

R. 6517

DEPARTAMENTO  
DE  
FISIOLOGIA Y BIOLOGIA ANIMAL  
  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
BIBLIOTECA

**TRANSPORTE DE GLICIL-SARCOSINA POR CELULAS AISLADAS DEL  
EPITELIO INTESTINAL DE POLLO**

Memoria presentada para  
aspirar al grado de Doctor en  
Farmacia, por MARIA LUISA  
CALONGE CASTRILLO

M<sup>a</sup> Luisa Calonge

U<sup>o</sup> B<sup>o</sup>

Los Directores del Trabajo

J. Bolufer

Fdo.: J. Bolufer

R. Ilundáin

Fdo.: R. Ilundáin

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 31 número 39 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 14 NOV 1988

El Jefe del Negociado de Tesis.

*Luis Mª*



A Luis Mª

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en  
de la  
de esta Universidad desde el día  
hasta el día  
Sevilla de de 19  
EL DIRECTOR DE

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

Deseso expresar mi sincero agradecimiento:

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

A la Dra. Dña. Ana Ilundáin 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 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 todas aquellas personas que de alguna forma han contribuido a su elaboración.

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

## **I. INTRODUCCION**

<b>I. 1. ABSORCION INTESTINAL DE LOS PRODUCTOS DE LA DIGESTION PROTEICA.....</b>	<b>1</b>
I. 1. 1. Digestión proteica.....	1
I. 1. 2. Absorción intestinal de péptidos.....	4
<b>I. 2. PAPEL DE LOS GRADIENTES IONICOS EN EL TRANSPORTE DE NO-ELECTROLITOS.....</b>	<b>6</b>
I. 2. 1. Importancia del gradiente de sodio.....	7
I. 2. 2. Papel del gradiente de protones en el transporte de solutos.....	20
<b>I. 3. MECANISMOS DE TRANSPORTE EN LA ABSORCION DE PEPTIDOS.....</b>	<b>22</b>
I. 3. 1. Requerimientos iónicos en el transporte de péptidos.....	29
I. 3. 2. Papel del pH y del gradiente de protones en el transporte de péptidos.....	36
<b>I. 4. OBJETO DEL TRABAJO.....</b>	<b>40</b>

## **II. MATERIAL Y METODOS.**

<b>II. 1. ELECCION DE LA TECNICA.....</b>	<b>41</b>
<b>II. 2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....</b>	<b>42</b>
<b>II. 3. COMPOSICION DE LAS SOLUCIONES.....</b>	<b>43</b>
II. 3. 1. Medios de incubación.....	43
II. 3. 2. Medios de aislamiento.....	46

11. 3. 3.	Medios de preincubación.....	47
11. 4.	<b>MARCADORES.....</b>	<b>47</b>
11. 5.	<b>TECNICAS.....</b>	<b>48</b>
11. 5. 1.	Aislamiento de células epiteliales de intestino delgado de pollo.....	48
11. 5. 2.	Obtención de células deplecionadas de ATP...52	52
11. 5. 3.	Experimentos de captación.....	52
11. 5. 4.	Experimentos de salida.....	55
11. 5. 5.	Determinación del volumen extracelular.....	58
11. 5. 6.	Determinación del volumen intracelular.....	58
11. 6.	<b>CRONATOGRAFIA.....</b>	<b>59</b>
11. 7.	<b>DETERMINACION DE LA PROTEINA.....</b>	<b>60</b>
11. 8.	<b>MODO DE EXPRESAR LOS RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
11. 8. 1.	Cálculo del volumen extracelular.....	61
11. 8. 2.	Cálculo del volumen intracelular.....	62
11. 8. 3.	Calculo de la captación de sustrato.....	63
11. 8. 4.	Cálculo de la salida de Na <sup>22</sup> .....	64
11. 8. 5.	Determinación de la entrada de TPP <sup>+</sup> .....	66
11. 9.	<b>TATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>

**III. RESULTADOS.**

III. 1.	<b>VOLUMEN EXTRACELULAR.....</b>	<b>68</b>
III. 2.	<b>VOLUMEN INTRACELULAR.....</b>	<b>70</b>
III. 3.	<b>ENTRADA DE GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO EN FUNCION DEL TIEMPO</b>	

	<b>DE INCUBACION.....</b>	<b>71</b>
III. 4.	<b>ESTIMACION DE LA HIDROLISIS DE GLY-SAR.....</b>	<b>74</b>
	4. 1. Estudio cromatográfico.....	74
	4. 2. Efecto de la L-Metionina.....	76
III. 5.	<b>CINETICA DEL TRANSPORTE DE GLY-SAR.....</b>	<b>80</b>
III. 6.	<b>INHIBICION DE LA CAPTACION DE GLY-SAR POR LA CARNOSINA.....</b>	<b>84</b>
III. 7.	<b>EFFECTO DEL SODIO SOBRE LA CAPTACION DE GLY-SAR..</b>	<b>88</b>
	7. 1. Ausencia de sodio.....	89
	7. 2. Efecto de la ouabaína.....	93
III. 8.	<b>EFFECTO DEL pH EXTRACELULAR.....</b>	<b>96</b>
	8. 1. Entrada de Gly-Sar a distintos pH en el medio de incubación.....	96
	8. 2. Efecto del FCCP.....	99
III. 9.	<b>EFFECTO DEL AMILORIDE.....</b>	<b>111</b>
	9. 1. Efecto del amiloride con diferentes pH en el medio de incubación.....	111
	9. 2. Efecto del amiloride con diferentes gradientes de sodio.....	123
	9. 3. Efecto del amiloride sobre la entrada de 2-DOG.....	127
III. 10.	<b>EFFECTO DE LA NONENSINA.....</b>	<b>130</b>
III. 11.	<b>EFFECTO DE LA L-LEUCINA, 3-ONG Y GLICIL-SARCOSINA SOBRE LA SALIDA DE Na<sup>22</sup></b>	

	<b>DESDE ENTEROCITOS PREVIAMENTE CARGADOS CON Na<sup>22</sup>.....</b>	<b>137</b>
III. 12.	<b>ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE GLY-SAR EN CELULAS DEPLECIONADAS DE ATP.....</b>	<b>142</b>
III. 13.	<b>EFECTO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA INDUCIDO POR ANIONES SOBRE LA CAPTACION DE 3-ONG Y DE GLY-SAR.....</b>	<b>152</b>
II. 14.	<b>EFECTO DEL POTENCIAL DE DIFUSION DE K<sup>+</sup> SOBRE EL TRANSPORTE DE 3-ONG Y DE GLY-SAR.....</b>	<b>156</b>
III. 15.	<b>TRANSPORTE DE GLY-SAR POR CELULAS AISLADAS DE CIEGO Y RECTO DE POLLO.....</b>	<b>166</b>
IV.	<b>DISCUSION.....</b>	<b>177</b>
V.	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>199</b>
VI.	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>203</b>

## **I. INTRODUCCION**

## **1. 1. ABSORCION INTESTINAL DE LOS PRODUCTOS DE LA DIGESTION PROTEICA**

### **1. 1. 1. DIGESTION PROTEICA**

No hace mucho tiempo, se pensaba que las proteínas de la dieta debían ser degradadas hasta el estado de aminoácidos libres para poder ser absorbidas. Hoy es reconocido que algunos péptidos (tripéptidos, dipéptidos,...) son absorbidos por los enterocitos, e incluso, se ha podido comprobar que los aminoácidos en forma de péptidos son absorbidos más rápidamente que los aminoácidos libres (Adibi, 1971).

La digestión gástrica, a pH ácido, puede liberar aminoácidos y pequeños péptidos. Estos son un buen estímulo para la liberación de hormonas que estimulan la secreción de enzimas pancreáticas. Como resultado de la acción de las proteasas pancreáticas se liberan más aminoácidos simples y una serie de pequeños péptidos de dos a cuatro aminoácidos. Se ha encontrado que la mayoría de los

aminoácidos aparecen principalmente en forma de péptidos, si bien una minoría (Met, Tyr y Arg) predomina en forma de aminoácidos libres (Adibi y Mercer, 1973); debido a que la velocidad de liberación de los aminoácidos durante la proteólisis varía ampliamente. Así, en el yeyuno proximal del hombre, los péptidos constituyen un 60-70 % del N amino luminal, mientras que el porcentaje disminuye a un 50 % en el intestino distal (Nixon y Mawer, 1970a y 1970b).

Los últimos estadios de la digestión proteica tienen lugar principalmente por las peptidasas del borde en cepillo y del citoplasma. Aquellos oligopéptidos que no han sido degradados por los enzimas pancreáticos son hidrolizados casi completamente por los enzimas del borde en cepillo, entre los que se encuentran: enterokinasa, endopeptidasa 24.11, aminopeptidasas A y N, dipeptidil amino peptidasa IV, folato conjugasa,  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, glutation dipeptidasa, glicil-leucil peptidasa, aspartico-lisina peptidasa. En el caso de los tripéptidos, aproximadamente la mitad de la actividad hidrolítica se localiza en el citoplasma, y en el caso de los dipéptidos la mayoría. Los péptidos que contienen prolina no son hidrolizados por los

enzimas del borde en cepillo, pero parece ser que son degradados en el citoplasma (Alpers, 1986).

Así, algunos dipéptidos son absorbidos intactos y, presumiblemente, hidrolizados en la célula. Sin embargo, la cantidad de péptido intacto que escapa de la hidrólisis intracelular y alcanzan la sangre, no está clara.

Se ha observado que pequeños péptidos atraviesan el intestino llegando al plasma. El interés en este punto ha aumentado a causa de las importantes implicaciones farmacológicas de este hecho. Gardner (1982) perfundió intestino delgado de rata con preparados proteicos parcialmente digeridos. Los resultados por él obtenidos, indicaron que por encima del 30% del N amino que alcanzó el lado serosal del intestino durante la absorción estaba en forma peptídica. Posteriormente, Raghunath y Narasinga Rao (1987) perfundiendo yeyuno de rata "in vivo" con fracciones peptídicas obtenidas durante la digestión enzimática de tres proteínas animales y tres vegetales, han observado que entre el 15 y el 42 % del N amino, para las distintas proteínas estudiadas, fue absorbido a través del sistema de absorción de péptidos. Por otro lado, Webb (1986) ha determinado que de los aminoácidos presentes en el plasma portal más

del 70% estaban asociados en forma de péptidos, existiendo una relación entre dichos aminoácidos y las proteínas incluidas en la dieta. Si estos aminoácidos son de la dieta original su alta contribución tendría un significado nutricional muy importante.

### 1. 1. 2. ABSORCION INTESTINAL DE PEPTIDOS

Como ya hemos indicado, 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 glicil-glicina se transportaba intacta (Agar *et al.*, 1953; Wiggins y Johnston, 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 podían ser absorbidos más rápidamente cuando se encontraban en forma de péptidos que de aminoácidos libres (Adibi y Phillips, 1968; Matthews *et al.*, 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 péptidos intactos. Esto se ha podido demostrar utilizando péptidos muy resistentes a la hidrólisis, como la glicil-sarcosina (Gly-Sar), glicil-sarcosil-sarcosina (Gly-Sar-Sar) (Addison, 1972 y 1975b) o la  $\beta$ -alanil-histidina ( $\beta$ -Ala-His) (Addison, 1974). O bien saturando los sistemas del transporte mediado de aminoácidos y comprobando como, bajo estas condiciones, la captación de péptidos permanece inalterada (Adibi, 1971; Cook, 1973; Crampton *et al.*, 1973; Cheeseman y Parsons, 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 estaban formados exclusivamente por ellos

(Asatoor *et al.*, 1970 y 1971; Navab y Asatoor, 1970; Hellier *et al.*, 1972; Tarlow *et al.*, 1972; Silk *et al.*, 1975; Leonard *et al.*, 1976).

Por otro lado se ha comprobado (ver apartado 1.1 de Introducción) que después de una comida proteica el contenido luminal es una mezcla compleja de péptidos y aminoácidos libres (Matthews, 1975a y 1975b; Adibi, 1976) con predominio de los primeros (Adibi y Mercer, 1973). De forma que los péptidos son, cuantitativamente, un sustrato más importante que los aminoácidos para la absorción.

## 1. 2. PAPEL DE LOS GRADIENTES IONICOS EN EL TRANSPORTE DE NO-ELECTROLITOS.

Las únicas sustancias conocidas que se transportan activamente a través de la membrana celular, directamente acopladas a la hidrólisis de ATP (hablándose de transporte activo  $1^{10}$ ) son:  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ );  $\text{Ca}^{++}$  (Ca-ATPasa) y  $\text{H}^+$  (H-ATPasa). Sin embargo, las células son capaces de acumular otras sustancias, como azúcares y aminoácidos, en contra de su gradiente de concentración. Para realizar este transporte, las células utilizan la energía almacenada en el gradiente transmembrana de estos iones (por lo

que se conoce como transporte activo  $2^{10}$ ). El movimiento del ión a favor de su gradiente electroquímico, está acoplado obligatoriamente al movimiento de otra molécula que pasa la membrana en contra de su gradiente de concentración.

Cuando las dos moléculas, la que se transporta y el ión cotransportado, se mueven en la misma dirección se habla de cotransporte (*symport*). Cuando se mueven en direcciones opuestas se habla de intercambio (*antiport*).

### 1. 2. 1. IMPORTANCIA DEL GRADIENTE DE SODIO.

El sistema de transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se ha estudiado con mucho detalle. Ha sido solubilizado y purificado a partir de varios tipos de células, incluyendo el riñón de mamíferos y los órganos eléctricos de las anguilas. El enzima es probablemente un dímero, con cada subunidad constituida por dos cadenas polipeptídicas. En total, el proceso de transporte provoca la salida de tres iones  $\text{Na}^+$  y la entrada de dos iones  $\text{K}^+$ , por cada molécula de ATP hidrolizada.

Existen pruebas evidentes que indican que la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$  es el enzima responsable del movimiento acoplado de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , tanto por los resultados

obtenidos en presencia de ouabaina (glicósido cardiaco que inhibe específicamente este enzima) como por los obtenidos con enzimas purificados y reinsertados en liposomas, que pueden transportar  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  siempre que exista ATP.

En células intestinales, así como en otras células epiteliales, la bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  está localizada en la membrana basolateral. Esta bomba mantiene en estado estacionario la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , expulsando fuera de la célula los iones  $\text{Na}^+$  que entran desde el medio extracelular, normalmente con una concentración de  $\text{Na}^+$  mucho mayor. Los procesos de entrada de  $\text{Na}^+$  en los enterocitos, a favor de gradiente, se pueden dividir en tres tipos.

1. Electrodifusión
2. Transporte acoplado con iones
3. Cotransporte con no-electrolitos

#### 1) ENTRADA POR ELECTRODIFUSION DE SODIO.

Según este modelo se supone que el  $\text{Na}^+$  entra en los enterocitos por electrodifusión a favor de su gradiente de potencial electroquímico y sale a través de la membrana basolateral por acción de la bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ . Este flujo transepitelial de  $\text{Na}^+$

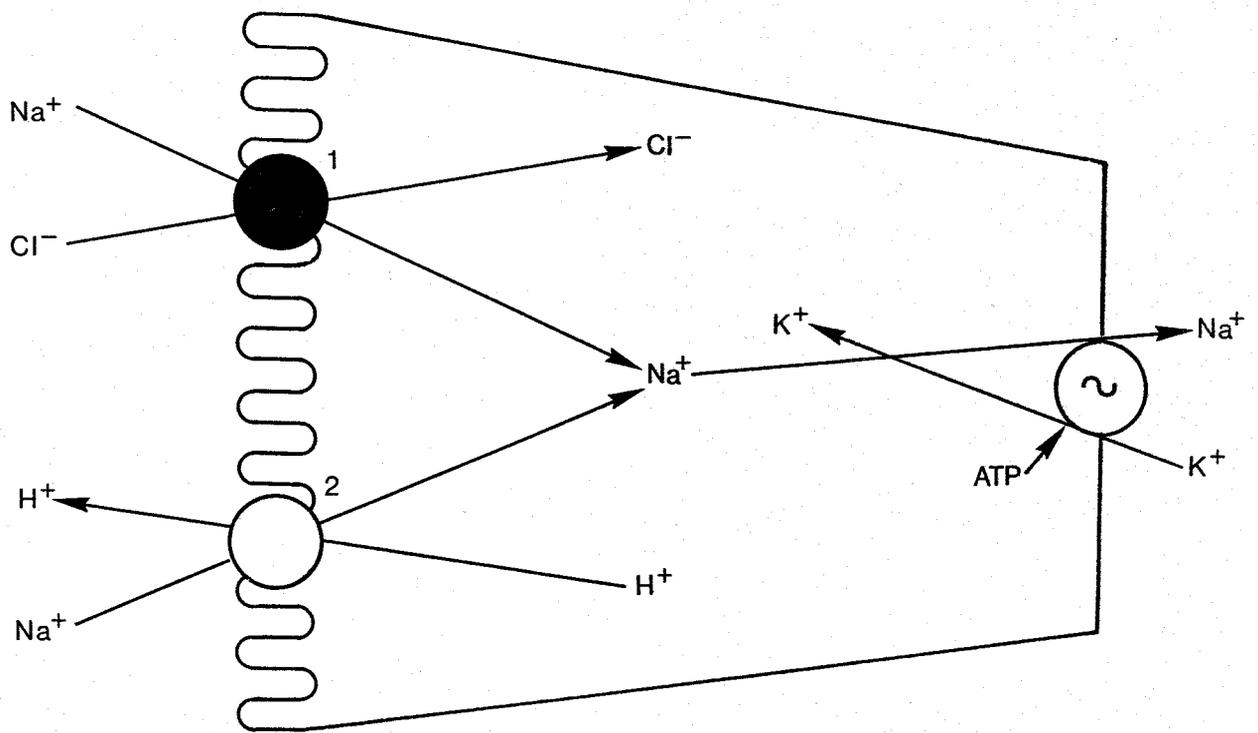
genera una diferencia de potencial transepitelial positiva en el lado serosal, la cual, es responsable del movimiento neto de  $\text{Cl}^-$  de mucosal a serosal (Schultz y Zalusky, 1964).

Este modelo no parece ser una explicación adecuada para la absorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  por el intestino delgado, ya que como veremos en el siguiente apartado, existe una total evidencia de que una gran fracción del  $\text{Na}^+$  y del  $\text{Cl}^-$  que entra en los enterocitos lo hace por un proceso en el cual el transporte transapical de  $\text{Na}^+$  está acoplado al de  $\text{Cl}^-$ . Sin embargo, parece tener alguna importancia en intestino grueso.

## 2) TRANSPORTE ACOPLADO CON IONES. (ver Fig. 1)

### a) Cotransporte con aniones.

La entrada acoplada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través de la membrana mucosal es una ruta importante en la absorción de estos iones por el intestino delgado. Esto se deduce por los estudios realizados sobre la entrada de  $\text{Cl}^-$  y la medida de las actividades intracelulares de  $\text{Cl}^-$  (Armstrong y



**Fig. 1. Transporte de  $\text{Na}^+$  acoplado con iones. 1) Ejemplo del sistema de cotransporte con aniones ( $\text{Cl}^-$ ). 2) Ejemplo del sistema de intercambio con cationes ( $\text{H}^+$ ).**

García-Díaz, 1984). Los resultados se han interpretado en términos de acoplamiento 1:1 de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , por vía de un transportador común, el cual requiere la presencia simultánea de ambos iones (Frizzell *et al.*, 1979).

Recientemente se ha demostrado en un gran número de células epiteliales y no epiteliales (Palfrey y Rao, 1983; Geck y Heinz, 1986; O'Grady *et al.*, 1987), incluyendo enterocitos de teleosteos (Frizzell *et al.*, 1984; Halm *et al.*, 1985) y de pollo (Montero *et al.*, 1988) la existencia de otro sistema de transporte iónico, con una relación de acoplamiento de  $2\text{Cl}^-: 1\text{Na}^+: 1\text{K}^+$  (Greger y Schlatte, 1983; O'Grady *et al.*, 1986) ó de  $2\text{Na}^+: 1\text{K}^+: 3\text{Cl}^-$  (Hall y Ellory, 1985; Russell, 1983), que es selectivamente inhibido por diuréticos como furosemida y bumetanida (Palfrey *et al.*, 1980; Haas y McManus, 1983; Greger y Schlatte, 1983).

#### b) Intercambio con cationes.

En este proceso la entrada de  $\text{Na}^+$  está acoplada a la salida de otra molécula. Se

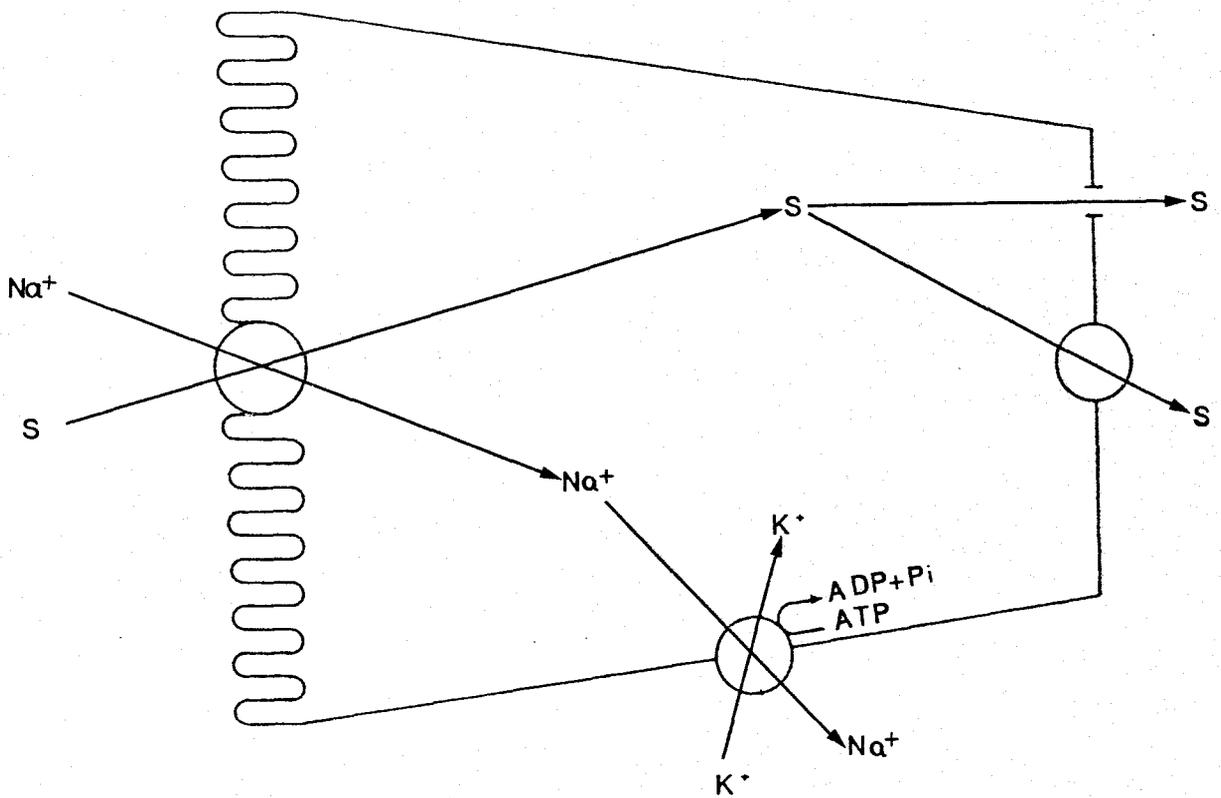
han descrito reacciones de intercambio entre el  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  y entre el  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que sirven para bombear  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{H}^+$  fuera del citosol, aprovechando la energía almacenada en el gradiente de  $\text{Na}^+$  generado por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Estos transportadores han sido descritos en muchas células (Murer *et al.*, 1976; Kinsella y Aronson 1980 y 1981; Knickelbein *et al.*, 1983), y recientemente también en enterocitos de pollo (Montrose *et al.*, 1985). El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  junto con la Ca-ATPasa, están implicados en el control de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ , de la cual dependen muchos sistemas de regulación celular. El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , junto con la H-ATPasa (cuando existe), serían responsables de la regulación del pH intracelular (Kinsella y Aronson, 1980; Burham *et al.*, 1982; Cassano *et al.*, 1984).

### 3) COTRANSPORTE CON NO-ELECTROLITOS.

Sustancias tan importantes como la glucosa y los aminoácidos, son transportados por el epitelio intestinal y renal, mediante una proteína localizada en el borde en cepillo, que se une específicamente

al  $\text{Na}^+$  y al sustrato (glucosa o aminoácido), acumulándose dentro de la célula. El  $\text{Na}^+$  que entra mediante este cotransporte es bombeado fuera de la célula por la  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPasa localizada en la membrana basolateral (ver Fig. 2). Este modelo fue postulado por Crane en 1960, según el cual la energía requerida para la acumulación de azúcares deriva del flujo de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana luminal a favor de su gradiente electroquímico, mantenido gracias a un mecanismo de transporte activo de  $\text{Na}^+$  hacia el exterior (ver apartado 1. 2. 1).

Según Crane (1962) el cotransporte monosacárido- $\text{Na}^+$  implica la existencia de unos componentes de la membrana, llamados transportadores, que producen el acoplamiento del paso de  $\text{Na}^+$  a favor de gradiente con el paso del azúcar en contra de gradiente, mediante la formación de un complejo ternario, transportador-azúcar- $\text{Na}^+$ . De esta forma, el gradiente electroquímico es una fuente de energía utilizada para transportar azúcares en contra del gradiente de concentración. Los aminoácidos neutros son transportados de una manera similar, de hecho, las observaciones en las que se basó la hipótesis del gradiente de sodio han



**Fig. 2. Representación esquemática del transporte acoplado de  $\text{Na}^+$  y no-electrolitos.** 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 ( $\text{Na}^+$ ) a favor de su gradiente electroquímico, mantenido gracias a la bomba de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de la membrana basolateral.

sido confirmadas por muchos estudios posteriores con aminoácidos (Hopfer *et al.*, 1973; Hopfer *et al.*, 1976; Murer y Hopfer, 1974).

Este transporte es un proceso saturable, que presenta una cinética de Michaelis-Menten, pudiéndose calcular una velocidad máxima,  $U_{m\acute{a}x}$ , y una constante de transporte,  $K_t$ , que guarda relación inversa con la afinidad del transportador por su sustrato. Asimismo, se ha comprobado que existen inhibiciones entre sustratos pertenecientes al mismo grupo de transporte.

Posteriormente, se ha observado que el gradiente de  $Na^+$  era insuficiente para explicar el grado de concentración que se alcanzaba en el estado estacionario (Kimmich 1970b y 1972; Potashner y Johnstone, 1971).

Murer y Hopfer (1974); Hopfer *et al.* (1975); Murer *et al.* (1975); Sigrist-Nelson *et al.* (1975); Kimmich y Carter-Su (1978); Carter-Su y Kimmich (1979 y 1980) con técnicas avanzadas, han puesto de manifiesto que el gradiente 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.

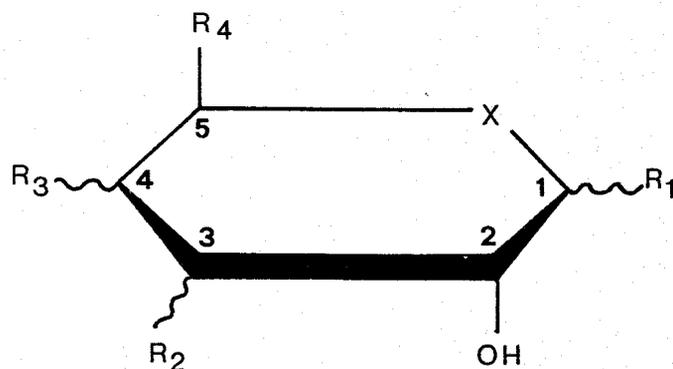
El transporte activo de azúcares presenta una elevada especificidad, ya que solo puede ser utilizado por azúcares con una determinada configuración.

Crane (1960 y 1962) va a establecer algunos de los requerimientos necesarios, como son:

1. Formar un anillo piranósido con un grupo hidroxilo en el carbono 2 en la misma orientación que en la D-glucosa.
2. Tener un átomo de carbono unido al carbono 5.
3. Ser de la serie de los D-monosacáridos.

En la figura 3 vemos la representación de Haworth de los requerimientos básicos.

- En los hidroxilos de los carbonos 1, 3 y 4 se permiten sustituyentes así como inversiones en la configuración espacial respecto a la glucosa. Esto permite la utilización experimental de azúcares, que si bien pueden utilizar el sistema de transporte, no pueden ser metabolizados por los enterocitos. Este es el caso de la 3-oxi-metilglucosa (Csáky y Thale, 1960), que es de los más empleados para el estudio de la absorción intestinal.



**Fig. 3.** Representación de Haworth de los requerimientos básicos de los monosacáridos que utilicen la vía del transporte activo en la membrana luminal. X, normalmente es un átomo de oxígeno, pero también puede ser un sulfuro o un carbono. Las líneas rectas indican orientaciones obligatorias, y las onduladas aquellas en las cuales la orientación es menos crítica.

- También se pueden admitir sustituyentes de gran volumen en el hidroxilo del carbono 1, ya sea en la configuración  $\alpha$  o  $\beta$ , como son el 1' y el  $\beta$ metil-D-glucósido (Landau *et al.*, 1962).

- En los hidroxilos de los carbonos 3 y 4, solo puede haber pequeños sustituyentes.

- En el carbono de R<sub>4</sub> (es decir, el carbono 6) el hidroxilo puede ser reemplazado por hidrógeno o fluor (Crane y Krane, 1956; Wilson y Landau, 1960).

- Alternativamente, el carbono 6 puede ser totalmente reemplazado, como es el caso de la xilosa (Csáky y Lassen, 1964; Alvarado, 1966).

- Finalmente, el puente de oxígeno de la piranosa se puede reemplazar por un carbono (Caspary y Crane, 1970) o por un átomo electronegativo como el sulfuro (Critchley *et al.*, 1969).

Igualmente, el transporte de aminoácidos es específico, presentando los siguientes requerimientos estructurales:

- Los aminoácidos deben pertenecer a la serie L, aunque algunos aminoácidos de la serie D también

pueden ser absorbidos por transporte activo

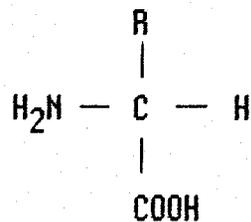
- La molécula debe poseer un grupo carboxílico unido al carbono alfa

- La molécula debe poseer un grupo amino unido al carbono alfa; su sustitución por otro grupo o la unión al carbono beta, disminuye mucho la afinidad por el transportador

- Debe haber un hidrógeno en el carbono alfa, su sustitución por otro grupo disminuye también la afinidad

- El radical unido al carbono alfa del aminoácido, no tiene demasiada influencia en el transporte activo, aunque su longitud aumente la afinidad por el transportador.

En resumen, las necesidades estructurales para que los aminoácidos sean transportados activamente son:



### 1. 2. 2. PAPEL DEL GRADIENTE DE PROTONES EN EL TRANSPORTE DE SOLUTOS.

En 1963, Mitchell formuló que la translocación de azúcares en bacterias se producía por un sistema acoplado al ión hidrógeno, de forma similar al sistema de transporte acoplado al sodio propuesto por Crane en mamíferos, con una diferencia ya que Mitchell asumía que el gradiente de  $H^+$  era establecido por el transporte de electrones en lugar de por una bomba de  $H^+$  que utilice ATP similar a la bomba de sodio.

Muchas bacterias aerobias obtienen su energía de la oxidación de la glucosa a  $CO_2$ . Durante este proceso los electrones son transferidos desde el NADH y pirúvico, intermediarios metabólicos, al oxígeno, último aceptor de protones. Los transportadores de electrones son proteínas integrales en la membrana plasmática. A medida que los electrones se mueven a lo largo de la cadena de transporte, los protones son bombeados fuera de la célula. El resultado puede ser un gradiente de concentración de  $H^+$  de 100 veces en el

medio respecto al citoplasma, el pH del medio será de 5 a 5,5 mientras que el pH del citoplasma permanece sobre 7,3. La energía almacenada en este gradiente de protones se usa con muchos propósitos. Uno de los principales es la generación de ATP desde ADP y  $P_i$ , otro es la entrada de nutrientes desde el medio.

Actualmente se conocen varios sistemas de transporte primario de  $H^+$  en bacterias:  $ATP_{asas}$ , cadena de transporte electrónico y bombas catiónicas o aniónicas (Maloney, 1982).

Se pensó que el transporte de solutos acoplado al gradiente de protones era más antiguo en la escala filogenética, y por ello típico de procariotas, mientras que los gradientes de sodio serían posteriores y prevalecerían en eucariotas. Pero esta atractiva clasificación no es válida ya que se han encontrado sistemas de transporte acoplados al  $Na^+$  en bacterias, mientras que ciertas células de mamíferos, tales como los enterocitos, parecen exhibir trasportes acoplados a  $H^+$ , como los descritos para péptidos (Ganapathy y Leibach, 1983; Ganapathy *et al.*, 1984; Hoshi, 1986), antibióticos (Kimura *et al.*, 1983; Okano *et al.*, 1986) y fólico (Schron *et al.*, 1985; Said *et al.*, 1987).

### 1. 3. MECANISMOS DE TRANSPORTE EN LA ABSORCION DE PEPTIDOS

Un criterio importante para establecer que el transporte intestinal de cualquier sustrato ocurre por un proceso de transporte 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  $\beta$ -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 los tripéptidos se acumulan intracelularmente en intestino intacto (Addison *et al.*, 1972, 1974 y 1975b; Matthews *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 *et al.*, 1972, 1974, 1975b; Matthews *et al.*, 1974).

Una característica de cualquier sistema de transporte mediado es su saturación al aumentar progresivamente la concentración de sustrato. Al estudiar, en intestino intacto, 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 *et al.*, 1979). Se observó que existían

dos componentes: 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 *et al.*, 1979; Burston *et al.*, 1978).

En vesículas de membrana del borde en cepillo de ratón se ha observado que el transporte de glicil-prolina es saturable en un rango de concentración de 2 a 75 mM, comportándose según la cinética de Michaelis-Menten (Rajendran *et al.*, 1985a). También se ha observado en vesículas de conejo (Takuwa *et al.*, 1985; Ganapathy *et al.*, 1981).

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  $\beta$ -Ala-His, sugiere que estos péptidos comparten un mismo mecanismo de transporte activo (Adibi, 1971; Adibi y Soleimanpour, 1974; Addison *et al.*, 1972, 1974 y 1975b; Matthews, 1975a y 1975b; Rubino *et al.*, 1971).

En aquellos casos, en los que se han estudiado las características cinéticas de la inhibición entre distintos péptidos, se ha comprobado que es de tipo competitivo (Addison *et al.*, 1974; Rubino *et al.*, 1971).

Todavía es incierto si existen o no, más de un sistema de transporte 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 *et al.*, 1974 y 1975b; Rubino *et al.*, 1971). Por analogía con lo ocurrido con los aminoácidos se pensó en la existencia de diferentes sistemas de transporte.

Estudios recientes empleando técnicas más refinadas, han revelado que algunos péptidos neutros, ácidos y básicos comparten el mismo sistema o sistemas de transporte (Matthews *et al.*, 1979; Taylor *et al.*, 1980). Por otro lado, Abe *et al.* (1987), registrando los potenciales transmurales inducidos por el transporte de péptidos, han observado que un gran número de glicil y alanil dipéptidos y tripéptidos comparten un sistema de transporte común. Sin embargo, otros péptidos conteniendo solamente aminoácidos hidrofóbicos, tales como leucil-leucina, fenilalanil-fenilalanina y fenilalanil-leucina, sugieren la presencia de transportadores específicos separados, lo cual fue también observado por Matthews y Burston (1983).

La existencia de más de un sistema de transporte tiene una gran importancia biológica, ya que la presencia de un solo sistema de captación de péptidos en el intestino delgado supondría una limitación si se produjese un defecto congénito en el mismo.

Los estudios realizados sobre los requerimientos estructurales de di- y tripéptidos para su transporte por el

intestino delgado (Matthews, 1975a y 1975b; Matthews y Payne, 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 *et al.*, 1971; Burston *et al.*, 1972; Addison *et al.*, 1974 y 1975a; Das y Radhaskrishnan, 1975; Amaya *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 *et al.*, 1971; Addison *et al.*, 1972 y 1975a; Das y Radhaskrishnan, 1975).
- c) La incorporación de  $\beta$ -aminoácidos reduce la afinidad por el sistema de transporte (Addison *et al.*, 1975b; Das y Radhaskrishnan, 1975), y en algunos casos ( $\beta$ -Ala-His) retarda la hidrólisis (Matthews *et al.*, 1974).
- d) La presencia de ligandos reduce o anula la afinidad por el sistema de transporte y también retarda la hidrólisis (Wiseman, 1974; Addison *et al.*, 1975b; Das y Radhaskrishnan, 1975).
- e) Se pensó que la presencia de aminoácidos con largas cadenas lipofílicas aumentaría la afinidad por el sistema de transporte de péptidos (Adibi y Soleimanpour, 1974; Rubino *et al.*, 1971), como sucedía con el de

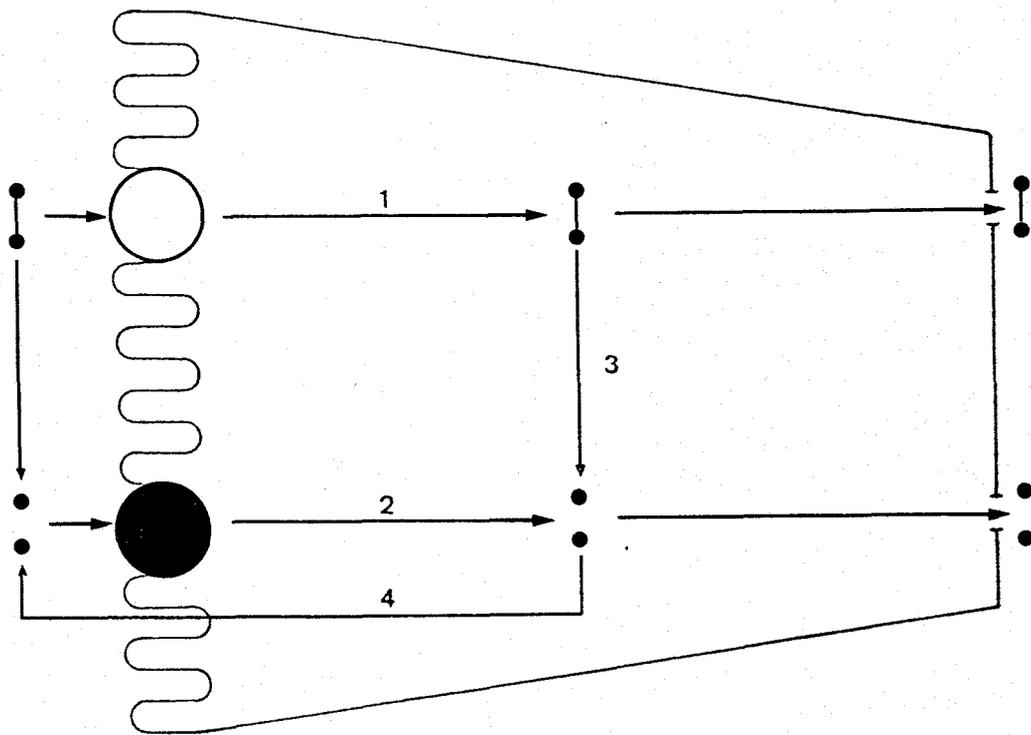
aminoácidos. Sin embargo, se ha comprobado en una serie de dipéptidos neutros en los que aumentaban las propiedades lipofílicas de la cadena, que era la valil-valina, y no la leucil-leucina, el inhibidor más poderoso de la Gly-Sar (Burston *et al.*, 1982; Matthews y Burston, 1983). Asimismo, Abe *et al.* (1987) han observado que las interacciones hidrofóbicas, predominantes en la interacción aminoácido-carrier, no son importantes en el transporte de péptidos. En el caso de los aminoácidos se observa una relación lineal entre los valores de  $1/K_t$  y  $P_m$  (Hajjar y Curran, 1970). En contraste, tal relación no aparece en el caso de los péptidos, y casi no hay tendencia a un aumento en el valor de  $1/K_t$  al aumentar el  $P_m$ .

- f) Igual que ocurre en el transporte de aminoácidos (Wiseman, 1974), el transporte de péptidos es estereoquímicamente específico (Burston *et al.*, 1972; Cheeseman y Smyth, 1973). Los péptidos que contienen D-aminoácidos son peor absorbidos (y muy lentamente hidrolizados) (Burston *et al.*, 1972; Asatoor *et al.*, 1973; Cheeseman y Smyth, 1973), aunque es probable que no carezcan totalmente de afinidad por el transportador (Addison *et al.*, 1975b). En este sentido, se ha demostrado que el transporte de D-dipéptidos es saturable (Cheeseman y Smyth, 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, 1975a y 1975b; Matthews y Payne, 1980), siendo mucho más importante esta última.
- Otros entrarán en los enterocitos, intactos, por un sistema específico, sufriendo hidrólisis intracelular, o entrando intactos en la sangre portal (Adibi, 1971 y 1976; Perry *et al.*, 1967; Gardner, 1975; Fairlough *et al.*, 1977; Sleisenger *et al.*, 1977; Matthews, 1975b).

