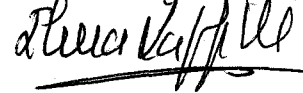


R.14087 T.1053

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio.....90..... número.....32..... del libro
correspondiente.
Sevilla,.....11 SET. 2000.....

El Jefe del Negociado.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y BIOLOGÍA ANIMAL



**TRANSPORTE INTESTINAL DE AZÚCARES EN
RATAS HIPERTENSAS**

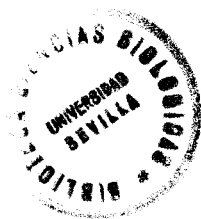
TESIS DOCTORAL

M^a ÁNGELES DE LA HERMOSA CABALLERO

Sevilla, 2000

BS 1346038

R.19.187



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y BIOLOGÍA ANIMAL



**TRANSPORTE INTESTINAL DE AZÚCARES EN
RATAS HIPERTENSAS**


Memoria que presenta

M^a ÁNGELES DE LA HERMOSA CABALLERO

para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla

Directores

**CARMEN MARÍA VÁZQUEZ CUETO
JOSÉ BOLUFER GONZÁLEZ
INMACULADA SÁNCHEZ AGUAYO**

Sevilla, 2000



Departamento de Fisiología y Biología Animal
Facultad de Farmacia
✉ C/Tramontana s/n. 41012 Sevilla
☎ 95 435 67 76
FAX: 95 423 37 65
✉ hermosa@fafar.us.es

CARMEN MARÍA VÁZQUEZ CUETO, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Biología Animal de la Universidad de Sevilla, JOSÉ BOLUFER GONZALEZ, Catedrático del Departamento Fisiología y Biología Animal de la Universidad de Sevilla e INMACULADA CONCEPCIÓN SÁNCHEZ AGUAYO, Profesora Titular del Departamento de Biología celular de la Universidad de Sevilla

INFORMAN

Que la Tesis titulada *Transporte Intestinal de azúcares en ratas hipertensas*, presentada por la Lda. M^a ÁNGELES DE LA HERMOSA CABALLERO para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología y Biología Animal de la Universidad de Sevilla y, considerándola concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Sevilla, a 24 de Julio de 2000.

Fdo.: Dra. Carmen María Vázquez Cueto

Fdo.: Dr. José Bolufer Gonzalez

Fdo: Inmaculada C. Sánchez Aguayo.

Este trabajo ha sido subvencionado mediante las ayudas FIS 97/1143 y FIS 99/1142 del *Fondo de Investigación Sanitaria*, Ministerio de Sanidad y Consumo. Durante su realización, el autor ha disfrutado de una ayuda de la Junta de Andalucía, Plan Andaluz de Investigación, (CTS-257).

Parte de los resultados obtenidos en esta Memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

- Mate A., Vial M., Vázquez C. M., **De la Hermosa M. A.**, Ruiz-Gutiérrez V. y Planas J. M. (1997). Lipid composition and membrane fluidity of guinea pig small intestinal brush-border membrane: regional differences. *XXXIII International Congress of Physiological Sciences*. St. Petersburg (Rusia).
- **De la Hermosa M. A.**, Rovira N., Vázquez C. M., Garriga C., Mate A., Ruiz-Gutiérrez V. y Planas J. M. (1997). Developmental changes in intestinal glucose transport, lipid composition and fluidity. *XXXIII International Congress of Physiological Sciences*. St. Petersburg (Rusia).
- Vázquez C. M., **De la Hermosa M. A.**, Mate A., Sánchez-Aguayo I. y Planas J. M. (1998). Monosaccharide transport in ileal brush-border membrane vesicles of hypertensive rats. *J. Physiol.* 509.P: 25P-26P.
- Sánchez-Aguayo I., Vázquez C. M., **De la Hermosa M. A.**, Mate A. y Planas J. M. (1998). Structural, ultrastructural and functional abnormalities in the ileal epithelium of hypertensive rats. *Z. Gastroenterol.* 36: 341.
- Barfull A., Mate A., **De la Hermosa M. A.**, Vázquez C. M. y Planas J. M. (1999). Decreased brush border sugar transport in the jejunum of Spontaneously Hypertensive Rats. *16th Meeting of the European Intestinal Transport Group (EIGT)*. Bad Herrenalb (Alemania).
- Mate A., **De la Hermosa M. A.**, Sánchez-Aguayo I., Planas J. M. y Vázquez C. M. (2000). Modificaciones en el transporte intestinal de azúcares en ratas hipertensas. *Hipertensión* 17: 134.
- Sánchez-Aguayo I., Torreblanca J., **De la Hermosa M. A.**, Mate A., Planas J. M. y Vázquez C. M. Ultrastructural and functional changes in the jejunal epithelium of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* (en prensa).
- Sánchez-Aguayo I., Torreblanca J., **De la Hermosa M. A.**, Mate A., Planas J. M. y Vázquez C. M. Morphological and functional abnormalities in the ileum of rats with spontaneous hypertension: studies on SGLT1 protein. *Scand. J. Gastroenterol.* (en prensa).

A mis padres y hermanos

A Ángel

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de alguna forma han contribuido a la elaboración de esta Tesis:

A la Dra. Carmen Vázquez, porque gracias a ella he logrado realizar esta Tesis. Por su cariño, paciencia y apoyo en todo momento. También le agradezco su gran interés y esfuerzo en la elaboración y culminación de esta memoria y la confianza depositada siempre en mi persona.

Al Dr. José Bolufer, codirector y tutor de este trabajo, por su gran ayuda y asesoramiento, y por transmitirme parte de su gran experiencia en el transporte de sustratos.

A la Dra. Inmaculada Sánchez, codirectora de este trabajo, por su gran disposición y ayuda en el aprendizaje y realización de las técnicas histológicas que han enriquecido mi formación investigadora.

A la Dra. Joana M^a Planas, por su ayuda y amistad demostrada durante la realización de este trabajo.

A Alfonso, (ya Dr. Mate), compañero excepcional, por su gran ayuda, apoyo y amistad en todos estos años de trabajo, a quien transmito millones de gracias.

A mis compañeras de tesis, M^a José Cano, M^a Luisa Murillo Jr. (ya Dras. Cano y Murillo), Reyes Artillo, Repo (Dra. Ramírez) y, Carmen de la Horra (Dra. de la Horra) con cuya compañía he disfrutado dentro y fuera del laboratorio.

A mis nuevos compañeros Lucía, Ruth, Chus, Olga, Inma, Juan Manuel y Marta por compartir y soportar conmigo los malos y buenos momentos de la culminación de esta memoria.

Al Dr. Pedro Núñez, por sus buenos consejos y asesoramiento informático. Al resto del profesorado del Departamento, mi más sincero reconocimiento por el buen trato recibido por todos y cada uno de ellos.

A la Dra. Ana Cameán e Isabel, por su gran amistad, paciencia, voluntad, buen humor y disposición en todo momento

A Paco, nuestro Técnico de Laboratorio, por su constante amabilidad y ayuda. A Reme, por su excelente asistencia técnica en los estudios de microscopía, y al personal de secretaría, por su colaboración en los trámites burocráticos.

A mi familia, a Ángel y Penélope por su amor, amistad y comprensión. A todos ellos, y a las personas que me han apoyado y ayudado y que es posible que mi memoria no recuerde. Gracias.

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ASBT	<i>Apical sodium-dependent bile acid transporter</i> (transportador de sales biliares dependiente de sodio).
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albúmina de suero bovino)
Ca ⁺⁺ ATPasa	ATPasa de calcio (bomba de calcio)
CBB	<i>Coomassie brilliant blue</i>
CHO	Chinese hamster ovary (línea celular de ovario de hamster chino)
c.p.m.	Cuentas por minuto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPH	1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno
DPX	Solución montante para histología
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GALT	Tejido linfoide asociado al tracto digestivo
GLUT	<i>Glucose transporter</i> (transportador de glucosa)
H	Homogeneizado
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfónico
INT	Violeta de p-yodonitroterazolio
K _i	Constante de inhibición
K _d	Constante de difusión
K _m	Constante de Michaelis (constante de afinidad)
Na ⁺ -K ⁺ ATPasa	ATPasa de sodio y potasio (bomba de sodio)
NHE	Na ⁺ /H ⁺ <i>exchanger</i> (intercambiador Na ⁺ /H ⁺)
P	Precipitado
P _{DPH}	Polarización de fluorescencia en el estado estacionario
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampón fosfato salino)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pNPP	para-nitrofenilfosfato disódico

Abreviaturas

pNP	para-nitrofenol
r_s	Anisotropía de fluorescencia en el estado estacionario
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SAAT	<i>Sodium amino acid cotransporter</i> (cotransportador de sodio y aminoácidos)
SDS	Dodecil sulfato sódico
SGLT	<i>Sodium glucose cotransporters</i> (cotransportadores de sodio y D-glucosa)
SGLT1	<i>Sodium glucose cotransporter</i> (cotransportador de sodio y D-glucosa)
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rats</i> (ratas espontáneamente hipertensas)
t	Tiempo
TCA	Ácido tricloroacético
THF	Ácido tetrahidrofurano
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
VMA	Vesículas de membranas apicales
Vmax	Velocidad máxima
WKY	Wistar-Kyoto (ratas normotensas)

ÍNDICE DE FIGURAS**ÍNDICE DE TABLAS**

<u>1. OBJETIVOS</u>	1
<u>2. INTRODUCCIÓN</u>	5
2.1. MORFOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO	7
2.2. MEMBRANA APICAL: ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS	
GENERALES	14
2.3. TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS A TRAVÉS DEL EPITELIO	
INTESTINAL	19
2.3.1. Transporte mediado concentrativo de monosacáridos a través de la	
membrana apical del enterocito	20
2.3.1.1. Estructura, función y características del cotransportador Na ⁺ -glucosa	
(SGLT1).....	20
2.3.2. Transporte mediado equilibrativo a través de la membrana apical del	
enterocito	29
2.3.2.1. Propiedades del transportador GLUT5.....	32
2.4. REGULACIÓN INTESTINAL DEL TRANSPORTE DE AZÚCARES	33
2.5. HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS	
MEMBRANAS CELULARES	34
2.5.1. Concepto de hipertensión arterial	34
2.5.2. Alteraciones en el transporte de iones	36
2.5.3. Fluidez y composición lipídica	38
<u>3. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	41
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	43
3.2. PRODUCTOS QUÍMICOS	43
3.2.1. Productos no radiactivos	43
3.2.2. Productos radiactivos	46

3.3. CONTROL DE PESO Y DE LA PRESIÓN ARTERIAL	46
3.4. MATANZA DE ANIMALES	48
3.5. AISLAMIENTO DE VESÍCULAS DE LA MEMBRANA APICAL (VMA) DEL ENTEROCITO DE YEYUNO E ÍLEON DE RATA.....	48
3.5.1. Composición de los medios	49
3.5.2. Procedimiento	49
3.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	51
3.6.1. Fundamento.....	51
3.6.2. Protocolo experimental	53
3.6.2.1. Preparación de las soluciones.....	51
3.6.2.2. Preparación de la curva patrón.....	53
3.6.2.3. Preparación de las muestras	53
3.6.3. Realización del ensayo.....	53
3.7. VALORACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	54
3.7.1. Valoración de la actividad sacarasa.....	54
3.7.1.1. Fundamento.....	54
3.7.1.2. Protocolo experimental	54
3.7.1.2.1. Preparación de la solución substrato	54
3.7.1.2.2. Preparación del reactivo para determinar glucosa.....	54
3.7.1.2.3. Preparación de las muestras	55
3.7.1.3. Realización del ensayo	55
3.7.2. Valoración de la actividad fosfatasa alcalina	56
3.7.2.1. Fundamento.....	56
3.7.2.2. Protocolo experimental	56
3.7.2.2.1. Preparación del tampón substrato.....	56
3.7.2.2.2. Preparación de la curva estándar	56
3.7.2.2.3. Preparación de las muestras	57
3.7.2.3. Realización del ensayo	57
3.7.3. Valoración de la actividad fosfatasa ácida	58
3.7.3.1. Fundamento.....	58
3.7.3.2. Protocolo experimental	58

3.7.3.2.1. Preparación de la solución tampón substrato.....	58
3.7.3.2.2. Preparación de las muestras.....	58
3.7.3.3. Realización del ensayo	59
3.7.4. Valoración de la actividad Na⁺-K⁺ ATPasa.....	59
3.7.4.1. Fundamento	59
3.7.4.2. Protocolo experimental.....	60
3.7.4.2.1. Preparación de los medios	60
3.7.4.2.2. Realización de la curva estándar.....	61
3.7.4.2.3. Preparación de las muestras.....	61
3.7.4.3. Realización del ensayo	61
3.7.5. Valoración de la actividad succinato deshidrogenasa	62
3.7.5.1. Fundamento	62
3.7.5.2. Protocolo experimental.....	62
3.7.5.2.1. Solución mezcla del ensayo.....	62
3.7.5.2.2. Preparación de las muestras.....	63
3.7.5.3. Realización del ensayo	63
3.8. TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS EN VMA DE YEYUNO E ÍLEON	
DE RATA.....	64
3.8.1. Transporte de D-glucosa y D-galactosa a diferentes tiempos de incubación	66
3.8.1.1. Composición de los medios.....	66
3.8.1.2. Realización del ensayo	68
3.8.1.3. <i>Cis</i> - Inhibición del transporte de D-glucosa por florricina.....	68
3.8.1.3.1. Composición de los medios	68
3.8.1.3.2. Realización del ensayo	69
3.8.1.4. <i>Cis</i> -Inhibición del transporte de D-glucosa por otros monosacáridos.....	69
3.8.1.4.1. Composición de los medios	69
3.8.1.4.2. Realización del ensayo	70
3.8.2. Transporte de D-fructosa a diferentes tiempos de incubación	70
3.8.2.1. Composición de los medios.....	70
3.8.2.2. Realización del ensayo	71
3.8.2.3. <i>Cis</i> -Inhibición del transporte de D-fructosa	71

3.8.2.3.1. Composición de los medios.....	71
3.8.2.3.2. Realización del ensayo	72
3.8.3. Efecto de la osmolaridad extravascular sobre el transporte de D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa.....	72
3.8.3.1. Fundamento.....	72
3.8.3.2. Composición de los medios	73
3.8.3.3. Realización del ensayo	74
3.9. CINÉTICA DEL TRANSPORTE DE D-GLUCOSA, D-GALACTOSA Y D-FRUCTOSA.	75
3.9.1. Fundamento	75
3.9.2. Cálculo de las constantes cinéticas.....	75
3.9.3. Cinética de D-glucosa y D-galactosa.....	76
3.9.3.1. Composición de los medios.....	76
3.9.3.2. Realización del ensayo	77
3.9.4. Cinética de D-fructosa	77
3.9.4.1. Composición de los medios.....	77
3.9.4.2. Realización del ensayo	78
3.10. ESTUDIOS DE LA POLARIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS APICALES DE INTESTINO DE RATA (YEYUNO E ÍLEON).....	78
3.10.1. Fundamento	78
3.10.2. Composición de los medios	78
3.10.3. Realización del ensayo	79
3.10.4. Interpretación de los resultados.....	80
3.11. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS PARA EL ESTUDIO MICROSCÓPICO	80
3.11.1. Estudios de microscopía óptica.....	81
3.11.1.1. Composición de los medios	81
3.11.1.2. Procedimiento.....	81
3.11.2. Estudios de microscopía electrónica	82
3.11.2.1. Composición de los medios	82
3.11.2.2. Procedimiento.....	83

3.11.3. Inmunolocalización del SGLT1 al microscopio óptico	84
3.11.3.1. Composición de los medios.....	84
3.11.3.2. Procedimiento.....	86
3.11.4. Inmunolocalización del SGLT1 al microscopio electrónico	88
3.11.4.1. Composición de los medios.....	88
3.11.4.2. Procedimiento.....	88
3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	90
<u>4. RESULTADOS</u>	91
4.1. PESO Y PRESIÓN ARTERIAL DE LOS ANIMALES	93
4.2. PUREZA DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANAS APICALES DE YEYUNO E ÍLEON	93
4.2.1. Concentración de proteínas	93
4.2.2. Marcadores enzimáticos	98
4.3. TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS EN VESÍCULAS DE LA MEMBRANA APICAL (VMA) DE YEYUNO E ÍLEON	110
4.3.1. Caracterización del transporte de D-glucosa	110
4.3.1.1. Transportes a diferentes tiempos de incubación.....	110
4.3.1.2. Especificidad de los transportadores frente a distintos substratos.....	114
4.3.1.3. Constantes cinéticas del transporte de D-glucosa en yeyuno e íleon.....	119
4.3.2. Caracterización del transporte de D-galactosa en yeyuno e íleon	119
4.3.2.1. Transporte en función del tiempo.....	119
4.3.2.2. Constantes cinéticas del transporte de D-galactosa.....	127
4.3.3. Caracterización del transporte de D-fructosa	134
4.3.3.1. Transporte a diferentes tiempos de incubación	134
4.3.3.2. Especificidad de sustrato para el transportador de la D-fructosa	137
4.3.3.3. Constantes cinéticas del transporte de D-fructosa.....	137
4.4. EFECTO DE LA OSMOLARIDAD EXTRAVESICULAR SOBRE EL TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS	145
4.5. ESTUDIOS DE FLUIDEZ DE MEMBRANA	145
4.6. ESTUDIO MICROSCÓPICO	153

4.6.1. Análisis estructural.....	153
4.6.2. Análisis ultraestructural	153
4.6.3. Estudio inmunohistoquímico	153
4.6.4. Estudio de inmunocitoquímica	154
<u>5. DISCUSIÓN.....</u>	171
5.1. AISLAMIENTO DE VESÍCULAS DE MEMBRANAS APICALES: PUREZA Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	173
5.2. TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS EN LA MEMBRANA APICAL DEL YEYUNO E ÍLEON DE RATAS SHR.....	175
5.2.1. Transporte acoplado al sodio: sistema SGLT1.....	175
5.2.2. Transporte independiente de sodio: sistema GLUT5.....	180
5.2.3. Transporte por difusión simple	182
5.3. ESTUDIOS ESTRUCTURALES.....	183
5.4. ESTUDIOS DE POLARIZACIÓN DE MEMBRANA: FLUIDEZ DE MEMBRANA.....	186
<u>6. CONCLUSIONES.....</u>	189
<u>7. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	195

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura del intestino delgado humano, sección transversal.

Figura 2.2. Estructura de la mucosa, vellosidades, criptas de Lieberkühn y de las células componentes del epitelio intestinal.

Figura 2.3 Esquema del citoesqueleto de una microvellosidad.

Figura 2.4. Mecanismo de absorción de azúcares en enterocitos de yeyuno e íleon. Sistemas de transporte implicados en la absorción intestinal de D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa.

Figura 2.5. Representación esquemática del modelo propuesto para el cotransportador Na^+ y D-glucosa presente en humanos (hSGLT1).

Figura 2.6. Esquema de las distintas conformaciones que toma el cotransportador de Na^+ y D-glucosa.

Figura 3.1. Esquema del método utilizado para medir la presión sanguínea en ratas WKY y SHR.

Figura 3.2. Esquema de la técnica de aislamiento de vesículas de membrana apical (VMA) de yeyuno e íleon de rata.

Figura 3.3. Representación esquemática del procedimiento de filtración.

Figura 4.1. Peso corporal de las ratas WKY y SHR entre las 8 y 14 semanas de edad.

Figura 4.2. Presión arterial de ratas WKY SHR entre las 8 y 14 semanas de edad.

Figura 4.3. Transporte de D-glucosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Figura 4.4. Transporte de D-glucosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Figura 4.5. *Cis*-Inhibición del transporte de D-glucosa dependiente de sodio a diferentes concentraciones de florricina, en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Figura 4.6. *Cis*-Inhibición del transporte de D-glucosa dependiente de sodio a diferentes concentraciones de florricina, en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Figura 4.7. *Cis*-Inhibición del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Figura 4.8. *Cis*-Inhibición del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Figura 4.9. Curvas de cinética del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY.

Figura 4.10. Curvas de cinética del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas SHR.

Figura 4.11. Curvas de cinética del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY.

Figura 4.12. Curvas de cinética del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas SHR.

Figura 4.13. Transporte de D-galactosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Figura 4.14. Transporte de D-galactosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Figura 4.15. Curvas de cinética del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY.

Figura 4.16. Curvas de cinética del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas SHR.

Figura 4.17. Curvas de cinética del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY.

Figura 4.18. Curvas de cinética del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas SHR.

Figura 4.19. Transporte de D-fructosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Figura 4.20. Transporte de D-fructosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Figura 4.21. *Cis*-Inhibición del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Figura 4.22. *Cis*-Inhibición del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Figura 4.23. Curvas de cinética del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY.

Figura 4.24. Curvas de cinética del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas SHR.

Figura 4.25. Curvas de cinética del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY.

Figura 4.26. Curvas de cinética del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas SHR.

Figura 4.27. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY.

Figura 4.28. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY.

Figura 4.29. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY.

Figura 4.30. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY.

Figura 4.31. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY.

Figura 4.32. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY.

Figura 4.33. Estructura e inmunolocalización de la proteína SGLT1 al microscopio óptico del epitelio de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Figura 4.34. Estructura e inmunolocalización de la proteína SGLT1 a microscopía óptica del epitelio de íleon de ratas WKY y SHR.

Figura 4.35. Ultraestructura y localización inmunocitoquímica de la proteína SGLT1 en enterocitos de yeyuno procedentes de ratas WKY y SHR.

Figura 4.36. Ultraestructura y localización inmunocitoquímica de la proteína SGLT1 en enterocitos de íleon procedentes de ratas WKY y SHR.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Niveles de proteína en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.2. Niveles de proteína en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.3. Actividad específica de la enzima sacarasa en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.4. Actividad específica de la enzima sacarasa en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.5. Actividad específica de la enzima fosfatasa alcalina en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.6. Actividad específica de la enzima fosfatasa alcalina en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.7. Actividad específica de la enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.8. Actividad específica de la enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.9. Actividad específica de la enzima fosfatasa ácida en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.10. Actividad específica de la enzima fosfatasa ácida en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.11. Actividad específica de la enzima succinato deshidrogenasa en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.12. Actividad específica de la enzima succinato deshidrogenasa en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.13. Velocidades iniciales y acumulación intravesicular de D-glucosa en vesículas de membranas apicales de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.14. Constantes cinéticas del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales aisladas de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR.

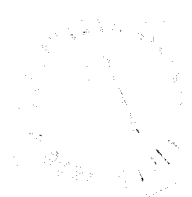
Tabla 4.15. Velocidades iniciales y acumulación intravesicular de D-galactosa en vesículas de membranas apicales de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.16. Constantes cinéticas del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales aisladas de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.17. Constantes cinéticas del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales aisladas de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR.

Tabla 4.18. Polarización de fluorescencia (P_{DPH}) y anisotropía de fluorescencia (r_s) en el estado estacionario, en membranas apicales procedentes de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR.

1. OBJETIVOS



Los mecanismos fisiológicos, patológicos y moleculares implicados en el desarrollo de la hipertensión arterial son numerosos, y parte de ellos aún desconocidos. La hipótesis más barajada y aceptada hoy en día apunta a la existencia de modificaciones en el transporte celular de iones, que a su vez alterarían la composición iónica celular. En este sentido el ión más afectado es el sodio.

Los estudios para profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de la hipertensión arterial, normalmente se han realizado en aquellos tejidos más directamente implicados en la hipertensión arterial, como son la musculatura lisa de los vasos (arterias), eritrocitos, linfocitos, plaquetas y riñón. En estos estudios se utiliza tradicionalmente un modelo de rata consanguínea hipertensa denominada "Spontaneously Hypertensive Rat" (SHR) y como controles ratas consanguíneas normotensas de la raza "Wistar-Kyoto" (WKY). Sin embargo, cada vez más, se discute el papel del intestino delgado en la fisiopatología de la hipertensión arterial. Se han realizado algunos estudios sobre el transporte intestinal de iones en la hipertensión arterial, pero existen pocos datos sobre el transporte intestinal de substratos orgánicos en esta patología.

Los principales monosacáridos de nuestra dieta son la glucosa, galactosa y fructosa. Estos monosacáridos se absorben en el intestino delgado mediante mecanismos mediados y de difusión simple. Concretamente, en la membrana apical del enterocito, la glucosa y la galactosa se transportan acopladas al ión sodio mediante una proteína de membrana que recibe el nombre de SGLT1 (*Sodium glucose cotransporter*). Nuestro primer objetivo fue el estudio del transporte intestinal de glucosa y galactosa en el intestino delgado de ratas WKY y SHR, ya que podrían modificarse algunos mecanismos de transporte de substratos dependientes del ión sodio en la hipertensión arterial. Este estudio se realizará en yeyuno e íleon. Analizaremos las constantes cinéticas del transportador implicado en la captación intestinal de los citados substratos y realizaremos la inmunolocalización de dicha proteína a nivel histológico y celular en yeyuno e íleon de ambos grupos experimentales.

Nuestro segundo objetivo fue el estudio del transporte de la D-fructosa. La D-fructosa se transporta, en la membrana apical del enterocito, mediante un sistema de transporte independiente del ión sodio, del que es responsable la proteína denominada GLUT5 (*Glucose transporter*). Al estudiar el transporte intestinal de la D-fructosa, en animales hipertensos, podremos comparar los resultados con los obtenidos al analizar el sistema de transporte dependiente del ión sodio.

Por último, en los estudios de la patogénesis de la hipertensión arterial, muchos autores apuntan al papel que juega la microviscosidad de la membrana plasmática. Por ello otro objetivo de esta memoria fue el análisis de la microviscosidad de la membrana apical de los enterocitos del yeyuno e íleon provenientes de ratas WKY y SHR.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. MORFOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO

La digestión de los alimentos comienza en la cavidad oral y prosigue en el estómago y en el intestino delgado. En éste último además del proceso de digestión, se produce la absorción de aquellos productos resultantes de la misma. El intestino delgado es la porción más larga del tubo digestivo, y se divide en tres partes o segmentos, que son duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno conecta con el yeyuno a través del llamado ángulo de Treitz y el íleon con el intestino grueso por la válvula íleocecal. Aunque estos segmentos son similares desde el punto de vista histológico, hay diferencias menores que permiten su identificación.

Realizando un corte transversal al intestino delgado se distinguen histológicamente cuatro capas de fuera hacia dentro: serosa, muscular, submucosa y mucosa (figura 2.1.).

La serosa está formada por tejido conectivo, recubierta externamente por un epitelio simple plano. De la serosa se origina el mesenterio que actúa como soporte de vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas. Con excepción de la segunda y la tercera porción del duodeno, todo el intestino delgado está revestido por una serosa.

La capa muscular del intestino delgado está compuesta a su vez por una capa circular interna y una longitudinal externa de músculo liso. Localizado entre estas dos capas se encuentra el **plexo mientérico** de Auerbach, que junto con el plexo submucoso de Meissner localizado en la submucosa, se encarga de la inervación intrínseca de la pared intestinal. Esta capa muscular es la encargada de la actividad peristáltica del intestino delgado.

La submucosa del intestino delgado está compuesta por tejido conectivo fibroelástico denso, de distribución irregular, en el que son muy abundantes los vasos linfáticos y los vasos sanguíneos. En ella, se sitúa el plexo submucoso de Meissner

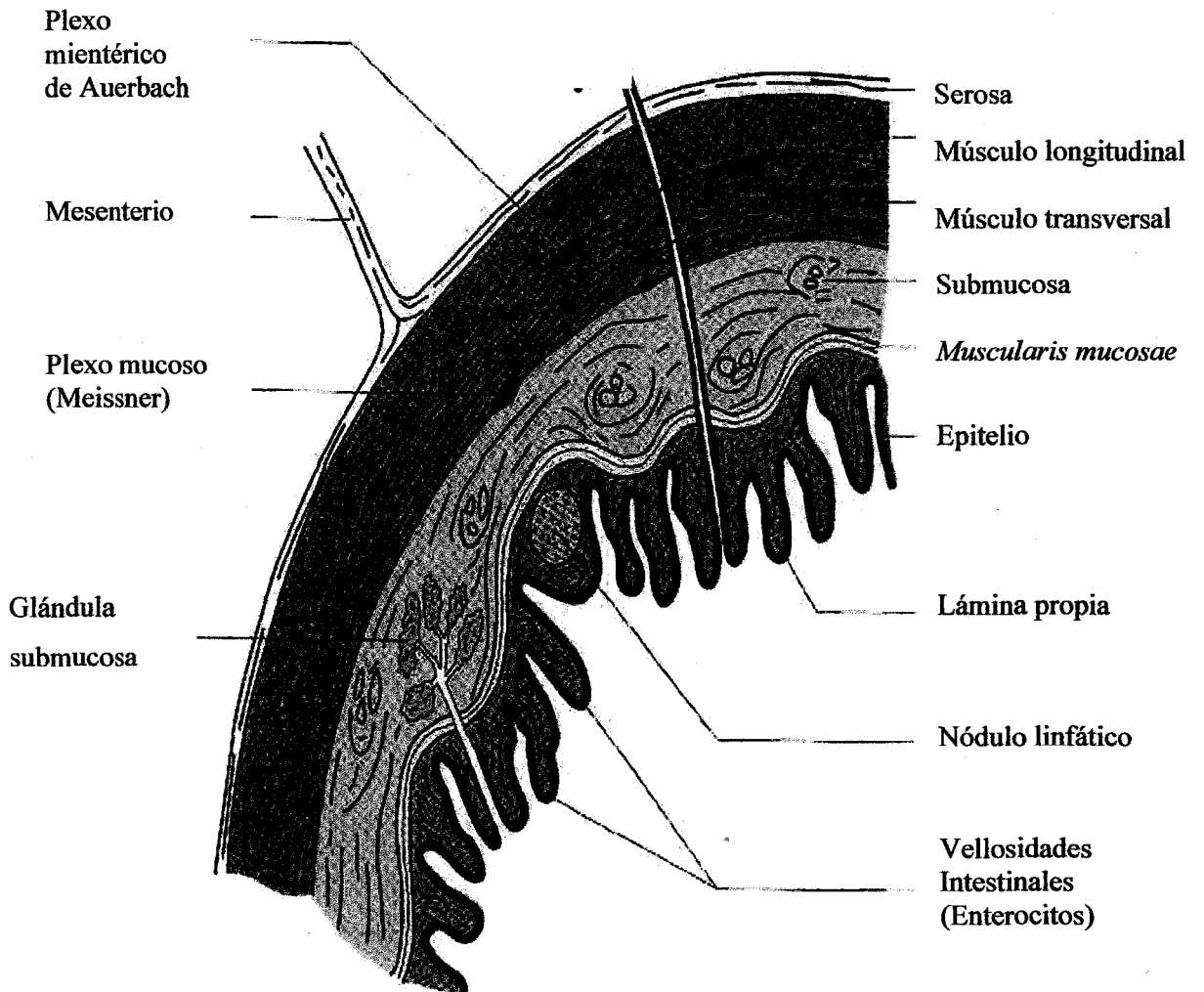


Figura 2.1. Estructura del intestino delgado humano, sección transversal.
Tomado de Escuredo, B. y col.: Estructura y función del cuerpo humano. Ed. Interamericana, Madrid, 1995.

previamente citado. En la primera mitad del duodeno, la submucosa contiene glándulas de Brunner secretoras de moco. Además, la submucosa contiene parte del tejido linfoide asociado al tracto digestivo (GALT), que aunque en su mayor parte aparece en la mucosa intestinal, parte de ella atraviesa la muscular de la mucosa y se asienta en la submucosa.

La mucosa intestinal se encuentra en la superficie luminal del intestino delgado. Se divide en 3 capas distintas: la capa muscular de la mucosa o *muscularis mucosae*, la lámina propia y el epitelio intestinal. La mucosa contiene numerosos pliegues transversos formando elevaciones semicirculares que reciben el nombre de válvulas conniventes o pliegues de Kerkring. Son muy numerosos en el duodeno distal y en el yeyuno proximal, y menos en la mitad proximal del íleon. La superficie de estos pliegues, a su vez, está cubierta de vellosidades que protruyen hacia la luz intestinal. Las vellosidades son estructuras permanentes, y tienen una forma y una magnitud que depende de la especie animal y de la zona del intestino que se considere, así como del estado fisiológico del individuo. Por ejemplo, el íleon contiene las vellosidades más estrechas, cortas y escasas de los tres segmentos que componen el intestino delgado. Las vellosidades junto con las válvulas conniventes incrementan la superficie de absorción de la mucosa en aproximadamente 30 veces.

