

CATEDRA DE FISILOGIA ANIMAL

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

" ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE GLICIL-SARCOSINA
POR ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO "

Memoria presentada para
aspirar al grado de
Licenciado en Farmacia,
por Maria Luísa CALONGE
CASTRILLO

M^{ra} Luísa Calonge

Vº Bº

Los Directores del Trabajo



Firmado: J. BOLUFER

Firmado: A. ILUNDAIN

A mis padres.

Los trabajos correspondientes a la presente Tesis de Licenciatura han sido realizados en el Departamento de Fisiología Animal, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección del Prof. Dr. D. José Bolufer González y de la Prof. Dra. Dña. Ana Ilundain Larrañeta.

Deseo expresar mi sincero agradecimiento:

Al Dr. D. José Bolufer González, por su constante labor directiva, así como por su paciencia y comprensión.

A la Dra. Dña. Ana Ilundain Larrañeta, por su enorme ayuda y valiosa dirección.

A mis compañeros del Departamento, por todos los consejos recibidos y por el estímulo ofrecido en todo momento.

A M^a del Carmen Montero Balosa, sin cuya colaboración no habría sido posible la realización de la puesta a punto de la técnica.

A la cátedra de Farmacognosia y Farmacodinamia, y en especial a la Dra. Dña. M^a Dolores García Jiménez, por su ayuda en la realización del estudio cromatográfico.

A la empresa COPOLL S.A., y fundamentalmente al Sr. D. Rafael Romero Zurita, por proporcionarnos los pollos y orientarnos en la cría de los animales.

A Reyes Castrillo López y a Luis María Santos Gómez del Castillo, por su valiosa ayuda en la mecanografía y en el diseño de las figuras que aparecen en el presente trabajo.

A todas aquellas personas que de alguna forma han contribuido a su elaboración.

Asimismo, agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la concensión de una Beca del Plan de Formación de Personal Investigador, que ha hecho posible la realización de la presente Memoria.

INDICE

I. INTRODUCCION

	<u>Página</u>
I.1. <u>MORFOLOGIA DEL EPITELIO INTESTINAL</u>	1
I.2. <u>TRANSPORTE A TRAVES DE MEMBRANAS</u>	9
1. Difusión simple.....	10
2. Transporte mediado.....	12
I.3. <u>TRANSPORTE A TRAVES DEL EPITELIO INTESTINAL</u> .	14
1. Transporte activo primario.....	15
2. Transporte activo secundario.....	17
I.4. <u>TRANSPORTE DE PEPTIDOS A TRAVES DEL EPITELIO</u> <u>INTESTINAL</u>	20
1. Transporte Activo y difusión simple de péptidos.....	22
2. Interacción entre el sodio y el trans - porte de péptidos.....	28
I.5. <u>OBJETO DEL TRABAJO</u>	31

II. MATERIAL Y METODOS.

II.1. <u>ANIMALES DE EXPERIMENTACION</u>	32
II.2. <u>SOLUCIONES</u>	32
1. Medios de incubación	
a) Standard.....	33
b) Medio de incubación sin sodio.....	34
c) Medio de incubación a pH=5 y a pH=6...	34
2. Medio de aislamiento	
a) Con citrato.....	35
b) Con hialuronidasa.....	35

II. 3.	<u>TECNICAS</u>	36
	1. Aislamiento de células epiteliales de intestino delgado de pollo.....	36
	2. Experimentos de captación.....	40
	3. Valoración del sustrato por centelleo líquido.....	45
	4. Cromatografía.....	46
II. 4.	<u>DETERMINACIÓN DE LA PROTEINA</u>	48
II. 5.	<u>MODOS DE EXPRESAR LOS RESULTADOS</u>	52
II. 6.	<u>TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS</u>	54
II. 7.	<u>REACTIVOS</u>	55

III. RESULTADOS

III.1.	<u>PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA</u>	56
III.2.	<u>VOLUMEN EXTRACELULAR</u>	62
III.3.	<u>VOLUMEN INTRACELULAR</u>	65
III.4.	<u>ENTRADA DE GLY-SAR EN CELULAS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION</u>	69
III.5.	<u>ESTIMACION DE LA HIDROLISIS DE GLY-SAR</u>	72
	1. Cromatografía.....	72
	2. Efectos de la L-Metionina.....	73
III.6.	<u>DEPENDENCIA DEL SODIO</u>	77
	1. Ausencia del sodio.....	77
	2. Efecto de la Monensina.....	78
	3. Efecto de la Ouabaína.....	79
III.7.	<u>EFECTO DEL pH</u>	86
III.8.	<u>CINETICA DEL TRANSPORTE DEL GLY-SAR:EFECTO DE LA CARNOSINA</u>	92

IV .	<u>DISCUSION</u>	100
------	------------------------	-----

V . CONCLUSIONES.....112

VI. BIBLIOGRAFIA.....114

I. INTRODUCCION.

I. INTRODUCCION

I. 1. MORFOLOGIA DEL EPITELIO INTESTINAL.

La capacidad de intercambiar sustancias a través de membranas biológicas depende, en gran parte, de la extensión de superficie membranosa. En este sentido el intestino delgado está altamente especializado, ya que además de presentar una gran longitud, su superficie de intercambio se ve multiplicada por las siguientes características morfológicas:

- Presencia de válvulas conniventes o pliegues de Kerchring, que aproximadamente aumentan la superficie intestinal tres veces.

- Existencia de pequeñas proyecciones digitiformes en la mucosa que recubre los pliegues, que reciben el nombre de vellosidades intestinales.

-Presencia de microvellosidades en las superficies libres de las células absorbentes que forman parte del epitelio intestinal.

Las vellosidades son evaginaciones de aproximadamente 0,5-1,2 mm. de altura y cerca de 0,1 mm. de grosor, de modo que permiten una ampliación de la superficie intestinal de hasta 5-6 veces, y constituyen la unidad funcional del intestino.

En la base de las vellosidades se abren las criptas de Lieberkhün, estructuras tubulares que llegan hasta la "muscularis mucosae". El centro de las vellosidades intestinales está formado por tejido conjuntivo laxo, vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas y fibras musculares lisas, responsables de los movimientos rítmicos de las vellosidades, tan importantes en los procesos de absorción.

Desde el punto de vista histológico (LEONARDT, H., 1975), la pared del intestino está constituida por varias capas, que desde el compartimento sanguíneo a la luz intestinal son: serosa, muscular, submucosa y mucosa. Esta última está formada, a su vez, por la "muscularis mucosae", la lámina propia y el epitelio (ver Figura 1).

De todas estas capas, es el epitelio el responsable de la capacidad que tiene el intestino delgado de transportar sustancias selectivamente.

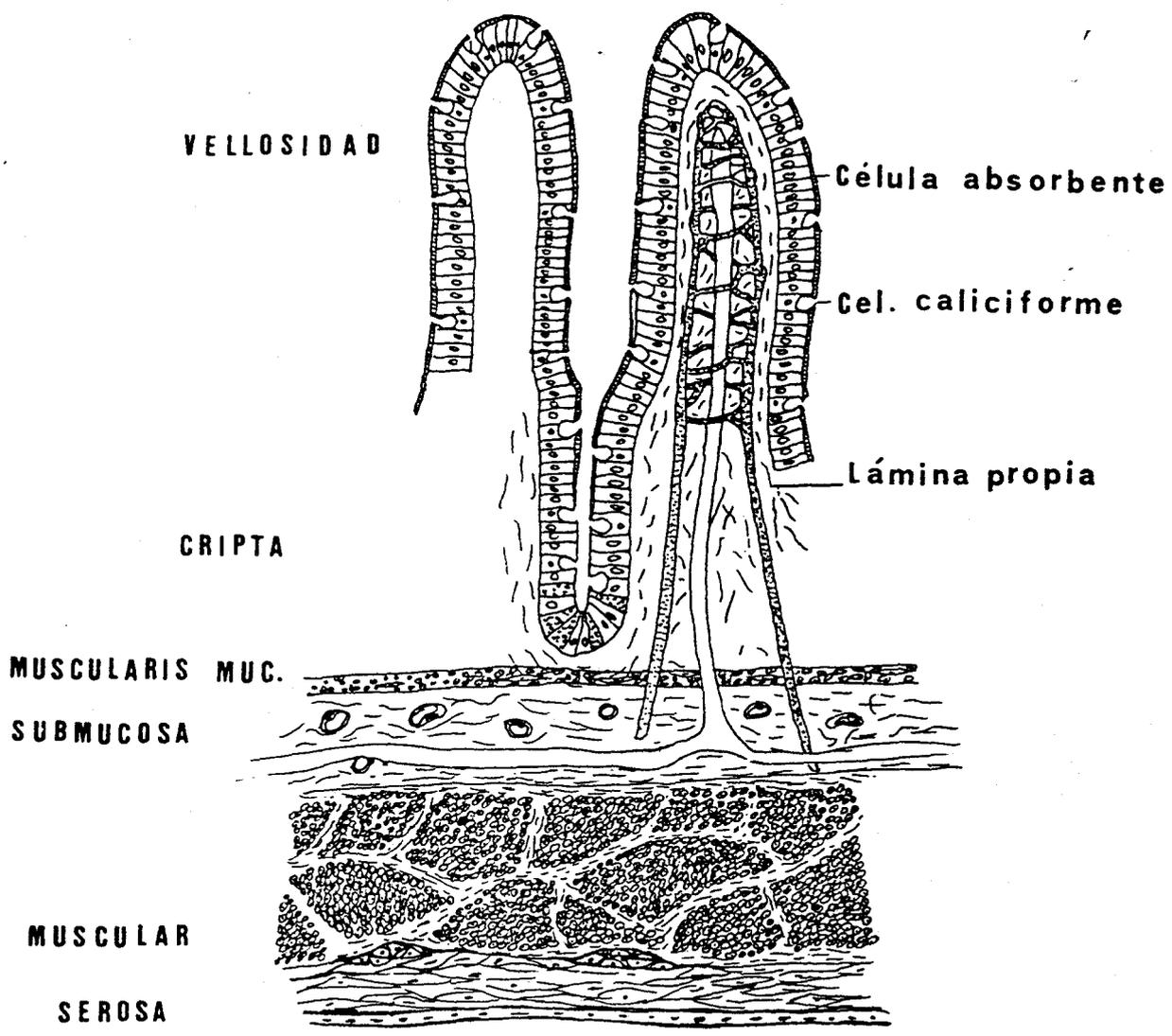


Figura 1. DISTRIBUCION DE LAS CAPAS INTESTINALES QUE FORMAN LA PARED INTESTINAL.

Dos tipos de células principales se observan en el epitelio que recubre las vellosidades: el 90% son células cilíndricas, altas, también llamadas células absorbentes o enterocitos. El resto del epitelio está formado por células caliciformes secretoras de moco (Fotografías 1y2).

Las células absorbentes o enterocitos se caracterizan por presentar asimetría en su estructura (SJOSTRAND, F.S., 1963, THIER, J.S., 1968). Son células en forma de columna, en las que se distinguen una membrana apical (o luminal) y otra basolateral (o serosal). En la superficie apical existe el denominado borde en cepillo, que proyecta gran número de microvellosidades, lo que como mencionamos con anterioridad, supone un amplio desarrollo de superficie (unas 30 veces). La membrana del borde apical es más gruesa que las limitantes de las regiones basales y laterales (ver Figura 2).

La membrana plasmática de la cara apical presenta también un revestimiento exterior de aspecto vellosito constituido por finos filamentos de material mucopolisacárido denominado glicocalix, y es precisamente ahí, donde se localiza la capa de "agua no agitada", que constituye un factor importante en la absorción de moléculas por el intestino delgado.

En el interior de cada microvellosidad se observa la existencia de una matriz citoplasmática, que envuelve un haz de filamentos rectos y delgados, paralelos al eje longitudinal de la vellosidad, (SJOSTRAND, F.S., 1963) que se extiende en su base

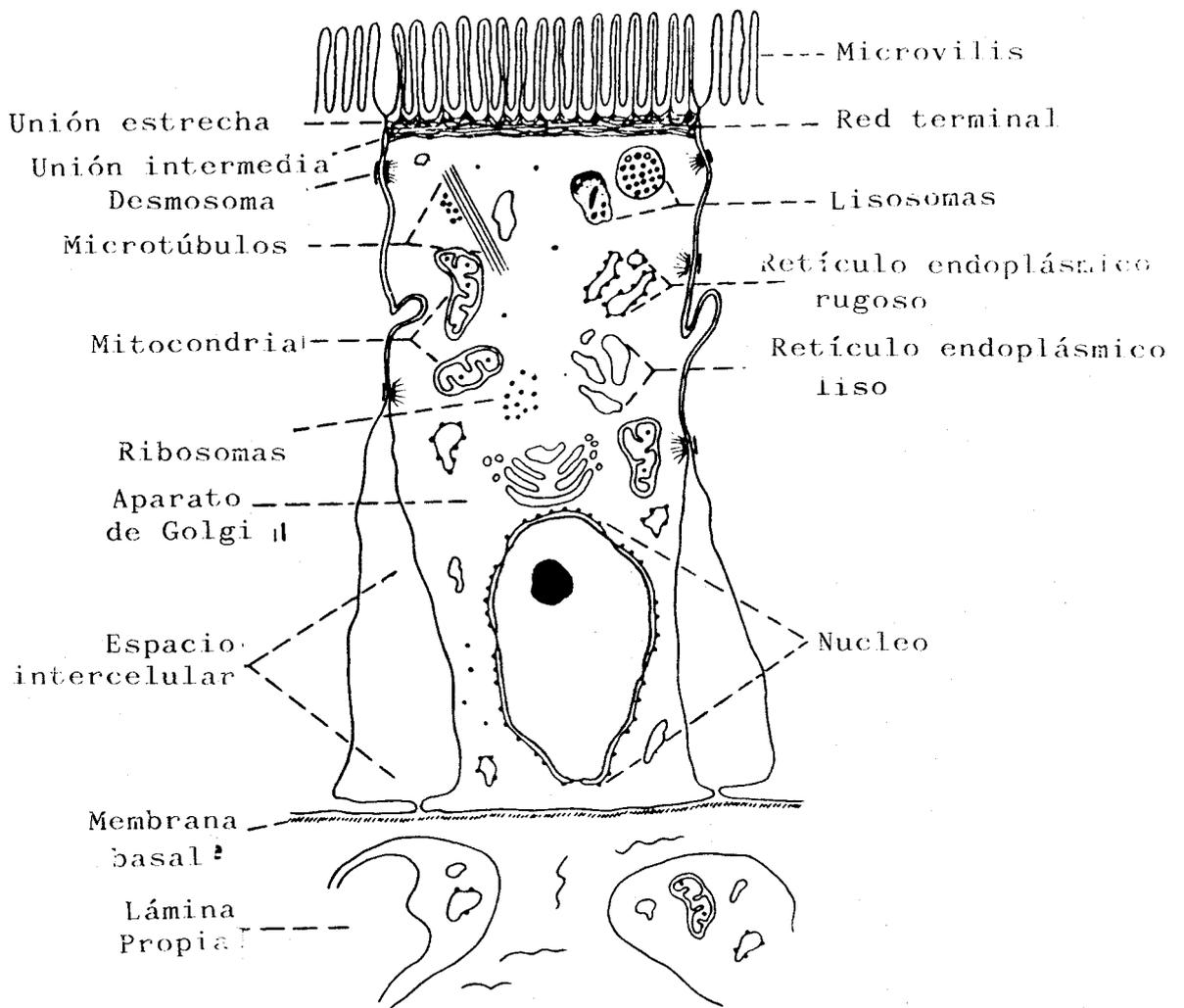


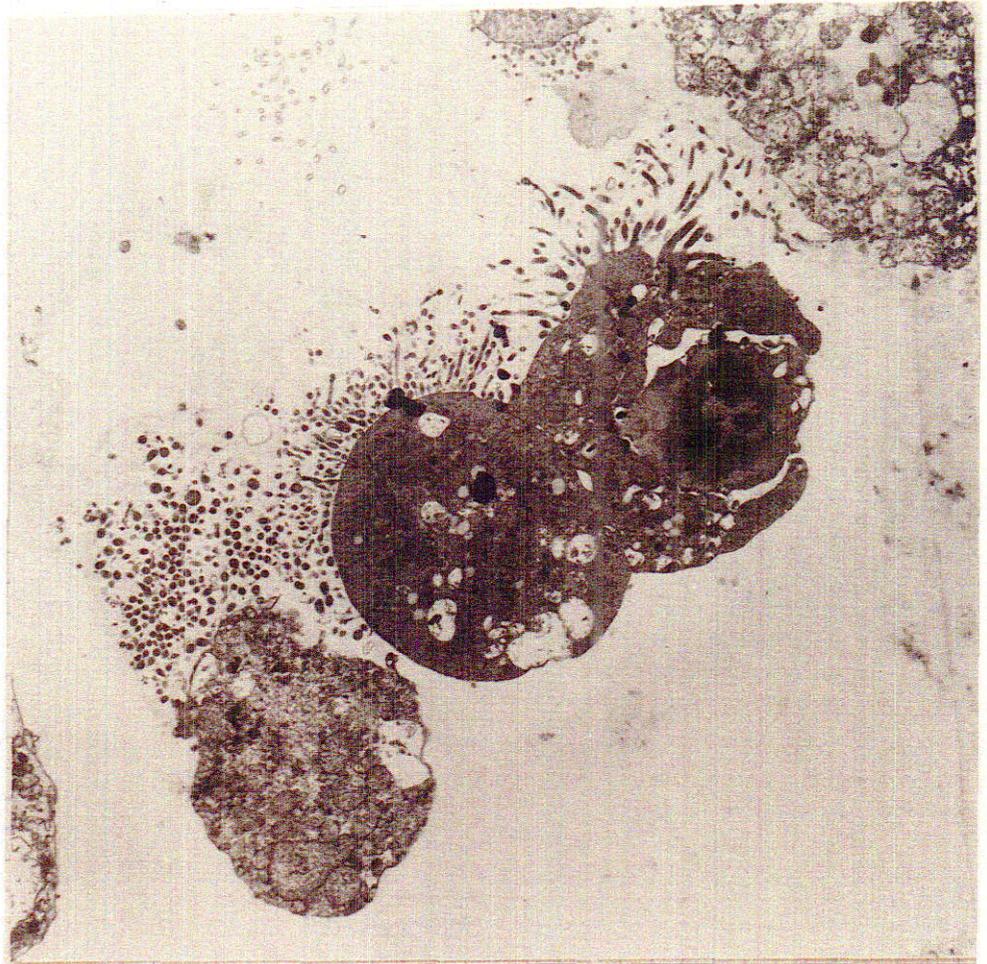
Figura 2. DIAGRAMA DE UNA CELULA EPITELIAL AISLADA.

como raicillas, y se entrecruzan con las de las microvellosidades contiguas en la región citoplasmática más interna, formando la llamada red terminal.

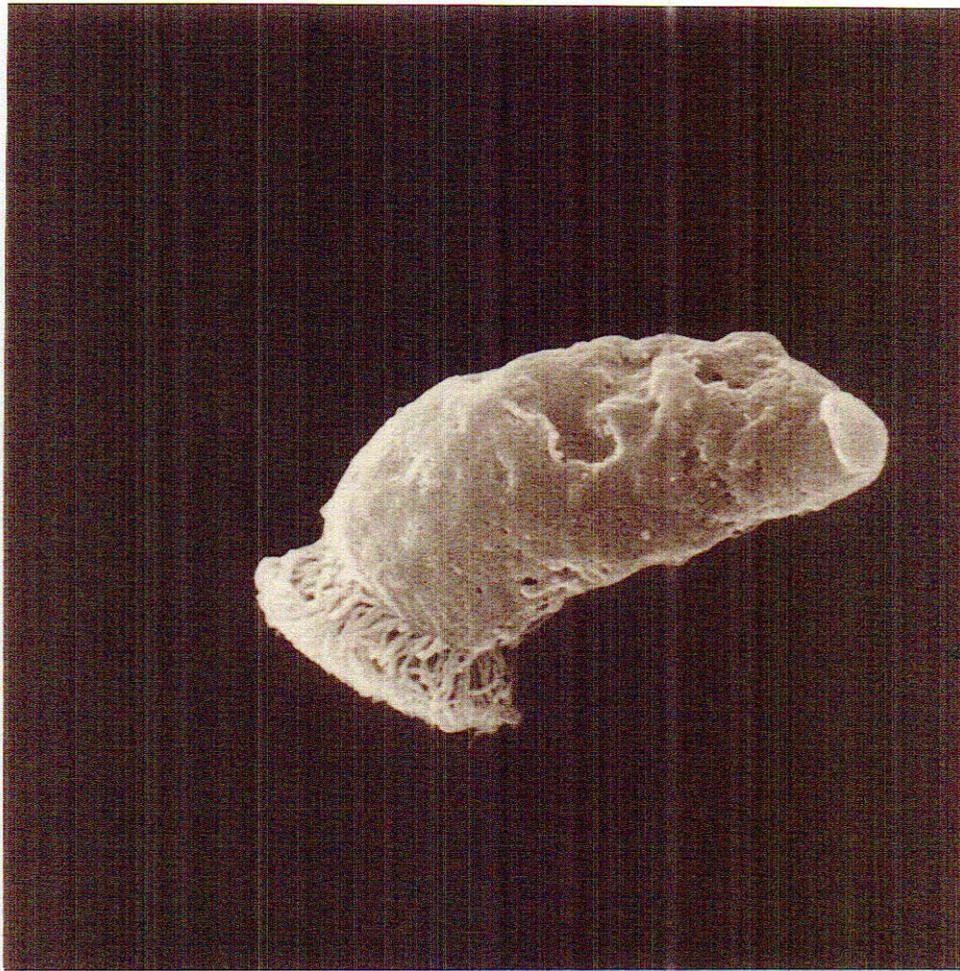
El citoplasma de los enterocitos contiene numerosas mitocondrias alargadas y algunos lisosomas, (SJOSTRAND, F.S., 1963) así como abundante retículo endoplasmático liso y rugoso. El aparato de Golgi se dispone en vesículas paralelas y asociadas. Los núcleos se sitúan en la base de las células.

La superficie basal de las células reposa sobre la membrana basal (capa continua de material homogéneo por encima de la lámina propia), y puede presentar expansiones citoplasmáticas que alcanzan a ésta última.

Las membranas laterales entre células pueden dejar espacio de separación más o menos amplio, con tres tipos de uniones entre sí: el complejo de unión por fusión de ambas membranas descrito por FAQUHAR en 1963 y que denominó "zona occludens"; la unión intermedia, en que las membranas están ya, se paradas con material amorfo entre ellas y los desmosomas, situadas en posición más basal, que establecen un cierto número de puntos de unión entre ambas células. Estos complejos de unión intercelular y el espacio que delimitan las membranas de las células absorbentes adyacentes, forman la vía paracelular, que puede ser utilizada por algunos iones y no electrolitos mientras que la mayoría de electrolitos utilizan la vía transcelular a través de las mem-



Fotografía 1. CELULAS DE YEYUNO OBSERVADAS AL MET.
x 6067. (La fotografía ha sido realizada en el De-
partamento de Fisiología Animal de la Facultad de
Farmacia de la Universidad de Barcelona).



Fotografía 2. Enterocito de yeyuno observado al MER.
x 4944. (La fotografía ha sido realizada en el Depar
tamento de Fisiología Animal de la Facultad de Farma
cia de la Universidad de Barcelona).

branas luminal y basolateral.

Otra característica interesante es la capacidad de recambio del epitelio intestinal. La división celular del epitelio intestinal está restringida a la base de las criptas de Lieberkühn, y el recambio del mismo se realiza totalmente en dos o seis días, según la especie animal. Después de al menos dos divisiones dentro de la cripta, las células migran por la vellosidad, y en el plazo de unos tres días alcanzan la punta de la misma donde son expulsadas. Durante su migración por la vellosidad, las células se diferencian adquiriendo progresivamente las características morfológicas, composición enzimática y sistemas de transporte propios de los enterocitos totalmente desarrollados (KINTER, N.B. y WILSON, T.H., 1965; NORDSTRÖM, C. et al., 1968; WEBSTER, U.L. y HARRISON, D., 1969; FORTIN-MAGANA, R., et al., 1970; CHENG, H. y LEBLOND, C.P., 1974; KING, I.S. et al., 1981)

I. 2. TRANSPORTE A TRAVES DE MEMBRANAS.

En general, al hablar del transporte a través de membranas, se pueden diferenciar dos mecanismos:

-El que se lleva a cabo sin interacción química con los elementos de la membrana. Las moléculas la atraviesan siguiendo las leyes de la difusión: "difusión simple" o "pasiva".