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



**Fig. 4. Representación esquemática de las rutas utilizadas por los dipéptidos para atravesar la membrana intestinal. (●●): dipéptido (●): aminoácido.**

○: sistema de transporte de dipéptidos.

●: sistema de transporte de aminoácidos.

- 1: Ruta de entrada de dipéptidos
- 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.

### 1. 3. 1. REQUERIMIENTOS IONICOS EN EL TRANSPORTE DE PEPTIDOS.

Como ya hemos indicado en el apartado anterior, es un hecho establecido que el transporte activo de azúcares y de algunos aminoácidos es dependiente de  $\text{Na}^+$ .

En el caso del transporte activo de péptidos los resultados obtenidos, sobre la dependencia iónica del mismo, son contradictorios.

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

Así, Addison *et al.* (1972 y 1975b) demostraron que el transporte de Gly-Sar y Gly-Sar-Sar por yeyuno de hamster "in vitro" es activo y dependiente de sodio. Matthews *et al.* (1974) llegaron a la misma conclusión utilizando  $\beta$ -Ala-His (carnosina). En ambos casos la inhibición del transporte fue de un 80 a un 90% al sustituir el  $\text{Na}^+$  del medio de incubación por  $\text{K}^+$  o  $\text{Li}^+$ . Heading *et al.* (1978) observaron que la

eliminación del  $\text{Na}^+$ , anulaba el transporte transmural de tirosil-tirosina y tirosil-D-alanina a través del intestino delgado de rata "in vitro".

Existen otros estudios, en los cuales, la inhibición del transporte de péptidos por la sustitución total del  $\text{Na}^+$  por otros cationes monovalentes, fue solo parcial, situándose entre el 35 y el 65%. Esta dependencia parcial ha sido demostrada para la glicil-prolina y la glicil-leucina en intestino delgado de mono "in vitro", observándose que el transporte independiente del  $\text{Na}^+$  era inhibido por otros dipéptidos, por lo que no podía ser atribuido a difusión simple sino a un proceso mediado por transportador (Ganapathy y Radhaskrishnan, 1980). En ileon de conejo también se demostró una dependencia parcial del transporte de glicil-prolina al sustituir el  $\text{Na}^+$  del medio de incubación por colina (Rubino *et al.*, 1971). Asimismo, el transporte de glicil-glicina en intestino delgado de cobaya "in vitro" (Himukai *et al.*, 1978) y de  $\beta$ -alanil-glicil-glicina en yeyuno de hamster "in vitro" (Addison *et al.*, 1975a) se ha demostrado que es parcialmente dependiente de sodio.

Parecen existir diferencias entre los efectos del sodio sobre el transporte de dipéptidos y aminoácidos. En ileon de conejo, al sustituir el sodio

del medio de incubación por colina, se inhibe la velocidad máxima del flujo de mucosal a serosal de glicil-prolina; mientras que la inhibición del flujo de glicina, se produce por aumento de la  $K_t$  (Rubino *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 dipéptidos por la mucosa del intestino no es dependiente del  $Na^+$  bajo las condiciones experimentales usadas.

La absorción de altas concentraciones de Gly-Sar (267 mM) en yeyuno de rata, no fue significativamente reducida al sustituir el sodio intraluminal por manitol (Matthews *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 y Parsons, 1974).

Otra aproximación utilizada para estudiar la interacción entre los péptidos y el sodio durante el

transporte ha sido investigar el efecto de los péptidos sobre el transporte de  $\text{Na}^+$ .

Hellier *et al.* (1976) y Silk *et al.* (1975) estudiaron los efectos de muchos dipéptidos y sus aminoácidos constituyentes sobre la absorción intestinal de  $\text{Na}^+$  usando la técnica de perfusión "in vivo" en humanos. Ellos demostraron que tanto los péptidos, como los aminoácidos, estimularon la absorción de  $\text{Na}^+$ . Contrariamente no hubo estimulación de la absorción de  $\text{Na}^+$  cuando un tripéptido, alanil-glicil-glicina fue perfundido (Silk *et al.*, 1973).

Recientemente, Himukai *et al.* (1983), utilizando la técnica de sacos evertidos, han observado que el influjo de  $\text{Na}^+$  a través del borde mucosal era aumentado por la glicil-glicina. El aumento en la entrada de  $\text{Na}^+$  causado por 10 mM glicil-glicina correspondió al 70% del causado por 10 mM glicina. Se demostró que el efecto del dipéptido no era debido a la glicina liberada por hidrólisis en el borde en cepillo. Sin embargo, la glicil-sarcosina no modificó la absorción neta de sodio en yeyuno de cerdo (Rhoads *et al.*, 1986).

Cheeseman (1984) estudiando la salida de  $\text{Na}^+$  desde enterocitos aislados de rata, encontró que los aminoácidos leucina y prolina, estimulaban dicha

salida, mientras que los dipéptidos glicil-leucina y carnosina no tuvieron ningún efecto. Sin embargo, la salida fue ampliamente estimulada por otro dipéptido, glicil-glicina.

Por otro lado, utilizando vesículas de membrana del borde en cepillo de ratón, Berteloot *et al.* (1981 y 1982) observaron que la glicil-L-leucina y la glicil-L-fenilalanina eran transportadas por dos mecanismos complementarios: 1) hidrólisis de los péptidos seguida por captación de los aminoácidos libres y 2) transporte del péptido intacto por un proceso mediado por transportador e independiente del  $\text{Na}^+$ .

Posteriormente, empleando otros péptidos altamente resistentes a la hidrólisis, tales como la carnosina o la glicil-L-prolina se ha observado que eran transportados intactos por un proceso mediado por transportador e independiente del  $\text{Na}^+$  (Rajendran *et al.*, 1984, 1985a y 1985b).

Asimismo, Ganapathy *et al.* (1981 y 1984) en vesículas de membrana del borde en cepillo de conejo han observado una independencia total entre el transporte de péptidos y el  $\text{Na}^+$ .

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 y Radhaskrishnan, 1980; Himukai *et al.*, 1982; Cheeseman y Devlin, 1985). Para otros, el transporte de dipéptidos es dependiente del  $\text{Na}^+$  (Addison *et al.*, 1972 y 1975b; Matthews *et al.*, 1974). Y existen otros autores para los cuales existe una total independencia entre los péptidos y dicho ión (Boyd y Ward, 1982; Ganapathy *et al.*, 1981 y 1984; Ganapathy y Leibach, 1983 y 1985, Rajendran *et al.*, 1984, 1985a, 1985b y 1987).

En cualquier caso se ha demostrado que el transporte de péptidos es electrogénico, lo que indica que se encuentra asociado a un flujo de carga (Boyd y Ward, 1980 y 1982). Se observó que la glicil-prolina y la carnosina, péptidos resistentes a la hidrólisis, producían una despolarización de la membrana del borde en cepillo del epitelio intestinal de *Necturus maculosus* similar a la producida por los aminoácidos libres. Sin embargo, esta despolarización fue diferente ya que los cambios eléctricos inducidos por los dipéptidos persistieron en gran medida, tras eliminar el  $\text{Na}^+$  del medio. Ya que los péptidos se encontraban en forma neutra (zwitterion) bajo las condiciones experimentales utilizadas, la despolarización no podía ser causada por el transporte del péptido sólo. Estos

resultados llevaron a los distintos autores a pensar que los péptidos podían ser cotransportados con otro catión distinto del sodio. Sin embargo, la identidad de este catión era desconocida, ya que los efectos electrogénicos de los péptidos eran mantenidos en distintas soluciones con composiciones catiónicas y aniónicas diferentes.

Por el contrario, Himukai *et al.* (1983) observaron que el efecto de la glicil-glicina sobre la diferencia de potencial transmural en intestino delgado de cobaya, era dependiente del  $\text{Na}^+$ , pero los efectos producidos por la glicina y la glicilglicina eran diferentes tanto cuantitativa como cualitativamente. En ausencia de  $\text{Na}^+$ , la glicina no produjo ningún cambio en la diferencia de potencial, mientras que bajo similares condiciones, una importante fracción del cambio producido por la glicil-glicina persistía.

Ganapathy y Leibach (1983) y Ganapathy *et al.* (1984) investigaron el papel del potencial de membrana en el transporte de péptidos utilizando vesículas de membrana del borde en cepillo de conejo. Un potencial negativo en el interior estimuló significativamente el transporte de glicil-prolina y glicil-sarcosina, incluso en la ausencia de  $\text{Na}^+$ .

La despolarización inducida por los dipéptidos ha sido también estudiada con el colorante DIS-C<sub>3</sub> (sensible al potencial) (Ganapathy *et al.*, 1984; Takuwa *et al.*, 1985) en vesículas de membrana del borde en cepillo del intestino delgado de conejo. La adición de varios di- y tripéptidos a las vesículas produjo un aumento de la fluorescencia del colorante tanto en presencia como en ausencia de sodio.

### 1. 3. 1. PAPEL DEL pH Y DEL GRADIENTE DE PROTONES EN EL TRANSPORTE DE PEPTIDOS

Los efectos del pH sobre la absorción de péptidos pueden ser muy variados. Las peptidasas del borde en cepillo intestinal son muy susceptibles a cambios en el pH luminal y, por ello, la hidrólisis de los péptidos por estas enzimas depende del pH luminal, siendo muy reducida cuando se acidifica (Fogel y Adibi, 1974; Matthews y Burston, 1984). El transporte de péptidos, como el de otros sustratos, puede ser afectado por cambios en el pH, que afecten directamente al transportador. Más aún, las concentraciones de las diferentes especies iónicas del péptido dependen del pH de la solución y del pH isoelectrico del péptido. Fogel

y Adibi (1974) observaron que la absorción de glicil-glicina y glicil-leucina disminuía a  $\text{pH}=2,25$ , reduciéndose en un 50% respecto a la absorción a  $\text{pH}=7,0$ . Ellos concluyeron que la reducción era debida principalmente a la protonación de los péptidos, lo cual disminuía la concentración de las especies neutras transportables.

En vesículas de membrana del borde en cepillo de intestino delgado de conejo ha sido estudiado el efecto del gradiente de  $\text{pH}$  sobre la absorción de péptidos (Ganapathy y Leibach, 1983; Ganapathy *et al.*, 1984). El transporte del dipéptido en la presencia de un gradiente (interno) de protones ( $[\text{pH}]_e=5,5$ ;  $[\text{pH}]_i=7,5$ ) fue dos veces mayor que en la ausencia de dicho gradiente. Este transporte acelerado se observó tanto en presencia como en ausencia de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, la presencia de un protonóforo, que disipa rápidamente el gradiente de protones, redujo dicha estimulación.

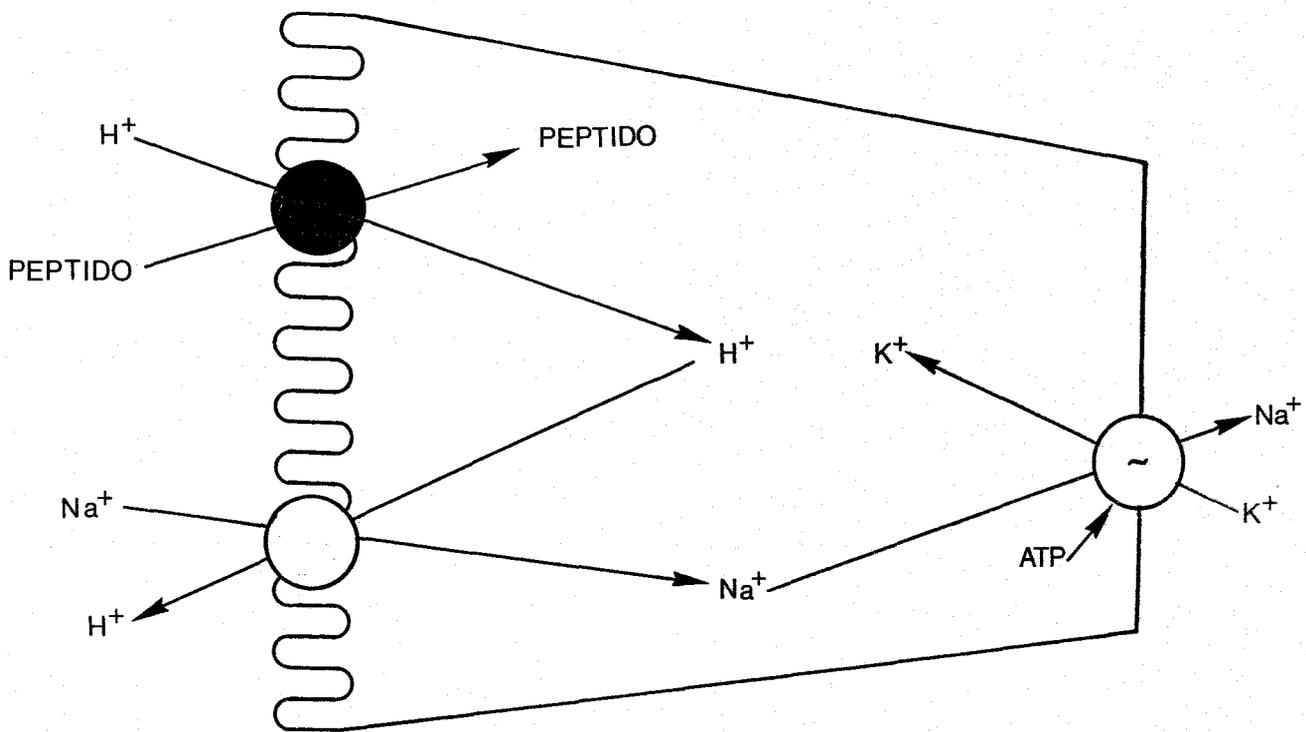
Estos mismos hechos se han observado en vesículas de membrana del borde en cepillo renal de conejo (Ganapathy y Leibach, 1983 y 1986; Silbernalg *et al.*, 1987).

Según Ganapathy y Leibach (1985) el hecho de que el transporte de péptidos sea máximo a  $\text{pH}=5,5-6,0$ ,

puede ser explicado por, al menos, dos mecanismos:

- 1) Los valores del pH isoelectrico para la mayoría de los péptidos utilizados en estos estudios están en el rango de pH de 4,5 a 6,0. Por ello, la concentración de las especies neutras transportables es máxima en este rango de pH.
- 2) El gradiente interno de protones estimula el cotransporte péptido-protón.

Basándose en estos datos ellos proponen un modelo según el cual, la fuerza conductora del transporte de péptidos a través de la membrana sería el gradiente de protones. La dependencia del sodio observada en tejidos intactos sería indirecta y debida a un intercambio  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ . El gradiente de protones es generado y mantenido por el intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  en la membrana del borde en cepillo, en respuesta al gradiente interno de  $\text{Na}^+$ , mantenido por la bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ( ver Fig. 5).



**Fig. 5. Modelo para el transporte intestinal de péptidos mostrando el papel del  $H^+$ , del gradiente de protones y de la energía celular en los procesos de transporte.**

#### **1. 4. OBJETO DEL TRABAJO**

Dada la importancia de la absorción de dipéptidos en la nutrición proteica y la disparidad de opiniones respecto al gradiente iónico responsable de dicha absorción nos pareció interesante estudiar el transporte del dipéptido glicil-sarcosina en células aisladas de intestino de pollo, de acuerdo con el siguiente plan de trabajo:

- 1. Evaluación del grado de hidrólisis de Gly-Sar.** Aunque hemos elegido este dipéptido por ser muy resistente a la hidrólisis por las peptidasas intestinales, estudiaremos en primer lugar la posible hidrólisis tanto intracelular como extracelular de dicho dipéptido.
- 2. Estudio y caracterización del sistema de transporte de Gly-Sar en enterocitos de pollo.** Para ello se estudiará la cinética de transporte, la inhibición por sustratos análogos y la influencia de distintos gradientes iónicos.
- 3. Flujos de salida de Na desde enterocitos precargados con  $\text{Na}^{22}$ .** Con el fin de conocer si la entrada de Gly-Sar está o no acoplada al  $\text{Na}^+$ .
- 4. Entrada de Gly-Sar en enterocitos deplecionados de ATP.** Con el objeto de estudiar el papel del gradiente de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{H}^+$  y del potencial de membrana.
- 5. Transporte de Gly-Sar por células aisladas de ciego proximal y de recto.**

En la mayoría de los experimentos de transporte se estudiará paralelamente la captación de 3-OMG, con el fin de poner a comparar las características del transportador de Gly-Sar con las ya conocidas del transportador de azúcar.

## **II. MATERIAL Y METODOS**

## 11. 1. ELECCION DE LA TECNICA.

Tradicionalmente el estudio de la absorción intestinal se ha desarrollado con técnicas "in vivo" en animales anestesiados, sometidos o no a una operación quirúrgica previa. Estos experimentos constituyeron la base de las primeras investigaciones.

El reconocimiento de que el tejido aislado del animal podía sobrevivir durante un tiempo prolongado, va a representar una gran ventaja ya que podía ser fácilmente manipulado y permitía modificar ampliamente las condiciones experimentales. Así se van a desarrollar una gran cantidad de técnicas "in vitro". Uno de las primeras fue la de Reid, en 1901, que con un segmento circular colocado entre dos compartimentos de vidrio va a demostrar la absorción de fluidos a favor de gradiente de presión hidrostática.

El mantenimiento de la viabilidad del tejido y por tanto, de su capacidad para transportar durante el tiempo de experimentación, va a ser solucionado por Fisher y Parsons (1949) al oxigenar las soluciones que estaban en contacto con el tejido.

Bihler y Crane (1962) y Schultz *et al.* (1966) incubaron por un lado láminas de mucosa y por el otro, el resto del tejido exento de mucosa, y demostraron que son las células columnares epiteliales de la mucosa, o enterocitos, los

principales implicados en los procesos de absorción intestinal, ya que sólo las láminas de mucosa eran capaces de acumular azúcares en contra de un gradiente de concentración. El resto de la pared intestinal libre de mucosa no presenta capacidad para acumular solutos.

A partir de este momento, el hombre va a prestar más atención a la funcionalidad de los enterocitos, centrándose los esfuerzos científicos en el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales estas células tienen una capacidad de transporte tan elevada. Es por ello que la utilización de las células epiteliales aisladas supone una gran ventaja en la metodología de estudio de la absorción intestinal de no-electrolitos. Se trata de un modelo experimental que conserva las características del transporte presente en el tejido completo. Los enterocitos constituyen la unidad funcional más pequeña del tejido intestinal, ya que se elimina la problemática de la existencia del tejido conectivo intersticial y de las diversas capas de la musculatura serosal.

## II. 2. 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).

La cría de los pollos desde el primer día después de la

eclosión hasta el momento de la experimentación se ha realizado en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Los animales fueron mantenidos en condiciones adecuadas de humedad y temperatura, suplementada durante la primera semana de vida con una fuente adicional de calor.

Durante el primer mes fueron alimentados con pienso INICIARINA (Gallina Blanca Purina) y a partir de esta edad con pienso GORDINA (Gallina Blanca Purina), y con libre acceso al agua.

### 11. 3. COMPOSICION DE LAS SOLUCIONES.

Para el aislamiento, lavado e incubación se han utilizado los medios descritos por Kimmich (1970a) con algunas modificaciones:

#### 11. 3. 1. MEDIOS DE INCUBACION

##### A) Estándar

NaCl	80 mmol/l
CaCl <sub>2</sub>	1 mmol/l
Manitol	100 mmol/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 mmol/l
MgCl <sub>2</sub>	1 mmol/l

Albúmina	1 g/l
Tris/HCl	20 mmol/l

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

B) Medio de incubación sin sodio o con distintas concentraciones de dicho ión.

En la preparación de estos medios, se sustituye el NaCl total o parcialmente por cantidades isoosmóticas de manitol:

Medio de incubación:	0 mM Na <sup>+</sup> -----	260 mM manitol
	40 mM Na <sup>+</sup> -----	180 mM manitol
	100 mM Na <sup>+</sup> -----	60 mM manitol

C) Medio de incubación a pH=5,0; pH=5,5 y pH=6,0.

Para ajustar el pH del medio de incubación a 5,0; 5,5 ó a 6,0; en lugar del sistema tampón Tris/HCl, utilizamos el de Tris/Acido cítrico isotónico (Matthews *et al.*, 1979; Taylor *et al.*, 1980).

D) Medios de incubación para células deplecionadas de ATP.

a) Medio con Nitrato.

La composición es igual a la del medio de incubación estándar, pero el NaCl (80 mM) es sustituido por  $\text{NaNO}_3$  (80 mM); y como sistema amortiguador se utilizó Tris/Acetato (20 mM).

b) Medio KG.

La composición de este medio es la siguiente:

Gluconato K	120 mmol/l
$\text{CaCl}_2$	1 mmol/l
$\text{MgCl}_2$	1 mmol/l
Tris-Hepes	20 mmol/l
Manitol	40 mmol/l
Albúmina	1 g/l

c) Medio NaG.

Es igual al anterior pero el gluconato potásico es sustituido por gluconato sódico.

El sustrato cuya captación es objeto de estudio, se disuelve en el medio de incubación. Como las concentraciones 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.

### 11. 3. 2. MEDIOS DE AISLAMIENTO

#### A) Con hialuronidasa

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

Se prepara a partir del medio de incubación estándar, o en su caso del medio KG, pesando la cantidad adecuada de enzima y disolviéndola directamente en el medio.

B) Con citrato: este medio se ha utilizado para el aislamiento de enterocitos de ciego y recto, ya que está descrito en la bibliografía (Ferrer *et al.*, 1986a), que es el más adecuado para estos tramos intestinales. Su composición es:

NaCl	80 mmol/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 mmol/l
Tris/ClH	20 mmol/l
Manitol	37 mmol/l
EGTA	0,1 mmol/l

Citrato trisódico	27 mmol/l
Albúmina	1 g/l

### 11. 3. 3. Medios de preincubación.

Se utilizan durante la deplección celular de ATP, su composición, en el caso de incubar con medio de nitrato es:

Manitol	280 mmol/l
Albúmina	1 g/l
Tris/Acetato	20 mmol/l

Todos los medios descritos deben prepararse extemporaneamente, ya que se ha observado que su mantenimiento a 4°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.

### 11. 4. MARCADORES

1. Para estudiar la captación de dipéptidos por enterocitos aislados hemos elegido [C<sup>14</sup>] Glicil-sarcosina, por ser muy resistente a la hidrólisis.
2. Para estudiar la entrada de azúcares hemos utilizado [C<sup>14</sup>] 3-oxi-metilglucosa.

3. Para medir el potencial de membrana empleamos  $[C^{14}]$  TPP<sup>+</sup> (tetrafenilfosfonio).
4. Para los experimentos de salida de  $Na^+$  utilizamos  $Na^{22}$ .
5. Para evaluar el volumen extracelular se empleó  $[C^{14}]$ PEG (polietilenglicol).

## II. 5. TECNICAS

### II. 5. 1. AISLAMIENTO DE CELULAS EPITELIALES DE INTESTINO DELGADO DE POLLO.

La técnica empleada es similar a la descrita por Perry (1966) y posteriormente modificada por Kimmich (1970a) en intestino delgado 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 la porción correspondiente a los 100 mm de intestino delgado situados a ambos lados del lugar de implantación de la yema. De los ciegos únicamente se obtiene el ciego proximal, y en su caso, se extrae el recto.

Los segmentos intestinales, así obtenidos, se separan del tejido pancreático y mesentérico adyacente. Se lavan varias veces con suero fisiológico frío, 4°C, (mantenido en baño de hielo) con el fin de eliminar el contenido luminal. En el caso del ciego y del recto, es necesario, en primer lugar, debido a la consistencia pastosa de su contenido, abrirlo longitudinalmente e introducirlo en el vaso con suero salino fisiológico y agitar para conseguir eliminarlo.

A continuación, se abren longitudinalmente, y se cortan en segmentos de aproximadamente 20 mm de longitud, que se introducen en dos vasos de polietileno, los cuales contienen 25 ml de medio de aislamiento cada uno. Los vasos se introducen en un baño termostático (Marca Selecta tipo Unitronic-320) a 37°C durante 30 minutos, sometiéndolos a una agitación constante de 80 a 100 ciclos por minuto.

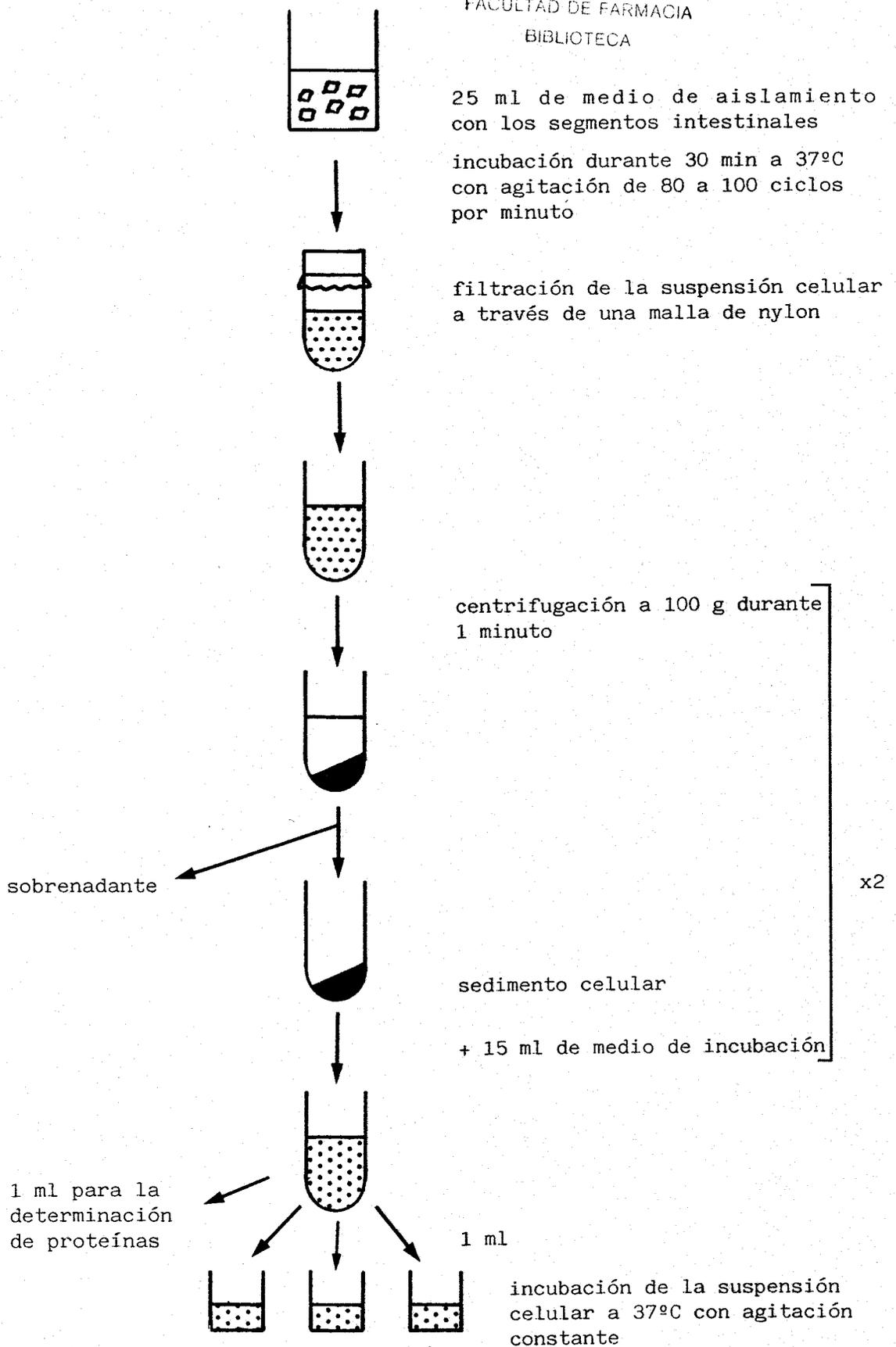
Transcurrido este tiempo, deshechamos el medio de aislamiento (con el fin de ir eliminando la hialuronidasa) y añadimos medio de incubación frío. Agitamos vigorosamente los segmentos intestinales para favorecer el desprendimiento de los enterocitos.

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 dos 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,.... Tras una centrifugación de 1 minuto a 100g (20°C) (en una centrífuga marca Beckman tipo J2-21), el sobrenadante se deshecha por decantación y el sedimento celular o "pellet", se resuspende en 15 ml de medio de incubación frío (4°C). El proceso se repite hasta que el sobrenadante queda transparente (generalmente es suficiente con dos 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 a 25 mg de proteína/ml (Fig. 6).

La viabilidad de las células fue determinada por la capacidad de las mismas para excluir azul de metileno al 0,2 % (Girardi *et al*, 1956) y resultó ser de un 65 %.



**Fig. 6. Esquema de la técnica seguida para el aislamiento de los enterocitos.**

### 11. 5. 2. OBTENCION DE CELULAS DEPLECIONADAS DE ATP.

La técnica utilizada ha sido la ya descrita por Carter-Su y Kimmich (1979 y 1980).

Una vez obtenida la suspensión celular, se lava como se ha descrito en el apartado anterior y por último se resuspende en el medio de preincubación (ver apartado 11. 3. 2. de Materiales y Métodos) conteniendo 30  $\mu\text{M}$  rotenona y 200  $\mu\text{M}$  ouabaina.

Se introduce en el baño termostatzado a 37°C con agitación constante durante 20 minutos.

### 11. 5. 3. EXPERIMENTOS DE CAPTACION.

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

El método que se utiliza es el siguiente:

La incubación se realiza en vasos de polietileno de 50 ml (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 polietileno para

evitar que las células queden adheridas al vidrio (Kimmich, 1970a)).

Cada vaso contiene 3 ml 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  $\sim 0,162 \mu\text{Ci}$  del sustrato marcado con  $\text{C}^{14}$ . 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  $\mu\text{l}$  de cada condición experimental con el objeto de conocer su actividad específica real.

Los vasos de precipitado se colocan en el baño termostatzado (37°C) y simultáneamente se introduce en dicho baño la suspensión de células que se hallaba a 4°C. Transcurridos unos 10 minutos necesarios para que las células se calienten, se adiciona 1 ml de la suspensión en los vasos de precipitado, con lo cual el volumen final del medio de incubación será de 4 ml. 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 y se mantengan dispersas.

Asimismo, se toma una muestra de 1 ml de la suspensión celular, para la cuantificación de la proteína por el método de Lowry (1951).

A los distintos tiempos prefijados, se toman muestras por duplicado, de 200  $\mu$ l, de cada condición experimental, que se llevan a tubos "eppendorf" conteniendo 200  $\mu$ l de una mezcla de aceites y 800  $\mu$ l de medio de incubación a 4°C (a esta temperatura se detiene la actividad celular). Los aceites utilizados son el dinonilftalato y el dibutilftalato mezclados en la proporción adecuada para que a 4°C su densidad sea 1,03 g/ml, intermedia entre la del medio de incubación y la de las células.

Seguidamente, los tubos "eppendorf" se centrifugan, a 12000 g durante 12 segundos (centrífuga "eppendorf" 5414S), de forma que el pellet celular se deposite en el fondo del "eppendorf", por debajo de las dos fases

aceites-medio de incubación.

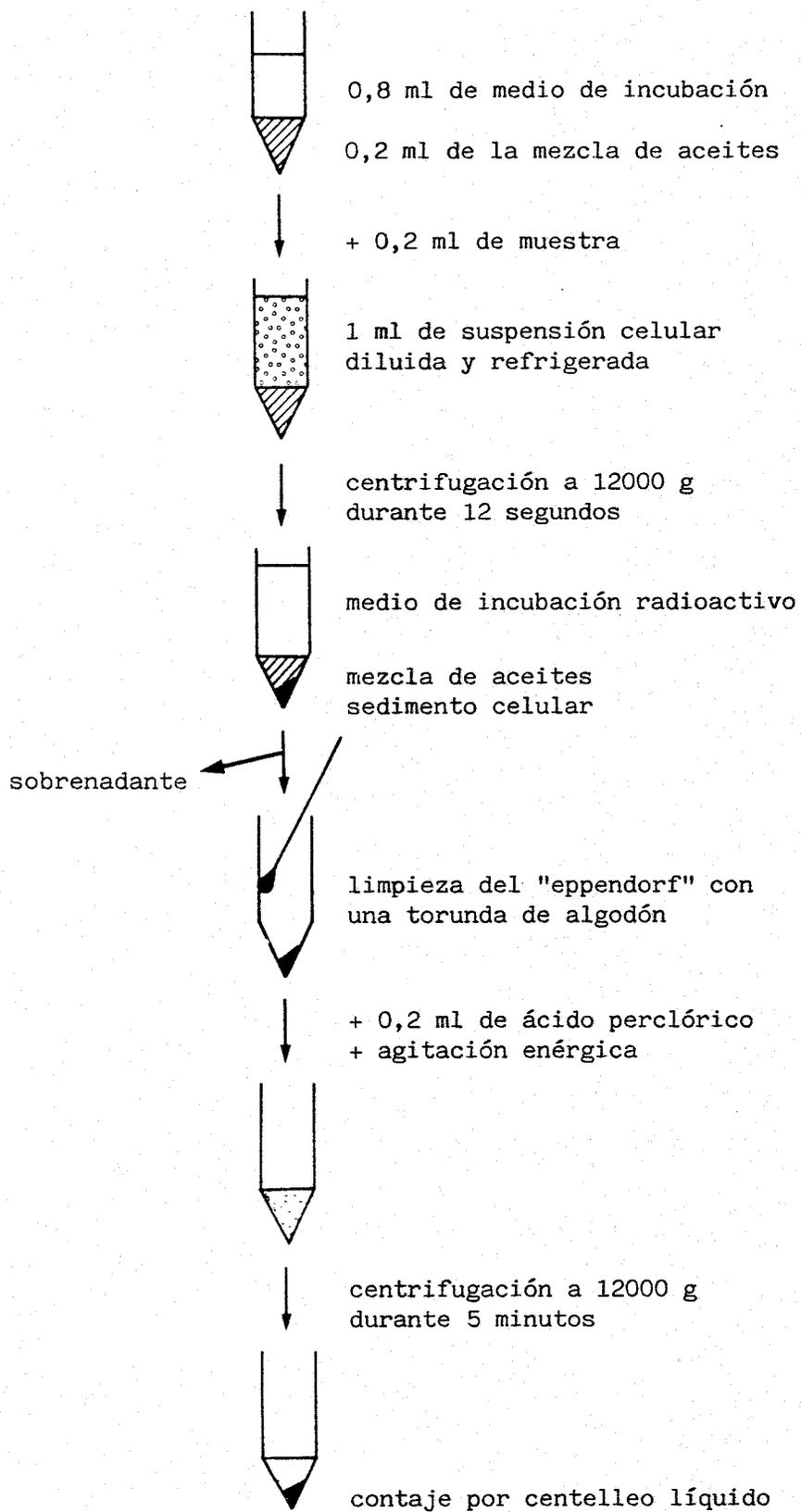
Con una bomba de vacío se succiona el sobrenadante completamente y se limpia la radioactividad de las paredes del "eppendorf" con una torunda de algodón.

Finalmente, se añaden 200  $\mu$ l de ácido perclórico al 3% (el ácido perclórico desnaturaliza las proteínas facilitando la rotura de los enterocitos), y se agitan enérgicamente en un mixer con el fin de extraer el sustrato intracelular. La suspensión se centrifuga a 12000 g durante 5 minutos y se toman del sobrenadante alícuotas de 100  $\mu$ l que se disponen en los viales con líquido de centelleo para el contaje del  $C^{14}$  (en un contador de centelleo líquido betamatic I (KONTRON)) (Fig.7).

#### II. 5. 4. EXPERIMENTOS DE SALIDA.

Para estudiar la salida de  $Na^{22}$  desde enterocitos aislados de pollo, es necesario, en primer lugar, cargar las células con dicho isótopo.

Para ello una vez obtenida la suspensión



**Fig. 7. Esquema de la separación de la suspensión celular del medio radioactivo por el método de centrifugación a través de aceites inertes.**

celular se añaden ~ 3  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{Na}^{22}$  y se preincuba en un baño termostatzado a  $37^{\circ}\text{C}$ , con agitación constante de 60 ciclos/minuto, durante 30 minutos. Para impedir la salida de  $\text{Na}^{22}$  por acción de la ATPasa  $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ , esta preincubación se realiza en presencia de ouabaína (200  $\mu\text{M}$ ).

Transcurrido este periodo de tiempo se lavan las células dos veces con medio frío sin radioisótopo, quedando a una concentración final de 20 a 30 mg de proteína/ml.

A continuación se realiza una dilución 1:40 en medio de incubación libre de  $\text{Na}^{22}$  y a  $37^{\circ}\text{C}$ . Inmediatamente se toma una alícuota de 500  $\mu\text{l}$  para conocer la cantidad de  $\text{Na}^{22}$  que hay en el interior de los enterocitos, en el tiempo cero de incubación. Se toman alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  a los 2, 4, 8, 12 y 14 minutos, en tubos "ependorf" conteniendo 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla de aceites (ver apartado II. 5. 3 de Material y Métodos). Se centrifugan y se toman muestras de 200  $\mu\text{l}$  del medio de incubación. A continuación se elimina todo el sobrenadante y se procede igual que en el apartado II. 5. 3 de Material y Métodos, para finalizar contando el  $\text{Na}^{22}$  remanente en las células.

### II. 5. 5. DETERMINACION DEL VOLUMEN EXTRACELULAR DEL PELLET.

Para determinar el volumen extracelular del pellet celular se utilizó [ $C^{14}$ ] PEG 4000, que debido a su alto peso molecular, no puede penetrar en las células.

Para la realización de estos experimentos se añadieron  $\sim 0,08 \mu C_i/ml$  de [ $C^{14}$ ] PEG 4000 a los 4 ml de suspensión celular y se procedió tal como se ha indicado en el apartado II. 5. 3 de Material y Métodos.

El volumen extracelular se expresa en  $\mu l/mg$  proteína.

### II. 5. 6. DETERMINACION DEL VOLUMEN INTRACELULAR

El volumen intracelular se obtiene midiendo la captación de 1 mM 3-oxi-metilglucosa en presencia de 0,25 mM florricina. Bajo estas condiciones experimentales, la 3 - oxi - metilglucosa, 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 del azúcar es igual a la extracelular, lo que permite calcular el volumen intracelular.

## 11. 6. CROMATOGRAFIA

En primer lugar, para conocer la pureza del radioisótopo [ $C^{14}$ ] Gly-Sar, se realizó un estudio cromatográfico en papel Whatman No.1 utilizando como fase móvil alcohol n-butílico/ ácido acético/ agua (4:1:1,v/v). Se encontró que sólo contenía una pequeña contaminación (5 %) de impurezas radioactivas. Sin embargo, no contenía ningún otro compuesto positivo a la ninhidrina distinto de la glicil-sarcosina.

Para estimar la hidrólisis producida por los enterocitos aislados, las células fueron incubadas en el medio estándar a 37°C. Una vez cargadas en presencia de 1mM Gly-Sar durante 30 minutos, se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ l que se centrifugaron durante 1 minuto.

Para comprobar que el dipéptido no era hidrolizado en el medio extracelular, se precipitaron las proteínas y se tomaron muestras del sobrenadante para la cromatografía.

A continuación y para estudiar la posible hidrólisis

intracelular, las células fueron rotas mediante shock osmótico (de esta manera la Gly-Sar secuestrada intracelularmente sale al exterior). Se precipitaron las proteínas y se tomaron muestras del sobrenadante para su estudio cromatográfico.

La glicina y la glicil-sarcosina fueron separadas por cromatografía en capa fina, utilizando placas de sílica-gel, y como fase móvil se empleó metanol/ acetonitrilo/ agua (9:0,5:0,5, v/v). Se dejaron correr durante 1 hora, al cabo de la cual, los patrones fueron identificados, revelando la placa con ninhidrina al 0,5 % en etanol absoluto. La sílica-gel correspondiente a la glicina y a la glicil-sarcosina fue raspada y recogida en viales de centelleo líquido para el conteo.

## II. 7. DETERMINACION DE LA PROTEINA

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

En primer lugar, se homogeneiza 1 ml de la suspensión celular que se diluye con agua destilada hasta el volumen deseado. A continuación, se mezcla 1 ml de la solución proteica diluida con 5 ml de una solución que contiene: tartrato

sódico potásico 0,2 g/l, carbonato sódico 20 g/l, hidróxido sódico 4 g/l y sulfato de cobre pentahidratado 0,1 g/l. Después de dejarlo 15 minutos en reposo, se añaden 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (Fosfomolibdeno - Fosfowolframio), previamente diluido a una concentración final de 1 mol/l. La mezcla se deja 30 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se lee su absorbancia en un espectrofotómetro (marca Shimatzu UU-110-02) a 750 nm.