La *muscularis mucosae* o capa muscular de la mucosa del intestino delgado, es la capa más delgada y está compuesta a su vez por una capa circular interna y otra longitudinal externa de células de músculo liso. Las fibras musculares de la capa circular interna entran en la vellosidad y se extienden a todo lo largo de su centro hasta alcanzar la membrana basal. Durante la digestión estas fibras musculares se contraen de manera rítmica, contribuyendo al movimiento de las vellosidades y facilitando el paso de nutrientes hacia la lámina propia.

La lámina propia es una capa de tejido conectivo que rellena el centro de la vellosidad. En ella se encuentra un conducto linfático de terminación ciega (vaso quilífero), vasos sanguíneos y células musculares lisas, éstas últimas orientadas en toda

la longitud de la vellosidad. También están presentes elementos extracelulares como colágeno y fibras elásticas. Además, en la lámina propia existen multitud de células del sistema inmunitario, entre ellas células plasmáticas, linfocitos, eosinófilos, mastocitos y macrófagos, que forman parte del llamado GALT y que nos proporciona defensa inmunológica contra los antígenos ingeridos. El íleon se caracteriza por un gran desarrollo del GALT, donde las células linfoides se agrupan formando las placas de Peyer, que ensanchan la lámina propia de la mucosa, interrumpen la muscular de la mucosa y se extienden hacia la submucosa.

La función más importante de la lámina propia es su función inmunológica. Además tiene otras funciones, entre ellas: ser una importante estructura de soporte para las células epiteliales intestinales, proporcionando el medio para el transporte del material absorbido por el epitelio hacia los lugares más distantes; y contribuir al movimiento de las vellosidades (Allan y Trier, 1991).

El resto de la lámina propia, que se extiende hasta la capa muscular de la mucosa, se encuentra comprimida en láminas delgadas de tejido conectivo muy vascularizadas, y presenta numerosas glándulas intestinales tubulares llamadas criptas de Lieberkühn, localizadas en la base de las vellosidades. La base de cada vellosidad está rodeada por las aberturas de numerosas criptas, que se abren hacia los espacios intervallosos como perforaciones de la túnica epitelial.

El epitelio intestinal presenta dos funciones principales que son las del transporte vectorial de sustancias y la de barrera defensiva. Es una estructura sometida a una agresión continua, lo cual hace que sea necesario un proceso de renovación constante. En el epitelio coinciden distintos tipos de células, que además están distribuidas de forma diferente según sea considerada la vellosidad o la cripta. Los distintos tipos de células son las siguientes (figura 2.2.):

Enterocitos o Células absorptivas. Son las más importantes en el epitelio de la vellosidad. Son células columnares muy polarizadas tanto morfológicamente como

funcionalmente, y son parecidas a un gran número de otras células epiteliales absortivas como las del túbulo contorneado proximal renal. Existe una notable diferencia en la composición y estructura de la membrana que está en contacto con el contenido luminal del intestino, membrana apical, frente a la membrana que rodea a la superficie basolateral del enterocito, membrana basolateral. El borde apical será objeto de estudio en el apartado 2.2. de esta Memoria. Las paredes basolaterales de los enterocitos presentan actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa y están separadas de la superficie apical por uniones estrechas y el complejo de unión.

El núcleo de los enterocitos es oval y está localizado en la zona basal de los mismos. En preparaciones debidamente teñidas, observadas al microscopio electrónico, aparece una zona clara correspondiente al complejo de Golgi, localizado en el citoplasma en la parte superior del núcleo. En la zona restante del citoplasma se encuentran mitocondrias, elementos del retículo endoplásmico liso y rugoso, ribosomas libres, polisomas, microtúbulos, lisosomas dispersos, y otras estructuras relacionadas tales como cuerpos multivesiculares y peroxisomas (Madara y Trier, 1994).

Células caliciformes o mucosas. Diseminadas entre los enterocitos de las vellosidades se observan las células mucosas, abundando principalmente en los dos tercios superiores de la vellosidad. Son células polarizadas que secretan moco siendo uno de los componentes principales la mucina, conjunto de glicoproteínas de elevado peso molecular. El moco tiene funciones fundamentales en la lubricación de la superficie epitelial; actúa como barrera para la difusión; interviene en procesos de desintoxicación; protege a la mucosa frente a proteasas; y facilita la eliminación de bacterias, virus y parásitos (Perdue y col., 1984). Estas células caliciformes tienen una vida breve, y después de descargar su mucígeno mueren y se descaman.

Las células mucosas son menos abundantes en el duodeno, y van aumentando en yeyuno e íleon, siendo más numerosas en el íleon terminal cercano al ciego.

Células endocrinas. Cerca del 1% de las células que cubren las vellosidades son células endocrinas. Se localizan principalmente en el tercio inferior de las criptas, aunque pueden también observarse más arriba de la vellosidad.

Son células columnares con microvellosidades irregulares y poco abundantes. Su núcleo es esférico y el citoplasma claro. Entre la hormonas que secretan tenemos la serotonina, colecistocinina, polipéptido gástrico inhibidor, motilina, somatostatina, peptidos similares al glucagón, neurotensina, sustancia P, secretina y gastrina.

Células indiferenciadas o regenerativas. Se encuentran en el fondo de las criptas en un número que va de 4 a 16 capas (Potten y Loeffler, 1990). Son células pluripotentes de las cuales derivan todas las demás a partir de sus multiplicaciones y posterior diferenciación. Son células madres que proliferan para repoblar el epitelio de las criptas y de las vellosidades. Su tasa de división es elevada, con un ciclo celular relativamente breve de 24 horas. Se piensa que de cinco a siete días después de la aparición de la nueva célula, ésta habrá progresado hasta la punta de la vellosidad y se habrá exfoliado.

Células de Paneth. Son células en forma de pirámide troncada, presentes fundamentalmente en el tercio más profundo de las criptas de Lieberkühn. Se distinguen con claridad por la presencia de gránulos eosinófilos grandes en su citoplasma luminal. Estas células participan en la barrera defensiva funcional, debido a que producen secreciones denominadas “defensinas” que protegen frente a la infección (Sato, 1988). A diferencia de las demás células del epitelio intestinal las células de Paneth tienen una vida prolongada.

Células M. Son células epiteliales mucosas que difieren de las anteriores tanto en estructura como en función. Se sitúan sobre los folículos linfoides y las placas de Peyer. Son cúbicas o planas en lugar de cilíndricas y altas y poseen micropliegues luminales en vez de microvellosidades. Las células M tienen capacidad para transportar

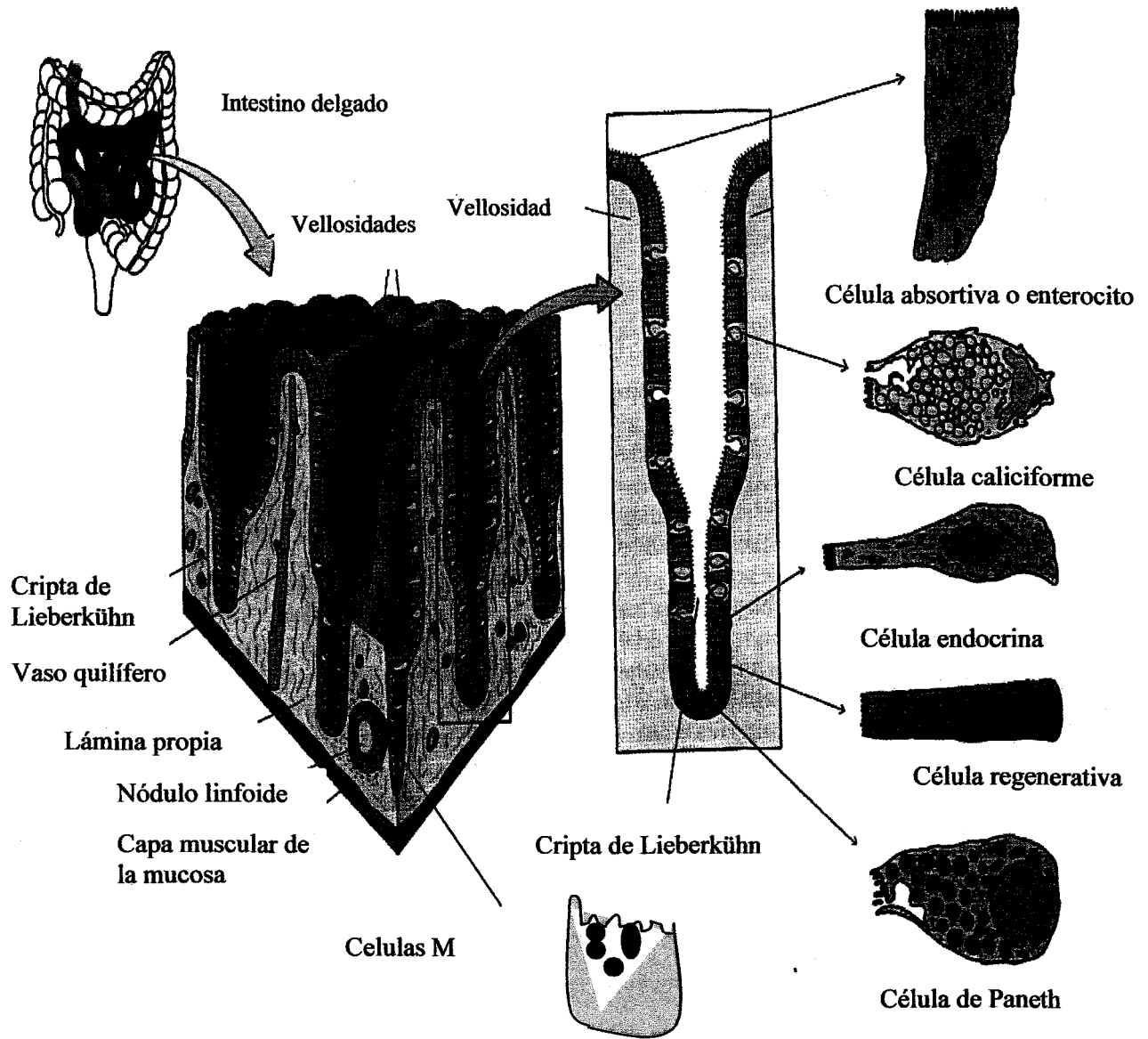


Figura 2.2. Estructura de la mucosa, vellosidades, criptas de Lieberkühn y de las células componentes del epitelio intestinal. Tomado de Leslie P. Gatner-James L. Hiatt: Histología, Texto y atlas. 1ª Ed., Mac Graw-Hill Interamericana, México 1997.

antígenos macromoleculares y microorganismos desde la luz intestinal hasta los folículos linfoides de las placas de Peyer, proceso que tiene lugar mediante la formación de vesículas endocíticas (Owen y col., 1986; Sicikski y col., 1990).

2.2. MEMBRANA APICAL: ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES.

Como comentamos en el apartado anterior, los enterocitos son células muy polarizadas, existiendo una gran diferencia morfológica y funcional entre la membrana en contacto con el lumen intestinal, membrana apical, y la membrana basolateral. Nos detendremos en la descripción de la membrana apical por ser objeto de estudio en la presente memoria. Estudios detallados sobre la estructura, composición química y aspectos funcionales de la membrana apical, han sido posibles gracias al desarrollo de métodos que permiten el aislamiento de membranas apicales relativamente puras. Además, una gran proporción de membranas se aíslan como vesículas cerradas, por lo que se usan como modelo para el estudio del transporte intestinal de un determinado substrato.

La membrana apical también recibe el nombre de membrana de borde en cepillo, por presentar multitud de proyecciones digitiformes estrechamente unidas llamadas microvellosidades. Estas microvellosidades tienen un grosor de 0,5 a 1,5 μm con 1 μm de longitud y su presencia hace aumentar la superficie de absorción intestinal de 14 a 40 veces. En los enterocitos del intestino se ha calculado que hay unos 200 millones de microvellosidades por mm^2 de superficie apical. En el interior de las microvellosidades hay unos filamentos que recorren toda su longitud y se proyectan hacia el interior de la célula formando el citoesqueleto de la microvellosidad. Estos filamentos están constituidos principalmente por actina, los cuales se adhieren al vértice de la microvellosidad a una región amorfa formada entre otras por villina. Además, estos filamentos de actina también están ligados a la red de actina de las uniones adherentes que se encuentran entre las células adyacentes. Por la base de la microvellosidad los filamentos de actina están embebidos en la membrana terminal, complejo de moléculas

de actina y espectrina, debajo de la cual se sitúan los filamentos intermedios de citoqueratina (figura 2.3.).

Aún se desconoce si el citoesqueleto de las microvellosidades, además de su evidente función arquitectónica, desempeña una función contráctil (Louvard, 1989; Bretcher, 1991). Se han propuesto diversas hipótesis para intentar explicar el sentido de esta contracción; una de ellas señala que la contracción serviría para separar entre sí las microvellosidades, evitando el contacto de unas con otras, lo que dificultaría la absorción. Sin embargo, es posible que la función de estos microfilamentos sea simplemente la de mantener rígida la microvellosidad mediante la formación de un apretado haz de microfilamentos.

Las microvellosidades están revestidas por glucoproteínas que forman el llamado glucocáliz. La capa de glucocáliz, no sólo protege a las microvellosidades de su autodigestión sino que además, contiene multitud de enzimas que intervienen en la digestión terminal de los dipéptidos y disacáridos hasta sus monómeros. Entre las enzimas se encuentran la fosfatasa alcalina, que hidroliza compuestos fosfatados; las disacaridasas, que rompen disacáridos, como la sacarasa, lactasa y maltasa, en monosacáridos y las aminopeptidasas, que liberan un aminoácido terminal de un péptido de cadena corta.

Además de estas proteínas enzimáticas, en la membrana apical existen multitud de otras proteínas no enzimáticas cuya función puede ser la de actuar como receptores, como el receptor del factor intrínseco de la cobalamina (Levine y col., 1984), o como transportadores, dentro de las cuales incluimos el transportador de D-glucosa dependiente de Na^+ , SGLT1 (*Sodium glucose cotransporter*) (Wright y col., 1991), el cual será objeto de estudio en esta memoria; el transportador de aminoácidos dependiente, SAAT (*Sodium amino acid cotransporter*) o independiente de Na^+ , (Stevens, 1990; Ganapathy y col., 1994); el transportador de sales biliares dependiente de Na^+ , ASBT (*apical sodium-dependent bile acid transporter*) (Christie y col., 1996) o el intercambiador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, NHE (*$\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger*) (Yun y col., 1995) entre otros.

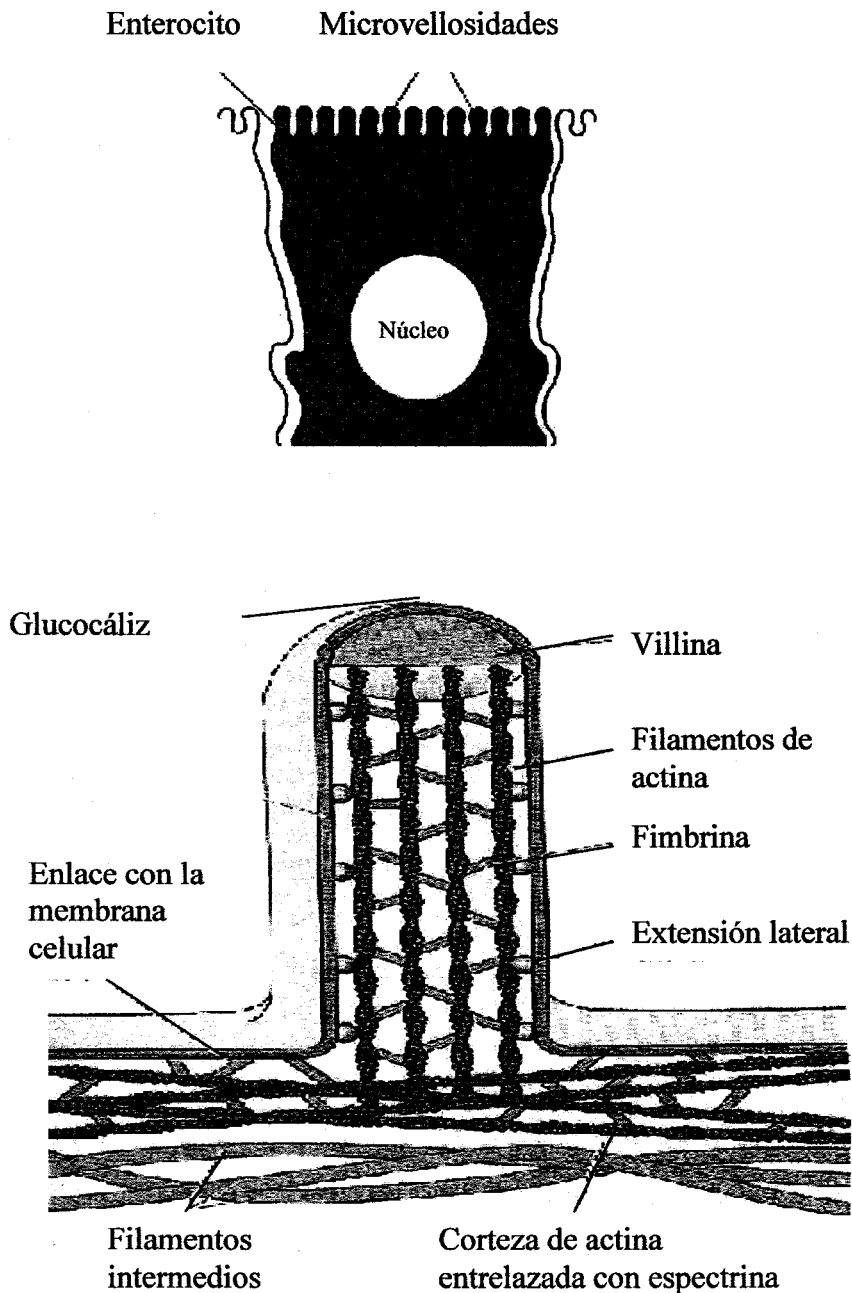


Figura 2.3. Esquema del citoesqueleto de una microvellosidad. Tomado de Bastian, G. F.: *The digestive System*. Ed. Harper Collins, New York, 1994; y Leslie P. Gartner.: *Histología, texto y atlas*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México, 1997.

Las proteínas de membrana difieren en cuanto a su grado de unión a las membranas celulares. Está generalmente aceptado que la parte glucosídica de las proteínas sobresale de la membrana y se proyecta hacia el lumen intestinal, mientras que la parte peptídica suele estar asociada o unida a la membrana. Pero la forma de unión depende del tamaño de las proteínas. Brasitus y col. (1988) demostraron que las proteínas grandes como la sacarasa-isomaltasa, la lactasa, maltasa, y leucinaminopeptidasa se encuentran normalmente en el exterior de la membrana, y unidas mediante una cadena polipeptídica que se inserta en la porción hidrofóbica de la membrana. Por el contrario, las proteínas pequeñas como la Ca^{++} ATPasa, la fosfatasa alcalina, el SGLT1 y la trealasa se encuentran inmersas en toda la membrana (Brasitus y Schachter, 1984).

Estudios mediante autorradiografías demuestran que la membrana apical posee una estructura muy dinámica que constantemente renueva sus proteínas. La velocidad de cambio de las macromoléculas depende de la especie animal, siendo más lenta en el hombre, y más rápida en ratas, gatos y rumiantes (Blok y col., 1984). La sacarasa, una de las proteínas más grandes de la membrana apical, se renueva cada 4-6 horas (Alpers, 1972). La mayoría, sino todas las proteínas de la membrana apical del enterocito, se renuevan al cabo de 48-72 horas (Messier y Leblond, 1960).

Además, la estructura y composición de la membrana apical no es uniforme a lo largo del intestino, existiendo diferencias regionales y, dentro de la misma región, considerando la madurez de los enterocitos. Así, en las células no diferenciadas de la cripta, las microvellosidades son poco abundantes y más cortas, y el glucocáliz está menos desarrollado que en los enterocitos maduros con una menor presencia de proteínas de membrana. Las disacaridasas, la fosfatasa alcalina y las dipeptidasas no se encuentran en la membrana apical de los enterocitos de la cripta (Madara y col., 1980).

Junto con las proteínas, la membrana apical es rica en lípidos, existiendo una proporción lípido/proteína aproximada de 1:1,5. Estudios realizados con réplicas obtenidas por criofacturas y observadas al microscopio electrónico, han dado una

valiosa información sobre la disposición de las proteínas y lípidos en la membrana apical. El plano de fractura separa la bicapa lipídica de las membranas apicales en sus dos monocapas, la cara de la mitad exterior (denominada cara E), y la cara de la mitad interior o protoplasmática (denominada cara P). En ambas caras se observan proteínas que se distribuyen asimétricamente, siendo la cara P de 5 a 8 veces más rica que la cara E (Madara y Trier, 1994).

En cuanto a la composición lipídica de la membrana apical, los fosfolípidos son los componentes mayoritarios junto con el colesterol. Esta relación colesterol/fosfolípidos tampoco se mantiene a lo largo del intestino y puede variar con respecto a la especie, siendo inferior en la rata y mayor en el pollo y en el cobaya (Ruiz-Gutiérrez y col., 1997)

Con respecto a la composición de fosfolípidos de las biomembranas se ha descrito que la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina son los fosfolípidos más abundantes en la membrana apical del yeyuno de rata (Ruiz-Gutiérrez y col., 1997), no así en el pollo (Vázquez y col., 1997b) o cobaya (Ruiz-Gutiérrez y col., 1997).

La composición en ácidos grasos de las membranas apicales también varía según región del intestino y especie considerada. En el caso de la rata, las membranas apicales presentan un alto porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados, seguidos por los ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Ruiz-Gutiérrez y col., 1997).

Por otro lado, el grado de saturación de los ácidos grasos junto con el contenido en colesterol y la composición de fosfolípidos de las membranas, son determinantes intrínsecos de la fluidez de las membranas (término inverso a la microviscosidad). Este factor influye en las interacciones lípido/proteína de la membrana apical y consecuentemente en la funcionalidad de la proteínas transportadoras insertas en dichas membranas (Ruiz-Gutiérrez y col., 1997).

2.3. TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS A TRAVÉS DEL EPITELIO INTESTINAL.

Los carbohidratos constituyen aproximadamente la mitad de la ingesta calórica en las personas adultas de los países occidentales. En esta dieta, los carbohidratos se ingieren en forma de polisacáridos, como el almidón; disacáridos, como la sacarosa, lactosa y maltosa; y monosacáridos en menor cantidad. Los polisacáridos y disacáridos han de ser previamente digeridos para poder absorberse por el epitelio intestinal, siendo los principales productos de la digestión las hexosas D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa.

La absorción de azúcares desde la luz del intestino hacia la sangre se realiza por dos vías en paralelo: la ruta transcelular y la ruta paracelular (figura 2.4.). La absorción transcelular implica el paso de los azúcares por dos membranas en serie, la luminal o apical y la basolateral, y puede tener lugar por difusión simple o bien por transporte mediado, a través de la interacción del substrato con proteínas específicas de la membrana del enterocito. La paracelular se realiza por difusión a través de las uniones intercelulares del epitelio, y depende de la mayor o menor permeabilidad de estas uniones.

En la membrana apical del enterocito hay un mecanismo de transporte mediado concentrativo o transporte activo, capaz de acumular hexosas dentro de las células en contra de su gradiente de concentración. Se trata de un mecanismo de cotransporte en el que la entrada de hexosas está acoplada al gradiente electroquímico del ión Na^+ . Nos referimos a la proteína de membrana denominada SGLT1, que transporta D-glucosa y D-galactosa. Además, en la membrana apical, así como también en la membrana basolateral, se han descrito mecanismos de transporte mediado equilibrativos o de difusión facilitada. Son sistemas independientes del ión Na^+ que favorecen el movimiento de hexosas a través de la membrana a favor de su gradiente de concentración. En la membrana apical se encuentra el transportador GLUT5, (*Glucose Transporter*) proteína de membrana que transporta D-fructosa y en la membrana

basolateral el transportador GLUT2, proteína de membrana capaz de transportar D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa. (figura 2.4.).

2.3.1. Transporte mediado concentrativo de monosacáridos a través de la membrana apical del enterocito.

Riklis y Quastel (1958), fueron los primeros investigadores en observar que el transporte activo de hexosas era dependiente de Na^+ . Posteriormente, Crane (1962) propone un modelo general de funcionamiento para el transporte de substratos basada en la denominada hipótesis del gradiente iónico. Esta hipótesis postula que la energía necesaria para la acumulación de monosacáridos deriva del flujo de Na^+ a través de la membrana luminal a favor de su gradiente electroquímico. Ésta es mantenida gracias a la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, localizada exclusivamente en la membrana basolateral del enterocito. El transporte en contra de gradiente de hexosas es un proceso que presenta una cinética de saturación tipo Michaelis-Menten, y es inhibible competitivamente por análogos estructurales, así como por un glucósido denominado florricina.

El transporte mediado concentrativo o activo de azúcares presenta una elevada especificidad, y los substratos que pueden utilizar este sistema de transporte han de cumplir unos determinados requerimientos estructurales para poder unirse al transportador.

2.3.1.1. Estructura, función y características del cotransportador Na^+ -D-glucosa (SGLT1).

Las moléculas que promueven el transporte de azúcares acoplado al sodio constituyen una familia de proteínas denominadas SGLT (*sodium glucose cotransporters*). Hasta el momento, se han descrito la presencia de dos moléculas SGLT, SGLT1 y SGLT2, las cuales se encuadran dentro de una superfamilia de transportadores dependientes del ión sodio. La molécula SGLT1 se localiza en la membrana apical de los enterocitos y de las células del túbulo proximal renal.

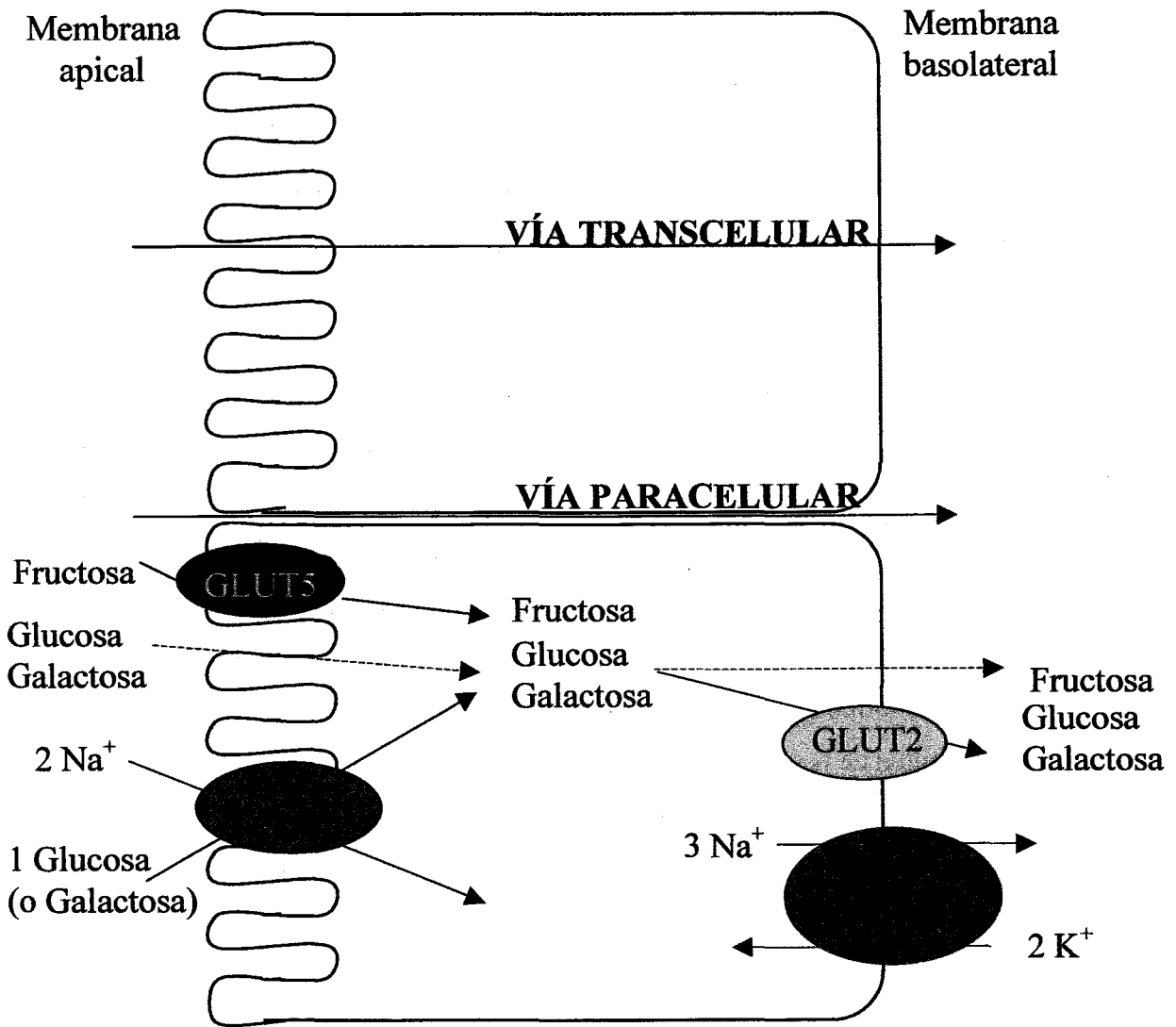


Figura 2.4. Mecanismo de absorción de azúcares en enterocitos de yeyuno e ileon. Sistemas de transporte implicados en la absorción intestinal de D-glucosa , D-galactosa y D-fructosa.

Por el contrario la proteína SGLT2 únicamente se ha encontrado en el riñón.

La caracterización bioquímica del cotransportador de Na⁺-D-glucosa (SGLT1) ha sido una tarea compleja desde un punto de vista técnico, ya que se trata de una proteína minoritaria en la membrana apical del enterocito (0,05-0,07% del total; Schmidt y col., 1983) y además se desnaturaliza con mucha facilidad durante el proceso de purificación.

La molécula SGLT1 fue clonada inicialmente por Hediger y col. (1987) en el intestino de conejo. La expresión de este transportador en diferentes sistemas de estudio reprodujo las características del transporte de azúcares encontradas en el intestino. Además, se descubrió que una mutación puntual en la proteína SGLT1 era suficiente para provocar una malabsorción de glucosa y galactosa (Turk y col., 1991). Todo ello llevó a la conclusión de que la proteína SGLT1 era el transportador intestinal de glucosa. Más recientemente, Loo y col. (1996) han señalado que esta proteína también transporta agua, de forma secundaria al transporte de sodio y glucosa, en un proceso que supone hasta la mitad de la absorción del agua en el intestino.

Además de en conejo, la molécula SGLT1 ha sido clonada en otros mamíferos como humanos (Hediger y col., 1989), cerdo (Ohta y col., 1990), rata (Lee y col., 1994) y cordero (Tarpey y col., 1995). Es una proteína de 662-665 aminoácidos, dependiendo de la especie, que se localiza principalmente en el intestino delgado. El ARNm de esta proteína está presente en gran proporción en células localizadas en las vellosidades intestinales. A medida que estas células migran, se va produciendo la transcripción del ARNm y la máxima expresión de la proteína aparece en la punta de la vellosidad (Hediger y Rhoades, 1994). En el riñón la proteína tiene un 100% de identidad con respecto a la intestinal (Morrison y col., 1991; Pajor y col., 1992) y se localiza principalmente en la región S3 del túbulo renal (Lee y col., 1994). Además, técnicas inmunológicas y de hibridación *in situ* han revelado la presencia del cotransportador SGLT1 en pulmón e hígado de rata (Lee y col., 1994) y en la barrera hematoencefálica, neuronas piramidales y de Purkinje de bovino, conejo, cerdo, y hombre (Nishizaki y

col., 1995; Poppe y col., 1997). El peso molecular de esta proteína, determinado por técnicas de *Western blotting* en distintas especies es de 65-75 kDa aproximadamente (Hirayama y col., 1991; Silverman y col., 1993; Lin y col., 1998).

Tras la clonación inicial del transportador SGLT1 (Hediger y col., 1987), el modelo de topología propuesto fue de 11 dominios transmembrana. Posteriormente, se habló de 12 dominios (M1 al M12) con los extremos amino y carboxilo orientados hacia el interior celular (Lee y col., 1994). Más recientemente, Turk y col. (1996) han propuesto un modelo topológico en el cual esta proteína integral tiene 14 dominios transmembrana encontrándose el extremo amino extracelularmente y el carboxilo terminal integrado en la membrana (Hediger y col., 1991) (figura 2.5.). En cualquier caso, la unidad funcional del transportador parece ser un homotetrámero formado de 4 subunidades de unos 73 kDa (Stevens y col., 1990). La proteína se encuentra glicosilada en un residuo de asparragina situado en la posición 248 (ASN²⁴⁸). Aunque inicialmente se pensó que esta glicosilación era importante para la actividad transportadora (Birnie y col., 1990), más tarde se demostró que su presencia no era necesaria funcionalmente (Hediger y col., 1991).