-Otro en el que las moléculas interaccionan

química con la membrana: " transporte mediado". Este mecanismo consiste básicamente en proteínas intrínsecas de la membrana que actúan como transportadores específicos. A veces, estas proteínas transportadoras se limitan a facilitar el paso de los solutos a favor de un gradiente de potencial electroquímico: "difusión facilitada". Otras veces, los transportadores forman parte de sistemas más complejos, en los que el soluto se transporta en contra de un gradiente electroquímico, merced a un aporte energético acoplado: "transporte activo"

1. Difusión simple.

En una primera aproximación, podemos definir la difusión como un proceso espontáneo de movimiento de una sustancia, de una región de mayor concentración a otra de concentración menor.

La velocidad del movimiento de las moléculas a favor de gradiente viene dada por la ley de Fick:

$$V = \frac{ds}{dt} = - D \cdot A \frac{dc}{dx}$$

en donde:

dc , es la diferencia de concentración de sustrato a ambos lados de la membrana,

D , constante de proporcionalidad: coeficiente de di

fusión. Es función de la naturaleza del soluto y del disolvente,

A, área del plano de la solución a través de la cual tiene lugar la difusión,
 dx , espesor de la superficie.

El signo negativo se debe a que la difusión ocurre en la dirección de menor concentración.

En esta velocidad influyen muchos factores externos:

a) Temperatura. Al aumentar la temperatura, aumentará la agitación térmica, y por tanto, la difusión.

b) Viscosidad. Al aumentar la viscosidad, aumenta el rozamiento y, por tanto, disminuye la difusión.

c) Porosidad. Según el tamaño y forma de las moléculas de soluto, en relación con la estructura de la membrana.

d) Cargas eléctricas. Si a través de la membrana existe diferencia de potencial, la posible polaridad de la molécula afectará a su difusión.

e) Solubilidad de las moléculas de sustrato en la membrana. En las membranas biológicas, que son lipídicas, este factor es importante.

En un sistema dado, se puede considerar que, para una misma membrana y molécula a difundir, todas estas posibles variables se mantienen constantes y se engloban dentro del coeficiente de difusión: D .

La ley de Fick puede ser aplicada a la difu-

sión de sustancias a través de membranas celulares. En este caso, debemos considerar el coeficiente de partición lípido-agua, de forma que la velocidad de difusión sería:

$$V = \frac{D_m \cdot A_m \cdot K_m}{X_m} (C_o - C_i) = P_m \cdot A_m (C_o - C_i)$$

ya que:

$$P_m = (\text{constante de permeabilidad}) = \frac{D_m \cdot K_m}{X_m}$$

siendo:

K_m , coeficiente de partición entre el exterior y el interior de la membrana,

A_m , superficie de la membrana,

X_m , espesor de la membrana,

D_m , constante de difusión,

P_m , permeabilidad de la membrana para dicha sustancia,

y el flujo:

$$J = \frac{V}{A_m} = (C_o - C_i) \cdot P_m$$

2. Transporte Mediado.

La interacción de las proteínas transportadoras con las moléculas transportadas se puede describir en los mismos términos que se aplican a las interacciones enzima-sustrato. Así pues, la mayoría de los conceptos y ecuaciones de la cinética enzimática se aplican por igual al transporte mediado.

Experimentalmente, el transporte mediado

puede distinguirse de la difusión simple por algunas propiedades fácilmente comprobables:

a) Es específico para ciertas sustancias o grupos de sustancias.

b) Es saturable, es decir, alcanza una velocidad máxima, $V_{m\acute{a}x}$, que no aumenta aunque aumente la concentración de sustrato.

c) Presenta una temperatura, por encima de la cual, las moléculas de transportador sufren desnaturalización térmica.

d) Es susceptible de inhibición por inhibidores específicos o reactivos que alteran la estructura de las proteínas.

e) Las sustancias que utilizan una misma proteína transportadora pueden inhibir mutuamente su transporte.

f) Obedece la cinética de Michaelis-Menten, de forma que:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \times S}{K_m + S}$$

en donde:

V, velocidad de transporte,

$V_{m\acute{a}x}$, velocidad máxima de transporte,

S, concentración de sustrato,

K_m , (constante de Michaelis-Menten): concentración de sustrato, para la cual, la velocidad de transporte es la mitad de la velocidad máxima.

I. 3. TRANSPORTE A TRAVES DEL EPITELIO INTESTINAL.

La absorción intestinal se refiere al movimiento de los solutos y del agua, desde la luz intestinal al compartimento sanguíneo o linfático. El movimiento de estas sustancias, se realiza tanto a través de las células epiteliales, como a través de las uniones intercelulares. En el primer caso han de atravesar una doble barrera, compuesta por las membranas apical o mucosal y basolateral o serosal, y por el medio intracelular, constituido por el citoplasma de estas células.

Es, en la membrana citoplasmática, donde residen los sistemas de transporte que constituyen el principal sistema regulador de la absorción.

La bicapa lipídica apolar de la membrana, facilita el paso de sustancias lipófilas que pueden, de este modo, solubilizarse en la membrana y penetrar en la célula a favor de un gradiente de concentración.

Por otro lado, las moléculas hidrosolubles penetran en la célula mediante poros o canales, (difusión simple) o bien por medio de determinadas proteínas de membrana (transporte mediado).

Para la célula, esta organización tiene la ventaja biológica de mantener la composición del medio intracelular dentro de un estrecho margen.

1. Transporte activo primario.

Ya definimos el transporte activo, como aquél en el cual, la translocación puede ocurrir en contra de gradientes químicos y/o eléctricos (ROSENBERG. T., 1948)

En otras palabras, podemos definir el transporte de un soluto A como activo, cuando el flujo neto de A desde el medio extracelular al intracelular: $J_{A(\text{neto})}^{o \rightarrow i} > 0$ mientras que la diferencia de potencial electroquímico, $\Delta \mu_A^{o \rightarrow i} < 0$ (ARONSON; P.S., 1981).

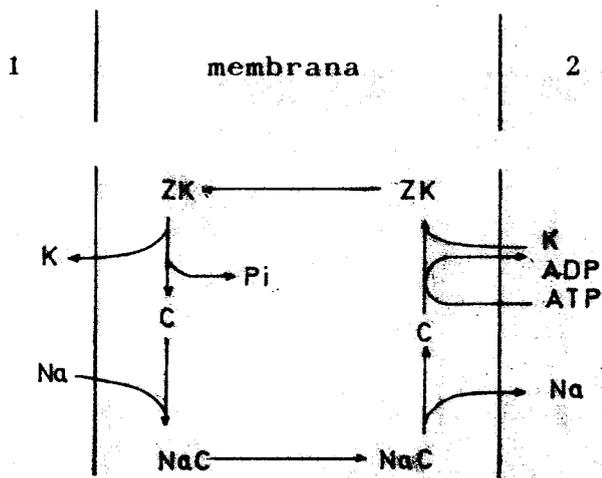
Por definición este transporte requiere un aporte de energía. Cuando dicha energía procede directamente de la energía metabólica suministrada por la célula, se habla, según la denominación propuesta por STEIN (1967) y SMYTH (1969) de transporte activo primario.

El caso más significativo de transporte activo primario es la llamada "bomba de sodio".

Una de las características fundamentales de la célula es su capacidad de mantener una distribución asimétrica de iones a través de la membrana. En particular, de los dos cationes más abundantes, el Na^+ , en general, está relegado a los líquidos extracelulares, mientras que el K^+ es esencialmente intracelular (USSING, H.H., 1960).

La membrana celular es permeable al sodio, que constantemente tiende a penetrar en las células, gracias a su gradiente de concentración. Por lo tanto, la relegación del Na^+ al espacio extracelular es un proceso dinámico que implica la existencia de un sistema específico de transporte activo, encargado de expulsar (o bombear) al exterior los iones de sodio, a medida que éstos penetran en la célula.

Si consideramos la hipótesis del gradiente del carrier (CRANE; R.K., 1962; CRANE, R.K., 1965), podemos esquematizar el transporte activo de sodio como sigue:



C y Z representan las dos formas del carrier con distinta afinidad por el Na^+ y por el K^+ . Estos dos iones presentan distintas afinidades por el carrier a ambos lados de la membrana, como fue sugerido por Shaw. De esta forma, la bomba de sodio expulsa activamente este ión fuera de la célula, con entrada simultánea de K^+ contra gradiente, gracias a la acción de una ATPasa (SKOU, J.C., 1965), que es activada por dichos iones.

Se ha podido comprobar experimentalmente como la anaerobiosis (LLUCH, M. y PONZ, F., 1962) y los inhibidores metabólicos disminuyen el transporte neto de sodio (PONZ, F. y LLUCH, M., 1955; CRANE, R.K., 1968).

2. Transporte activo secundario.

La acumulación de una gran cantidad de solutos (azúcares, aminoácidos,...) no requiere directamente energía metabólica, sino que la utiliza indirectamente vía la energía potencial almacenada en forma de gradiente de sodio, del que es enteramente dependiente.

Utilizando la misma terminología, constituiría un transporte activo secundario por acoplamiento al gradiente de sodio (CRANE, R.K., 1968), es decir, a un transporte primario. (figura 3)

Posteriormente, se ha visto que el gradiente químico de sodio era insuficiente para explicar el grado de concentración que se alcanzaba en el estado estacionario. (BOSACKOVA, J. y CRANE, R.K., 1965; KIMMICH, G.A., 1970b y 1972; POTASHNER, S.J. y JOHNSTONE, R.M., 1971)

MURER, H. y HOPFER, U. (1974); HOPFER, U. et al. (1975); MURER, H. et al. (1975); SIGRIST-NELSON, K. et al. (1975); KIMMICH, G.A. y CARTER-SU, C. (1978) y CARTER-SU, C. y KIMMICH, G.A. (1979 y 1980) con técnicas avanzadas, han puesto de manifiesto que el gradiente

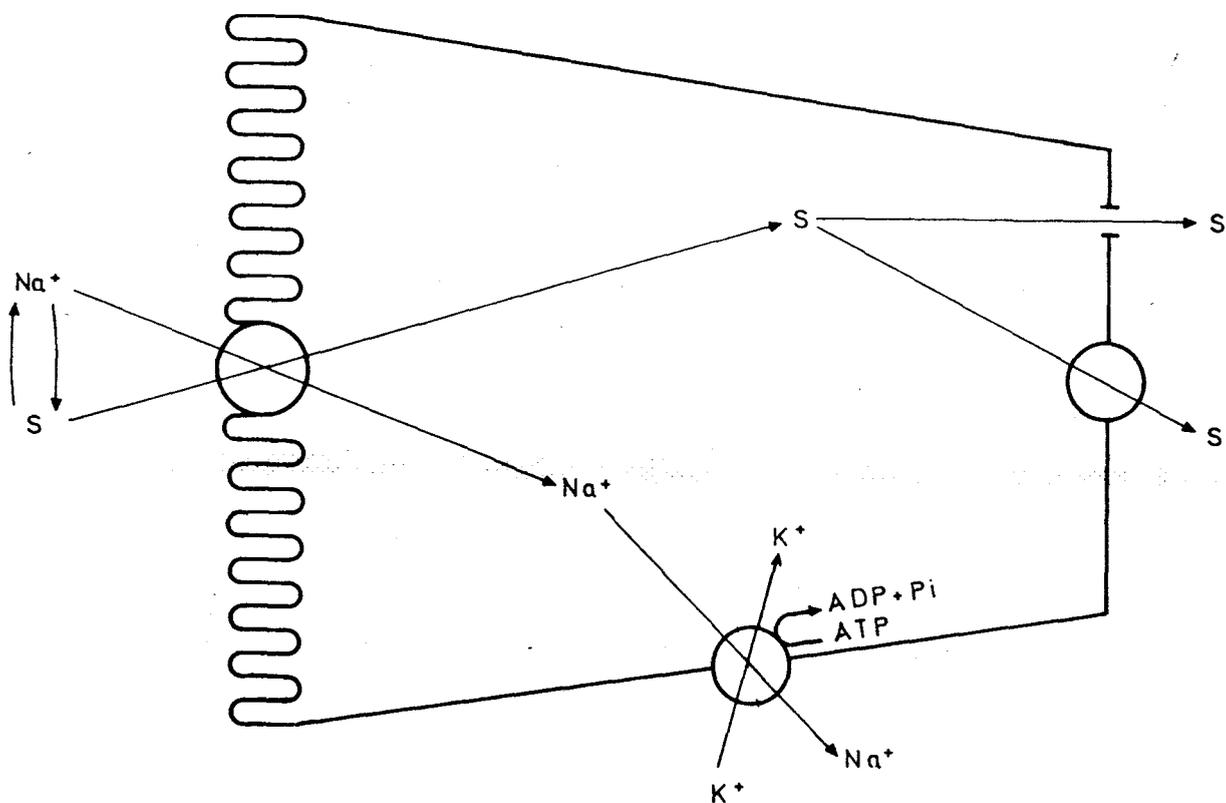


Figura 3. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL TRANSPORTE ACTIVO DE SOLUTOS. El esquema muestra el transporte en contra de gradiente de concentración del sustrato (S) en la cara luminal, impulsado por el flujo del ión sodio (Na^+) a favor de su gradiente electroquímico, mantenido gracias a la bomba de Na^+ y K^+ de la membrana basolateral.

electroquímico de sodio era solo una parte de la fuente energética necesaria para el transporte concentrativo, y han demostrado que el potencial de membrana ejerce un papel fundamental en la creación de un gradiente eléctrico favorable para el transporte.

Termodinámicamente, la relación entre el gradiente electroquímico, el potencial de membrana y el gradiente de soluto que una célula puede llegar a establecer queda reflejado en la siguiente desigualdad (KIMMICH, G.A., 1980):

$$\nu \text{Na}^+ \left(RT \frac{a_{\text{Na}^+}^m}{a_{\text{Na}^+}^c} + FV_{mc} \right) \geq RT \frac{a_s^c}{a_s^m}$$

donde:

νNa^+ , es el coeficiente de acoplamiento, es decir, los moles de ión sodio que son transportados por cada mol de sustrato,

R, la constante de los gases perfectos,

T, la temperatura absoluta,

$a_{\text{Na}^+}^m$, y $a_{\text{Na}^+}^c$, las actividades del ión sodio en los compartimentos luminal y celular respectivamente,

F, la constante de Faraday,

V_{mc} , el potencial de membrana que existe a través de la membrana luminal,

a_s^c y a_s^m , las actividades del sustrato en los compartimentos celular y luminal, respectivamente.

Los términos de la izquierda representan la energía mínima requerida para establecer el gradiente de soluto de la derecha.

I. 4. TRANSPORTE DE PEPTIDOS A TRAVES DEL EPITELIO INTESTINAL.

Durante muchos años se ha creído que la absorción de proteínas requería la hidrólisis completa de las mismas hasta el estado de aminoácidos libres.

A lo largo de la década de los cincuenta varios investigadores revelaron que la diglicina se transportaba intacta (AGAR, W.T. et al., 1953; WIGGANS, D.S. y JOHNSTON, J.M., 1959). Sin embargo, esta observación fue ignorada ya que se pensó que se trataba de un péptido anómalo.

Hacia la mitad de los años sesenta, se observó que los aminoácidos podrían ser absorbidos más rápidamente cuando se encontraban en forma de péptidos que de aminoácidos libres (ADIBI, 1968; MATTHEWS, 1968).

En la actualidad, difícilmente puede ser discutido el hecho de que los procesos de captación mucosal de péptidos y aminoácidos son independientes. Si bien los aminoácidos pueden inhibir totalmente la captación de aminoácidos liberados por hidrólisis de los péptidos, no afectan, sin embargo, la captación de los péptidos intactos. Esto se ha podido demostrar utilizando péptidos altamente resistentes a la hidrólisis, como la glicil-sarcosina (Gly-Sar), glicil-sarcosil-sarcosina (Gly-Sar-Sar) (ADDISON, J.M., et al., 1972 y 1975b) o la β alanil-histidina (β Ala-His) (ADDISON, J.M., et al., 1974). O bien sa-

turando los sistemas del transporte mediado de aminoácidos y comprobando como, bajo estas condiciones, la captación de péptidos permanece inalterada (ADIBI, S.A., 1971; COOK, G. C., 1973; CRAMPTON, R.F. et al., 1973; CHEESEMAN, C.I. y PARSONS, D.S., 1974)

Otra línea de estudio muy importante, que muestra la independencia de la captación mucosal de péptidos y aminoácidos, procede de aquellas investigaciones realizadas sobre los defectos genéticos en el transporte de aminoácidos, como son la enfermedad de Hartnup y la cistinuria. Se ha observado, en individuos que padecían estas enfermedades, que su intestino delgado conservaba la capacidad de absorber péptidos que contenían los aminoácidos afectados, e incluso que estuvieran formados exclusivamente por ellos, (ASATOOR, A.M. et al., 1970 y 1971; NAVAB, F. y ASATOOR, A.M., 1970; HELLIER, M.D. et al., 1972; TARLOW, M.J., et al., 1972; SILK, D.B.A. et al., 1975; LEONARD, J.V., et al., 1976).

Por otro lado, se ha comprobado que después de una comida proteica el contenido luminal es una mezcla compleja de péptidos y aminoácidos libres (MATTHEWS, D.M., 1975a y 1975b; ADIBI, S.A., 1976), con predominio de los primeros (ADIBI, S.A. y MERCER, D.W., 1973). De forma que los péptidos son, cuantitativamente, un sustrato más importante que los aminoácidos, para la absorción.

1. Transporte activo y difusión simple de péptidos.

Un criterio importante para establecer que el transporte de cualquier sustrato ocurre por un proceso activo, es demostrar que se acumula en los enterocitos en contra de un gradiente electroquímico.

Dada la presencia de peptidasas en el epitelio intestinal, la obtención de péptidos altamente resistentes a la hidrólisis, tales como la Gly-Sar, la Gly-Sar-Sar o la β Ala-His, ha facilitado el estudio de su transporte intestinal. Mediante el empleo de dichos péptidos, se ha puesto de manifiesto que los dipéptidos y tripéptidos se acumulan intracelularmente en intestino intacto (ADDISON, J.M., et al., 1972, 1974 y 1975b; MATTHEWS, D.M., et al., 1974). Además, la captación de estos péptidos fue inhibida por la anoxia e inhibidores metabólicos, todo lo cual confirma la existencia de un sistema activo para su transporte. (ADDISON, J.M., et al., 1972, 1974, 1975b; MATHEWS, D.M., et al., 1974).

El hecho de que otros muchos dipéptidos y tripéptidos, que son rápidamente hidrolizados por las peptidasas citosólicas, compitan por la captación mucosal de la Gly-Sar, la Gly-Sar-Sar, o la β Ala-His, sugiere que estos péptidos comparten un mismo mecanismo de transporte activo (ADIBI, S.A.; 1971 y 1974; ADDISON, J.M., et al., 1972, 1974 y 1975b; MATTHEWS, D.M., 1975a y 1975b; RUBINO, A., et al., 1971).

En aquellos casos, en los que se han estudia

do las características cinéticas de la inhibición entre distintos péptidos, se ha comprobado que es de tipo competitivo (ADDISON, J.M., et al., 1974 RUBINO, A., et al., 1971;).

Todavía es incierto si existen o no, más de un sistema de captación de péptidos. Se observó que algunos di- y tripéptidos, constituidos por aminoácidos básicos y ácidos, presentaban baja afinidad por los sistemas responsables de la captación de péptidos formados por aminoácidos neutros (ADDISON, J.M., et al., 1974 y 1975b; RUBINO, A., et al., 1971). Por analogía con lo ocurrido con los aminoácidos se pensó en la existencia de diferentes sistemas de captación.

Sin embargo, recientemente, gracias al uso de técnicas más refinadas, se ha observado que los péptidos neutros, ácidos y básicos comparten el mismo sistema o sistemas de captación (MATTHEWS, D.M., et al., 1979; TAYLOR, E. et al., 1980). Sin embargo, esto no descarta la posible existencia de más de un sistema de transporte. De hecho la presencia de un solo sistema de captación de péptidos en el intestino delgado supondría una gran desventaja biológica, ya que un defecto congénito en el mismo podría esperarse fuera causa de muerte en la infancia.

Una característica de cualquier sistema de transporte mediado es su saturación al aumentar progresivamente la concentración de sustrato. Al estudiar la velocidad de absorción intestinal de Gly-Sar en un rango de concentraciones (0,125 a 100 mM) no se

cumplió totalmente este principio (MATTHEWS, D.M., et al., 1979). Se observó que dos componentes distintos estaban incluidos: uno saturable (transporte activo) y otro no saturable (difusión simple). La separación de ambos ha revelado que la difusión simple es un componente minoritario de la absorción total, cuando la concentración de Gly-Sar está dentro del rango de concentraciones fisiológicas (MATTHEWS, D.M., et al., 1979; BURSTON, D., et al., 1978).

Los estudios realizados sobre los requerimientos estructurales de di- y tripéptidos para su transporte por el intestino delgado (MATTHEWS, D.M., 1975a y 1975b; MATTHEWS, D.M. y PAYNE, J.W., 1980), han revelado que:

a) Si el grupo amino-terminal o el carboxilo-terminal son sustituidos, la afinidad por el sistema de transporte se reduce o anula (RUBINO, A. et al., 1971; BURSTON, D. et al., 1972; ADDISON, J.M. et al., 1974 y 1975b; DAS, M. y RADHASKRISHNAN, A.N., 1975; AMAYA, F.J. et al., 1976).

b) La sustitución del hidrógeno del enlace peptídico (como en la Gly-Sar, Gly-Sar-Sar, o Gly-Pro) no anula la afinidad por el sistema de transporte, aunque en el caso de la Gly-Sar y la Gly-Sar-Sar retarda enormemente la hidrólisis (RUBINO, A., et al., 1971, ADDISON, J.M., et al., 1972 y 1975a; DAS, M. y RADHASKRISHNAN, A.N., 1975).

c) La incorporación de β -aminoácidos reduce la afinidad por el sistema de transporte (ADDISON,

J.M., et al., 1975b; DAS, M. y RADHASKRISHNAN, A.N., 1975), y en algunos casos (β Ala-His) retarda la hidrólisis (MATTHEWS, D.M., et al., 1974).

d) La presencia de ligandos χ reduce o anula la afinidad por el sistema de transporte y también retarda la hidrólisis (WISEMAN, G., 1974; ADDISON, J.M., et al., 1975b; DAS, M, y RADHASKRISHNAN, A.N., 1975).

e) Se pensó que la presencia de aminoácidos con largas cadenas lipofílicas aumentaría la afinidad por el sistema de transporte de péptidos (ADIBI, S.A. y SOLEIMANPOUR, M.R., 1974; RUBINO, A., et al., 1971), como sucedía con el de aminoácidos. Sin embargo, se ha comprobado, recientemente, que una serie de dipéptidos neutros en los que aumentaban las propiedades lipofílicas de la cadena, es la valil-valina, y no la leucil-leucina, el inhibidor más poderoso de la Gly-Sar (BURSTON, D., et al., 1982; MATTHEWS, D.M., et al., 1983).

f) Igual que ocurre en el transporte de aminoácidos (WISEMAN, G., 1974), el transporte de péptidos es estereoquímicamente específico (BURSTON, D., et al., 1972; CHEESEMAN, C.I. y SMYTH, D.H., 1973). Los péptidos que contienen D-aminoácidos son pobremente absorbidos (y muy lentamente hidrolizados) (BURSTON, D., et al., 1972; ASATOOR, A.M., et al., 1973; CHEESEMAN, C.I. y SMYTH, D.H., 1973), aunque es probable que no carezcan totalmente de afinidad por el sistema de transporte intestinal (ADDISON, J.M. et al., 1975b). Así, se ha demostrado que el transporte de D-dipéptidos es saturable (CHEESEMAN, C.I.

y SMYTH, D.H., 1973).