El cálculo de la concentración de proteína se realiza en base a los datos obtenidos, paralelamente, con soluciones de concentración conocida de albúmina sérica bovina.

## 11. 8. MODO DE EXPRESAR LOS RESULTADOS

### 11. 8. 1. CALCULO DEL VOLUMEN EXTRACELULAR

El volumen extracelular se calculó por la siguiente expresión:

$$\mu\text{l/mg} = \frac{\text{DPM}_p \times U/v}{\text{DPM}_s \times 1/v \times \Pi}$$

en donde:

$\text{DPM}_p$ , desintegraciones por minuto de la muestra

tomada del pellet (muestra problema)

$DPM_s$ , desintegraciones por minuto de la muestra "standard", es decir, de la muestra tomada del medio de incubación,

$U$ , volumen de ácido perclórico en el que fue disgregado el pellet,

$v$ , volumen de la muestra que se toma para el conteo,

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

### 11. 8. 2. CALCULO DEL VOLUMEN INTRACELULAR

Para el cálculo del volumen intracelular (que al igual que el anterior se expresa en  $\mu\text{l}/\text{mg}$  proteína) se aplicó la siguiente ecuación:

$$\mu\text{l}/\text{mg} = \frac{DPM_p \times U/v \times C_i}{DPM_s \times 1/v \times M} - (U_e \times C_i)$$

en donde:

$DPM_p$ ,  $DPM_s$ ,  $U$ ,  $v$  y  $M$ , tienen el mismo significado

que en el apartado anterior,

$C_i$ , es la concentración del azúcar, y

$U_e$ , es el volumen extracelular expresado en  $\mu\text{l}/\text{mg}$

### II. 8. 3. CALCULO DE LA CAPTACION DE SUSTRATO

Los resultados se expresan en nmoles de sustrato /  $\mu\text{l}$  de volumen intracelular (o agua celular), calculándose de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{nmol}/\mu\text{l} = \frac{\text{DPM}_p \times U/v \times C_i}{\text{DPM}_s \times 1/v \times M} - (U_e \times C_i) / U_i$$

en donde:

$\text{DPM}_p$ ,  $\text{DPM}_s$ ,  $U$ ,  $v$ , y  $M$ , tienen el mismo significado que en el apartado II. 8. 1 de Material y Métodos,

$U_e$ , es el volumen extracelular (expresado en  $\mu\text{l}/\text{mg}$  de proteína),

$U_i$ , es el volumen intracelular del pellet

(expresado en  $\mu\text{l}/\text{mg}$  de proteína),

$C_i$ , concentración del sustrato en estudio, en el medio de incubación.

#### 11. 8. 4. CALCULO DE LA SALIDA DE $\text{Na}^{22}$

La salida de  $\text{Na}^{22}$  a lo largo del tiempo se calcula como %  $\text{Na}^{22}$  remanente en las células respecto al tiempo cero, y se expresa en forma de un coeficiente de velocidad aparente de salida.

Cuando las muestras se toman del medio extracelular, el  $\text{Na}^{22}$  remanente se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{Na}^{22} = 100 - \frac{\text{DPM}_t - \text{DPM}_{t_0}}{\text{DPM}_{t_f}} \cdot 100$$

siendo:

$\text{DPM}_t$ : desintegraciones por minuto a un tiempo determinado.

$\text{DPM}_{t_0}$ : desintegraciones por minuto a tiempo cero.

$DPM_{t_f}$ : desintegraciones por minuto a tiempo final.

Para el cálculo de esta velocidad se considera que el sodio sale de las células procedente de un único compartimiento celular, pudiendo describirse el flujo de salida por la siguiente expresión exponencial:

$$C_t = (C_0 - C_{\infty}) \times e^{-Kt} + C_{\infty} \quad \text{Ecuación 1}$$

en donde,

$t$ , es tiempo

$C_t$ ,  $C_0$  y  $C_{\infty}$  representa la radioactividad en las células a los tiempo  $t$ , 0 y  $\infty$ , respectivamente, y

$K$ , es una constante exponencial

Asumiendo que  $C_{\infty}$  es despreciable, la ecuación 1 queda:

$$C_t = C_0 \times e^{-Kt} \quad \text{Ecuación 2}$$

Tomando logaritmos neperianos:

$$\ln C_t = \ln C_0 - \ln e^{-Kt}$$

$$\ln C_t = \ln C_0 - Kt$$

$$K = \frac{\ln C_0 - \ln C_t}{t}$$

Los datos experimentales obtenidos , como se verá, son perfectamente descritos por la ecuación 2 ya que los puntos se ajustaban a una línea recta en una representación semilogarítmica, por lo que la suposición de que  $C_{\infty}$  es despreciable es, por tanto, correcta.

#### II. 8. 5. DETERMINACION DE LA ENTRADA DE TPP<sup>+</sup>

La entrada de TPP<sup>+</sup> se expresa en pmoles TPP<sup>+</sup>/mg proteína.

#### II. 9. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

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 ( $\Sigma$ ).

**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.

### **III. RESULTADOS**

### III. 1. VOLUMEN EXTRACELULAR.

Para el cálculo del volumen extracelular clásicamente se emplean moléculas, tales como inulina, manitol, polietilenglicol (PEG) 4.000, 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 PEG 4.000.

En la realización de estos experimentos se añadieron  $0,08 \mu\text{Ci/ml}$  [ $\text{C}^{14}$ ]PEG 4.000 a los 4 ml de suspensión celular y se procedió tal como se indica en el apartado II. 5. 3 de Material y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I. Como se puede observar el volumen extracelular no se modificó significativamente a lo largo del tiempo. Todos los resultados de la presente memoria sobre el transporte de sustratos en células aisladas de intestino delgado de pollo, han sido corregidos por el valor del volumen extracelular, que representa la media de los datos obtenidos en los distintos tiempos de incubación ( $2,99 \pm 0,04 \mu\text{l/mg}$  proteína,  $n=20$ ).

**Tabla I. Medida del volumen extracelular del pellet celular.** Se utilizó  $^{14}\text{C}$ -PEG como marcador. Los resultados se expresan en  $\mu\text{l}$  agua / mg proteína, y representan los valores medios acompañados de su error estándar, siendo n el nº de determinaciones independientes.

n	T (min):	$\mu\text{l}$ agua / mg proteína			
		1	5	15	30
5		3,0	2,9	3,2	3,0
		±	±	±	±
		0,3	0,2	0,2	0,1

### III. 2. VOLUMEN INTRACELULAR.

Para medir 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 a partir de la distribución en el equilibrio de 3-oximetilglucosa (1 mM) en presencia de 0,25 mM florricina (ver apartado II. 5. 6 de Material y Métodos). Los datos obtenidos sobre dicho parámetro dan un valor medio de  $3,6 \pm 0,2$   $\mu\text{l}/\text{mg}$  proteína (n=12), que está de acuerdo con el obtenido por Restrepo y Kimmich (1985).

Para el cálculo de la concentración intracelular de los distintos sustratos empleados en la presente memoria, se utilizará como volumen intracelular dicho valor.

En aquellos experimentos en los que se modificaron las condiciones experimentales o se introdujeron reactivos, también se hicieron algunas medidas simultáneas del volumen intracelular. Los resultados obtenidos, en cada caso, se incluyen en los distintos apartados del presente trabajo.

### **III. 3. ENTRADA DE GLY-SAR EN ENTEROCITOS AISLADOS DE POLLO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN.**

Para estudiar la capacidad de las células aisladas de intestino delgado de pollo para acumular el dipéptido Gly-Sar, se determinó la entrada del mismo a lo largo del tiempo de incubación.

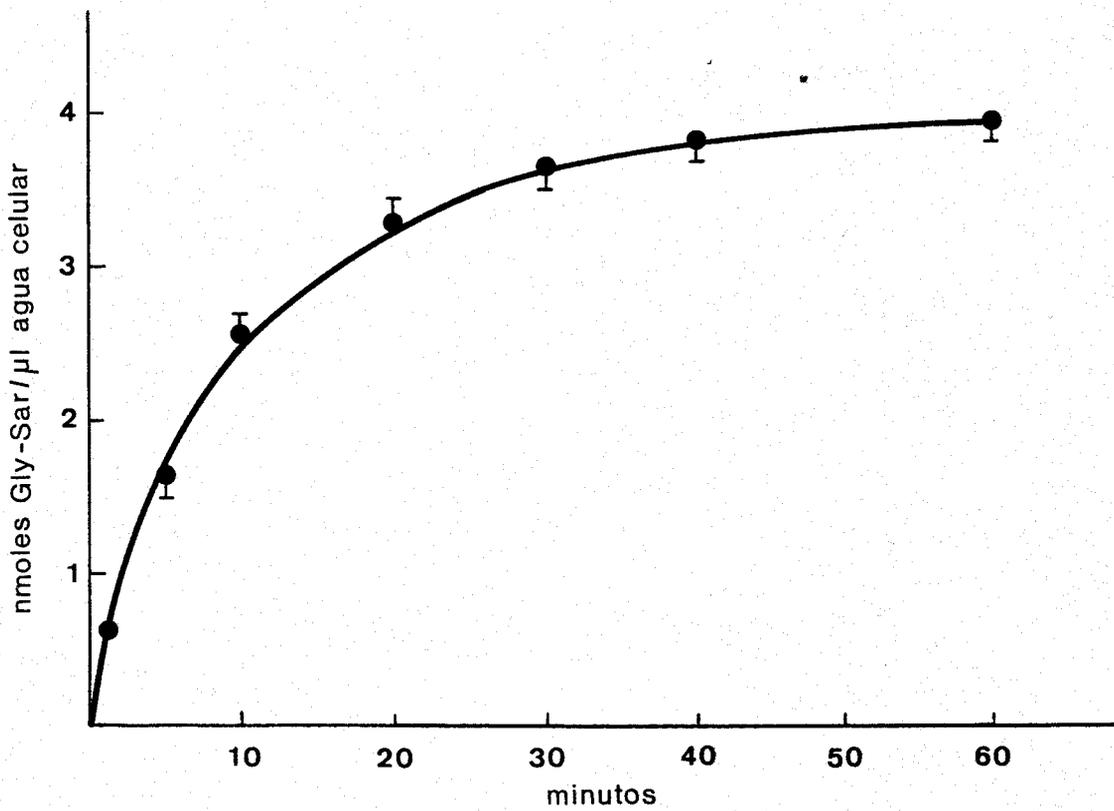
Se empleó una concentración del dipéptido de 1 mM y se procedió tal como se describe en el apartado II. 5. 3 de Material y Métodos.

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla II y Fig. 8, donde puede observarse que después de 30 minutos de incubación se alcanza el estado estacionario, con un valor de 12,9 nmol/mg proteína celular. Este valor permaneció constante durante más de 20 minutos de incubación.

Considerando que el volumen intracelular es 3,6  $\mu$ l/mg proteína (ver apartado III. 2 de Resultados), ya a los 5 minutos de incubación la relación concentración intracelular/concentración extracelular del dipéptido es mayor que 1, alcanzándose en el equilibrio una concentración intracelular de 3,6 mM.

**Tabla II. Entrada de Gly-Sar (1 mM) en células aisladas de intestino delgado de pollo, en función del tiempo de incubación. Los resultados se acompañan  $\pm$  SEM.**

Tiempo (min)	n	nmol / $\mu$ l agua celular
1	8	0,6 $\pm$ 0,08
5	8	1,6 $\pm$ 0,09
10	8	2,7 $\pm$ 0,06
15	8	2,8 $\pm$ 0,09
20	8	3,3 $\pm$ 0,15
30	8	3,6 $\pm$ 0,10
40	8	3,8 $\pm$ 0,13
60	8	3,9 $\pm$ 0,07



**Fig. 8.** Entrada de 1 nM Gly-Sar (●) en células aisladas de intestino delgado de pollo en función del tiempo de incubación.

### III. 4. ESTIMACION DE LA HIDROLISIS DE GLY-SAR.

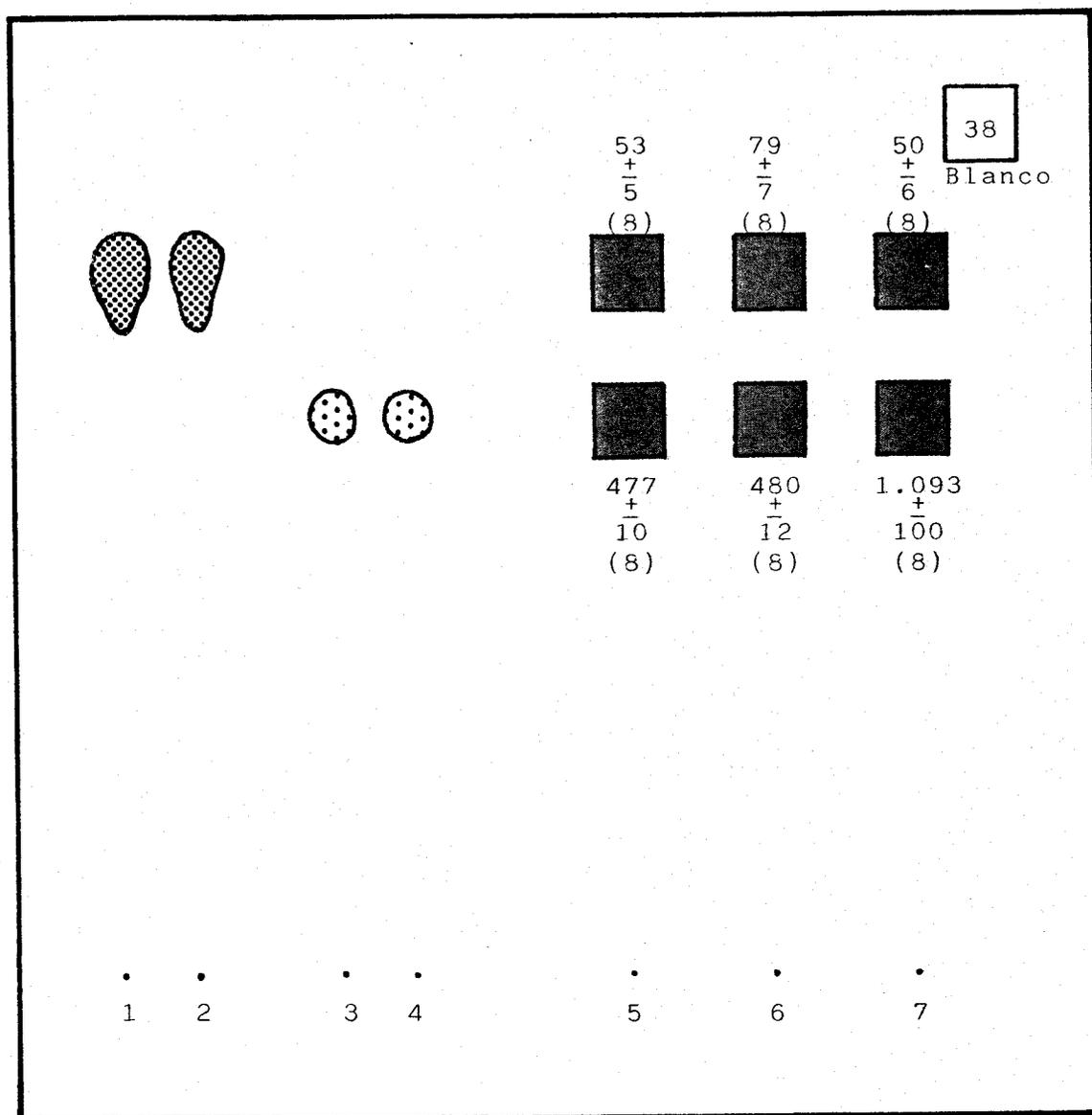
#### 4. 1. ESTUDIO CROMATOGRAFICO.

Como ya se ha indicado en la Introducción, la Gly-Sar es un dipéptido no natural, altamente resistente a la hidrólisis, por lo que ha sido utilizado en estudios de transporte tanto con preparaciones de tejido intacto (Matthews, 1975a) como por vesículas de membrana del borde en cepillo (Ganapathy *et al.*, 1984). El único enzima conocido capaz de hidrolizar este dipéptido es una prolidasa, EC 3.4.13.9 (Ganapathy *et al.*, 1982) localizada en el citosol.

Para comprobar que el dipéptido era efectivamente acumulado por las células en forma intacta, y no como  $^{14}\text{C}$ -Glicina resultante de su hidrólisis, se realizó un estudio cromatográfico de muestras recogidas tanto del medio extracelular como del interior de los enterocitos (ver apartado II. 6 de Material y Métodos).

Los resultados obtenidos (Fig. 9) muestran que no se produjo hidrólisis detectable del dipéptido en el medio tras 15 y 30 minutos de incubación.

Por otro lado, los experimentos llevados a cabo para estudiar la hidrólisis intracelular de la Gly-Sar revelaron que el dipéptido permaneció intacto, tras 15 y



**Fig. 9. Cromatografía en capa fina.** La fase estacionaria utilizada ha sido sílica-gel y la fase móvil metanol:acetonitrilo:agua (9:0,5:0,5, v/v). El tiempo de recorrido fue aproximadamente 1 hora.

1 y 2: Patrones de glicina. (Las manchas eran de color violeta).

3 y 4: Patrones de Gly-Sar. (Las manchas eran de color amarillo).

5: Muestras del medio intracelular tras incubar 15 minutos en presencia de Gly-Sar.

6: Muestras del medio intracelular tras incubar 30 minutos en presencia de Gly-Sar.

7: Muestras del medio extracelular tras incubar 30 minutos en presencia de Gly-Sar.

■ Zonas raspadas para el conteo.

Los resultados obtenidos se expresan en d.p.m. y se acompañan  $\pm$  S.E.M. El número de datos se indica entre paréntesis.

30 minutos de incubación, en un 90 y 85%, respectivamente.

#### 4. 2. EFECTO DE LA L-METIONINA.

Un método indirecto para averiguar si la Gly-Sar es hidrolizada extracelularmente, es decir por peptidasas localizadas en el borde en cepillo, es ver si su captación celular se ve modificada por aminoácidos que compiten con la glicina o con la sarcosina. En nuestro caso nos interesaba emplear un aminoácido que compitiera con la glicina, ya que es este aminoácido el que porta el marcaje. La L-metionina es un aminoácido que tiene gran afinidad por el sistema de transporte de la L-glicina (Sepúlveda y Smyth, 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 el medio de incubación contenía L-metionina (10 mM), Gly-Sar (1 mM) y trazas de Gly-Sar marcada con  $^{14}\text{C}$ . Si la Gly-Sar hubiera sufrido hidrólisis extracelular, la L-metionina habría disminuido marcadamente la acumulación de la glicina por los enterocitos.

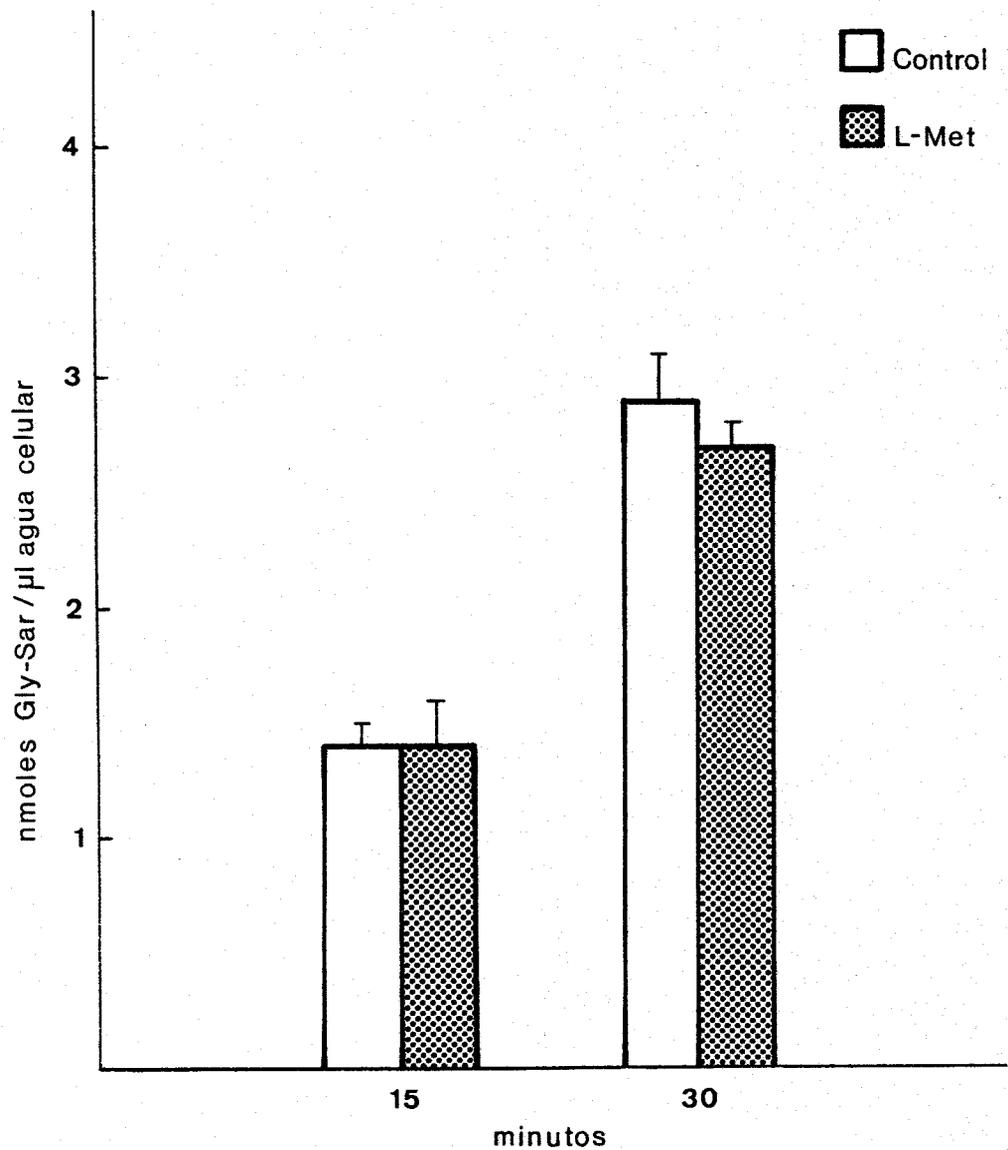
En la Tabla III y figura 10, se puede observar que la L-metionina produjo una ligera, pero no significativa

inhibición en la acumulación de Gly-Sar a tiempos largos, corroborando los resultados obtenidos en el estudio cromatográfico.

Tabla III. Efecto de la L-Metionina (10 mM) sobre la entrada de Gly-Sar (1 mM) en células aisladas de intestino delgado de pollo. Los resultados se expresan en nmol Gly-Sar /  $\mu$ l agua celular, a los 15 y 30 minutos de incubación, y se acompañan  $\pm$  SEM. n=nº de datos.

	n	T (min):	nmol Gly-Sar/ $\mu$ l agua celular	
			15	30
Control	9		1,4 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,2
L-Net	9		1,4 <sup>NS</sup> $\pm$ 0,2	2,7 <sup>NS</sup> $\pm$ 0,1

NS: diferencia no significativa.



**Fig. 10.** Efecto de la 10mM L-Met sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar en células aisladas de intestino delgado de pollo. En ordenadas se indica la concentración intracelular del dipéptido.

### III. 5. CINETICA DEL TRANSPORTE DE GLICIL-SARCOSINA.

Se ha realizado un estudio cinético del transporte de Gly-Sar por enterocitos aislados de pollo. Para ello medimos la velocidad de entrada del dipéptido en un rango de concentraciones de 0,1 a 50 mM, en presencia de 80 mM Na<sup>+</sup> y a pH 6,0. La osmolaridad del medio de incubación se mantuvo disminuyendo la cantidad de manitol en 50 mM.

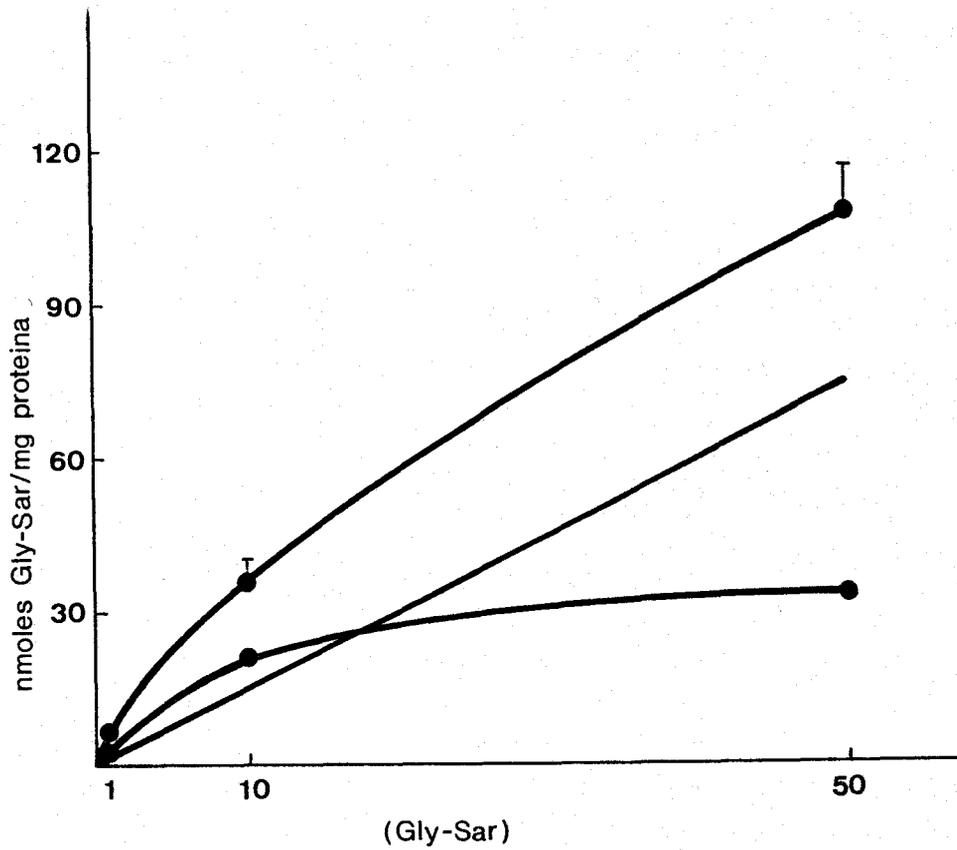
Los resultados presentes en la Tabla IV y Fig. 11 sugieren que en el transporte del dipéptido se incluyen dos componentes distintos. Uno es saturable (mediado por carrier) y el otro es no saturable (difusión simple).

Se ha estimado la difusión por el método gráfico descrito por Neame y Richards (1972), según el cual se dibuja una recta a través del origen de la gráfica de la velocidad frente a la concentración, paralela a la porción lineal de la curva observada a concentraciones muy altas.

A continuación, se ha determinado el componente mediado sustrayendo de la absorción total, la producida por difusión. La representación gráfica de estos resultados según el método de Lineweaver-Burk es una línea recta, lo que nos indica que un sólo componente está implicado en el transporte mediado de Gly-Sar (Fig. 12). Los valores para la constante aparente de transporte y la velocidad máxima son:  $K_t=8$  mM y  $U_{max}=31$  nmol Gly-Sar/ mg proteína/ min, respectivamente.

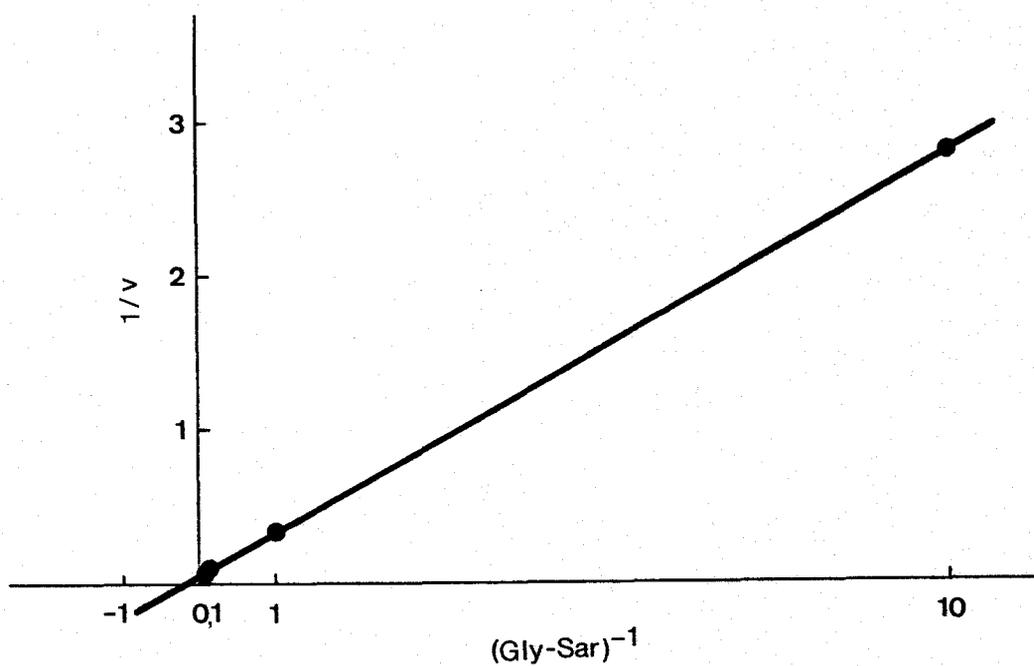
**Tabla IV. Entrada de Gly-Sar en células aisladas de intestino delgado de pollo, en función de la concentración de Gly-Sar en el medio de incubación.**

		nmol Gly-Sar/mg proteína/minuto			
n	[Gly-Sar]:	0,1	1	10	50
<b>Absorción total</b>	4	0,51 ± 0,03	4,5 ± 0,5	36 ± 4	108 ± 10
<b>Difusión</b>		0,15	1,5	15	75
<b>Transporte mediado</b>		0,36	3	21	33



**Fig. 11. Entrada de Gly-Sar en función de su concentración en el medio de incubación. Las incubaciones fueron de 1 minuto y las concentraciones de sustrato ensayadas fueron 0,1; 1; 10 y 50 mM.**

- 1: Entrada total
- 2: Componente pasivo
- 3: Componente mediado



**Fig. 12.** Representación gráfica según el método de Lineweaver-Burk de los valores de transporte mediado de Gly-Sar, descritos en la Fig. anterior.

### III. 6. INHIBICION DE LA CAPTACION DE GLY-SAR POR LA CARNOSINA.

La  $\beta$ -alanil-histidina o carnosina es otro dipéptido altamente resistente a la hidrólisis, por lo que fue elegido para estudiar si inhibía la captación de la Gly-Sar y si esta inhibición era o no de tipo competitivo.

Los experimentos se realizaron en presencia de  $\text{Na}^+$ , utilizando dos concentraciones de sustrato: 0,1 y 1 mM y tres concentraciones de inhibidor: 1, 5 y 10 mM.

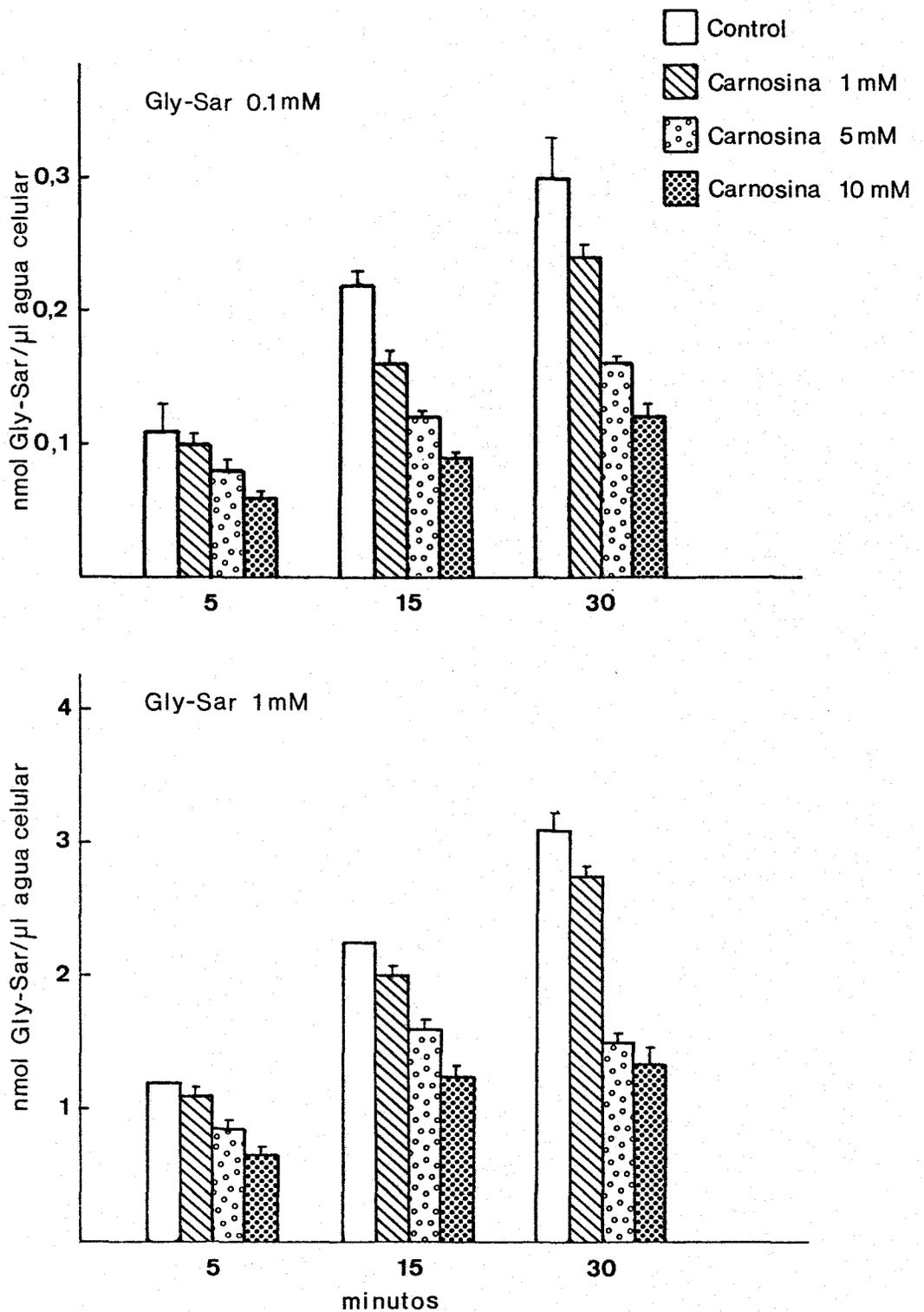
Los resultados obtenidos a los distintos tiempos de incubación se muestran en la Tabla V y Fig. 13. A partir de los mismos hemos calculado por regresión matemática los valores correspondientes a 1 minuto de incubación, que han sido utilizados para el cálculo de las distintas constantes cinéticas.

Para el estudio cinético hemos utilizado el método de Dixon. Así, representando el inverso de la velocidad frente a la concentración de inhibidor, hemos comprobado que la inhibición es de tipo competitivo (ver Fig. 14). La constante de inhibición calculada por dicho método es 12 mM. Este tipo de representación también nos permite calcular la constante aparente de transporte,  $K_t$  y la velocidad máxima,  $V_{\text{max}}$ , siendo los valores obtenidos: 6,3 mM y 6,5 nmol / mg proteína / min, respectivamente.

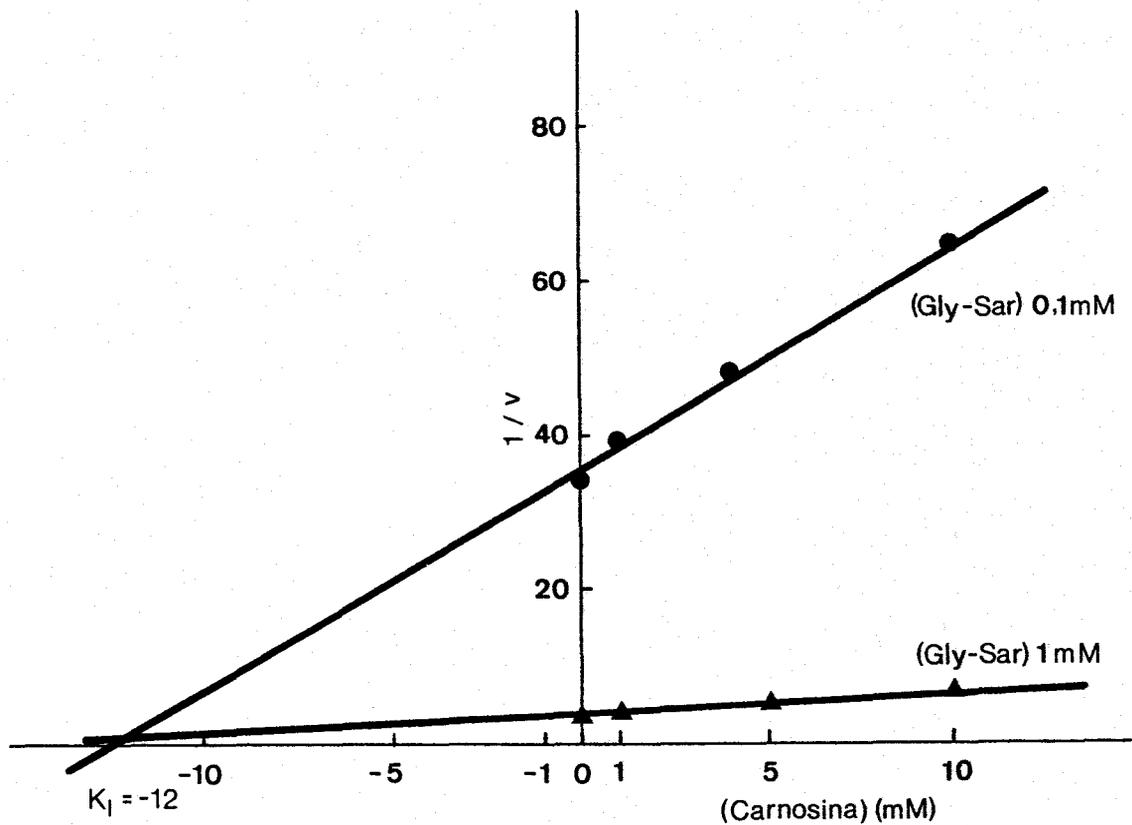
**Tabla U. Efecto de la carnosina sobre la entrada de Gly-Sar en células aisladas de intestino delgado de pollo. Se han utilizado dos concentraciones de Gly-Sar (0,1 y 1 mM) y tres de carnosina (1, 5 y 10 mM).**

	n	T (min):	nmol Gly-Sar/ $\mu$ l agua celular		
			5	15	30
<b>Gly-Sar (0,1 mM)</b>					
Control	6		0,12 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,03
Carnosina (1 mM)	6		0,10 $\pm$ 0,007	0,16 <sup>***</sup> $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01
Carnosina (5 mM)	6		0,08 $\pm$ 0,008	0,12 <sup>*</sup> $\pm$ 0,005	0,16 <sup>*</sup> $\pm$ 0,006
Carnosina (10 mM)	6		0,06 <sup>***</sup> $\pm$ 0,004	0,09 <sup>*</sup> $\pm$ 0,005	0,12 <sup>*</sup> $\pm$ 0,01
<b>Gly-Sar (1 mM)</b>					
Control	6		1,20 $\pm$ 0,04	2,26 $\pm$ 0,04	3,11 $\pm$ 0,13
Carnosina (1 mM)	6		1,10 $\pm$ 0,07	2,02 <sup>**</sup> $\pm$ 0,08	2,46 <sup>**</sup> $\pm$ 0,08
Carnosina (5 mM)	6		0,86 <sup>**</sup> $\pm$ 0,07	1,62 <sup>*</sup> $\pm$ 0,08	1,52 <sup>*</sup> $\pm$ 0,08
Carnosina (10 mM)	6		0,65 <sup>*</sup> $\pm$ 0,07	1,25 <sup>*</sup> $\pm$ 0,09	1,37 <sup>*</sup> $\pm$ 0,12

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,005 > p > 0,001$ ; \*\*\*  $0,025 > p > 0,01$ ; respecto a los valores control.



**Fig. 13. Efecto de la carnosina sobre la entrada de Gly-Sar (0,1 y 1 mM) en células aisladas de intestino delgado de pollo. Se ensayaron tres concentraciones de inhibidor.**



**Fig. 14. Inhibición del transporte de Gly-Sar por distintas concentraciones de carnosina.** La velocidad del transporte de Gly-Sar se expresa en nmoles/ $\mu$ l agua celular/minuto. Los datos son representados según el método de Dixon ( $1/v$  vs concentración de inhibidor). (●) 0,1 mM Gly-Sar; (▲) 1 mM Gly-Sar.