Wright y col. (1991) propusieron un modelo tridimensional para ilustrar el funcionamiento del cotransportador SGLT1 (figura 2.6.). Según este modelo, el Na⁺ sería el primero en unirse a la proteína transportadora, provocando un cambio conformacional que aumenta la afinidad por el monosacárido, que se une seguidamente.

La unión del monosacárido al transportador da lugar a un segundo cambio conformacional, que conduce a la liberación del substrato en el citoplasma. Finalmente el transportador se reorienta hacia el lado externo de la membrana. Junto a este modelo el grupo de Koepsell (Veyhl y col., 1993), han propuesto la existencia de una proteína de 56 kDa, denominada RS1, capaz de regular el transporte de monosacáridos. Así el transporte de Na⁺ y D-glucosa se realizaría por un oligómero de la membrana formado por dos subunidades de SGLT1 con las cuales interaccionaría una o dos subunidades de

RS1. Ha de destacarse que sólo la proteína SGLT1 transporta Na^+ y D-glucosa, si bien la presencia de RS1 incrementa la capacidad máxima del transportador.

Los modelos cinéticos propuestos para explicar el funcionamiento del cotransportador han sido muy diversos, y en todos ellos se ha intentado dar una explicación funcional a los resultados experimentales. El grupo de Wright propuso un modelo cinético que explica los resultados experimentales observados. Este modelo propone que el transportador tiene una valencia de -2 y dos estados conformacionales $[C]'$ y $[C]''$, en los cuales el lugar de unión con los substratos se encuentra respectivamente en la parte externa e interna de la membrana celular. En condiciones de reposo ($V_{mc} = -50$ mV), el transportador se encuentra orientado hacia fuera, y la presencia de una elevada concentración de Na^+ extracelular, hace que se unan dos Na^+ . Esta unión aumenta la afinidad por la D-glucosa aproximadamente un orden de magnitud y favorece la unión del monosacárido. Esta unión origina un cambio conformacional que permite que el substrato se siga liberando en la parte citoplasmática, así finalmente, el transportador se reorienta hacia la parte externa de la membrana. Por lo cual, comparando la relación de entrada de Na^+ respecto a la captación de monosacárido, se obtiene un coeficiente de acoplamiento de 2:1 para el SGLT1.

Estudios realizados por Fisher y Parson (1949), demostraron que el transporte de azúcares era un proceso saturable que presentaba una cinética de Michaelis-Menten. Los procesos de este tipo se caracterizan por dos constantes, la velocidad máxima de transporte, V_{max} , que da idea de la capacidad de transporte del sistema, y la constante de transporte de Michaelis, K_m , que se refiere a la afinidad entre el substrato y el transportador.

La cinética del transporte mediado puede estudiarse a partir de la acumulación del substrato dentro del tejido a tiempos cortos. Esta acumulación es una medida de la tasa inicial de transporte, ya que el flujo en sentido contrario es despreciable dentro del margen de tiempo que normalmente se utiliza para hacer este tipo de estudios.

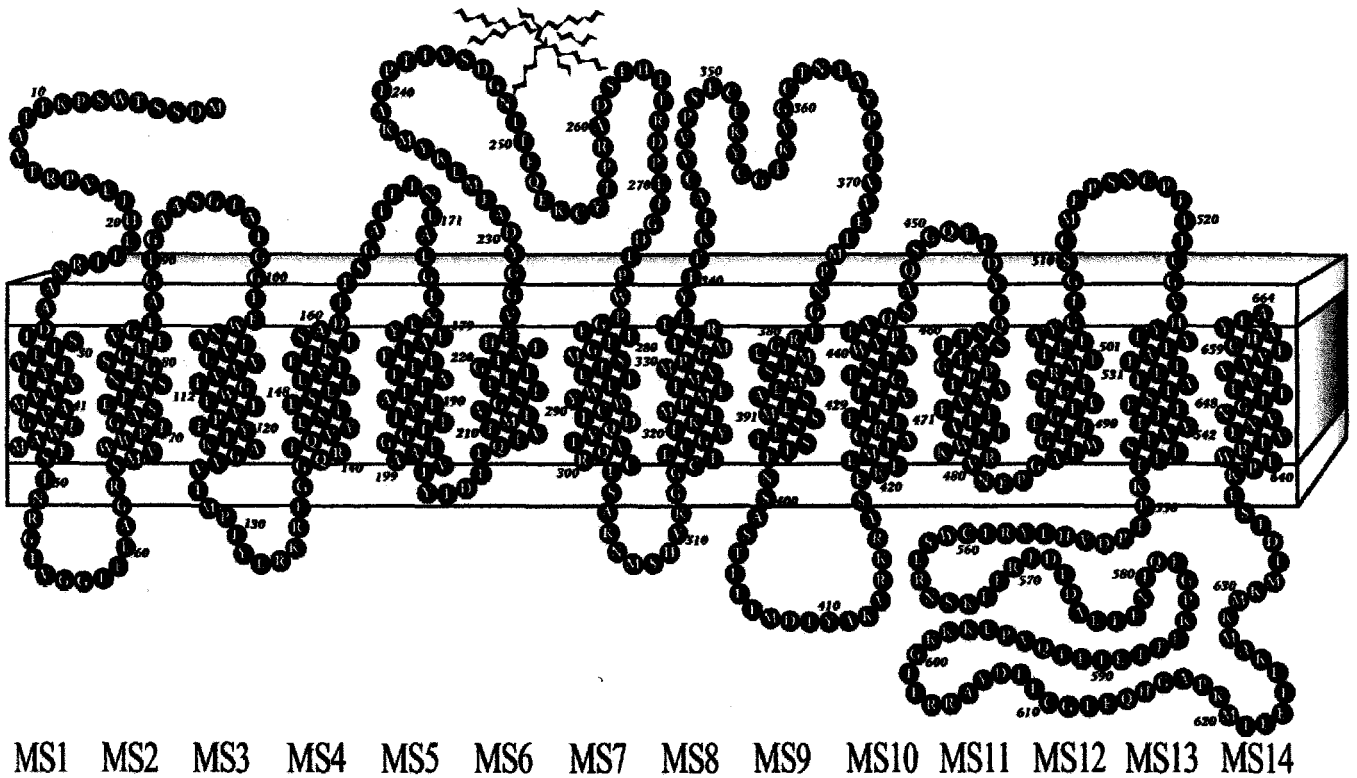


Figura 2.5. Representación esquemática del modelo propuesto para el cotransportador de Na⁺ y D-glucosa presente en humanos (hSGLT1). El sitio de N-glicosilación se encuentra en el aminoácido localizado en posición 248 (Asn²⁴⁸), entre los dominios MS5 y MS6. Tomado de Turk y col., (1996).

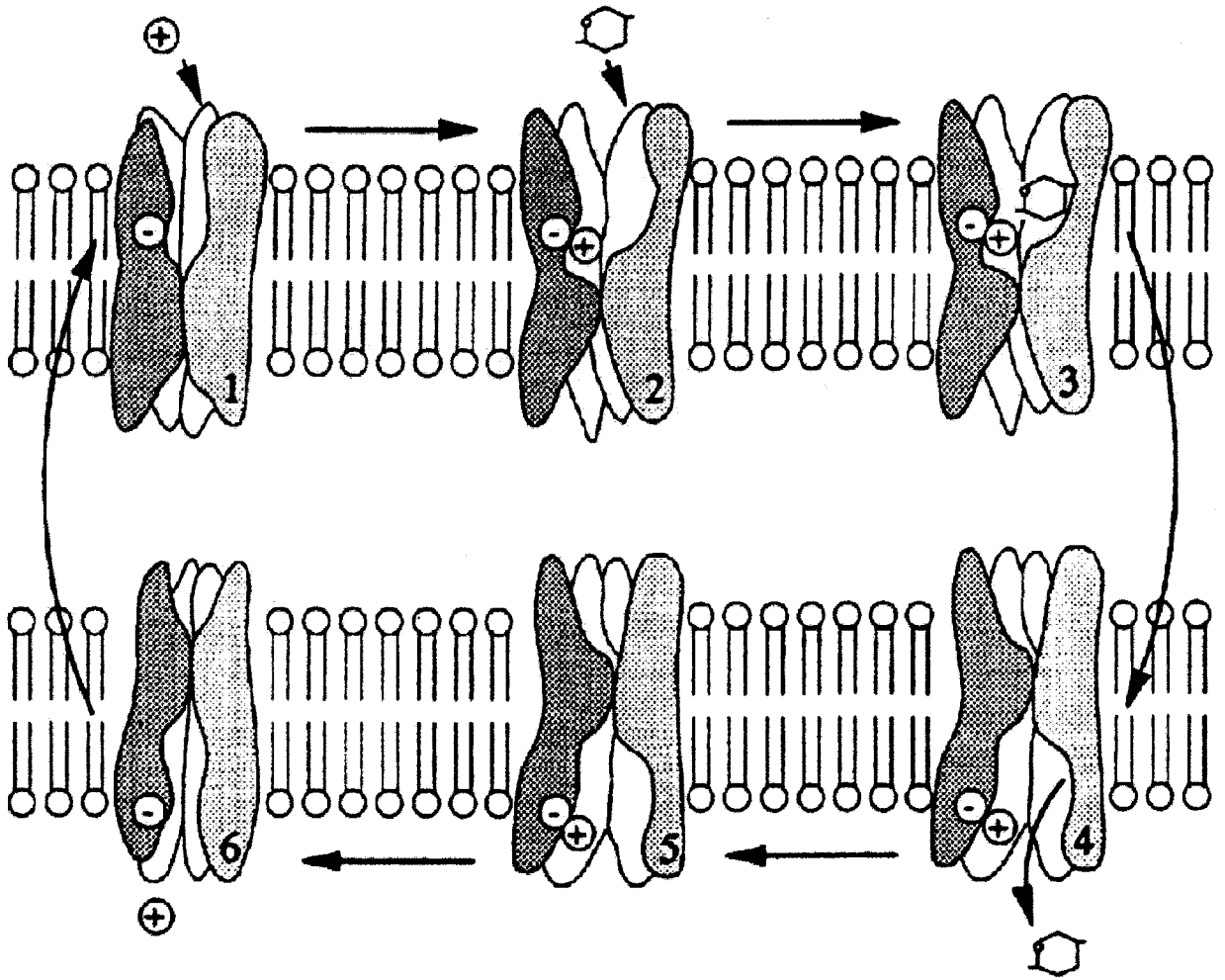


Figura 2.6. Esquema de las distintas conformaciones que toma el cotransportador de Na⁺ y D-glucosa. Modelo propuesto por Wright y col., (1991), para el cotransporte de Na⁺ y D-glucosa. Tomado de Wright y col., (1991).

La saturabilidad del sistema es atribuible a la existencia de un número limitado de transportadores en la membrana, a los cuales se unirá el soluto para ser transferido al otro lado de la membrana, de forma que a concentraciones elevadas, la mayoría de estos transportadores están ocupados.

Son muchos los estudios cinéticos realizados en diferentes sistemas y especies de animales. De todos ellos se deduce que la especificidad de sustrato del SGLT1 decrece en el orden: D-glucosa > α -metil-D-glucosa (α -MG) > D-galactosa > 3-O-metil-D-glucosa (3-OMG) > 2-deoxiglucosa (2-DOG), tanto en vesículas de membranas apicales de conejo (Ikeda y col., 1989) como en células COS-7 y oocitos de *Xenopus* (Hediger y col., 1987; Birnir y col., 1990; Lee y col., 1994; Panayotova-Heiermann y col., 1995). Otros monosacáridos como D-fructosa, D-manosa, L-glucosa o L-galactosa no son transportados por esta proteína (Hediger y col., 1987; Lee y col., 1994).

La florricina o glucósido de la floretina, es en la actualidad un conocido inhibidor competitivo del transporte de azúcares acoplado al sodio. Se ha comprobado que la florricina se une, con alta afinidad, al sitio extracelular del cotransportador SGLT1, y no sufre translocación hacia el interior celular (Koepsell y Madrala, 1987), por lo que se habla de unión o *binding* de florricina a la proteína transportadora. Los valores recogidos en la bibliografía para la constante de inhibición (K_i) del transporte dependiente de sodio de D-glucosa por parte de la florricina oscilan entre los 6-15 μ M encontrados por diferentes investigadores en oocitos con SGLT1 de intestino de conejo (Ikeda y col., 1989) y, en células COS-7 expresando el mismo transportador (Birnir y col., 1990).

En cuanto a la constante de afinidad (K_m) para el transporte de glucosa, son muchos los estudios realizados en diferentes sistemas y especies animales. Freeman y Quamme (1986), en vesículas de membranas apicales procedentes de intestino delgado de rata obtuvieron un valor promedio de 0,5 mM tanto en el yeyuno como en el íleon. Para Dudeja y col. (1990), el valor de K_m oscilaba entre 0,05 y 0,16 mM según se aislaran vesículas de membranas apicales procedentes de enterocitos de ratas en

diferentes niveles del eje cripta-vellosidad. En estudios con oocitos se obtuvieron unos valores de 0,17, 0,31 y 0,49 mM según fueran inyectados con el ADNc del SGLT1 correspondiente al conejo, rata o humanos, respectivamente (Hirayama y col., 1996). En general podemos promediar un valor que puede oscilar entre 0,05-0,6 mM (Ikeda y col., 1989; Birnir y col., 1990; Thorens, 1996; Lin y col., 1998).

Con respecto a la D-galactosa, se han observado unos valores de K_m que oscilan entre 1-4 mM según el método de estudio aplicado y la especie utilizada (Bieberdorf y col., 1975; Barber y col., 1979; Vinardell y Bolufer, 1983; Carreras y col., 1988). Estos resultados indican la menor afinidad que presenta el SGLT1 para la D-galactosa comparado con la D-glucosa.

La cinética del transporte mediado concentrativo se ve afectada por el gradiente de Na^+ existente a través de la membrana. Para Goldner y col. (1969), Kimmich y Randles (1975) y Hopfer y Groseclose (1980), la concentración externa de Na^+ modifica la V_{\max} del sistema sin afectar prácticamente la K_m . En cambio Crane y col. (1965), Curran y col. (1967), y Alvarado (1976) observaron que el gradiente de Na^+ afecta a la K_m sin modificar la V_{\max} . Estas diferencias cinéticas tan notables configuran modelo muy diferentes a la hora de explicar el cotransporte de monosacáridos y Na^+ . Por otra parte, el valor de K_m para la unión del Na^+ al transportador es de 4-17 mM (Umbach y col., 1990; Panatoyova-Heiermann y col., 1995; Hirayama y col., 1996), existiendo una estequiometría indicada anteriormente de dos iones sodio por cada molécula de azúcar cotransportada (Lee y col., 1994).

Recientemente, se ha puesto mucha atención en la cuestión de si existe en el intestino más de un transportador de hexosas dependiente del ión Na^+ . Diversos autores han evidenciado la existencia de más de un sistema de cotransporte Na^+ /glucosa en la membrana luminal del enterocito. Kaunitz y col. (1982), Kessler y Semenza (1983), Kaunitz y Wright (1984), Brot-Laroche y col. (1986) interpretan que existen dos transportadores con diferente afinidad para la D-glucosa. Por otro lado, Freeman y Quamme (1986) han observado cambios con la edad en lo referente a la cinética del

transporte de D-glucosa en el yeyuno e íleon de rata, y sugiere la existencia de dos sistemas de cotransporte de glucosa con el ión Na^+ que se expresan de distinta manera a lo largo de la edad y del intestino. De los dos sistemas de transporte, el mayoritario en el intestino delgado presenta baja capacidad y alta afinidad, características correspondientes a la proteína SGLT1.

No hay coincidencia entre los diferentes autores sobre las características del segundo sistema de transporte. Brot-Laroche y col. (1986) describieron el sistema II con una elevada capacidad y una baja afinidad, con valores de K_m para la D-glucosa de 25 mM.

Kaunitz y Wright (1983) estudiando el transporte de D-glucosa en vesículas apicales de yeyuno de conejo diferenciaron un sistema de transporte saturable y minoritario con una afinidad muy superior a la del sistema mayoritario. Este mismo grupo (Ikeda y col., 1989) caracterizaron estos dos sistemas de transporte utilizando el α -MG y sugirieron la posibilidad de que los dos componentes sean en realidad manifestaciones de un único transportador. Posteriormente, ellos mismos rectifican los trabajos anteriores y reconocen la existencia de un único transportador (SGLT1) que transporta todas las hexosas con un grupo hidroxilo en el carbono dos con la misma configuración que la presente en la D-glucosa. La D-glucosa y la D-galactosa son los sustratos naturales de este transportador, caracterizándose por presentar una alta afinidad por dichos monosacáridos.

2.3.2. Transporte mediado equilibrativo a través de la membrana apical del enterocito.

El transporte mediado equilibrativo de azúcares es independiente del Na^+ y se caracteriza por:

- realizarse a favor de gradiente electroquímico
- ser saturable

- poseer especificidad de sustrato
- ser inactivo por inhibidores
- no requerir gasto energético y
- ser reversible

El transporte equilibrativo de hexosas es mediado por miembros de una familia de proteínas denominada GLUT (*Glucose transporters*) de la cual se han aislado hasta la fecha siete isoformas nombradas desde GLUT1 hasta GLUT7. Ellos se diferencian por su secuencia de aminoácidos, localización, especificidad de sustrato y afinidad hacia sustrato comunes (Rand y col., 1993; Thorens y col., 1990; Thorens y col., 1996).

El transporte de hexosas a través de estas proteínas se caracteriza porque el transportador alterna entre dos estados conformacionales, cada uno de ellos para la unión del sustrato, bien sea por la cara citoplasmática de la célula o por la cara extracelular (Carruthers, 1990). La unión del sustrato a cualquiera de las dos caras de la membrana daría lugar a un cambio conformacional de la proteína provocando la reorientación del transportador y la liberación del sustrato al otro lado de la membrana.

Los conocimientos que actualmente tenemos de la estructura y función de estos transportadores, provienen fundamentalmente de la información obtenida a partir del estudio del GLUT1, primera proteína que fue identificada como un transportador de D-glucosa, que se expresa en gran cantidad en las membranas de los eritrocitos y en la membrana basolateral de las células constituyentes de la región S3 del túbulo renal (Thorens y col., 1996).

En los enterocitos, se ha descrito la presencia del GLUT2 en la membrana basolateral y del GLUT5 en la membrana apical (Thorens y col., 1996).

El GLUT2 se trata de una proteína de 61 kDa y de 524 aminoácidos que fue clonada e identificada en el hígado en el año 1988 (Fukumoto y col., 1988; Thorens y

col., 1988), y presenta un 55,5 % de identidad con respecto al cotransportador SGLT1.

En las células epiteliales del intestino delgado, el sistema GLUT2 se expresa en la membrana basolateral de los enterocitos situados en la punta y en las paredes de las vellosidades (Thorens y col., 1993), donde se coexpresa el sistema de transporte SGLT1 (Wright y col., 1994). Recientemente también se ha descrito la presencia de este transportador en la membrana apical de las células absorbentes del intestino de rata pero en una cantidad muy reducida, incrementándose este hecho en el caso de animales diabéticos (Debnam y col., 1995).

La especificidad de este mecanismo independiente de Na^+ es diferente a la del transporte activo, dependiente de Na^+ , a través de la membrana apical del enterocito; el GLUT2 es capaz de utilizar además de D-glucosa y la D-galactosa, otros monosacáridos como la D-fructosa, D-manosa y 2-deoxi-glucosa (Bihler y Cybulski, 1973). Este transportador es insensible a la florricina, pero inhibible por floretina (Kimmich, 1981), teofilina (Holfman y Naftalin, 1975; Moretó y col., 1984) y citocalasina B (Kimmich y Randles, 1979).

Las características cinéticas y por tanto funcionales más notable en este sistema, y que difiere en el caso de los demás miembros de esta familia, es que presenta una baja afinidad por el substrato y una alta velocidad máxima (Kimmich y Randles, 1975). La K_m del GLUT2 para la D-glucosa o para sus análogos estructurales no metabolizables oscila entre 17 mM (Garriga y col., 1997) y 42 mM (Gould y col., 1991; Bell y col., 1993). La elevada K_m de este sistema de transporte es fundamental para la función llevada a cabo en el epitelio intestinal. La baja afinidad por el substrato hace que la saturación del sistema no sea el factor limitante para su funcionamiento y por tanto la cantidad de soluto transportado depende solo de su concentración. Esta característica permite que la salida de D-glucosa de los enterocitos a través de la membrana basolateral se ajuste en cualquier momento a la concentración de soluto contenido dentro de la célula.

2.3.2.1. Propiedades del transportador GLUT5

El GLUT5 es una proteína de membrana de 501 aminoácidos que presenta un 41% de identidad con respecto al GLUT2. Su descubrimiento se realizó a partir del aislamiento de su ADNc en el intestino delgado de diferentes mamíferos: humanos (Kayano y col., 1990), rata (Rand y col., 1993) y conejo (Miyamoto y col., 1994).

Estudios de *Northern blotting* han puesto de manifiesto que la molécula GLUT5 se expresa principalmente en el intestino delgado, y mediante técnicas de inmunolocalización e inmunotransferencia se ha ratificado su localización en la membrana apical de los enterocitos situados en la punta y en las paredes de las vellosidades (Davidson y col., 1992; Mahraoui y col., 1992; Miyamoto y col., 1994). Sin embargo, otros investigadores han localizado también al GLUT5 en el yeyuno humano en la membrana basolateral de estas células (Blakemore y col., 1995).

Además de en el intestino delgado, se ha puesto de manifiesto esta proteína en otros tejidos como riñón (Kayano y col., 1990; Rand y col., 1993; Miyamoto y col., 1994), cerebro y barrera hematoencefálica (Mantych y col., 1993), espermatozoides (Burant y col., 1992) y eritrocitos (Concha II y col., 1997).

El GLUT5 es un transportador exclusivo para la D-fructosa, siendo insensible a la presencia de D-glucosa o D-galactosa. Esta observación se ha llevado a cabo en oocitos inyectados con el ARNm de la proteína (Burant y col., 1992), en vesículas de membrana apical (Miyamoto y col., 1994) y en células de ovario de hamster chino (Inukai y col., 1995). Así la D-fructosa entraría en las células absorbentes del intestino mediante el GLUT5, localizado en la membrana apical de los enterocitos, y saldría a través del GLUT2, localizado en la membrana basolateral (Cheeseman, 1993).

Otra característica del GLUT5 es que no es inhibido por citocalasina B, conocido inhibidor del transporte de azúcar por difusión facilitada (Carruters, 1990; Rand y col., 1993).

La constante de afinidad del transportador para la D-fructosa (K_m) se sitúa en torno a los 4-17 mM, según sistema, tejido y especie usada para el estudio, (Burant y col., 1992; Bell y col., 1993; Thorens, 1993; Miyamoto y col., 1994; Inukai y col., 1995; Concha y col., 1997; Kane y col., 1997; Hundal y col., 1998).

2.4. REGULACIÓN INTESTINAL DEL TRANSPORTE DE AZÚCARES.

La absorción de los principales monosacáridos de la dieta, D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa, es un proceso regulado por el epitelio intestinal. La regulación puede ser específica o inespecífica, implicando fenómenos tanto celulares como paracelulares, siendo fruto de una respuesta adaptativa controlada por los propios substratos absorbidos o bien se trata de fenómenos determinados genéticamente.

Los mecanismos específicos son aquellos, en el que el transporte de un determinado substrato es modificado por el cambio en el número o en la afinidad de las estructuras encargadas de su transporte. Un ejemplo bien documentado, es la inducción del SGLT1 por la dieta (Ferraris, 1994).

También pueden presentarse adaptaciones inespecíficas, las cuales afectan a la superficie de absorción por cambio en el número de la célula absorbente o bien por cambio en el tamaño de las vellosidades o microvellosidades (Holt y col., 1984; Mitjans y col., 1995), o del grosor de la capa no agitada (Thomson, 1979).

Se han observado igualmente cambios funcionales a diferentes niveles de las vellosidad, como es el caso de animales acabados de nacer que transportan nutrientes en todos los puntos de la vellosidad, mientras que en los adultos la función de transporte se encuentra restringida al tercio superior de esta estructura (Smith, 1981).

Una de las variables que más afectan a la capacidad de acumulación y por tanto a la de transportar substratos, es el gradiente electroquímico del Na^+ a través de la membrana apical. Esta variable depende de numerosos factores, entre los cuales es

posible destacar al actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa y la permeabilidad de las membranas apical y basolateral al Na^+ y a otros iones. Así por ejemplo el incremento en la capacidad de acumulación de monosacáridos inducidos por AMPc se atribuye a una disminución de la permeabilidad al Na^+ (Hyun y Kimmich, 1982; Sharp y Debnam, 1994) y es independiente del Cl^- presente en líquido extracelular (Moretó y col., 1984).

Por otro lado, la adaptación por una dieta con bajo contenido en NaCl reduce la capacidad para transportar monosacáridos, aparentemente por una reducción en la V_{max} , debida a un aumento en la permeabilidad apical al Na^+ (Jaso y col., 1995).

Otro de los mecanismos importantes, es la modificación en la firmeza de las uniones estrechas que fijan los enterocitos, ya que estos cambios pueden afectar al movimientos de solutos por la vía paracelular. Según Pappenheimer y Volpp (1992), la activación de SGLT1 da lugar a un incremento de la presión osmótica intracelular y es acompañada por un aumento del volumen celular. La respuesta reguladora inicia la contracción de la lactomiosina del citoesqueleto que envuelve la región apical del enterocito provocando un cambio en la geometría de las uniones estrechas.

2.5. HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y FISIOPATOLOGÍA DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS.

2.5.1. Concepto de hipertensión arterial

La hipertensión arterial es una enfermedad en la cual la presión arterial está elevada por encima de los niveles normales especificados para una determinada edad y sexo. Es probablemente una de las principales causas de los desórdenes cardiovasculares, pudiendo afectar a personas de todos los grupos de edad, aunque su prevalencia está incrementada con la edad. Esta alteración representa el principal problema de salud poblacional, dando lugar a complicaciones vasculares, las cuales incrementan el riesgo de enfermedades coronarias y fallo renal crónico.

La hipertensión arterial se divide en dos categorías: hipertensión primaria e hipertensión secundaria. En la hipertensión primaria o también llamada hipertensión esencial, la elevación crónica de la tensión arterial no está relacionada con la evidencia de otras enfermedades. En la hipertensión secundaria, la elevación de la presión arterial está acompañada de otras enfermedades, como es el caso de enfermedades renales.

Los niveles de presión arterial se definen como el producto del gasto cardiaco y la resistencia vascular periférica, por tanto, en todas las formas de hipertensión están implicados mecanismos hemodinámicos, bien sea por aumento del gasto cardíaco, por aumento de la resistencia periférica o bien por una combinación de los dos.

Sin embargo, muchos otros factores están implicados, como el sistema nervioso autónomo, el riñón, la composición electrolítica de los fluidos extracelulares e intracelulares, mecanismos de transporte a través de las membranas, disfunciones endoteliales e influencias hormonales, tal como el mecanismo renina-angiotensina-aldosterona, el cual juega un papel activo en la regulación de la presión arterial.

Aunque la causa o causas de la hipertensión esencial son desconocidas, hay muchos factores de riesgo implicados que contribuyen a su desarrollo. A todos los factores hay que añadir la predisposición genética. Muchos estudios sugieren que en personas cuyo historial familiar es positivo, el riesgo de desarrollar hipertensión esencial es aproximadamente el doble que en personas con historial familiar negativo.

Una de las hipótesis generalmente aceptadas en la patogénesis de la hipertensión arterial está basada en la presencia de anormalidades en el transporte celular de iones. Defectos múltiples en el transporte celular de iones han sido observados en pacientes con hipertensión (Zicha, 1993; Monteith y col., 1994) así como en ratas con hipertensión experimental (Bukoski, 1990; Hoffman y col., 1995), en particular defectos en el transporte de los iones Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} . En este sentido, se han encontrado modificaciones en las concentraciones intracelulares de estos iones en varios tejidos implicados en la hipertensión arterial. Sin embargo, la relación entre las alteraciones en

el transporte de la membrana celular y la hipertensión siguen siendo objeto de estudio.

Por otro lado, los investigadores sugieren que los defectos observados en el transporte de iones en la hipertensión arterial podrían ser debidos a cambios en la composición lipídica y fluidez encontrados en muchos de los tejidos implicados en la hipertensión arterial (Bing y col., 1986; Carr y col., 1993). Basada en esta teoría, se han realizado estudios para intentar normalizar los valores de presión arterial a través de la manipulación de la composición lipídica de las membranas, mediante la administración de dietas enriquecidas con diferentes aceites (Pagman y col., 1986; Sasaki y col., 1995; Engler y Engler, 1998).

2.5.2. Alteraciones en el transporte de iones.

Como indicamos en el apartado anterior, los principales iones que parecen jugar un papel importante en la fisiopatología de esta enfermedad son el Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} . De todos ellos, quizás el más estudiado es el ión sodio. Son muchos los autores que demuestran defectos en el transporte de sodio a través de la membrana celular, aumentando consecuentemente el contenido de sodio intracelular en una gran variedad de células, tanto en pacientes con hipertensión esencial como en animales con hipertensión genética (Poch y col., 1994; Soleimani y Singh, 1995). Este incremento puede jugar un papel muy importante en el origen, desarrollo y/o mantenimiento de la elevación en la presión sanguínea.

Los sistemas de transporte de sodio más estudiado han sido el intercambiador Na^+/H^+ (NHE), la bomba Na^+-K^+ ATPasa y la permeabilidad pasiva al Na^+ .

Estudios procedentes de diferentes laboratorios han encontrado un aumento en la actividad del intercambiador NHE en plaquetas (Roskopf y col., 1992), linfocitos (Göbel y col., 1994) y eritrocitos (Sierra y col., 1993) procedentes de pacientes con hipertensión esencial.

En ratas espontáneamente hipertensas (SHR), modelo genético experimental para los estudios de hipertensión, ha sido observado un aumento en la actividad del NHE en linfocitos (Saleh y Battle, 1990), arterias mesentéricas (Foster y col., 1992), plaquetas (Feig, 1990), eritrocitos (Orlov y col., 1989), células de la musculatura lisa vascular (Hoffman y col., 1995), riñón (Roskopf y col., 1995; Kelly y col., 1997) y en el íleon (Vázquez y col., 1997). En el riñón y en cultivo de células de la musculatura lisa vascular, el aumento encontrado en la actividad del NHE, va acompañado por un aumento en la cantidad de ARNm que contiene la información para la síntesis de esta proteína (Kelly y col., 1997).

En cuanto al sistema $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, numerosos trabajos sugieren la implicación del mismo en los mecanismos relacionados con la hipertensión arterial (Pickar y col., 1994; Sweadner y col., 1994). Sin embargo existen resultados contradictorios, describiéndose tanto un aumento (Overback, 1987) como una disminución de su actividad (Engelman y Duhm, 1987).

La permeabilidad pasiva para el sodio aumenta en varios tejidos procedentes de ratas hipertensas; células de la musculatura lisa de los vasos (Jones y col., 1972), riñón (Parenti y col., 1986), eritrocitos (Yokomatsu y col., 1992) e íleon (Lubcke y Barbezat, 1988). En este último trabajo, se cuestionaba muy inicialmente el papel del intestino delgado en la fisiopatología de la hipertensión arterial. Todos estos resultados explican el hecho de que, a igual ingesta del ión sodio, la excreción urinaria de este ión se encuentre disminuída en ratas SHR con respecto a las WKY (Beierwaltes y col., 1982).

En ratas hipertensas y en pacientes con hipertensión primaria se ha demostrado la presencia de una alta concentración intracelular de Ca^{++} en una gran variedad de células (músculo liso vascular, eritrocitos, plaquetas) (Sugiyama y col., 1990; Wadsworth, 1990). Sin embargo, es en la musculatura lisa de los vasos donde se produce una mayor acumulación de Ca^{++} y como consecuencia una mayor respuesta vasoconstrictora con efectos hipertensivos.