Todas las características descritas hasta el momento, sobre el transporte intestinal de dipéptidos, sugieren que éstos pueden entrar en el enterocito por dos rutas distintas, que serán función del dipéptido en cuestión. Así:

- Algunos dipéptidos podrán entrar utilizando los sistemas de captación de aminoácidos, tras sufrir hidrólisis intraluminal o en el borde en cepillo (MATTHEWS, D.M., 1975a y 1975b; MATTHEWS, D.M., y PAYNE, J.W., 1980), siendo mucho más importante esta última

- Otros entrarán en los enterocitos, intactos, por un sistema específico, sufriendo a continuación hidrólisis intracelular, o entrando intactos en la sangre portal (ADIBI, S.A., 1971 y 1976; PERRY, T.L., et al., 1967; GARDNER, M.L.G., 1975; FAIRLOUGH, P.D., et al., 1977; SLEISENGER, M.H., et al., 1977; MATTHEWS, D.M., 1975b)

Debe añadirse que la ruta de captación de aminoácidos, puede hacer más eficaz la absorción intestinal de péptidos, actuando como mecanismo de "re captación" de aquellos aminoácidos procedentes de la hidrólisis intracelular del péptido, y que por difusión vuelven a la luz intestinal. (figura 4)

LUZ
INTESTINAL

ENTEROCITO

SANGRE

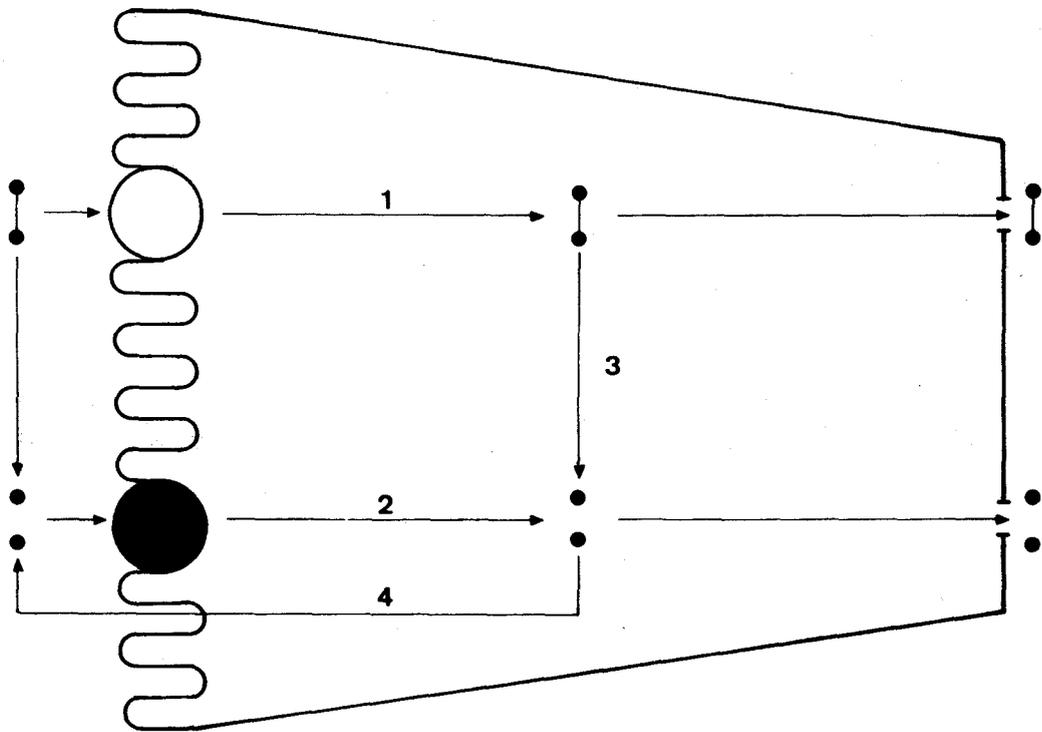


Figura 4. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS RUTAS UTILIZADAS POR LOS DIPEPTIDOS PARA ATRAVESAR LA MEMBRANA INTESTINAL. (●—●): di péptido. (● ●): aminoácidos.

- : sistema de transporte de dipéptidos
- : sistema de transporte de aminoácidos
- 1: Ruta de entrada de dipéptidos intactos
- 2: Ruta de entrada de aminoácidos procedentes de la hidrólisis intraluminal o del borde en cepillo
- 3: Hidrólisis intracelular de dipéptidos
- 4: Salida por difusión a la luz intestinal de aminoácidos procedentes de la hidrólisis de dipéptidos.

2. Interacción entre el sodio y el transporte de péptidos.

Es un hecho establecido que el transporte activo de algunos aminoácidos por el intestino delgado requiere sodio en el medio extracelular.

En el caso del transporte activo de péptidos, aunque no está tan extensivamente estudiado, parece ser que existe también una dependencia del sodio.

La sustitución del Na⁺ presente en el medio de incubación por K⁺ o Li⁺, anula la acumulación intracelular de Gly-Sar en anillos de intestino de hamster (ADDISON, J.M., et al., 1972), y el transporte transmural de tirosil-glicina y tirosil-D-alanina a través del intestino delgado de rata "in vitro" (HEADING, C.E., et al., 1978).

Parecen existir diferencias entre los efectos del sodio sobre el transporte de dipéptidos y aminoácidos. En íleon de conejo, al sustituir el sodio del medio de incubación por colina, se inhibe la velocidad máxima del flujo de mucosal a serosal de la glicil-prolina; mientras que la inhibición del flujo de glicina, se produce por aumento de la K_t (RUBINO, A., et al., 1971).

En contraste con los estudios "in vitro" descritos anteriormente, un pequeño número de experimentos "in vivo", parecen demostrar que la captación de péptidos por la mucosa del intestino no es dependien

te del Na^+ bajo las condiciones experimentales usadas.

La absorción de altas concentraciones de Gly-Sar (267mM) en yeyuno de rata, no fue significativamente reducida al sustituir el sodio intraluminal por manitol (MATTHEWS, D.M., et al., 1969).

También se observó que la captación de glicil-leucina (10mM) por el intestino delgado de la rana, "Rana pipiens", "in vivo" no fue afectada al sustituir el Na^+ intraluminal por K^+ , mientras que la captación de glicina y leucina desde una mezcla equivalente fue inhibida por la ausencia de Na^+ (CHEESEMAN, C.I. y PARSONS, D.S., 1974).

Toda esta complejidad hace que existan discrepancias entre los distintos investigadores. Para unos, algunos dipéptidos son cotransportados con sodio, mientras que otros no lo son (GANAPATHY, V. y RADHAKRISHNAN, A.N., 1980; HIMUKAY, M., et al., 1982; CHEESEMAN, C.I. y DEVLIN, D., 1985). Para otros, el transporte de dipéptidos es independiente del sodio (BOYD, C.A.R. y WARD, M.R., 1982; GANAPATHY, V. y LEIBACH, F.H., 1983; GANAPATHY, V. et al., 1984; RAJENDRAN, V.M., et al., 1984), en cualquier caso, se ha demostrado que el transporte de péptidos es electrogénico, lo que indica que se encuentra asociado a un flujo iónico (BOYD; C.A.R. y WARD, M.R., 1980 y 1982).

Por otro lado, mediante el empleo de vesículas de membrana del borde en cepillo de conejo, se ha visto que el transporte de dipéptidos no es con-

centrativo, es electrogénico y estimulado por un gradiente de protones. Basándose en estas observaciones y en la posible independencia entre el transporte de péptidos y el sodio, GANAPATHY, V. et al. (1983 y 1984) han desarrollado una hipótesis según la cual, la fuerza conductora del transporte de péptidos a través de la membrana, sería el gradiente de H^+ . De acuerdo con estos autores, la dependencia del sodio observada en tejidos intactos sería indirecta y debida a un intercambio $Na^+ - H^+$ (GANAPATHY, V. y LEIBACH, 1983; GANAPATHY, V., et al., 1984).

Tal y como se ha descrito brevemente en la presente introducción se puede afirmar que el transporte intestinal de dipéptidos es electrogénico, en consecuencia dependiente de un gradiente iónico. Sin embargo, en relación con la naturaleza de este gradiente iónico, así como sobre si el transporte de dipéptidos es o no acumulativo, existen grandes discrepancias.

Estas diferencias guardan relación con el tipo de técnica empleada: sea intestino intacto o vesículas de membrana de borde en cepillo de células intestinales. El trabajar con preparaciones de intestino intacto presenta inconvenientes debido a la presencia del glicocalix y capas musculares. Por otro lado, las vesículas de membranas celulares se alejan enormemente del estado fisiológico.

I. 5. OBJETO DEL TRABAJO.

Por los motivos anteriormente expuestos nos pareció interesante estudiar el transporte de dipéptidos en células aisladas de intestino delgado de pollo, de acuerdo con el siguiente plan de trabajo:

- 1.- Puesta a punto de la técnica de aisla miento de células epiteliales de intesti no delgado de pollo.
- 2.- Evaluación del grado de hidrólisis de Gly-Sar, dipéptido seleccionado para el presente trabajo.
- 3.- Estudio de la entrada de Gly-Sar a ente- rocitos a lo largo del tiempo.
- 4.- Efecto del sodio sobre la velocidad ini cial de entrada de Gly-Sar a los entero- citos y sobre su concentración intracelu lar en el estado estacionario.
- 5.- Estudio de la dependencia del pH del transporte de Gly-Sar en enterocitos.
- 6.- Cinética del transporte de Gly-Sar en en terocitos.

II. MATERIAL Y METODOS.

II. MATERIAL Y METODOS

II. 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se han utilizado pollos de la raza HUBBARD, de edades comprendidas entre 4 y 7 semanas, procedentes de granjas avícolas de la empresa COPOLL S.A. (Andalucía).

Los animales fueron mantenidos en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, siendo alimentados con piensos Gallina Blanca Purina.

II. 2. SOLUCIONES.

Para el aislamiento, lavado e incubación de las células se han utilizado los medios descritos por KIMMICH, G.A. (1970), con algunas modificaciones.

1. Medio de incubación.

a) Standard.

REACTIVO	CONCENTRACION	
	g/ l	mM
NaCl	4,675	80
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,147	1
Manitol	18,217	100
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,684	3
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,203	1
Albúmina	1	1
TRIS 0,2 M	50 ml	
ClH 0,2 M	41,4 ml	20

La osmolaridad final del medio es 300 mM y el pH= 7,4.

Para prepararlo disponemos de tres soluciones:

Solución A: solución de NaCl (1,6 M) en agua destilada.

Solución B: solución de K₂HPO₄.3H₂O (60mM) en agua destilada.

Solución C: solución de MgCl₂ (20mM) y CaCl₂.2H₂O 20 mM en agua destilada.

Para 1 litro de medio de incubación stan

dard, una vez pesadas las cantidades ya indicadas de manitol y albúmina, se añaden 50 ml de la solución A, 50 ml de la solución B, 50 ml de la solución C y TRIS/ClH en las proporciones adecuadas para obtener un pH= 7,4.

El sustrato cuya captación es objeto de estudio, se disuelve en el medio de incubación. Como las concentraciones utilizadas de dicho sustrato y de los modificantes son relativamente pequeñas, no se considera necesario introducir correcciones en la osmolaridad del medio, salvo que se indique en el correspondiente apartado de resultados.

b) Medio de incubación sin sodio.

En la preparación de este medio, se sustituye el NaCl por una cantidad isoosmótica de manitol (45,54 g/l).

c) Medio de incubación a pH=5 y a pH=6.

Para ajustar el pH del medio de incubación a 5 o a 6, en lugar del sistema tampón TRIS/ClH, utilizamos el de TRIS/Acido Cítrico isotónico. (MATTHEWS, D.M., et al., 1979; TAYLOR, E., et al., 1986).

Se preparan una solución de ácido cítrico (100mM), y otra de TRIS (0,2M), que se mezclan en las cantidades adecuadas, para obtener el pH deseado.

2. Medio de aislamiento.

a) Con citrato.

Se prepara a partir del medio de incubación standard, pesando 7,94 g de citrato sódico que disolvemos en 1 litro de medio de incubación, para que la concentración final sea 13,5mM.

b) Con hialuronidasa.

La cantidad de hialuronidasa en el medio de aislamiento debe ser 1mg/ml.

Al igual que el anterior se prepara a partir del medio de incubación standard, pesando la cantidad adecuada de enzima y disolviendo la directamente en el medio.

Todos los medios descritos deben prepararse ex-temporáneamente, ya que se ha observado que su man-tenimiento a 4º C durante 24 horas da lugar a la aparición de hongos, lo que conlleva cambios en la composición y en el pH de las soluciones.

II. 3. TECNICAS.

1. Aislamiento de células epiteliales de intestino delgado de pollo.

La técnica empleada es similar a la descrita por PERRY (1966) y posteriormente modificada por KIMMICH (1970) en intestino de pollo.

El aislamiento se lleva a cabo como se describe a continuación:

El pollo, sin ayuno previo, es decapitado y desangrado. Esto último es importante para disminuir el número de hematíes en la suspensión celular.

Se efectúa un corte en la zona inferior de la cavidad abdominal y se extrae unos 50 centímetros de intestino delgado en la zona media, separándolo con cuidado del tejido pancreático y mesentérico adyacente. El intestino se lava varias veces con suero fisiológico frío, 1° C, (mantenido en baño de hielo), con el fin de eliminar el contenido luminal. Se abre longitudinalmente, y se corta en segmentos de aproximadamente 2cm. de longitud, que se introduce en dos tubos de polietileno que contienen 25 ml de medio de aislamiento cada uno. Los tubos cerrados herméticamente, se introducen en un baño termostataado (Marca Selecta tipo Unitronic-320), a 37° C durante

30 minutos, sometiéndolos a una agitación constante de 80 a 100 ciclos por minuto.

Transcurrido este tiempo algunas células se habrán desprendido espontáneamente. Para provocar un mayor desprendimiento agitamos vigorosamente los segmentos de intestino con una pipeta de plástico.

La separación de las células aisladas de los segmentos intestinales se realiza por filtración a través de una malla de nylon.

La suspensión celular se reparte en 2 tubos de polietileno y se procede al lavado de las mismas, con el fin de eliminar la hialuronidasa del medio, el mucus, las sales biliares, etc. Tras una centrifugación, durante 2 minutos a 100 g (0°C) (en una centrífuga marca Beckman tipo J2-21), el sobrenadante se desecha por decantación y el sedimento celular o "pellet", se resuspende suavemente en 15ml de medio de incubación frío (1°C). El proceso se repite hasta que el sobrenadante quede transparente (generalmente es suficiente con repetirlo 2 veces).

Por último el "pellet" se resuspende en medio de incubación hasta un volumen equivalente a 5-10 veces el volumen del sedimento celular. Esta dilución final tiene por objeto preparar una suspensión de células que contenga entre 15 y 25 mg de proteína/ml (ver Figura 5).

Figura 5. ESQUEMA DE LA TECNICA SEGUIDA PARA EL AIS
LAMIENTO DE LOS ENTEROCITOS.



25 ml de medio de aislamiento
con los segmentos intestinales



incubación durante 30 min a 37°C
con agitación de 80 a 100 ciclos
por minuto



filtración de la suspensión ce-
lular a través de una malla de
nylon



centrifugación a 100 g durante
2 minutos



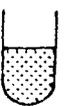
sedimento celular
+ 15 ml de medio de incubación

sobrenadante

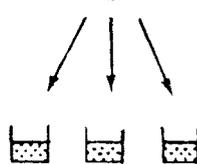


1 ml

1 ml para la
determinación
de proteínas



incubación de la suspensión ce-
lular a 37°C con agitación cons-
tante



La suspensión de enterocitos aislados y lavados debe mantenerse en un baño de hielo hasta el momento de su utilización.

Es importante señalar que si las células van a ser incubadas en medio de incubación sin Na^+ , el lavado debe realizarse con medio de incubación que carezca de dicho catión y que se preparará como ya se ha indicado en el apartado II. 2. b. de material y métodos. Igualmente se lavará con medios de incubación de $\text{pH}=5$ y de $\text{pH}=6$, cuando las células vayan a ser incubadas a dichos pH .

2. Experimentos de captación.

La captación de sustrato por las células se determina midiendo la cantidad de sustrato que éstas han secuestrado a lo largo del tiempo.

El método que se utiliza es el siguiente:

La incubación se realiza en vasos de polietileno de 50ml. (Se debe observar que tanto durante el aislamiento como durante la incubación de las células, todo el material que se pone en contacto con las mismas debe ser de vidrio parafinado o de polietileno, para evitar que las células queden adheridas al vidrio

(KIMMICH, G.A., 1970).

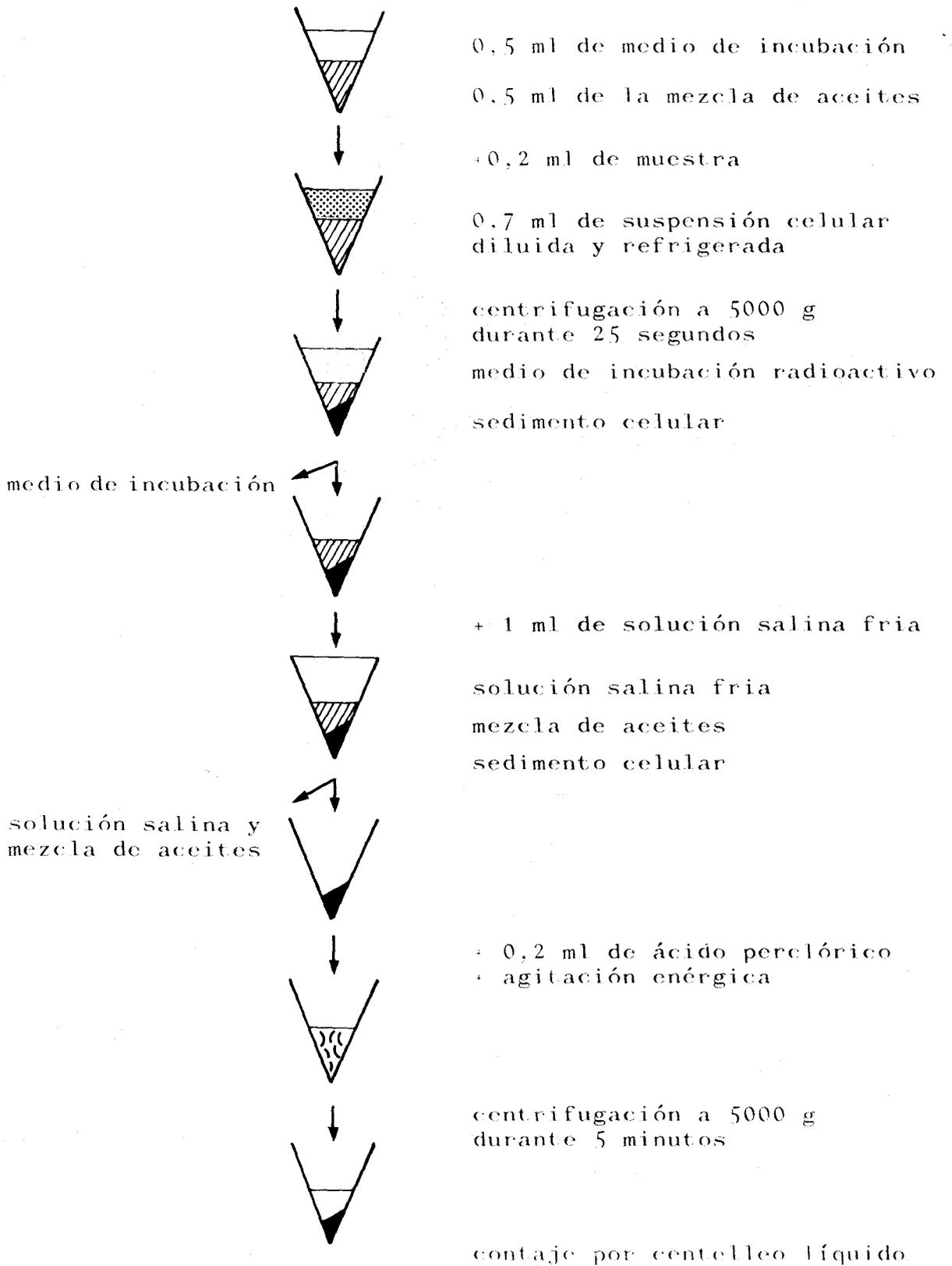
Cada vaso contiene 3ml. de medio de incubación con una concentración de sustrato, y de todos aquellos reactivos cuyos efectos queremos estudiar, tal que tras añadir la suspensión celular, su concentración final en el medio de incubación sea la deseada.

Al medio de incubación también se adicionan 0,162 μCi de (C-14) Gly-Sar. Para lo cual se pipetea 50 μl de una solución de 3,240 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ Gly-Sar. De esta manera la actividad específica de los sustratos en el medio es de aproximadamente $5,4 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. A continuación se toman dos muestras de 100 μl de cada condición con el objeto de conocer su actividad específica real.

Los vasos de precipitación se colocan en el baño termostataado (37°C) y simultáneamente se introduce en dicho baño la suspensión de células que se hallaba a 1°C, se adiciona 1ml. de la suspensión en los vasos de precipitado, con lo cual el volumen final del medio de incubación será de 4ml. Es aquí donde da comienzo la incubación celular y este momento se considera el tiempo cero del experimento. Durante todo el periodo de tiempo que dura la incubación, los vasos de precipitado se mantendrán en agitación constante, con objeto de que todas las células estén en contacto con el medio de incubación.

Así mismo se toma una muestra de 1ml de

Figura 6. ESQUEMA DE LA SEPARACION DE LA SUSPENSION
CELULAR DEL MEDIO RADIOACTIVO POR EL METODO
DE CENTRIFUGACION A TRAVES DE ACEITES
INERTES.



la suspensión celular, para la cuantificación de la proteína por el método de LOWRY, O. H. et al., 1951.

A los distintos tiempos, prefijados, se toman muestras, por duplicado, de 200µl, de cada condición experimental, que se llevan a tubos "eppendorf" conteniendo 0,5ml dinonilftalato y dibutilftalato (densidad = 1,030 g/ml a 4°C) y 0,5ml de medio de incubación a 1°C. A esta temperatura se detiene la actividad celular.

Seguidamente los "eppendorf" se centrifugan, a 5000 g durante 25 segundos, (centrifuga eppendorf 5414 S), de forma que el pellet celular se deposita en el fondo del eppendorf, por debajo de las dos fases: aceites-medio de incubación.

Con una bomba de vacío se succiona la fase acuosa. Para limpiar la radioactividad de las paredes del eppendorf se añade 1ml de solución salina fría. Se succiona ésta completamente, y, se secan las paredes interiores del eppendorf con una torunda de algodón.

Finalmente una vez succionada la fase oleosa, se añaden 200µl de ácido perclórico al 3% (el ácido perclórico desnaturaliza las proteínas facilitando la rotura de los enterocitos) con agitación en un mixer, los tubos se centrifugan a 5000 g durante 5 minutos y se toman del sobrenadante alícuotas de 100µl que se disponen en

los viales con líquido de centelleo para el conteo del C14 (ver Figura 6)

3. Valoración del sustrato por centelleo líquido.

a) Fundamento.

La determinación de la radioactividad con un contador de centelleo líquido, se basa en la transmisión de la energía contenida en el material radiactivo al disolvente que contiene una sustancia fluorescente. Cuando una partícula β atraviesa un líquido de centelleo, pierde energía en su recorrido interaccionando con el líquido centelleador y la consecuencia es la emisión de fotones, las cuales son transformadas en el tubo fotomultiplicador en impulsos eléctricos que son ampliados y registrados.

b) Contador de centelleo.

El contador de centelleo líquido betamatic I (kontron), utilizado por nosotros, dispone de dos fotomultiplicadoras situadas a ambos lados de la muestra y de un dispositivo electrónico que detecta sólo los impulsos que llegan simultáneamente a ambos fotomultiplicadores. Este tipo de conteo, llamado conteo por coincidencia, permite reducir algunos de los factores que perturban el registro y reduce el conteo de fondo.

c) Líquido de centelleo.

Los líquidos de centelleo están constituidos por una solución de uno o más compuestos aromáticos en otro disolvente aromático.