### III. 7. EFFECTO DEL SODIO SOBRE LA CAPTACION DE GLY-SAR.

El hecho de que el transporte de Gly-Sar muestre una cinética de saturación y que la carnosina inhiba de forma competitiva la entrada del dipéptido nos indica que dicho transporte es mediado por transportador. Además, el que la Gly-Sar alcance en el interior de las células una concentración superior a su concentración en el medio extracelular, sugiere que dicho proceso está mediado por un mecanismo activo.

Es bien conocido que el transporte de muchas sustancias orgánicas (ver apartado 1. 2. 1 de Introducción) está acoplado al transporte activo primario de  $\text{Na}^+$ , por lo que la ausencia de dicho catión y/o la anulación del gradiente transmembrana del  $\text{Na}^+$  inhibe todos aquellos procesos de transporte dependientes de dicho transporte primario.

Para ver si el sistema de transporte de la Gly-Sar era o no dependiente del sodio se realizaron dos tipos de experimentos, el primero, consistente en la medida de la captación de Gly-Sar en ausencia de  $\text{Na}^+$  en el medio de incubación y el segundo, en presencia de ouabaína, conocido inhibidor de la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

### 7. 1. AUSENCIA DE SODIO.

Se realizaron una serie de experimentos en los que el  $\text{Na}^+$  del medio de incubación fue sustituido total o parcialmente por cantidades isoosmóticas de manitol (ver apartado II. 3. 1 de Material y Métodos).

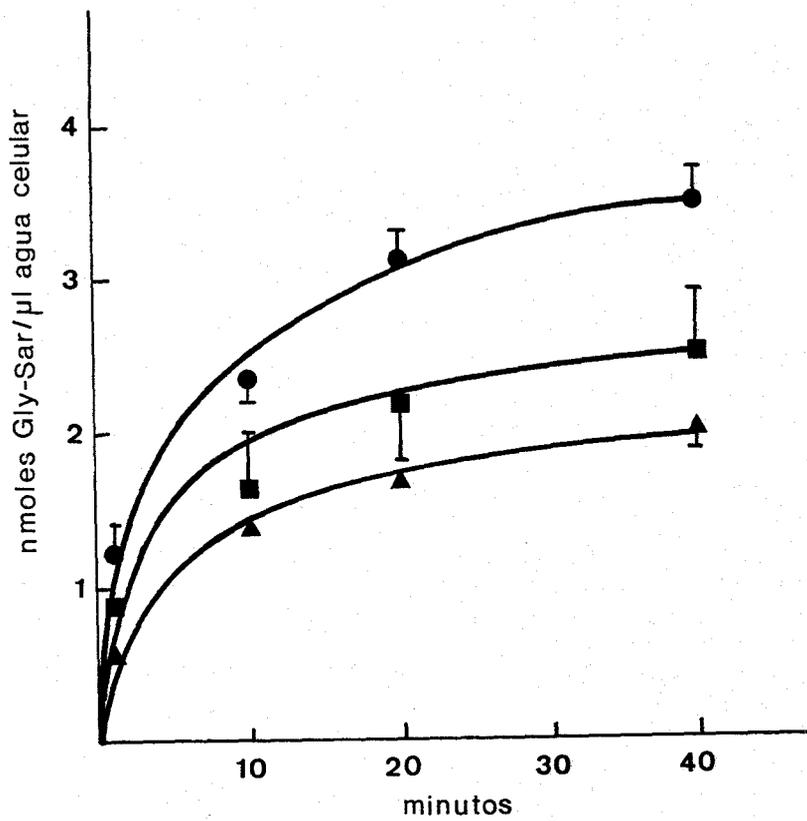
Los resultados se resumen en la Tabla VI y Fig. 15 y muestran que la sustitución parcial del  $\text{Na}^+$ , hasta una concentración de 40 mM, produjo una ligera inhibición en la entrada de Gly-Sar, siendo la acumulación intracelular del dipéptido en el estado estacionario un 70% de la alcanzada en condiciones control (80 mM  $\text{Na}^+$ ). Esta disminución se vió aumentada al eliminar totalmente el sodio, así bajo estas condiciones la velocidad inicial de entrada del dipéptido fue de un 50% y la acumulación en el estado de equilibrio un 57%, aproximadamente, respecto al control. Es importante señalar que en ambos casos la concentración intracelular fue mayor que 1.

Se realizaron medidas simultáneas del volumen intracelular en presencia y ausencia de  $\text{Na}^+$ , observándose que la eliminación de dicho ión no lo modificaba (ver Tabla VII).

Tabla UI. Entrada de Gly-Sar (1 mM) en células aisladas de intestino delgado de pollo, a distintas concentraciones de  $\text{Na}^+$  del medio de incubación. Se ensayaron tres concentraciones de  $\text{Na}^+$ : 80, 40 y 0 mM.

		nmol Gly-Sar / $\mu\text{l}$ agua celular				
	n	T (min):	1	10	20	40
Control	9		1,2 ±	2,3 ±	3,1 ±	3,5 ±
			0,2	0,1	0,2	0,2
[ $\text{Na}^+$ ] = 40 mM	6		0,9 ±	1,6 ±	2,2 ±	2,5 <sup>**</sup> ±
			0,2	0,4	0,4	0,4
[ $\text{Na}^+$ ] = 0 mM	9		0,6 <sup>**</sup> ±	1,4 <sup>*</sup> ±	1,7 <sup>*</sup> ±	2,0 <sup>*</sup> ±
			0,2	0,06	0,06	0,1

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,05 > p > 0,025$ ; respecto al control.



**Fig. 15. Acumulación de 1mM Gly-Sar por células aisladas de intestino delgado de pollo, con distintas concentraciones de Na<sup>+</sup> en el medio de incubación. (●) 80 mM Na<sup>+</sup>; (■) 40 mM Na<sup>+</sup> y (▲) 0 mM Na<sup>+</sup>.**

**Tabla VII. Efecto de la presencia y ausencia de sodio del medio de incubación sobre el volumen intracelular. El  $\text{Na}^+$  fue sustituido por cantidades isoosmóticas de manitol. Se utilizó 3-OMG (1 mM) y florricina (0,25 mM). El tiempo de incubación fue 30 minutos. Datos  $\pm$  SEM.**

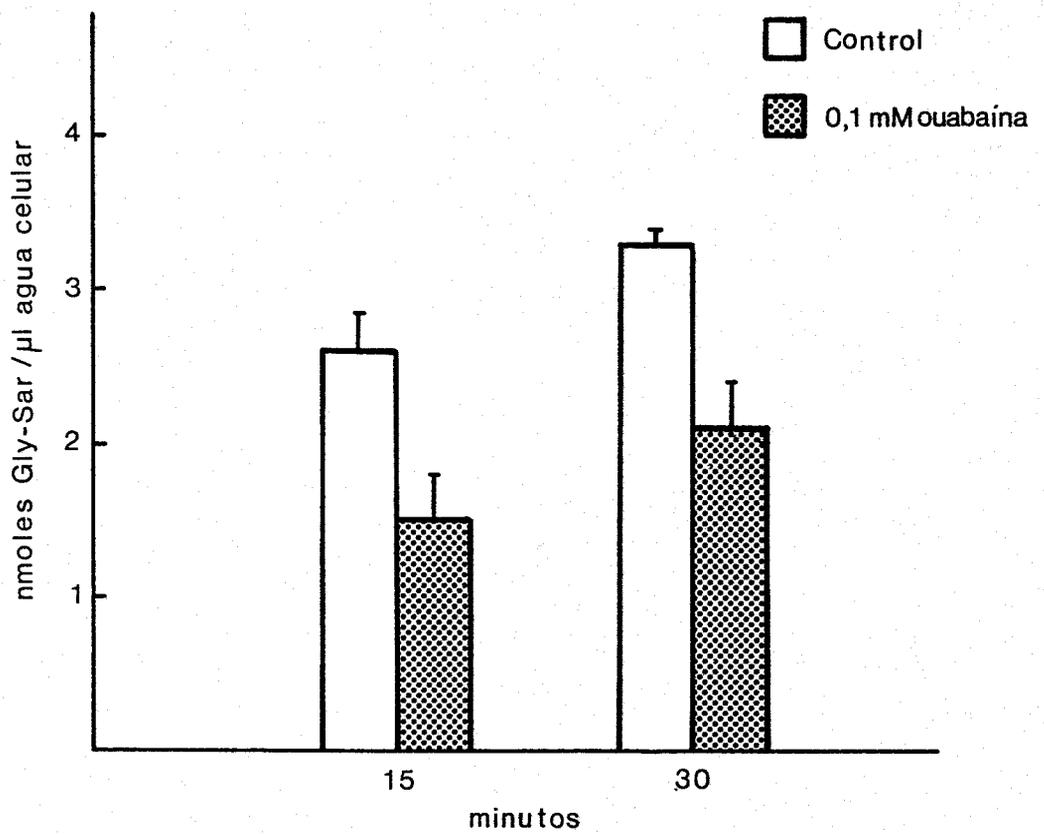
[ $\text{Na}^+$ ];	$\mu\text{l}$ agua celular/mg proteína	
	80 mM	0 mM
$\bar{X}$	3,8	3,7
	$\pm$	$\pm$
$\Sigma$	0,2	0,2
n	(6)	(6)

## 7. 2. EFECTO DE LA OUABAINA.

La ouabaina, glicósido cardiotónico, inhibe la  $\text{ATPasa-Na}^+-\text{K}^+$  y en consecuencia anula el gradiente transmembrana de sodio (Van Os *et al.*, 1984).

Estos experimentos se realizaron solo a dos tiempos: 15 y 30 minutos. La concentración de ouabaina utilizada fue de 0,1 mM.

En la Tabla VIII y Fig. 16 puede observarse que la presencia de ouabaina inhibió significativamente la captación del dipéptido, aunque la concentración intracelular del mismo fue mayor que 1 en los dos tiempos utilizados.



**Fig. 16. Efecto de la 0,1 mM ouabaina sobre la acumulaci3n de 1 mM Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo. La concentraci3n de Na<sup>+</sup> fue 80 mM.**

Tabla VIII. Efecto de la ouabaina (0,1 mM) sobre la acumulación de Gly-Sar (1 mM) en enterocitos aislados de pollo.  $[Na^+] = 80$  mM.

	n	T (min):	nmol Gly-Sar/ $\mu$ l agua celular	
			15	30
<b>Control</b>	5		2,6 ± 0,3	3,3 ± 0,08
<b>Ouabaina</b>	5		1,5** ± 0,3	2,1* ± 0,3

\*  $0,005 > p > 0,001$ ; \*\*  $0,025 > p > 0,01$ ; respecto al control.

### III. 8. EFFECTO DEL pH EXTRACELULAR.

#### 8.1. ENTRADA DE GLY-SAR A DISTINTOS VALORES DE pH EN EL MEDIO DE INCUBACION.

Como ya se ha mencionado a lo largo de la Introducción en la presente Memoria, algunos autores postulan que es el gradiente transmembrana de protones el que proporciona la energía necesaria para el transporte de dipéptidos y que la dependencia del gradiente de sodio, observada en tejido intacto, podría ser un efecto indirecto. Asimismo, los experimentos realizados para estudiar el efecto del sodio sobre el transporte de Gly-Sar parecen revelar una cierta dependencia entre la captación del dipéptido y la presencia de un gradiente transmembrana de  $\text{Na}^+$ .

Por todo ello se hicieron una serie de experimentos en los que se estudiaba el efecto del pH del medio de incubación sobre el transporte de Gly-Sar en enterocitos.

Se han ensayado cuatro valores de pH 7,4; 6,0; 5,5 y 5,0, en presencia de  $\text{Na}^+$  y con células aisladas a pH 7,4.

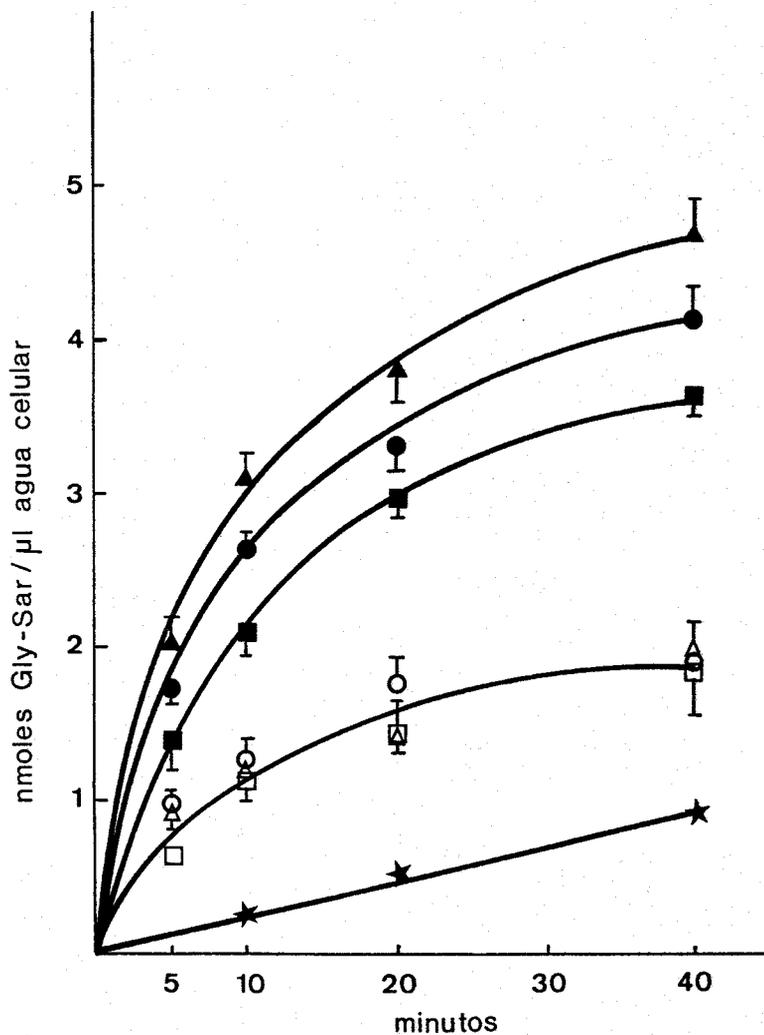
A pH 6,0 se observa una estimulación tanto en la

**Tabla IX. Efecto del pH del medio de incubación sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar, en células aisladas de intestino delgado de pollo. Datos  $\pm$  SEM.**

	n	T (min):	nmol Gly-Sar / $\mu$ l agua celular			
			5	10	20	40
pH 7,4	24		1,5 $\pm$ 0,08	2,3 $\pm$ 0,10	3,1 $\pm$ 0,12	4,0 $\pm$ 0,10
pH 6,0	15		1,9** $\pm$ 0,12	2,7 $\pm$ 0,17	3,5*** $\pm$ 0,14	4,7* $\pm$ 0,15
pH 5,5	7		1,4 $\pm$ 0,18	2,1 $\pm$ 0,17	3,0 $\pm$ 0,17	3,6** $\pm$ 0,09
pH 5,0	7			0,3* $\pm$ 0,07	0,5* $\pm$ 0,06	0,9* $\pm$ 0,1

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,01 > p > 0,005$ ; \*\*\*  $0,05 > p > 0,025$ .

Los datos se compararon con los obtenidos a pH 7,4 (controles).



**Fig. 17. Efecto del pH extracelular y del ionóforo de  $H^+$ , FCCP, sobre la entrada de Gly-Sar (1 mM) en enterocitos aislados. Las células fueron aisladas a pH 7,4 e incubadas a pH 7,4 (●,○), 6,0 (▲,△), 5,5 (■,□) o 5,0 (★). El FCCP, disuelto en etanol absoluto, se añadió a una concentración final de 50  $\mu$ M (símbolos blancos).**

**Tabla X. Medida del volumen intracelular a diferentes pH.** Se utilizó 3-OMG (1 mM) y florricina (0,25 mM). El tiempo de incubación fue de 30 min. Los datos representan valores medios ( $\bar{X}$ ) acompañados de su error estándar ( $\Sigma$ ) y n es el número de determinaciones para cada condición experimental.

$\mu\text{l}$ agua celular/mg proteína			
pH:	7,4	6,0	5,0
$\bar{X}$	3,6	3,5	3,6
	$\pm$	$\pm$	$\pm$
$\Sigma$	0,1	0,1	0,1
n	(12)	(6)	(6)

velocidad inicial como en la acumulación intracelular del dipéptido alcanzada en el estado de equilibrio (ver Tabla IX y Fig. 17). No así a pH 5,5, donde los valores fueron muy similares a los obtenidos a pH 7,4. Por otro lado, a pH 5,0 el sistema de transporte parece ser no funcional, ya que después de 40 minutos de incubación la concentración intracelular de Gly-Sar fue similar a la presente en el medio de incubación.

El volumen intracelular no se modificó al variar el pH del medio de incubación (Tabla X).

También estudiamos la entrada del dipéptido a pH 6,0, en ausencia de  $\text{Na}^+$ . Como se puede observar en la Tabla XI y Fig. 18, La disminución del pH no modificó la entrada de Gly-Sar al eliminar el  $\text{Na}^+$  del medio de incubación.

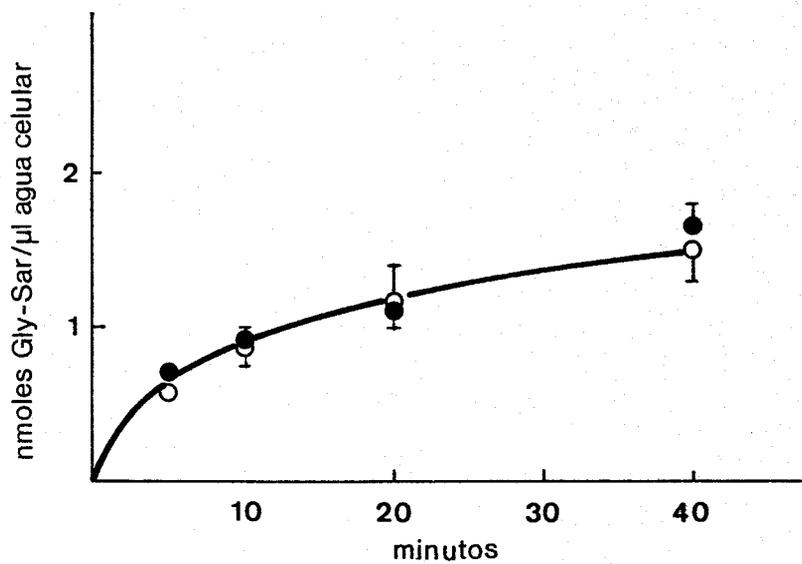
## 8. 2. EFECTO DEL FCCP.

La presencia del ionóforo de protones FCCP (carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona) inhibió la captación de Gly-Sar a los tres valores de pH ensayados (7,4, 6,0 y 5,5) (Tabla XII y Fig. 17).

Con objeto de clarificar si la acción del FCCP era debida a una inhibición específica del transporte dependiente de protones, estudiamos el efecto del FCCP

**Tabla XI. Entrada de Gly-Sar en células aisladas de intestino delgado de pollo, sin  $\text{Na}^+$  y con distintos pHs del medio de incubación.**

		nmol Gly-Sar/ $\mu\text{l}$ agua celular				
	n	T (min):	5	10	20	40
pH 7,4	8		0,7	0,9	1,1	1,7
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
			0,04	0,1	0,1	0,1
pH 6,0	8		0,6	0,9	1,2	1,5
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
			0,06	0,1	0,2	0,2



**Fig. 18. Entrada de 1 mM Gly-Sar en células aisladas de intestino delgado de pollo, en ausencia de  $\text{Na}^+$ , a pH 7,4 (●) y a pH 6,0 (○).**

sobre la captación de 3-OMG. Este sistema de transporte ha sido ampliamente estudiado, y es bien conocido que depende del gradiente transmembrana de  $\text{Na}^+$ . En la Tabla XIII y Fig. 19 se puede observar que el FCCP disminuyó la entrada del azúcar.

Los efectos del pH y del FCCP sobre la captación de sustratos no fueron debidos a cambios en el volumen celular, ya que ninguno de ellos modificó significativamente este parámetro (ver Tablas X y XIU).

Para ver si la Gly-Sar se unía a componentes intracelulares, en cuyo caso la acumulación intracelular alcanzada en el estado estacionario, 3,6 mM (ver apartado III. 3 de Resultados) no sería real, realizamos una serie de experimentos en los que el FCCP (25  $\mu\text{M}$ ) se añadió a la suspensión celular cuando ya se había alcanzado el estado estacionario de acumulación para la Gly-Sar. En este momento y dado que el FCCP inhibe la acumulación del dipéptido en el estado estacionario, deberíamos observar una salida del mismo desde el interior de las células.

En la Tabla XV y Fig. 20 se muestra como el FCCP provocó una salida del dipéptido, aproximándose su concentración intracelular, al cabo de 30 minutos, a la concentración del medio extracelular. Esta observación nos indica que las células son capaces de establecer un gradiente real para el dipéptido. Se ha calculado

**Tabla XII. Efecto del 50  $\mu$ M FCCP sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo, a distintos pHs del medio de incubación.**

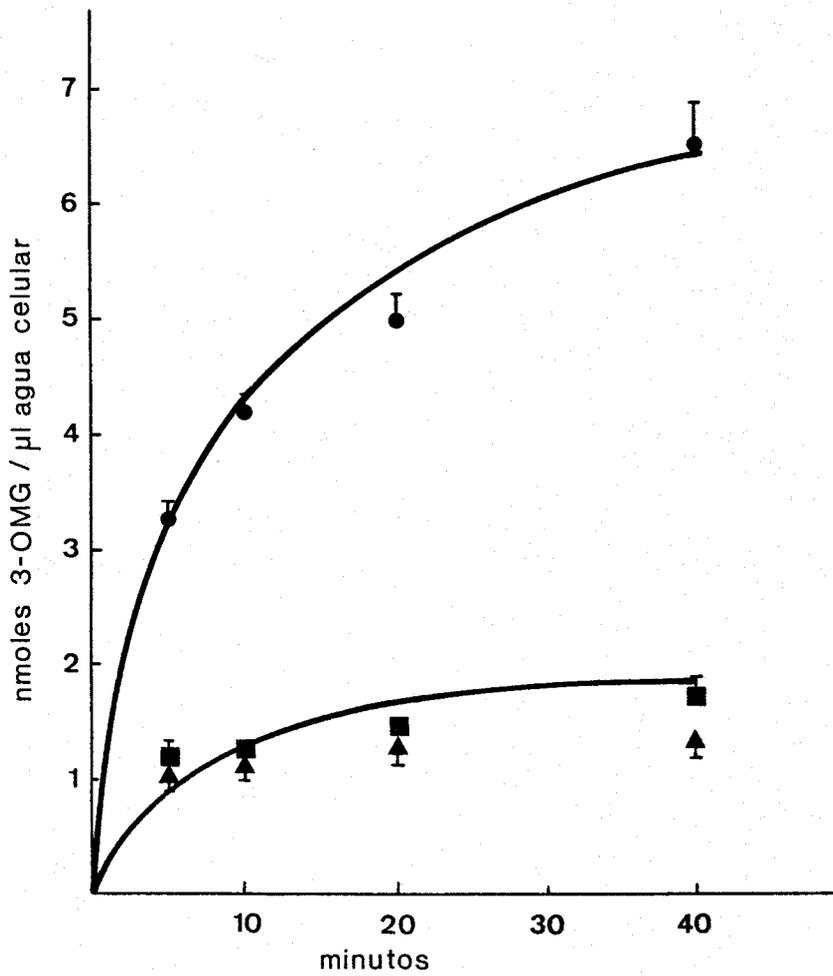
		nmol Gly-Sar / $\mu$ l agua celular				
	n	T (min):	5	10	20	40
<b>pH 7,4</b>						
Control	8		1,7 $\pm$ 0,06	2,7 $\pm$ 0,06	3,3 $\pm$ 0,15	4,2 $\pm$ 0,15
FCCP	8		1,0* $\pm$ 0,06	1,3* $\pm$ 0,08	1,8* $\pm$ 0,13	1,9* $\pm$ 0,11
<b>pH 6,0</b>						
Control	8		2,0 $\pm$ 0,19	3,1 $\pm$ 0,15	3,8 $\pm$ 0,19	4,7 $\pm$ 0,20
FCCP	8		0,9* $\pm$ 0,14	1,2* $\pm$ 0,12	1,4* $\pm$ 0,11	2,0* $\pm$ 0,14
<b>pH 5,5</b>						
Control	7		1,4 $\pm$ 0,18	2,1 $\pm$ 0,17	3,0 $\pm$ 0,17	3,6 $\pm$ 0,09
FCCP	7		0,6*** $\pm$ 0,02	1,1** $\pm$ 0,08	1,4* $\pm$ 0,20	1,8* $\pm$ 0,24

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,005 > p > 0,001$ ; \*\*\*  $0,005 > p > 0,025$ ; respecto a los valores control.

**Tabla XIII. Efecto del FCCP sobre la entrada de 1 mM 3-OMG en enterocitos aislados de pollo.**

	n	T (min):	nmol 3-OMG / $\mu$ l agua celular			
			5	10	20	40
<b>Control</b>	4		3,3 $\pm$ 0,12	4,2 $\pm$ 0,14	5,0 $\pm$ 0,19	6,6 $\pm$ 0,28
<b>FCCP (25 <math>\mu</math>M)</b>	4		1,0* $\pm$ 0,10	1,1* $\pm$ 0,12	1,2* $\pm$ 0,09	1,3* $\pm$ 0,10
<b>FCCP (50 <math>\mu</math>M)</b>	4		1,2* $\pm$ 0,10	1,1* $\pm$ 0,03	1,4* $\pm$ 0,05	1,8* $\pm$ 0,10

\*  $p < 0,001$  respecto a los valores control.



**Fig. 19. Efecto del FCCP sobre la entrada de 1 nM 3-OMG en enterocitos aislados de pollo. Se ensayaron dos concentraciones de FCCP: 25 (▲) y 50 μM (■). Control: ●.**

Tabla XIV. Efecto del FCCP sobre el volumen intracelular.

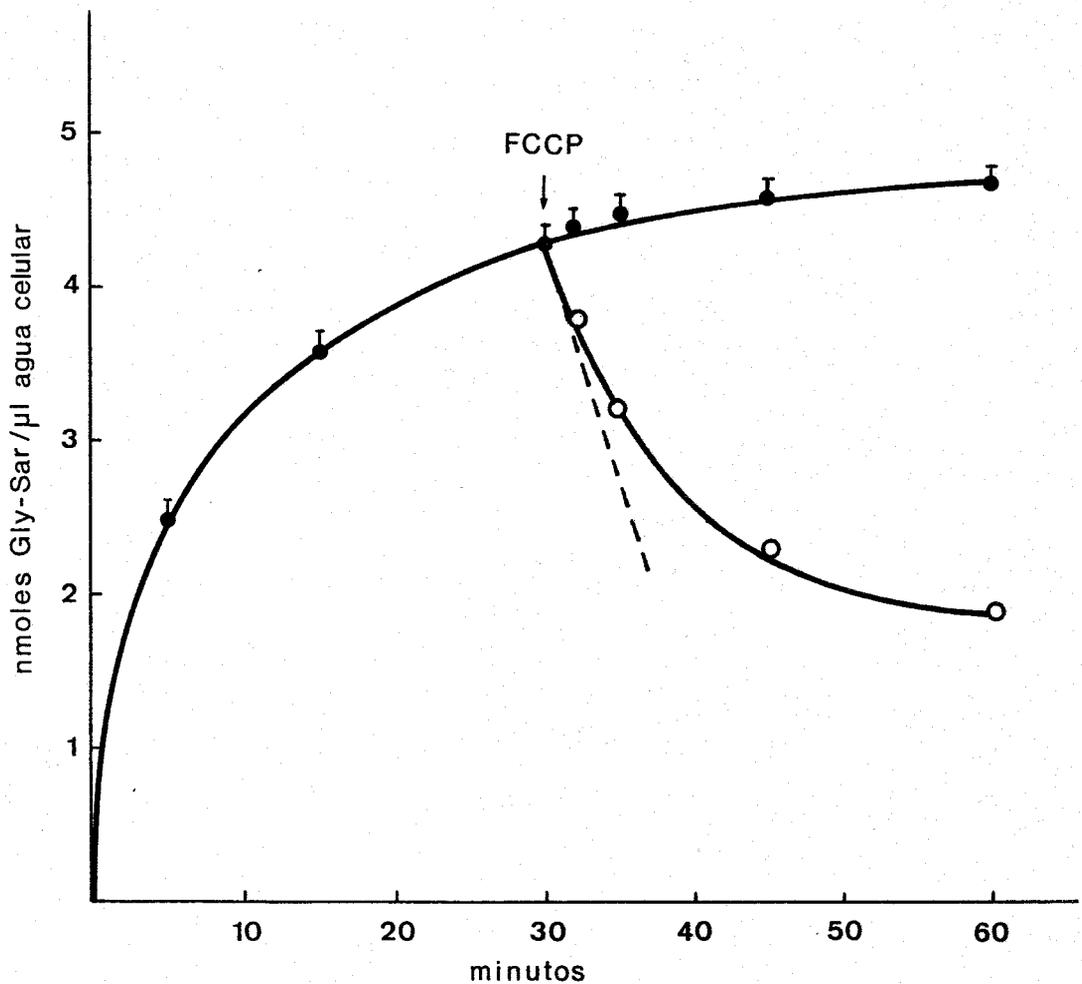
	$\mu\text{l}$ agua celular/mg proteína	
	Control	FCCP
$\bar{X}$	3,6	3,5
	$\pm$	$\pm$
$\Sigma$	0,2	0,2
n	(5)	(5)

gráficamente la velocidad inicial de salida de la Gly-Sar, trazando la tangente a la curva de salida. El valor obtenido es  $0,25 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{l agua celular}$ .

**Tabla XV. Efecto del FCCP (25  $\mu$ M) sobre la acumulación en el estado estacionario de Gly-Sar (1 mM) en enterocitos aislados de pollo. El FCCP se añadió a los 30 minutos de incubación.**

		nmol Gly-Sar / $\mu$ l agua celular						
n	T (min):	5	15	30	32	35	45	60
<b>Control</b>	12	2,5	3,6	4,3	4,4	4,5	4,6	4,7
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>FCCP (25 <math>\mu</math>M)</b>	9				3,8	3,2*	2,3*	1,9*
					$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
					0,2	0,2	0,2	0,2

\*  $p < 0,001$  respecto al control.



**Fig 20.** Acumulación de 1 mM Gly-Sar por enterocitos (●). El FCCP (25 μM) indujo la salida de Gly-Sar desde enterocitos aislados que habían establecido un gradiente del dipéptido en el estado de equilibrio (○). La velocidad inicial de salida representada por la tangente a la curva de salida (línea discontinua) es 0,25 nmol/minuto/μl agua celular.

### III. 9. EFFECTO DEL AMILORIDE.

#### 9.1. EFECTO DEL AMILORIDE CON DIFERENTES pH EN EL MEDIO DE INCUBACION.

Dado que en la bibliografía se ha sugerido que el efecto de la ausencia de sodio sobre el transporte de dipéptidos sea indirecto y producido por la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  al eliminar el  $\text{Na}^+$  del medio (Ganapathy et al., 1981; Ganapathy y Leibach, 1985), realizamos una serie de experimentos en los que estudiamos el efecto del amiloride (inhibidor de dicho intercambiador) sobre el transporte del dipéptido, Gly-Sar, y del azúcar, 3-OMG. Una inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tendría efectos opuestos sobre un sistema de transporte dependiente de  $\text{Na}^+$  y sobre un sistema de transporte dependiente de  $\text{H}^+$ . El primero sería estimulado, mientras que el segundo sería inhibido. Por ello, si el antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  está presente en enterocitos y está implicado en el transporte de dipéptidos, cabe esperar que el amiloride disminuya la captación de Gly-Sar y aumente la de 3-OMG.

Los resultados (Tabla XVI y XVII y Fig. 21 y 22) muestran que cuando el amiloride (1 mM) fue añadido al principio del periodo de incubación la captación de 3-OMG

Tabla XVI. Efecto del amiloride (0,5 y 1 mM) sobre la entrada de 1 mM 3-ONG y 1 mM Gly-Sar en células aisladas de intestino delgado de pollo, a pH 7,4.

	n	nmol/ $\mu$ l agua celular			
		T (min): 5	10	20	40
<b>Gly-Sar</b>					
Control	8	1,3 $\pm$ 0,08	2,0 $\pm$ 0,08	2,8 $\pm$ 0,14	3,8 $\pm$ 0,13
Amiloride (0,5 mM)	6	1,1 $\pm$ 0,06	1,4** $\pm$ 0,12	2,0* $\pm$ 0,11	2,6* $\pm$ 0,16
Amiloride (1 mM)	6	0,9* $\pm$ 0,06	1,5** $\pm$ 0,11	2,0* $\pm$ 0,11	2,6* $\pm$ 0,13
<b>3-ONG</b>					
Control	12	2,7 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,3
Amiloride (0,5 mM)	8	2,0 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,4
Amiloride (1 mM)	10	2,4 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,4

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,005 > p > 0,001$ ; respecto a los valores control.

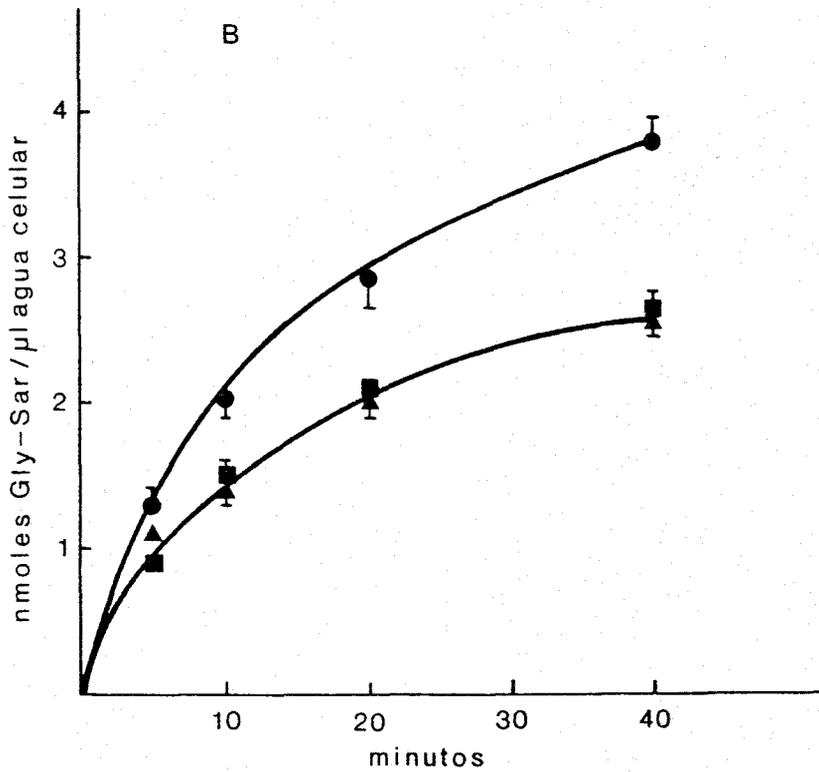
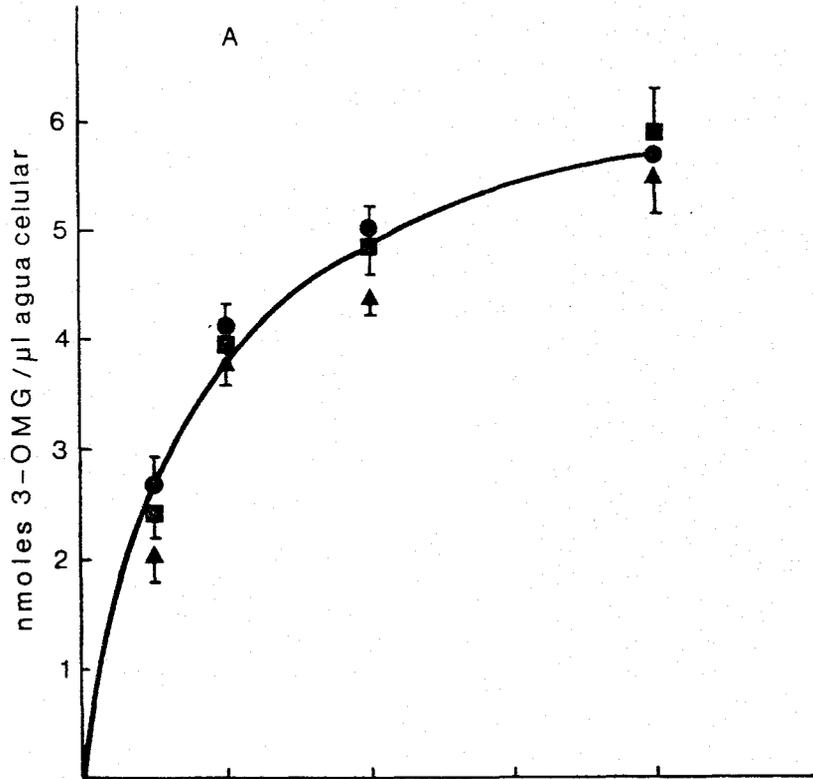
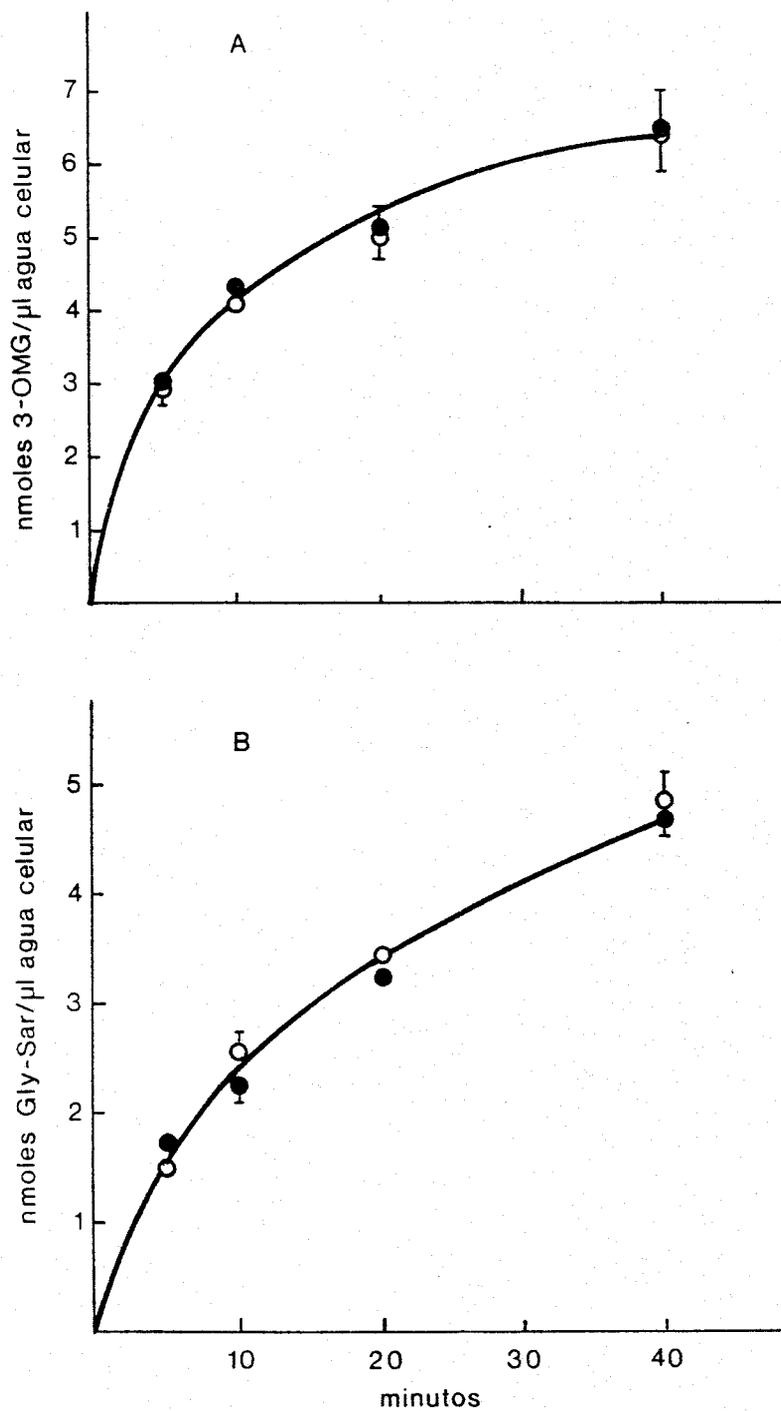


Fig 21. Efecto del amiloride sobre la entrada de 1 mM 3-OMG (A) o 1mM Gly-Sar (B) en enterocitos aislados de pollo. Las células fueron incubadas en medio con  $[Na^+] = 80$  mM y pH 7,4, en ausencia (●) y presencia de amiloride: 0,5 (■) y 1 mM (▲).