El transporte de Ca^{++} a nivel intestinal y renal también sufre alteraciones (Hsu y col., 1986; Young y col., 1990). Estudios utilizando vesículas de membrana apical de borde en cepillo, procedentes de duodeno y riñón, demostraron que el transporte de Ca^{++} aumentaba en el duodeno pero no en el riñón de ratas SHR (Hennesen y col., 1993). Sin embargo, se observaba una hipercalciuria en ratas hipertensas (Hsu y col., 1987) sugiriendo, que la disminución del transporte transepitelial de Ca^{++} a nivel renal no es debido a defectos en la zona luminal sino a defectos en zonas más profundas de la estructura de la membrana apical (Hennesen y col., 1993).

Por otro lado, datos epidemiológicos y evidencias encontradas en animales de experimentación, indican que las deficiencias de Mg^{++} y K^+ son factores importantes en el origen de enfermedades cardiovasculares (Ng y col., 1992; Arsenian, 1993).

Varios estudios han demostrado una disminución en la concentración intracelular de Mg^{++} en células de la musculatura lisa vascular (Ng y col., 1992), cerebro y riñón (Herotte y col., 1991), y una disminución del Mg^{++} y K^+ intracelular en eritrocitos (Kawarabayashi y col., 1986) en pacientes con hipertensión esencial. Basándonos en estos datos, un incremento en el consumo de Mg^{++} y K^+ podría dar lugar a una bajada de la presión sanguínea (Kawano y col., 1998).

2.5.3. Fluidéz y composición lipídica.

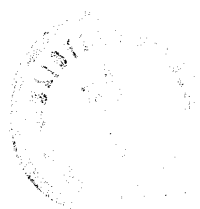
Es bien conocido que cambios en el estado físico de los lípidos de membrana pueden afectar a la relación lípido/proteína e influenciar a un gran número de proteínas de membrana, incluyendo las proteínas que median en los procesos de transporte. Hay proteínas de membrana cuyas actividades son sensibles a la fluidéz de membrana y/o a su composición lipídica, pero hay otras cuyas actividades están menos influenciadas por cambios en la composición lipídica y/o fluidéz.

Se han encontrado modificaciones tanto en los niveles de colesterol libre como en la composición de los fosfolípidos, en las plaquetas (Benjamin y col., 1990),

eritrocitos (Annapurna y col., 1990), lipoproteínas (Bagdale y col.,1995), y otros tejidos (Delachambre y col., 1998) de humanos y ratas hipertensas. De forma similar, la fluidez de membrana está alterada en eritrocitos, plaquetas, células de la musculatura lisa vascular y otros tejidos (Devynnck y col., 1982) de sujetos y ratas hipertensas. Todas estas alteraciones en las propiedades físicas de las membranas podrían explicar en parte, los defectos en el transporte iónico encontrados en la hipertensión arterial.

Por otra parte, se han descrito alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados en sujetos hipertensos, que pueden afectar a la síntesis de ácido araquidónico y, consecuentemente, a la de ciertos eicosanoides vasoactivos derivados de este ácido, los cuales están implicados en el control de la presión sanguínea (Hurtado y col., 1996).

3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se han utilizado ratas de la raza Wistar-Kyoto (WKY) como controles normotensas y ratas hipertensas de la raza Spontaneously Hypertensive Rats (SHR), procedente ambas de la empresa Harlan Ibérica S.A. (España).

Los animales se adquieren con la edad de 8 semanas, se alimentan *ad libitum* hasta la edad objeto de estudio, 12-14 semanas, con pienso comercial Panlab S.L. y agua corriente, y se mantuvieron en condiciones adecuadas de temperatura y humedad en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

3.2. PRODUCTOS QUÍMICOS.

3.2.1. Productos no radioactivos.

- Acetato de etilo, Panreac, España, Art. 141318.
- Acetato sódico dihidratado, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. S-8625.
- Ácido acético glacial, Panreac, España, Art. 141008.
- Ácido clorhídrico, Panreac, España, Art. 141019.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), *Sigma Chemical Company*, EE.UU..Art. E. 9884.
- Ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. H-3375.
- Ácido maléico, E. Merck, Alemania. Art. 800380.
- Ácido 2-tiobarbitúrico, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. T-5500.
- Ácido tricloroacético, Panreac, España, Art. 252373.
- Azida sódica, *Sigma Chemical Company*, EE.UU..Art S-2002.
- Benzamidina hidroclicada, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. B-6506.

- BIO-RAD PROTEIN ASSAY (reactivo coloreado concentrado), *Bio-Rad*, Alemania, Art. 500-0006.
- 1-butanol, Panreac, España, Art. 141082.
- Cacodilato sódico trihidratado, *Fluca Chemie A.G.*, Alemania, Art. 20840.
- Citocalasina B, *Fluca Chemie A.G.*, Alemania, Art.30380.
- Cloruro magnésico hexahidratado, E. Merck, Alemania, Art. 105833.
- Cloruro mercúrico, *Sigma Chemical Company*, EE.UU., Art. M-1136.
- Cloruro potásico, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. 4504.
- Cloruro sódico, Panreac, España, Art. 141659.
- 3,3'-Diaminobencidina (3,3', 4,4'-Tetraaminobifenilo), *Sigma Chemical Company*, EE.UU., Art. D-8001.
- 1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. D-4380.
- 2,2-Dimetilaminoetanol, *Fluca Chemie AG*, Alemania. Art. 38990.
- Dimetil sulfóxido (DMSO), *Fluca Chemie AG*, Alemania. Art. 41641.
- Dodecil sulfato sódico (SDS), Bio-Rad, Alemania, Art. 161-0301.
- D.E.R. [®]736 (resina diepoxídica), *Fluca Chemie AG*, Alemania. Art. 31191.
- DPX (solución montante para histología), *Fluca Chemie AG*, Alemania. Art. 44581.
- ERL [®]4206 (dióxido de 4-vinilciclohexeno), *Fluca Chemie AG*, Alemania. Art. 94956.
- Etanol absoluto, Panreac, España, Art. 141086.
- Florricina, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. P-8037.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. P-7626.
- Fosfato potásico monobásico (KH₂PO₄), *Mallinckrodt Chemical Works*, EE.UU. Art 7100.
- Fosfato disódico, (Na₂HPO₄), Panreac, España, Art. 141679.

- D-(-) Fructosa, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. F-0127.
- D-(-) Galactosa, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. G-0625.
- Gammaglobulina bobina, Bio-Rad, Alemania. Art. 500.0005.
- D-(+)-Glucosa, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. G-7528.
- Glucosa oxidasa (Kit para al determinación de glucosa), *Boehringer Mannheim*, Alemania. Art. 124036.
- Glutaraldehido, *Fluca Chemie, AG*, Alemania. Art. 49627.
- Hexano, Panreac, España. Art. 141347.
- Hidróxido sódico, Panreac, España, Art. 141687.
- Hidroxitolueno butilado (BHT) *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. B-1378.
- L-Lisina monoclorhidrato. *Fluca Chemie AG*. Alemania, Art. 62929.
- D-manitol, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. M-4125.
- Metanol, Panreac, España. Art. 141091.
- p-Nitrofosfato disódico, *Aldrich Chemie*, Alemania, Art, N-2,200-2.
- p-Nitrofenol, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art104-8.
- Ouabaína octahidratada, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art O-3125.
- Paraformaldehido, *Fluca Chemie AG*. Alemania, Art. 76240.
- Peróxido de hidrógeno, Panreac, España, Art. 141077.
- 2-Propanol (Isopropanol), Panreac, España, Art. 211090.
- Resina LRWhite
- Sacarosa, Probus, España, Art. 176820.
- Saponina, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. S-2149.
- Succinato sódica hexahidratado, E. Merck, Alemania, Art. 820151.
- Sulfato magnésico heptahidratado, E. Merck, Alemania, Art. 136855.
- Solución tampón alcalina 221, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art S-221.
- 1,1,3,3,-tetrametoxipropano, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art T-1642.
- Tiocianato potásico, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. P-3011.
- Tiocianato sódico, *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art S-7757.

- Tris-hidroximetil-aminometano (TRIZMA[®], Tris) *Sigma Chemical Company*, EE.UU.. Art. T-1378.
- Tritón X-100, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. X-100.
- Violeta de p-yodonitrotetrazolio (INT), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. I-8377.
- Xileno (Xilol), Panreac, España, Art.131769.

3.2.2. Productos radioactivos.

- D-(D-¹⁴C) fructosa, *Amersham Pharmacia Biotech*, Reino Unido, Art. CFB. 47.
- D-(1-³H) galactosa, *Amersham Pharmacia Biotech*, Reino Unido, Art. TRK. 233.
- D-(U-¹⁴C) glucosa, *Amersham Pharmacia Biotech*, Reino Unido, Art. CFB. 96.

3.3. CONTROL DE PESO Y DE LA PRESIÓN ARTERIAL.

El control de peso y de la presión arterial se realiza semanalmente, desde las 8 a las 12-14 semanas, edad en que se sacrifican los animales. La medida de la presión arterial se realiza por un método indirecto de oclusión en la cola, utilizando un electroesfigmomanómetro y un registrador digital (LETICA, España; modelo LE 5000, con cilindro de presión automático LE 5100) (figura 3.1.).

Los animales se inmovilizan en el interior de cepos cilíndricos y se colocan dentro de una estufa, a una temperatura de 37 °C, durante 10-15 minutos; de este modo se consigue la vasodilatación necesaria para la medida. Pasado este tiempo se sacan de la estufa y se les introduce en la cola el manguito de presión y el transductor de pulsos cardiacos. Se aumenta la presión del manguito hasta que el colapso de la arteria anula la señal de pulsos recibida por el transductor, quedando visualizada la presión sistólica en milímetros de mercurio. Inmediatamente se realiza la despresurización, y el indicador se bloquea de nuevo cuando la amplitud de las pulsaciones cardiacas recobra el 80 % de su valor inicial, mostrando el valor de la presión diastólica.

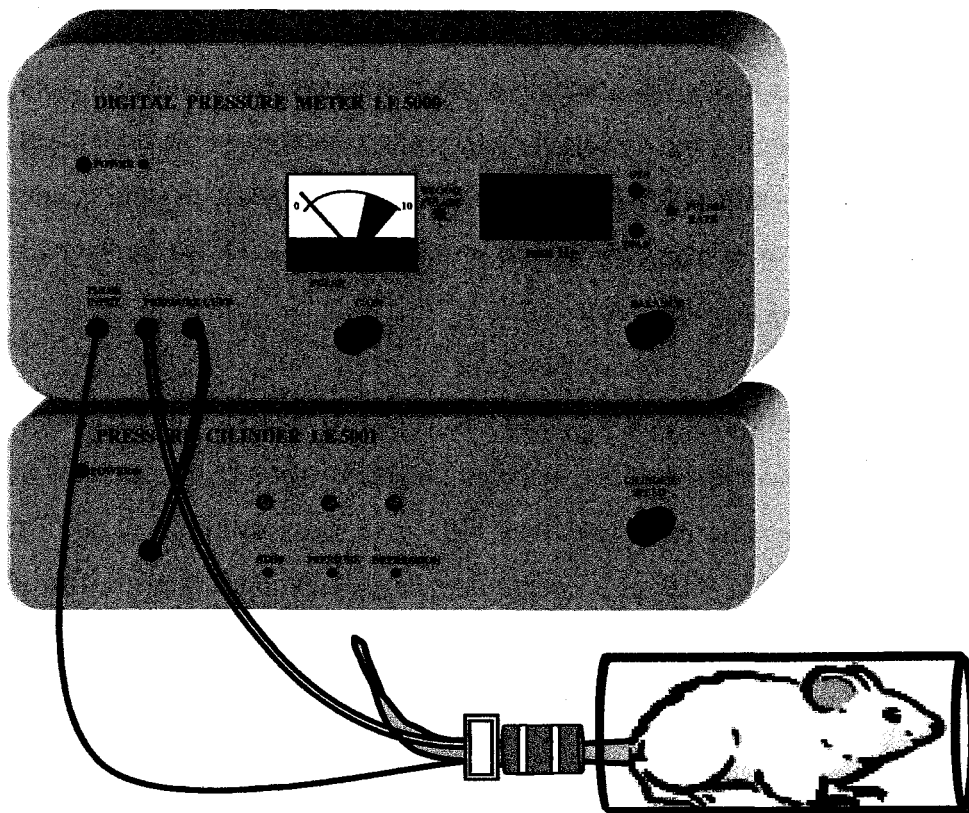


Figura 3.1. Esquema del método utilizado para medir la presión sanguínea en ratas WKY y SHR. La figura representa el método indirecto de la oclusión en la cola, utilizando el registrador digital LE 5000. Tomado de A. Mate, Tesis Doctoral (2000).

Los valores de presión arterial sistólica y diastólica de cada rata se calculan a partir de la media aritmética de 3-4 mediciones sucesivas, evitando en la medida de lo posible crear situaciones de estrés en el animal durante el proceso.

3.4. MATANZA DE ANIMALES.

A la edad de 12-14 semanas, los animales se sacrifican tras un periodo de ayuno de 18-24 horas. Se anestesian por inhalación con eter-etílico, se abre su abdomen hasta la altura del diafragma, y se extraen los segmentos del intestino delgado, yeyuno e íleon, considerando el yeyuno aproximadamente 40 cm proximales desde el asa de Treitz, e íleon 40 cm proximales al esfínter ileo-cecal.

Los segmentos se introducen por separado en vasos de precipitado que contienen suero fisiológico a una temperatura de 4 °C, se lavan por fuera y por dentro, para evitar que en la mucosa encontremos restos de comida o bilis, y se secan sobre papel de filtro para retirar el exceso de líquido. Tras esta operación y con ayuda de una pinza fina se limpian los segmentos de la grasa adherida, se abren longitudinalmente y se raspa la mucosa.

La mucosa obtenida se envuelve en papel de aluminio, debidamente rotulada con el nombre del segmento y la fecha de obtención, se introduce en nitrógeno líquido y se guarda a una temperatura de -80 °C hasta el momento de su utilización.

3.5. AISLAMIENTO DE VESÍCULAS DE LA MEMBRANA APICAL (VMA) DEL ENTEROCITO DE YEYUNO E ÍLEON DE RATA.

El presente estudio se ha llevado a cabo en vesículas constituidas por membranas apicales de yeyuno e íleon. Estas vesículas se han preparado según el método de Vázquez y col., (1997a), usando un protocolo de precipitación con el catión divalente Mg^{++} , con algunas modificaciones.

3.5.1 Composición de los medios.

Tampón I

Manitol	100 mmol/L.
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,1).....	2 mmol/L.
NaN ₃	3,1 μM.

Tampón II

Manitol	100 mmol/L.
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4).....	2 mmol/L.
MgSO ₄	0,1 mmol/L.
NaN ₃	3,1 μM.

Tampón III.

Manitol	300 mmol/L.
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7.4).....	20 mmol/L.
MgSO ₄	0,1 mmol/L.
NaN ₃	3,1 μM.

3.5.2. Procedimiento.

El esquema a seguir se indica en la figura 3.2. En el momento de comenzar la preparación de las vesículas, se cogen las muestras de yeyuno o íleon que están a -80 °C y se pesan. Se colocan por separado, según sea yeyuno o íleon, rata normotensa o hipertensa, en vasos de precipitado con 25-30 mL de tampón I, a este tampón I se le añaden inhibidores de proteasas tales como:

PMSF0,2 mmol/L.

Benzamidina10 mg

A continuación se deja la mucosa en contacto con el tampón I y una vez descongelada, se procede a separar la mucosa de las capas musculares mediante homogeneización a alta velocidad con *Waring Blender* durante 30 segundos a 4 °C. El homogeneizado, al que denominaremos H, se filtra a través de una media para eliminar los restos de tejido, se le mide el volumen total, y se toman 4 alícuotas de 100 µL cada una que se colocan en tubos *Eppendorf* y se guardan a -20 °C, para una posterior determinación de la concentración de proteínas y de las actividades de distintos marcadores enzimáticos.

Al homogeneizado resultante se le añade Cl_2Mg , gota a gota, hasta obtener una concentración final de 10 mmol/L, y se agita suavemente, mediante agitadores magnéticos modelo SBS A-05, durante 20 minutos a 4 °C. El Cl_2Mg precipita las membranas basolaterales y las de otros orgánulos citoplasmáticos, separándolas de este modo de las membranas apicales y a continuación, se inician las centrifugaciones para la obtención de las vesículas de membrana apical, utilizándose una centrífuga modelo Beckman J2-21.

Se centrifuga el homogeneizado a 3000 g durante 30 minutos, obteniéndose un sobrenadante S_1 y un precipitado P_1 , que se desecha. Inmediatamente después el sobrenadante S_1 se vuelve a centrifugar a 30000 g durante 35 minutos. El sobrenadante S_2 se desecha y nos quedamos con el precipitado P_2 . El precipitado P_2 lo resuspendemos en 5-10 mL de tampón II con ayuda de una pipeta *Pasteur* de plástico, el volumen resultante lo homogeneizamos con un homogeneizador teflón/cristal 10 veces, llevándolo a un volumen final de 25-30 mL con tampón II. Esta mezcla se centrifuga a 30000 g durante 35 minutos, el sobrenadante obtenido S_3 se desecha y el precipitado P_3 forman las membranas apicales de los enterocitos de yeyuno e íleon de rata.

El precipitado P₃ se resuspende en tampón III con ayuda de una aguja de 25 g, con un volumen tal que la concentración de proteínas sea de 25-30 mg/mL. Tras esta operación, la suspensión obtenida se hace pasar por una aguja de 29 g 10 veces consecutivas. El volumen de suspensión de VMA se divide en alícuotas de 50 µL, que se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido, donde se guardan hasta el momento de su utilización. De la cantidad final de VMA se toman unos 25-30 µL que se conservan a -20 °C para determinar su concentración de proteínas, así como la actividad y recuperación de los distintos marcadores enzimáticos. Todo el material que se utiliza, así como los procesos para la obtención de las vesículas deben realizarse a una temperatura de -4 °C.

3.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

3.6.1. Fundamento.

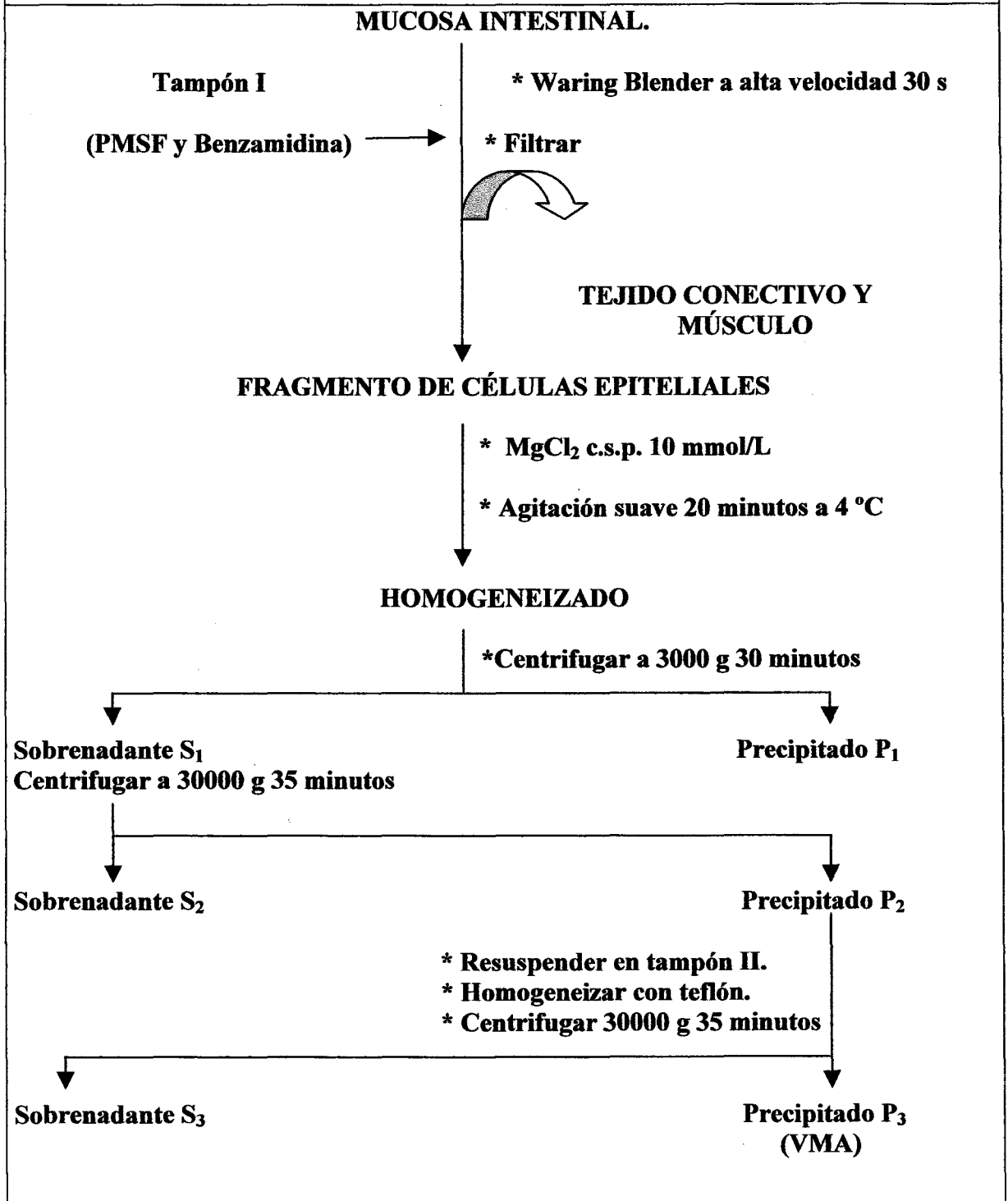
La concentración de proteínas se ha determinado siguiendo el método descrito por Bradford, (1976), utilizando los reactivos BIO-RAD®. El *Coomassie Brilliant Blue G-250* se combina con las proteínas dando lugar a un complejo azul con elevado coeficiente de extinción que le confiere una elevada sensibilidad para valorar la concentración de proteínas. La formación del complejo proteína-colorante es un proceso muy rápido, se forma en menos de dos minutos y además queda disuelto en la solución durante una hora aproximadamente sin ninguna precipitación.

Este método tiene la ventaja de ser muy sensible frente al método de Lowry y col., (1951), es muy rápido, muy específico, preciso y reproducible, realizando los experimentos por triplicado, la desviación estandar es de 1,2% de la media.

3.6.2. Protocolo experimental.

3.6.2.1. Preparación de las soluciones.

Figura 3.2.: Esquema de la técnica de aislamiento de vesículas de la membrana apical (VMA) de yeyuno e íleon de rata.



Preparación del reactivo *Coomassie Brilliant Blue (CBB)*: se diluye un volumen de reactivo BIO-RAD® en cuatro volúmenes de agua destilada. Se filtra a través de papel Whatman n° 1 y se deja en reposo a temperatura ambiente.

3.7.2.2. Preparación de la curva patrón.

A partir de una solución de 1,4 mg/mL de γ -globulina, se preparan cinco soluciones estándares, de 100 μ L cada una cuya concentración protéica sería: 0,0 (tomándose ésta como blanco), 0,014 mg/mL, 0,028 mg/mL, 0,056 mg/mL y 0,112 mg/mL. Todas las concentraciones de la curva patrón se hacen por duplicado.

3.6.2.3. Preparación de las muestras.

- Homogeneizado: se toman directamente 10 μ L de homogeneizado y se llevan a 100 μ L con agua destilada.
- VMA: se realiza una dilución 1/2, tomando 12 μ L de vesículas y 12 μ L de agua destilada, de esta suspensión se toman 5 μ L y se llevan a 100 μ L con agua destilada. Tanto las muestras de homogeneizado como las de VMA se realizan por triplicado.

3.6.3. Realización del ensayo.

La técnica consiste en mezclar 100 μ L de la solución problema o estandar con 5 mL de reactivo BIO-RAD®. Se agita y se deja en reposo durante 15 minutos, con un límite de 50 minutos, y posteriormente se procede a la lectura de las absorbancias a 595 nm en un espectrofotómetro de doble haz Hitachi modelo V-2001. Conociendo la absorbancia de la muestra, se pueden conocer sus concentración a partir de una curva patrón.

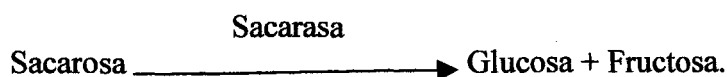
3.7. VALORACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

3.7.1. Valoración de la actividad sacarasa.

3.7.1.1. Fundamento.

Para la determinación de la actividad sacarasa (marcadores de las VMA), se utiliza el método descrito por Dahlquist (1964). La determinación de glucosa se analiza por el método de GOD-PERID[®] (Boehringer).

El fundamento de esta técnica se resume en el siguiente esquema:



3.7.1.2. Protocolo experimental.

3.7.1.2.1. Preparación de la solución sustrato.

Realizamos primero un tampón maleato 0,1 mol/L el cual contiene:

Ácido Maléico.....1,16 g.
NaOH (2 N).....c.s.p. pH = 6.
Agua bidestilada.....c.s.p. 100 mL.

Pesamos 96 g de sacarosa y se disuelven en 5 mL de tampón maleato.

3.7.1.2.2. Preparación del reactivo para determinar glucosa.

Se disuelven 1,4 mg del reactivo 2 del Kit de Glucosa en 100 mL de agua bidestilada.

3.7.1.2.3. Preparación de las muestras.

Diluimos las muestras con la suficiente cantidad de agua bidestilada tal que la concentración de proteínas sea la siguiente:

- Homogeneizado: 2 mg/mL.
- VMA: 3 mg/mL

3.7.1.3. Realización del ensayo.

Se añaden 50 μ L de muestra a tubos de ensayo de cristal de 10 mL, junto con 50 μ L de la solución sustrato. Al mismo tiempo preparamos para cada muestra un tubo control, en el cual ponemos sólo 50 μ L de solución tampón sustrato. Todos los tubos los incubamos a 37 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, en los tubos control añadimos 50 μ L de muestra y todos los tubos los ponemos en agua hirviendo durante 2 minutos para detener la reacción. Al cabo de este tiempo se sacan y se dejan enfriar a temperatura ambiente.

Una vez que baja su temperatura añadimos a cada tubo 5 mL de reactivo para la determinación de glucosa, y los dejamos a temperatura ambiente durante 25 minutos para el desarrollo del color. Al mismo tiempo preparamos otros 2 tubos, uno para el blanco, que lleva 100 μ L de agua bidestilada y 5 mL de reactivo, y otro tubo que lleva 100 μ L de solución estándar, con una concentración de 9,1 mg de glucosa/dL, y 5 mL de reactivo. Todas las muestras se hacen por triplicado.

Finalmente leemos la absorbancia a una longitud de onda $\lambda = 436$ nm.

La actividad específica se obtendrá a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{nmol glucosa / min / mg proteínas} = \frac{\text{D.O. muestra} - \text{D.O. control}}{(0,0505/30/\text{mg}) \text{ D.O. estandar}}$$

Donde:

D.O. = densidad óptica.

mg = cantidad de mg de proteínas existentes en la reacción.

3.7.2. Valoración de la actividad fosfatasa alcalina.

3.7.2.1. Fundamento.

Para la determinación de la actividad fosfatasa alcalina se utiliza el método descrito por Breaudiere y col. (1977). El método se basa en que las fosfatasas alcalinas a pH = 9,4, catalizan la hidrólisis del substrato p-nitrofenilfosfato disódico en p-nitrofenol, que a elevado pH se transforma en una quinona, complejo estable de color amarillo, el cual determinaremos espectrofotométricamente a 400 nm.

3.7.2.2. Protocolo experimental.

3.8.2.2.1. Preparación del tampón substrato.

Disolvemos 100 mg de p-nitrofenilfosfato disódico (pNPP) en 25 mL de la solución tampón alcalina, y añadimos 25 mL de agua bidestilada. Esta solución es estable al menos 6 semanas si se mantiene a -20 °C, y se guarda en frasco topacio resguardada de la luz.

3.7.2.2.2. Preparación de la curva estandar.

Preparamos una solución de p-nitrofenol (pNP) 5 mM en NaOH 0,05 N, resguardándola de la luz, esta solución se puede mantener a 4 °C al menos durante 1 mes.

3.7.2.2.3. Preparación de las muestras.

Se diluyen las muestras con suficiente cantidad de agua bidestilada para obtener las siguientes concentraciones de proteínas:

- Homogeneizado: 1-1,5 mg/mL de proteínas.
- (VMA): 0,2-0,3 mg/mL de proteínas.

3.7.2.3. Realización del ensayo.

Añadimos 20 μ L de cada muestra a tubos de ensayo, los llevamos a preincubar durante 10 minutos a 37 °C, igualmente se preincuba la solución tampón substrato. Posteriormente añadimos 1 mL de la solución tampón substrato a cada tubo, con un intervalo de tiempo de 10-15 segundos, los agitamos y se dejan incubar durante 15 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo paramos la reacción añadiendo a cada tubo 1 mL de NaOH 0,05 N en el mismo orden seguido anteriormente. Mediante la adición del NaOH, se bloquea la actividad de la fosfatasa alcalina por desnaturalización, y se obtiene un pH adecuado para que se transforme el p-nitrofenol en una quinona de color amarillo. Una vez parada la reacción se toman de cada tubo 100 μ L y se vierten en cubetas de 1 cm de paso de luz que contienen 1 mL de NaOH 0,05 N.

Todas las muestras, incluyendo muestras problemas y estándares, se hacen por triplicado, desarrollándose éstas junto a las muestras a partir del paso en el que finaliza la reacción. Se realiza un blanco de cada muestra, por duplicado, que consiste en añadir 20 μ L de muestra a 1 mL de solución tampón substrato una vez finalizada la reacción. El valor de absorbancia de este blanco se descuenta de sus correspondientes muestras.

Para el cálculo de las concentraciones se sigue la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol/mL} = (a-b) \times F \times 510, \text{ donde}$$

a = μ moles de la muestra.

b = μ moles del blanco de la muestra.

F = factor de dilución.

3.7.3. Valoración de la actividad fosfatasa ácida.

3.7.3.1. Fundamento.

Para la valoración de la actividad de la fosfatasa ácida (marcador lisosomal), se siguió el método descrito por Absolom, (1986). Consiste en la determinación del p-nitrofenol (pNP) que se forma como consecuencia de la actuación de la enzima sobre el substrato, p-nitrofenil fosfato disódico (pNPP).

3.7.3.2. Protocolo experimental.

3.7.3.2.1. Preparación de la solución tampón substrato.

Preparamos una solución 4,5 mM de pNPP en tampón acetato sódico/ácido acético, (AcONa/AcOH) 0,1 mol/L, pH = 4,5, solamente se prepara la cantidad necesaria para el ensayo.

3.7.3.2.2. Preparación de las muestras.

Diluimos las muestras con la suficiente cantidad de agua bidestilada tal que la concentración de proteínas sea la siguiente:

- Homogeneizado: 1-1,5 mg/mL de proteínas.

- (VMA): 0-0,4 mg/mL de proteínas.

3.7.3.3. Realización del ensayo.

Para realizar el ensayo tomamos tubos de cristal a los cuales le añadimos 100 μ L de muestra, los llevamos a incubar a 37 $^{\circ}$ C durante 5 minutos, junto con la solución tampón substrato. Pasado este tiempo añadimos a cada tubo 1 mL de solución tampón substrato con un intervalo de 10-15 segundos entre tubo y tubo, se agitan y se dejan incubar 10 minutos a 37 $^{\circ}$ C. Finalizamos la reacción añadiendo 1 mL de NaOH 2 N a cada tubo.

Para determinar la actividad de la fosfatasa ácida leemos el color desarrollado a 405 nm frente a un blanco, consistente en añadir a un tubo de ensayo 100 μ L de agua bidestilada, 1 mL de solución tampón substrato y 1 mL de NaOH 2 N.

Todas las muestras se hacen por triplicado y para el cálculo de las concentraciones se aplica la siguiente ecuación:

$$\mu\text{moles de pNP / min / mg de proteínas} = \text{D.O.} \times E^{-1} \times 10 \text{ min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} .$$

Siendo:

D.O. = densidad óptica de la muestra.

E = 18,5 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$.

mg = mg de proteínas en el tubo de reacción.

3.7.4. Valoración de la actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa.

3.7.4.1. Fundamento.

Las ATPasas son enzimas que catalizan la transformación del ATP en ADP y PO_4^{-3} . La actividad fosfatasa de estas enzimas es dependiente del ión K^+ , siendo la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa la única ATPasa que es inhibida por la ouabaína a una concentración de 1 mmol/L (Stirling, 1972). Para su valoración, se determina la actividad de las ATPasas en presencia y ausencia de ouabaína y por sustracción se obtiene la actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa. Para la determinación de las actividades ATPasas se ha utilizado el método descrito por Colas. y Maroux (1980). Consiste en medir el p-nitrofenol liberado como consecuencia de la actuación de la enzima p-nitrofenil fosfatasa (pNPPasa), sobre el substrato p-nitrofenil fosfato disódico (pNPP).