Basándonos en la bibliografía, para la determinación de los distintos compuestos radioactivos, utilizados en nuestro trabajo, hemos empleado el siguiente líquido de centelleo:

2 partes de tolueno
1 parte de tritón X 100
5gr/l. de PPO
C.S. de agua

Para el contaje se utilizan viales de cristal conteniendo 10 ml de líquido de centelleo.

4. Cromatografía.

Para estimar la hidrólisis de la Gly-Sar por las células epiteliales (aunque se trata de un dipéptido altamente resistente a la hidrólisis), se ha realizado un estudio cromatográfico del medio de incubación y del pellet celular.

Finalizado el periodo de incubación en presencia de Gly-Sar (ver apartado II. 3. 2. de material y métodos) las células son rotas mediante shock osmótico. De esta manera la Gly-Sar se-

cuestrada intracelularmente sale al exterior. Tras centrifugación, se toman muestras del sobrenadante para su estudio cromatográfico.

Se han ensayado distintas fases móviles y estacionarias con objeto de seleccionar la más adecuada para obtener una buena separación entre la glicina y la glicil-sarcosina. Así mismo se emplearon las dos técnicas que se describen a continuación.

a) Mediante el empleo de cromatografía en capa fina, con celulosa y sílica-gel, se ensayaron como fases móviles: etanol: amoníaco: agua (20: 1: 4, v/v) y metanol: acetonitrilo: agua (9: 0,5: 0,5, v/v), siendo el valor de los R_f 0,24 para la glicina y 0,34 para la Gly-Sar, y 0,34 para la glicina y 0,21 para la Gly-Sar, respectivamente. Las muestras tomadas del medio de incubación y del pellet se dejaron correr aproximadamente 3 horas, revelándose la placa, al término de este periodo con ninhidrina al 0,5% en etanol absoluto.

b) Utilizando, en este caso, cromatografía en papel se procedió según la técnica indicada por MATTHEWS, D.M., et al., (1979) y BURSTON, D. et al., (1982).

Las muestras del medio de incubación y del pellet se dejan correr junto con las muestras patrón (Gly-Sar y Gly), en papel Whatman 3MM, con la fase móvil butanol: ácido acético: agua (120: 30: 50, v/v). Transcurridas 24 horas, se cubren las

zonas de papel correspondiente al recorrido de la muestra problema y se revela, con ninhidrina al 0,5% en etanol, las correspondientes a las muestras patrón.

Posteriormente se recortan las zonas de papel problema y se colocan en viales con 10 ml de líquido de centelleo para su contaje.

Según la zona donde aparezca la radioactividad, podremos saber si la C14-Gly-Sar se ha hidrolizado o no.

II. 4. DETERMINACION DE LA PROTEINA.

La determinación cuantitativa de la proteína, presenta en la suspensión de células aisladas del intestino delgado de pollo, se realizó siguiendo el método establecido por LOWRY, O.H., et al., (1951).

Reactivos:

Solución A: Carbonato sódico al 2% en NaOH
0,1N

Solución B: Sulfato cúprico pentahidratado al
0,5%

Solución C: Tartrato sódico-potásico al 1%

Solución D: Se prepara extemporáneamente mezclando las tres soluciones anteriores en la siguiente proporción:

50 partes de la solución A

0,5 partes de la solución B
5 partes de la solución C

Solución E: Reactivo de Folin (Fosfomolibdeno-Fosfowolframio) 1N.

Solución patrón: Se prepara una solución madre que contenga 0,1mg/ml de albúmina sérica bovina, y a partir de ésta, se obtiene las distintas soluciones patrón realizando una serie de diluciones que se indican en la tabla I. Cada una de las soluciones patrón se prepara por triplicado.

Solución problema: Se homogeneiza la suspensión de enterocitos y se diluye posteriormente 1:250 en agua destilada. Se toma, por triplicado, 1ml que se lleva a sendos tubos de ensayo.

Blanco: se obtiene añadiendo 1ml de agua destilada en un tubo de ensayo.

(Ver tabla I)

Técnica:

A cada tubo de ensayo se añaden 5ml del reactivo D y se agita. Tras un periodo de reposo de 15 a 20 minutos, se añaden 0,5ml de la solución E a cada tubo de ensayo, se agita vigorosamente y se dejan reposar 30 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se lee su absorbancia en un espectrofotómetro (Marca Shimatzu UV-110-02) a 750 nm.

A partir de los valores de absorbancia de las soluciones patrón, se construye una recta patrón (ab-

sorbancia vs concentración) a la que se llevan los valores de absorbancia de las soluciones problema. De esta manera se obtiene el valor del contenido proteico de las soluciones problema.

El valor real del contenido proteico de la suspensión celular, se calcula a partir del obtenido gráficamente (a) tal, como a continuación, se indica:

$$\text{mg/ml} = (a-b) \cdot c$$

en donde:

b, concentración de albúmina sérica bovina del medio de incubación (1mg/ml),

c, dilución a la que fue sometida la suspensión celular previa a la colorimetría (1:250).

Si llamamos Z al valor obtenido, para calcular el contenido proteico del pellet celular, se aplicará la siguiente corrección:

$$\text{mg/ml (pellet celular)} = Z \cdot \frac{e}{d}$$

siendo:

e, dilución que sufre la suspensión celular al añadirla al medio de incubación (1:4) (Hay que tener en cuenta que el contenido proteico se valora en la suspensión celular de la que se tomaba 1ml para llevarla a 3ml de medio de incubación),

d, volumen de muestra que se toma del medio de incubación que contiene las células a lo largo del tiempo (0,2ml)

TABLA I

PROTOCOLO DE LA TECNICA DE DETERMINACION DE PROTEINAS SEGUN EL METODO DE LOWRY.

	Solución patrón (ml)	Solución problema (ml)	Agua destilada (ml)	Reactivo D (ml)
Blanco	—	—	1,00	5,00
Patrón I	0,25	—	0,75	5,00
Patrón II	0,50	—	0,50	5,00
Patrón III	1,00	—	0,00	5,00
Problema	—	1,00	—	5,00

II. 5. MODO DE EXPRESAR LOS RESULTADOS.

Los resultados se expresan en nmoles de Gly-Sar/ μ l de volumen intracelular (o agua celular). Para ello inicialmente se calculan los nmoles de Gly-Sar/mg de proteína de la suspensión celular, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/mg} = \frac{\text{d.p.m.}(p) \times \frac{V}{v}}{\text{d.p.m.}(s) \times \frac{1}{v} \cdot M} \times \text{Ci} \quad (1)$$

en donde:

d.p.m.(p), desintegraciones por minuto de la muestra tomada del pellet (muestra problema),

d.p.m.(s), desintegraciones por minuto de la muestra "standard", es decir, de la muestra tomada del medio de incubación,

V, volumen de ácido perclórico en el que fue disgregado el pellet,

v, volumen de la muestra que se toma para el contaje,

M, contenido proteico del pellet celular (expresado en mg),

Ci, concentración del sustrato en estudio (Gly-Sar) en el medio de incubación.

Para conocer el valor real de la cantidad de sustrato captado por las células, debemos descontar del anterior, la cantidad de sustrato presente en el medio extracelular del pellet. Esta se obtiene utilizando PEG 4000, que debido a su alto peso molecular, no puede penetrar en las células. De esta forma, em-

pleando PEG-4000 marcado radioactivamente se calcula el volumen extracelular, mediante la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} \text{Volumen extracelular/mg proteina } (\mu\text{l/mg}) &= \\ &= \frac{\text{d.p.m.}(p) \times \frac{V}{v}}{\text{d.p.m.}(s) \times \frac{1}{v} \times M} \end{aligned} \quad (2)$$

en donde:

d.p.m.(p), d.p.m.(s), V, v y M, tienen el mismo significado que en la ecuación (1).

Una vez conocido el volumen extracelular podremos saber los nmoles de sustrato que en él se encuentran, y a partir de este valor, la cantidad real de sustrato captado por las células.

$$\text{nmol}_{\text{intracelular}} = \text{nmol}_{\text{total}} - \text{nmol}_{\text{extracelular}}$$

Por último, el volumen intracelular (al que referimos los resultados) se obtiene midiendo la absorción de 3-o-Metil-Glucosa en presencia de florricina. Bajo estas condiciones experimentales, en el estado de equilibrio, la concentración intracelular del azúcar es igual a la extracelular. Es decir:

$$C_{\text{Azúcar extracelular}} = C_{\text{Azúcar intracelular}}$$

$$C_i^a = \frac{\text{nmol}_i}{V_i} = \frac{\text{nmol}_{\text{total}} - \text{nmole}}{V_i}$$

De donde:

$$V_i = \frac{\text{nmol}_{\text{total}} - \text{nmol}_e}{C_i} = \frac{\text{nmol}_{\text{total}} - \text{nmol}_e}{C_e}$$

siendo:

V_i , el volumen intracelular del pellet,
 $\text{nmol}_{\text{total}}$, cantidad de azúcar determinada por experimentación,
 nmol_e , cantidad de azúcar localizada en el volumen extracelular del pellet, y determinada por PEG-4000,
 C_e , concentración extracelular de azúcar, es decir, concentración de 3-o- Metil-Glucosa en el medio de in cubación.

II. 6. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS.

El análisis estadístico aplicado a los datos experimentales del presente trabajo ha consistido en:

Cálculo de los estadísticos básicos: media (\bar{X}) y error estándar (\mathcal{E}), en los que se expresan todos los resultados obtenidos en los distintos experimentos. (También se indica el número de datos en tre paréntesis (n)).

Comparación de las medias de los distintos experimentos. Para poder determinar la significación entre los valores obtenidos en los distintos experimentos se aplicó el test de la t de Student.

II. 7. REACTIVOS.

La glicil-sarcosina, β -alanil-histidina, galactosa, 3-o-metil-glucosa, teofilina, florricina, ouabaína, monensina, ninhidrina, fueron suministrados por Sigma Chemical Company, St. Luis, USA.

C-14-Glicil-sarcosina, C-14-3-o-metil-glucosa, H-3-galactosa, C-14-PEG-4000, fueron suministrados por Amersham, Inglaterra.

La pureza de los dipéptidos, marcados y sin marcar radioactivamente, fue comprobada cromatográficamente por los dos métodos descritos en el apartado II. 4. de Material y Métodos.

III. RESULTADOS.

III. RESULTADOS

III. 1. Puesta a punto de la técnica.

El presente trabajo se inició con la puesta a punto de la técnica de estudio de transporte de sustratos, en células aisladas de intestino delgado de pollo. Los experimentos correspondientes a esta fase inicial del trabajo se realizaron en colaboración, con la licenciada María del Carmen Montero Balosa.

Para el aislamiento de las células, se emplearon dos medios distintos de aislamiento (ver apartado II.2.2. de Material y Métodos). Se comprobó que el medio de aislamiento con hialuronidasa favorecía el desprendimiento de las células, más que el de citrato. Por lo que fue utilizado en todos los experimentos ulteriores.

También se han ensayado dos métodos para el aislamiento del pellet celular del medio de incubación: uno de ellos se realizaba mediante sucesivos lavados y centrifugaciones del pellet celular a 4°C (para detener todos los procesos de transporte). Esto permite que al final quede un pellet de células con radioactividad despreciable en el medio extracelular, por lo que al romper las células el sustrato radioactivo que aparece procede de su interior.

El otro, es el ya descrito en el apartado

II. 3. 2. de Material y Métodos. Se basa en utilizar una mezcla de aceites con una densidad mayor que la del medio de incubación y menor que la de los enterocitos, de forma que al centrifugar, las células pasan a través de los aceites, formando un pellet, mientras que el medio de incubación permanece sobre la mezcla oleosa. Para este segundo método se probaron distintas mezclas de aceites:

-Mezcla de siliconas AR-20 y AR-200 en la proporción 5,25/3,50.

-Mezcla de dibutilftalato y dinonilftalato en proporción 64,16/35,84, quedando una densidad final de 1,03 g/ml a 4°C, que se determinó con un picnómetro.

Siendo esta última la más adecuada, ya que permitió una buena separación de las células, con un volumen extracelular atrapado en las mismas, constante, y resultando más rápida.

A continuación se pasó a ver si las células obtenidas funcionaban adecuadamente en cuanto a su capacidad de transporte de sustratos. Dado que el transporte de galactosa por células aisladas de intestino delgado de pollo, así como el efecto de diferentes sustancias (tales como florricina y teofilina) sobre dicho proceso, ha sido ampliamente estudiado por RANGLES, J. y KIMMICH, G.A. (1978) (que fueron los primeros en utilizar esta técnica); se hicieron una serie de experimentos para comprobar el buen funcionamiento de las células por nosotros aisladas.

Para ello se utilizó, como sustrato a absorber, 1 mM galactosa, estudiándose la entrada del azú

car en condiciones control y en presencia de florricina y teofilina.

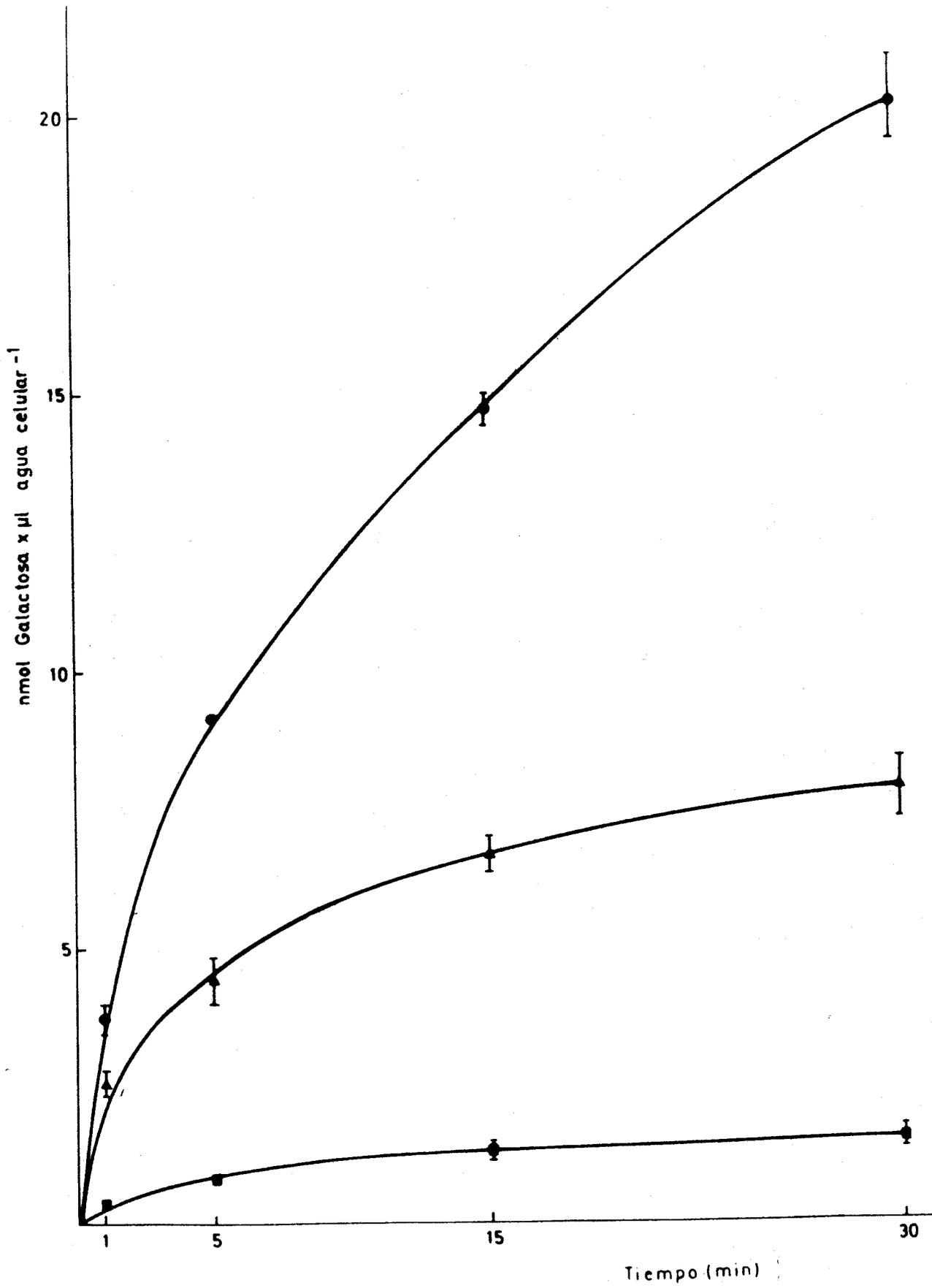
La Tabla II muestra que la florricina, conocido inhibidor del transporte activo de azúcares (ALVARADO, F., 1967), disminuyó marcadamente la entrada de galactosa en las células. Por otro lado la teofilina aumentó significativamente la acumulación intracelular del azúcar. Tanto el grado de inhibición, como el de estimulación obtenidos, están de acuerdo, con los descritos por RANGLES, J. y KIMMICH, G.A. (1978). Estas observaciones nos indican que el proceso de aislamiento celular era el adecuado, y que las células mantenían su viabilidad a lo largo del tiempo de experimentación.

TABLA II.

ENTRADA DE GALACTOSA (1mM) A CELULAS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO A LO LARGO DEL TIEMPO DE INCUBACION, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE 0,25mM FLORRICINA(F) O 7,5mM TEOFILINA (T). C: CONDICIONES CONTROL.

TIEMPO (min)	nmol galactosa . μ l agua celular ⁻¹											
	1			5			15			30		
	C	F	T	C	F	T	C	F	T	C	F	T
	2,18	0,31	3,16	4,78	0,81	9,32	6,14	1,24	15,35	7,34	1,87	21,55
	3,18	0,44	4,37	4,07	1,02	8,88	7,27	1,23	14,01	8,61	1,28	23,68
	2,51	0,36	3,73	6,02	0,75	9,34	7,30	1,00	14,79	9,38	0,89	25,44
	2,47	0,46	-	5,09	0,66	-	6,75	1,59	-	6,94	1,59	-
	2,96	0,44	-	4,27	0,78	-	6,09	1,46	-	6,88	1,65	-
\bar{X}	2,66	0,38	3,75	4,43	0,85	9,88	6,71	1,30	14,72	7,83	1,45	23,55
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ϵ	0,20	0,05	0,30	0,43	0,07	0,13	0,29	0,11	0,30	0,55	0,19	0,80
(n)	(5)	(5)	(3)	(5)	(5)	(3)	(5)	(5)	(3)	(5)	(5)	(3)

Figura 7. ENTRADA DE GALACTOSA (1mM) A CELULAS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO A LO LARGO DEL TIEMPO DE INCUBACION, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE 0,25mM FLORRICINA (■) O 7,5mM TEOFILINA (●). (▲): CONDICIONES CONTROL.



III. 2. VOLUMEN EXTRACELULAR

Para el cálculo del volumen extracelular, clásicamente se emplean moléculas, tales como inulina, manitol, PEG 4000, etc., que debido a su tamaño no penetran en las células o lo hacen muy lentamente. De entre todos estos marcadores, en el presente trabajo se ha empleado polietilenglicol (PEG) 4000.

Para la realización de estos experimentos se añadían $0,08 \mu\text{Ci/ml}$ C-14-PEG 4000 a los 4 ml de suspensión celular y se procedía tal como se indicó en el apartado II. 3. 2. de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III. Como se puede observar el volumen extracelular no se modificó significativamente a lo largo del tiempo.

En aquellos experimentos en los que se modificaban las condiciones experimentales (ausencia de Na^+ , modificación del pH del medio de incubación), también se hicieron algunas medidas simultáneas del volumen extracelular, no observándose modificación alguna.

Por todo ello, los resultados obtenidos sobre el transporte de Gly-Sar en células aisladas de intestino delgado de pollo, que se muestran en el presente trabajo, han sido corregidos por un valor de volumen extracelular, que representa el valor medio de los obtenidos en los distintos tiempos y condiciones experimentales; esto es : $2,99 \pm 0,04 \mu\text{l/mg}$

proteína (n=25). Este valor está de acuerdo con el ya obtenido por RANGLES y KIMMICH (1978) con entero citos de intestino delgado de pollo.

TABLA III.

VOLUMEN EXTRACELULAR DE LOS PELLETS.

TIEMPO (min)	μl agua celular . mg proteína ⁻¹			
	1	5	15	30
	2,62	2,18	3,02	3,02
	3,68	3,00	3,60	3,36
	3,31	3,27	2,95	2,71
	2,55	3,14	3,52	3,03
\bar{X}	3,04	2,98	3,02	3,03
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ϵ	0,31	0,28	0,22	0,23
(n)	(4)	(4)	(4)	(4)

III. 3. VOLUMEN INTRACELULAR

Para evaluar el volumen intracelular se emplean sustancias muy permeables ($^3\text{H}_2\text{O}$, por ejemplo), cuya concentración intracelular, en el estado estacionario, está en equilibrio con la extracelular.

En el presente trabajo se ha estimado el volumen intracelular midiendo la absorción de 1mM 3-o-Metil-Glucosa, en presencia de florricina (0,25mM). Bajo estas condiciones experimentales, la 3-o-Me-til-Glucosa, azúcar activamente transportado al interior de las células, sólo penetra al interior de éstas por difusión, ya que la florricina bloquea el mecanismo activo. En consecuencia; en el estado estacionario (30 minutos) la concentración intracelular de 30MG es igual a su concentración en el medio de incubación, lo que permite calcular el volumen intracelular (ver apartado II. 5. de material y métodos).

En las Tablas IV y V, se muestran los resultados obtenidos del volumen intracelular bajo distintas condiciones experimentales. Como se puede observar, ni el pH del medio de incubación, ni la ausencia de Na de éste, modificaron significativamente el volumen intracelular de los enterocitos. Basándonos en estos resultados, nos pareció correcto considerar como volumen intracelular, para el cálculo de la concentración intracelular de glicil-sarcosina, el que se corresponde con el valor medio de todos los datos obtenidos sobre dicho parámetro ($3,63 \pm 0,20 \mu\text{l}/\text{mg}$ proteína⁻¹ (n=35)). Este valor está próximo a los ob

servados por BROWN, P.D. y SEPULVEDA, F.V. (1985) y por SCHWENK, M. et al. (1984), en enterocitos aislados de intestino delgado de conejo y rata, respectivamente.

TABLA IV.

EFFECTO DEL pH DEL MEDIO DE INCUBACION SOBRE EL VOLU-
MEN INTRACELULAR.

pH:	μl agua celular . mg proteína ⁻¹		
	7,4	6	5
	3,43	-	3,53
	3,37	-	3,73
	3,02	-	3,62
	4,05	-	3,19
	4,01	-	3,98
	4,29	-	3,71
	3,96	3,91	-
	3,97	3,93	-
	3,45	3,51	-
	3,65	3,06	-
	3,22	3,19	-
	2,68	3,52	-
X	3,60	3,52 ^{N.S.}	3,62 ^{N.S.}
\pm	\pm	\pm	\pm
ϵ	0,14	0,15	0,12
(n)	(12)	(6)	(6)

N.S.: no significativo. Comparaciones de los valores obtenidos a pH=6 y a pH=5, respecto a los observados a pH=7,4.

TABLA V.

EFFECTO DE LA PRESENCIA Y AUSENCIA DE SODIO DEL MEDIO DE INCUBACION SOBRE EL VOLUMEN INTRACELULAR.

Na ⁺ (mM)	μl agua celular : mg proteína ⁻¹ .	
	140	0
	3,49	3,21
	4,46	4,47
	4,36	4,16
	4,17	4,31
	2,39	2,81
	3,77	3,44
\bar{X}	3,77	3,73 ^{N.S.}
\pm	\pm	\pm
ϵ	0,34	0,30
(n)	(6)	(6)

N.S.: no significativo. Comparación entre los valores medios obtenidos en presencia y ausencia de sodio.

III. 4. ENTRADA DE GLY-SAR EN CELULAS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Inicialmente se hicieron una serie de experimentos en los que se midió la entrada de glycil-sar cosina a enterocitos aislados de intestino delgado de pollo a lo largo del tiempo.

Se empleó una concentración del dipéptido de 1mM y se procedió tal como se describe en el apartado III. 3. 2. de Material y Métodos.

La cantidad de Gly-Sar que entra en las células aumentó al aumentar el tiempo de incubación (ver Tabla VI y Figura 7).