Tabla XVII. Efecto del 1 mM amiloride sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar y 1 mM 3-ONG en enterocitos aislados de pollo, a pH 6,0.

		nmol / $\mu$ l agua celular			
	n	T (min): 5	10	20	40
<b>Gly-Sar</b>					
Control	7	1,7 ± 0,10	2,2 ± 0,17	3,3 ± 0,16	4,7 ± 0,23
Amiloride (1 mM)	7	1,6 ± 0,15	2,6 ± 0,16	3,4 ± 0,17	4,9 ± 0,29
<b>3-ONG</b>					
Control	6	2,9 ± 0,2	4,3 ± 0,1	5,1 ± 0,3	6,5 ± 0,5
Amiloride (1 mM)	6	2,9 ± 0,3	4,1 ± 0,1	5,0 ± 0,3	6,4 ± 0,5



**Fig. 22. Efecto del amiloride sobre la entrada de 1 mM 3-OMG (A) o 1 mM Gly-Sar (B) en enterocitos aislados de pollo. Las células fueron incubadas en medio con  $[Na^+] = 80$  mM y pH 6,0 en presencia (●) y ausencia de 1 mM amiloride (○).**

Tabla XVIII. Efecto del amiloride (0,5 y 1 mM) sobre el volumen intracelular.

[Amiloride] (mM):	$\mu\text{l}$ agua celular/mg proteína		
	0	0,5	1
$\bar{x}$	3,6	3,2	3,8
	$\pm$	$\pm$	$\pm$
$\Sigma$	0,2	0,3	0,3
n	(6)	(6)	(6)

no fue afectada ni a pH, 7,4 ni a pH, 6,0, mientras que la captación de Gly-Sar fue inhibida, a pH 7,4, tras 40 minutos de incubación (30% inhibición), no siendo modificada a pH 6,0.

La presencia de amiloride en el medio de incubación no alteró el volumen intracelular (Tabla XVIII).

La ausencia de efecto del amiloride sobre la acumulación de 3-OMG, en nuestras condiciones experimentales, podría deberse a que dicho fármaco necesita un tiempo para alterar los gradientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$ . Por este motivo repetimos los experimentos con células que previamente habían sido preincubadas, durante 15 minutos, con 1 mM amiloride y luego incubadas con los distintos sustratos en estudio, en presencia también de 1 mM amiloride.

Comparando los datos de la Tabla XIX con los de la Tabla XVI podemos observar que la preincubación de las células "per se" disminuye la captación de los distintos sustratos ( ~ 20 % 3-OMG y 30 % Gly-Sar). Esta disminución no fue debida a una variación del volumen intracelular (Tabla XXII).

En relación a los efectos producidos por el amiloride, bajo estas condiciones experimentales, la Tabla XIX y Fig. 24 muestra que el amiloride estimuló

**Tabla XIX. Efecto del 1 mM amiloride sobre la entrada de 1 mM 3-OMG y de 1 mM Gly-Sar en células aisladas de pollo, a pH 7,4. Las células fueron preincubadas en presencia de 1 mM amiloride durante 15 minutos.**

		nmol Gly-Sar / $\mu$ l agua celular				
	n	T (min):	1	10	20	40
<b>Gly-Sar</b>						
Control	5		0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,04	2,7 ± 0,1
Amiloride	5		0,3*** ± 0,08	0,8*** ± 0,1	1,1** ± 0,2	1,6** ± 0,3
<b>3-OMG</b>						
Control	5		1,5 ± 0,2	3,5 ± 0,2	4,6 ± 0,2	5,5 ± 0,03
Amiloride	5		1,2 ± 0,2	4,8**** ± 0,3	6,4*** ± 0,5	8,1* ± 0,6

\* 0,005 > p > 0,001; \*\* 0,01 > p > 0,005; \*\*\* 0,025 > p > 0,01; \*\*\*\* 0,05 > p > 0,025; respecto al control.

**Tabla XX. Efecto del 1 mM amiloride sobre la entrada de 1 mM 3-OMG y de 1 mM Gly-Sar en células aisladas de pollo, a pH 6,0. Las células fueron preincubadas en presencia de 1 mM amiloride durante 15 minutos.**

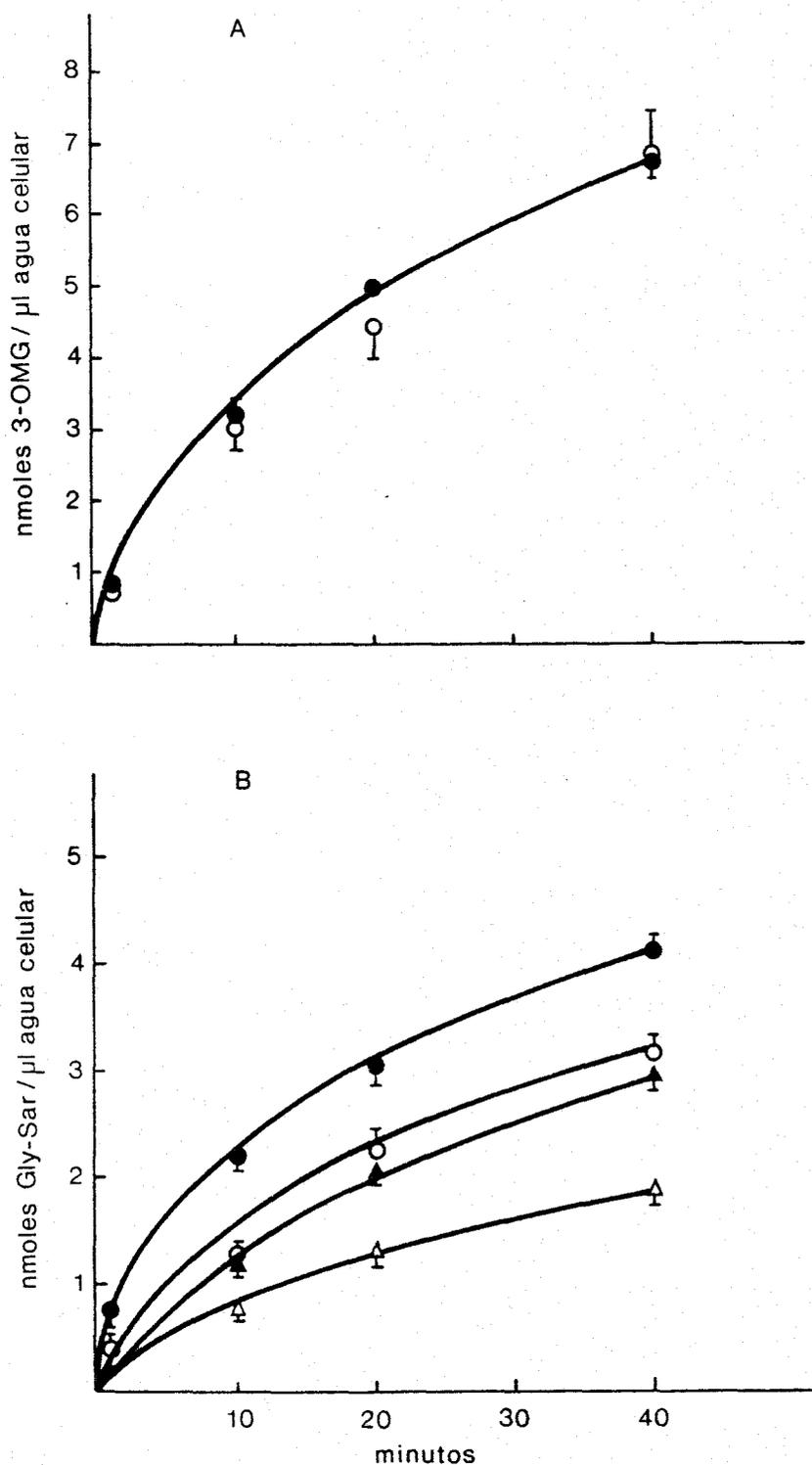
		nmol / $\mu$ l agua celular				
	n	T(min):	1	10	20	40
<b>3-OMG</b>						
Control	6		0,7 $\pm$ 0,05	3,1 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,2
Amiloride	6		0,7 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,4	6,9 $\pm$ 0,5
<b>Gly-Sar</b>						
Control	11		0,7 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,2
Amiloride	11		0,4 $\pm$ 0,1	1,3* $\pm$ 0,1	2,3* $\pm$ 0,1	3,2* $\pm$ 0,1

\*  $p < 0,001$ ; respecto a los valores control.

**Tabla XXI. Efecto del 1 mM amiloride sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo, a pH 5,5. Las células fueron preincubadas en presencia de 1 mM amiloride, durante 15 minutos.**

	n	T (min):	nmol Gly-Sar / $\mu$ l agua celular		
			10	20	40
<b>Control</b>	10		1,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2
<b>Amiloride</b>	10		0,8** ± 0,1	1,3* ± 0,1	1,9* ± 0,1

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,025 > p > 0,01$



**Fig. 23. Efecto del amiloride sobre la entrada de 1 mM 3-OMG (A) y de 1 mM Gly-Sar (B) en células aisladas de intestino delgado de pollo, a diferentes valores de pH en el medio extracelular. Las células fueron preincubadas en presencia de 1 mM amiloride, durante 15 minutos, en medio con  $[Na^+] = 80$  mM y pH 7,4, e incubadas con amiloride 1 mM, a pH 6,0 (●,○) y a pH 5,5 (▲,△). La concentración de  $Na^+$  fue en todos los medios 80 mM. Los símbolos blancos indican la presencia de amiloride.**

**Tabla XXII. Efecto del 1 mM amiloride sobre el volumen intracelular.** Las células fueron preincubadas en presencia de 1 mM amiloride. El volumen se determinó a los 30 minutos.

[Amiloride](mM):	$\mu\text{l}$ agua celular/mg proteína	
	0	1
$\bar{x}$	3,5	3,5
	$\pm$	$\pm$
$\Sigma$	0,4	0,5
n	(4)	(4)

(30%) la captación del azúcar e inhibió (40%) la del dipéptido, a pH 7,4, después de 40 minutos de incubación.

Cuando el valor del pH extracelular fue 6,0 el amiloride no afectó la captación de 3-OMG. Sin embargo, tanto a pH 6,0 como a pH 5,5 la entrada de Gly-Sar fue inhibida en un 20 y un 37 % respectivamente, tras 40 minutos de incubación (Tablas XX y XXI y Fig. 23).

## 9. 2. EFECTO DEL AMILORIDE CON DIFERENTES GRADIENTES DE SODIO.

Para comprobar si los efectos del amiloride eran dependientes de la concentración de  $\text{Na}^+$  extracelular, se estudió el efecto del amiloride a distintos gradientes de  $\text{Na}^+$ . Las células fueron preincubadas, durante 15 minutos, en medio estándar que contenía 1 mM amiloride, y a continuación incubadas en medio con diferentes concentraciones de  $\text{Na}^+$  (80, 40 y 0 mM).

Los resultados muestran (Tabla XXIII y Fig. 24) que a 80 mM  $\text{Na}^+$ , el amiloride aumentó la captación de 3-OMG (30 % después de 40 minutos de incubación), y tuvo un ligero efecto a 40 mM  $\text{Na}^+$ . En el medio libre de  $\text{Na}^+$ , la concentración intracelular del azúcar fue similar a la del medio extracelular, con independencia de la presencia o no de amiloride en el medio de incubación.

Tabla XXIII. Efecto del 1 mM amiloride sobre la entrada de 1 mM 3-OMG en enterocitos aislados de pollo a pH 7,4 y con distintas  $[Na^+]$ . Las células fueron preincubadas con 1 mM amiloride durante 15 minutos.

		nmol 3-OMG / $\mu$ l agua celular						
	n	T (min):	0,33	0,66	1	10	20	40
<b><math>[Na^+] = 80 \text{ mM}</math></b>								
Control	5		0,7 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,03
Amiloride	5		0,8 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2	4,8 <sup>***</sup> $\pm$ 0,3	6,4 <sup>**</sup> $\pm$ 0,5	8,1 <sup>*</sup> $\pm$ 0,6
<b><math>[Na^+] = 40 \text{ mM}</math></b>								
Control	3		0,4 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,7	4,1 $\pm$ 0,4
Amiloride	3		0,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,3
<b><math>[Na^+] = 0 \text{ mM}</math></b>								
Control	3		0,6 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,2
Amiloride	3		0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,2

\*  $0,005 > p > 0,001$ ; \*\*  $0,025 > p > 0,01$ ; \*\*\*  $0,05 > p > 0,025$ ; respecto a los valores control.

**Tabla XXIV. Efecto del 1 mM amiloride sobre la entrada de 1mM Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo, a pH 7,4 y distintas concentraciones de Na<sup>+</sup> del medio de incubación. Las células fueron preincubadas durante 15 minutos con 1 mM amiloride.**

		nmol Gly-Sar / $\mu$ l agua celular				
	n	T (min):	1	10	20	40
<b>[Na<sup>+</sup>] = 80 mM</b>						
Control	5		0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,04	2,7 ± 0,1
Amiloride	5		0,3** ± 0,08	0,8** ± 0,1	1,1* ± 0,2	1,6* ± 0,3
<b>[Na<sup>+</sup>] = 40 mM</b>						
Control	5		0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Amiloride	5		0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,9** ± 0,1	1,1** ± 0,1
<b>[Na<sup>+</sup>] = 0 mM</b>						
Control	5		0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1
Amiloride	5		0,2 ± 0,04	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2

\* 0,01 > p > 0,005; \*\* 0,025 > p > 0,01 respecto a los valores control.

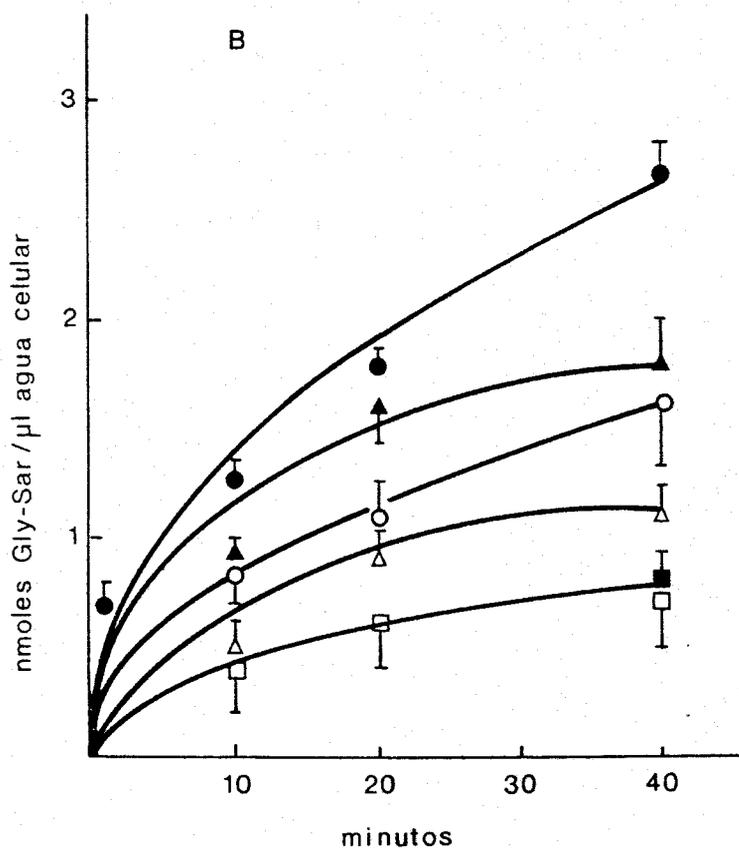
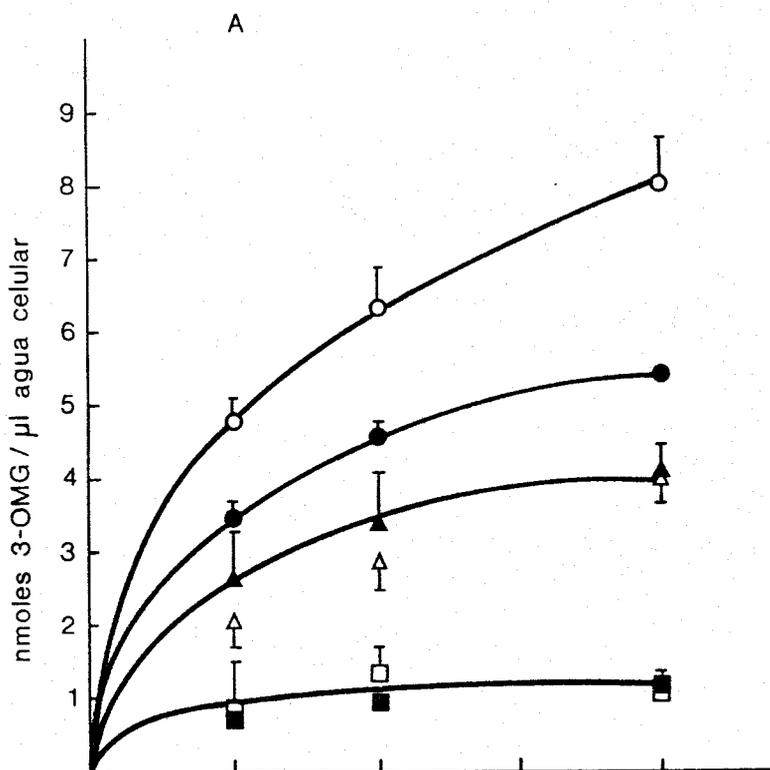


Fig. 24. Efecto del amiloride sobre la acumulación de 1 mM 3-OMG (A) y 1 mM Gly-Sar (B) por enterocitos aislados de pollo, a diferentes concentraciones de Na<sup>+</sup> extracelular. Las células fueron preincubadas durante 15 minutos con 1 mM amiloride e incubadas en presencia de 1 mM amiloride en medios con concentraciones de Na<sup>+</sup>: 80 (●,○), 40 (▲,△) y 0 mM (■,□). Los símbolos en blanco indican la presencia de amiloride. En cada medio el valor del pH fue 7,4.

Cuando el sustrato fue Gly-Sar, el amiloride inhibió su captación en un 40 y un 50 %, a 80 y a 40 mM  $\text{Na}^+$ , respectivamente, y no tuvo efecto en el medio sin  $\text{Na}^+$  (Tabla XXIV y Fig. 24).

### 9. 3. EFECTO DEL AMILORIDE SOBRE LA ENTRADA DE 2-DOG.

Diversas sustancias, como la teofilina, floretina y citocalasina B, son capaces de aumentar la acumulación intracelular de azúcares en el estado estacionario, siendo este efecto producido por una inhibición del sistema de transporte independiente de  $\text{Na}^+$  y localizado en la membrana basolateral (Randles y Kimmich, 1978). Dado que el amiloride estimulaba la acumulación del azúcar podría esto deberse, en parte, a un efecto sobre dicho sistema de transporte.

La 2-deoxiglucosa (2-DOG) es un sustrato con gran afinidad por el sistema de transporte independiente de  $\text{Na}^+$ , y que no puede utilizar el sistema dependiente de  $\text{Na}^+$ , por lo que es el sustrato de elección para determinar si la acción de una sustancia se realiza sobre dicho sistema de transporte

Los resultados obtenidos (Tabla XXV) muestran que el amiloride no modificó el transporte de 2-DOG, por lo que sus efectos sobre el transporte de 3-OMG no son

debidos a una inhibición del sistema basolateral de transporte de azúcares.

**Tabla XXV. Efecto del 1 mM amiloride sobre la entrada de 1 mM 2-D0G en enterocitos aislados de pollo. Las células fueron preincubadas con 1 mM amiloride durante 15 minutos.**

		nmol 2-D0G / $\mu$ l agua celular		
n	T (sg):	20	40	60
<b>Control</b>	4	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,03	0,5 ± 0,03
<b>Amiloride</b>	4	0,3 ± 0,03	0,4 ± 0,03	0,6 ± 0,05

### III. 10. EFEECTO DE LA MONENSINA.

La monensina es un ionóforo de  $\text{Na}^+$  y favorece el intercambio de  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$  a través de la membrana celular (Montrose et al., 1985). Esto implica que la adición de monensina podría invertir los efectos del amiloride sobre la captación de Gly-Sar y de 3-OMG.

Las Tablas XXVI, XXVII, XXVIII y XXIX y las Fig. 25 y 26 muestran que cuando la monensina se añadió a las células al mismo tiempo que el amiloride (es decir las células fueron preincubadas, durante 15 minutos, con ambas sustancias y luego incubadas con los distintos sustratos y modificantes), los efectos del amiloride sobre la captación de 3-OMG y de Gly-Sar fueron, efectivamente, anulados por la monensina, en todas las condiciones estudiadas, indicando que el amiloride y la monensina tienen efectos opuestos y sugiriendo que el primero estaba actuando sobre el antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , como había sido descrito para estas células por Montrose et al., 1985.

**Tabla XXVI. Efecto del 1 mM amiloride y  $10^{-6}$  M monensina sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar. Las células fueron preincubadas (15 minutos) e incubadas con amiloride y/o monensina, a pH 7,4.**

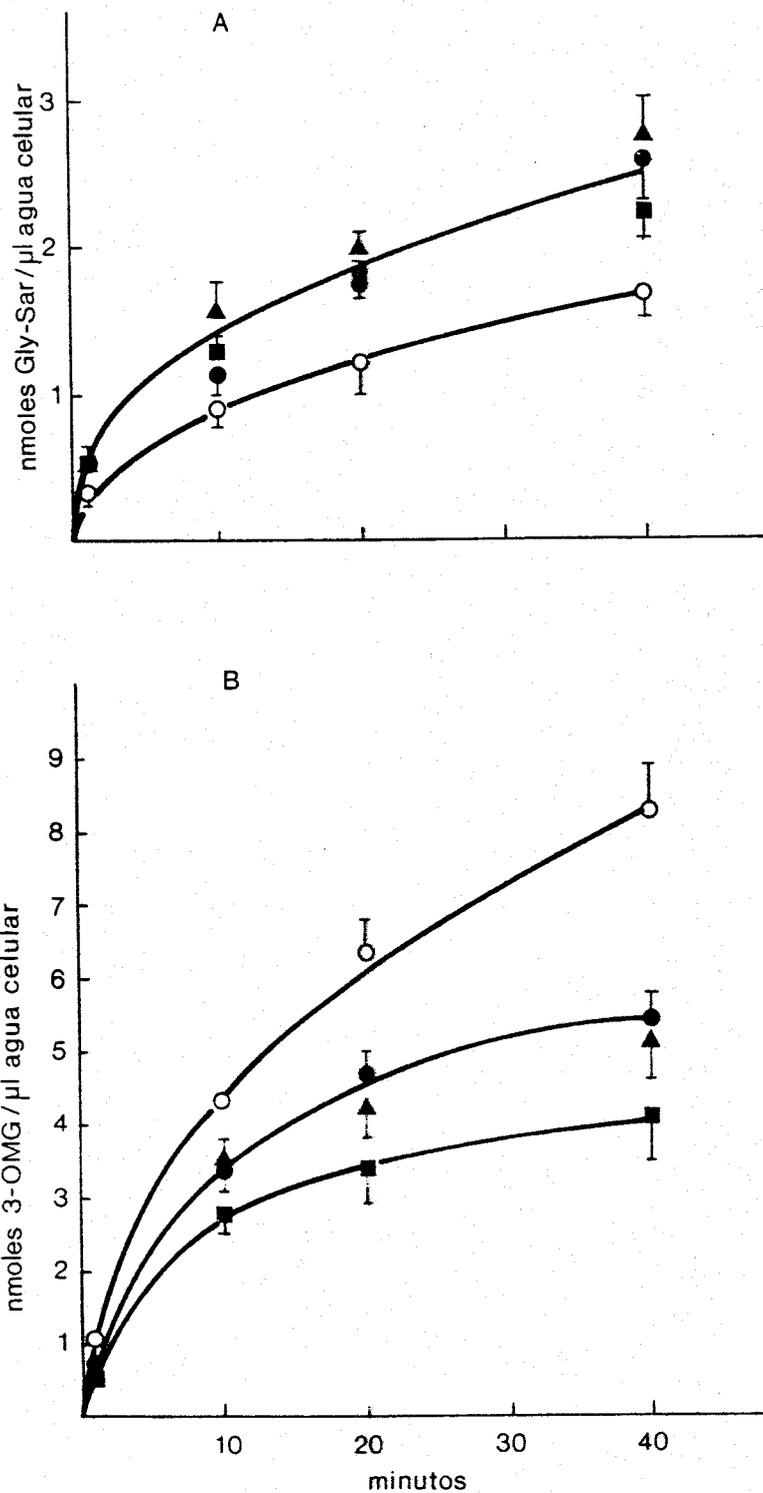
		nmol Gly-Sar / $\mu$ l agua celular				
	n	T (min):	1	10	20	40
<b>Control</b>	6		0,5 ±	1,1 ±	1,8 ±	2,6 ±
			0,1	0,1	0,1	0,3
<b>Amiloride</b>	6		0,3 ±	0,9 ±	1,2* ±	1,7** ±
			0,1	0,1	0,2	0,2
<b>Monensina</b>	6		0,5 ±	1,6 ±	2,0 ±	2,7 ±
			0,1	0,2	0,1	0,3
<b>Amiloride + Monensina</b>	9		0,5 ±	1,3 ±	1,8 ±	2,2 ±
			0,04	0,1	0,1	0,1

\*  $0,025 > p > 0,01$ ; \*\*  $0,05 > p > 0,025$ ; respecto a los valores control.

**Tabla XXVII. Efecto del 1 mM amiloride y  $10^{-6}$  M monensina sobre la entrada de 1 mM 3-OMG en enterocitos aislados de pollo. Las células fueron preincubadas con amiloride y/o monensina, a pH 7,4.**

		nmol 3-OMG / $\mu$ l agua celular			
n	T (min):	1	10	20	40
<b>Control</b>	6	0,9 ±	3,4 ±	4,7 ±	5,5 ±
		0,1	0,3	0,3	0,3
<b>Amiloride</b>	6	1,1 ±	4,3 <sup>***</sup> ±	6,4 <sup>**</sup> ±	8,3 <sup>*</sup> ±
		0,2	0,1	0,4	0,6
<b>Monensina</b>	6	0,8 ±	3,5 ±	4,2 ±	5,1 ±
		0,2	0,3	0,4	0,5
<b>Amiloride + Monensina</b>	6	0,7 ±	2,8 ±	3,4 <sup>****</sup> ±	4,1 ±
		0,1	0,3	0,4	0,6

\* 0,005 > p > 0,001; \*\* 0,01 > p > 0,005; \*\*\* 0,025 > p > 0,01; \*\*\*\* 0,05 > p > 0,025; respecto a los valores control.



**Fig. 25. Efecto del amiloride y de la monensina sobre la entrada de 1 mM 3-OMG y 1 mM Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo, a pH 7,4. Las células fueron preincubadas, durante 15 minutos e incubadas en presencia de 1 mM amiloride y/o 10<sup>-6</sup> monensina, en medio conteniendo 80 mM Na<sup>+</sup> y pH 7,4. ●, control; ○, 1 mM amiloride; ▲, 10<sup>-6</sup> M monensina; ■, 1 mM amiloride + 10<sup>-6</sup> M monensina.**

**Tabla XXVIII. Efecto del 1 mM amiloride y  $10^{-6}$  M nonensina sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo. Las células fueron preincubadas (15 min) e incubadas con amiloride y/o nonensina, a pH 6,0.**

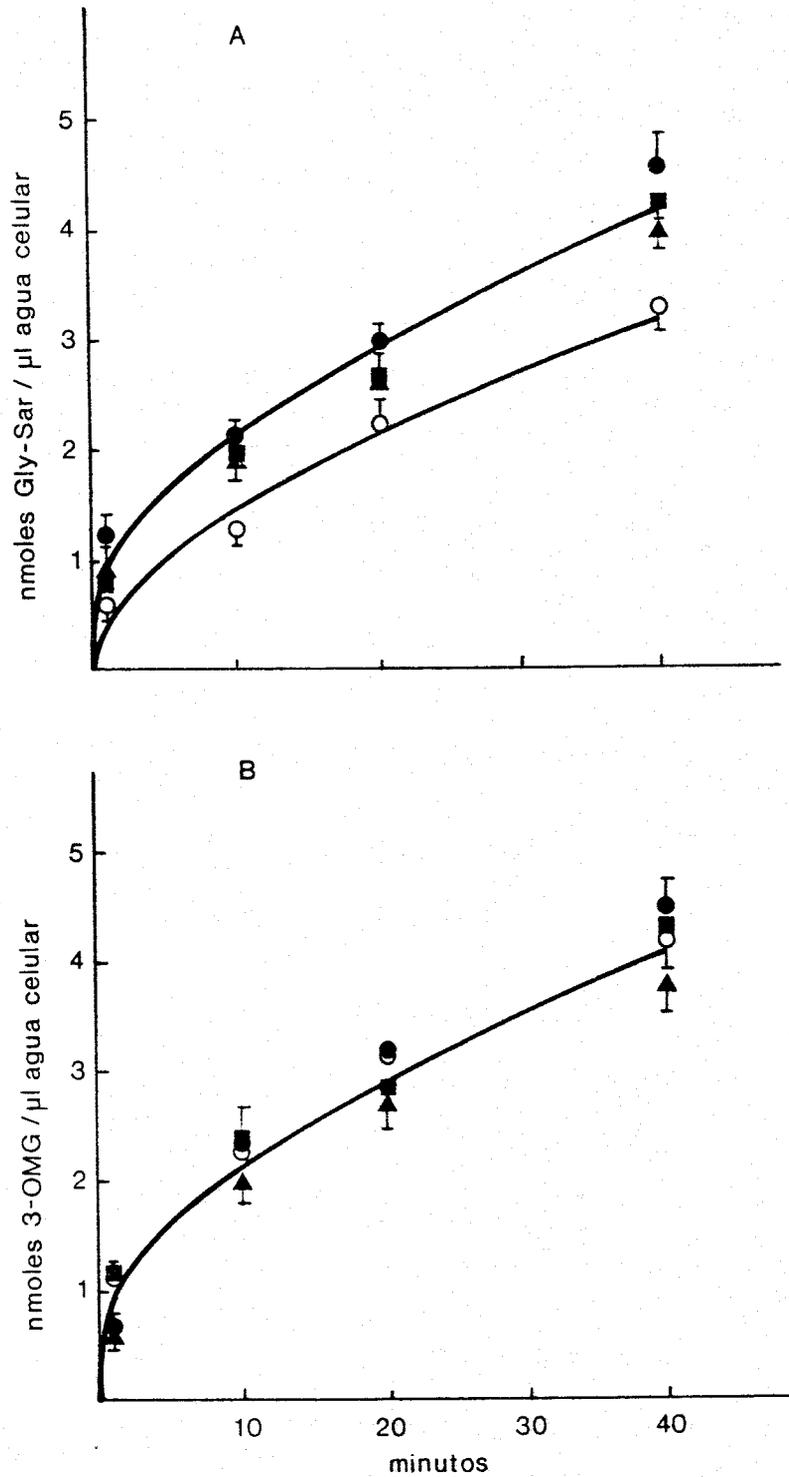
	n	T(min):	nmol Gly-Sar / $\mu$ l agua celular			
			1	10	20	40
<b>Control</b>	5		0,9 ± 0,2	2,2 ± 0,1	3,0 ± 0,1	4,6 ± 0,3
<b>Amiloride</b>	5		0,6 ± 0,1	1,3* ± 0,1	2,3*** ± 0,2	3,3** ± 0,2
<b>Nonensina</b>	5		0,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	2,6*** ± 0,1	4,0 ± 0,3
<b>Amiloride +</b> <b>Nonensina</b>	5		1,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,6 ± 0,2	4,3 ± 0,3

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,01 > p > 0,005$ ; \*\*\*  $0,025 > p > 0,01$ ; respecto a los valores control.

**Tabla XXIX. Efecto del 1,25 mM amiloride y  $10^{-6}$ M monensina sobre la entrada de 1 mM de 3-OMG en enterocitos aislados de pollo. Las células fueron preincubadas (15 minutos) e incubadas en presencia de 1 mM amiloride y/o monensina, a pH 6,0.**

		nmol 3-OMG / $\mu$ l agua celular			
	n	T (min): 1	10	20	40
<b>Control</b>	5	0,7 ±	2,3 ±	3,2 ±	4,5 ±
		0,1	0,3	0,1	0,3
<b>Amiloride</b>	5	1,1* ±	2,3 ±	3,2 ±	4,2 ±
		0,1	0,3	0,1	0,3
<b>Monensina</b>	5	0,7 ±	2,0 ±	2,7 ±	3,8 ±
		0,2	0,2	0,2	0,3
<b>Amiloride +</b> <b>Monensina</b>	5	1,2* ±	2,3 ±	2,8 ±	4,3 ±
		0,1	0,2	0,2	0,2

\*  $0,025 > p > 0,01$ ; respecto a los valores control.



**Fig. 26. Efecto del amiloride y de la monensina sobre la entrada de 1 mM 3-OMG y 1 mM Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo, a pH 6,0. Las células fueron preincubadas, durante 15 minutos e incubadas en presencia de 1 mM amiloride y/o  $10^{-6}$  M monensina, en medio conteniendo 80 mM  $\text{Na}^+$  y pH 6,0. ●, control; ○, 1 mM amiloride; ▲,  $10^{-6}$  M monensina; ■, 1 mM amiloride +  $10^{-6}$  M monensina.**

III. 11. EFECTO DE LA L-LEUCINA, 3-OMG Y GLICIL -  
SARCOSINA SOBRE LA SALIDA DE  $\text{Na}^{22}$  DESDE ENTEROCITOS  
PREVIAMENTE CARGADOS CON  $\text{Na}^{22}$ .

Ya hemos visto como la eliminación del  $\text{Na}^+$  del medio de incubación reduce, aunque no anula, el transporte de Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo. Por otro lado, el amiloride inhibe la captación del dipéptido, lo que podría indicar que el efecto del  $\text{Na}^+$  es indirecto y debido a la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ .

La entrada a las células de un sustrato cuyo transporte esté acoplado al  $\text{Na}^+$  estimulará la bomba de  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  y, por lo tanto, la salida del ión. Por ello, otro método experimental para averiguar si la relación entre el transporte del dipéptido y el  $\text{Na}^+$  es o no directa, es el de estudiar el efecto de la Gly-Sar sobre la salida de  $\text{Na}^{22}$  desde enterocitos previamente cargados con  $\text{Na}^{22}$ .

Para comprobar este hecho, estudiamos, en condiciones control y en presencia de 20 mM L-Leucina y de 20 mM 3-OMG, la salida de  $\text{Na}^{22}$  desde enterocitos previamente cargados con  $\text{Na}^{22}$ . La realización de estos experimentos se desarrolló como se indica en el apartado II. 5. 4 de Material y Métodos. La osmolaridad del medio de incubación se mantuvo disminuyendo la cantidad de manitol (en 20 mM). El % de  $\text{Na}^{22}$  remanente en las células se midió tanto a partir del  $\text{Na}^{22}$  que aparecía en el

medio extracelular, como del que permanecía en el interior de los enterocitos. Los resultados se recogen en las Tablas XXX y XXXI y Fig. 27, observándose que efectivamente, ambas sustancias estimularon la salida de  $\text{Na}^{22}$ , siendo las constantes de velocidad, expresadas en  $\text{min}^{-1}$ : 0,126 (control); 0,173 ( en presencia de 20 mM L-Leucina) y 0,224 (en presencia de 20 mM 3-OMG).

Sin embargo, la Gly-Sar (20 mM) no modificó la salida del ión, lo que parece indicar que el dipéptido no se cotransporta con  $\text{Na}^+$  ( $k= 0,137 \text{ min}^{-1}$ ).

Tabla XXX. Salida de  $\text{Na}^{22}$  desde células previamente cargadas, en condiciones control y en presencia de L-Leucina (20  $\mu\text{M}$ ) y de Gly-Sar (20  $\mu\text{M}$ ). Las muestras se tomaron del medio extracelular. k: constante de velocidad.

	n	T (min):	% $\text{Na}^{22}$ remanente en las células				k( $\text{min}^{-1}$ )
			2	4	8	12	
Control:	9		75	59	37	22	0,126
			±	±	±	±	±
			3	5	5	5	0,011
L-Leu:	5		60*	42*	22**	15	0,173***
			±	±	±	±	±
			3	4	2	2	0,015
Gly-Sar:	6		73	55	33	20	0,137
			±	±	±	±	±
			6	4	4	4	0,019

\*  $0,005 > p > 0,001$ ; \*\*  $0,025 > p > 0,01$ ; \*\*\*  $0,05 > p > 0,025$ ; respecto al control.

Tabla XXXI. Salida de  $\text{Na}^{22}$  desde células previamente cargadas en presencia de L-Leucina (20  $\mu\text{M}$ ) y de Gly-Sar (20  $\mu\text{M}$ ). Las muestras se tomaron después de romper el pellet. k: constante de velocidad.

	n	T (min):	% $\text{Na}^{22}$ remanente en las células			k( $\text{min}^{-1}$ )
			2	4	8	
Control	12		73 ± 2	59 ± 2	34 ± 1	0,127 ± 0,004
L-Leu	4		66** ± 1	48*** ± 2	27** ± 2	0,170* ± 0,007
3-ONG	3		55* ± 1	39* ± 1	18* ± 1	0,224* ± 0,007
Gly-Sar	12		72 ± 2	58 ± 2	34 ± 1	0,137 ± 0,005

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,01 > p > 0,005$ ; \*\*\*  $0,05 > p > 0,025$ ; respecto al control.

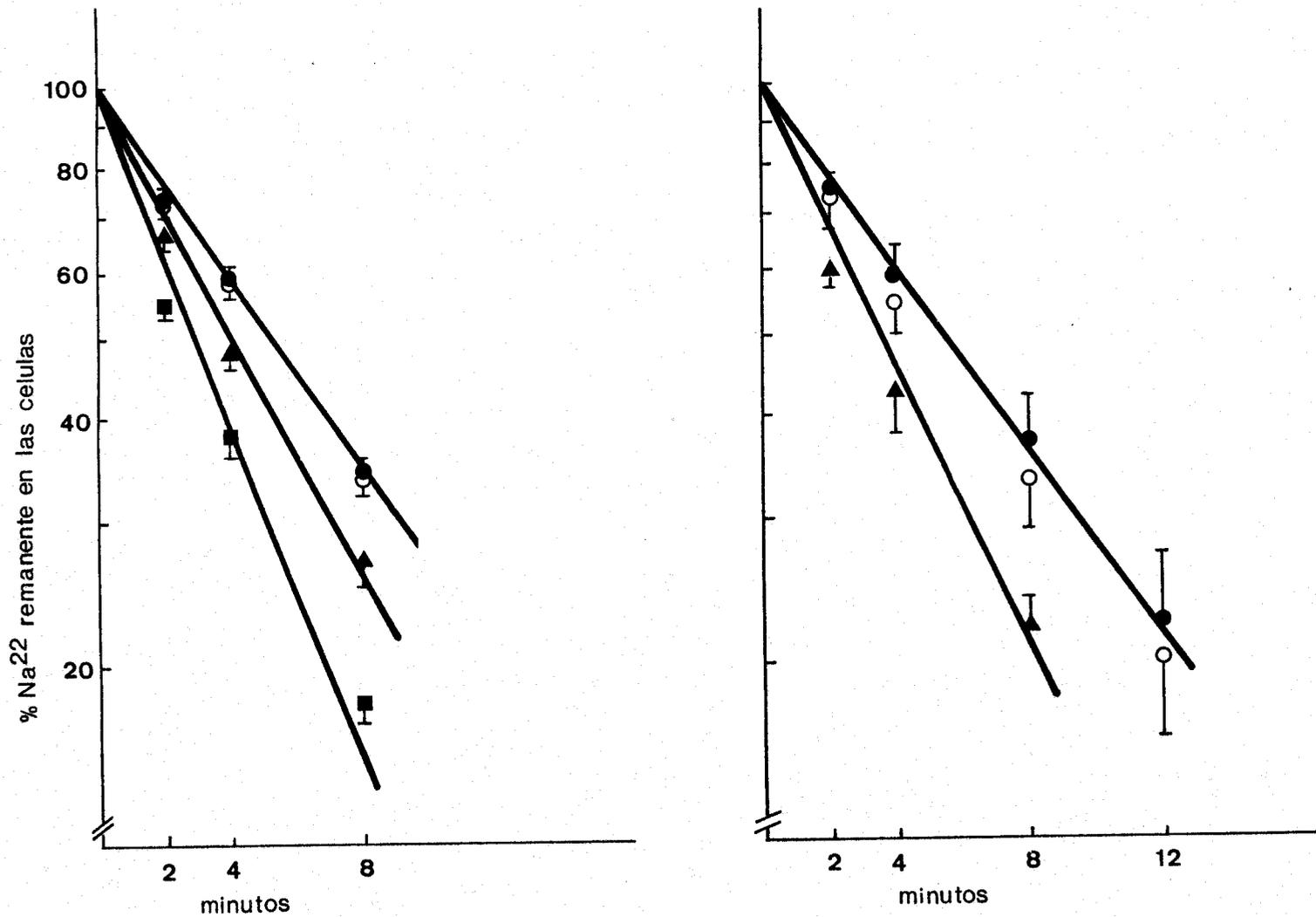


Fig. 27. Salida de  $\text{Na}^{22}$  desde enterocitos previamente cargados con  $\text{Na}^{22}$ . Dicha salida se ensayó en condiciones control (●) y en presencia de distintos sustratos: L-Leucina (▲), 3-OMG (■) y Gly-Sar (○).