3.7.4.2. Protocolo experimental.

3.7.4.2.1. Preparación de los medios.

- Solución C.

Tris/HCl (pH = 7,5).....100 mM.

MgSO₄.....20 mM

EDTA.....10 mM.

KCl.....180 mM.

c.s.p. 100 mL.

- Solución de pNPP, (guardar en frasco topacio, es fotosensible).

pNPP0,1 mol/L

c.s.p. 5 mL.

- Solución de parada.

NaOH1 N

c.s.p. 500 mL.

A partir de las soluciones anteriores se preparan las siguientes:

- Solución A:

Solución C..... 5 mL.
pNPP (0,1 mol/L)..... 500 µL.
Saponina..... 17 mg.
H₂O (bidestilada)..... 4,45 mL.

- Solución B:

Solución A..... 5 mL.
Ouabaína 1,7 mg/mL.
La ouabaína se disuelve en 100 µL de DMSO.

3.7.4.2.2. Realización de la curva estándar.

Preparamos una curva estándar disolviendo p-nitrofenol (pNP) 1 mM en NaOH 1 N.

3.7.4.2.3. Preparación de las muestras.

Diluimos las muestras con suficiente cantidad de agua bidestilada tal que la concentración de proteínas sea la siguiente:

- Homogeneizado: 3 mg/mL.
- VMA: 2 mg/mL.

3.7.4.3. Realización del ensayo.

Añadimos a cada tubo 50 μL de muestra, previamente diluida de modo que los tubos con muestras de homogeneizado contengan 150 μg de proteínas y los de VMA contengan 20 μg de proteínas, y los llevamos a incubar durante 2 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, añadimos 500 μL de la solución A (sin ouabaína) o B (con ouabaína) y los dejamos incubar a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente paramos la reacción con 500 μL de la solución de parada.

Para la determinación de pNP liberados leemos las absorbancias obtenidas a 410 nm frente a un blanco compuesto por agua bidestilada. Las muestra se hacen todas por triplicado y además se realiza un blanco de cada una de las dos soluciones, que consiste en añadir 50 μL de agua bidestilada junto con 500 μL de solución A o solución B, y se procede igual que con las muestras.

3.7.5. Valoración de la actividad succinato deshidrogenasa.

3.7.5.1. Fundamento.

Para la determinación de la enzima succinato deshidrogenasa seguimos el método descrito por Pennington (1961), que consiste en la determinación del fumarato (producto final del ciclo de ácido cítrico) que se forma como consecuencia de la actuación de la enzima succinato deshidrogenasa (marcador mitocondrial), sobre el substrato succinato. Todo el ensayo se realiza a pH fisiológico en tubos de cristal con tapón.

3.7.5.2. Protocolo experimental.

3.7.5.2.1. Solución mezcla del ensayo.

Succinato sódico.....100 mM.
Sacarosa.....50 mM.
Tampón ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$)c.s.p. pH = 7,4.

Esta solución se diluye 1:1 con agua bidestilada y se le añade 0,1% de iodo-nitro tetrazolium (INT), que requiere agitación y calor para su disolución, esta mezcla adquiere un color amarillo.

- Solución de parada.

Ácido tricloro acético (TCA) 10 % (p/v).

- Reactivo para la separación de fases.

Acetato de etilo.

3.7.5.2.2. Preparación de las muestras.

Diluimos las muestras de homogeneizado y VMA con una cantidad de agua adecuada para que la concentración de proteínas en cada tubo esté entre 0,2-0,3 mg/mL.

3.7.5.2.3. Realización del ensayo.

A los tubos con las muestras añadimos 750 μ L de solución mezcla de ensayo, los incubamos a 37 °C hasta que aparezca un color rosado, anotándose en ese momento el tiempo. Pasado ese tiempo paramos la reacción con 750 μ L de TCA al 10% y seguidamente añadimos a cada tubo 3 mL de acetato de etilo para separar las dos fases formadas una vez ha finalizado la reacción.

A continuación los tubos se centrifugan a 3000 g durante 10 minutos, y con una pipeta Pasteur de cristal tomamos toda la fase superior donde se encuentra el fumarato y la introducimos en cubetas de 1 cm de paso de luz. Leemos la absorbancia de las muestras a 490 nm frente a un blanco, que consiste en añadir la muestra a la mezcla del ensayo, las demás etapas se realizan de igual manera.

Para el cálculo del fumarato producido seguiremos la siguiente ecuación:

$$\frac{[A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}] \times (3)}{\epsilon \times \text{mg de proteínas en el tubo} \times t}$$

Donde:

A_{muestra} : absorbancia de la muestra.

A_{blanco} : absorbancia del blanco.

ϵ : $20,1 \times 10^{-3}$ (si el resultado está expresado en $\text{mmol} \times \text{min}^{-1}/\text{mg}$ de proteínas).

t : tiempo de incubación en minutos.

3.8. TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS EN VMA DE YEYUNO E ÍLEON DE RATA.

Para el transporte de monosacáridos las VMA se incuban en el medio de composición deseada que contiene el monosacárido en estudio. La incubación se realiza a 37 °C, para lo que las vesículas se atemperan previamente durante 2-5 minutos. El periodo de incubación se inicia adicionando 100 μL de medio de incubación a la suspensión de vesículas de membrana, cuya cantidad de proteínas varía en función del substrato en estudio.

Transcurrido el periodo de incubación deseado, se añade 1 mL de solución de parada (4 °C), que detiene el transporte del substrato debido a su temperatura, composición iónica, dilución del medio de incubación y presencia del inhibidor adecuado.

La separación de las VMA del medio de incubación se realiza por filtración siguiendo la técnica de Hopfer y col. (1973). La filtración se facilita por succión

mediante una bomba de vacío (Millipore, mod. XX55 22050 Bedford, MA, EE.UU.). Ésta permite una rápida separación y por tanto el empleo de tiempos de incubación del orden de segundos. Se toman 900 μL de cada muestra y se filtran rápidamente, a través de un filtro (filtros *MF-Millipore*) de nitrocelulosa de 0,22 μm de diámetro de poro, (Millipore GSWP 304F0, Bedford, MA, EE.UU.). Estos filtros son circulares, con un diámetro de 25 mm, acorde con el portafiltros empleado en el sistema de filtración (portafiltros de polipropileno *Swinnex*, Millipore SX00 02500, Bedford, MA, EE.UU.) (figura 3.3.). Previamente estos filtros se han colocado en un recipiente con solución de parada para que se humedezcan, éstos retienen las VMA. Inmediatamente, los filtros se lavan con 5 mL de solución de parada a 4 °C, con el fin de eliminar la radioactividad retenida por el filtro y que no corresponde a la contenida dentro de las VMA.

Los filtros se llevan a viales de centelleo que contienen 4 mL de un cóctel de centelleo líquido (*Ready Protein*⁺® Beckman P/N 586604, EE.UU.). Este contiene una sustancia luminiscente o luminóforo, la cual absorbe la energía emitida por el sustrato radioactivo, reemitiendo parte de ella en forma de luz visible o ultravioleta (fenómeno de fluorescencia inmediata). Una vez concluido el experimento, los viales se llevan a un contador de centelleo (Beckman mod. LS 6500, EE.UU.). Este aparato contiene un fotocátodo y un fotomultiplicador, el primero transforma la luz emitida por el luminóforo en impulsos eléctricos, mientras que el fotomultiplicador amplifica la señal eléctrica generada en el fotocátodo, permitiendo cuantificar de este modo la cantidad de radioactividad incorporada en las vesículas. La unión no específica del radioisótopo al filtro se evalúa adicionando solución de parada a la suspensión de vesículas antes de añadir el medio de incubación, y el valor de radioactividad que se mide se sustrae del total de la radioactividad determinada en cada muestra.

Todas las medidas se realizan por triplicado. Para determinar la actividad específica del radioisótopo en el medio de incubación (Estándares) se colocan 100 μL de la mezcla final (medio de incubación, VMA y solución de parada) en viales con líquido de centelleo.

El contenido de soluto de las vesículas se calcula como se indica a continuación:

$$\text{pmoles / mg prot} = \frac{\text{cpm}_c - \text{cpm}_b}{\text{cpm}_{st}} \times \frac{V_{mi} \times [S] \times V_{st}}{\text{mg} \times V_f} \times 10^3$$

Donde cpm son cuentas por minuto (c, del problema; b, del blanco; st, del estándar); V_{mi} , es el volumen del medio de incubación en mL; [S], es la concentración del substrato en mM; V_{st} , es el volumen del estándar en mL; mg, son los mg de proteínas que hay en el tubo de reacción, y V_f , es el volumen filtrado en mL (figura 3.3.).

3.8.1. Transporte de D-glucosa y D-galactosa a diferentes tiempos de incubación.

3.8.1.1. Composición de los medios.

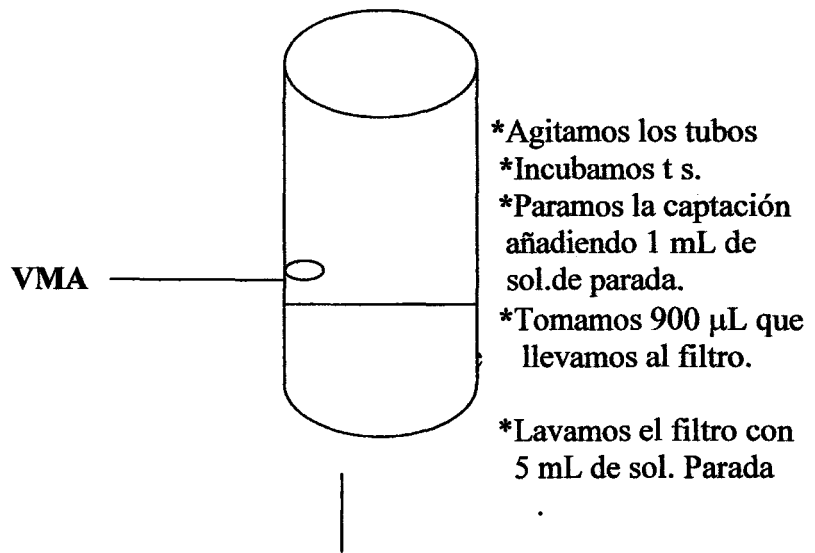
- Medios de incubación.

NaSCN/KSCN	100 mM.
Manitol.....	100 mM.
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,1 mM.
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7.4)	20 mM.
NaN ₃	3,1 μM
D-glucosa o D-galactosa.....	0,1 mM.

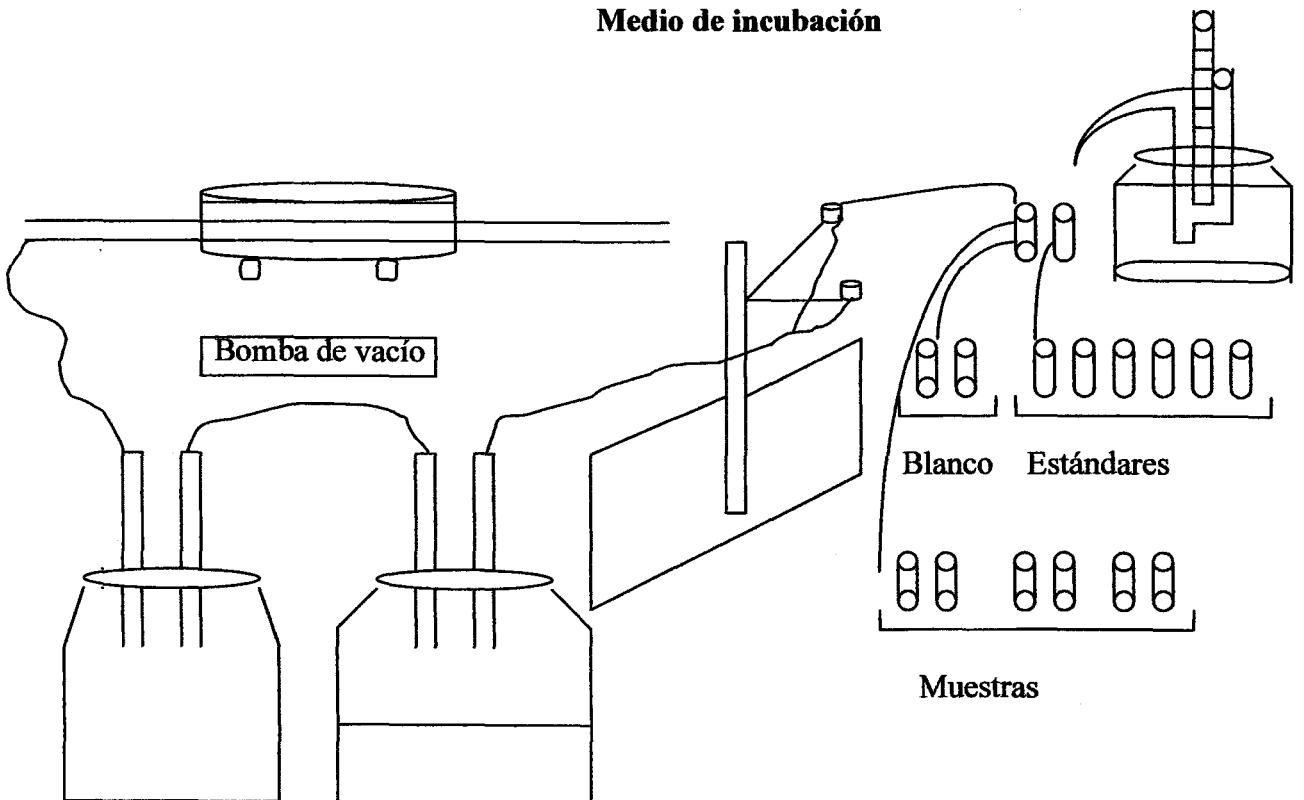
- Solución de parada.

KSCN.....	150 mM.
HEPES/Tris (c.s.p.pH = 7,4)	20 mM.
NaN ₃	3,1 μM

Figura 3.3. : Representación esquemática del procedimiento de filtración.



Medio de incubación



3.8.1.2. Realización del ensayo.

Se colocan los μL equivalentes a 75-200 μg de proteínas para los dos sustratos. Los tiempos de incubación empleados para el transporte de D-glucosa son: 5 s, 15 s, 30 s, 60 s y 30 min; y para D-galactosa son: 5 s, 15 s, 60 s, y 30 min. Las muestras para cada tiempo de incubación se hacen por triplicado, con su correspondiente blanco y dos estándares. Los medios de incubación se preparan de manera extemporánea añadiéndoles la D-glucosa o D-galactosa radiactiva y junto con las muestras los atemperamos a 37 °C durante 2-5 minutos antes de iniciar el experimento.

La concentración de ^{14}C -D-glucosa y ^{14}C -galactosa es de 4,72 μM y 0,374 μM respectivamente en cada medio de incubación. El transporte de D-glucosa o D-galactosa se lleva a cabo mediante el método de filtración rápida descrito en el apartado 3.8.

3.8.1.3. *Cis*- Inhibición del transporte de D-glucosa por florricina.

El transporte mediado a diferencia de la difusión simple, es saturable. Ésto implica que la entrada de D-glucosa al interior de las vesículas puede verse disminuida en presencia de concentraciones importantes de otro sustrato que tenga afinidad por el mismo sistema de transporte, mediante un proceso de inhibición competitiva.

La florricina es un conocido inhibidor competitivo del transporte de D-glucosa a través de los transportadores tipo SGLT. Mediante este experimento, hemos determinado el transporte de D-glucosa a diferentes concentraciones de florricina, lo cual nos ha permitido calcular la IC_{50} (concentración de florricina que reduce a la mitad la captación de D-glucosa en ausencia de inhibidor).

3.8.1.3.1. Composición de los medios.

- Medios de incubación.

NaSCN/KSCN.....	100 mM
Manitol	100 mM
HEPES/Tris (pH = 7,4)	20 mM
MgSO ₄ ·7 H ₂ O.....	0,1 mM
NaN ₃	3,1 μM
D-glucosa.....	0,1 mM
Florricina	0-100 μM

Las concentraciones de florricina empleadas han sido: 1, 5, 25, 50 y 100 μM.

3.8.1.3.2. Realización del ensayo.

El protocolo seguido es análogo al que se describe en el apartado 3.8.1.2., salvo que el tiempo de incubación es siempre el mismo (5 segundos). La solución de parada es la misma que utilizamos en el transporte de D-glucosa.

3.8.1.4. *Cis*-Inhibición del transporte de D-glucosa por otros monosacáridos.

La finalidad de este experimento es observar la especificidad de sustrato del sistema de transporte de D-glucosa presente en la membrana apical de enterocitos de yeyuno e íleon (cotransportador SGLT1). Para ello hemos estudiado el transporte de este monosacárido en presencia de altas concentraciones de otro monosacárido, el epímero D-galactosa. Este monosacárido se transporta por el cotransportador SGLT1, pero con una menor afinidad que la D-glucosa. Además hemos determinado la autoinhibición del transporte de D-glucosa, con el objeto de comprobar si los resultados son comparables a los obtenidos con la D-galactosa, así como también incluimos una condición con florricina.

3.8.1.4.1. Composición de los medios.

- Medios de incubación.

NaSCN/KSCN	150-100 mM
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4).....	20 mM
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,1 mM
NaN ₃	3,1 μM
D-glucosa	0,1 mM
Inhibidor.....	0-100 mM

Los inhibidores utilizados y sus concentraciones han sido D-glucosa y D-galactosa (10 y 100 mM) y florricina 0,25 mM.

3.8.1.4.2. Realización del ensayo.

El protocolo seguido es análogo al que se describe en el apartado 3.8.1.2., salvo que el tiempo de incubación es siempre el mismo (5 segundos). La solución de parada es la misma que se emplea en el transporte de D-glucosa y la concentración de ¹⁴C-D-glucosa es de 9,37 μM.

3.8.2. Transporte de D-fructosa a diferentes tiempos de incubación

3.8.2.1. Composición de los medios.

- Medios de incubación.

KSCN/Manitol	150/300 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,1 mM
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4).....	20 mM
NaN ₃	3,1 μM
D-fructosa.....	1 mM.

- Solución de parada.

KSCN/Manitol 150/300 mM.
HEPES/ Tris (c.s.p. pH = 7,4) 20 mM.
NaN₃ 3,1 μM

3.8.2.2. Realización del ensayo.

En cada tubo se coloca un volumen de vesículas correspondiente a 150-200 μg de proteínas. Los tiempos de incubación empleados para el transporte de fructosa son: 15 s, 30 s, 60 s, 10 min y 30 min. Las muestras para cada tiempo de incubación se hacen por triplicado, con su correspondiente blanco y dos estándares. El medio de incubación se prepara de forma extemporánea, añadiéndole la D-fructosa radiactiva y junto con las muestras lo atemperamos a 37 °C durante 1-5 minutos antes de iniciar el experimento. La concentración de ¹⁴C-fructosa es de 5,61 μM en el medio de incubación. El transporte de fructosa se lleva a cabo mediante el método de filtración rápida descrito en el apartado 3.8.

3.8.2.3. *Cis*-Inhibición del transporte de D-fructosa.

Este experimento se realiza para determinar la especificidad de sustrato del transportador GLUT5. Para ello, se ha estudiado el transporte de D-fructosa en presencia de altas concentraciones de D-glucosa, D-galactosa y florricina. También se ha determinado el efecto de la citocalasina B sobre el transporte de fructosa. La citocalasina B es un inhibidor de la difusión facilitada de glucosa, pero no parece afectar al transporte de D-fructosa mediado por GLUT5 (Axelrod y Pilch, 1983; Carruters, 1990; Rand y col., 1993). Por último, también se ha medido la autoinhibición del transporte de D-fructosa, lo que permite obtener un valor de referencia con respecto a los otros posibles inhibidores.

3.8.2.3.1. Composición de los medios.

- Medios de incubación.

KSCN	150-0 mM
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4).....	20 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 mM
NaN ₃	3,1 μM
D-fructosa.....	1 mM
Inhibidor	0-300 mM.

Los inhibidores utilizados y sus concentraciones han sido D-glucosa y D-galactosa (10 y 100 mM), citocalasina B (0,05 mM), florricina (0,25 mM), y D-fructosa (autoinhibición, 100 y 300 mM).

- Solución de parada.

KSCN	150 mM.
HEPES/ Tris (c.s.p. pH = 7,4).....	20 mM.
NaN ₃	3,1 μM

3.8.2.3.2. Realización del ensayo.

El protocolo a seguir es análogo al descrito en el apartado 3.8. salvo que el tiempo de incubación es de 15 segundos para cada muestra. La concentración de ¹⁴C-D-fructosa es 5,61 μM en el medio de incubación.

3.8.3. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa.

3.8.3.1. Fundamento.

La finalidad de estos experimentos es determinar si las vesículas encierran un compartimento osmóticamente reactivo, es decir cerrado, y además valorar la cantidad de substrato que se une a la membrana de forma inespecífica (*Binding*).

3.8.3.2. Composición de los medios.

- Medio de incubación para D-glucosa y D-galactosa.

NaSCN..... 150-100 mM.
Manitol 0-200 mM.
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4) 20 mM.
MgSO₄·7H₂O..... 0,1 mM.
NaN₃ 3,1 μM
D-glucosa/D-galactosa 0,1 mM.

- Medios de incubación para D-Fructosa.

KSCN 100-250 mM.
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4) 20 mM.
MgSO₄·7H₂O..... 0,1 mM.
NaN₃ 3,1 μM
D-fructosa..... 1 mM.

- Solución de parada.

KSCN 150 mM
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4) 20 mM
NaN₃..... 3,1 μM

3.8.3.3. Realización del ensayo

Las concentraciones intra y extravasculares utilizadas han sido las siguientes:

	Intravesicular	Extravesicular (D-glucosa)	Extravesicular (D-galactosa)	Extravesicular (D-fructosa)
NaSCN		150-100 mM	150-100 mM	---
KSCN		---	---	100-250 mM
Manitol	300 mM	0-200 mM	0-200 mM	---
HEPES/TRIS	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
MgSO ₄	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM
NaN ₃	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%
D-glucosa	---	0,1 mM	---	---
D-galactosa	---	---	0,1 mM	---
D-fructosa.	---	---	---	1 mM

Todas estas soluciones se preparan extemporáneamente. La osmolaridad se midió con un osmómetro *Gonotec* modelo *Osmomat 030*. La concentración de ¹⁴C-D-glucosa y de ¹⁴C-D-galactosa es de 9,37 µM y 0,925 µM respectivamente. La concentración de ¹⁴C-D-fructosa es de 9,31 µM.

La pauta es igual a la descrita en el apartado 3.8., la diferencia radica en que el tiempo de incubación es siempre el mismo, 30 minutos, coincidiendo con el tiempo de equilibrio. La solución de parada es la misma que la descrita en el transporte para los tres sustratos.

3.9. CINÉTICA DEL TRANSPORTE DE D-GLUCOSA, D-GALACTOSA Y D-FRUCTOSA.

3.9.1. Fundamento.

Con el propósito de caracterizar el sistema de transporte de D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa presente en la membrana apical, se ha llevado a cabo un estudio cinético del transporte de dichos monosacáridos.

3.9.2. Cálculo de las constantes cinéticas.

El cálculo de las constantes cinéticas para el transporte de D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa se ha efectuado mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas a ecuaciones que describen el comportamiento cinético para un sistema de transporte. El ajuste de las curvas a un modelo de sistema de transporte teniendo en cuenta que aplicamos flujos totales, se define con la siguiente ecuación:

$$V = (V_{\max} \cdot [S] / K_m + [S]) + (K_d \times [S])$$

La regresión lineal tiene como finalidad ajustar una serie de datos a una ecuación determinada, de manera que los parámetros de la ecuación dan lugar al mínimo valor posible de la suma de los cuadrados de las distancias de los puntos experimentales a la curva. En el caso que nos ocupa la ecuación a la que se quiere ajustar los puntos es la ecuación de Michaelis-Menten, y los parámetros de esta ecuación son la velocidad máxima del transporte mediado (V_{\max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_m).

La forma en que se realiza el proceso de ajuste es la siguiente: a partir de unos valores iniciales para cada uno de los parámetros, estimados a partir de una linealización de la ecuación, se calcula la suma de los cuadrados de las diferencias entre los puntos experimentales y los de la curva. Entonces se varían los parámetros con tal de hacer más pequeña la suma de los cuadrados, y se vuelve a hacer el mismo cálculo. Es, pues, un

proceso cíclico, que continúa hasta que ya no es posible conseguir un valor más pequeño para la suma de los cuadrados. Así es como se obtienen los parámetros de la curva.

Se ha utilizado un programa de ajuste de curvas, Enzfitter (Leatherbarrow, 1987), mediante un método de regresión no lineal que utiliza el algoritmo de Marquardt (1963) para el cálculo de las iteraciones necesarias para el ajuste. La aplicación de este método a los flujos individuales obtenidos de cada segmento dan lugar a las curvas de Michaelis-Menten.

3.9.3. Cinética de D-glucosa y D-galactosa.

3.9.3.1. Composición de los medios.

- Medios de incubación.

NaSCN/KSCN	100 mM.
Manitol	100-0 mM
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4).....	20 mM.
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,1 mM
NaN ₃	3,1 μM
D-glucosa/D-galactosa	0,01-100 mM.

- Solución de parada.

KSCN	150 mM.
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4).....	20 mM.
NaN ₃	3,1 μM.

3.9.3.2. Realización del ensayo.

Las concentraciones utilizadas para la realización de la cinética son: 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mM en ambos casos, para D-glucosa y D-galactosa. Los medios de incubación para cada concentración de sustrato se preparan extemporáneamente y el tiempo de incubación es de 5 s para los dos sustratos en estudio. Cada muestra se hace por triplicado conteniendo 75-200 µg de proteínas. La concentración de ¹⁴C-D-glucosa y de ¹⁴C-D-galactosa es de 9,37 µM y 0,925 µM respectivamente. La técnica a seguir es la de filtración rápida explicada en el apartado 3.8.

3.9.4. Cinética de D-fructosa.

3.9.4.1. Composición de los medios.

- Medios de incubación.

KSCN	150-0 mM
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4)	20 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 mM
NaN ₃	3,1 µM
D-fructosa.....	0,1-300 mM.

- Solución de parada.

KSCN.....	150 mM.
HEPES/Tris (c.s.p. pH = 7,4)	20 mM.
NaN ₃	3,1 µM

3.9.4.2. Realización del ensayo.

Las concentraciones utilizadas para la realización de la cinética son: 0,1, 0,5, 1, 10, 50, 100, 200, 300 mM. Los medios de incubación para cada concentración de sustrato se preparan extemporáneamente y el tiempo de incubación es de 15 s para cada muestra, las cuales se hacen por triplicado conteniendo cada una 200-250 μg de proteínas. A cada medio de incubación se le añade ^{14}C -D-fructosa con una concentración de 9,31 μM . La técnica a seguir es la de filtración rápida explicada en el apartado 3.8.

3.10. ESTUDIOS DE LA POLARIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS APICALES DE INTESTINO DE RATA (YEYUNO E ILEON).

3.10.1. Fundamento.

Estos estudios se realizaron con el objeto de determinar la fluidez de las membranas de las vesículas obtenidas. Para ello utilizamos una sustancia hidrofóbica fluorescente, 1,6-difenilhexatrieno (DPH), el cual sólo emite fluorescencia cuando está incorporado en un ambiente lipídico. Al variar la fluidez de la membrana variará la posibilidad de giro del DPH y la polarización de fluorescencia. La determinación de la polarización de fluorescencia y anisotropía del DPH constituye el método más sencillo y utilizado para estimar la fluidez de las membranas biológicas, esto es, el orden lipídico (Sawyer, 1988).

3.10.2. Composición de los medios.

- Solución stock

1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) 2 mM

Tetrahidrofurano (THF)0,46 mM

(guardar en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de nitrógeno, protegido de la luz).

- Tampón salino de sacarosa.

Sacarosa..... 250 mM.

Tris-HCl pH = 7,4 10 mM.

3.10.3. Realización del ensayo.

Las medidas de la polarización de fluorescencia en el estado de equilibrio se realizaron usando cubetas de 1 cm de paso de luz y una longitud de onda excitación-emisión de 360-440 nm, en un fluorímetro SLM. Aminco Bowman[®] modelo Serie 2, según el método descrito por Vázquez y col. (1997b).

Como marcador de las vesículas de membrana de borde en cepillo se usó el compuesto hidrofóbico fluorescente, 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) con una concentración de 0,2 mM. Las vesículas, con una concentración de 150-200 µg de proteínas, se incubaron a 25 °C durante una hora junto con 1880 µL de tampón salino de sacarosa y 20 µL de DPH 0,2 mM.

La anisotropía de fluorescencia en el estado de equilibrio (r) y la polarización (P) se determinaron por las intensidades de emisión a través de un analizador orientado paralela y perpendicularmente a la dirección de polarización de la luz de excitación, según describen Shinitzky y col. (1974). El valor de r_0 , el límite máximo de anisotropía, usado en los cálculos fue de 0,4 para el DPH. El valor de r_∞ , anisotropía de fluorescencia límite, se calculó de los valores de r tal como previamente fue descrito por Van Blitterswijk y col. (1987).

Cálculos:

Polarización de fluorescencia: $P_{\text{DPH}} = (I_{\text{vv}} - I_{\text{vh}}G) / (I_{\text{vv}} + I_{\text{vh}}G)$

Anisotropía de fluorescencia: $r_s = 2P / (3 - P)$

Anisotropía de fluorescencia límite: $r_{\infty} = 4 / 3r_s - 0,10$ (donde $0,13 < r_s < 0,28$).

Parámetro de orden lipídico: $S_{DPH} = (r_{\infty}/r_0)^{1/2}$ (donde $r_0 = 0,4$)

Donde:

I_{vv} = intensidades de emisión paralela.

I_{vh} = intensidades de emisión perpendiculares.

Determinación de G: el valor normal es 1. Es un parámetro que nos indica la eficiencia del aparato.

$G = I_{hv}/I_{hh}$ o lo que es lo mismo $I_{90^{\circ}0^{\circ}}/I_{0^{\circ}90^{\circ}}$.

3.10.4. Interpretación de los resultados.

Si la molécula fluorescente está unida rígidamente (menor fluidez) girará menos y desviará menos el plano de la luz polarizada que incide sobre ella, por tanto el factor I_{vh} será menor y P mayor.

Si la molécula fluorescente está más libre (mayor fluidez) tendrá un mayor movimiento que tenderá a variar la orientación de la luz polarizada incidente y la I_{vh} será mayor y P menor.

3.11. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS PARA EL ESTUDIO MICROSCÓPICO.

Una vez hemos aislado, lavado, y retirado la grasa adherida de yeyuno e íleon, con ayuda de un bisturí se realizan cortes de 1-2 mm de ancho a modo de aros. Estos pequeños segmentos se introducen en la solución de fijación necesaria según el estudio a realizar.

3.11.1. Estudios de microscopía óptica.

3.11.1.1. Composición de los medios.

- Tampón fosfato salino (PBS) (0,1 mol/L)
ClNa 137 mM
KCl 2,7 mM
KH₂PO₄ 1 mM
Na₂HPO₄ 10 mM
pH = 7,4
- Solución fijadora.
Paraformaldehido 4%
Tampón fosfato salino (PBS) 0,1 mol/L.
- Solución de lavado.
Tampón fosfato salino (PBS) 0,1 mol/L
- Soluciones para deshidratar.
Etanol de graduación creciente.
- Composición de la resina Spurr.
ERL-4206 10,0 g.
DER-736 6,0 g.
NSA 26 g.
DMAE 0,4 g.

3.11.1.2. Procedimiento.

Los pequeños segmentos de yeyuno e íleon son introducidos rápidamente en el tampón de fijación durante 3 horas a temperatura ambiente. Para el proceso de fijación

se utilizan viales de plástico cerrados que a su vez se colocan en un agitador orbital de tubos (*Selecta*) para mantenerlos en movimiento. Después de fijados, los segmentos se lavan con solución de lavado y se deshidratan con etanol a distinta graduación y tiempos diferentes.

Etanol 70 %.....	10 minutos.
Etanol 80%.....	10 minutos.
Etanol 90%.....	10 minutos.
Etanol 100%.....	15 minutos.
Etanol 100%.....	15 minutos.
Etanol 100%.....	15 minutos.