Como se puede observar ya a partir de los 5 minutos de incubación, la relación concentración intracelular / concentración extracelular del dipéptido fue mayor que 1, alcanzándose en el equilibrio una concentración intracelular de 3,22mM.

TABLA VI.

ENTRADA DE 1mM GLY-SAR EN CELULAS AISLADAS DE INTES-
TINO DELGADO DE POLLO EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCU-
BACION.

Tiempo (min)	nmol Gly-Sar . μl^{-1} agua celular			
	1	5	15	30
	0,76	2,00	2,62	2,99
	0,82	1,62	2,60	3,15
	0,92	2,20	3,27	3,43
	0,54	2,77	3,07	3,40
	0,31	2,13	2,81	3,07
	0,63	1,98	2,66	2,95
	0,67	1,96	2,86	3,46
	0,54	2,09	2,89	3,32
\bar{X}	0,65	2,09	2,85	3,22
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ϵ	0,08	0,13	0,09	0,08
(n)	(8)	(8)	(8)	(8)

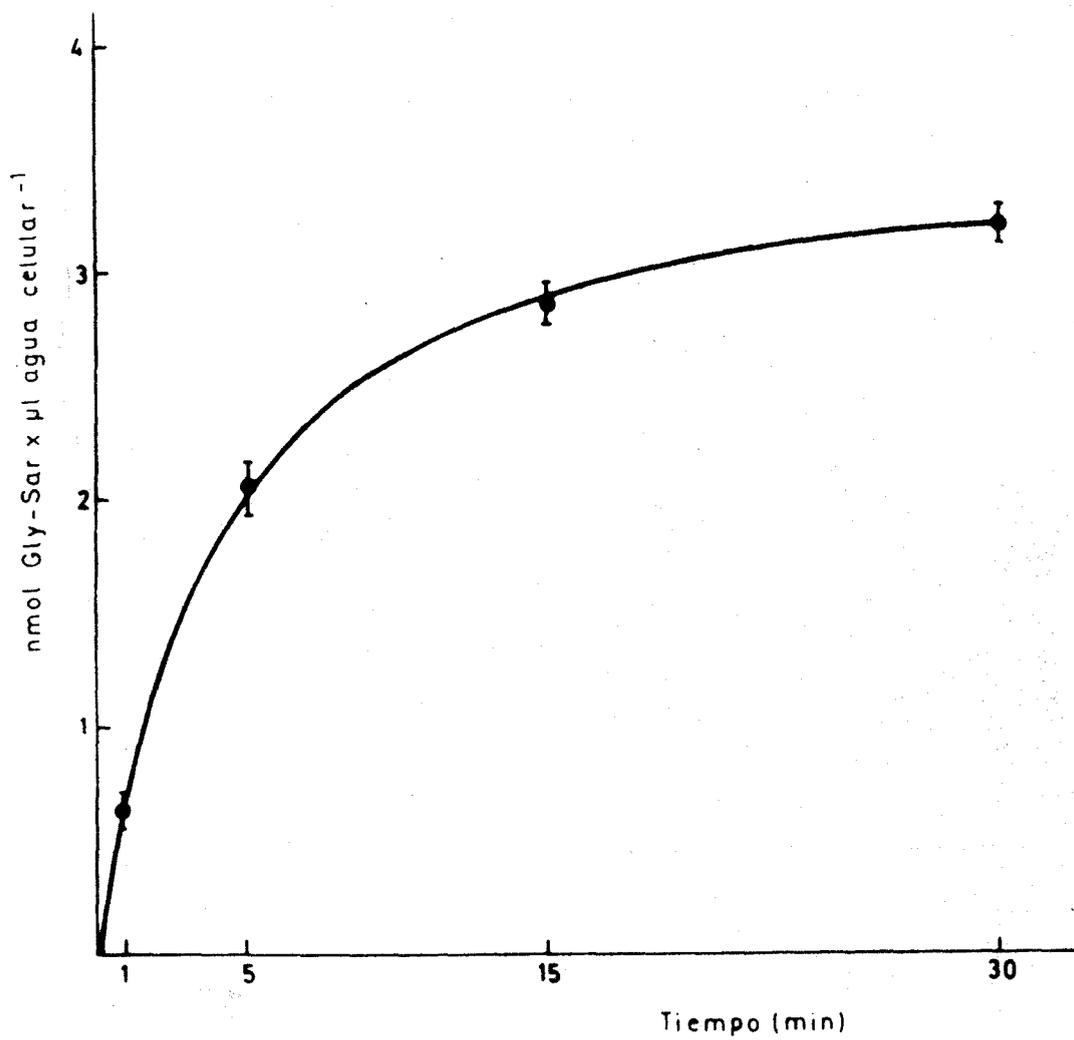


Figura 8. ENTRADA DE 1mM GLY-SAR (●) EN CELULAS AISLADAS DE IN TESTINO DELGADO DE POLLO EN FUNCION DEL TIEMPO DE IN CUBACION.

III. 5. ESTIMACION DE LA HIDROLISIS DE GLY-SAR.

1. Cromatografía.

Como ya se ha indicado en la introducción del presente trabajo, la Gly-Sar es un dipéptido no natural, altamente resistente a la hidrólisis. No obstante, para comprobar que el dipéptido era efectivamente acumulado intracelularmente en forma intacta y no la ^{14}C -Glicina, resultante de su hidrólisis, se realizó un estudio cromatográfico del medio de incubación y del pellet celular, tal como se indica en el apartado II. 3. 4. a de Material y Métodos.

Las técnicas descritas resultaron adecuadas para separar la Gly de la Gly-Sar de una mezcla de ambas sustancias puras. Sin embargo, no pudieron ser empleadas para ver si la Gly-Sar era hidrolizada por las células, bien extracelularmente (muestra tomada del medio de incubación) o intracelularmente (muestra del pellet), ya que la albúmina presente en el medio de incubación y otros péptidos y aminoácidos del pellet celular, provocaron interferencias, obteniéndose tras el revelado, múltiples manchas difíciles de identificar.

Para evitar estas interferencias, se realizó un estudio, también cromatográfico, pero en el que se medía el recorrido del marcaje (C-14), tal y como se describe en el apartado II. 3. 4. b.

de Material y Métodos.

Recortadas las zonas de papel correspondientes a la Gly-Sar y a la Gly, la radioactividad apareció en un 98% en la zona correspondiente a la Gly-Sar, lo que nos indica que el dipéptido o bien no es hidrolizado por las células, o lo es de forma despreciable.

2. Efecto de la L-Metionina.

Un método indirecto para averiguar si la la Gly-Sar es hidrolizada extracelularmente, es decir, por dipeptidasas localizadas en el borde en cepillo, es el de ver si su captación celular se ve modificada por aminoácidos que compiten con la Gly o con la Sarcosina. En nuestro caso nos interesaba emplear un aminoácido que compitiera con la Gly, ya que es este aminoácido el que porta el marcaje (C-14).

La L-Metionina es un aminoácido que tiene una gran afinidad por el sistema de transporte de la L-Gly (SEPULVEDA, F.V. y SMITH, M.W. 1978) y en consecuencia actúa como un potente inhibidor competitivo de la entrada de este aminoácido a las células.

Se realizaron una serie de experimentos, en los que se añadía 10mM L-Metionina a los 4ml de suspensión celular que contenía, a su vez, 1mM Gly-Sar y trazas de Gly-Sar marcada con C-14.

Si la Gly-Sar hubiera sufrido hidrólisis, la L-Metionina hubiera disminuido marcadamente su acumulación por los enterocitos.

En la tabla VII y figura 9 , se puede observar que la L-Metionina produjo una ligera, pero no significativa inhibición en la acumulación de Gly-Sar a tiempos largos, corroborando los resultados obtenidos en el estudio cromatográfico.

TABLA VII.

EFFECTO DE LA 10mM L-METIONINA SOBRE LA ENTRADA DE 1mM GLY-SAR EN CELULAS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO.

TIEMPO (min)	nmol Gly-Sar . μ l agua celular ⁻¹			
	15		30	
	0	10	0	10
L-MET	0	10	0	10
	1,97	2,03	2,92	2,87
	1,63	1,43	2,90	2,25
	1,22	1,19	2,91	2,56
	1,53	1,48	2,92	2,85
	1,57	1,24	2,98	2,40
	1.44	1,43	2,75	2,69
\bar{X}	1,53	1,47 ^{N.S.}	2,89	2,55 ^{N.S.}
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ϵ	0,11	0,17	0,04	0,12
(n)	(6)	(6)	(6)	(6)

N.S.: no significativo. Comparaciones entre los valores obtenidos en presencia y ausencia de 10mM L-Metionina (L-MET).

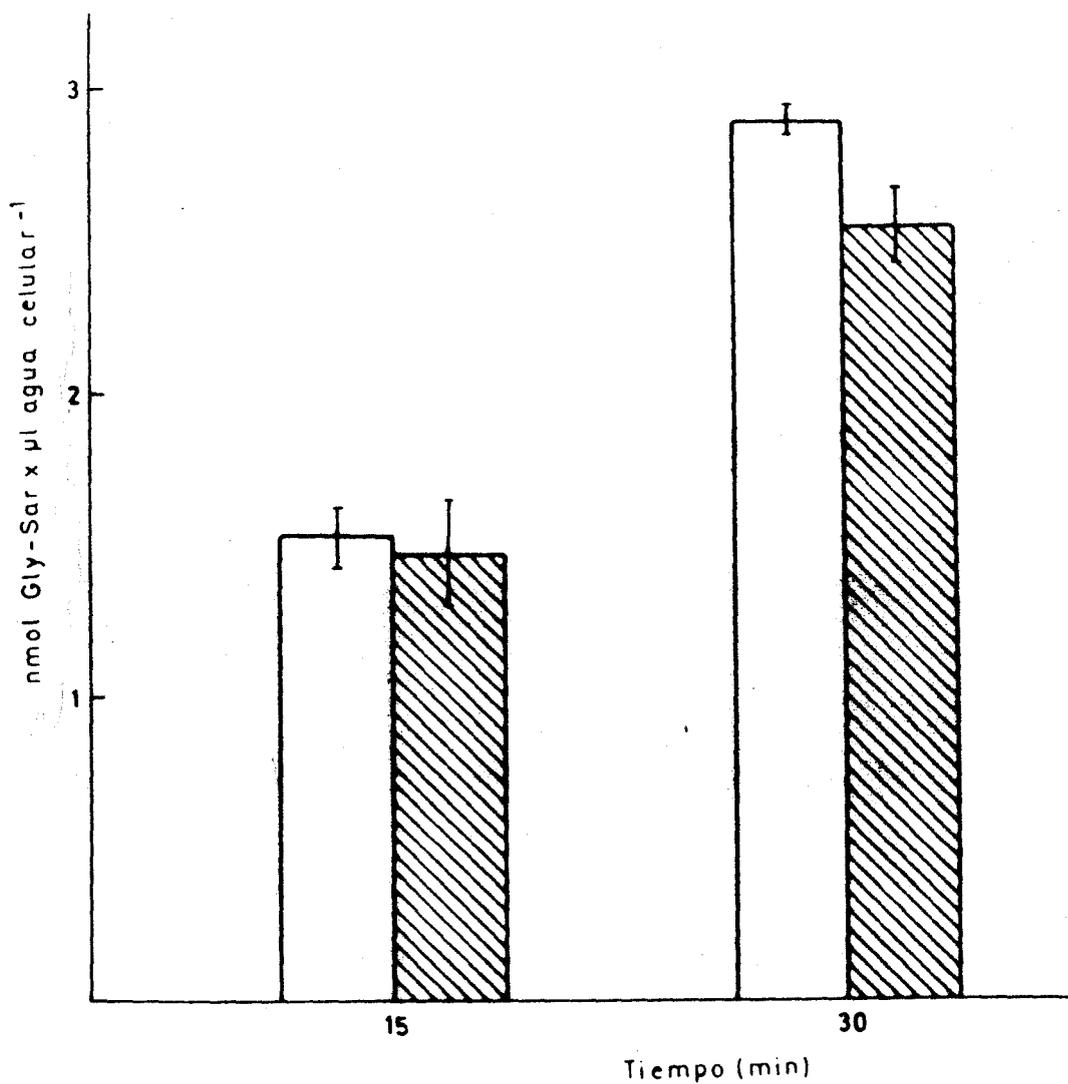


Figura 9. EFECTO DE LA 10mM L-METIONINA  SOBRE LA ENTRADA DE 1mM GLY-SAR  EN CELULAS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO.

III. 6. DEPENDENCIA DEL Na⁺.

La observación de que la glicil-sarcosina en traba a las células en forma intacta y alcanzaba en el interior de éstas, una concentración por encima de su concentración de equilibrio, sugiere que dicho proceso está mediado por un mecanismo activo.

Es bien conocido que el transporte activo de dichas sustancias orgánicas (KIMMICH, G.A., 1981) es tá acoplado al transporte activo primario del Na⁺, por lo que la ausencia de dicho catión y/o la anula-ción del gradiente transmembrana del Na⁺ inhibe todos aquellos procesos de transporte dependientes del transporte activo del Na.

Para ver si el sistema de transporte de la Gly-Sar era o no dependiente del Na⁺, se realizaron tres tipos de experimentos:

1. Ausencia del Na⁺.

En algunos experimentos se sustituyó isoosmóticamente el sodio del medio de incubación por manitol. (ver apartado II.2.1.a) de material y métodos).

Como se puede observar en la Tabla VIII y en la figura 10, tanto la velocidad inicial ($0,86 \pm 0,15$ nmol/ μ l agua celular y $0,42 \pm 0,05$ en presen-cia y ausencia de sodio respectivamente) de capta-ción de GlySar, como la concentración intracelular del dipéptido alcanzada en el equilibrio fueron

significativamente disminuidas al eliminar el so
dio del medio de incubación.

2. Efecto de la Monensina.

Los resultados mostrados en la Tabla VIII indicaban que la ausencia de sodio inhibía signi
ficativamente el transporte de Gly-Sar. Sin em-
bargo, la eliminación del sodio del medio de in-
cubación no bloqueó por completo el sistema de
transporte activo de Gly-Sar, ya que la relación
concentración intracelular/concentración extrace-
lular del dipéptido, seguía siendo mayor que 1.
Esta observación podría indicar que parte del
transporte activo de Gly-Sar fuera independiente
del sodio, y por tanto mediado por otro sistema
de transporte activo primario. Sin embargo, tam-
bién podría ser debido a que, si bien se eliminó
el sodio del medio de incubación, siempre queda
algo atrapado en las microvellosidades de los en-
terocitos (ALVARADO, F. et al., 1982), lo que po-
dría explicar la no anulación del transporte ac-
tivo de Gly-Sar.

Con objeto de dilucidar, si el transpor-
te activo de Gly-Sar era total o parcialmente de-
pendiente del sodio se hicieron una serie de expe-
rimentos en los que se estudió el efecto de la
monensina sobre dicho proceso.

La monensina es un ionóforo del sodio, y
por tanto, disipa el gradiente transmembrana de
este ión (GHIJSEN, W. et al., 1984).

Como se puede observar (ver Tabla IX y figura 11), en presencia de 10 μ M monensina, la acumulación intracelular del péptido fue totalmente anulada.

3. Efecto de la Ouabaína.

Otra manera de anular el gradiente transmembrana de sodio, es la de bloquear la ATPasa NaK mediante el glicósido cardiotónico, ouabaína (VAN OS, C.H. et al., 1984).

Estos experimentos se llevaron a cabo solamente a dos tiempos: 15 y 30 minutos.

La ouabaína (0,1 mM) anuló la acumulación de 1 mM Gly-Sar (ver Tabla X y figura 12).

TABLA VIII.

ACUMULACION DE 1mM GLY-SAR POR CELULAS INTESTINALES AISLADAS DE POLLO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE SODIO DEL MEDIO DE INCUBACION.

		nmol Gly-Sar . μ l agua celular ⁻¹							
TIEMPO: (min)	1		5		15		30		
OUABAINA: (mM)	140	0	140	0	140	0	140	0	
	0,54	0,30	2,77	1,35	3,07	1,47	2,63	1,63	
	0,92	0,36	2,20	1,36	3,27	1,70	3,43	2,38	
	0,80	0,36	2,83	1,23	3,76	1,83	3,99	2,00	
	0,76	0,54	2,00	1,41	2,62	1,85	3,07	2,10	
	1,31	0,53	2,13	1,43	2,81	1,67	3,65	1,91	
\bar{X}	0,86	0,42	2,38	1,35	3,10	1,70	3,35	2,00	
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	
ϵ	0,15	0,05	0,19	0,04	0,26	0,10	0,26	0,14	
(n)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	
p	<0,01		<0,001		<0,001		<0,001		

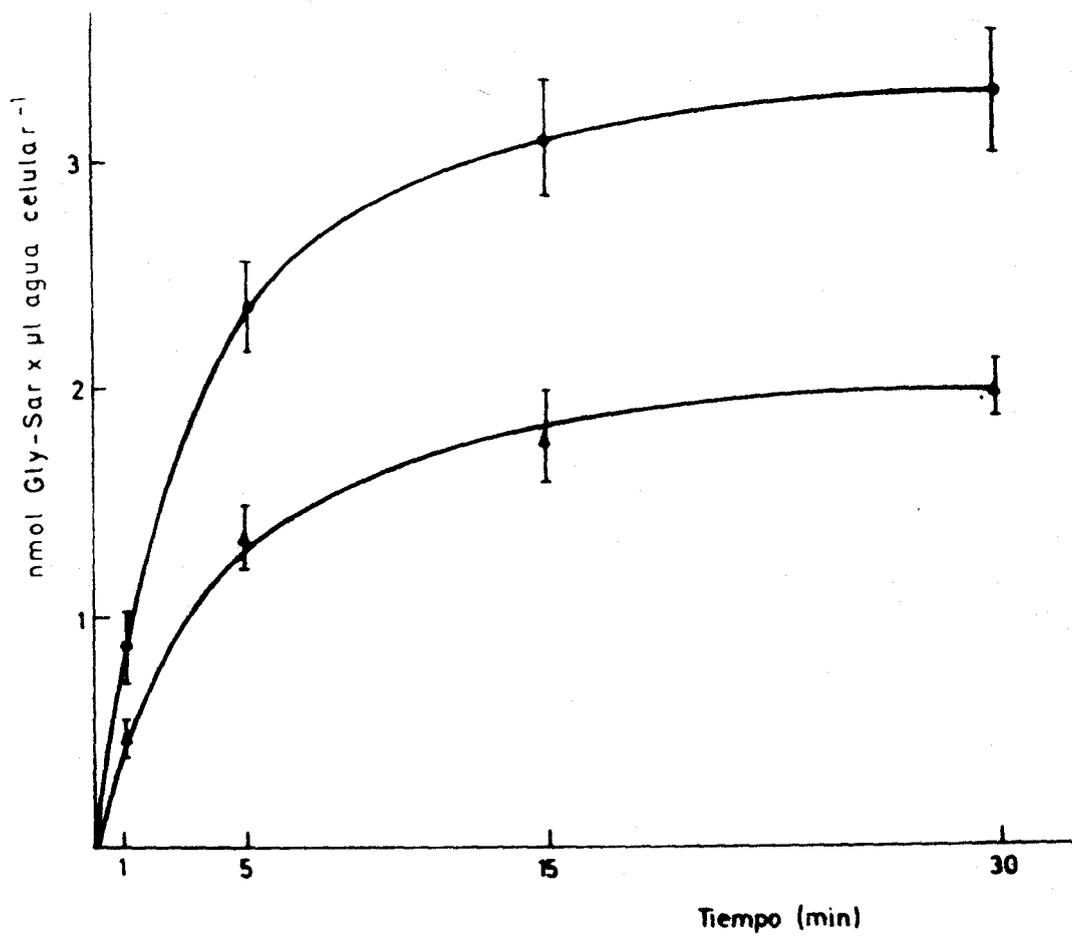


Figura 10. ACUMULACION DE 1mM GLY-SAR POR CELULAS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO EN PRESENCIA (●) Y AUSENCIA (▲) DE 140mM SODIO DEL MEDIO DE INCUBACION.

TABLA IX.

EFFECTO DE LA MONENSINA SOBRE LA ENTRADA DE 1mM GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO.

		nmol Gly-Sar . μ l agua celular ⁻¹							
TIEMPO: (min)	1		5		15		30		
MONENSINA: 0 (μ M)	10	0	10	0	10	0	10		
	0,58	0,26	1,30	0,88	2,69	0,90	3,22	1,08	
	0,60	0,30	1,62	0,56	2,42	0,91	2,76	1,40	
	0,82	0,31	1,66	1,11	2,50	1,29	3,15	1,42	
	0,54	0,29	1,47	0,90	2,55	0,98	3,60	0,75	
	0,82	0,28	1,55	0,95	2,45	1,30	3,11	1,30	
\bar{X}	0,67	0,28 ^{N.S.}	1,52	0,88 ^{N.S.}	2,52	1,07*	3,19	1,19*	
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	
ϵ	0,13	0,02	0,14	0,20	0,10	0,20	0,30	0,28	
(n)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	

* $p < 0,001$.

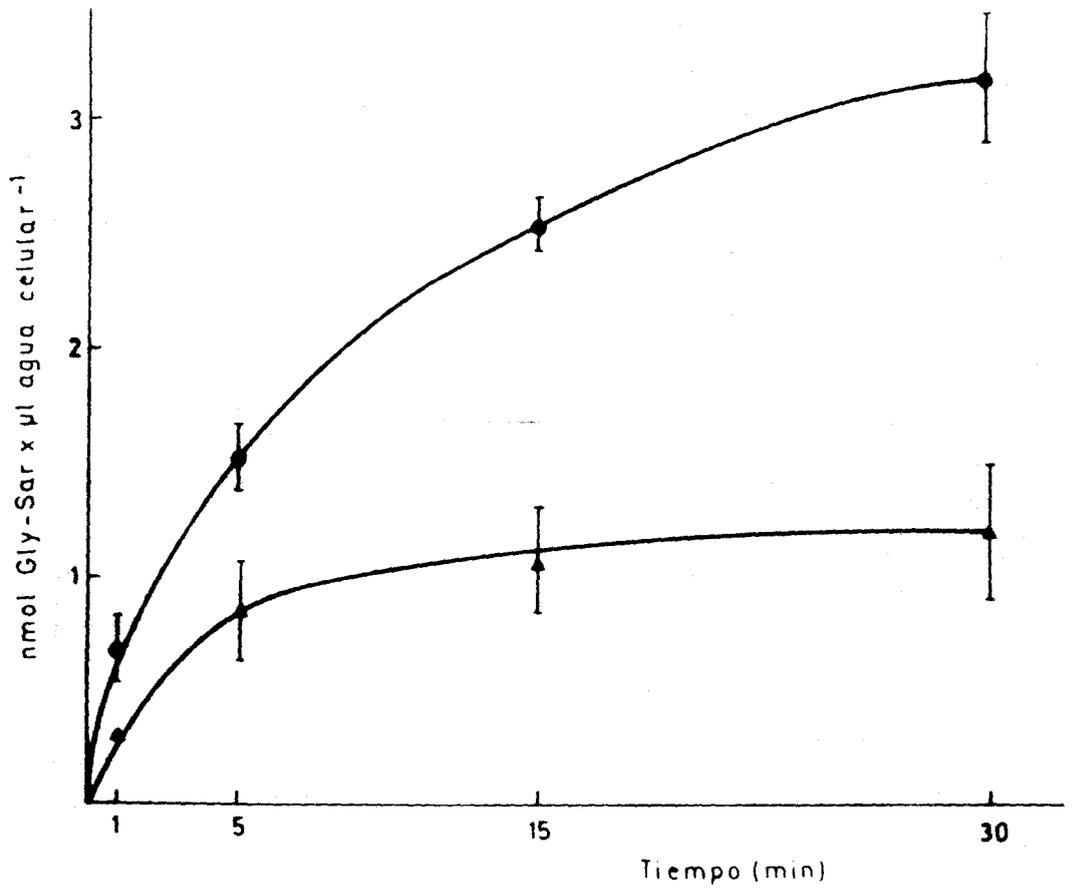


Figura 11. EFECTO DE LA 10 μ M MONENSINA (\blacktriangle) SOBRE LA ENTRADA DE 1mM GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO.