### III. 11. ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE GLICIL-SARCOSINA EN CELULAS DEPLECIONADAS DE ATP.

Los enterocitos deplecionados de ATP han sido utilizados para estudiar el efecto del potencial de membrana y de los gradientes iónicos sobre el transporte intestinal de azúcares dependiente de  $\text{Na}^+$ . Este tipo de preparación es semejante al de vesículas aisladas del borde en cepillo, ya que tiene bloqueadas las bombas iónicas, pudiéndose modificar la composición del medio intracelular. Las células deplecionadas de ATP presentan algunas ventajas, respecto a las preparaciones de vesículas de borde en cepillo, ya que éstas pueden haber sufrido alteraciones en las propiedades de las membranas durante el proceso de obtención y además, las células, dado su gran tamaño permiten obtener acumulaciones transitorias (*overshoots*) más prolongadas.

Las células fueron aisladas y deplecionadas según el método descrito por Carter-Su y Kimmich (1979 y 1980). Estos autores obtuvieron enterocitos de pollo deplecionados de ATP (con niveles de ATP de un 4 % respecto a enterocitos normales), tras un periodo de preincubación de 15 minutos con 30  $\mu\text{M}$  rotenona y 200  $\mu\text{M}$  ouabaína.

Utilizando las mismas condiciones (ver apartado II. 5. 2 de Material y Métodos) se realizaron inicialmente una serie de experimentos, encaminados a comprobar si las células, por

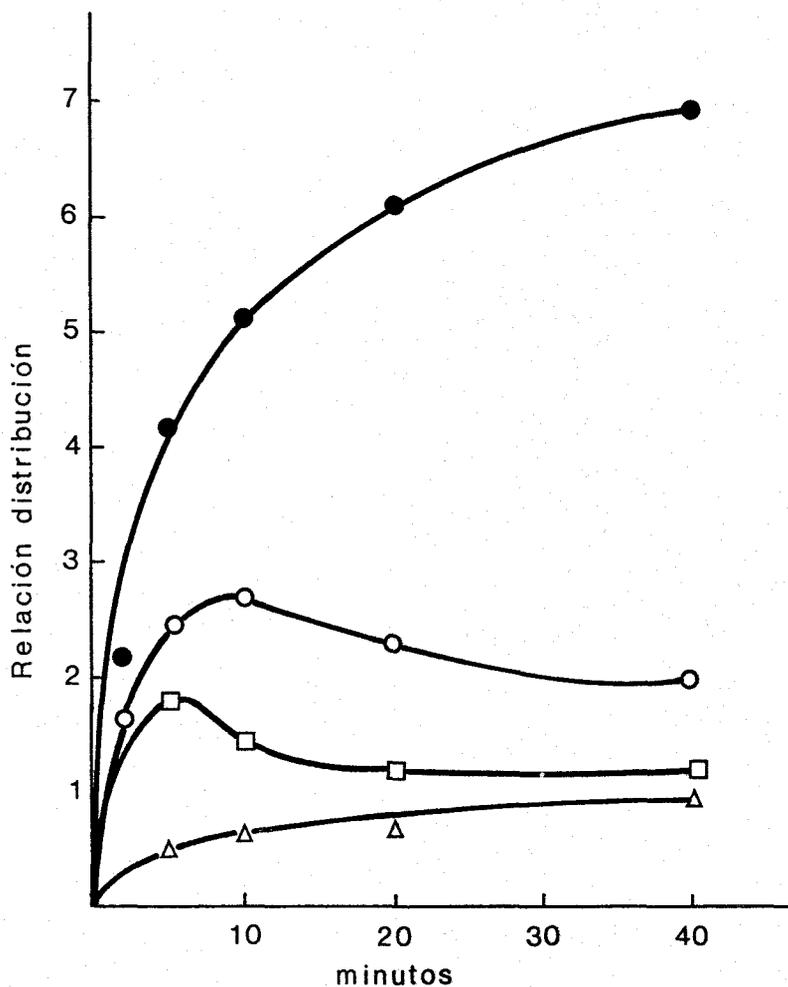
nosotros aisladas, se comportaban de forma similar a las descritas por dichos autores.

En primer lugar, estudiamos la posible variación del volumen celular tras la depleción, midiendo la entrada de 3-OMG en presencia de florricina. Los resultados obtenidos indicaron que dicho volumen no se modificaba ( $3,6 \pm 0,2$ ,  $n=8$  y  $3,5 \pm 0,1$ ,  $n=8$ ; en células control y deplecionadas, respectivamente).

En la Tabla XXXII y Fig. 28 se muestra la captación de 1 mM 3-OMG por enterocitos normales y deplecionados de ATP en medio de incubación estándar. Para deplecionarlas, las células fueron preincubadas durante 15 minutos, en ausencia de  $\text{Na}^+$ , con 30  $\mu\text{M}$  rotenona y 200  $\mu\text{M}$  ouabaína y, posteriormente incubadas en medio estándar (80 mM  $\text{Na}^+$ ) para imponer un gradiente de  $\text{Na}^+$ . Se puede observar que la concentración de 3-OMG en el estado de equilibrio en células control (energizadas normalmente) es 7 veces mayor que la concentración en el medio de incubación. También se puede observar en células deplecionadas la acumulación transitoria de 3-OMG, si bien el alcance y magnitud de la misma fueron inferiores a los descritos por Carter-Su y Kimmich (1979 y 1980). A los 20 minutos de incubación, la acumulación de 3-OMG queda totalmente anulada, siendo los niveles intracelulares del azúcar próximos a los obtenidos en presencia de florricina. En este estudio, al igual que los autores citados,

**Tabla XXXII. Entrada de 1 mM 3-OMG en células control y en células deplecionadas de ATP, en función del tiempo de incubación. También se indica la relación de distribución (R) del azúcar en células control y en células deplecionadas, respecto a la acumulación en presencia de florricina. Se expresa la media y el error estándar de 4 determinaciones para cada punto.**

		nmol 3-OMG / mg proteína					
	n	T(min):	2	5	10	20	40
<b>Florricina:</b>	4		0,5	0,9	1,4	2,3	3,6
<b>Control:</b>	4		9,2 ± 2	15,0 ± 2	18,4 ± 3	19,9 ± 1	26,2 ± 1
<b>R:</b>			2,5	4,2	5,1	5,5	7,3
<b>Deplecionadas:</b>	4		3,3 ± 0,8	6,5 ± 1	4,9 ± 1	4,6 ± 0,8	4,5 ± 1
<b>R:</b>			0,9	1,8	1,4	1,3	1,3



**Fig. 28. Entrada de 1 mM 3-OMG en enterocitos deplecionados de ATP, por tratamiento con rotenona y ouabaína.** Las células deplecionadas fueron preincubadas durante 15 minutos en un medio sin  $\text{Na}^+$ , en presencia de 30  $\mu\text{M}$  rotenona y 200  $\mu\text{M}$  ouabaína. La entrada de 3-OMG se midió en medio estándar, conteniendo 80 mM  $\text{Na}^+$  y Tris /CIH como sistema amortiguador ( $\square$ ), o en medio de  $\text{NO}_3\text{Na}$  (80mM), en cuyo caso el sistema amortiguador fue Tris / Acetato ( $\circ$ ), en ausencia ( $\circ, \square$ ) y presencia de flouresceína ( $\Delta$ ). En ambos casos durante la incubación el medio contenía 30  $\mu\text{M}$  rotenona, 200  $\mu\text{M}$  ouabaína y 200  $\mu\text{M}$  flouresceína. Simultáneamente se midió la entrada de 3-OMG en células normalmente energizadas ( $\bullet$ ).

se añadía en el medio de incubación 200  $\mu$ M floretina, un potente inhibidor del sistema de transporte de azúcares independiente de  $\text{Na}^+$ , con el fin de obtener acumulaciones transitorias más marcadas.

Dado que el interés de nuestro trabajo era estudiar el transporte de dipéptidos en células deplecionadas de ATP, lo primero que nos planteamos fue la necesidad o no de incluir floretina en el medio de incubación. Por ello estudiamos en células normalmente energizadas el posible efecto de la floretina (200  $\mu$ M) y teofilina (7,5 mM) sobre la captación de Gly-Sar (1 mM). Los resultados se muestran en la Tabla XXXIII, pudiéndose observar que la presencia de estos compuestos no modificó los niveles intracelulares de Gly-Sar. Por ello en los experimentos realizados con células deplecionadas de ATP, y que describimos a continuación utilizamos un medio sin floretina.

La captación de Gly-Sar por células deplecionadas de ATP fue estudiada en dos series de experimentos. En la primera serie las células fueron sometidas a diferentes gradientes de  $\text{Na}^+$  sin modificar el pH, que fue en todos los casos 7,4. Para ello las células fueron deplecionadas en medio sin  $\text{Na}^+$  e incubadas posteriormente en medios con diferentes concentraciones de  $\text{Na}^+$  (100, 80 y 0 mM). Como puede observarse en la Tabla XXXIV y Fig. 29, bajo estas condiciones, la velocidad inicial, y la concentración

Tabla XXXIII. Efecto de la teofilina (7,5 mM) y de la floretina (200 µM) sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo.

	n	T (min):	nmol Gly-Sar / µl agua celular			
			5	10	20	40
<b>Control</b>	5		1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,04	2,6 ± 0,2	3,1 ± 0,3
<b>Teofilina</b>	5		1,4 ± 0,1	2,1* ± 0,1	2,6 ± 0,2	3,1 ± 0,3
<b>Floretina</b>	5		1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,5 ± 0,1	3,2 ± 0,2

\* 0,025 > p > 0,01; respecto al control.

intracelular del dipéptido fue idéntica en las tres condiciones experimentales, no observándose acumulación del dipéptido.

En la segunda serie de experimentos, las células fueron sometidas a diferentes gradientes de  $H^+$  en un medio libre de  $Na^+$ . Para ello, las células fueron deplecionadas en medio sin  $Na^+$  a pH de 7,4 e incubadas posteriormente en medios sin  $Na^+$  y con diferentes concentraciones de  $H^+$  (pH 7,4; 6,0 y 5,5). Como puede observarse en la Tabla XXXV y Fig. 29, bajo estas condiciones la velocidad inicial y la acumulación intracelular del dipéptido fueron también iguales bajo las tres condiciones experimentales, no observándose en ninguno de los casos acumulación.

**Tabla XXXIV. Entrada de 1 mM Gly-Sar en células deplecionadas de ATP, a pH 7,4 y distintos gradientes de Na<sup>+</sup>. Las células fueron deplecionadas en medio sin Na<sup>+</sup> (por tratamiento con 80 μM rotenona y 200 μM ouabaina), y posteriormente incubadas en medios con distintas [Na<sup>+</sup>]: 0, 80 y 100 mM.**

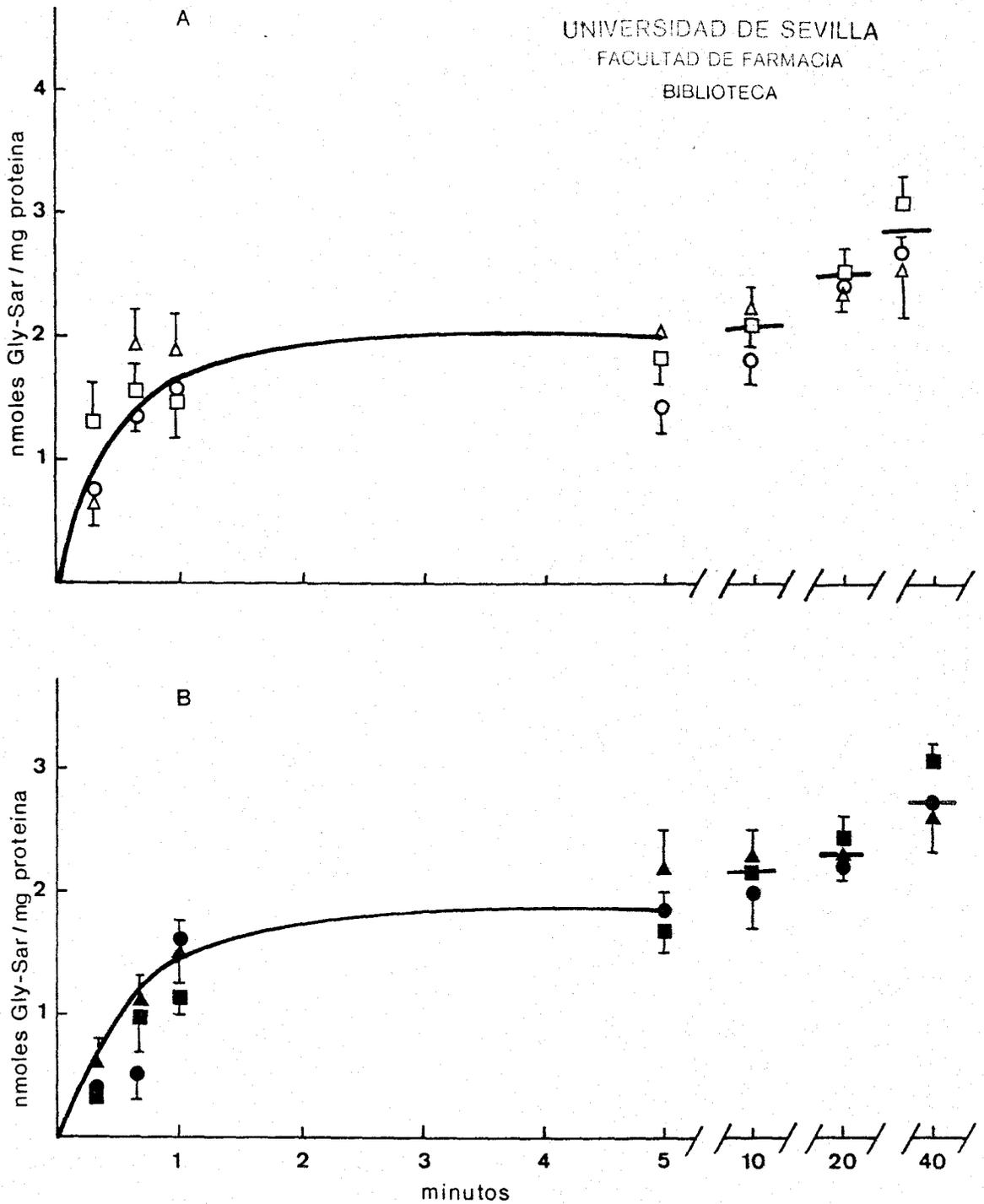
		nmol Gly-Sar / mg proteína						
n T (min):		0,33	0,66	1	5	10	20	40
[Na <sup>+</sup> ]=0 mM	7	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,2	3,1 ± 0,1
[Na <sup>+</sup> ]=80 mM	7	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	1,6 <sup>**</sup> ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,7 ± 0,2
[Na <sup>+</sup> ]=100 mM	6	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,3	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,3	2,6 ± 0,3

\* 0,025 > p > 0,01; respecto a 0 mM Na<sup>+</sup>.

**Tabla XXXV. Entrada de 1 mM Gly-Sar en células deplecionadas de ATP a distintos pH en el medio de incubación. La preincubación y la incubación se realizó en medio sin Na<sup>+</sup>, sustituido por manitol. Las células fueron deplecionadas de ATP por tratamiento con 80 µM rotenona y 200 µM ouabaina, durante 20 min, a pH 7,4 antes de iniciar la incubación.**

		nmol Gly-Sar / mg proteína						
n	T (min):	0,33	0,66	1	5	10	20	40
pH 7,4:	6	0,7	1,4	1,5	1,4	1,8	2,4	2,7
		±	±	±	±	±	±	±
		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
pH 6,0:	6	1,3**	1,5	1,5	1,8**	2,1	2,5	3,1**
		±	±	±	±	±	±	±
		0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
pH 5,5:	6	0,7	1,9	1,8	2,0*	2,2	2,4	2,5
		±	±	±	±	±	±	±
		0,2	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,4

\* 0,01 > p > 0,005; \*\* 0,05 > p > 0,025; respecto a pH 7,4.



**Fig. 29.** Entrada de 1 mM Gly-Sar en enterocitos deplecionados de ATP, en presencia de un gradiente interno de protones (A) o de sodio (B). En el primer caso, las células fueron preincubadas durante 15 minutos en un medio sin Na<sup>+</sup> (sustituido por manitol), a pH 7,4 (conteniendo 30 μM rotenona y 200 μM ouabaína), e incubadas en ausencia de Na<sup>+</sup> y con diferentes pH: 7,4 (○), 6,0 (□) y 5,5 (△). En el segundo caso, la preincubación se realizó en las mismas condiciones, siendo las células posteriormente transferidas a medios con distintas concentraciones de Na<sup>+</sup>: 0 (■), 80 (●) y 100 mM (▲), y pH 7,4.

### III. 13. EFFECTO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA INDUCIDO POR ANIONES SOBRE LA CAPTACION DE 3-OMG Y DE GLY-SAR.

El uso de aniones con alta permeabilidad da lugar a la creación de potenciales negativos en el interior de la célula, y en consecuencia, cuando se imponen gradientes químicos para el  $\text{Na}^+$  junto con potenciales eléctricos, las células pueden establecer gradientes para los azúcares superiores a los observados bajo la única influencia del gradiente de  $\text{Na}^+$ .

Por ello, realizamos una serie de experimentos en los que el  $\text{ClNa}$  fue sustituido por  $\text{NO}_3\text{Na}$  (el anión  $\text{NO}_3^-$  tiene una permeabilidad superior al  $\text{Cl}^-$ ). Las células fueron preincubadas en un medio con tampón Tris-Acetato en vez de Tris- $\text{ClH}$  (con 200  $\mu\text{M}$  ouabaína y 80  $\mu\text{M}$  rotenona) e incubadas en medio con nitrato sódico (ver apartado II. 3. 1 de Material y Métodos). Bajo estas condiciones, observamos (Tabla XXXVI y Fig.28) como efectivamente la acumulación transitoria de 3-OMG fue mayor que la observada al incubar en medio estándar. En el caso del dipéptido su entrada se vió ligeramente favorecida, en los tiempos iniciales, al aumentar el gradiente de potencial a través de la membrana (ver Tabla XXXVII y Fig. 30). Sin embargo, no se observó acumulación transitoria del mismo.

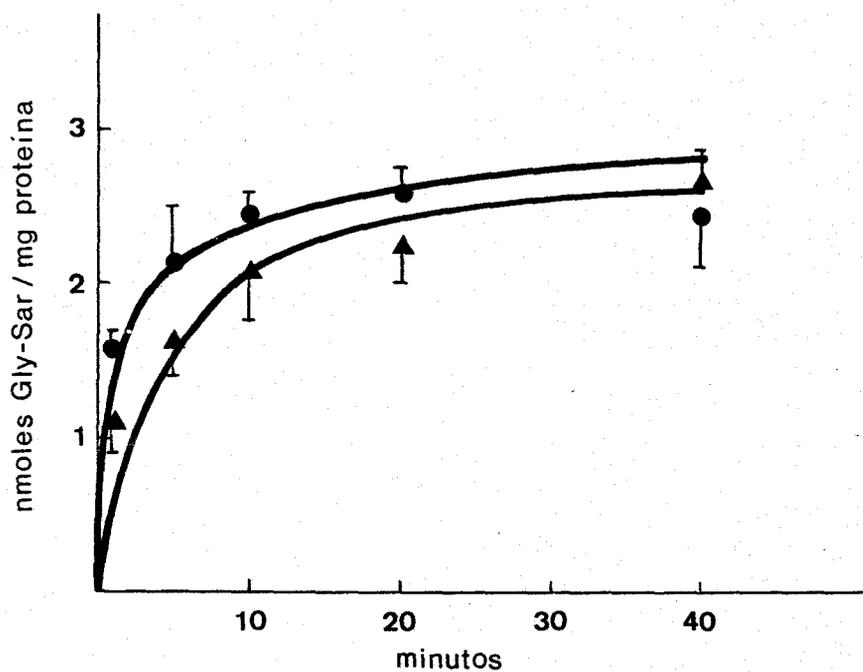
**Tabla XXXVII. Entrada de 3-OMG en células deplecionadas de ATP, después de preincubar con 80  $\mu$ M rotenona y 200 $\mu$ M ouabaína. Las células deplecionadas fueron incubadas en presencia de rotenona, ouabaína y floretina, en medio de Nitrato Na. También se indica la relación de distribución (R) en células control y deplecionadas.**

		nmol 3-OMG / mg proteína				
n T(min):		1	5	10	20	40
<b>Florricina:</b>	4	0,4	1,8	2,2	2,4	3,5
<b>Control:</b>	4	4,6 ± 1	10,7 ± 3	13,4 ± 3	18,8 ± 4	22,1 ± 5
<b>R:</b>		1,3	3,1	3,8	5,4	6,1
<b>Deplecionadas:</b>	7	6,2 ± 0,4	8,9 ± 0,6	9,6 ± 0,8	8,1 ± 0,8	7,0 ± 0,6
<b>R:</b>		1,6	2,5	2,7	2,2	1,9

**Tabla XXXVII. Efecto del anión acompañante del  $\text{Na}^+$  en la entrada de 1  $\mu\text{M}$  Gly-Sar en células deplecionadas de ATP, por tratamiento con rotenona y ouabaina. Los medios de incubación utilizados con las células deplecionadas fueron el medio estándar y el medio de Nitrato Na.**

		nmol Gly-Sar / mg proteína				
	n	T (min): 1	5	10	20	40
<b>Medio estándar</b>	6	1,1 ± 0,07	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,4	2,2 ± 0,2	2,7 ± 0,1
<b>Medio Nitrato</b>	15	1,6** ± 0,2	2,3* ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,3

\*  $0,01 > p > 0,001$ ; \*\*  $0,05 > p > 0,025$ ; respecto a los valores control.



**Fig. 30.** Entrada de 1 mM Gly-Sar en enterocitos deplecionados de ATP, en presencia de un gradiente de  $\text{Na}^+$  y diferentes gradientes aniónicos. Las células fueron preincubadas en medio con sistema tampón Tris/Acetato e incubadas en medio estándar (▲) o en medio de nitrato sódico (●).

### III. 14. EFECTO DEL POTENCIAL DE DIFUSION DE $K^+$ SOBRE EL TRANSPORTE DE GLICIL-SARCOSINA Y DE 3-ONG.

Cuando los enterocitos son deplecionados de ATP en un medio con alta concentración de  $K^+$  (medio KG, ver apartado II. 3. 1 de Material y Métodos) y, posteriormente transferidos a medios con distintas concentraciones de dicho ión, en presencia de valinomicina (ionóforo de  $K^+$ ), se generan potenciales eléctricos, debido al flujo de salida de  $K^+$ , que son mayores, cuanto menor sea la concentración de este ión en el medio extracelular.

Un sensor cualitativo del potencial de membrana es el tetrafenilfosfonio ( $TPP^+$ ), cuya entrada en las células es función del mismo. De esta forma, y bajo las condiciones descritas anteriormente, la entrada de  $TPP^+$  aumentará al disminuir la concentración extracelular de  $K^+$ .

En primer lugar, y para comprobar experimentalmente la generación de dichos potenciales, realizamos un estudio sobre la entrada de  $TPP^+$  ( $10 \mu M$ ) en enterocitos deplecionados de ATP. Una vez deplecionadas las células de ATP, por el tratamiento descrito (ver apartado II. 5. 2 de Material y Métodos), fueron incubadas en medios con distintas concentraciones de  $K^+$ , en presencia de  $30 \mu g/ml$  de valinomicina. El  $K^+$  fue sustituido por cantidades isoosmóticas de manitol, con excepción del medio libre de  $K^+$  en cuyo caso

**Tabla XXXVIII. Entrada de TPP<sup>+</sup> en células deplecionadas de ATP con distintos potenciales de membrana.** Las células fueron aisladas y deplecionadas en medio KG. La incubación se llevo a cabo en medios con distintas concentraciones de K<sup>+</sup>, sustituido por cantidades isoosmóticas de manitol, con excepción del medio libre de K<sup>+</sup>, en cuyo caso se utilizó el medio NaG.

[K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> /[K <sup>+</sup> ] <sub>e</sub> (mM)	n	T (min):	pmoles TPP <sup>+</sup> / mg proteína			
			1	2	35	10
140/140	4	22 ± 2	33 ± 2	37 ± 4		
120/120	4				40 ± 5	51 ± 5
140/35	4	34 <sup>**</sup> ± 1	36 ± 4	50 <sup>****</sup> ± 0,7		
140/6	4	38 <sup>*</sup> ± 0,5	51 <sup>***</sup> ± 4	67 <sup>**</sup> ± 4		
120/0	4				70 <sup>*****</sup> ± 10	118 <sup>***</sup> ± 15

\* p < 0,001; \*\* 0,005 > p > 0,001; \*\*\* 0,01 > p > 0,005; \*\*\*\* 0,025 > p > 0,01;

\*\*\*\*\* 0,05 > p > 0,025; respecto a los valores a [K<sup>+</sup>] = 140 mM.

se utilizó el medio NaG (ver apartado II. 3. 1 de Material y Métodos). Como se puede observar en la Tabla XXXVIII la entrada de  $\text{TPP}^+$  aumentó significativamente al disminuir la concentración extracelular de  $\text{K}^+$ , lo que nos confirma que, efectivamente, los gradientes impuestos de  $\text{K}^+$  hacia el exterior en presencia de valinomicina, dan lugar a la generación de potenciales eléctricos.

A continuación, estudiamos la posible influencia de dichos potenciales sobre la entrada de 3-OMG (0,1 mM) y Gly-Sar (0,1 mM), bajo distintas condiciones experimentales.

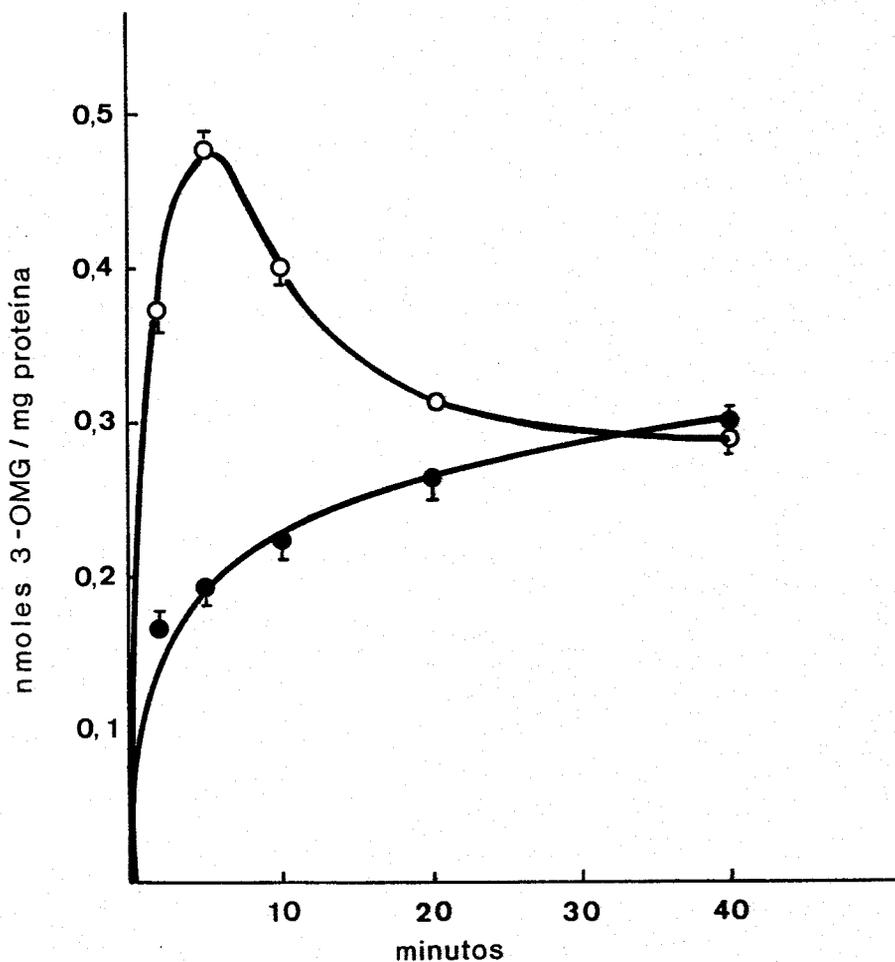
Para estudiar la posible influencia del potencial de membrana y del gradiente de  $\text{Na}^+$  sobre el transporte de sustratos, los enterocitos deplecionados de ATP en medio KG, fueron transferidos a un medio libre de  $\text{K}^+$ , en presencia de valinomicina, y con una alta concentración de  $\text{Na}^+$  (medio NaG). Como se podía esperar, (ver Tabla XXXIX y Fig. 31) la imposición de dicho gradiente de  $\text{Na}^+$  y del potencial de membrana dió lugar a un aumento significativo en la entrada del azúcar, observándose claramente la acumulación transitoria del mismo, típica de las células deplecionadas (como ya se ha descrito anteriormente). Bajo las mismas condiciones la entrada del dipéptido se vió ligeramente favorecida, en relación con la entrada del mismo en ausencia de dichos gradientes (Tabla XXXIX y Fig. 32).

Con el fin de estudiar el efecto del potencial de

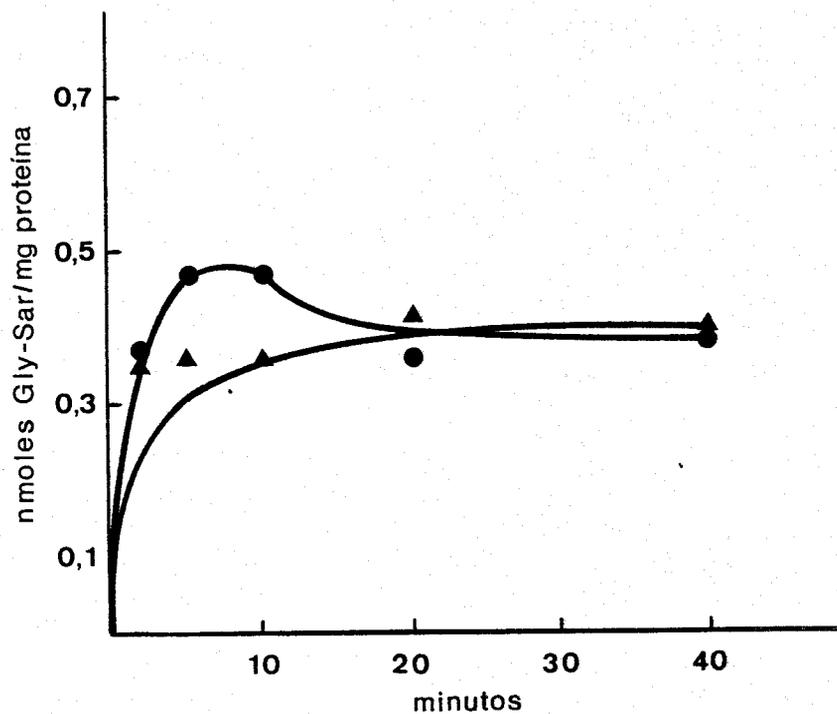
Tabla XXXIX. Entrada de 3-OMG (0,1 mM) y de Gly-Sar (0,1 mM) en células deplecionadas de ATP, en presencia de 30 µg/ml valinomicina. El medio de incubación utilizado fue el medio KG o el medio NaG.

		nmol / mg proteína				
n	T (min):	2	5	10	20	40
<b>3-OMG:</b>						
Medio KG	5	0,17 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,30 ± 0,03
Medio NaG	8	0,37** ± 0,03	0,48* ± 0,03	0,40*** ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,29 ± 0,02
<b>Gly-Sar:</b>						
Medio KG	3	0,37 ± 0,06	0,36 ± 0,02	0,43 ± 0,07	0,35 ± 0,05	0,40 ± 0,06
Medio NaG	8	0,36 ± 0,04	0,48 ± 0,07	0,48 ± 0,07	0,43 ± 0,06	0,39 ± 0,04

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,005 > p > 0,001$ ; \*\*\*  $0,025 > p > 0,01$



**Fig. 31. Efecto del gradiente de sodio y del potencial de membrana sobre la entrada de 3-OMG (0,1 mM) en enterocitos deplecionados de ATP. Las células fueron preincubadas durante 15 minutos en medio KG y, posteriormente incubadas en medio NaG (O) y en medio KG(●), en presencia de 20 µg/ml valinomicina y 200 µM floretina. 80 µM rotenona y 200 µM ouabaína estuvieron presentes en la preincubación y en la incubación.**



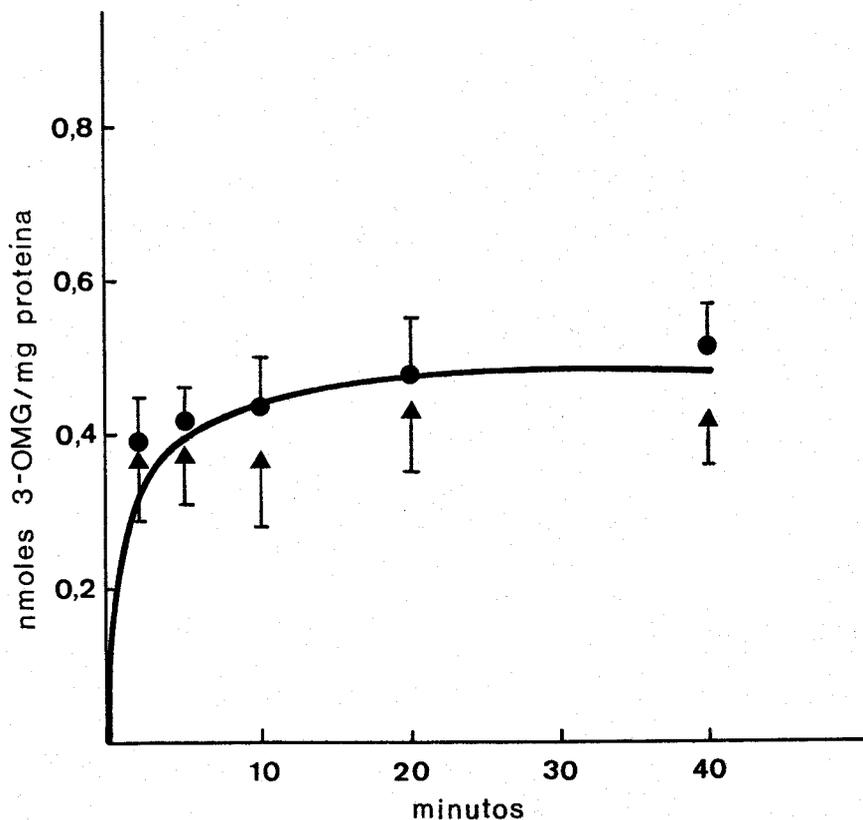
**Fig. 32.** Efecto del gradiente de sodio y del potencial de membrana sobre la entrada de  $0,1 \mu\text{M}$  Gly-Sar en enterocitos deplecionados de ATP. Las células fueron preincubadas durante 15 minutos en medio KG y, posteriormente incubadas en medio NaG (●) y en medio KG(▲), en presencia de  $20 \mu\text{g/ml}$  valinomicina,  $80 \mu\text{M}$  rotenona y  $200 \mu\text{M}$  ouabaina estuvieron presentes en la preincubación y en la incubación.

membrana y del gradiente de  $H^+$  sobre el transporte de sustratos, los enterocitos deplecionados de ATP en medio con alta concentración de  $K^+$  (medio KG), fueron transferidos a medios sin  $K^+$  y sin  $Na^+$  (sustituidos por cantidades isoosmóticas de manitol), en presencia de valinomicina, y con distintos pH. En la Tabla XL y Fig. 33 se puede observar como, al eliminar el  $Na^+$  del medio de incubación, el azúcar no se acumula ni en ausencia ( $pH_o$  7,4;  $pH_i$  7,4) ni en presencia ( $pH_o$  5,5;  $pH_i$  7,4) de un gradiente de  $H^+$  en adición al potencial de difusión de  $K^+$ . Sin embargo, el dipéptido se acumuló intracelularmente cuando un gradiente de  $H^+$  ( $pH_o$  5,5;  $pH_i$  7,4) y un gradiente de potencial fueron impuestos a través de la membrana, alcanzando una concentración intracelular 2,5 veces superior a la del medio extracelular (Tabla XL y Fig. 34).

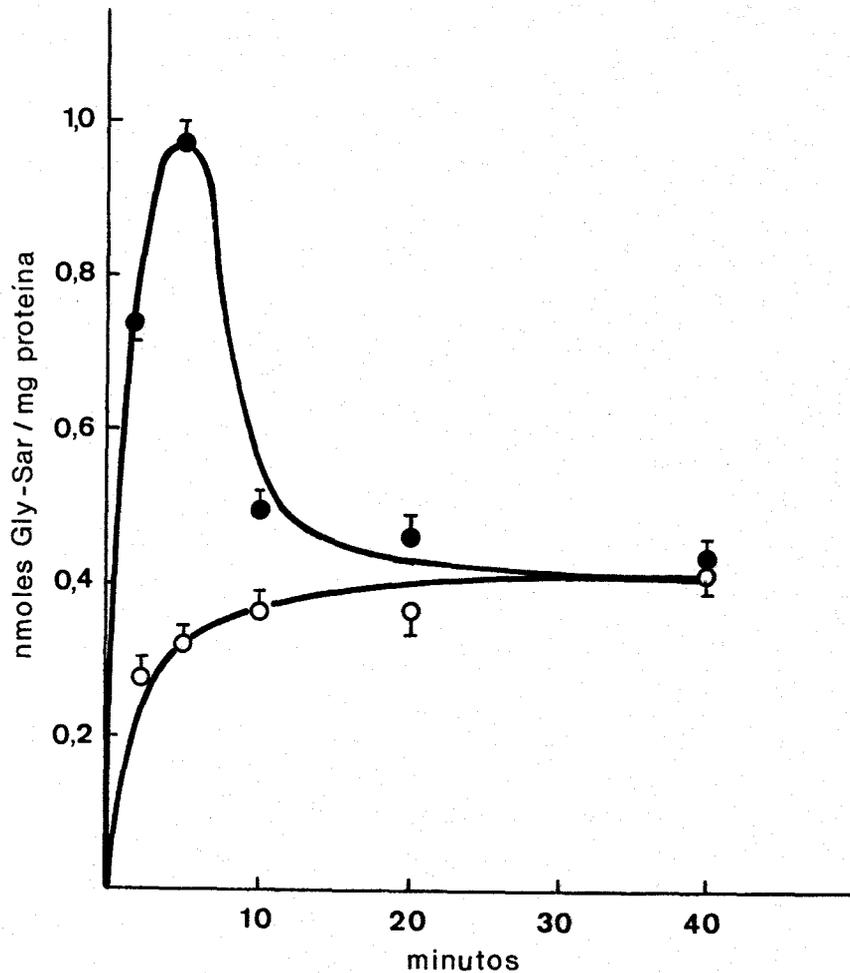
Tabla XL. Entrada de 3-OMG (0,1 mM) y Gly-Sar (0,1 mM) en células deplecionadas de ATP, en presencia de 30 µg/ml valinomicina, a distintos pH del medio de incubación, en ausencia de Na<sup>+</sup>.

		nmol / mg proteína				
n	T (min):	2	5	10	20	40
<b>3-OMG</b>						
pH 7,4	4	0,39 ± 0,04	0,42 ± 0,07	0,44 ± 0,06	0,48 ± 0,05	0,52 ± 0,05
pH 5,5	4	0,39 ± 0,09	0,45 ± 0,08	0,36 ± 0,06	0,43 ± 0,09	0,42 ± 0,08
<b>Gly-Sar</b>						
pH 7,4	6	0,28 ± 0,06	0,33 ± 0,04	0,37 ± 0,07	0,36 ± 0,07	0,41 ± 0,05
pH 5,5	9	0,73* ± 0,07	0,97* ± 0,06	0,50 ± 0,08	0,47 ± 0,08	0,44 ± 0,06

\* p < 0,001



**Fig. 33.** Efecto del gradiente de protones y del potencial de membrana sobre la entrada de 0,1 mM 3-OMG en enterocitos deplecionados de ATP. Las células fueron preincubadas en medio KG a pH 7,4 y, posteriormente incubadas en medio KG (●), a pH 7,4, o en medio sin  $K^+$  y sin  $Na^+$  (sustituido por manitol), a pH 5,5 (▲), en presencia de 20  $\mu$ M valinomicina y 200  $\mu$ M floretina, 80  $\mu$ M rotenona y 200  $\mu$ M ouabaína estuvieron presentes en la preincubación y en la incubación.