Tras los lavados y la deshidratación los segmentos se infiltran en resina Spurr, procediéndose de la siguiente manera:

- 1° Etanol absoluto-resina (1:1), durante 2-3 horas a 4 °C.
- 2° Resina pura durante 12 horas a 4 °C.

Una vez infiltrados los segmentos en la resina se realizan bloques individuales de las piezas que polimerizan a 70 °C durante 8 horas. Posteriormente se realizan cortes semifinos (1-2 μm) con un microtomo modelo Ultracut E, Reichert, Jung. Estos cortes se colocan en portas con poli-L-lisina y se tiñen con azul de toluidina y fucsina básica al 0,05%, según el método descrito por Abreu y col. (1993), para su observación al microscopio óptico (Olimpus microscope Vanox AHB3).

3.11.2. Estudios de microscopía electrónica.

3.11.2.1. Composición de los medios.

- Tampón cacodilato (0,1 mol/L)
Cacodilato sódico/HCl (c.s.p. pH = 7,2-7,4).

- Solución fijadora.
Glutaraldehido..... 2,5%.
Tampón cacodilato.

- Tampón de lavado.
Tampón cacodilato.

- Solución de postfijación.
Tetróxido de osmio 1%
Tampón cacodilato 0,1 mol/L.

- Soluciones para deshidratar.
Acetona 70%
Acetona 70% - Acetato de uranilo ... 1%
Acetona 80%.
Acetona 90%.

- Composición de la resina Spurr.
ERL-4206..... 10,0 g.
DER-736 6,0 g.
NSA..... 26,0 g.
DMAE..... 0,4 g.

3.11.2.2. Procedimiento.

Para el estudio ultraestructural se obtienen segmentos de tejido más pequeños que para el estudio de microscopía óptica. Los segmentos se fijan en la solución fijadora durante 3 horas a temperatura ambiente, en movimiento con la ayuda de un agitador orbital de tubos. Transcurrido este tiempo se lava en tampón de lavado y se realiza una postfijación durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras son lavadas de

nuevo y posteriormente se deshidratan con acetona de graduación creciente, procediéndose de la manera siguiente:

Acetona 70%.....	10 minutos.
Acetona 70%- acetato de uranilo 1%2 h.	
Acetona 70%.....	5 minutos.
Acetona 80%.....	10 minutos.
Acetona 90%.....	15 minutos.
Acetona 100%.....	15 minutos.
Acetona 100%.....	30 minutos.

Una vez realizada la deshidratación, los segmentos se infitran en resina Spurr de la misma forma que se explicó en el apartado 3.11.1.2.

1. Acetona absoluta-resina (1:1)2-3 horas.
2. Resina pura.....12 horas a 4 °C.

Las muestras se colocan en moldes individuales que polimerizan a 70 °C durante 8 horas. Los cortes ultrafinos (40 nm) se recogen en rejilla de cobre y níquel y se tiñen con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación al microscopio electrónico, modelo Philips 300 EM.

3.11.3. Inmunolocalización del SGLT1 al microscopio óptico.

3.11.3.1. Composición de los medios.

- Medio de desplastificación.
NaOH (10 g) en etanol absoluto.

- Soluciones de hidratación.
Etanol de graduación decreciente.
- Inhibición de la actividad peroxidasa endógena.
H₂O₂ (comercial 33%)..... 0,3%.
Tampón fosfato salino (PBS)..... 0,1 mol/L.
- Inhibición de la agregación de los anticuerpos (PBS-BSA).
Tampón fosfato salino (PBS)..... 0,1 mol/L.
Albúmina de suero bovino (BSA).... 1%.
- Soluciones de lavado
Tris 0,05 M.
HCl c.s.p. pH = 7,6.
- Solución de diaminobenzidina.
Diaminobenzidina 10 mg.
H₂O₂ (comercial 33%)..... 12 µL.
Tris/HCl 0,05 M c.s.p. pH = 7,66 20 mL.
- Soluciones para deshidratación.
Agua destilada
Etanol 80%.
Etanol 90%.
Etanol 100%.
Xilol.
- Solución montante para histología.
DPX *Mountant for histology*, Fluka nº cat. 44581.

3.11.3.2. Procedimiento.

El proceso de fijación, lavado, deshidratación e infiltración es el mismo que el explicado para microscopía óptica (apartado 3.11.1.); posteriormente se da paso al proceso de desplastificación que se realiza siempre que la resina que se utiliza es de naturaleza hidrófoba, como es el caso de la resina Spurr, ya que los anticuerpos están en solución acuosa y hay que facilitar su llegada al SGLT1 eliminando la resina y dejando el tejido libre de la misma. Este proceso se lleva a cabo en el medio de desplastificación durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se lava con etanol absoluto durante 5 minutos, y continuamos hidratando con etanol de graduación decreciente de la siguiente forma:

Etanol 100%.....	3 minutos.
Etanol 80%.....	3 minutos.
Etanol 50%.....	3 minutos.
H ₂ O (destilada).....	3 minutos.

Teniendo en cuenta que el segundo anticuerpo está marcado con peroxidasa, bloqueamos la actividad peroxidasa endógena del tejido con H₂O₂ 0,3% en PBS 0,1 mol/L durante 30 minutos. Se lavan los portales con PBS 0,1 mol/L dos veces durante 5 minutos, se secan los bordes con papel de filtro y se dejan en cámara húmeda. Posteriormente añadimos al tejido BSA al 1% en PBS 0,1 mol/L con ayuda de una pipeta Pasteur de cristal, de modo que cubra toda la zona donde se encuentra el tejido durante 10 minutos. El BSA (albúmina de suero bovino), impide la agregación de los anticuerpos en solución y previene la unión inespecífica de éstos a compuestos celulares.

El siguiente paso es la incubación con el primer anticuerpo (o anticuerpo primario). Este anticuerpo está obtenido a partir de un suero de conejo, al que previamente se le inyecta un antígeno. En el caso que nos ocupa, el antígeno con el que se induce la producción del anticuerpo es una cadena peptídica constituida por los

aminoácidos 564-575 de la secuencia de aminoácidos deducida para el transportador SGLT1 del intestino de conejo (Hediger y col., 1987). Se toma el primer anticuerpo, anti-SGLT1, hacemos una dilución 1:100 del mismo en (PBS-BSA), y se añaden 30 μ L sobre el tejido incubándose en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente. Se continua lavando con PBS 0,1 mol/L dos veces durante 5 minutos, y con PBS-BSA en cámara húmeda durante 10 minutos.

Al segundo anticuerpo marcado con peroxidasa, se le hace una dilución 1:200 (esta dilución es variable dependiendo del número de lote y de la marca comercial) en PBS-BSA, se añaden 30 μ L al porta que contiene el tejido y lo incubamos a temperatura ambiente durante 2 horas. Lavamos posteriormente con PBS 0,1 mol/L dos veces durante 5 minutos y con Tris/HCl pH = 7,6. Paralelamente se realizan controles omitiendo el primer anticuerpo. Se añade la solución de diaminobenzidina- H_2O_2 y se mantiene durante 30 minutos, en cámara húmeda y oscuridad, para evitar la oxidación de la diaminobenzidina. Transcurrido este proceso se lava con Tris/HCl pH = 7,6 durante 3 minutos y posteriormente se deshidrata de la siguiente manera:

Agua destilada..... 3 minutos.
Etanol 80%..... 3 minutos.
Etanol 100%..... 3 minutos.
Xilol 3 minutos.

Finalmente se añade al cubreobjeto unas gotas de solución montante para histología (DPX), se tapan los portas con los cubres y se visualiza al microscopio óptico tipo Olympus microscope (Vanox AHB3).

3.11.4. Inmunolocalización del SGLT1 al microscopio electrónico.

3.11.4.1. Composición de los medios.

- Solución Fijadora.
Tampón fosfato salino (PBS) pH = 7,4 0,1 mol/L.
Paraformaldehido.....4%.
Glutaraldehido.....0,25%.

- Tampón de lavado.
Tampón fosfato salino (PBS) pH = 7,4 0,1 mol/L.

- Soluciones de deshidratación.
Etanol de graduación creciente.

- Composición de la resina LR White.
Resina LR White.
Etanol absoluto.

- Inhibición de la agregación de anticuerpos (PBS-BSA).
Tampón fosfato salino (PBS).....0,1 mol/L.
Albúmina de suero bobino (BSA).....1%.

3.11.4.2. Procedimiento.

Los segmentos de tejido usados se fijan con la solución fijadora durante 3 horas a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo lavamos con el tampón de lavado y deshidratamos con etanol de la manera siguiente:

Etanol 70%.....	10 minutos.
Etanol 80%.....	10 minutos.
Etanol 90%.....	10 minutos.
Etanol 100%.....	15 minutos.
Etanol 100%.....	15 minutos.
Etanol 100%.....	15 minutos.

Tras este periodo infiltramos el tejido en resina LR White, resina hidrófila que no necesita desplastificación posterior, procediéndose de la siguiente manera:

Resina/Etanol V/V	Tiempo minutos
1/3.....	30-60'.
2/2.....	30-60'.
3/1.....	30-60'.
Resina pura.....	30-60'.
Resina pura.....	12 horas.
Resina pura.....	8 horas.

Una vez el tejido está infiltrado en la resina se polimeriza en cápsulas de gelatina a una temperatura de 50-55 °C durante 24 horas. Obtenido los bloques de resina se le hacen cortes ultrafinos con un microtomo, colocándose estos cortes en rejillas de niquel cubiertas. Las rejillas se lavan con PBS 0,1 mol/L durante 5-10 minutos y con PBS-BSA durante 10-30 minutos. Posteriormente tomamos el primer anticuerpo anti-SGLT1, lo diluimos 1:50 en PBS-BSA, e incubamos añadiendo 30 µL del anticuerpo diluido durante 2 horas en cámara húmeda. Lavamos después con PBS-BSA dos veces durante 10 y 30 minutos en cámara húmeda.

Tomamos el segundo anticuerpo, proteína-A marcada con oro, lo diluimos 1:10 en PBS-BSA y añadimos 30 µL procediendo de la misma manera que con el primer anticuerpo y dejándolo incubar durante 60 minutos en cámara húmeda. Paralelamente se

realizan controles omitiendo el primer anticuerpo. Lavamos las rejillas con PBS-BSA y agua destilada, dos veces y durante 10 minutos con cada una de las soluciones. Finalmente se tiñen las rejillas con acetato de uranilo, para ser examinadas y fotografiadas usando un microscopio electrónico de transmisión Philips 300 EM, perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Sevilla.

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los resultados, a la hora de comparar los dos grupos de estudio analizados (ratas WKY y SHR), se ha efectuado mediante el test de la *t* de Student, considerando que ambos grupos no están relacionados o emparejados. Se han considerado diferencias estadísticamente significativas para valores de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. PESO Y PRESIÓN ARTERIAL DE LOS ANIMALES.

Los animales se adquieren con la edad de 8 a 9 semanas, y hasta la realización de los estudios, cuando alcanzan la edad adulta de 12-14 semanas, se les mide semanalmente el peso y la presión arterial. En la figura 4.1. se muestra el desarrollo del peso corporal durante el periodo de tiempo indicado. Se observa que el peso corporal va aumentando cada semana, no existiendo diferencias significativas entre las ratas WKY y SHR. La diferencia de peso por animal y por semana se mantiene en un intervalo aproximado de 10 a 20 gramos, variando desde un valor de 209 ± 3 g en la 8ª semana a 290 ± 6 g en la 14ª semana en ratas normotensas, y desde 189 ± 5 g en la 8ª semana a 319 ± 12 g en la 14ª semana en ratas hipertensas.

En la figura 4.2. se muestran los valores de presión arterial. La presión diastólica y sistólica aumenta en ambos grupos de animales hasta la 10-11ª semana de edad, estabilizándose a partir de este periodo. Las presiones diastólica y sistólica se mantienen significativamente mayores en las ratas SHR con respecto a las ratas WKY en todo el periodo de tiempo comprendido desde su adquisición hasta su sacrificio. A la edad de 12 semanas los valores de presión sistólica son: 220 ± 4 mm Hg frente a 165 ± 2 mm Hg para las ratas SHR y ratas WKY, respectivamente. Los valores de presión diastólica son: 172 ± 4 mm Hg frente a $130 \pm$ mm Hg para las ratas SHR y ratas WKY, respectivamente.

4.2. PUREZA DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANAS APICALES DE YEYUNO E ÍLEON.

4.2.1. Concentración de proteínas.

Las tablas 4.1. y 4.2. muestran para las ratas WKY y SHR las concentraciones de proteínas en los homogeneizados de yeyuno e íleon y en las vesículas de membranas apicales obtenidas a partir de dichos homogeneizados.

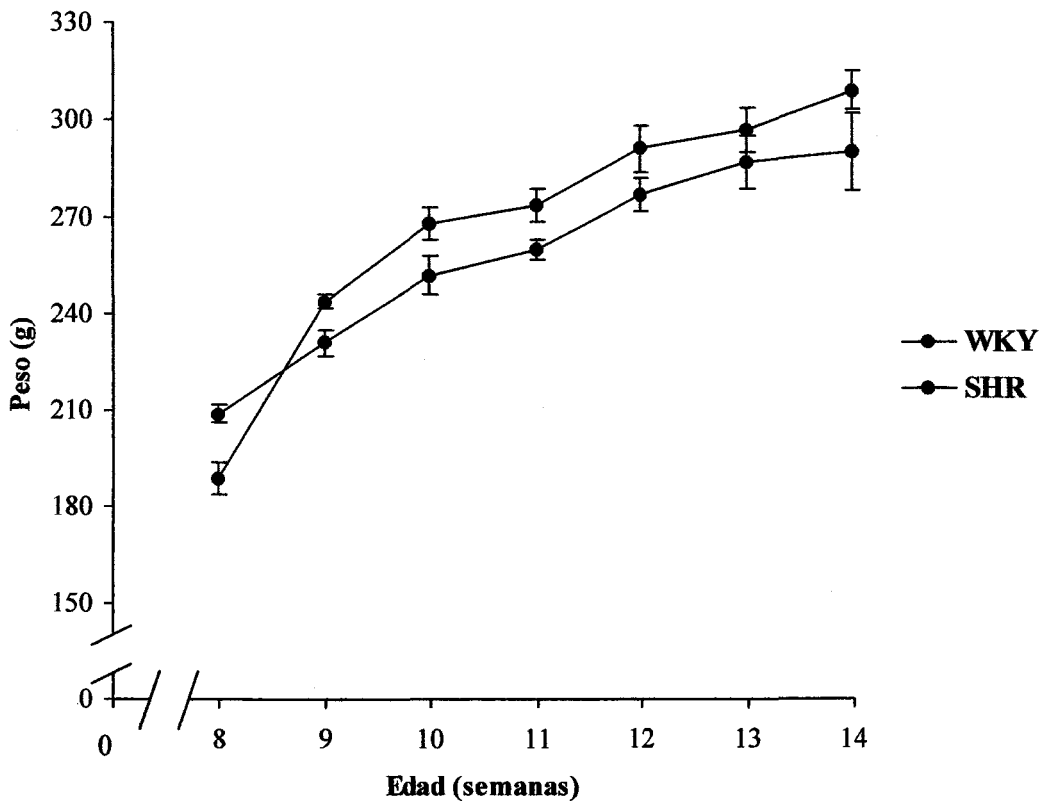


Figura 4.1. Peso corporal de las ratas WKY y SHR entre las 8 y 14 semanas de edad. Los resultados se expresan como media \pm error estándar (n = 11-22 animales).

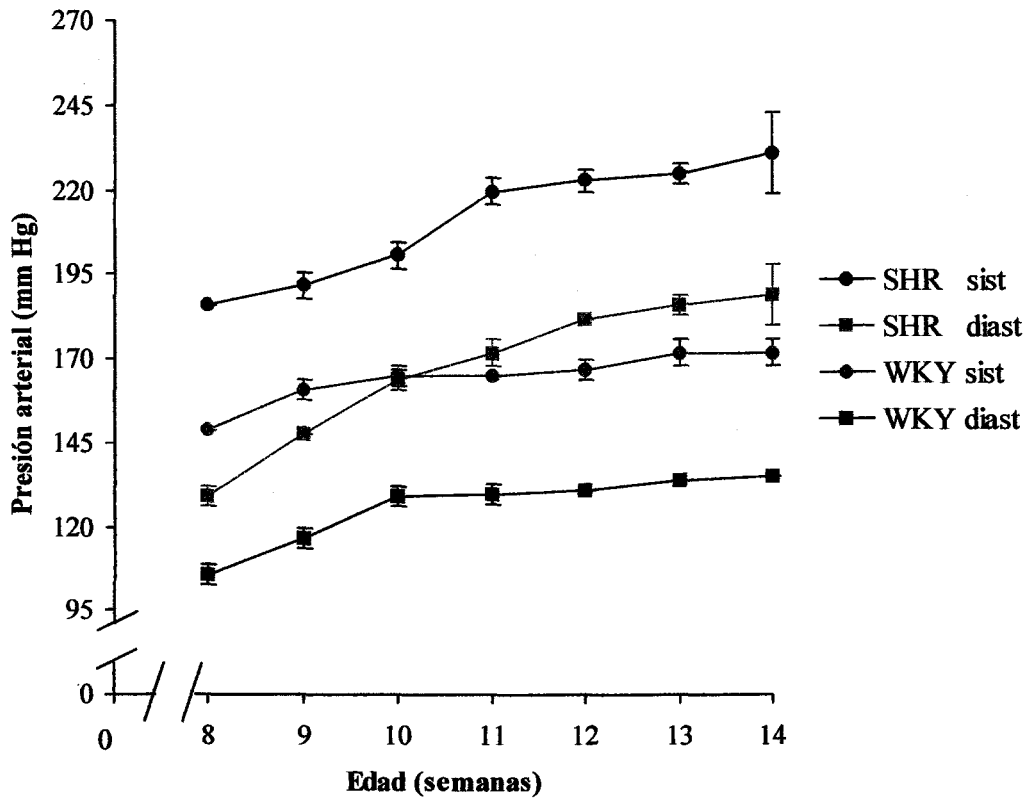


Figura 4.2. Presión arterial de las ratas WKY y SHR entre las 8 y 14 semanas de edad. Los resultados se expresan como media \pm error estándar (n = 11-12 animales).

NIVELES DE PROTEÍNAS EN HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES DE YEYUNO.

	WKY	SHR
Concentración de proteína H		
(mg/mL)	8,3 ± 0,8 (7)	8,8 ± 0,7 (13)
Concentración proteína VMA		
(mg/mL)	22,7 ± 1,4 (7)	20,8 ± 1,3 (13)
Recuperación		
(%)	2,4 ± 0,1 (7)	2,2 ± 01 (13)

Tabla 4.1. Niveles de proteínas en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA), procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Los resultados se expresan como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos.

**NIVELES DE PROTEÍNAS EN HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS
APICALES DE ÍLEON.**

	WKY	SHR
Concentración proteínas H (mg/mL)	7,6 ± 0,7 (7)	6,6 ± 0,5 (10)
Concentración proteínas VMA (mg/mL)	24,2 ± 1,6 (7)	22,7 ± 1,8 (10)
Recuperación (%)	2,6 ± 0,2 (7)	2,7 ± 0,2 (10)

Tabla 4.2. Niveles de proteínas en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA), procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Los resultados se expresan como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos.

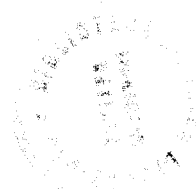
La concentración de proteínas así como la recuperación de las mismas (expresada como porcentaje de la cantidad total de proteínas presente en los correspondientes homogeneizados) es muy similar en las VMA procedentes de ratas normotensas e hipertensas, no existiendo diferencias significativas entre el yeyuno e íleon.

4.2.2. Marcadores enzimáticos.

En las tablas 4.3. a 4.12. se muestran las concentraciones de proteínas y actividades específicas de las enzimas sacarasa, fosfatasa alcalina, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, fosfatasa ácida y succinato deshidrogenasa, medidas en las membranas apicales y en los homogeneizados de yeyuno e íleon de ratas SHR y WKY.

Tanto en las ratas WKY como en las ratas SHR, el método de aislamiento utilizado permite la obtención de vesículas de membranas apicales de yeyuno e íleon con un buen grado de pureza, puesto que el grado de recuperación y enriquecimiento de la enzima sacarasa, marcadora de estas membranas, son suficientemente elevados con respecto a los homogeneizados de partida tanto en yeyuno como en íleon. Las VMA provenientes del yeyuno presentan un enriquecimiento de la sacarasa de 14 a 16 veces y una recuperación aproximada de 25-32% tanto en las ratas normotensas como hipertensas (tabla 4.3.), no observándose diferencias significativas entre ambos grupos de animales. En el íleon, el enriquecimiento de la sacarasa es de 15-16 veces junto con una recuperación de 41-47% tanto en ratas normotensas como hipertensas (tabla 4.4.), no observándose modificaciones significativas entre los grupos de animales. En cuanto a la fosfatasa alcalina, otra enzima usada como marcadora de las membranas apicales, los resultados muestran en el yeyuno e íleon, un enriquecimiento de 8-11 veces y una recuperación de un 22-34% (tablas 4.5.-4.6.), sin aparecer diferencias significativas entre ambos grupos de ratas. Al comparar los valores obtenidos en la actividad de las enzimas sacarasa y fosfatasa alcalina entre ratas WKY y SHR, observamos una disminución significativa en la actividad específica de ambas enzimas en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas, tanto en yeyuno como en el íleon.

Los resultados obtenidos para los marcadores enzimáticos de membranas basolaterales, lisosomales y mitocondriales (Na^+ - K^+ ATPasa, fosfatasa ácida y succinato deshidrogenasa, respectivamente) indican un bajo nivel de contaminación con otras membranas celulares en ambos grupos de animales y para los dos segmentos estudiados (tablas 4.7.- 4.12.)



**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA SACARASA EN
HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES DE YEYUNO.**

	WKY	SHR
Actividad específica H (nmol glucosa/min·mg proteína)	82 ± 13 (6)	49 ± 6** (6)
Actividad específica VMA (nmol glucosa/min·mg proteína)	1141 ± 197 (6)	686 ± 12* (6)
Enriquecimiento (n° veces)	16 ± 2 (6)	14 ± 1 (6)
Recuperación (%)	25 ± 3 (6)	32 ± 3 (6)

Tabla 4.3. Actividad específica de la enzima sacarasa en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas están expresadas como nanomoles de glucosa formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados están expresados como media ± error estándar, y entre paréntesis el número de aislamientos. *P < 0,05, **P < 0,01, comparadas con ratas WKY.

**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA SACARASA EN
HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES DE ÍLEON.**

	WKY	SHR
Actividad específica H (nmol glucosa/min mg proteína)	20 ± 2 (6)	12 ± 2* (6)
Actividad específica VMA (nmol glucosa/min·mg proteína)	301 ± 23 (6)	192 ± 26* (6)
Enriquecimiento (n° veces)	15 ± 2, (6)	16 ± 2 (6)
Recuperación (%)	47 ± 9 (6)	41 ± 4 (6)

Tabla 4.4. Actividad específica de la enzima sacarasa en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA), procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas están expresadas como nanomoles de glucosa formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados se expresan como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos. *P < 0,05, comparada con ratas WKY.

**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA FOSFATASA ALCALINA EN
HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES DE YEYUNO.**

	WKY	SHR
Actividad específica H ($\mu\text{mol pNP}/\text{min}\cdot\text{mg proteína}$)	0,45 \pm 0,05 (6)	0,27 \pm 0,03* (6)
Actividad específica VMA ($\mu\text{mol pNP}/\text{min}\cdot\text{mg proteína}$)	4,7 \pm 0,6 (6)	2,4 \pm 0,1** (6)
Enriquecimiento (n ^o veces)	11 \pm 0,5 (6)	9,0 \pm 1,5 (6)
Recuperación (%)	24,0 \pm 0,3 (6)	22,3 \pm 0,3 (6)

Tabla 4.5. Actividad específica de la enzima fosfatasa alcalina en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas están expresadas como micromoles de para-nitrofenol (pNP) formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados están expresados como media \pm error estándar, y entre paréntesis el número de aislamientos. *P < 0,05, **P < 0,01 comparada con ratas WKY.

**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA FOSFATASA ALCALINA EN
HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES DE ÍLEON.**

	WKY	SHR
Actividad específica H ($\mu\text{mol pNP}/\text{min}\cdot\text{mg proteína}$)	0,17 \pm 0,05 (6)	0,05 \pm 0,01* (6)
Actividad específica VMA ($\mu\text{mol pNP}/\text{min}\cdot\text{mg proteína}$)	1,4 \pm 0,12 (6)	0,38 \pm 0,03*** (6)
Enriquecimiento (n° veces)	8,0 \pm 0,9 (6)	7,6 \pm 0,6 (6)
Recuperación (%)	34 \pm 5,7 (6)	32 \pm 4,4 (6)

Tabla 4.6. Actividad específica de la enzima fosfatasa alcalina en homogeneizado (H) y vesículas de membranas apicales (VMA), procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas están expresadas como micromoles de para-nitrofenol (pNP) formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados están expresados como media \pm error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos. *P < 0,05, ***P < 0,001 comparadas con ratas WKY.

**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA Na⁺-K⁺ ATPasa EN
HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES DE YEYUNO.**

	WKY	SHR
Actividad específica H ($\mu\text{mol pNP}/\text{min}\cdot\text{mg proteína}$)	$4,2 \pm 0,6$ (6)	$4,9 \pm 0,3$ (6)
Actividad específica VMA ($\mu\text{mol pNP}/\text{min}\cdot\text{mg proteína}$)	$14,2 \pm 2,1$ (6)	$13,3 \pm 2,4$ (6)
Enriquecimiento (n° veces)	$3,6 \pm 0,5$ (6)	$3,0 \pm 0,1$ (6)
Recuperación (%)	$2,8 \pm 0,2$ (6)	$2,9 \pm 0,3$ (6)

Tabla 4.7. Actividad específica de la enzima Na⁺-K⁺ ATPasa en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA), procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas están expresadas como micromoles de para-nitrofenol (pNP) formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados están expresados como media \pm error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos.

**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA Na⁺-K⁺ ATPasa EN
HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES DE ÍLEON.**

	WKY	SHR
Actividad específica H ($\mu\text{mol pNP}/\text{min}\cdot\text{mg proteína}$)	$2,0 \pm 0,2$ (6)	$2,1 \pm 0,2$ (6)
Actividad específica VMA ($\mu\text{mol pNP}/\text{min}\cdot\text{mg proteína}$)	$6,5 \pm 0,2$ (6)	$5,8 \pm 0,2$ (6)
Enriquecimiento (n ^o veces)	$2,7 \pm 0,1$ (6)	$2,3 \pm 0,6$ (6)
Recuperación (%)	$2,8 \pm 0,2$ (6)	$2,5 \pm 0,5$ (6)

Tabla 4.8. Actividad específica de la enzima Na⁺-K⁺ ATPasa en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA), procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas están expresadas como micromoles de para-nitrofenol (pNP) formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados están expresados como media \pm error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos.

**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA FOSFATASA ÁCIDA EN
HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES DE YEYUNO.**

	WKY	SHR
Actividad específica H (nmol pNP/min·mg proteína)	43,0 ± 12,1 (6)	42,5 ± 3,8 (6)
Actividad específica VMA (nmol pNP/min mg proteína)	57,8 ± 9,1 (6)	45,5 ± 14,2 (6)
Enriquecimiento (n° veces)	1,3 ± 0,2 (6)	1,1 ± 0,1 (6)
Recuperación (%)	1,2 ± 0,2 (6)	1,4 ± 0,1 (6)

Tabla 4.9. Actividad específica de la enzima fosfatasa ácida en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas están expresadas como nanomoles de para-nitrofenol (pNP) formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados están expresados como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos.

**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA FOSFATASA ÁCIDA EN
HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES DE ÍLEON.**

	WKY	SHR
Actividad específica H (nmol pNP/min·mg proteína)	27,8 ± 5,2 (6)	24,4 ± 1,1 (6)
Actividad específica VMA (nmol pNP/min·mg proteína)	49,2 ± 13,7 (6)	28,9 ± 5,0 (6)
Enriquecimiento (n° veces)	1,7 ± 0,3 (6)	1,1 ± 0,2 (6)
Recuperación (%)	1,0 ± 0,1 (6)	0,9 ± 0,02 (6)

Tabla 4.10. Actividad específica de la enzima fosfatasa ácida en homogeneizado y en vesículas de membrana apicales (VMA) procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas están expresadas como nanomoles de para-nitrofenol (pNP) formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados están expresados como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos.

**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA SUCCINATO
DESHIDROGENASA EN HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES
DE YEYUNO.**

	WKY	SHR
Actividad específica H (nmol fumarato/min·mg proteína)	5,1 ± 0,7 (6)	6,2 ± 0,8 (6)
Actividad específica VMA (nmol fumarato/min·mg proteína)	3,9 ± 0,5 (6)	2,9 ± 0,6 (6)
Enriquecimiento (n° veces)	0,8 ± 0,02 (6)	0,5 ± 0,01 (6)
Recuperación (%)	0,6 ± 0,05 (6)	0,4 ± 0,08 (6)

Tabla 4.11. Actividad específica de la enzima succinato deshidrogenasa en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA), procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas se expresan en nanomoles de fumarato formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados están expresados como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos.

**ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA SUCCINATO
DESHIDROGENASA EN HOMOGENEIZADO Y MEMBRANAS APICALES
DE ÍLEON.**

	WKY	SHR
Actividad específica H (nmol fumarato/min·mg proteína)	2,2 ± 0,1 (6)	2,3 ± 0,1 (6)
Actividad específica VMA (nmol fumarato/min·mg proteína)	3,2 ± 0,2 (6)	3,0 ± 0,2 (6)
Enriquecimiento (n° veces)	1,6 ± 0,3 (6)	1,4 ± 0,2 (6)
Recuperación (%)	1,2 ± 0,2 (6)	1,1 ± 0,3 (6)

Tabla 4.12. Actividad específica de la enzima Succinato deshidrogenasa en homogeneizado (H) y en vesículas de membranas apicales (VMA) procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Las actividades específicas se expresan en nanomoles de fumarato formados en cada minuto por miligramo de proteína. Los resultados se expresan como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de aislamientos.

4.3. TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS EN VESÍCULAS DE MEMBRANAS APICALES DE YEYUNO E ILEON.

4.3.1. Caracterización del transporte de D-glucosa.

4.3.1.1. Transporte a diferentes tiempos de incubación.

Las figuras 4.3. y 4.4. muestran la entrada de D-glucosa (0,1 mmol/L) en VMA de yeyuno e íleon, respectivamente, para ratas normotensas e hipertensas tras la incubación de las mismas durante los tiempos de 5, 15, 30 y 60 segundos, y 30 minutos. La captación de este monosacárido por las vesículas en el yeyuno y en el íleon en ambos grupos de animales es acumulativa en presencia de un gradiente de sodio, obteniéndose a los 5 segundos la acumulación máxima. La cantidad de substrato acumulado, calculada como la relación entre la acumulación máxima y el punto de equilibrio, es significativamente menor en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas tanto para el yeyuno como para el íleon. En el caso del yeyuno, la acumulación es de $11,1 \pm 0,6$ veces para las ratas normotensas y de $6,5 \pm 0,5$ veces para las ratas hipertensas, y en el íleon es de $8,7 \pm 0,6$ veces en las ratas normotensas y de $3,9 \pm 0,5$ veces, para las ratas hipertensas, (tabla 4.13.).

En el yeyuno al igual que en el íleon esta acumulación desaparece cuando se realiza la captación de este substrato en un medio libre de sodio (KSCN), desapareciendo la acumulación transitoria de substrato y alcanzándose el equilibrio a los 30 minutos. El flujo de D-glucosa en presencia de sodio es significativamente mayor para los tiempos de incubación de 5 y 15 segundos en el yeyuno y 5, 15, 30 y 60 segundos en el íleon de ratas WKY con respecto a las SHR. En el punto de equilibrio (30 minutos), tanto para el yeyuno como para el íleon, se observan valores de transporte de glucosa similares para las ratas normotensas e hipertensas, no existiendo diferencias en los transportes obtenidos en presencia y ausencia del ión sodio.