TABLA X.

EFFECTO DE LA OUABAINA SOBRE LA ACUMULACION DE 1mM
GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO.

TIEMPO: (min)	nmol Gly-Sar . μ l agua celular-1			
	15		30	
	0	0,1	0	0,1
	1,68	0,99	2,00	1,22
	1,97	0,99	2,92	1,26
	1,63	0,94	3,20	1,12
	1,22	0,64	-	0,89
	1,40	0,66	3,57	0,88
\bar{X}	1,58	0,84	2,92	1,07
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ϵ	0,14	0,09	0,38	0,08
(n)	(5)	(5)	(4)	(5)
p	<0,001		<0,001	

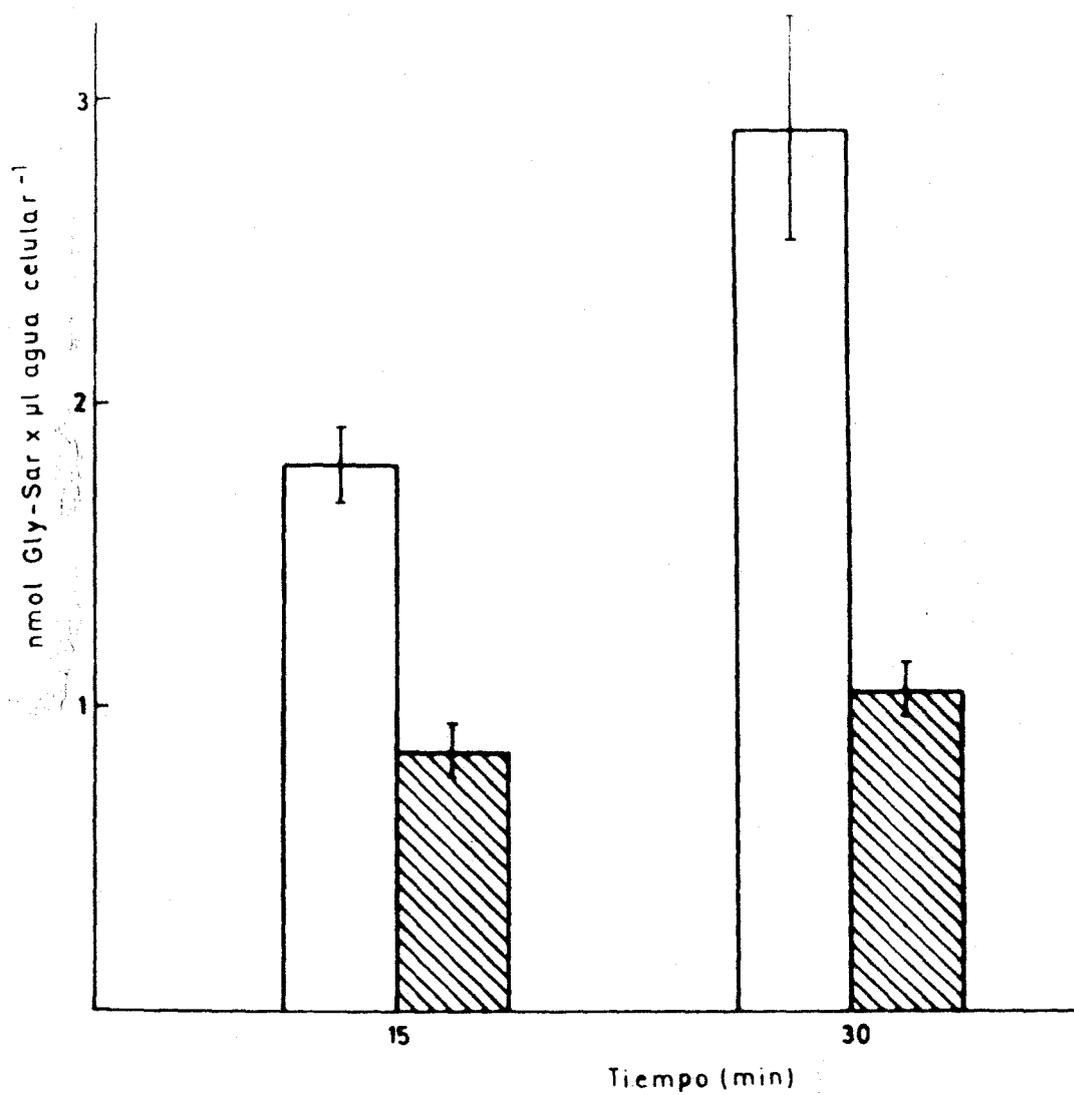


Figura 12. EFECTO DE LA 0,1mM OUABAINA  SOBRE LA ACUMULACION DE 1mM GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO.

III. 7. EFFECTO DEL pH.

A lo largo de la introducción del presente trabajo se ha mencionado como ciertos autores (GANAPATHY, V., et al., 1984 y 1985), postulaban que era el gradiente transmembrana de protones el que proporcionaba la energía para el transporte de dipéptidos y que la dependencia del gradiente de sodio sería un efecto indirecto.

Por este motivo se hicieron una serie de experimentos en los que se estudió el efecto del pH del medio de incubación, sobre el transporte de Gly-Sar en enterocitos. Se han ensayado tres pH: 7,4, 6 y 5.

Los valores obtenidos muestran (ver Tablas XI y XIII y Figura 13) que a pH=6, la acumulación de 1mM Gly-Sar no se modifica significativamente respecto a la observada a pH=7,4. A incubaciones cortas (1 minuto) la disminución del pH duplicó la entrada de Gly-Sar.

Sin embargo, a pH=5 (ver Tablas XII y XIII y Figura 14) hay una fuerte inhibición del transporte, en contra de lo que cabía esperarse si el gradiente de protones fuera el responsable de la acumulación intracelular del dipéptido.

TABLA XI.

TRANSPORTE DE 1mM GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO A pH= 7,4 Y A pH= 6.

		nmol Gly-Sar . μl agua celular ⁻¹									
TIEMPO: (min)	1		10		20		30		40		
pH:	7,4	6	7,4	6	7,4	6	7,4	6	7,4	6	
	0,14	0,03	1,20	1,19	1,96	1,64	2,83	2,02	3,18	3,15	
	0,32	-	1,28	1,20	1,67	1,65	2,37	1,92	3,01	2,48	
	0,36	0,82	1,65	1,91	2,36	3,30	3,31	3,32	3,49	3,37	
	0,16	0,50	1,98	2,03	2,66	2,49	2,95	2,62	3,25	3,30	
	0,20	0,68	1,62	1,79	1,76	1,73	2,73	3,40	3,10	3,68	
	0,14	0,80	1,18	1,38	2,86	2,86	2,86	2,78	3,26	3,64	
	-	-	1,96	1,27	2,08	2,35	2,35	3,31	3,24	3,63	
\bar{X}	0,22	0,56*	1,55	1,54 ^{N.S.}	2,19	2,28 ^{N.S.}	2,77	2,77 ^{N.S.}	3,21	3,32 ^{N.S.}	
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	
ϵ	0,04	0,16	0,14	0,15	0,14	0,26	0,13	0,25	0,07	0,17	
(n)	(6)	(5)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	

* p < 0,05

N.S.: no significativo. Comparación entre los valores obtenidos a pH= 7,4 y a pH= 6.

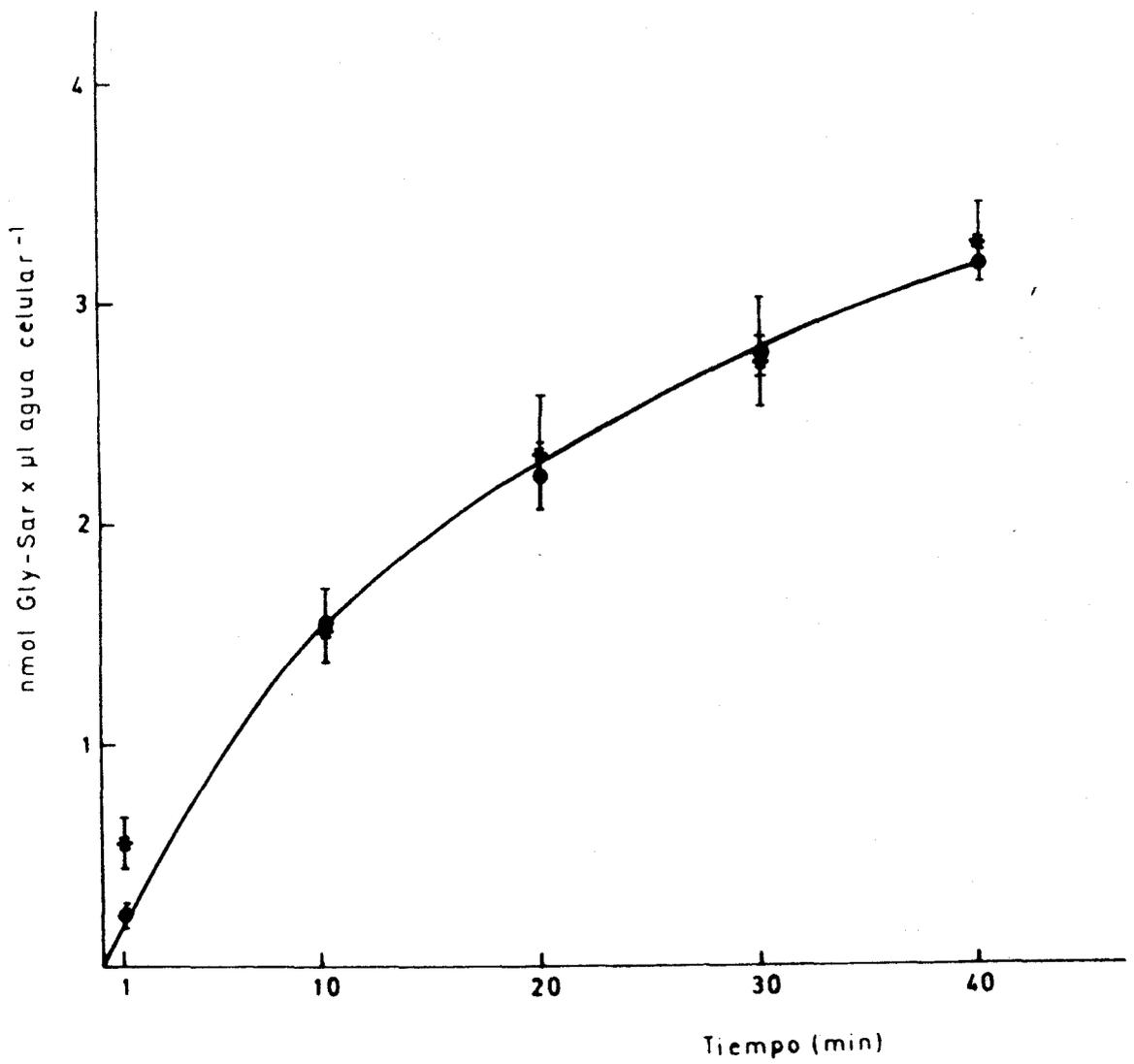


Figura 13. TRANSPORTE DE 1mM GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO A pH=7,4 (●) Y A pH=6 (*).

TABLA XII.

TRANSPORTE DE 1mM GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO A pH= 7,4 Y A pH= 5.

TIEMPO (min)	nmol Gly-Sar . μ l agua celular ⁻¹					
	20		30		40	
	7,4	5	7,4	5	7,4	5
pH:	7,4	5	7,4	5	7,4	5
	2,12	0,59	2,72	0,71	3,53	0,98
	2,34	0,59	-	0,72	3,25	0,68
	1,95	0,26	2,79	0,54	3,61	0,98
	2,09	0,34	3,08	0,58	3,60	0,68
	2,16	0,36	2,74	0,28	3,52	-
	2,12	0,30	2,89	-	3,55	1,09
	1,96	0,14	3,11	0,50	3,66	1,07
	2,37	0,15	3,33	0,44	3,42	0,40
X	2,14	0,34	2,95	0,54	3,52	0,83
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ϵ	0,06	0,06	0,09	0,06	0,05	0,10
(n)	(8)	(8)	(7)	(7)	(8)	(7)
p	<0,001		<0,001		<0,001	

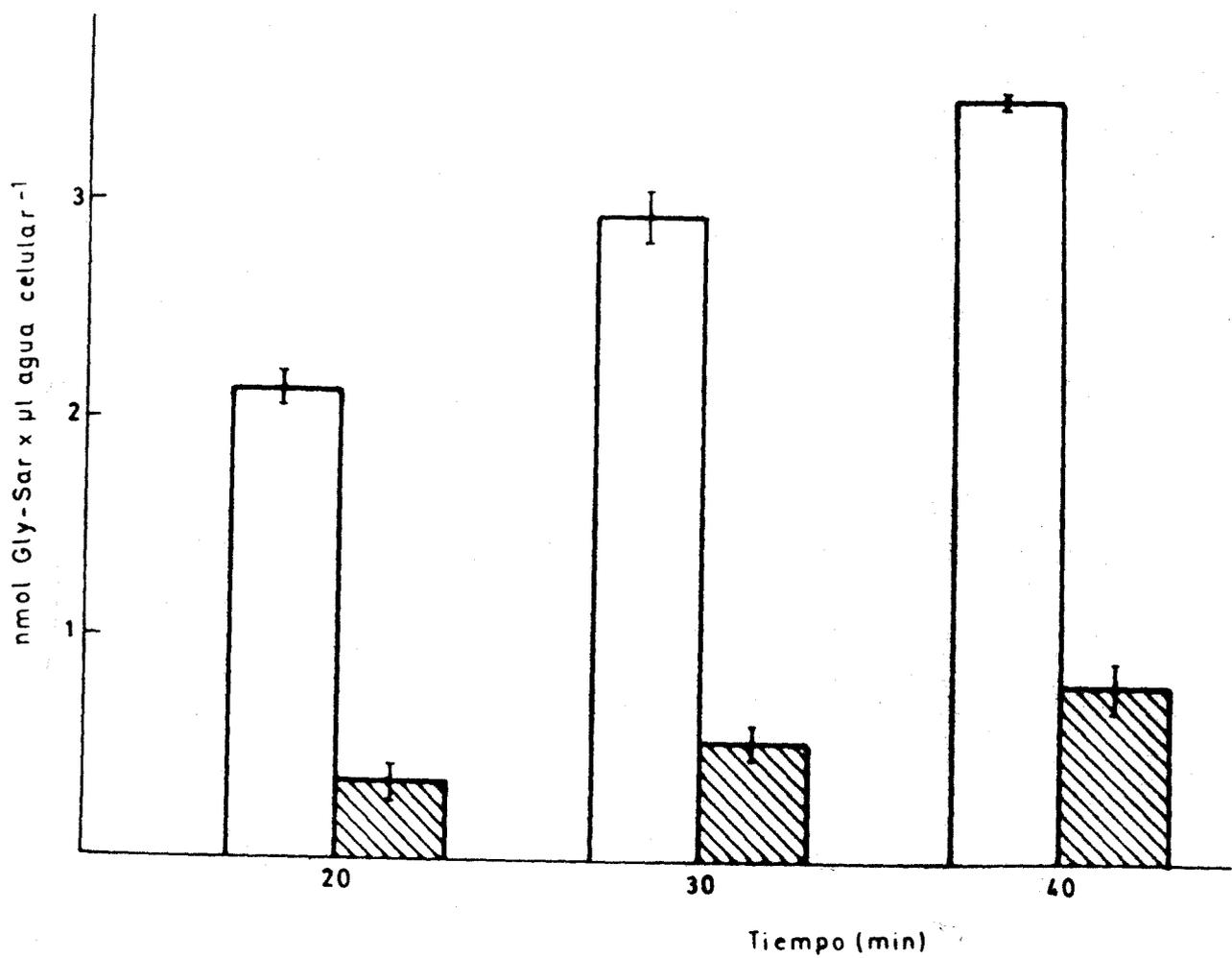


Figura 14. TRANSPORTE DE 1mM GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO A pH=7,4 Y A pH=5 .

TABLA XIII.

COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE ACUMULACION DE GLY-SAR, EN ENTEROCITOS AISLADOS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO, OBTENIDOS A pH= 5 Y A pH= 6 RESPECTO AL pH= 7,4.

TIEMPO (min)	nmol Gly-Sar . μ l agua celular ⁻¹				
	1	10	20	30	40
pH=7,4	0,22 \pm 0,04 (6)	1,55 \pm 0,14 (7)	2,16 \pm 0,10 (15)	2,86 \pm 0,10 (14)	3,36 \pm 0,06 (15)
pH=6	0,56 \pm 0,16 ^{**} (5)	1,54 \pm 0,15 ^{N.S.} (7)	2,28 \pm 0,26 ^{N.S.} (7)	2,77 \pm 0,25 ^{N.S.} (7)	3,32 \pm 0,17 ^{N.S.} (7)
pH=5	—	—	0,34 \pm 0,06 [*] (8)	0,54 \pm 0,06 [*] (7)	0,83 \pm 0,10 [*] (7)

* p < 0,001

** p < 0,005

N.S.: no significativo.

III. 8. CINETICA DEL TRANSPORTE DE GLICIL-SARCOSINA:
EFFECTO DE LA CARNOSINA.

La β alanil-histidina o carnosina, es otro dipéptido altamente resistente a la hidrólisis.

Se ha realizado un estudio para ver si la β alanil-histidina inhibía la acumulación de la Gly-Sar, y si esta inhibición era o no de tipo competitivo.

Se han utilizado dos concentraciones de sustrato: 0,1 y 1 mM y tres concentraciones distintas de inhibidor: 1, 5 y 10.

A partir de los resultados obtenidos (ver Tablas XIV y XV) y utilizando el método de Dixon (ver Figuras 15, 16 y 17) hemos comprobado que la inhibición es de tipo competitivo.

Este tipo de representenación gráfica también nos permite calcular la constante aparente de transporte: K_t y la velocidad máxima: $V_{m\acute{a}x}$ de la Gly-Sar. En la Tabla XVI se indican los valores de K_I , K_t y $V_{m\acute{a}x}$ obtenidos a los distintos tiempos de incubación.

TABLA XIV.

EFFECTO DE LA CARNOSINA SOBRE LA 1mM GLY-SAR EN CELULAS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO.

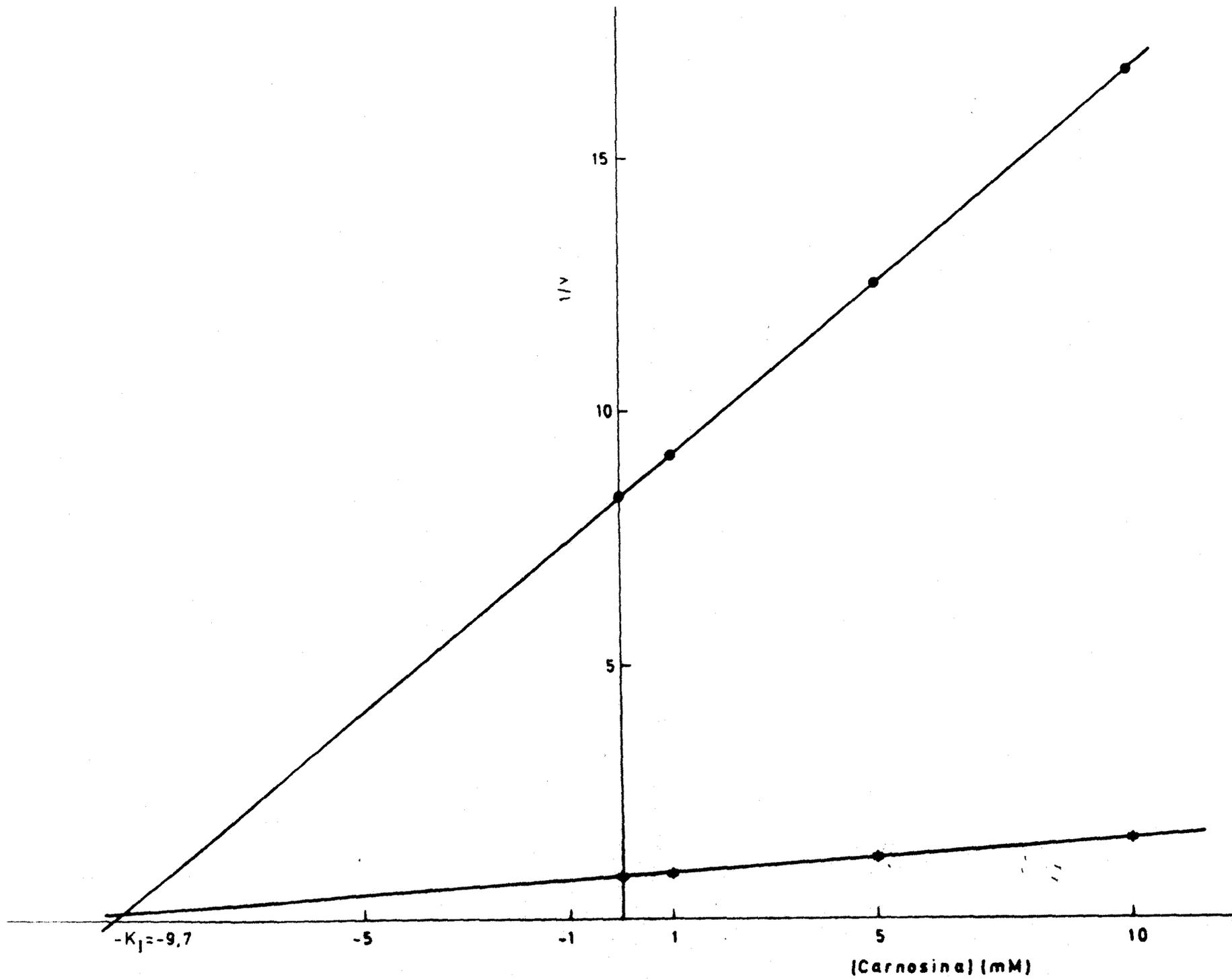
		nmol Gly-Sar . μ l agua celular ⁻¹											
TIEMPO: (min)		5				15				30			
CARNOSINA: 0 (mM)		1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10	
		1,09	1,00	0,84	0,60	2,15	1,96	1,59	1,11	3,04	2,40	1,22	0,95
		1,29	1,07	0,73	0,65	2,26	1,94	1,61	1,47	3,36	2,16	1,40	—
		1,22	1,12	1,09	0,54	2,20	1,96	1,45	1,14	2,83	2,47	1,72	1,52
		1,20	1,10	0,64	0,51	2,25	2,20	1,79	1,00	2,71	2,08	1,64	1,50
		1,30	1,22	0,98	0,86	2,38	1,94	1,85	1,53	3,29	2,92	1,66	1,39
		1,10	1,08	0,92	0,67	2,34	2,10	1,41	1,22	3,45	2,74	1,45	1,49
\bar{X}		1,20	1,10	0,86	0,65	2,26	2,02	1,62	1,25	3,11	2,46	1,52	1,37
\pm		\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ϵ		0,04	0,07	0,07	0,07	0,04	0,05	0,08	0,09	0,13	0,14	0,08	0,12
(n)		(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(5)

TABLA XV.

EFFECTO DE LA CARNOSINA SOBRE LA 0,1mM GLY-SAR EN CELULÁS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO.

nmol Gly-Sar . μ l agua celular -1												
TIEMPO : (min)	5				15				30			
CARNOSINA: 0 (mM)	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10	
	0,19	0,12	0,09	0,08	0,27	0,19	0,11	0,10	0,40	0,27	0,14	0,13
	0,13	0,12	0,08	0,05	0,19	0,15	0,13	0,10	0,26	0,24	0,16	0,15
	0,09	0,08	-	0,06	0,19	0,15	0,13	0,09	0,21	0,22	0,16	0,15
	0,10	0,10	0,11	0,07	0,22	0,18	0,13	0,10	0,26	0,21	0,17	0,07
	0,12	0,10	0,08	0,06	0,22	0,13	0,11	0,07	0,35	0,25	0,16	0,09
	0,10	0,11	0,07	0,06	0,22	0,17	0,12	0,10	0,30	0,26	0,18	0,14
\bar{X}	0,12	0,10	0,08	0,06	0,22	0,16	0,12	0,09	0,30	0,24	0,16	0,12
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ϵ	0,02	0,007	0,008	0,004	0,01	0,01	0,005	0,005	0,03	0,01	0,006	0,01
(n)	(6)	(6)	(5)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)

Figura 15. INHIBICION DEL TRANSPORTE DE GLY-SAR POR DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CARNOSINA. La velocidad del transporte de Gly-Sar se expresa en nmoles/ μ l agua celular/5 minutos. Los datos son representados según el método de Dixon ($1/v$ vs concentración de inhibidor). (●) 0,1mM Gly-Sar; (*)1mM Gly-Sar.