**Fig. 34.** Efecto del gradiente de protones y del potencial de membrana sobre la entrada de 0,1 mM Gly-Sar en enterocitos deplecionados de ATP. Las células fueron preincubadas en medio KG a pH 7,4 y, posteriormente incubadas en medio KG (○), a pH 7,4, o en medio sin K<sup>+</sup> y sin Na<sup>+</sup> (sustituido por manitol), a pH 5,5 (●), en presencia de 20 μM valinomicina, 80 μM rotenona y 200 μM ouabaína estuvieron presentes en la preincubación y en la incubación.

### III. 15. TRANSPORTE DE GLICIL-SARCOSINA POR CELULAS AISLADAS DE CIEGO Y RECTO DE POLLO.

La región cecal del tracto digestivo del pollo ha sido considerada, tradicionalmente, como una zona de interés para la nutrición del animal, únicamente, por su relación con la absorción de agua y electrolitos.

Ferrer, *et al.* (1986a) han puesto de manifiesto que el medio más adecuado para aislar los enterocitos, tanto de ciego como de recto, es el de citrato sódico, descrito en el apartado II. 3. 2 de Material y Métodos, por lo que ha sido empleado en los experimentos que se describen a continuación.

En la Tabla XLI y Fig. 35 se puede observar que la acumulación de 3-OMG es 3 veces mayor en ciego y 2,2 veces mayor en recto que en yeyuno. Asimismo la Gly-Sar alcanzó a los 40 minutos de incubación una concentración intracelular 1,75 veces mayor en ciego que en yeyuno, y sólo 1,2 veces superior en recto.

Las diferencias observadas no son debidas a un cambio del volumen intracelular, ya que como puede observarse en la Tabla XLV éste no varió significativamente respecto a los valores medidos en yeyuno.

Hemos estudiado la entrada de Gly-Sar en células aisladas de ciego y recto, en presencia y ausencia de sodio.

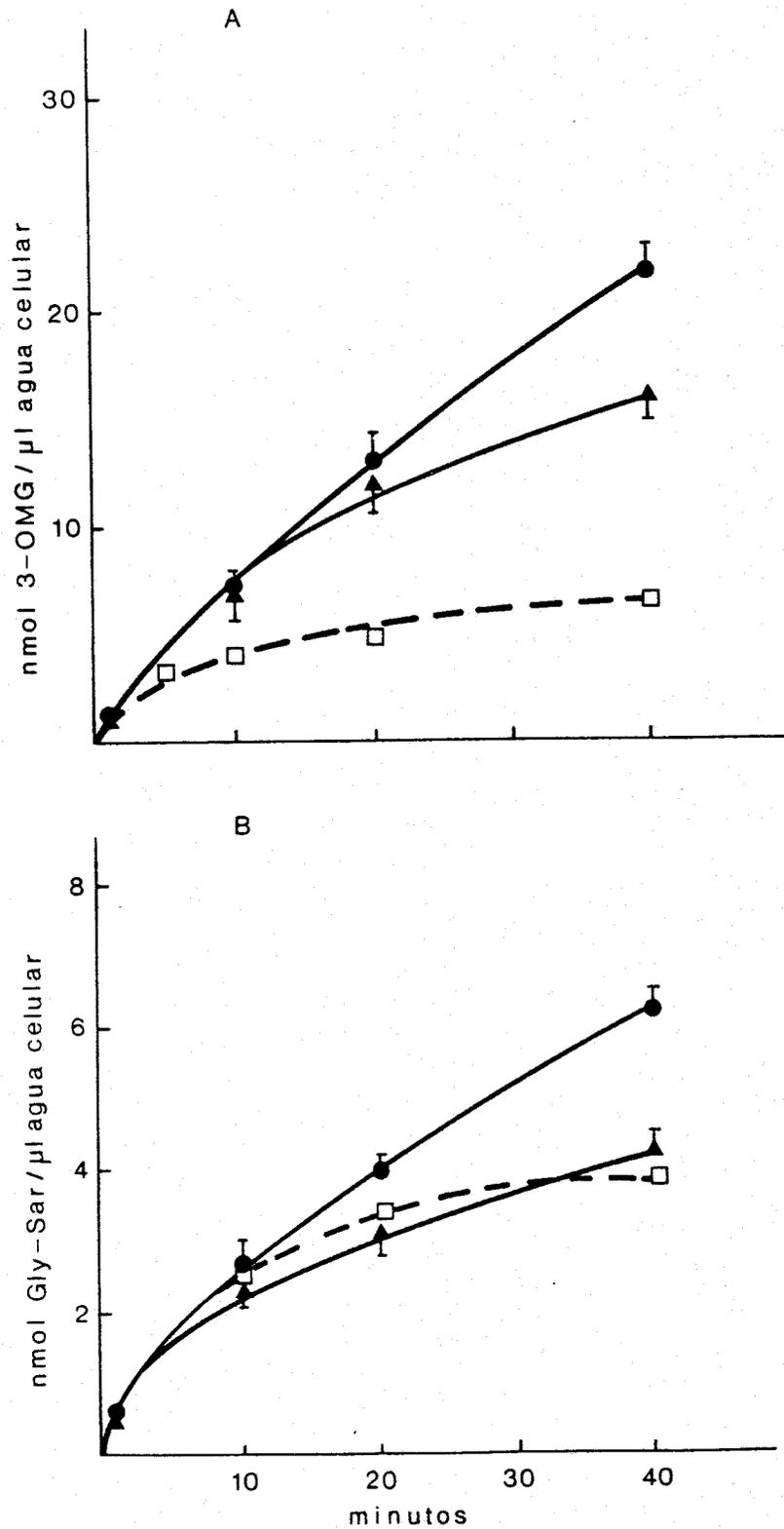
En la Tabla XLII y Fig. 36 se puede observar como en ciego la eliminación del ión redujo significativamente tanto la velocidad inicial de entrada (43%) como la acumulación intracelular a los 40 minutos (34%). En recto, la disminución provocada al eliminar el sodio del medio de incubación fue menor, siendo solo significativa a los 40 minutos de incubación (62%).

También estudiamos el efecto del pH sobre la entrada de Gly-Sar en células aisladas de ciego y recto de pollo, observando que en ambos casos la disminución del pH, desde 7,4 a 6,0, estimuló significativamente la entrada del dipéptido ( ver Tabla XLIII y Fig. 37).

Por último, para dilucidar si el efecto del  $\text{Na}^+$  era indirecto, es decir, debido a la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , examinamos el efecto del amiloride sobre la entrada de Gly-Sar. Como se puede observar en la Tabla XLIV y Fig. 38 el amiloride inhibió la entrada del dipéptido tanto en ciego como en recto, igual que ocurría en yeyuno, lo que nos indica que la inhibición producida al eliminar el sodio del medio de incubación, puede ser indirecta, como había sido sugerido por Ganapathy et al., 1984.

Tabla XLI. Entrada de 3-OMG (1 mM) y Gly-Sar (1 mM) en enterocitos aislados de ciego y recto de pollo, en función del tiempo de incubación.

		nmol / $\mu$ l agua celular			
n	T (min):	1	10	20	40
<b>3-OMG</b>					
Ciego	9	0,9	7	13	22
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		0,5	0,5	0,8	1,2
Recto	4	1	7	12	16
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		0,08	0,8	1,4	1,1
<b>Gly-Sar</b>					
Ciego	18	0,4	2,6	3,9	6,3
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		0,08	0,3	0,2	0,2
Recto	9	0,7	2,2	3,1	4,3
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		0,2	0,1	0,3	0,2

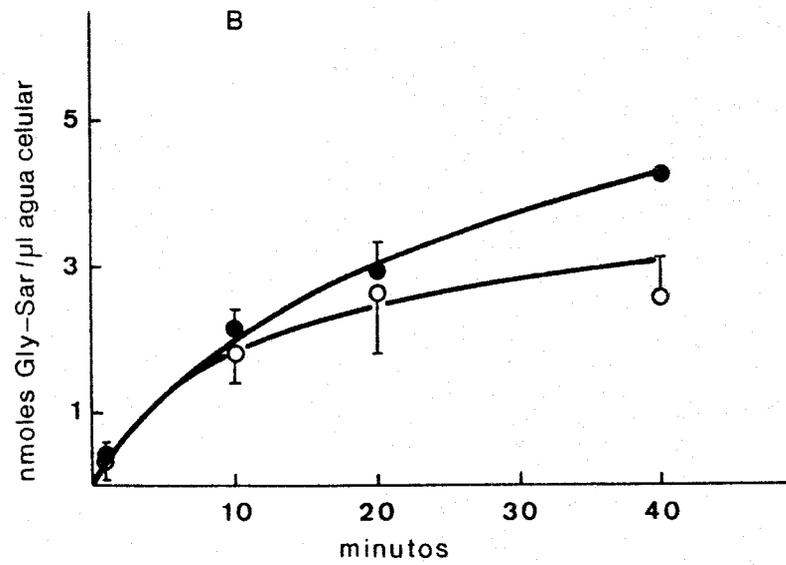
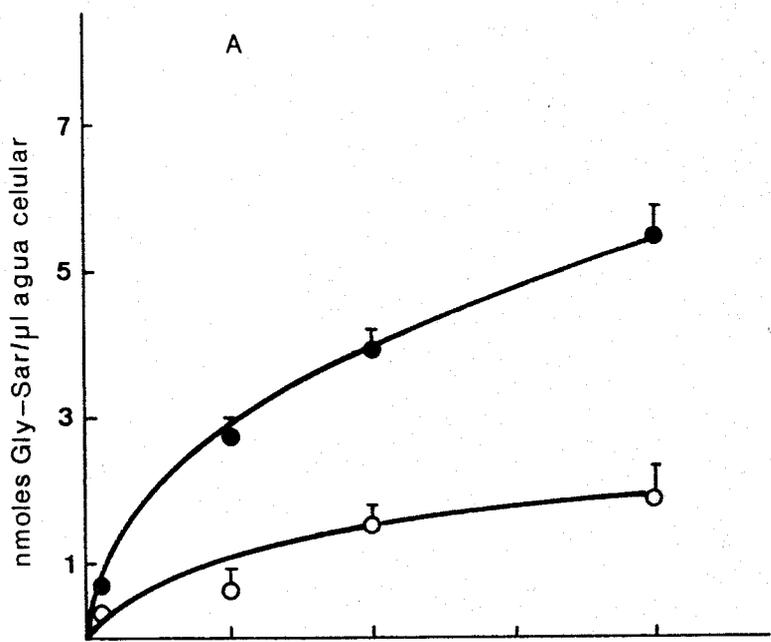


**Fig. 35.** Entrada de 1 mM 3-OMG (A) y 1 mM Gly-Sar (B) en células intestinales aisladas de ciego (●) y recto de pollo (▲). Las células fueron aisladas en medio de citrato sódico. La línea de trazos indica la entrada de ambos sustratos en células aisladas de intestino delgado de pollo.

Tabla XLII. Entrada de 1 mM Gly-Sar en enterocitos aislados de ciego y recto de intestino delgado de pollo, en presencia y ausencia de sodio.

		nmol / $\mu$ l agua celular			
n	T (min):	1	10	20	40
<b>Ciego</b>					
[Na <sup>+</sup> ]=80 mM	4	0,7 ± 0,1	2,8 ± 0,2	3,9 ± 0,3	5,5 ± 0,4
[Na <sup>+</sup> ]=0 mM	4	0,3 <sup>****</sup> ± 0,1	0,7 <sup>**</sup> ± 0,3	1,6 <sup>*</sup> ± 0,2	1,9 <sup>*</sup> ± 0,4
<b>Recto</b>					
[Na <sup>+</sup> ]=80 mM	4	0,6 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,8 ± 0,4	4,2 ± 0,1
[Na <sup>+</sup> ]=0 mM	4	0,4 ± 0,3	1,8 ± 0,4	2,6 ± 0,8	2,6 <sup>***</sup> ± 0,4

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,005 > p > 0,001$ ; \*\*\*  $0,01 > p > 0,005$ ; \*\*\*\*  $0,05 > p > 0,025$



**Fig. 36. Efecto de la ausencia de Na<sup>+</sup> en el medio de incubación sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar en células aisladas de ciego (A) y recto de pollo (B). El aislamiento se realizó en medio de citrato sódico. En la incubación el Na<sup>+</sup> fue sustituido isoosmóticamente por manitol, siendo el pH del medio de incubación 7,4. ●, 80 mM Na<sup>+</sup>; ○, 0 mM Na<sup>+</sup>.**

Tabla XLIII. Efecto del pH sobre la entrada de Gly-Sar (1 mM) en enterocitos aislados de ciego y recto de pollo.

		nmol / $\mu$ l agua celular				
	n	T (min):	1	10	20	40
<b>Ciego</b>						
pH 7,4	4		0,4 ± 0,2	2,6 ± 0,4	3,9 ± 0,4	6,4 ± 0,2
pH 6,0	4		1,6 <sup>***</sup> ± 0,4	3,7 ± 0,4	5,5 <sup>***</sup> ± 0,4	8,7 <sup>**</sup> ± 0,5
<b>Recto</b>						
pH 7,4	4		1,3 ± 0,5	2,4 ± 0,4	3,5 ± 0,3	4,3 ± 0,0
pH 6,0	4		2,9 ± 0,5	4,1 <sup>***</sup> ± 0,5	5,4 <sup>*</sup> ± 0,2	7,7 <sup>*</sup> ± 0,7

\* 0,005 > p > 0,001; \*\* 0,01 > p > 0,005; \*\*\* 0,05 > p > 0,025

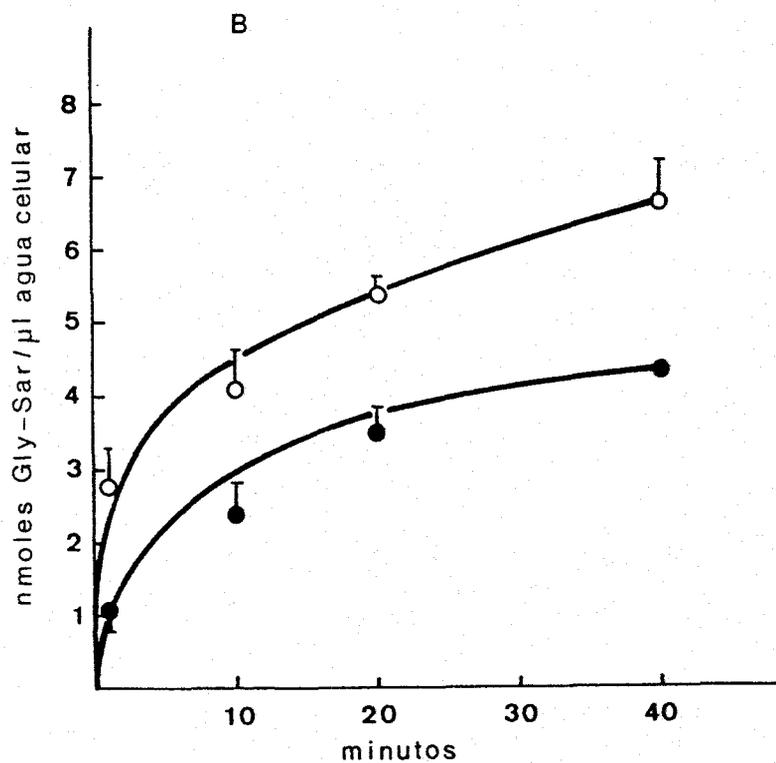
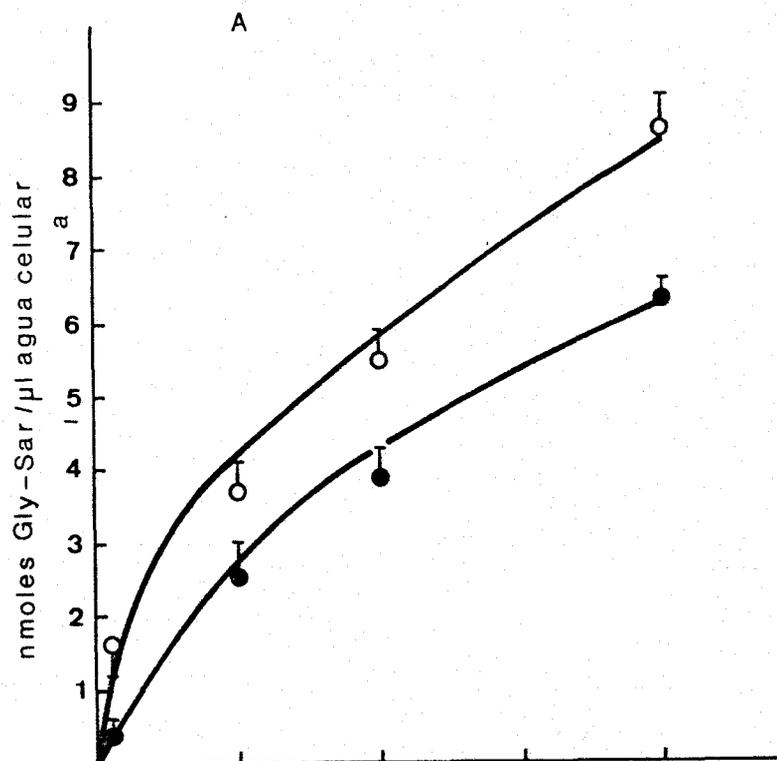
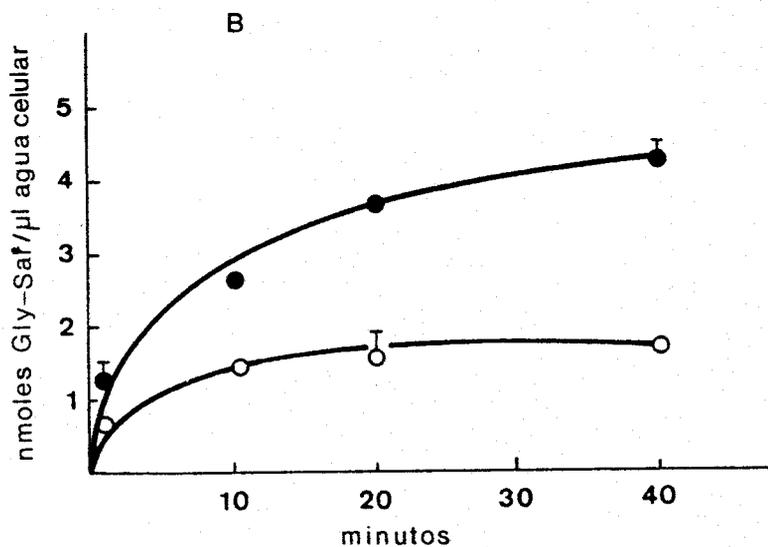
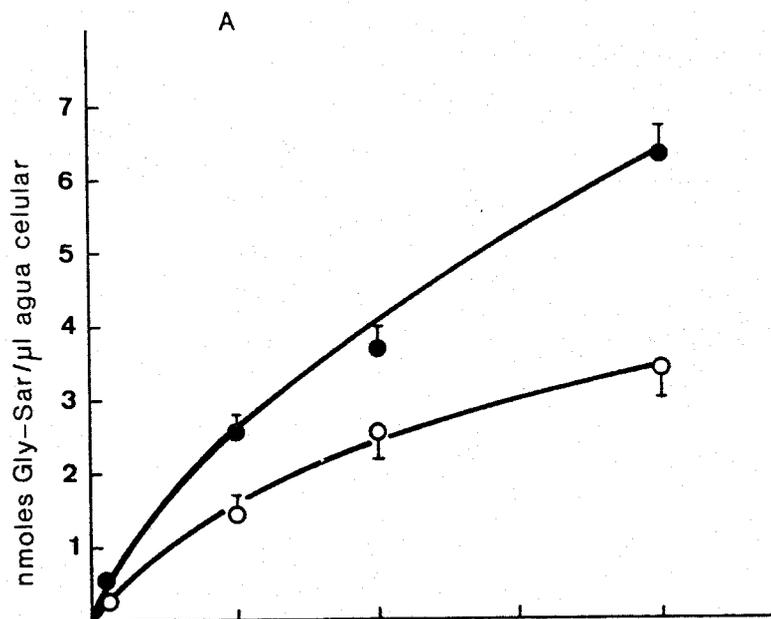


Fig. 37. Efecto del pH del medio de incubación sobre el transporte de 1 mM Gly-Sar por enterocitos aislados de ciego (A) y recto de pollo (B). Se ensayaron dos valores de pH: 7,4 (●) y 6,0 (○).

Tabla XLIV. Efecto del amiloride (1,25 mM) sobre la entrada de Gly-Sar (1 mM) en enterocitos aislados de ciego y recto de pollo. Las células fueron preincubadas durante 15 minutos con amiloride (1 mM).

		nmol / $\mu$ l agua celular			
n	T (min):	1	10	20	40
<b>Ciego</b>					
Control	4	0,5 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,4
Amiloride	4	0,3 $\pm$ 0,1	1,5*** $\pm$ 0,2	2,5**** $\pm$ 0,3	3,4** $\pm$ 0,4
<b>Recto</b>					
Control	4	1,3 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,2
Amiloride	4	0,7**** $\pm$ 0,1	1,4* $\pm$ 0,1	1,6* $\pm$ 0,3	1,7* $\pm$ 0,1

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $0,005 > p > 0,001$ ; \*\*\*  $0,01 > p > 0,005$ ; \*\*\*\*  $0,05 > p > 0,025$ ; respecto a los valores control.



**Fig. 38. Efecto del amiloride sobre la entrada de 1 mM Gly-Sar en enterocitos aislados de ciego (A) y recto de pollo (B). Las células fueron preincubadas en presencia de 1 mM amiloride durante 15 minutos, y posteriormente incubadas con 1,25 mM amiloride (○). Control: ●**

**Tabla XLV. Volumen intracelular y extracelular de células aisladas de ciego y recto de pollo.**

	n	µl agua /mg proteína	
		Ciego	Recto
<b>Volumen total</b>	8	5,9 ± 0,5	5,9 ± 0,5
<b>Volumen extracelular</b>	8	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,5
<b>Volumen intracelular</b>	8	3,7 ± 0,5	3,7 ± 0,5

## **IV. DISCUSSION**

#### IV. 1. ENTRADA DE GLY-SAR EN CELULAS AISLADAS DE INTESTINO DELGADO DE POLLO.

La importancia nutritiva de la absorción de aminoácidos en forma de péptidos ha sido bien demostrada. Por ejemplo, pacientes incapaces de absorber aminoácidos básicos y neutros permanecen sanos cuando se incluye en su dieta péptidos que contienen estos aminoácidos (Asatoor *et al.*, 1971). Por otra parte se ha descrito que determinados aminoácidos aparecen en la sangre (o fluido serosal) más rápidamente cuando se administran luminalmente en forma de di- o tri- péptidos, que como aminoácidos libres (Craft *et al.*, 1968).

En los últimos quince años, se ha demostrado que los di- y tri- péptidos son transportados activamente por las células de la mucosa intestinal mediante sistemas de transporte específicos y diferentes de aquellos implicados en el transporte de aminoácidos libres. Sin embargo, existen algunos aspectos del transporte de péptidos que han planteado gran controversia.

Hace dos décadas Crane postuló la hipótesis del gradiente de  $\text{Na}^+$  para explicar el modo de acoplamiento entre la energía metabólica y el transporte de azúcares en el intestino. Hoy, se ha podido demostrar que el gradiente

transmembrana de  $\text{Na}^+$  es la fuente de energía necesaria para el transporte activo de varios solutos orgánicos (azúcares y aminoácidos) e inorgánicos (cloruro, sulfato, fosfato, etc.). Pero, en relación a la naturaleza del gradiente iónico responsable del transporte de péptidos los resultados obtenidos han sido muy diversos.

Algunos estudios realizados con tejido intacto han demostrado que el transporte de dipéptidos es activo y dependiente de  $\text{Na}^+$  (Matthews, 1975; Matthews y Payne, 1980), sugiriendo que el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  sería la fuerza energética para dicho transporte.

Otros estudios, llevados a cabo con vesículas de membrana del borde en cepillo, han demostrado que el transporte de dipéptidos es electrogénico, independiente del  $\text{Na}^+$ , energizado por un gradiente de  $\text{H}^+$  y no-concentrativo (Hoshi, 1986; Ganapathy y Leibach, 1983; Ganapathy *et al.*, 1984). Por otro lado Takuwa *et al.* (1985), han descrito estas mismas propiedades para el transporte de glicil-glicina, pero observan que es concentrativo.

Sin embargo, Rajendran *et al.* (1987) han demostrado recientemente que en vesículas aisladas del borde en cepillo de conejo, hombre y ratón, el transporte de dipéptidos es independiente del gradiente de  $\text{Na}^+$  y del gradiente de  $\text{H}^+$ .

Las preparaciones de células aisladas son muy utilizadas en los estudios de los sistemas de transporte y,

más concretamente en el estudio de la energética de los mismos, ya que este tipo de preparación conserva las características de transporte del intestino completo, pero carece de toda una serie de capas tisulares, no epiteliales, que pueden enmascarar o dar lugar a error en la interpretación de los resultados. Asimismo presentan algunas ventajas sobre las vesículas que se describirán más adelante.

Se ha utilizado el pollo como animal de experimentación, porque la técnica de aislamiento de células epiteliales de su intestino, está muy 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 correctamente.

Iniciamos el presente trabajo estudiando la entrada de glicil-sarcosina en células aisladas de intestino delgado de pollo, en función del tiempo de incubación, comprobando que el dipéptido se acumula en los enterocitos, en contra de un gradiente de concentración. Así, en el estado de equilibrio alcanza una concentración intracelular 3,6 veces mayor a la del medio extracelular, resultado similar al encontrado en yeyuno de hamster (Addison *et al.*, 1972).

Uno de los problemas que plantea el estudio del transporte intestinal de péptidos 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 serían 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 estudiar si las células de intestino delgado de pollo poseen sistemas de transporte para dipéptidos, resultaba imprescindible utilizar un dipéptido no hidrolizable por la mucosa intestinal. Los datos existentes en la bibliografía muestran que la glicil-sarcosina es muy resistente a la hidrólisis. El único enzima conocido capaz de hidrolizar este dipéptido es una prolidasa, EC 3.4.13.9 (Ganapathy, 1982), localizada en el citosol.

El estudio cromatográfico, realizado por nosotros, muestra que el dipéptido no es hidrolizado en el medio de incubación. Además la L-Met, que presenta una elevada afinidad

por el sistema de transporte de la L-Gly, no afectó significativamente la entrada del dipéptido, por lo que podemos decir que la Gly-Sar es transportada intacta al interior de las células. Por otro lado, tras 30 minutos de incubación un 85% del contenido isotópico en las células permaneció como Gly-Sar. Teniendo en cuenta este dato, la concentración intracelular real del dipéptido sería 3 mM, es decir las células tienen capacidad para crear y mantener un gradiente de concentración 3 veces superior en relación al medio extracelular.

Otro hecho que podría enmascarar los resultados sería la unión del dipéptido a componentes intracelulares. Sin embargo la Gly-Sar permanece libre en el interior de las células, ya que la adición de FCCP (25  $\mu$ M) (un inhibidor de la entrada del dipéptido, ver Tabla XII y Fig. 17) a células que ya habían establecido el estado de equilibrio estacionario de acumulación del dipéptido, provocó la liberación de Gly-Sar desde las células con una velocidad inicial de salida de 0,25 nmol /  $\mu$ l agua celular / minuto.

La cinética de transporte de varios dipéptidos (carnosina, alanil-alanina, glutamil-glutámico, glicil-glicina, glicil-leucina, glicil-sarcosina, leucil-leucina, valil-valina) ha sido estudiada en varias especies animales (ratón, rata, hamster, mono, *Necturus*) (Addison *et al.*, 1974; Boyd y Ward, 1982; Cheeseman, 1986; Das y Radhakrishnan, 1975;

Matthews *et al.*, 1974 y 1979; Matthews y Burston, 1984; Nutrenadel y Scriver, 1976; Schedl *et al.*, 1979). Las constantes aparentes de transporte ( $K_t$ ) (porque no han sido corregidas para la resistencia del espesor de las capas de agua no agitadas) observadas oscilan entre 0,7 y 13 mM y los valores de velocidad máxima ( $U_{max}$ ) entre 0,4 y 4,4 nmol / mg proteína / minuto. El estudio cinético que describimos en el presente trabajo ha sido desarrollado por dos métodos diferentes, el primero midiendo la entrada de Gly-Sar a diferentes concentraciones de sustrato, a pH 6,0, y el segundo midiendo la entrada de Gly-Sar en presencia del dipéptido carnosina, a pH 7,4, ambos en presencia de  $Na^+$  en el medio de incubación. Los resultados obtenidos a pH 6,0 en el medio de incubación, sorprenden por la magnitud del componente de difusión, cuya importancia relativa respecto al transporte total aumenta al aumentar la concentración de sustrato. Así, a 0,1 mM el componente no-mediado fue solamente un 20% del transporte total, mientras que a 10 mM fue un 42% (Tabla IV y Fig. 11). Matthews *et al.* (1979) encontraron resultados semejantes estudiando la entrada de Gly-Sar en yeyuno de hamster.

Cuando las diferentes velocidades iniciales obtenidas a distintas concentraciones de sustrato, se corrigen por el valor de la difusión, se obtienen las velocidades iniciales mediadas por transportador. La representación gráfica de estos

valores siguiendo el método de Lineweaver-Burk fue una línea recta con un coeficiente de regresión  $r=0,9999$ , lo que indica que sólo un componente mediado está implicado en el transporte de Gly-Sar. Las constantes cinéticas obtenidas por este método han sido  $K_t = 8 \text{ mM}$  y  $U_{\text{max}} = 31 \text{ nmol/mg proteína/minuto}$ .

Por otro lado, la  $\beta$ -alanil-histidina o carnosina inhibió la entrada de Gly-Sar, lo que confirma la presencia de transportadores específicos para la Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo, que son compartidos por otros dipéptidos, como por ejemplo la carnosina. Los resultados obtenidos utilizando concentraciones de Gly-Sar 0,1 y 1 mM y concentraciones de carnosina 1, 5 y 10 mM fueron representados según el método de Dixon (Fig. 14), observándose que la inhibición es competitiva, o sea que los dos dipéptidos compiten por el mismo lugar de unión al transportador. En este estudio los valores no han sido corregidos por el valor de la difusión, ya que las concentraciones de sustrato utilizadas han sido muy bajas. Los valores de las constantes cinéticas han sido  $K_t = 6,3 \text{ mM}$ ,  $U_{\text{max}} = 6,5 \text{ nmol/ mg proteína/ minuto}$  y  $K_i = 12 \text{ mM}$ . Este valor de  $K_i$  es 3 veces mayor que el encontrado en vesículas de membrana del borde en cepillo de conejo (Ganapathy *et al.*, 1984). Como se puede observar el valor de la constante aparente de transporte ( $K_t$ ) es semejante al citado anteriormente y entra dentro del margen observado en

otras especies animales. Sin embargo, la velocidad máxima aumentó al disminuir el pH del medio de incubación (6,5 vs 31 nmol / mg proteína / minuto, pH 7,4 vs 6,0). Ganapathy *et al.* (1984), en vesículas de membrana del borde en cepillo de conejo, han observado que la  $K_t$  no fue modificada al imponer un gradiente de protones, mientras que la  $U_{max}$  fue incrementada desde 10,8 a 20,8 nmol / mg proteína / minuto al disminuir el pH extravesicular, lo que podría explicar el aumento por nosotros observado, cuando el pH del medio extracelular fue 6,0.

Al estudiar el efecto de la concentración de  $Na^+$  en el medio de incubación sobre la entrada de Gly-Sar, observamos que existía una relación entre la captación del dipéptido y la concentración extracelular del ión, ya que la reducción de ésta disminuía la entrada de Gly-Sar. No obstante, aún en ausencia total de  $Na^+$  en el medio de incubación la Gly-Sar se acumuló en contra de gradiente en el interior de los enterocitos (2,0 nmol / mg proteína / minuto, Tabla VI), por lo que estos resultados sugieren que dicho transporte es sólo en parte dependiente de  $Na^+$ . Esta dependencia parcial ha sido demostrada "in vitro" para la glicil-prolina y la glicil-leucina en intestino delgado de mono (Ganapathy y Radhaskrishnan, 1980), para la glicil-glicina en intestino delgado de cobaya (Himukai *et al.*, 1978) y para la  $\beta$ -alanil-glicil-glicina en yeyuno de hamster (Addison *et al.*, 1975a).

Por otro lado, la ouabaína (0,1 mM), en presencia de  $\text{Na}^+$ , inhibió el transporte activo de Gly-Sar. Bajo estas condiciones la concentración intracelular del dipéptido fue 2 veces superior a la del medio, lo que nos indica que el sistema de transporte activo de Gly-Sar depende en parte del funcionamiento de la bomba de  $\text{Na}^+$ .

Los resultados obtenidos a diferentes valores de pH extracelular muestran que la captación de Gly-Sar fue mayor a pH 6,0 que a pH 7,4 o 5,5, en presencia de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, en ausencia de  $\text{Na}^+$ , el pH 6,0 no estimuló la entrada del dipéptido. El FCCP inhibió la acumulación del dipéptido a los tres valores de pH ensayados. Además, este protonóforo también inhibió la captación de 3-OMG, indicando que su efecto no fue debido a una disipación específica del gradiente de  $\text{H}^+$  a través de la membrana. Estos resultados pueden ser fácilmente interpretados, ya que se ha demostrado que el FCCP produce una disminución del potencial de membrana, en vesículas de membrana del borde en cepillo (Ganapathy *et al.*, 1981) y una depleción total del contenido de ATP celular en túbulos proximales de riñón de conejo (Mandel y Murphy, 1984).

Según el modelo propuesto por Ganapathy *et al.* (1985) el transporte de dipéptidos sería dependiente de la actividad del sistema intercambiador  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ , necesaria para mantener un microclima ácido en la proximidad de los enterocitos, como ha sido demostrado por Lucas (1983). Según esto el  $\text{Na}^+$

extracelular sería requerido para mantener la actividad del intercambiador.

Existen gran cantidad de estudios que han demostrado la existencia del intercambiador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  en muchas células epiteliales (Roos y Boron, 1981; Reuss y Petersen, 1985) incluyendo enterocitos de pollo (Montrose et al., 1985). Este intercambiador puede ser inhibido por el amiloride y mimetizado por el ionóforo monensina (Montrose et al., 1985).

Los resultados recogidos en la Tabla XIX muestran que el amiloride estimuló la captación de 3-OMG a pH 7,4 y  $[\text{Na}^+]=80$  mM, no afectándola ni a pH 6,0, ni a pH 7,4 (40 mM ó 0 mM  $\text{Na}^+$ ). Por otro lado, cuando el sustrato fue Gly-Sar, el amiloride inhibió su captación a pH 7,4 y 80 ó 40 mM  $\text{Na}^+$ , siendo su efecto menor a pH 6,0 ó 5,5 (80 mM  $\text{Na}^+$ ) y no afectándole en ausencia de  $\text{Na}^+$ . Estos resultados son la primera evidencia que obtuvimos de una diferencia entre los sistemas de transporte de azúcares (3-OMG) y dipéptidos (Gly-Sar), puesto que el mismo agente (amiloride) producía una estimulación de la entrada de 3-OMG y una inhibición de la entrada de Gly-Sar. Esta diferencia puede explicarse teniendo en cuenta que el amiloride al inhibir el sistema de intercambio  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  aumenta el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana del borde en cepillo, y disminuye la salida de  $\text{H}^+$  y, por tanto, el gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  a través de la membrana. Un aumento de la captación de 3-OMG

dependiente de  $\text{Na}^+$  producida por amiloride, ha sido demostrado también en colon de conejo (Ilundáin y Nafatlin, 1981). Estos resultados indican que la Gly-Sar y la 3-DMG tienen requerimientos iónicos diferentes, lo cual podría ser interpretado en términos de una dependencia del sistema de transporte de la glicil-sarcosina respecto del gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$ .

En relación a los diferentes efectos del amiloride a pH 7,4 y a pH 6,0, una posible explicación podría ser que la contribución del sistema de intercambio  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  a los flujos totales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$  varía según el pH del medio, como fue demostrado por Montrose *et al.* (1985) en enterocitos de pollo deplecionados de ATP y por Garty *et al.* (1985) en vesículas obtenidas del epitelio de la vejiga urinaria de sapo. En nuestras condiciones (células normalmente energizadas), el pH intracelular se mantiene, probablemente próximo a 7,0 (Roos y Boron, 1981), siendo por ello la contribución del intercambiador  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  al gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  mayor a pH 7,4 que a pH 6,0 para un mismo gradiente de  $\text{Na}^+$ . Esto implica que el amiloride podría ser más efectivo inhibiendo la salida de  $\text{H}^+$ , a pH 7,4 que a pH 6,0; aumentando así la actividad de los sistemas de transporte dependientes de  $\text{Na}^+$  e inhibiendo la de los sistemas de transporte dependientes de  $\text{H}^+$  que a pH 6,0.

Hirose y Chang (1988) han encontrado que el amiloride

disminuye el pH intracelular en presencia de  $\text{Na}^+$ , pero no así cuando el  $\text{Na}^+$  se elimina del medio de incubación. Esto explicaría la falta de efecto del amiloride sobre los sistemas de transporte del azúcar y del dipéptido en ausencia de  $\text{Na}^+$ .

El efecto estimulante del amiloride sobre el transporte de 3-DMG no es debido a una inhibición del sistema de transporte de azúcares independiente de  $\text{Na}^+$ , ya que el transporte de 2-DOG (sustrato que no utiliza el sistema de transporte dependiente de  $\text{Na}^+$ ) no fue modificado en presencia de amiloride.

Para corroborar los resultados anteriores realizamos una serie de experimentos utilizando monensina. Este ionóforo confiere capacidad de intercambio  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  a muchos sistemas celulares, incluyendo enterocitos de pollo (Montrose *et al.*, 1985). De forma que la adición de monensina a las células podría prevenir los efectos del amiloride sobre el intercambiador  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ , y en consecuencia sobre el transporte de no-electrolitos, como de hecho hemos observado (Fig. 25 y 26 ).

Las posibles interferencias de los sistemas de intercambio  $\text{K}^+-\text{H}^+$  o  $\text{Cl}^- - \text{OH}^-$  no han sido señaladas, ya que no se ha podido demostrar la presencia de tales intercambiadores en enterocitos de pollo (Montrose *et al.*, 1985).

En resumen, el transporte de Gly-Sar en enterocitos aislados de pollo parece ser dependiente de  $\text{Na}^+$ , pero de una

manera indirecta. Los experimentos con amiloride y monensina sugieren que el  $\text{Na}^+$  es necesario para mantener un gradiente de  $\text{H}^+$  adecuado, via el intercambiador  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ , como había sido sugerido por Ganapathy y Leibach (1985) en vesículas de membrana del borde en cepillo. La actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+-\text{K}^+$  sería necesaria para mantener el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$ , y en consecuencia de  $\text{H}^+$ . Así, se ha observado que la ouabaína, al inhibir dicha ATPasa, produce una acidificación de las células (Hoinard y Goré, 1988), lo que podría explicar la inhibición de la entrada de Gly-Sar, encontrada por nosotros, en presencia de dicho glicósido.

#### IV. 2. EFFECTO DE DISTINTOS SUSTRATOS SOBRE LA SALIDA DE $\text{Na}^+$ DESDE ENTEROCITOS PREVIAMENTE CARGADOS CON $\text{Na}^{22}$ .

Un método para demostrar el cotransporte de sustratos con el  $\text{Na}^+$ , consiste en cargar las células con Na marcado y medir su salida en presencia de dichos sustratos. Si el transporte del sustrato aumenta la entrada de  $\text{Na}^+$  por cotransporte, este  $\text{Na}^+$  extra en el interior de la célula aumentará la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  para bombear fuera dicho ión y mantener la osmolaridad intracelular y el gradiente de  $\text{Na}^+$  (Cheeseman y Devlin, 1985).

Como ya hemos indicado en la Introducción se ha demostrado, con una gran variedad de técnicas, que la 3-OMG y

la L-Leu son cotransportadas con  $\text{Na}^+$  a través de la membrana del borde en cepillo de los enterocitos. Los datos presentados en la Tablas XXX y XXXI y Fig. 27 confirman que estos sustratos estimulan el flujo de salida de  $\text{Na}^+$  al exterior de las células, salida que siguió una cinética de primer orden durante al menos 8 minutos, e indican un aumento de la entrada de  $\text{Na}^+$  acoplada a estos sustratos. Los valores calculados para las distintas constantes de salida son muy parecidos a los obtenidos por Cheeseman y Devlin (1985) en enterocitos aislados de rata, lo que nos indica que nuestras células funcionan adecuadamente, y puede ser utilizada esta técnica para detectar si un sistema de transporte está o no acoplado al  $\text{Na}^+$ .