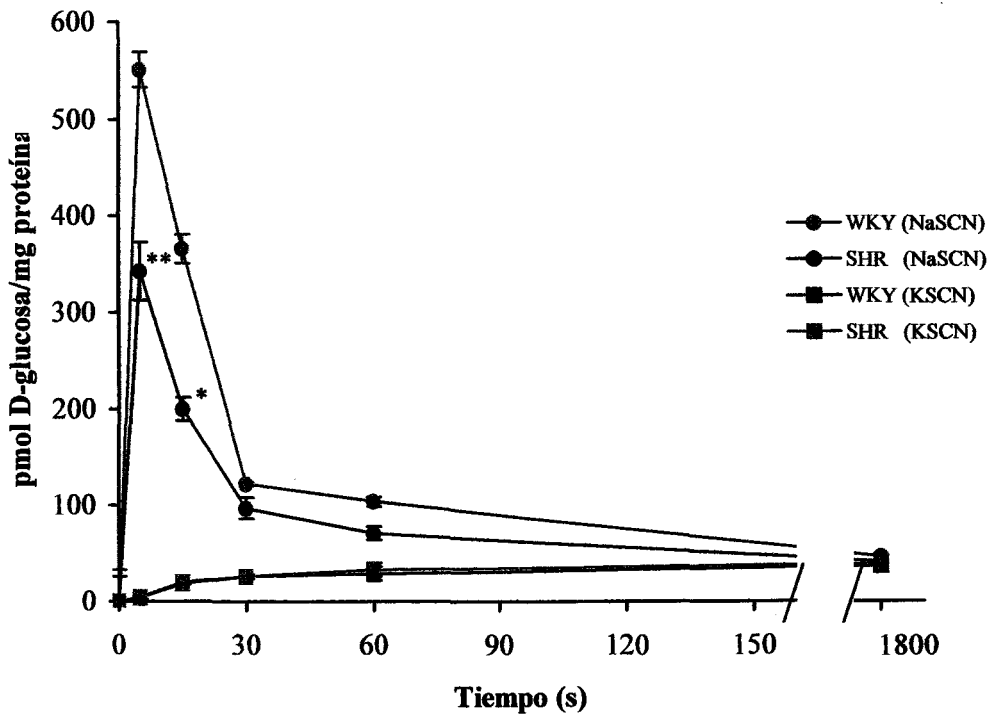


Figura 4.3. Transporte de D-glucosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Los resultados se expresan como media \pm error estándar (n = 6 aislamientos). *P < 0,05, **P < 0,01, comparado con ratas WKY.

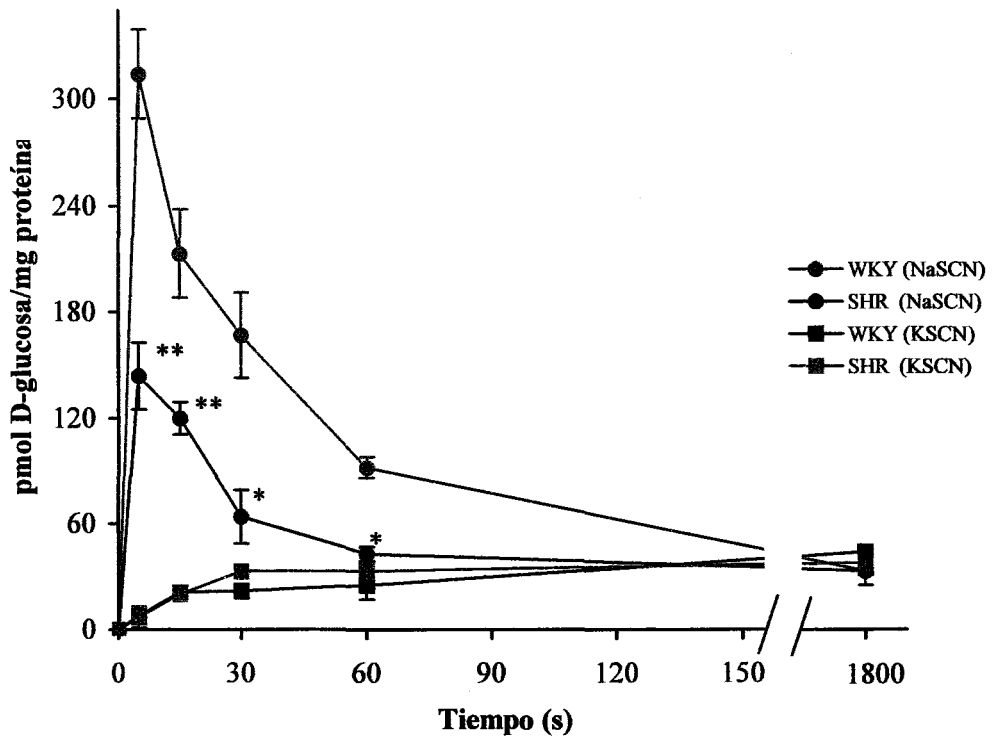


Figura 4.4. Transporte de D-glucosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 5$ aislamientos). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, comparado con ratas WKY.

**VELOCIDAD INICIAL Y ACUMULACIÓN DE D-GLUCOSA PARA
YEYUNO E ÍLEON EN RATAS WKY Y SHR.**

	WKY	SHR
YEYUNO		
Velocidad inicial (pmol/mg proteína·s)	110 ± 6,8 (6)	64 ± 6,1** (6)
Acumulación (n° veces)	11,1 ± 0,6 (6)	6,5 ± 0,5** (6)
ÍLEON		
Velocidad inicial (pmol/mg proteína·s)	63 ± 4,9 (6)	29 ± 3,7** (6)
Acumulación (n° veces)	8,7 ± 0,6 (6)	3,9 ± 0,5** (6)

Tabla 4.13. Velocidades iniciales y acumulación intravesicular de D-glucosa en vesículas de membranas apicales de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR. Las velocidades iniciales se expresan en picomoles por miligramos de proteína por segundo (pmol/mg proteína·s). Los resultados se expresan como la media ± error estándar, y entre paréntesis el número de experimentos realizados.** P < 0,01 comparado con ratas WKY.

A partir de los valores del transporte de D-glucosa detectados en el equilibrio, podemos calcular el volumen intravesicular siendo los valores en yeyuno para las ratas WKY y SHR, respectivamente de $0,41 \pm 0,07$ y $0,46 \pm 0,05$ $\mu\text{L}/\text{mg}$ proteína, y para el íleon de $0,36 \pm 0,06$ y $0,36 \pm 0,03$ $\mu\text{L}/\text{mg}$ proteína. Estos resultados indican que no existen diferencias en el tamaño de las vesículas de membranas apicales entre ambos grupos de animales en los dos segmentos estudiados.

La velocidad inicial de entrada de la D-glucosa disminuye significativamente en las ratas SHR con respecto a las WKY, tanto en el yeyuno como en el íleon, observándose unos valores en el yeyuno de $110 \pm 6,8$ pmol/mg proteína \cdot s y $64 \pm 6,1$ pmol/mg proteína \cdot s para ratas WKY y SHR, respectivamente, y en el íleon de $63 \pm 4,9$ pmol/mg proteína \cdot s y $29 \pm 3,7$ pmol/mg proteína \cdot s para las ratas WKY y SHR, respectivamente.

4.3.1.2. Especificidad de los transportadores frente a distintos sustratos.

Las figuras 4.5. y 4.6. muestran para el yeyuno e íleon, respectivamente, de ratas normotensas e hipertensas, la inhibición ejercida por diferentes concentraciones de florricina sobre el transporte de D-glucosa $0,1$ mmol/L dependiente de sodio. El tiempo de incubación es de 5 segundos, tiempo en el que la entrada de azúcar es máxima, como vimos en el apartado anterior. El transporte de D-glucosa dependiente de sodio, es completamente inhibido a una concentración de florricina igual a 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$, tanto en yeyuno como en el íleon de ratas normotensas e hipertensas. A su vez, la CI_{50} (concentración del inhibidor que reduce el transporte a la mitad) es similar en ambos segmentos estudiados y para ambos grupos de animales, con un valor de 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$.

La inhibición del transporte de D-glucosa por otros azúcares, para un tiempo de incubación de 5 segundos, en el yeyuno y en el íleon de ratas WKY y SHR se muestran en las figuras 4.7. y 4.8., respectivamente. La presencia de altas concentraciones de D-galactosa (100 mmol/L), inhibe en gran medida la entrada de D-glucosa dependiente de

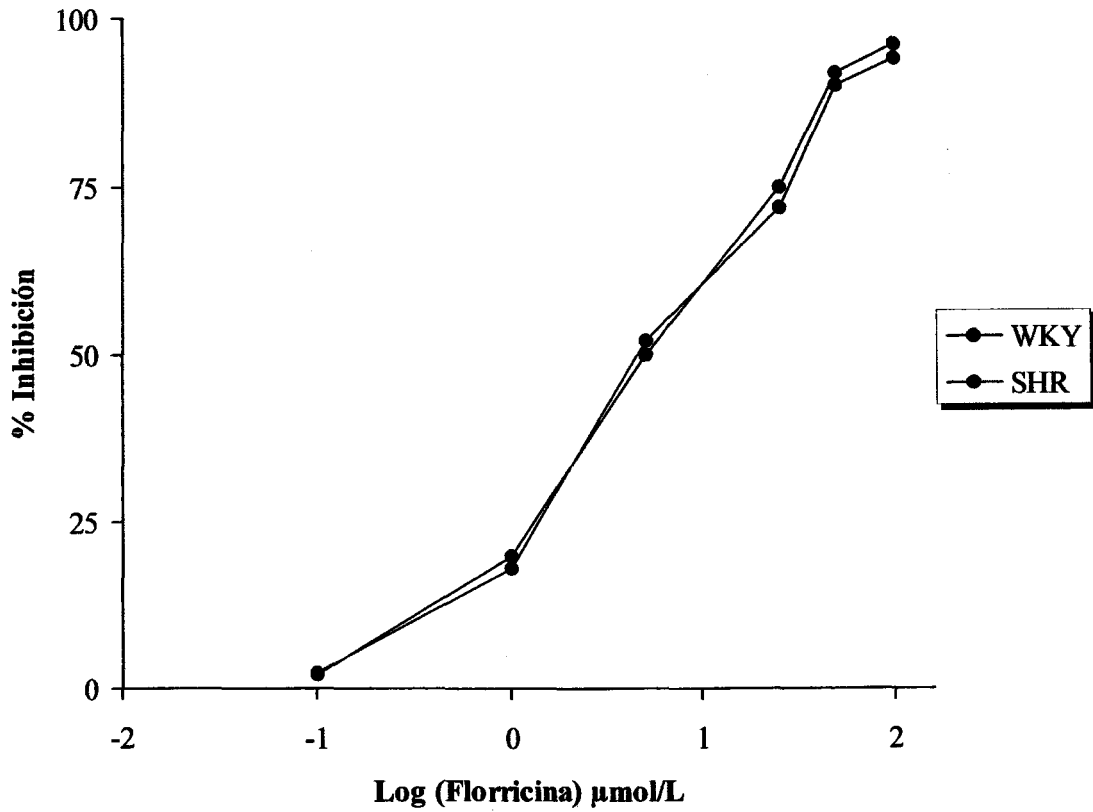


Figura 4.5. *Cis*-inhibición del transporte de D-glucosa dependiente de sodio, a diferentes concentraciones de florricina, en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 4 aislamientos).

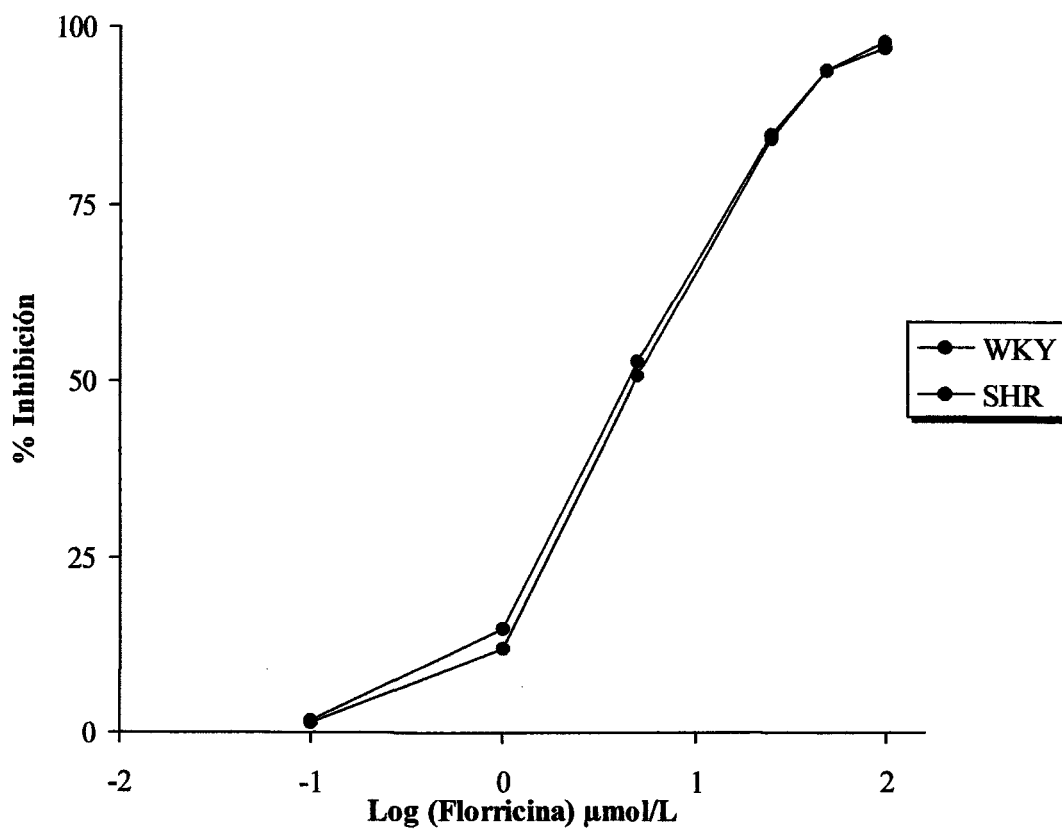


Figura 4.6. *Cis*-inhibición del transporte de D-glucosa dependiente de sodio, a diferentes concentraciones de florricina, en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 4 aislamientos).

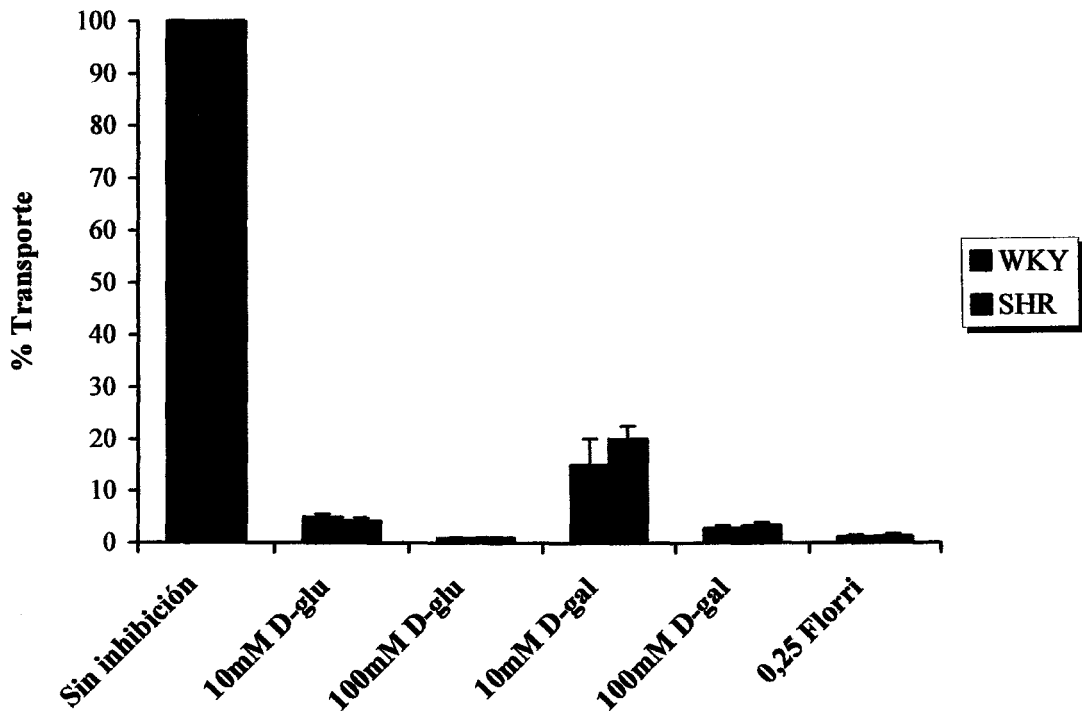


Figura 4.7. *Cis*-inhibición del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Los substratos ensayados como inhibidores han sido D-glucosa (D-glu), D-galactosa (D-gal) y florricina (florri), a las concentraciones indicadas. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 3 aislamientos).

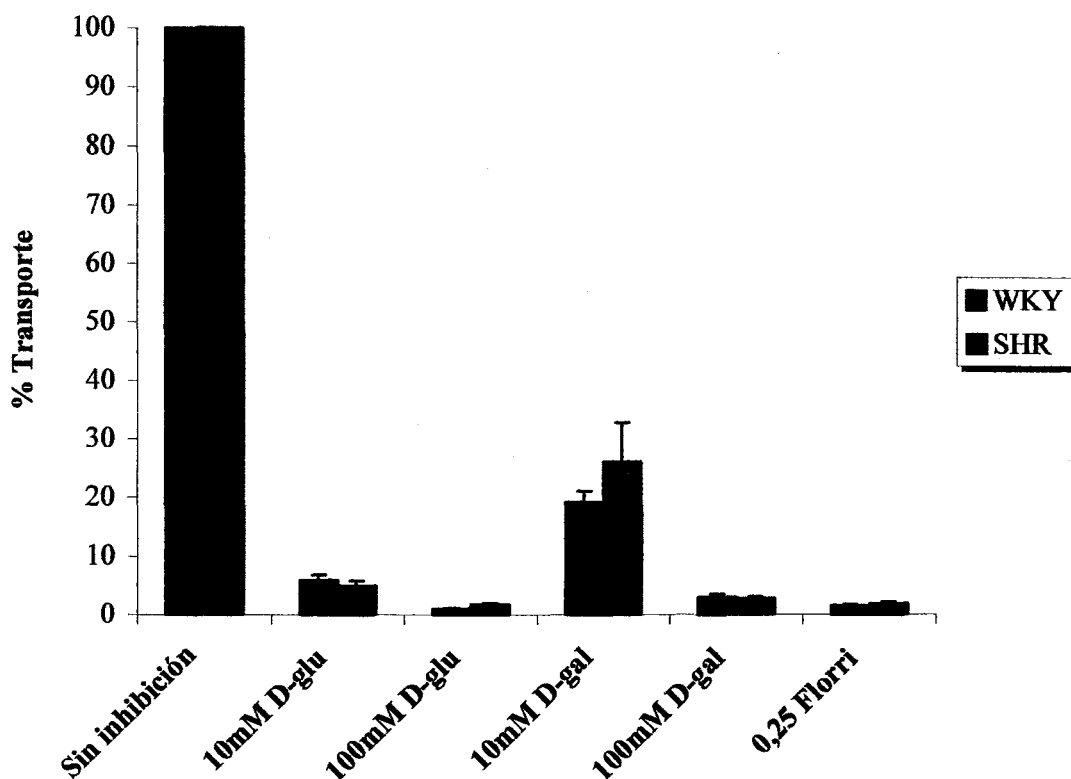


Figura 4.8. Cis-inhibición del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de hígado de ratas WKY y SHR. Los substratos ensayados como inhibidores han sido D-glucosa (D-glu), D-galactosa (D-gal) y florricina (florri), a las concentraciones indicadas. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 3$ aislamientos).

sodio, tanto en el yeyuno como en el íleon para ambos grupos de animales, con valores para el yeyuno de $97 \pm 0,5\%$ y $96 \pm 0,6\%$ de inhibición para las ratas WKY y SHR, respectivamente y en el íleon de $97 \pm 0,5\%$ y $96 \pm 0,4\%$ de inhibición en ratas WKY y SHR, respectivamente. La autoinhibición (inhibición mediante 100 mmol/L de D-glucosa) y la inhibición por florricina (0.25 mmol/L), dan lugar a una inhibición total del transporte en ratas WKY y SHR, así como en los dos segmentos estudiados.

4.3.1.3. Constantes cinéticas del transporte de D-glucosa en yeyuno e íleon.

En las figuras 4.9.–4.12. se muestran las curvas de cinética obtenidas para el transporte de D-glucosa, en condiciones de flujo inicial, en el yeyuno (figuras 4.9. y 4.10.) e íleon (figuras 4.11. y 4.12.) de ratas WKY y SHR. En ambos casos, el mejor ajuste de las curvas de transporte total (en presencia de sodio) se obtiene considerando un modelo de un sistema de transporte mediado más una componente de difusión simple.

Los parámetros cinéticos obtenidos (tabla 4.14.) muestran que las ratas hipertensas tienen significativamente disminuida la capacidad de captación de este sustrato a través de este sistema de transporte, en el yeyuno e íleon, ya que presentan valores de velocidad máxima (V_{\max}) significativamente más bajos que los de las ratas normotensas. Por el contrario, la afinidad de los transportadores (K_m) y la difusión de la D-glucosa a través de la membrana (K_d) no sufren modificaciones significativas entre los dos grupos experimentales y para ninguno de los dos segmentos estudiados.

4.3.2. Caracterización del transporte de D-galactosa en yeyuno e íleon.

4.3.2.1. Transporte en función del tiempo.

Los tiempos de incubación empleados para observar la captación de D-galactosa en vesículas de yeyuno e íleon han sido de 5, 15 y 60 segundos, y 30 minutos. Las figuras 4.13. y 4.14. muestran el transporte en función del tiempo del sustrato D-

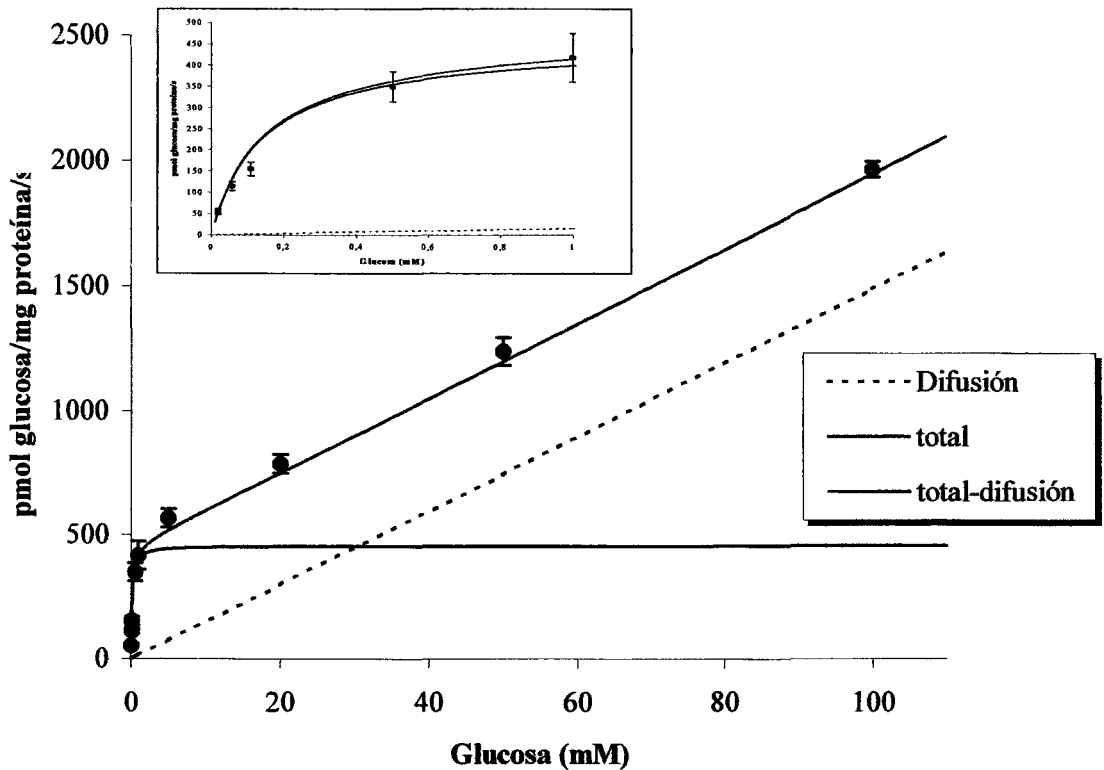


Figura 4.9. Curvas de cinética del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY. La concentración de D-glucosa empleada ha sido de 0,01-100 mmol/L, en un medio de incubación 100 mmol/L NaSCN. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 4$ experimentos).

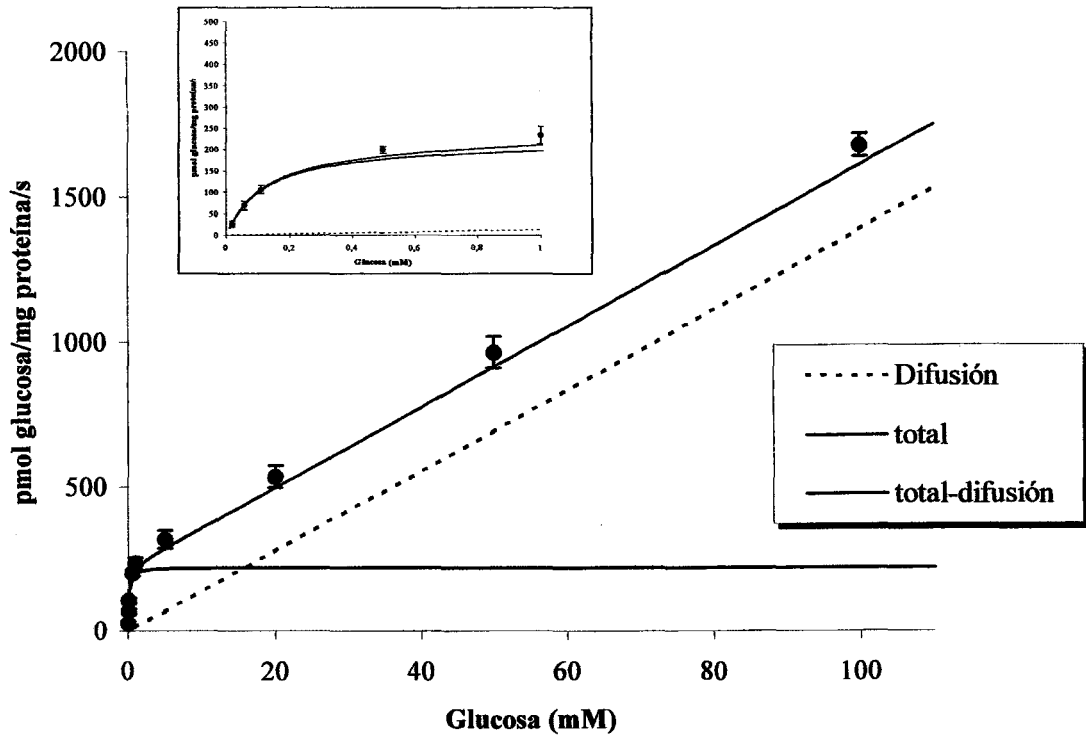


Figura 4.10. Curvas de cinética del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes del yeyuno de ratas SHR. La concentración de D-glucosa empleada ha sido de 0,01-100 mmol/L, en un medio de incubación 100 mmol/L NaSCN. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 4$ experimentos).

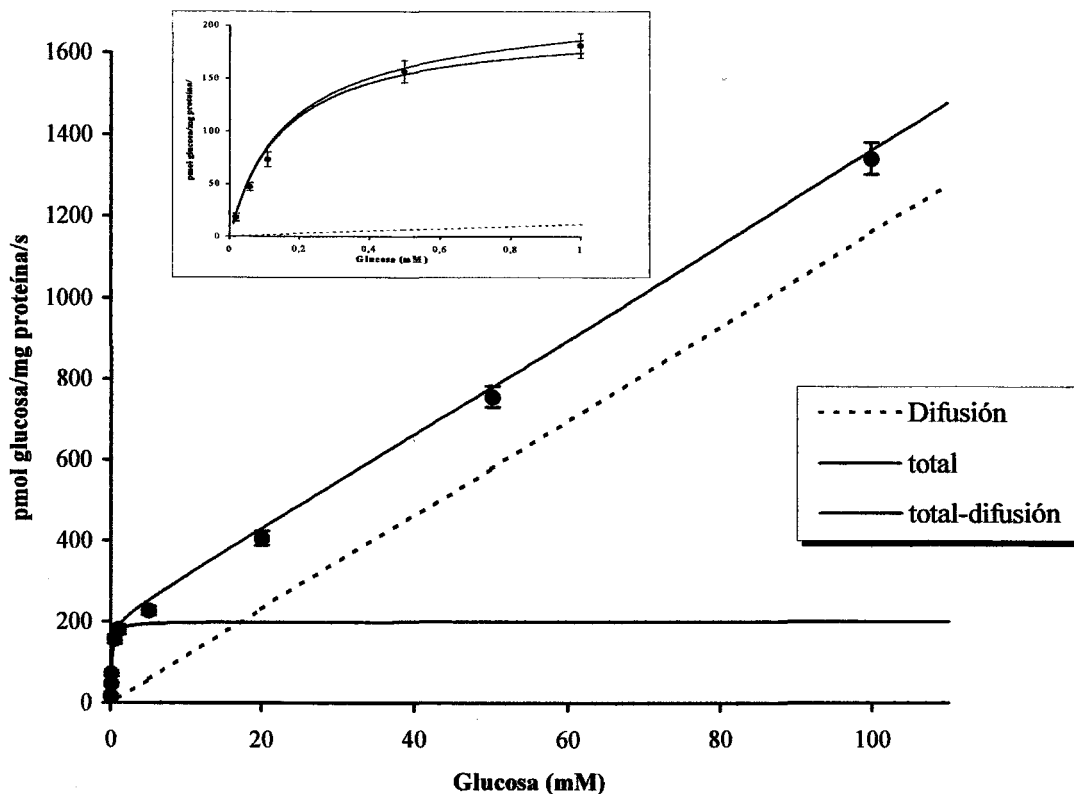


Figura 4.11. Curvas de cinética del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY. La concentración de D-glucosa empleada ha sido de 0,01-100 mmol/L, en un medio de incubación 100 mmol/L NaSCN. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 4$ experimentos)

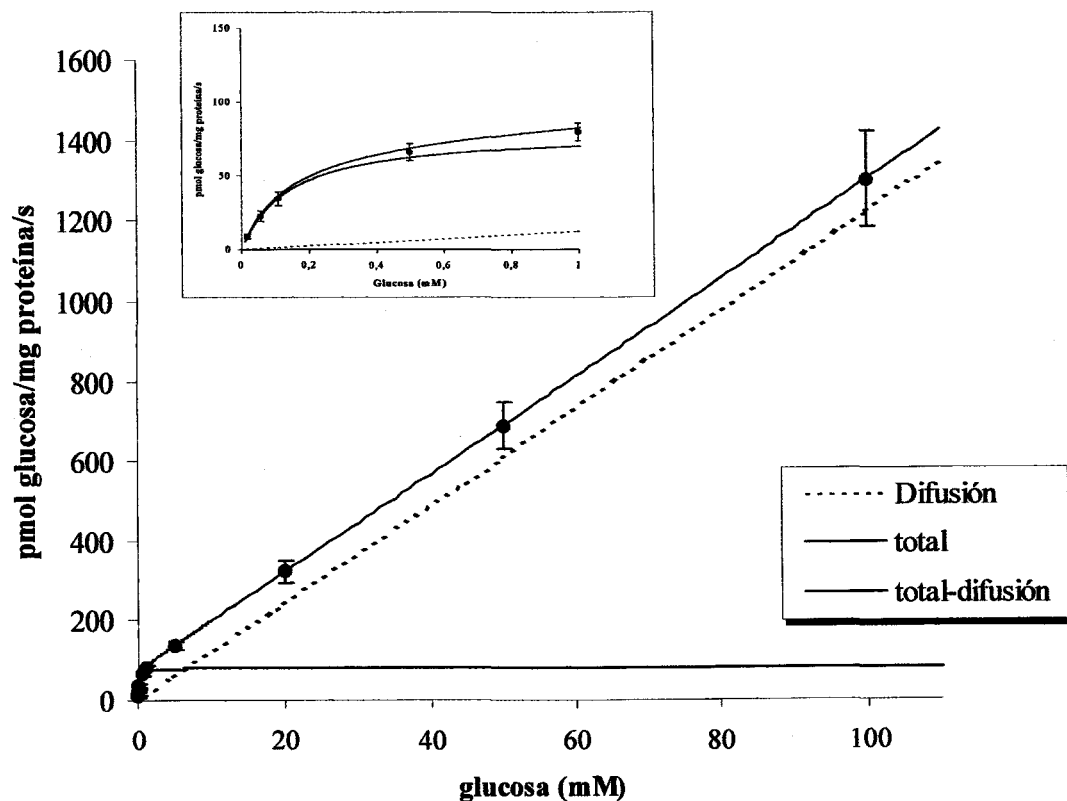


Figura 4.12. Curvas de cinética del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de fleon de ratas SHR. La concentración de D-glucosa empleada ha sido de 0,01-100 mmol/L, en un medio de incubación 100 mmol/L NaSCN. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 4$ experimentos).

