, M.J. (1973): J. Exp. Biol., 58, 367.
47. PRINCE, W.T., BERRIDGE, M.J. i RASMUSSEN, H. (1972): Proc. Natn. Acad. Sci., 69, 553.
48. RASMUSSEN, H. (1970): Science, 170, 404.
49. REEVER, J.P. (1975): J. Biol. Chem., 250, 9428.
50. RIKLIS, E. i QUASTEL, J.H. (1958): J. Biochem. Physiol., 36, 347.
51. ROBINSON, J.W.L. (1979): Comp. Biochem. Physiol., 34, 641.
52. SCHARRER, E., LIEBICH, H.G., RAAB, W. i PROMBERGER, N. (1979): Abl. Vet. Med. A., 26, 95.
53. SÖGNEN, E. (1965): Acta Pharmacol. Toxicol., 22, 49.

54. WILLIAM, J.A. i LEE, M. (1974): Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 542.
55. WILSON, T.H. i LANDAU, B.R. (1960): Am. J. Physiol., 198, 99.
56. WILSON, T.H. i WISEMAN, G. (1954): J. Physiol. (London), 123, 116.
57. YOUNOSZAI, M.K. (1974): J. Pediat., 85, 446.