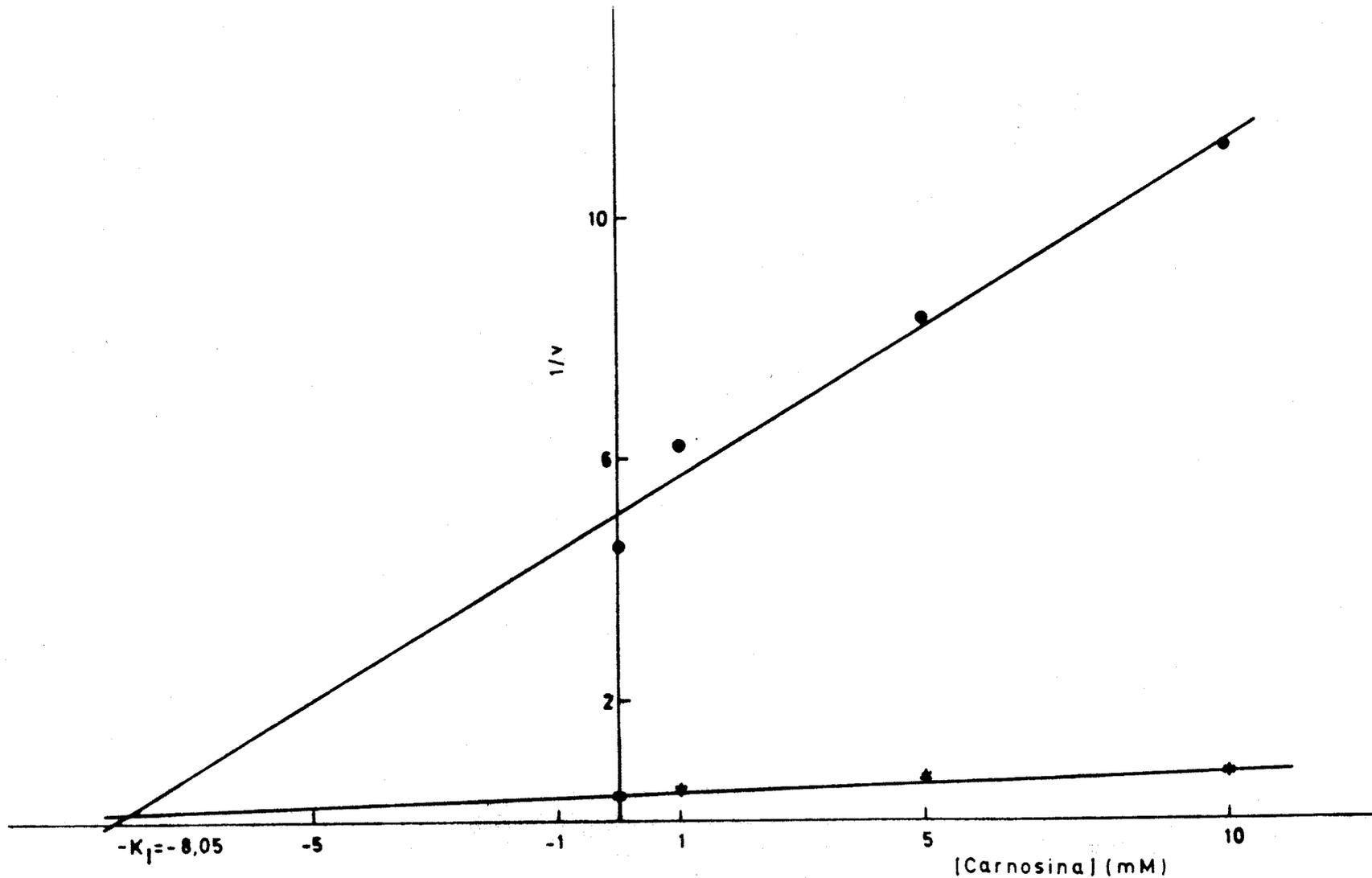


Figura 16. INHIBICION DEL TRANSPORTE DE GLY-SAR POR DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CARNOSINA. La velocidad del transporte de Gly-Sar se expresa en nmoles/ μ l agua celular/15 minutos. Los datos son representados según el método de Dixon ($1/v$ vs concentración de inhibidor). (●) 0,1mM Gly-Sar; (*) 1mM Gly-Sar.

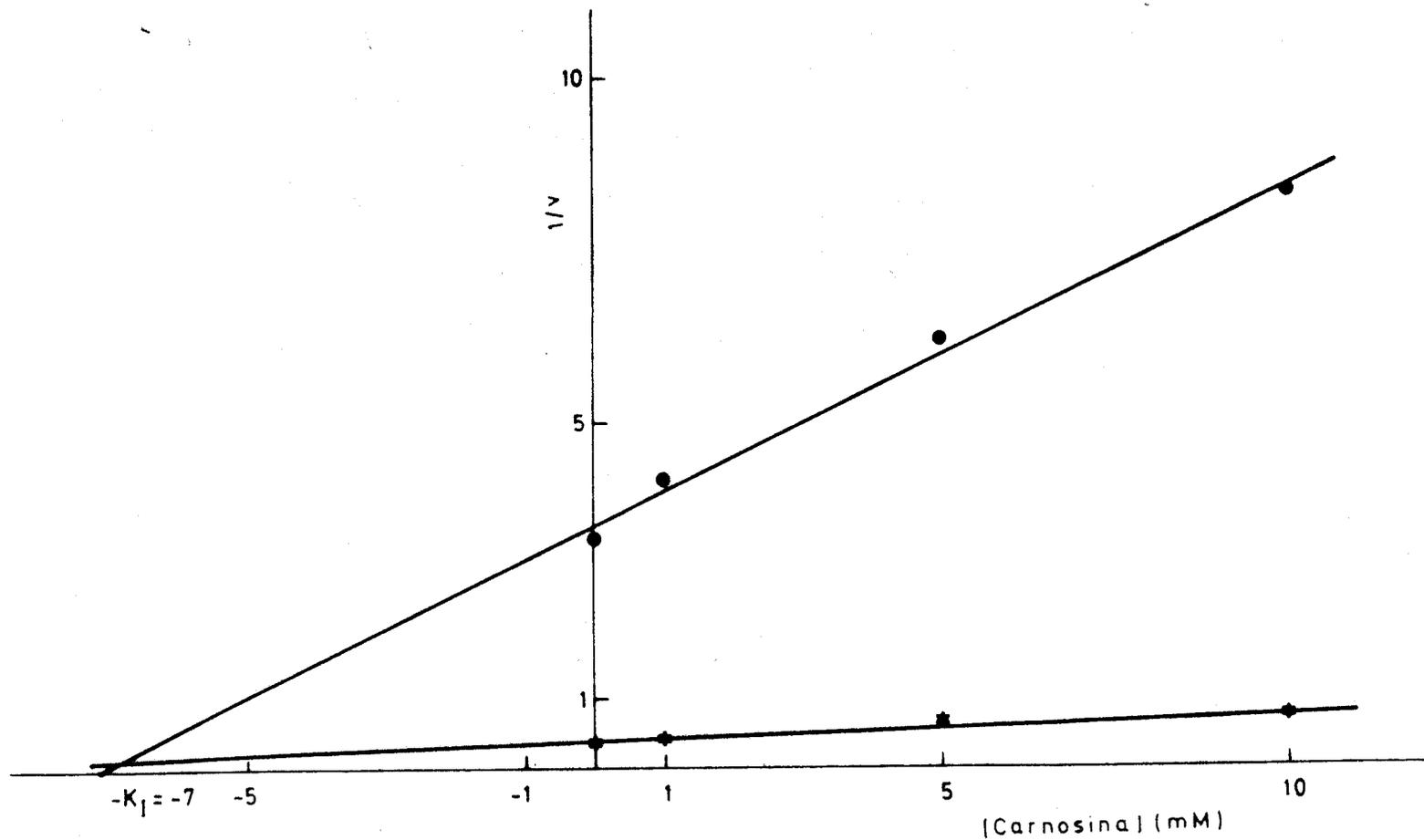


Figura 17. INHIBICION DEL TRANSPORTE DE GLY-SAR POR DISTITAS CONCENTRACIONES DE CARNOSINA. La velocidad del transporte de Gly-Sar se expresa en nmoles/ μ l agua celular/30 minutos. Los datos son representados según el método de Dixon ($1/v$ vs concentración de inhibidor). (●) 0,1mM Gly-Sar; (★) 1mM Gly-Sar.

TABLA XVI.

CINETICA DEL TRANSPORTE DE GLICIL-SARCOSINA

TIEMPO: (min)	5	15	30
K _I (CARNOSINA): (mM)	9,70	8,05	7,00
K _t : (mM)	4,85	3,00	3,00
V _{máx} : (nmol/μl proteína)	6,70	6,70	10,00

IV. DISCUSSION.

IV. DISCUSION

El movimiento de pequeños péptidos a través de la membrana del borde en cepillo del epitelio intestinal, ha sido investigado con una gran variedad de técnicas, y en diferentes especies. Esto ha llevado a una situación confusa acerca de la especificidad y características del transportador o transportadores implicados en el proceso (MATTHEWS, D.M. y PAYNE, J.W., 1980).

Diversos trabajos han puesto de manifiesto que el transporte de péptidos es activo y dependiente del sodio, siendo el gradiente de sodio el que suministra la energía necesaria para su acumulación intracelular, en consecuencia para su movimiento transepitelial.

Así, ADDISON, J.M., et al., (1972) demostraron que el transporte de Gly-Sar por yeyuno de hamster "in vitro" es activo, y dependiente del sodio. MATTHEWS; D.M., et al., (1974) llegaron a la misma conclusión utilizando β alanil-histidina (carnosina). HEADING, et al., (1978) observaron que la eliminación del sodio anulaba el transporte transmural de tirosil-glicina y tirosil-D-alanina a través del intestino delgado de rata "in vitro". RUBINO, et al., (1971) comprobaron que la sustitución del sodio por colina, disminuía la $V_{m\acute{a}x}$ del transporte de glicil-prolina en íleon de conejo "in vitro".

GANAPATHY; V. et al., (1980) observaron en intestino delgado de mono "in vitro", que el trans-

porte de glicil-leucina y glicil-prolina dependía solo parcialmente del sodio.

Por otro lado, experimentos "in vivo" realizados por CHEESEMAN, C.F. y PARSONS, D.S. (1974, 1976 y 1980)), perfundiendo el intestino delgado de rana, revelaron que el flujo de glicil-leucina desde la luz intestinal al lecho vascular, era poco afectado cuando se sustituía el sodio del medio de perfusión por potasio. Sin embargo, no se observó bajo ninguna de las condiciones experimentales empleadas "in vivo", que el dipéptido fuera acumulado intracelularmente, lo que hacía pensar que debía existir una relación entre estos dos hechos. Por otro lado, resulta difícil demostrar "in vivo", la dependencia del sodio de cualquier sistema de transporte, que por experimentación "in vitro" se sabe es totalmente dependiente del gradiente electroquímico transmembrana de sodio, dado que no es posible, bajo condiciones de experimentación "in vivo", eliminar totalmente el sodio del medio de perfusión. Esto se debe a que, por un lado, hay suficiente sodio atrapado en el glicocalix y capas de agua no agitadas a él adheridas, como para que el cotransporte de sodio-sustrato se mantenga, y por otro, siempre hay un suministro continuo de sodio al medio de perfusión, procedente del plasma sanguíneo.

En los últimos años, mediante el uso de vesículas de membrana del borde en cepillo intestinal de conejo, se ha visto que la entrada de péptidos al interior del espacio vesicular es independiente del so

úio, electrogénico y estimulado por un gradiente de protones (GANAPATHY, V. y LEIBACH, F.H., 1983, GANAPATHY et al., 1984 y 1985, RAJENDRAN; V.W. et al., (1984) Basándose en estos datos, GANAPATHY; V. et al., (1984) proponen un modelo para explicar, el transporte intestinal de péptidos, según el cual, los péptidos y los protones son cotransportados a través de la membrana del borde en cepillo intestinal. El gradiente de protones a través del borde en cepillo sería el que energizaría el transporte activo del péptido.

El gradiente de sodio estimularía el transporte de péptidos indirectamente, manteniendo el gradiente de protones, vía el sistema de intercambio sodio-protones (GANAPATHY; V. y LEIBACH, F.H., 1983, GANAPATHY; V., et al., 1984 y 1985)

Un hecho llamativo es que, las discrepancias observadas en relación con la naturaleza del gradiente iónico transmembrana responsable del transporte de dipéptidos, así como si dicho proceso es o no acumulativo, se correlacionan con el tipo de técnica empleada. Así, con tejido intacto se observa que algunos dipéptidos se acumulan y que su transporte al interior de las células es enteramente dependiente del gradiente electroquímico transmembrana de sodio. Con vesículas de membrana de borde en cepillo se observa, por el contrario, que los dipéptidos no se acumulan y que su entrada al espacio vesicular depende de un gradiente transmembrana de protones.

Por todo ello, nos pareció interesante estu-

diar el transporte de dipéptidos utilizando como preparación células aisladas de intestino delgado. Para el estudio que nos interesaba realizar esta preparación tiene la ventaja, sobre la de vesículas, de ser mucho más fisiológica y sobre intestino intacto de eliminar toda una serie de capas tisulares, no epiteliales, que pueden enmascarar o dar lugar a errores en la interpretación de los resultados.

Se ha utilizado el pollo, como animal de experimentación, porque la técnica de aislamiento de células epiteliales, de su intestino delgado, está bastante perfeccionada. Además son tantos los estudios realizados sobre el transporte de sustratos en dichas células, que permiten una fácil comprobación de que la técnica se está utilizando adecuadamente.

El trabajo se inició con la puesta a punto de la técnica de obtención de células epiteliales de intestino delgado de pollo. Como comprobación de la validez de la técnica, se estudió el transporte de D-galactosa en las células por nosotros obtenidas. Los resultados muestran (ver tabla II) que, la acumulación de galactosa, en el equilibrio, fue disminuida 10 veces por la florricina, y estimulada al triple por la teofilina. RANGLES, J. y KIMMICH, C.A. (1978), observan que la teofilina aproximadamente triplica (2,87 veces) la acumulación de galactosa por células aisladas de pollo y que la florricina la disminuye en 8 veces.

Este paralelismo entre nuestros resultados y los obtenidos por KIMMICH, nos demostraron que la

técnica era correctamente usada y, por tanto, podía ser empleada para el estudio del transporte de dipéptidos, en nuestro caso.

Basándonos en la bibliografía, también se hicieron una serie de mejoras a la técnica inicialmente descrita por KIMMICH, C.A.(1970a), con el único objeto de obtener el mayor rendimiento celular posible, de ahorrar tiempo de experimentación y de conseguir una mejor separación del pellet del medio de incubación a él adherido (ver apartado III.1 Resultados)

Uno de los problemas que plantea el estudio del transporte intestinal de dipéptidos es el de su hidrólisis por peptidasas intestinales, tanto de las localizadas en el borde en cepillo como de las citosólicas.

El grado de hidrólisis que sufren los dipéptidos debe ser tenido en cuenta a la hora de analizar los resultados, ya que en caso contrario, las conclusiones obtenidas serían totalmente erróneas; si un dipéptido es hidrolizado por hidrolasas del borde en cepillo, lo que entraría a las células sería no el dipéptido, sino los aminoácidos resultantes y la acumulación intracelular, en caso de observarse, sería debida a los aminoácidos y no al dipéptido per se. Por otro lado, si las peptidasas citosólicas fueran las que hidrolizaran el dipéptido, éste entraría intacto pero su acumulación intracelular sería también un artefacto, ya que su entrada sería siempre a favor de gradiente al irse transformando en aminoácidos a medida que entrara a las células.

Por todo ello, y con objeto de ver si las células del intestino delgado de pollo poseen sistemas de transporte para dipéptidos, resultaba imprescindible el emplear un dipéptido altamente resistente a la hidrólisis. Los datos existentes en la bibliografía muestran que la Gly-Sar, es un dipéptido no hidrolizable por la mucosa intestinal (PAYNE, J. W., 1972, ADDISON; J.M., 1972 y 1975a, MATTHEWS, D. M., 1975). Sin embargo, se ha aislado de mucosa intestinal de cerdo (SJOSTROM, H. y NOREN, O. 1974) y mono (BAKSI, H. y RADHASKRISHMAN, A.N., 1974) una dipeptidasa de prolina que presenta una ligera actividad sobre los dipéptidos que poseen sarcosina (X-Sar)

El estudio por nosotros realizado sobre la hidrólisis de Gly-Sar, revela que éste dipéptido o bien no se hidroliza en intestino delgado de pollo o lo hace muy ligeramente. Por un lado, el que la L-metionina (ver tabla VII) no modificara significativamente la acumulación celular de Gly-Sar, indica que el dipéptido no se hidroliza, al menos extracelularmente, es decir a nivel del borde en cepillo, lo que sugiere que el dipéptido atraviesa la membrana celular intacto. Por otro lado, los estudios cromatográficos revelaron que la Gly-Sar permanecía como tal en un alto porcentaje en el pellet celular tras largos periodos de incubación (30 minutos), lo que demuestra que tampoco se hidroliza intracelularmente de forma apreciable. En consecuencia se puede afirmar que los datos obtenidos en el presente trabajo reflejan el comportamiento del dipéptido intacto.

Los resultados obtenidos muestran que la Gly-

Sar se acumula intracelularmente, en contra de un gradiente de concentración. Así, ya a los 5 minutos de incubación, la relación concentración intracelular: concentración extracelular del dipéptido fue mayor que 1, y en el estado de equilibrio estacionario la Gly-Sar alcanzó una concentración celular de $3,22 \pm 0,08$ nmol/ μ l agua celular, frente al 1mM inicialmente presente en el medio de incubación.

Esto nos indica que el dipéptido es transportado activamente al interior de las células. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en intestino intacto (ADDISON, J.M., et al., 1972; HEADING, et al., 1978; MATTHEWS, D.M., et al., 1974), pero no con los observados en vesículas de membrana de borde en cepillo de conejo, en donde nunca se ha demostrado que la concentración intravesicular del dipéptido fuera mayor que la de equilibrio (GANAPATHY, V. y LEIBACH, F.H., 1983; GANAPATHY, V. et al., 1984 y 1985).

Al sustituir el sodio del medio de incubación, por una concentración isoosmótica de manitol, la entrada del dipéptido a las células fue marcadamente reducida, tanto en su velocidad inicial (entrada observada tras 1 minuto de incubación), como a tiempos largos. Esta dependencia de sodio del transporte de Gly-Sar, en enterocitos aislados de intestino delgado de pollo, volvió a corroborarse al añadir al medio de incubación ouabaína, inhibidor de la ATPasa-Na-K (VAN OS, C.H., et al., 1984) o monensina, ionóforo del Na^+ (GHIJSEN, W., et al., 1984). Ambas sustancias actúan disipando el gradiente transmembrana

del Na^+ y en consecuencia, anulan todos aquellos procesos de transporte acoplados al gradiente electroquímico del sodio.

Es interesante la observación de que la sustitución isoosmótica de sodio por manitol, aunque disminuyó significativamente la acumulación de Gly-Sar, en el estado estacionario no la anuló (ver Tabla VIII). Así bajo estas condiciones experimentales la concentración intracelular de Gly-Sar fue de $2,00 \pm 0,14$ nmol/ μl agua celular que es mayor que 1mM (concentración extracelular del dipéptido), Estos resultados podrían sugerir que el transporte del dipéptido fuera parcialmente independiente del sodio. Sin embargo, los datos obtenidos mediante el empleo de ouabaína o monensina descartan esta posibilidad, ya que la presencia de dichas sustancias bloqueó la acumulación celular en contra de gradiente de Gly-Sar.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por MATTHEWS, D.M. et al.(1974) para la carnosina, por ADDISON, J.M. et al.(1972 y 1975a) para la Gly-Sar, en intestino intacto de hamster, y por HEADING, C.E. et al. (1978) en intestino delgado de rata, para la tirosil-D-alanina y para la tirosil-glicina. Por otro lado, CHEESEMAN, C.I. y DEVLIN, D. (1985) han observado que la glicil-glicina, bajo condiciones experimentales en las que el dipéptido no es hidrolizado, estimula el transporte de Na^+ en células aisladas de intestino delgado de rata, apoyando la hipótesis de la presencia de un cotransporte Na^+ -dipéptido.

Los resultados hasta el momento discutidos revelan que la Gly-Sar se transporta activamente en células aisladas de intestino delgado de pollo, y sugieren que dicho transporte está acoplado al gradiente electroquímico transmembrana del sodio. Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, dicha dependencia no se ha demostrado en vesículas de membrana de borde en cepillo. Por el contrario, la entrada del dipéptido al espacio intravesicular parece ser estimulada por un gradiente de protones (GANAPATHY, V. et al., 1984 y 1985).

De hecho GANAPATHY observa que la sustitución del sodio del medio de incubación reduce en un 25% la entrada de Gly-Sar a vesículas de membrana de borde en cepillo de intestino delgado de conejo.

A priori resulta difícil realizar un estudio del efecto del gradiente de protones en células epiteliales de intestino delgado, porque hay pocos datos sobre el pH intracelular de dichas células y ninguno referente al pH intracelular de enterocitos de pollo. WAGNER, J.D. et al. (1985), estimaron que el pH intracelular de mucosa colónica de rata es 6,85.

La Tabla XII muestra que la disminución del pH extracelular, hasta valores de 5, redujo drásticamente la entrada de Gly-Sar a las células, tanto a tiempos cortos, como a largos periodos de incubación. Por otro lado, la incubación de las células en un medio de pH=6 no modificó significativamente el transporte del dipéptido, respecto al observado a pH=7,4, a tiempos largos; si bien se observó una estimulación a tiempos cortos de incubación (ver Tabla XI).

La inhibición provocada por un pH extracelular de 5, podría ser explicada a partir de las propiedades eléctricas de la Gly-Sar. Este dipéptido tiene dos grupos ionizables: un grupo carboxilo con un $pK_a=2,83$ y un grupo amino con un $pK_a=8,45$, siendo su $pH_{isoelectrico}=5,68$ (EDSALL, J.T., 1943). Según Mc LAUGHLIN, S.(1977) a $pH=7,2$ la Gly-Sar lleva una carga neta negativa, mientras que a $pH=5$, lleva una carga neta positiva. Se ha demostrado que la acidificación del medio extracelular, disminuye la afinidad de algunos dipéptidos por su sistema de transporte (FOGEL, M.R. y ADIBI, S.A., 1974). Por el contrario el que a $pH=7,4$ presente una carga neta negativa podría favorecer el cotransporte con Na^+ , tal como ocurre con el cotransporte de aminoácidos (STEVENS, B.R. et al., 1984).

Estudios preliminares, por nosotros realizados, con FCCP (carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona), ionóforo de protones, revelan que la presencia de dicha sustancia no altera el transporte de Gly-Sar en enterocitos aislados de intestino delgado de pollo.

Estos resultados demuestran que un gradiente de protones no parece ser el responsable de la acumulación celular del dipéptido en enterocitos de pollo, y se oponen a los obtenidos en vesículas de borde en cepillo de conejo. Estas diferencias son difíciles de explicar. Un hecho a tener en cuenta es que en vesículas de borde en cepillo nunca se ha observado acumulación de dipéptidos. Es posible, que el gradiente de protones favorezca la velocidad inicial de

entrada del dipéptido (posiblemente vía un sistema de transporte por difusión facilitada), pero no sea suficiente como para transportar al dipéptido en contra de gradiente de concentración y, por tanto, el mantener su transporte acumulativo. Quizás ésta sea la explicación de por qué a pH=6, también nosotros observamos una estimulación en la velocidad inicial de entrada del dipéptido.