El hecho de que la Gly-Sar no estimule la salida de  $\text{Na}^+$  (ver Tablas XXX y XXXI y Fig. 27), apoya la hipótesis, enunciada en el apartado anterior, que postula que este sustrato no es cotransportado con  $\text{Na}^+$  a través de la membrana del borde en cepillo.

Cheeseman y Devlin (1985) obtuvieron resultados similares al estudiar el efecto de la glicil-L-leucina y de la carnosina sobre la salida de  $\text{Na}^+$  en enterocitos de rata. Sin embargo, la glicil-glicina sí estimuló dicha salida, lo que llevó a estos autores a pensar en la posible existencia de distintos sistemas de transporte de péptidos, unos independientes de  $\text{Na}^+$  y otros dependientes de dicho ión. En

cualquier caso la Gly-Sar no parece ser cotransportada con el  $\text{Na}^+$ .

### IV. 3. ENTRADA DE GLICIL - SARCOSINA EN ENTEROCITOS DEPLECIONADOS DE ATP.

Los resultados obtenidos con células normales parecen sugerir que el transporte de Gly-Sar por enterocitos aislados de pollo es dependiente de  $\text{Na}^+$  de una forma indirecta, pudiendo ser el gradiente de  $\text{H}^+$  el responsable directo de su acumulación.

Para corroborar esta hipótesis nos pareció interesante realizar un estudio utilizando células deplecionadas de ATP.

A la hora de analizar la influencia de los distintos gradientes iónicos sobre el transporte de sustratos, las células aisladas presentan un inconveniente: si bien podemos conocer y controlar la composición del medio extracelular, no ocurre lo mismo con el medio intracelular. Esta dificultad ha sido solventada por muchos autores, mediante el uso de vesículas de membrana del borde en cepillo, ya que al no tener bombas iónicas permiten controlar tanto la composición del medio extravesicular como la del medio intravesicular, e imponer determinados gradientes iónicos y potenciales de membrana.

En los últimos años, Carter-Su y Kimmich (1979 y 1980) han desarrollado un método para la obtención de enterocitos deplecionados de ATP, mediante preincubación de las células en un medio con rotenona y ouabaína. Este tipo de preparación exhibe características análogas a aquellas demostradas para las vesículas de membrana. El contenido celular de ATP se reduce a un nivel tal que no pueden mantener la actividad de la bomba de sodio ni la acumulación intracelular de los azúcares. En consecuencia, las concentraciones iónicas celulares después de la preincubación en presencia de rotenona y ouabaína serán similares a las extracelulares y se pueden manipular los gradientes iónicos y los potenciales de membrana con independencia del metabolismo. Además las células deplecionadas tienen algunas ventajas sobre las vesículas, ya que se evitan posibles alteraciones de las propiedades de la membrana (tales como permeabilidad iónica u orientación de la vesícula) que acompañan a los procesos de formación de las vesículas. Por otra parte su mayor tamaño permite obtener acumulaciones transitorias de los sustratos más prolongadas.

Tras comprobar que las células deplecionadas de ATP en nuestro laboratorio eran capaces de acumular transitoriamente 3-OMG (Fig. 28), estudiamos la entrada de Gly-Sar. Los resultados obtenidos muestran que el transporte de Gly-Sar no fue estimulado al imponer distintos gradientes de  $\text{Na}^+$  a pH 7,4 (ver Tabla XXXIV y Fig. 29). Estos resultados

parecen estar de acuerdo con un gran número de trabajos, realizados con vesículas de membrana del borde en cepillo, en los cuales el  $\text{Na}^+$  no tuvo ningún efecto sobre la entrada del dipéptido (Abe *et al.*, 1987; Ganapathy *et al.*, 1981 y 1984; Rajendran *et al.*, 1984 y 1985 a y b). Asimismo, en contraposición con las observaciones obtenidas por otros autores en vesículas de membrana ( Ganapathy *et al.*, 1981 y 1984; Takuwa *et al.*, 1985), la captación de Gly-Sar tampoco fue modificada cuando impusimos un gradiente de  $\text{H}^+$ , en ausencia de  $\text{Na}^+$  (Tabla XXXV y Fig, 29). Nuestros resultados, sin embargo, están de acuerdo con los obtenidos recientemente por Rajendran *et al.* (1987) que observa que ni el  $\text{Na}^+$  ni los  $\text{H}^+$  ejercieron efecto alguno sobre la entrada de Gly-Pro en vesículas de membrana del borde en cepillo de ratón, conejo y hombre.

El potencial de membrana tiene una gran importancia en el transporte activo de solutos a través del epitelio intestinal (Kimmich, 1984). Dicho potencial (negativo en el interior) juega un papel fundamental al suministrar parte de la energía necesaria para dicho transporte. En varias preparaciones celulares se ha demostrado que la acumulación de azúcares no podía explicarse termodinámicamente en base exclusiva al gradiente de  $\text{Na}^+$  (Bosackova y Crane, 1965; Kimmich, 1970b y 1972; Potashner y Johnstone, 1971), sino que era necesario tener en cuenta el gradiente eléctrico

transmembrana (Carter-Su y Kimmich, 1979 y 1980; Hopfer *et al.*, 1975; Kimmich y Carter-Su, 1978; Murer y Hopfer, 1974; Murer *et al.*, 1975 y Sigrist-Nelson *et al.*, 1975).

En el caso de los dipéptidos se ha demostrado que: i) el transporte de dipéptidos produce una variación del potencial transmural en intestino de sapo y *Necturus* (Abe *et al.*, 1987; Boyd y Ward, 1982). ii) su transporte en vesículas de membrana del borde en cepillo de intestino de conejo se ve favorecida por la creación de potenciales de membrana negativos en el interior (Ganapathy y Leibach, 1983; Ganapathy *et al.*, 1984; Takuwa *et al.*, 1985). Todo ello sugiere que el transporte de dipéptidos es electrogénico y se ve favorecido por el potencial de membrana.

La creación de potenciales de membrana en células deplecionadas de ATP puede llevarse a cabo por dos mecanismos: el primero consiste en imponer gradientes de entrada de aniones más permeables que el  $\text{Cl}^-$ , como el  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SCN}^-$  (Carter-Su y Kimmich, 1979); el segundo en imponer gradientes de salida de  $\text{K}^+$  en presencia de valinomicina (ionóforo de  $\text{K}^+$ ) (Carter-Su y Kimmich, 1980). En ambos casos, se crea un potencial de membrana negativo en el interior de la célula respecto al exterior.

El uso de 3-OMG, cuyo transporte ha sido inequívocamente demostrado que es electrogénico, nos permitió

comprobar que con ambos métodos se creaba un potencial de membrana (negativo en el interior). Podemos observar en las Fig. 28 y 31 que la acumulación transitoria 3-OMG fue mayor que en ausencia de potencial. Por otro lado, mediante el empleo del catión lipofílico TPP<sup>+</sup>, también comprobamos como al disminuir la concentración extracelular de K<sup>+</sup> en presencia de valinomicina se producía un aumento del potencial de membrana (ver Tabla XXXVIII).

En relación a la Gly-Sar se observa que la velocidad inicial de entrada es ligeramente mayor en un medio con nitrato que en el medio estándar, lo cual parece indicar que el potencial de membrana favorece la entrada de Gly-Sar (Fig. 30).

Dado que la Gly-Sar tiene dos grupos ionizables, un grupo carboxilo con un pK<sub>a</sub> de 2,83 y un grupo amino con un pK<sub>a</sub> de 8,45, siendo su pH isoelectrico 5,66 (Ganapathy *et al.*, 1984), bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, este dipéptido existe predominantemente como un ión dipolar con carga neta cero. Por lo tanto, si su transporte depende del potencial de membrana quiere decir que la Gly-Sar es cotransportada con algún ión, y que el complejo carrier-sustrato está cargado.

Para corroborar los resultados anteriores y poner de manifiesto la naturaleza del ion que se cotransporta con el

dipéptido, se hicieron una serie de experimentos en enterocitos deplecionados de ATP en los que el potencial de membrana se creaba mediante un gradiente de  $K^+$  y presencia de valinomicina. Para la realización de estos experimentos elegimos una concentración de sustrato 0,1 mM, ya que a concentraciones menores es más fácil obtener acumulaciones. Los resultados muestran que la presencia de un potencial de membrana no estimula la entrada de Gly-Sar. Al imponer un gradiente de  $Na^+$ , además de un gradiente eléctrico, se observa que hay una ligera acumulación transitoria de Gly-Sar (Fig. 32) que puede atribuirse al potencial de membrana. En las mismas condiciones, el transporte de 3-OMG nos daba los máximos valores de acumulación transitoria. Sin embargo, al imponer un gradiente de  $H^+$ , por incubación de estas células en medio sin  $Na^+$  a pH 5,5, la acumulación transitoria alcanzada por el dipéptido fue 2,5, mientras que el azúcar no se acumuló en estas condiciones (gradiente de  $H^+$  y presencia de potencial de membrana). El hecho de que la entrada de sustratos orgánicos a células deplecionadas de ATP y en presencia de valinomicina no fuera concentrativa cuando la concentración de  $K^+$  intracelular fue alta e igual a la extracelular indica que es el gradiente eléctrico, creado por el gradiente de  $K^+$  en presencia de valinomicina, el responsable de la entrada concentrativa de sustratos y no la alta concentración de  $K^+$  intracelular. Estos resultados

indican claramente que el transporte de Gly-Sar en enterocitos deplecionados de ATP depende del potencial de membrana y del gradiente de protones, y están de acuerdo con los resultados obtenidos por Ganapathy *et al.* (1981 y 1984) al estudiar el transporte de glicil-L-prolina y glicilsarcosina y por Takuwa *et al.* (1985) con glicil-glicina, ambas en vesículas de membrana del borde en cepillo de conejo. Sin embargo, contrastan con los obtenidos por Rajendran *et al.* (1987) en vesículas de membrana del borde en cepillo de intestino de ratón, conejo y hombre, ya que no observaron estimulación del transporte de glicil-L-prolina al imponer un gradiente de  $H^+$  en presencia de un potencial de membrana.

#### IV. 4. ENTRADA DE GLICIL-SARCOSINA EN CELULAS AISLADAS DE CIEGO Y RECTO.

Recientemente Ferrer *et al.* (1986b) han demostrado la existencia en ciego proximal de pollo de un mecanismo de transporte activo para monosacáridos, con una capacidad de acumular 3-OMG 2 veces superior a la del yeyuno a los 60 minutos de incubación. Asimismo han comprobado (Planas *et al.*, 1987) que las células de recto de pollo son capaces de acumular 3-OMG en un valor que resulta 2,2 veces superior al obtenido en células procedentes de yeyuno. Nuestros resultados sobre la captación de 3-OMG coinciden con los citados.

Una vez comprobada la existencia de sistemas de transporte específicos para dipéptidos en intestino delgado de pollo, nos pareció interesante estudiar la posible existencia de los mismos en intestino grueso.

En la Tabla XLI y Fig.35 se puede observar que la Gly-Sar también se acumuló en las células aisladas de ciego y recto, es decir, también parece existir un sistema de transporte activo para dipéptidos en estos tramos intestinales, con las mismas características a las del sistema de transporte presente en el yeyuno, ya que: i) fue inhibido en ausencia de  $\text{Na}^+$ , pero sin que su acumulación llegue a anularse (Fig. 36); ii) fue estimulado cuando el pH del medio extracelular fue 6 (Fig. 37); iii) fue inhibido por el amiloride (Fig. 38) lo que parece indicar, de un modo indirecto, la existencia del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en estas células. En resumen, el sistema de transporte parece ser dependiente del  $\text{Na}^+$  de un modo indirecto, al depender del gradiente de  $\text{H}^+$  y del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

## **V. CONCLUSIONES**

1. Mediante el empleo de técnicas cromatográficas se ha visto que la glicil-sarcosina no es, de forma apreciable, hidrolizada ni extracelularmente, ni intracelularmente por células aisladas de intestino delgado de pollo. Esto se confirmó por el hecho de que la L-metionina no inhibió el transporte de Gly-Sar.
2. La Gly-Sar se acumula intracelularmente en contra de su gradiente de concentración; alcanzándose en el estado estacionario, una concentración tres veces mayor que la medio extracelular, lo que indica que los enterocitos de intestino delgado de pollo poseen un sistema de transporte activo para la Gly-Sar. El dipéptido acumulado intracelularmente se mantiene libre, sin unirse a componentes intracelulares.
3. El estudio cinético del transporte de Gly-Sar en células aisladas de intestino delgado de pollo, revela que dicho transporte tiene dos componentes: un componente pasivo (difusión simple) y un componente mediado (transporte activo). Las constantes cinéticas del transporte mediado, a pH 6,0, calculadas según el método de Lineweaver-Burk, fueron  $K_t=8$  mM y  $U_{max}=31$  nmol/mg proteína/minuto.
4. Las constantes cinéticas, a pH 7,4, calculadas según el método de Dixon, fueron  $K_t=6,3$  mM y  $U_{max}=6,5$  nmol/mg proteína/minuto;

apreciándose que si bien la disminución del pH no modificó la  $K_t$  aumentó significativamente la  $U_{max}$ .

5. La carnosina ( $\beta$ -alanil-histidina) inhibe competitivamente el transporte de Gly-Sar, obteniéndose una constante de inhibición ( $K_i$ ), a pH 7,4, de 12 mM.
6. La disminución del gradiente de sodio y la inhibición de la ATPasa- $Na^+K^+$  reducen la entrada de Gly-Sar sin anular su acumulación en el estado de equilibrio.
7. La entrada de Gly-Sar en células aisladas fue mayor a  $pH_e$  6,0 que a  $pH_e$  7,4 y 5,5. Cuando el  $pH_e$  fue 5,0 cesó la acumulación del dipéptido.
8. El FCCP (protonóforo) inhibió la entrada de Gly-Sar a los tres valores de pH ensayados. Asimismo inhibió la entrada de 3-OMG.
9. En presencia de amiloride (inhibidor del intercambiador  $Na^+/H^+$ ) la entrada de Gly-Sar fue inhibida; mientras que la de 3-OMG fue estimulada. La presencia de monensina revertió el efecto producido por el amiloride sobre el transporte del dipéptido y del azúcar. Estos datos sugieren que la acumulación de Gly-Sar depende, en parte, de la actividad del intercambiador  $Na^+-H^+$ .

10. En enterocitos deplecionados de ATP, la entrada de Gly-Sar no se vió modificada al variar el gradiente de  $\text{Na}^+$  a pH 7,4, ni al variar el gradiente de  $\text{H}^+$  en ausencia de  $\text{Na}^+$ .
11. El aumento del potencial de membrana, mediante la variación del gradiente aniónico, favoreció la entrada de Gly-Sar a enterocitos deplecionados de ATP en presencia de un gradiente de  $\text{Na}^+$ .
12. El potencial de membrana, inducido por el  $\text{K}^+$ , en presencia de valinomicina, no modificó la entrada de Gly-Sar en ausencia de un gradiente de  $\text{Na}^+$  o de  $\text{H}^+$ .  
La imposición de un gradiente de  $\text{Na}^+$  en estas condiciones favoreció la entrada de Gly-Sar, observándose una ligera acumulación transitoria.  
La máxima acumulación transitoria del dipéptido se observó cuando además del potencial de membrana se impuso un gradiente de  $\text{H}^+$ .
13. La Gly-Sar se acumula en células aisladas de ciego proximal y de recto, alcanzando un gradiente de concentración mayor que en el yeyuno. Las características de este sistema de transporte son las mismas, ya que: i) fue inhibido en ausencia de  $\text{Na}^+$  sin llegar a anularse su acumulación intracelular en el estado estacionario, ii) fue máximo a pH 6,0, iii) fue

inhibido en presencia de amiloride.

14. De todo lo anterior se deduce que la Gly-Sar es transportada en células aisladas de pollo por un sistema de transporte activo terciario, el cual depende directamente del gradiente de  $H^+$  y del potencial de membrana; siendo dependiente del  $Na^+$  de un modo indirecto, al ser el gradiente de  $H^+$  función del sistema de intercambio  $Na^+-H^+$  (sistema de transporte activo secundario), el cual depende a su vez de la ATPasa- $Na^+-K^+$  (sistema de transporte activo primario).

## **VI. BIBLIOGRAFIA**

**BIBLIOGRAFIA**

ABE, M.; HOSHI, T. y TAJIMA, A. (1987),  
Characteristics of transmural potential changes associated with the  
proton-peptide co-transport in toad small intestine. J. Physiol., 394:  
481-499.

ADDISON, J.M.; BURSTON, D.; DALRYMPLE, J.A.; MATTHEWS, D.M.; PAYNE,  
J.W.; SLEISENGER, M.H. y WILKINSON, S. (1975 b),  
A common mechanism for transport of di- and tripeptides by hamster  
jejunum "in vitro". Clin. Sci. Mol. Med. 49: 313-322.

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

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

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. (1976),

Intestinal phase of protein assimilation in man. Am. J. Clin. Nutr. 29: 205-215.

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 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. y SOLEIMANPOUR, M. R. (1974),

Functional characterization of dipeptide transport system in human jejunum. J. Clin. Invest. 53: 1368-1374.

AGAR, W.T.; HIRD, F.J.R. y SIDHU, G.S. (1953),

The active absorption of amino acids by the intestine. J. Physiol. (London), 121: 255-263

ALPERS, D.U. (1986),

Uptake and fate of absorbed amino acids and peptides in the mammalian intestine. Federation Proc. 45: 2261-2267.

ALVARADO, F. (1966),

D-xylose active transport in the hamster small intestine. Biochim. Biophys. Acta, 112: 292-303.

AMAYA-F., J.; LEE, T.C. y CHICHESTER, C.O. (1976),

The intestinal absorption of fructosyl-glycine-L-leucine. Nutr. Rep. Int. 14: 229-235.

ARMSTRONG, W. Mc. D. y GARCIA-DIAZ, J.F. (1984),

Electrical phenomena and ion transport in the small intestine. In: Handbook of Experimental Pharmacology, vol 70/1, ed.: T.Z., Csaky, pp. 309-380, Springer, New York.

ASATOOR, A.M.; CHADHA, A.; MILNE, M.D. y PROSSER, D.I. (1973),

Intestinal absorption of stereoisomers of dipeptides in the rat. Clin. Sci. Mol. Med. 45: 199-212.

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.

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". Clin. Sci. 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, 1979.

CARTER-SU, C. y KIMMICH, G.A. (1980),  
Effect of the membrane potential on  $\text{Na}^+$ -dependent sugar transport by  
ATP-depleted intestinal cells. Am. J. Physiol. 238: C73-C80.

CASPARY, W.F. y CRANE, R.K. (1970),  
Active transport of myo-inositol and its relation to the sugar  
transport system of hamster small intestine. Biochim. Biophys. Acta.  
203: 308-316.

CASSANO, G.; STEIGER, B. y MURER, H. (1984),  
 $\text{Na}/\text{H}$ - and  $\text{Cl}/\text{OH}$ - exchange in rat jejunal and rat proximal tubular  
brush-border membrane vesicle. Pfluegers Arch. 400: 309-317.

CHEESEMAN, C.I. (1984),  
Sodium and dipeptide transport in the small intestine. Can. J.  
Physiol. Pharmacol. 62: Aiii.

CHEESEMAN, C. I. (1986),

Expression of aminoacid and peptide transport systems in rat small intestine. Am. J. Physiol., 251: G636-G641.

CHEESEMAN, C.I. y DEVLIN, D. (1985),

The effect of amino acids and dipeptides on sodium-ion transport in rat enterocytes. Biochim. Biophys. Acta, 812: 767-773.

CHEESEMAN, C.I. y PARSONS, D.S. (1974),

Intestinal absorption of peptides. peptide uptake by small intestine of *Rana Pipiens*. Biochim. Biophys. Acta, 373: 523-526.

CHEESEMAN, C.I. y SMYTH, D.H. (1973),

Specific transfer process for intestinal absorption of peptides. J. Physiol. (London), 229: 45P-46P.

COOK, G.C. (1973),

Independent jejunal mechanisms for glycine and glycylglycine transfer in man "in vitro". Br. J. Nutri. 30: 13-19.

CRAFT, I. L.; GEDDES, D.; HYDE, C. W.; WISE, I. J. y MATTHEWS, D.M. (1968),

Absorption and Malabsorption of glycine and glycine peptides in man. Gut, 9: 425-437.

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

CRANE, R.K. (1960),  
Intestinal absorption of sugars. Physiol. Rev. 40: 798-825.

CRANE, R.K. (1962),  
Hypothesis for mechanism of intestinal active transport of sugars.  
Fred. Proc. 21: 891-895.

CRANE, R.K. y KRANE, S.M. (1956),  
On the mechanism of intestinal absorption of sugars. Biochim. Biophys.  
Acta, 20: 568-574.

CRITCHLEY, D.R.; EICHALZ, A. y CRANE, R.K. (1969),  
Transport of 5-thio-D-glucose in hamster small intestine. Biochim.  
Biophys. Acta, 211:244-254.

CSAKY, T.Z. y LASSEN, U.U. (1964),  
Active transport of D-xylose. Biochim. Biophys. Acta, 82: 215-217.

CSAKY, T.Z. y THALE, M. (1960),  
Effect of ionic environment on intestinal sugar transport. J. Physiol.  
(London), 151: 59-65.

DAS, M. y RADHAKRISHNAN, R.N. (1975),

Studies on a wide-spectrum intestinal dipeptide uptake system in the monkey and in the human. Biochem. J. 146: 133-137.

FAIRCLOUGH, 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.

FERRER, R.; PLANAS, J.M. y MORETO, M. (1986a),

Preparation and properties of isolated epithelial cells from chicken cecum and jejunum. Rev. Esp. Fisiol. 42: 341-348.

FERRER, R.; PLANAS, J.M. y MORETO, M. (1986b),

Characteristics of the chicken proximal cecum hexose transport system. Pflugers. Arch. 407: 100-104.

FISHER, R.B. y PARSONS, D.S. (1949),

A preparation of surviving rat small intestine for the study of absorption. J. Physiol. (London), 110: 36-46.

FOGEL, M.R. y ADIBI, S.A. (1974),

Assessment of the role of brush border peptide hydrolases in luminal

disappearance of dipeptides in man. J. Lab. Clin. Med. 84: 327-333.

FRIZZELL, R.A.; FIELD, M. y SCHULTZ, S.G. (1979),

Sodium-coupled Chloride transport by epithelial tissues. Am. J. Physiol. 236: F1-F8.

FRIZZELL, R.A.; HALM, D.R.; MUSCH, M.W.; STEWART, C.P. y FIELD, M. (1984),

Potassium transport by flounder intestinal mucosa. Am. J. Physiol. 246: F946-F951.

GANAPATHY, U.; BURCKHARDT, G. y LEIBACH, F.H. (1984),

Characteristics of glycylsarcosine transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. J. Biol. Chem. 259 (4): 8954-8959.

GANAPATHY, U.; FONTELES, M.; PASHLEY, D.H. y LEIBACH, F.H. (1982),

Prolidase contamination in commercial bovine serum albumin. Biochim. Biophys. Acta, 719: 154-157.

GANAPATHY, U. 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 (23): 14189-14192.

GANAPATHY, U. y LEIBACH, F.H. (1985),

Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient?. Am. J. Physiol. 249: G153-G160.

GANAPATHY, U. y LEIBACH, F.H. (1986),

Carrier mediated reabsorption of small peptides in renal proximal tubules. Am. J. Physiol. 251: F945-F953.

GANAPATHY, U.; MENDICINO, J.F. y LEIBACH, F.H. (1981),

Transport of glycyl-L-proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit. J. Biol. Chem. 256: 118-124.

GANAPATHY, U. y RADHAKRISNAN, A.N. (1980),

Sodium-dependent inhibition of amino acid and dipeptide transport by harmaline in monkey small intestine. Biochem. Pharmacol. 29: 713-716.

GARDNER, M.L.G. (1975),

Absorption of amino acids and peptides from a complex mixture in the isolated small intestine from the rat. J. Physiol. (London), 253: 233-256.

GARDNER, M.L.G. (1982),

Absorption of intact peptides studies on transport of protein digesta and dipeptide across rat small intestine in vitro. Cl. Exp. Physiol. 67: 629-637.

GARTY, H.; CIUAN, E.D. y CIUAN, M. M. (1985),  
Effects of internal and external pH on amiloride-blockable  $\text{Na}^+$   
transport across toad urinary bladder vesicles. J. Membrane Biol. 87:  
67-75.

GECK, P. y HEINZ, E. (1986),  
The  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$  cotransport system. J. Memb. Biol. 91: 97-105.

GIRARDI, A.J.; McMICHAEL, H. y HENLE, W. (1956),  
The use of HeLa cells in suspension for the quantitative study of  
virus propagation, Virology, 2: 532-544.

GREGER, A. y SCHLATTER, E. (1983),  
Properties of the lumen membrane of the cortical thick ascending limb  
of Henle's loop of rabbit kidney. Pfluegers Arch. 396: 315-324.

HAAS, M. y McMANUS, T.J. (1983),  
Bumetanide inhibits  $(\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Cl}^-)$  cotransport at a chloride site. Am. J.  
Physiol. 245: C235-C240.

HAJJAR, J.J. y CURRAN, P.F. (1970),  
Characteristics of the amino acid transport system in the mucosal  
border of rabbit ileum. J. Gen. Physiol. 56: 673-691.

HALL, A.C. y ELLORY, J.C. (1985),

Measurement and stoichiometry of bumetanide-sensitive (2Na:1K:3Cl) cotransport in ferret red cells. J. Membr. Biol. 85: 205-213.

HALM, D.R.; KRASNY, E.J., Jr. y FRIZZELL, R.A. (1985),

Electrophysiology of flounder intestinal mucosa. I. Conductance properties of the cellular and paracellular pathways. J. Gen. Physiol. 85: 843-864.

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.; PERRETT, D. y THIRUMALAI, C. (1972),

Intestinal dipeptide transport in normal and cystinuric subjects. Clin. Sci. 43: 659-668.

HELLIER, M.D.; RADHAKRISHNAN, A.N.; GANAPATHY, U.; MATHAN, U.I. y BAKER, S.J. (1976),

Intestinal perfusion studies in tropical sprue. I. Amino acid and dipeptide absorption. Gut 17: 511-516.

HIMUKAI, M.; KANO-KAMEYAMA, A. y HOSHI, T. (1982),

Mechanisms of inhibition of glycylglycine transport by glycyl-L-leucine and L-leucine in guinea small intestine. Biochim.

Biophys. Acta, 687: 170-178.

HIMUKAI, M.; KANO-KAMEYAMA, A. y HOSHI, T. (1983),  
Interaction of glycylglycine and  $\text{Na}^+$  at the mucosal border of guinea  
pig small intestine. Biochim. Biophys. Acta, 732: 659-667.

HIMUKAI, M.; SUZUKI, Y. y HOSHI, T. (1978),  
Differences in characteristics between glycine and glycylglycine  
transport in guinea pig small intestine. Jpn. J. Physiol. 28: 499-510.

HIROSE, R. y CHANG, E.B. (1988),  
Effects of serotonin on  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchange and intracellular calcium in  
isolated chicken enterocytes. Am. J. Physiol. 254: G891-G897.

HONNARD, C. y GORE, J. (1988),  
Cytoplasmic pH in isolated rat enterocytes. Role of  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger.  
Biochim. Biophys. Acta, 941: 111-118.

HOPFER, U.; NELSON, K.; PERROTTO, J. e ISSELBACHER, K.J. (1973),  
Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small  
intestine. J. Biol. Chem. 248: 25-32.

HOPFER, U.; SIGRIST-NELSON, K.; AMMANN, E. y MURER, H. (1976),  
Differences in neutral amino acid and glucose transport between brush

border and basolateral plasma membrane of intestinal epithelial cells.  
J. Cell. Physiol. 89: 805-810.

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

HOSHI, T.; TAKUWA, N.; ABE, M. y TAJIMA, A. (1986),  
Hydrogen ion-coupled transport of D-glucose by phlorizin-sensitive  
sugar carrier in intestinal brush-border membranes. Biochim. Biophys.  
Acta, 861: 483-488.

ILUNDAIN, A. y NAFTALIN, R.J. (1981),  
Na<sup>+</sup>-dependent co-transport of  $\alpha$ -methyl-D-glucoside across the mucosal  
border of rabbit descending colon. Biochim. Biophys. Acta, 644:  
316-322.

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  $\text{Na}^+$ -gradient. In:  $\text{Na}^+$ -Linked transport of organic solutes (Heinz, E., ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 116-129.

KIMMICH, G.A. (1984),

Sodium electrochemical gradients and intestinal absorption. In: Intestinal Toxicology, ed by C.M. Schiller, Raven Press, New York.

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

Membrane potentials and the energetics of intestinal  $\text{Na}^+$ -dependent transport system. Am. J. Physiol. 235: C73-C81.

KIMURA, T.; YAMAMOTO, T.; MIZUMO, M.; SUGA, Y.; KITADE, S. Y SEZAKI, H. (1983),

Characterization of aminocephalosporin transport across rat small intestine. J. Pharmacobio-Dyn. 6: 246-253.

KINSELLA, J.L. y ARONSON, P.S. (1980),

Properties of the  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger in renal microvillus membrane vesicles. Am. J. Physiol. 238: F461-F469.

KINSELLA, J.L. y ARONSON, P.S. (1981),

Interaction of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Li}^+$  with the renal microvillus  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchanger. Am. J. Physiol. 241: C220-C226.

KNICKELBEIN, R.; ARONSON, P.S.; ATHERTON, W. Y DOBBINS, J.W. (1983),

Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. Am. J. Physiol. 245: G504-G510.

LANDAU, B.R.; BERNSTEIN, N.L. y WILSON, T.H. (1962),

Hexose transport by hamster intestine "in vitro". Am. J. Physiol. 203: 237-240.

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.

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.

LUCAS, M. (1983),

Determination of acid surface pH in vivo in rat proximal jejunum. Gut, 24: 734-739.

MALONEY, P.C. (1982),

Energy coupling to ATP synthesis by the proton-translocating ATPase.  
J. Memb. Biol. 67: 1-12.

MANDEL, L.J. y MURPHY, E. (1984),

Regulation of cytosolic free calcium in rabbit proximal renal tubules.  
J. Biol. Chem., 259: 11188-11196.

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 (Ed. by Matthews, D.M. y Payne, J.W.) pp. 61-146.

MATTHEWS, D.M.; ADDISON, J.M. y BURSTON, D. (1974),

Evidence for active transport of the dipeptide carnosine ( $\beta$ -alanil-L-histidine) by hamster jejunum "in vitro". Clin. Sci. Mol. Med. 46: 693-705.

MATTHEWS, D.M. y BURSTON, D. (1983),

Uptake of L-leucil-L-leucine and glycylsarcosine by hamster jejunum "in vitro". Clin. Sci. 65: 177-184.

MATTHEWS, D.M. y BURSTON, D. (1984),

Uptake of series of neutral dipeptides including L-alanyl-L-alanine, glycylglycine and glycylsarcosine by hamster jejunum "in vitro". Clin. Sci. 67: 541-549.

MATTHEWS, D.M.; CRAFT, I.L.; GEDDES, D.M.; WISE, I.J. y HIDE, C.W. (1968),

Absorption of glycine and glycine peptides from the small intestine of the rat. Clin. Sci. 35: 415-424.

MATTHEWS, D.M.; GANDY, R.H.; TAYLOR, E. y BURSTON, D. (1979),

Influx of two dipeptides, glycylsarcosine and L-glutamyl-L-glutamic acid, into hamster jejunum "in vitro". Clin. Sci. 56: 15-23.

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. y PAYNE, J.W. (1980),

Transmembrane transport of small peptides. Current Topics in membranes and transport, 14: 331-408.

MITCHELL, P. (1963),

Molecular, group and electron translocation through natural membranes. Biochem. Soc. Simp. 22: 142-168.

- MONTERO, M.C.; BOLUFER, J. e ILUNDAIN, A. (1988),  
Potassium transport in isolated chicken enterocytes. Plugers Archiv.  
412: 422-426.
- MONTROSE, M.H.; BEBERNITZ, G. Y KIMMICH, G.A. (1985),  
Evaluation of ion gradient-dependent H<sup>+</sup> transport systems in isolated  
enterocytes from the chick. J. Memb. Biol. 88: 55-66.
- MURER, H. y HOPFER, U. (1974),  
Demonstration of electrogenic Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose transport in  
intestinal brush border membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 484-488.
- MURER, H.; HOPFER, U. y KINNE, R. (1976),  
Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from  
rat small intestine and kidney. Biochem. J. 154: 597-604.
- MURER, H.; SIGRIST-NELSON, K. y HOPFER, U. (1975),  
On the mechanism of sugar and amino acid interaction in intestinal  
transport. J. Biol. Chem. 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.

NEAME, K.D. y RICHARDS, T.G. (1972),

In: Elementary Kinetics of membrane carrier transport, pp. 56-79.  
Black-well scientific publications, Oxford.

NIXON, S.E. y MAWER, G.E. (1970a),

The digestion and absorption of protein in man. I. The site of  
absorption. Br. J. Nutr. 24: 227-240.

NIXON, S.E. y MAWER, G.E. (1970b),

The digestion and absorption of protein in man. II. The form in which  
digested protein is absorbed. Br. J. Nutr. 24: 241-258.

NUTRENADEL, W. y SCRIVER, C.R. (1976),

Uptake and metabolism of  $\beta$ -alanine and L-carnosine by rat tissues in  
vitro: role in nutrition. Am. J. Physiol. 230: 643-651.

O'GRADY, S.M.; MUSH, M.W. y FIELD, M. (1986),

Stoichiometry and ion affinities of the Na-K-Cl cotransport system in  
the intestine of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*).  
J. Memb. Biol. 91: 33-41.

O'GRADY, S.M.; PALFREY, H.C. y FIELD, M. (1987),

Characteristics and functions of Na-K-Cl cotransport in epithelial  
tissues. Am. J. Physiol. 22: C177-C192.

OKANO, T.; INUI, K.; MAEGAWA, H.; TAKANO, M. y HORI, R. (1986),  
H<sup>+</sup> coupled uphill transport of aminoccephalosporins via the dipeptide  
transport system in rabbit intestinal brush border membranes. J. Biol.  
Chem. 261: 14130-14134.

PALFREY, H.C.; FEIT, P.W. y GREENGARD, P. (1980),  
cAMP-stimulated cation cotransport in avian erythrocytes: inhibition  
by loop diuretics. Am. J. Physiol. 238: C139-C148.

PALFREY, H.C. y RAO, M. (1983),  
Na/K/Cl cotransport and its regulation. J. Exp. Biol. 106: 43-54.

PERRY, 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 asociated with neurologic  
disease and mental defect. M. Engl. J. Med. 277: 1219-1227.

PLANAS, J.M.; OLIVERAS, M.; FERRER, R. y MORETO, M. (1987),  
Estudio morfológico y del transporte de 3-oxi-metil-D-glucosa en recto  
y coprodeo de pollo. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de  
Ciencias Fisiológicas. Extremadura.

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.

RAGHUNATH, M. y NARASINGA RAO, B.S. (1987),

Absorption by rat jejunum in situ, of the peptides released during sequential enzymatic digestion "in vitro" of dietary proteins. Nutrition Reports International, 35: 939-947.

RAJENDRAN, U.M.; ANSARI, S.A.; HARIG, J.M.; ADAMS, M.B.; KHAN, A.H. y RAMASWAMY, K. (1985a),

Transport of glycyl-L-proline by human intestinal brush border membrane vesicles. Gastroenterology, 89: 1298-1304.

RAJENDRAN, U.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.

RAJENDRAN, U.M.; BERTELOOT, A. y RAMASWAMY, K. (1985b),

Transport of glycyl-L-proline by mouse intestinal brush border membrane vesicles. Am. J. Physiol. 248: G682-G686.

RAJENDRAN, U.M.; HARIG, J.M. y RAMASWAMY, K. (1987),

Characteristics of glycyl-L-proline transport in intestinal brush

border vesicles. Am. J. Physiol. 252: G281-G286.

RANDLES, J. y KIMMICH, G.A. (1978),

Effects of phloretin and teophylline on 3- $\alpha$ -methylglucose transport by intestinal epithelial cells. Am. J. Physiol. 234: C64-C72.

REID, E.W. (1901),

Transport of fluid by certain epithelia. J. Physiol. (London), 26: 436-444.

RESTREPO, D. y KIMMICH, G.A. (1985),

The mechanistic nature of the membrane potential dependence of sodium-sugar cotransport in small intestine. J. Membrane. Biol. 87: 159-172.

REUSS, L. y PETERSEN, K. (1985),

Cyclic AMP inhibits  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchange at the apical membrane of *Necturus* gallbladder epithelium. J. Gen. Physiol. 85: 409-429.

ROOS, A. y BORON, W.F. (1981),

Intracellular pH. Physiol. Rev. 61: 296-434.

RUBINO, A.; FIELD, M. y SHWACHMAN, H. (1971),

Intestinal transport of amino acid residues of dipeptides. 1. Influx of the glycine residue of glycyl-L-proline across mucosal border. J. Biol. Chem. 246: 3542-3548.

RUSSELL, J.M. (1983),

Cation coupled chloride influx in squid axon: role of potassium and stoichiometry of the transport process. J. Gen. Physiol. 81: 909-925.

SAID, H.M.; GHISHAN, F.K. y REDHA, R. (1987),

Folate transport by human intestinal brush border membrane vesicles. Am. J. Physiol. 252: G229-G236.

SCHELD, H.P.; BURSTON, D.; TAYLOR, E. y MATTHEWS, D.M. (1979),

Kinetics of uptake of an amino acid and a dipeptide into hamster jejunum and ileum: the effect of semistarvation and starvation. Cli. Sci. 56: 487-492.

SCHRON, C.M.; WASHINGTON, C. y BLITZER, B. (1985),

The transmembrane pH gradient drives uphill folate transport in rabbit jejunum. J. Clin. Invest. 76: 2030-2033.

SCHULTZ, S.G.; FUISZ, R.E. y CURRAN, P.F. (1966),

Amino acid and sugar transport in rabbit ileum. J. Gen. Physiol. 49: 489-866.

SCHULTZ, S.G. y ZALUSKY, R. (1964),

Ion transport in isolated rabbit ileum. I. Short-circuit current and  $\text{Na}^+$  fluxes. J. Gen. Physiol. 47: 567-584.

SEPULVEDA, F.V. y SMYTH, 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 HOPFER, U. (1975),

Active alanine transport in isolated brush border membranes. J. Biol. Chem. 250: 5674-5680.

SILBERNAGL, S.; GANAPATHY, V. y LEIBACH, F.H. (1987),

H<sup>+</sup> gradient-driven dipeptide reabsorption in proximal tubule of rat kidney. Studies in vivo and in vitro. Am. J. Physiol. 253: F448-F457.

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.

SILK, D.B.A.; PERRETT, D.; WEBB, J.P.W. y CLARK, M.L. (1973),

Tripeptide absorption in man. Gut, 14: 427-428.

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 guinea pig of an amino acid mixture simulating casein and a partial enzymic hydrolysate of casein. Clin.

Sci. Mol. Med. 52, 259-267.

TAKUWA, N.; SHIMADA, T.; MATSUMOTO, H.; HIMUKAI, M. y HOSHI, T.  
(1985),

Effect of hydrogen ion-gradient on carrier-mediated transport of  
glycylglycine across brush border membrane vesicles from rabbit small  
intestine. Jpn. J. Physiol. 35: 629-642.

TARLOW, M.J.; SEAKINS, J.W.T.; LLOYD, J.K.; MATTHEWS, D.M.; CHENG, B. y  
THOMAS, A.J. (1972),

Absorption of amino acids and dipeptides 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. Clin. Sci. 53: 221-225.

WEBB, K.E., Jr. (1986),

Amino acid and peptide absorption from gastrointestinal tract.  
Federation Proc. 45: 2268-2271.

WIGGANS, D.S. y JOHNSTON, J.M. (1959),

The absorption of peptides. Biochim. Biophys. Acta, 32: 69-73.

WILSON, T.H. y LANDAU, B.R. (1960),

Specificity of sugar transport by hamster intestine. Am. J. Physiol.  
198: 99-106.

WISEMAN, G. (1974),

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

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. M<sup>te</sup> LUISA CALONGE CASTRILLO titulada "Transporte de Glicil-Sacarosina por células aisladas del epitelio Intestinal de pollo"

acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Sevilla, 16 de Diciembre

19 88

El Vocál,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario,

Manuela Pallas

El Doctorado,

M<sup>te</sup> Luisi Celayo