En conclusión, los resultados por nosotros obtenidos hasta el momento favorecen la hipótesis de que el transporte acumulativo de Gly-Sar es dependiente del transporte activo primario del sodio.

Indudablemente, se necesitan realizar experimentos adicionales, estudiando, principalmente, el efecto del gradiente de sodio y protones a tiempos menores que 1 minuto, tanto en células normales, como carentes de ATP, para dilucidar el papel de uno y otro catión en dicho proceso. Las células carentes de ATP se comportan como vesículas, que permiten establecer con mayor fiabilidad gradientes iónicos transmembrana, y además presentan la ventaja, sobre las vesículas, de que la membrana plasmática no ha sido alterada.

Por último se realizó un estudio cinético del transporte de Gly-Sar (Figuras 15 a 17) que ha permitido el cálculo de sus constantes aparentes de transporte: afinidad por el transportador (K_t) y velocidad máxima de transporte ($V_{máx}$) (ver Tabla XVI). Los valores de K_t obtenidos (3-4,85mM) son muy próximos a los observados por GANAPATHY, V. et al. (1985) en ve

sículas de membrana de borde en cepillo de conejo (3,7 mM) e inferiores a los observados por MATTHEWS, D.M. et al. (1983) en intestino intacto de hamster (6-8 mM). La mayor afinidad observada en enterocitos aislados y vesículas de membrana de borde en cepillo, respecto a la obtenida en intestino intacto, se debe a que en este tipo de preparación las capas de agua no agitada tienen mucha mayor importancia, por lo que la concentración real de sustrato a nivel del borde en cepillo, lugar donde se localiza el transportador, es menor que en el medio de incubación o fase agitada.

Las Figuras también muestran que la carnosina se comporta como un inhibidor competitivo del transporte de Gly-Sar, con una K_i que oscila entre 7 y 9,7 mM. Estos resultados están de acuerdo con los de GANAPATHY, V. et al. (1984).

El estudio cinético corrobora la hipótesis de que los enterocitos aislados de pollo poseen un sistema de transporte para la Gly-Sar, que además, puede ser utilizado por otros dipéptidos, como por ejemplo, la carnosina.

V. CONCLUSIONES.

V. CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto la técnica de aislamiento de células epiteliales aisladas de intestino delgado de pollo, sobre la que se han introducido mejoras que permiten reducir el tiempo de duración de cada experimento.
2. Mediante el empleo de técnicas cromatográficas y de L-Metionina, se ha visto que la Glicil-Sarcosina no es, de forma apreciable, hidrolizada ni extracelularmente, ni intracelularmente por enterocitos de intestino delgado de pollo.
3. La Glicil-Sarcosina se acumula intracelularmente en contra de un gradiente de concentración; alcanzándose, en el estado estacionario, una concentración del dipéptido, tres veces mayor que la del medio extracelular, lo que indica que los enterocitos de intestino delgado de pollo poseen un sistema de transporte activo para la Glicil-Sarcosina.
4. La ausencia de sodio del medio de incubación disminuyó significativamente la velocidad de entrada a las células de Glicil-Sarcosina, así como su grado de acumulación intracelular en el estado de equilibrio.
5. En presencia de ouabaína y monensina la relación concentración intracelular: concentración extracelular de Glicil-Sarcosina no fue mayor que 1, lo

que indica, que ambas sustancias anulan el transporte activo de Glicil-Sarcosina.

6. La acidificación del medio de incubación (pH=5) bloqueó el sistema de transporte acumulativo de Glicil-Sarcosina.
7. El transporte acumulativo de Glicil-Sarcosina en enterocitos aislados de intestino delgado de pollo, parece depender de un gradiente transmembrana de sodio y no de un gradiente transmembrana de protones.
8. El estudio cinético del transporte de Glicil-Sarcosina en enterocitos de intestino delgado de pollo, revela que la constante aparente de transporte, K_t , es del orden de 3-4,85 mM y la velocidad máxima de transporte, $V_{máx}$, es del orden de 6,70 - 10 nmol/ μ l agua celular.
9. La β alanil-histidina (carnosina) inhibió competitivamente el transporte de Glicil-Sarcosina, obteniéndose una K_I que oscila entre 7-9,7 mM.

VI. BIBLIOGRAFIA.

ADDISON, J.M., BURSTON, D. y MATTHEWS, D.M. (1972). Evidence for active transport of the dipeptide glycylsarcosine by hamster jejunum in vitro. Clin. Sci. 43, 907-911.

ADDISON, J.M., MATTHEWS, D.M. y BURSTON, D. (1974). Competition between carnosine and other peptides for transport by hamster jejunum in vitro. Clin. Sci. Mol. Med. 46, 704-714.

ADDISON, J.M., BURSTON, D., PAYNE, J.W., WILKINSON, S. y MATTHEWS, D.M. (1975a). Evidence for active transport of tripeptides by hamster jejunum in vitro. Clin. Sci. Mol. Med. 49, 305-312.

ADDISON, J.M., BURSTON, D., DALRYMPLE, J.A., MATTHEWS, D.M., PAYNE, J.W., SLEISENGER, M.H. y WILKINSON, S. (1975b). A common mechanism for transport of di- and tripeptides by hamster jejunum in vitro. Clin. Sci. Mol. Med. 49, 313-122.

ADIBI, S.A. y PHILLIPS, E. (1968). Evidence for greater absorption of amino acid from peptide than from free form by human intestine. Clin. Res. 16, 446.

ADIBI, S.A. (1971). Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. J.Clin. Invest. 50, 2266-2275.

ADIBI, S.A. y MERCER, D.W. (1973). Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. J. Clin. Invest. 52, 1586-1594.

ADIBI, S.A. y SOLEIMANPOUR, M.R. (1974). Functional characterization of dipeptide transport system in human jejunum. J.Clin. Invest. 53, 1368-1374.

ADIBI, S.A. (1976). Intestinal phase of protein assimilation in man. Am. J. Clin. Nutr. 29, 205-215.

AGAR, W.T., HIRD, F.J.R. y SIDHU, G.S. (1953). The active absorption of amino acids by the intestine. J. Physiol. 121, 255-263.

ALVARADO, F. (1967). Hypothesis for the interaction of phloridzin and phloretin with membrane carrier for sugar. Biochim. Biophys. Acta. 135, 483-495.

ALVARADO, F. y LHERMINIER, M. (1982). Phenylalanine transport in guinea pig jejunum. A general mechanism for organic solute and sodium cotransport. J. Physiol (Paris). 78, 131-145.

AMAYA, F.J., LEE, T.C. y CHICHESTER, C.O. (1976). The intestinal absorption of fructosylglycine-L - Leucine. Nutr. Rep. Int. 14, 229-235.

ARONSON, P.S. (1981). Identifying secondary active solute transport in epithelia. Am. J. Physiol. 240, F1-F11.

ASATOOR, A.M., CHENG, B., EDWARDS, K.D.G., LANT, A.F., MATTHEWS, D.M., MILNE, M.C., NAVAB, F. y RICHARDS, A. J. (1970). Intestinal absorption of two dipeptides in Hartnup disease. Gut. 11. 380-389

ASATOOR, A.M., CROUCHMAN, M.R., HARRISON, A. R. ,
LIGHT, F.W., LOUGHRIDGE, L.W., MILNE, M.D. y
RICHARDS, A.J. (1971). Intestinal absorption of
oligopeptides in cystinuria. Clin. Sci. 41, 23-33.

ASATOOR, A.M., CHADHE, A., MILNE, M.D. y PROSSER,
D.J. (1973). Intestinal absorption of stereoisomers
of dipeptides in the rat. Clin. Sci. Mol. Med. 45,
199-212.

BAKSI, K. y RADHAKRISHNAM, A.N. (1974). Purification
and properties of prolidase (imidodipeptidase) from
monkey small intestine. Indian J. Biochem. Biophys.
11, 7-11.

BOSACKOVA, J. y CRANE, R.K. (1965). Studies on the
mechanism of intestinal absorption of sugars. VII.
Cation inhibition of active sugar transport and
 $^{22}\text{Na}^+$ influx into hamster small intestine in vitro.
Biochim. Biophys. Acta. 102, 423-435.

BOYD, C.A.R. y WARD, M.R. The influence of amino
acids and oligopeptides on the electrical properties
of cells in the small intestinal epithelium J.
Physiol. 310, 45-46P.

BOYD, C.A.R. y WARD, M.R. (1982). A micro—electrode
study of oligopeptide absorption by the small
intestinal epithelium of *Necturus maculosus*. J.
Physiol. 324, 411.

BROWN, P.D. y SEPULVEDA, F.V.(1985). A rabbit jejunal isolated enterocyte preparation suitable for transport studies. J. Physiol. 363, 257-270.

BURSTON, D., ADDISON, J.M. y MATTHEWS, D.M. (1972). Uptake of dipeptides containing basic and acidic amino acids by rat small intestine in vitro. Clin. Sci. 43, 823-837

BURSTON, D., GANDY, R.U., MATTHEWS, D.M., SCHEDL, H. P. y TAYLOR, E. (1978). Simple diffusion and mediated transport: their roles in influx into hamster jejunum of two amino acids and a dipeptide. Physiological Society. 15P.

BURSTON, D., WAPNIR, R.A., TAYLOR, E. y MATTHEWS, D. M. (1982). Uptake of L-valyl-L-valine and glycyl-sarcosine by hamster jejunum in vitro. Clinical Science. 62, 617-626.

CARTER - SU, C. y 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. y KIMMICH, G.A., (1980). Effect of the membrane potential on Na^+ dependent sugar transport by ATP - depleted intestinal cells. Am. J. Physiol. 238, C-37 - C-80.

CHEESEMAN, C.I. y SMYTH, D.H.(1973). Specific transfer process for intestinal absorption of peptides. J. Physiol. (London). 229, 45P-46P.

CHEESEMAN, C.I. y PARSON, D.S. (1974). Intestinal absorption of peptides. Peptide uptake by small of "Rana pipiens". Biochim. Biophys. Acta. 373. 523-526.

CHEESEMAN, C.I. y PARSON, D.S. (1976). The role of some small peptides in the transfer of amino nitrogen across the wall of vascularly perfused intestine. J. Physiol. (London) 262, 459-476.

CHEESEMAN, C.I., (1977). The role of sodium in the intestinal transport of small peptide. J. of Physiol, 272, 630-648.

CHEESEMAN, C.I., (1980). The transport of dipeptides by small intestine. Can. J. Physiol. 58, 1326,1333.

CHEESEMAN, C.I. y DEVLIN, D. (1985). The effect of amino acids and dipeptides on sodium-ion transpot in rat enterocytes. Biochim. Biophys. Acta. 812, 767-773.

CHENG, H. y LEBLOND, C.P. (1974). Origin differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the Mouse small Intestine. I. Columnar cell. Am. J. Anat. 141, 461-480.

COOK, G.C. (1973). Independent jejunal mechanisms for glycine and glycyglycine transfer in man in vivo. Br. J. Nutri. 30. 13-19.

CRAMPTON, R.F., LIS, M.T y MATHEEWS, D.M. (1973). Sites of maximal absorption and hydrolis of two dipeptides by rat small intestine in vivo. Clin Sci. 44. 583-594.

CRANE, R.K. (1962). Hypothesis for the 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. (1968). Absorption of sugars. In: Handbook of Physiology. Sect.6: Alimentary canal Vol. III, P. 1323 Amer. Physiol. Soc., Washington.

DAS. M. y RADHASKRISHMAN. A.N. (1975) Studies on a wide-spectrum intestinal dipeptide uptake system in the monkey and in the human. Biochem. J. 146, 133-137.

EDSALL; J.T. (1943) In: Proteins, Amino Acides and Peptides (Colhig.E. J., and Edsall, J.T., eds.) pp 75-115, Reinhold, New York.

FAIRLOUGH, P.D., SILK, D.B.A., CLARK, M.L., MATTHEWS, D.M., MARRS, T.C., BURSTON, D. y CLEGG, K.M. (1977), Effect of glycylglycine on absorption from human jejunum of an amino acid mixture simulating casein and a partial enzymic hydrolysate of casein containing small peptides. Clin. Sci. Mol. Med. 53, 27,33.

FARQUHAR, M.G. y PALADE, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. J. Cell. Biol. 17, 375-412.

FOGEL, M.R. y ADIBI. S.A. (1974). Assessment of the role of brush-border peptide hidrolases in huminal disappearance of dipeptides in man. J. Lab.Clin.Med. 84, 327-333.

FORTIN-MAGANA, R., HURWITZ, R., HERBST, J. y KUTCHMER, N. (1970). Intestinal Enzymes: Indicators of proliferation in the jejunum. Science 167, 1627-1628.

GANAPATHY, V. y RADHAKRISNAN, A.N. (1980). Sodium-dependent inhibition of amino acid and dipeptide transport by harmaline in monkey small intestine. Biochemical Pharmacology, 29, 713-716.

GANAPATHY, V. y LEIBACH, F.H. (1983). Role of pH gradient and membrane potential in Dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. J. Biol. Chem. 258, 14189-14192.

GANAPATHY, V., BURCKHARDT, G. y LEIBACH, F.H. (1984) Characteristics of Glycyl-sarcosine Transport in Rabbit Intestinal Brush-Border Membrane Vesicles. J. Biol. Chem. 259, 8954-8959.

GANAPATHY, V., BURCKHARDT, G. y LEIBACH, F.H. (1985) Peptide transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles studied with a potential-sensitive dye. Biochim. Biophys. Acta. 816, 234-240.

GARDNER, M.L.G. (1975). Absorption of amino acids and peptides form a complex mixture in the isolate small intestine of the rat. J. Physiol. (London) 253, 233-256.

GHIJSEN, W., MURER, H. y VAN OS, G. (1984). Regulation of active Ca^{2+} Transport in Basolateral membranes of small intestinal epithelium. In: Epithelial Calcium and Phosphate Transport: Molecular and Cellular Aspects, 289-294.

HEADING, C.E., ROGERS, C.S. y WILKINSON, S. (1978). Absorption of two tyrosine containing dipeptides from the small intestine and rectum of the rat. J. Physiol. (London) 278, 21P-22P.

HELLIER, M. D., HOLDSWORTH; C. D., PERRET; D. y THIRUMALAI C. (1972). Intestinal dipeptide transport in normal and cystinuric subjects. Clin. Sci. 43, 659-668.

HIMUKAY, M., KANO-KAMEYAMA, A. y HOSHI, T. (1982). Mechanisms of inhibition of glycyglycine transport by glycy-L-Leucine and L-Leucine in guinea small intestine. Biochim. Biophys. Acta. 687, 170-178.

HOPFER, V., SIGRIST-NELSON, K. y MURER, H. (1975). Intestinal sugar transport: studies with isolated plasma membranes. Ann. Ny. Acad. Sci. 264, 414-427.

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. (1972). 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 (Heinz, E., ed.). Springer-Verlag, Berlin, p.116-129.

KIMMICH, G.A. y CARTER-SU, C. (1978). Phloretin-like action of bioflavonoids on sugar accumulation capability of isolated intestinal cells. Membrane Biochemistry, 1, 221-237.

KIMMICH, G.A. (1981). Intestinal absorption of sugars. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract., 41, 1035-1061.

KING, I.S., SEPULVEDA, T.V. y SMITH, M.V. (1981). Cellular distribution of neutral and basic amino acid transport systems in rabbit ileal mucosa. J. Physiol. (London) 355-368.

KINTER, N.B. y WILSON, T.H. (1965). Autoradiographic studies of sugar and amino acid absorption by everted sacs of hamster intestine. J. Cell. Biol., 25, 19-39.

LEONARD J.V., MARRS, T.C., ADDISON, J.M., BURSTON, D. CLEGG, K.M., LLOYD, J.K., MATTHEWS, D.M. y SEAKINS, J.W. (1976). Intestinal absorption of amino acids and peptides in Hartnup disease. Pediatr. Res. 10, 246-249.

LEONARDT, H. (1975) (Reimpresión 1977). Histología, citología y microanatomía humanas. Versión española de la 4ª edición alemana. Salvat Editores S.A. Mallorca, 41. Barcelona, p. 388-396.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

LLUCH, M. y PONZ, F. (1962) Influencia de la anoxia sobre la absorción activa de azúcares por el intestino. Rev. Esp. Fisiol. 18, 157-162.

MATTHEWS, D.M., CRAFT, I.L., GEDDES, D.M., WISE, I.J. y HYDE, C.W. (1968). Absorption of glycine and glycine peptides from the small intestine of the rat. Clin. Sci. 35, 415-424.

MATTHEWS, D.M., LIS, M.T., CHENG, B. y CRAMPTON, R.F. (1969) Observations on the intestinal absorption of some oligopeptides of methionine and glycine in the rat. Clin. Sci. 37, 751-764.

MATTHEWS, D.M., ADDISON, J.M. y BURSTON, D. (1974). Evidence for active transport of the dipeptide carnosine (β -alanyl-L-histidine) by hamster jejunum in vitro. Clin. Sci. Mol. Med. 46, 693-705.

MATTHEWS. D.M. (1975a) Intestinal absorption of peptides. Physiol. Rev. 55, 537-608.

MATTHEWS. D.M. (1975b) Absorption of peptides by mammalian intestine. In: Peptide Transport in Protein Nutrition (Edited by MATTHEWS. D.M. PAYNE, J.W.) 61-146.

MATTHEWS, D.M., GANDY, R.H., TAYLOR, E. y BURSTON, D. (1979). Influx of two dipeptides, glycyl-sarcosine and L-glutamyl-L-glutamic acid, into hamster jejunum in vitro. Clin. Sci. 56, 15-23.

MATTHEWS, D.M. y PAYNE, J.W. (1980). Transmembrane transport of small peptides. Current Topics in membranes and transport, 14, 331-408.

MATTHEWS, D.M. y BURSTON, D. (1983) Uptake of L-leu-L-leu and glycylsarcosine by hamster jejunum in vitro. Clinical Science, 65, 177-184.

MCLAUGHLIN, S. (1977). Electrostatic potentials at membrane solution interfaces. In: Current Topics in Membranes and Transport, pp. 71-144 (Ed. Bronner, F y Kleinzeller, A). Academic Press, New York.

MURER, H. y HOPFER, U. (1974). Demonstration of electrogenic Na^+ dependent D glucosa transport in intestinal brush border membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 484-488.

MURER, H., SIGRIST-NELSON, K. y HOPFER, V. (1975). On the mechanism of sugar and amino acid interaction in intestinal transport. J. Biol. Chim., 250, 2392-2396.

NAVAB F. y ASATOOR, A.M. (1970). Studies on intestinal absorption of amino acids and a dipeptide in a case of Hartnup disease. Gut. 11, 373-379.

NORDSTRÖM, C., DAHL GRIST, A. y JOSEFSSON, L. (1968). Quantitative determination of enzymes in different parts of the villi and crypts of the rat small intestine. Comparison of alkaline phosphatase, disaccharidases and dipeptidases. J. Histochem. Cytochem. 15, 713-721.

PAYNE, J.W. (1972). Effects of N-methyl peptide bonds on peptide utilization by *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 71, 259-265.

PERRI, A.D. (1966) Isolation of the epithelial cells of the rat small intestine. Can. J. Biochem. 44, 687-693

PERRY, T.L., HANSEN; S. y TISCHLER, B. (1967). Carnosinemia: a new metabolic disorder associated with neurologic disease and mental defect. N. Engl. J. Med. 277, 1219-1227.

PONZ, F. y LLUCH, M. (1955). Coupling of cell metabolism and active transport in glucose absorption by intestine. Rev. Esp. Fisiol. 11, 267-275.

POTASHNER, S.J. y JOHNSTONE, R. M. (1971). Cation gradients, ATP and amino acid accumulation in Ehrlich ascites tumor cells. Biochim. Biophys. Acta, 233, 91-103.

RAJENDRAN, V.M., BERTELOOT, A., ISHIKAWA, Y., KHAN, A. H. y RAMASWAMY, K. (1984). Transport of carnosine by mouse intestinal brush border membrane vesicles. Biochim. Biophys. Acta. 778, 443-448.

RANDLES, J. y KIMMICH, G.A. (1978). Effects of phloretin and theophylline on 3-*o*-methyl-glucose transport by intestinal epithelial cells. Am. J. Physiol. 234, C64-C72.

ROSENBERG, T. (1948). On accumulation and active transport in biological systems. I. Thermodynamic considerations. Acta. Chem. Scand. 2, 14-33.

RUBINO, A., FIELD, M. y SCHWACHMAN, H. (1971). Intestinal transport of amino acid residues of dipeptides. I. Influx of the glycine residue of glycyl-L-proline across mucosal border. J. Biol. Chem. 246, 3542-3548.

SCHWENK, M. HEGAZY, E. y LOPEZ DEL PINO, V. (1984). Uridine uptake by isolated intestinal epithelial cells of guinea pig. Biochim. Biophys. Acta, 805, 370-374.

SEPULVEDA, F.V. y SMITH, M. W. (1978). Discrimination between different entry mechanisms for neutral amino acids in rabbit ileal mucosa. J. Physiol. 282. 73-90.

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

SILK, D.B.A., PERRETT, D. y CLARK, M.L. (1975), Jejunal and ileal absorption of dibasic amino acids and an arginine-containing dipeptide in cystinuria. Gastroenterology, 68, 1426-1432.

SKOU, J.C. (1965). Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45, 596.-

SLEISENGER, M.H., PELLING, D., BURSTON, D., y MATTHEWS D.M. (1977). Amino acid concentrations in portal venous plasma during absorption from the small intestine of the guinea pig of an amino acid mixture simulating casein and a partial enzymic hidrolisate of casein. Clin. Sci. Med. 52, 259-267.

SJOSTRAND, F.S. (1963). The ultraestructure of the plasma membrane of columnar epithelium cells of the mouse intestine. J. Ultraestructura, Res. 3, 517.

SJOSTROM, H. y NOREN, O. (1974). Structural properties of pig intestinal proline dipeptidase. Biochim. Biophys, Acta. 359, 177-185.

SMYTH, D.H. (1969). The economy of the columnar epithelial cell. Gut. 10, 2

STEIN, W.D. (1967). The movement of molecules across cell membranes. Academic Press. New York. p.177.

STEVENS, B.S., KAUNITZ, J.D. y WRIGHT, E.M. (1984). Intestinal transport of amino acids and sugars: advances using membrane vesicles, Ann. Rev. Physiol. 46, 417-433.

TARLOW, M.J., SEAKINS, J.W.T., LLOYDS, J.K., MATTHEWS, D.M., CHENG, B. y THOMAS, A.J. (1972). Absorption of amino acids and peptides in a child with a variant of Hartnup disease and coexistent coeliac disease Arch. Dis. Child. 47, 798-803.

TAYLOR, E., BURSTON, D. y MATTHEWS, D.M. (1980). Influx of glycylsarcosine and L-lysyl-L-lysine into hamster jejunum in vitro. Clinical. Science, 53, 221-225.

THIER, J.S. (1968). En: Handbook of Physiology. Sect.6. Alimentary Cond. Vol. III p.1125 Amer. Physiol. Sec. Washington.

USSING, H.H. (1960). The alkali metal ions in Biology En: Handbuch der Experimentel en Pharmakologie, vol. 13, Springer-Verlog, Berlin.

VAN OS, C.H., VAN HEESWIJK, M.P.E. y GHIJSEN, W.E.J.M. (1984) Properties of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in epithelial plasma membranes from rat kidney cortex and rat duodenum. In: Epithelial calcium and phosphate transport: Molecular and cellular aspects, 95-100.

WAGNER, J.D., KURTIN, P. y CHARNEY, A.N. (1985). Effect of systematic acid-base disorders on colonic intracellular pH and ion transport. Amer. J. Physiol. 12, 639-647.

WEBSTER, U.L. y HARRISON, D. (1969). Enzymic activities during the transformation of crypt to columnar intestinal cells. Exp. Cell. Res. 56, 245-253

WIGGANS, D.S. y JOHNSTON; J.M. (1959) The absorption of peptides. Biochim. Biophys, Acta. 32, 69-73.

WISEMAN, G. (1974) Absorption of protein digestion products. In: Intestinal Absorption (D.H. Smyth, ed.) Biomembranes, Vol. 4A, p.363-481. Plenum, New York.