**PARÁMETROS CINÉTICOS DEL TRANSPORTE DE D-GLUCOSA EN
YEYUNO E ÍLEON.**

	WKY	SHR
YEYUNO		
V_{\max} (pmol/mg proteína·s)	455 ± 12 (5)	220 ± 10* (5)
K_m (mmol/L)	0,14 ± 0,02 (5)	0,12 ± 0,01 (5)
K_d (nL/mg proteína·s)	14,9 ± 0,3 (5)	13,9 ± 0,9 (5)
ÍLEON		
V_{\max} (pmol/mg proteína·s)	200 ± 25 (5)	80 ± 10* (5)
K_m (mmol/L)	0,15 ± 0,01 (5)	0,14 ± 0,02 (5)
K_d (nL/mg proteína·s)	11,6 ± 0,2 (5)	12,2 ± 0,1 (5)

Tabla 4.14. Constantes cinéticas del transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales aisladas de yeyuno e íleon de ratas WKY Y SHR. Las constantes han sido calculadas por regresión no lineal, a partir de las curvas cinéticas representadas en las figuras 4.9.–4.12.. Los valores de velocidad máxima (V_{\max}) se expresan en picomoles de D-glucosa captados por las vesículas por cada miligramo de proteína y segundo; la constante de afinidad del sistema de transporte implicado (K_m) en milimoles/L y la constante de difusión (K_d) en nanolitros por cada miligramo de proteína y segundo. Los resultados están expresados como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de curvas ajustadas. Las diferencias estadísticamente significativa entre los dos grupos de animales se indican mediante asteriscos: *P < 0,05 comparado con ratas WKY.

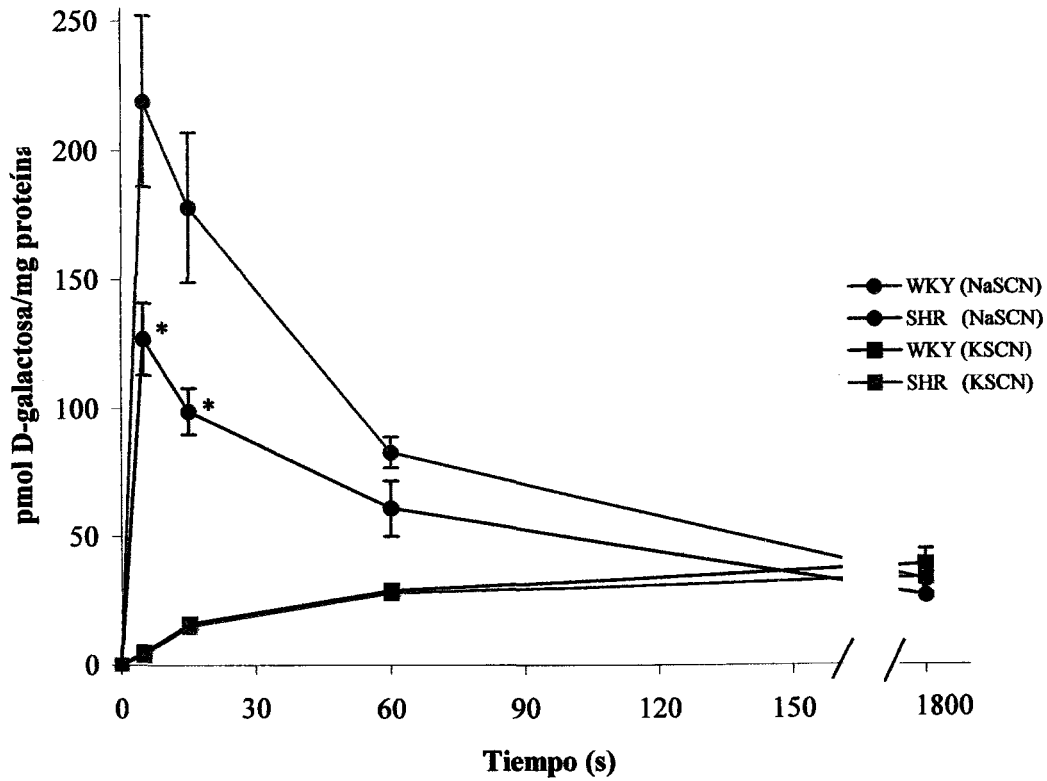


Figura 4.13. Transporte de D-galactosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 6$ aislamientos). * $P < 0,05$, comparado con ratas WKY.

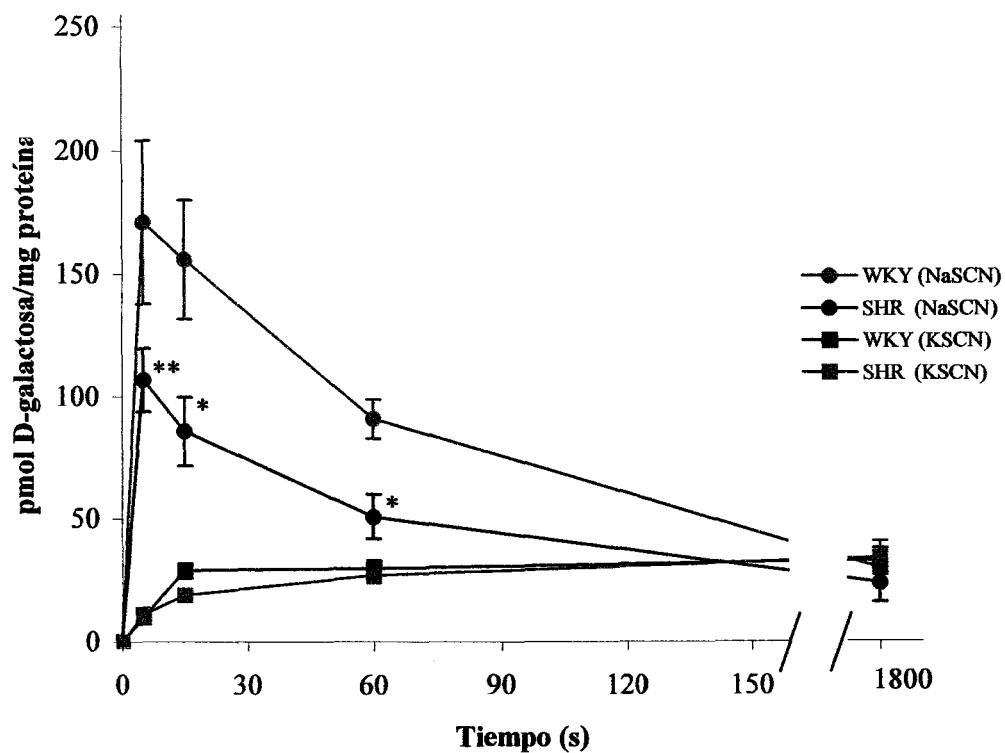


Figura 4.14. Transporte de D-galactosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 5$ aislamientos). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, comparado con ratas WKY.

galactosa procedentes de yeyuno e íleon, respectivamente, para los dos grupos experimentales. El transporte de D-galactosa (0,1 mmol/L), al igual que el de D-glucosa, es acumulativo en presencia de un gradiente de sodio. El máximo de acumulación se obtiene a los 5 segundos, tanto en yeyuno como en íleon, mientras que el equilibrio se alcanza a los 30 minutos. Esta acumulación es significativamente menor en las ratas SHR con respecto a las WKY, tanto en el yeyuno ($2,2 \pm 0,2$ veces y $3,9 \pm 0,2$ veces para SHR y WKY, respectivamente) como para el íleon ($2,2 \pm 0,5$ veces y $4,6 \pm 0,9$ veces para SHR y WKY, respectivamente) (Tabla 4.15).

La sustitución de un gradiente de NaSCN por un gradiente de KSCN, provoca la desaparición transitoria de la acumulación de este substrato, alcanzándose la condición de equilibrio a los 30 minutos. En este punto, se observan valores similares en los dos grupos de animales, tanto para el yeyuno como para el íleon, no existiendo diferencias en los valores de transporte obtenidos en presencia de NaSCN y KSCN. El flujo de D-galactosa obtenida en presencia de sodio es significativamente mayor para los tiempos de incubación 5 y 15 segundos en el yeyuno y 5, 15 y 60 segundos en el íleon de ratas WKY con respecto a las ratas SHR.

En las ratas normotensas el flujo inicial de transporte de D-galactosa es de $44 \pm 6,6$ pmol/mg proteína·s, para el yeyuno y 34 ± 6 pmol/mg proteína·s para el íleon, mientras que en las ratas hipertensas este flujo es significativamente menor ($25 \pm 2,8$ pmol/mg proteína·s y $16 \pm 1,5$ pmol/mg proteína·s, para el yeyuno e íleon, respectivamente) (Tabla 4.15.).

4.3.2.2. Constantes cinéticas del transporte de D-galactosa.

El estudio de los flujos de D-galactosa a tiempos de 5 segundos, a distintas concentraciones de este substrato, se muestran en las figuras 4.15. y 4.16. para el yeyuno y en las figuras 4.17. y 4.18. para el caso del íleon. Igual que en el caso de la D-glucosa, consideramos el mejor ajuste de las curvas cinéticas analizadas obteniendo

**VELOCIDAD INICIAL Y ACUMULACIÓN DE D-GALACTOSA PARA
YEYUNO E ÍLEON DE RATAS WKY Y SHR.**

	WKY	SHR
YEYUNO		
Velocidad inicial (pmol/mg proteína·s)	44,0 ± 6,6 (6)	25,0 ± 2,8* (6)
Acumulación (n° veces)	3,9 ± 0,2 (6)	2,2 ± 0,2** (6)
ÍLEON		
Velocidad inicial (pmol/mg proteína·s)	34,0 ± 6,0 (6)	16,0 ± 1,5** (6)
Acumulación (n°veces)	4,6 ± 0,9 (6)	2,2 ± 0,5** (6)

Tabla 4.15. Velocidades iniciales y acumulación de D-galactosa en vesículas de membranas apicales de yeyuno e ileon de ratas WKY y SHR. Las velocidades iniciales se expresan en picomoles por miligramos de proteína por segundo (pmol/mg proteína·s). Los resultados se expresan como media ± error estándar, y entre paréntesis el número de experimentos realizados. * P < 0,05, **P < 0.01, comparados con las ratas WKY.

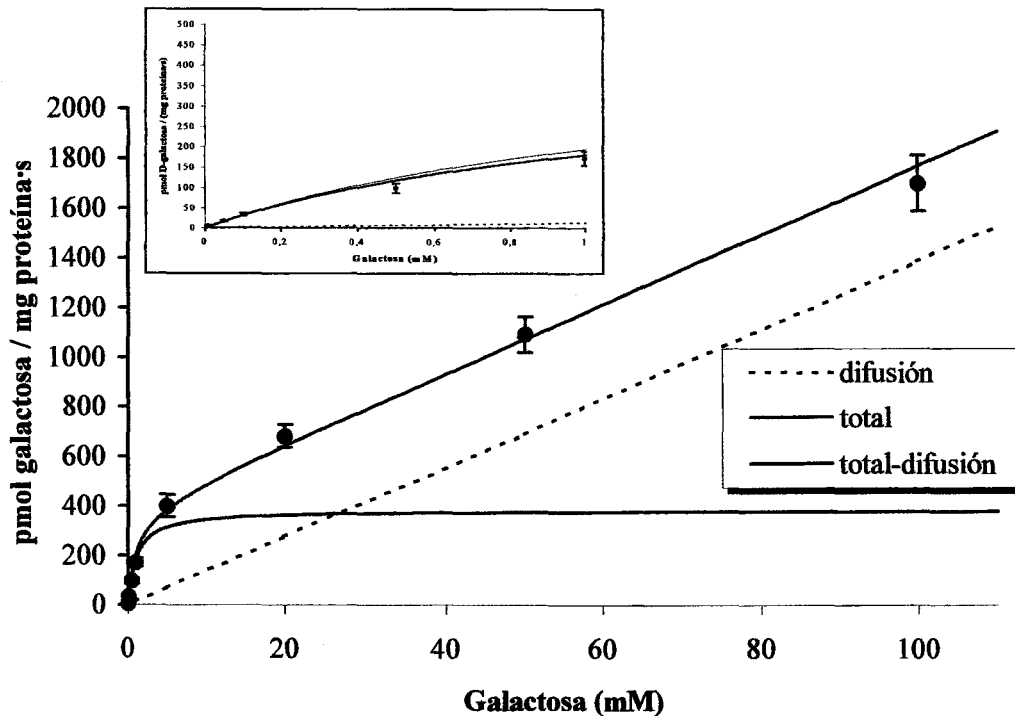


Figura 4.15. Curvas de cinética del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY. La concentración de D-galactosa empleada ha sido de 0,01-100 mmol/L, en un medio de incubación 100 mmol/L NaSCN. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 4$ experimentos).

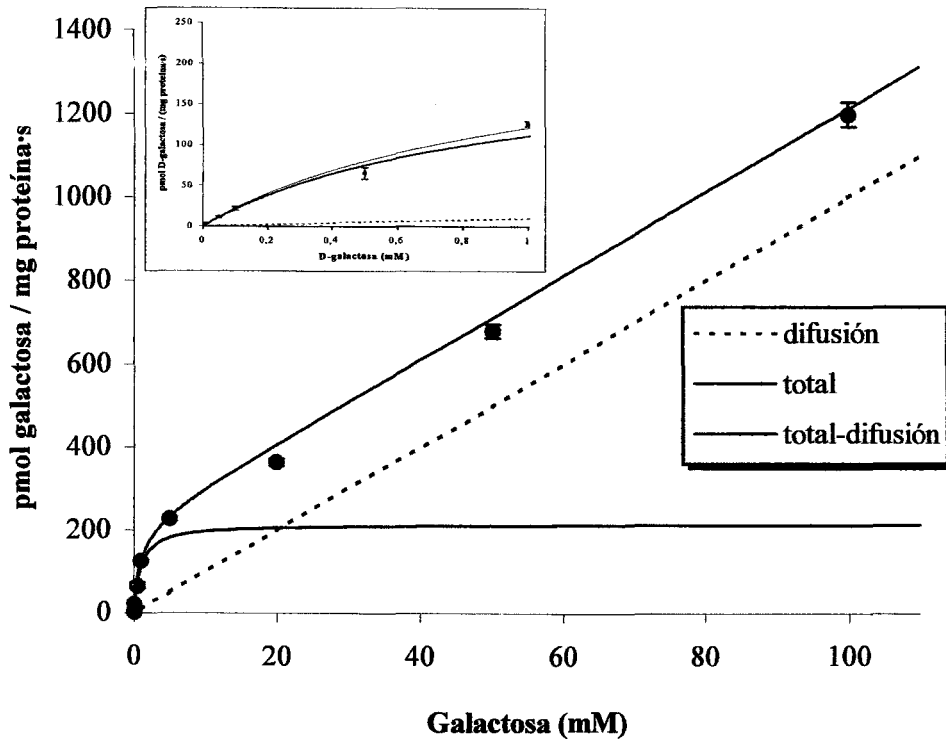


Figura 4.16. Curvas de cinética del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas SHR. La concentración de D-galactosa empleada ha sido de 0,01-100 mmol/L, en un medio de incubación 100 mmol/L NaSCN. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 4$ experimentos).

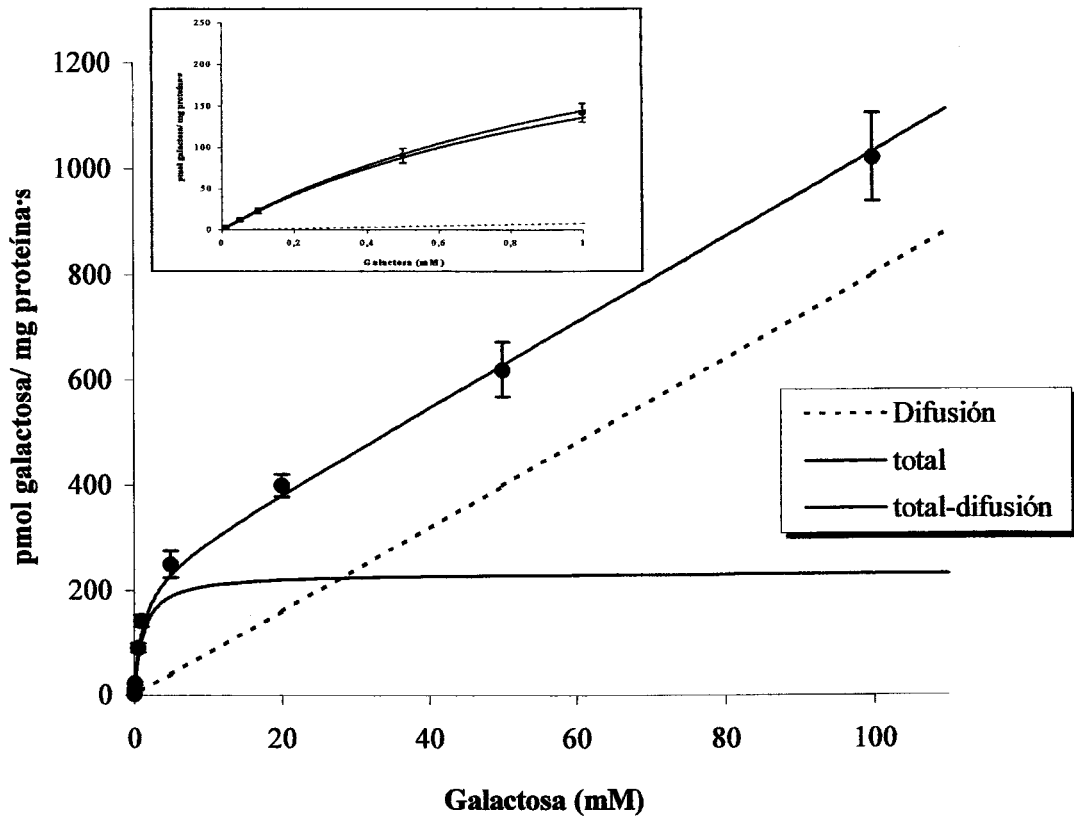


Figura 4.17. Curvas de cinética del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de ileon de ratas WKY. La concentración de D-galactosa empleada ha sido de 0,01-100 mmol/L, en un medio de incubación 100 mmol/L NaSCN. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 4$ experimentos).

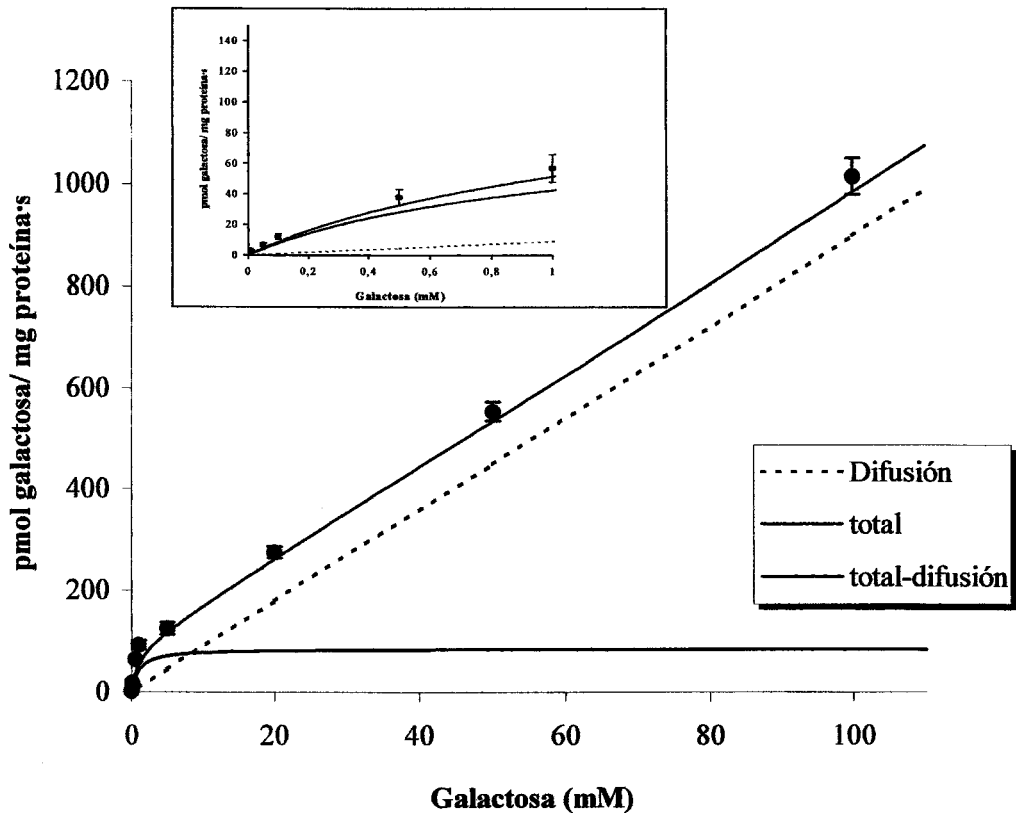


Figura 4.18. Curvas de cinética del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de ileon de ratas SHR. La concentración de D-galactosa empleada ha sido de 0,01-100 mmol/L, en un medio de incubación 100 mmol/L NaSCN. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 4$ experimentos).

**PARÁMETROS CINÉTICOS DEL TRANSPORTE DE D-GALACTOSA
EN YEYUNO E ÍLEON.**

	WKY	SHR
YEYUNO		
V_{\max} (pmol/mg proteína·s)	385 ± 44 (5)	190 ± 4* (5)
K_m (mM)	1,13 ± 0,02 (5)	0,93 ± 0,03 (5)
K_d (nL/mg proteína·s)	13,9 ± 0,4 (5)	9,7 ± 0,2 (5)
ÍLEON		
V_{\max} (pmol/mg proteína·s)	233 ± 25 (5)	85 ± 2*(5)
K_m (mM)	1,2 ± 0,13 (5)	1,04 ± 0,03 (5)
K_d (nL/mg proteína·s)	8,0 ± 0,3 (5)	9,0 ± 0,1 (5)

Tabla 4.16. Constantes cinéticas del transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales aisladas de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR. Las constantes han sido calculadas por regresión no lineal, a partir de las curvas cinéticas representadas en las figuras 4.15.-4.18.. Los valores de velocidad máxima (V_{\max}) se expresan en picomoles D-galactosa por cada miligramo de proteína y segundo; la constante de afinidad del sistema implicado (K_m) en milimoles/L y la constante de difusión (K_d), en nanolitros por cada miligramo de proteína y segundo. Los resultados están expresados como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de curvas ajustadas. Las diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de animales se indican mediante asteriscos: *P < 0,05 comparado con ratas WKY.

como resultado un sistema de transporte mediado más un componente no saturable (difusión simple). Los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la tabla 4.16. y nos indican que la capacidad de captación de este monosacárido se encuentra disminuida en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas, tanto en el yeyuno como en el íleon. La afinidad de este sistema en el yeyuno de ratas normotensas no se modifica con respecto a las ratas hipertensas, ocurriendo lo mismo en el íleon, en el que los valores de K_m no difieren significativamente entre los dos grupos de animales. Por lo que respecta a la constante de difusión, K_d , en el yeyuno presenta un valor ligeramente superior, aunque no significativo, en ratas normotensas con respecto a las hipertensas, no mostrándose ninguna diferencia en el íleon entre ambos grupos experimentales.

4.3.3. Caracterización del transporte de D-fructosa.

4.3.3.1. Transporte en función del tiempo.

El transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales para ratas WKY y SHR se muestra en las figuras 4.19. y 4.20. para el yeyuno e íleon, respectivamente. Los tiempos de incubación empleados son de 15 segundos, 1, 10 y 30 minutos. A diferencia del transporte de D-glucosa y D-galactosa, la captación de D-fructosa no presenta un máximo a corto tiempo de incubación, sino que aumenta progresivamente hasta alcanzar el equilibrio, a los 30 minutos, donde los valores de transporte son similares entre ambos grupos de animales, tanto para el yeyuno como para el íleon.

La captación de este monosacárido es significativamente más baja en las vesículas de yeyuno procedentes de ratas hipertensas para los tiempos de 15 segundos, 1 y 10 minutos de incubación, y a partir de este momento los valores tienden a igualarse entre los dos grupos, hasta alcanzar el equilibrio. En el caso del íleon la disminución en el transporte de D-fructosa es significativa a los 15 segundos y 1 minuto.

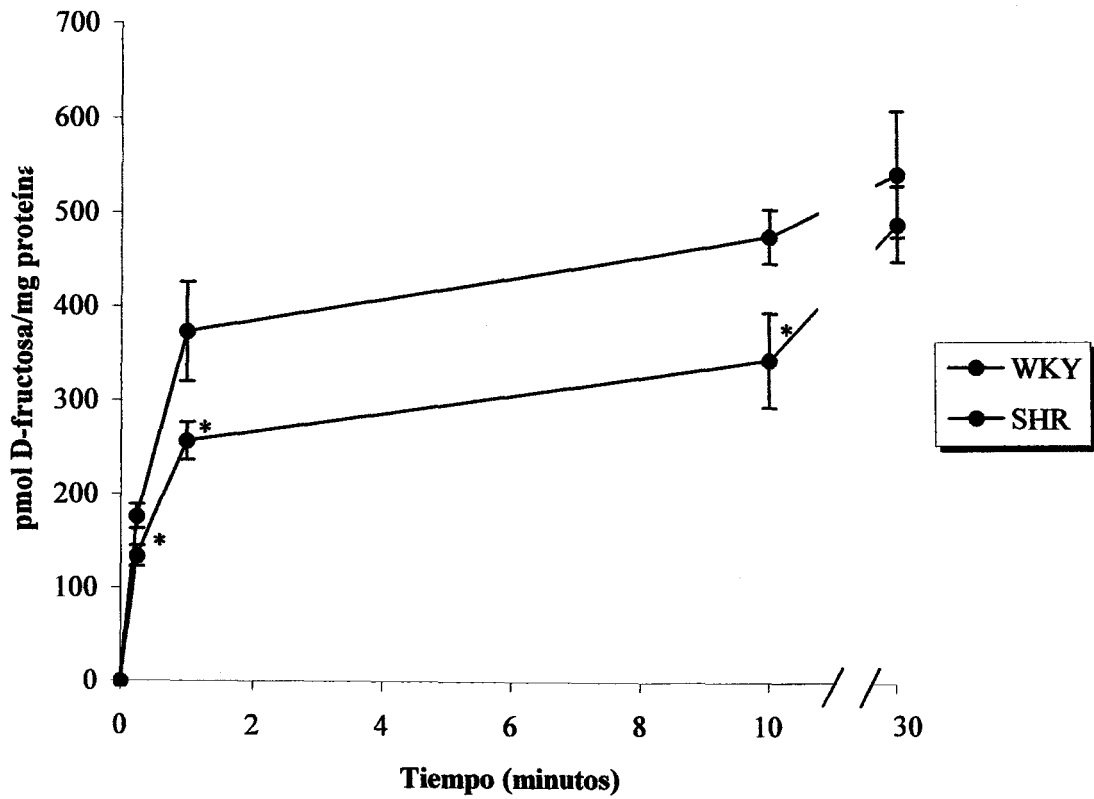


Figura 4.19. Transporte de D-fructosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 5 aislamientos). *P<0,05 comparadas con ratas WKY.

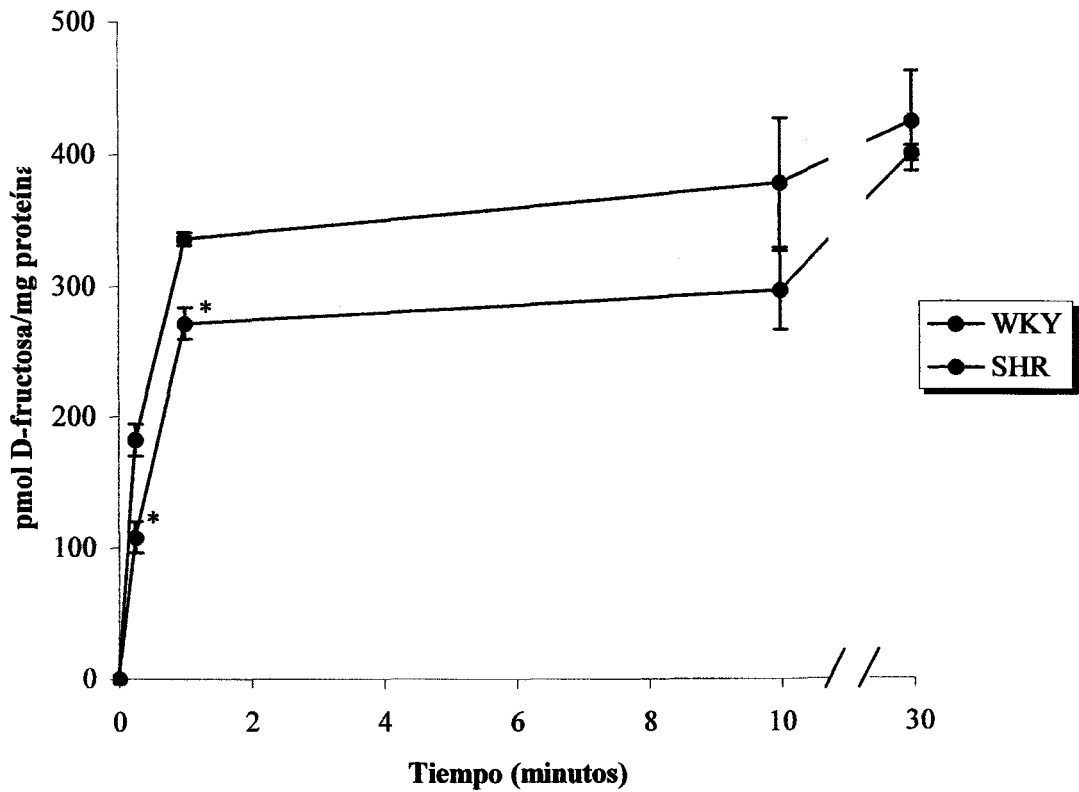


Figura 4.20. Transporte de D-fructosa a diferentes tiempos de incubación en vesículas de membranas apicales procedentes de ileon de ratas WKY y SHR.

Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 6 aislamientos).

*P < 0,05 comparadas con ratas WKY.

4.3.3.2. Especificidad de sustrato para el transportador de la D-fructosa

La especificidad del transportador de la D-fructosa para las ratas WKY y SHR se muestra en las figuras 4.21. y 4.22. para el caso del yeyuno e íleon, respectivamente. Como puede observarse la presencia de altas concentraciones de D-glucosa y D-galactosa (10 y 100 mmol/L), de citocalasina B (0,05 mmol/L) y de florricina (0,25 mmol/L), no ejercen ningún efecto inhibitor sobre el flujo inicial de D-fructosa (1 mmol/L) en los dos grupos experimentales de animales y para los dos segmentos estudiados. La inhibición de este transporte sólo se obtiene mediante la autoinhibición, empleando el propio sustrato como inhibidor a altas concentraciones (D-fructosa 100 y 300 mmol/L), en ratas WKY y SHR tanto en el yeyuno (figura 4.21.) como en el íleon (figura 4.22.).

4.3.3.3. Constantes cinéticas del transporte de D-fructosa.

Las figuras 4.23.-4.26. muestran la captación de D-fructosa, en condiciones de flujo inicial, frente a la concentración de sustrato, realizadas en ratas normotensas e hipertensas, tanto en yeyuno (figuras 4.23. y 4.24.) como en íleon (figuras 4.25. y 4.26.). En este caso el mejor ajuste de las curvas se obtiene al aplicar un único sistema de transporte mediado más un componente difusional no saturable. En la tabla 4.17. se reflejan los parámetros cinéticos calculados por regresión no lineal de las curvas, en yeyuno e íleon. La capacidad del sistema GLUT5 para transportar D-fructosa es significativamente más baja en las ratas hipertensas que en las normotensas. Por el contrario, la afinidad hacia la fructosa no se modifica por la hipertensión así como tampoco se observan diferencias significativas en cuanto a los valores de K_d obtenidos entre uno y otro grupo de animales ni en yeyuno ni en íleon.

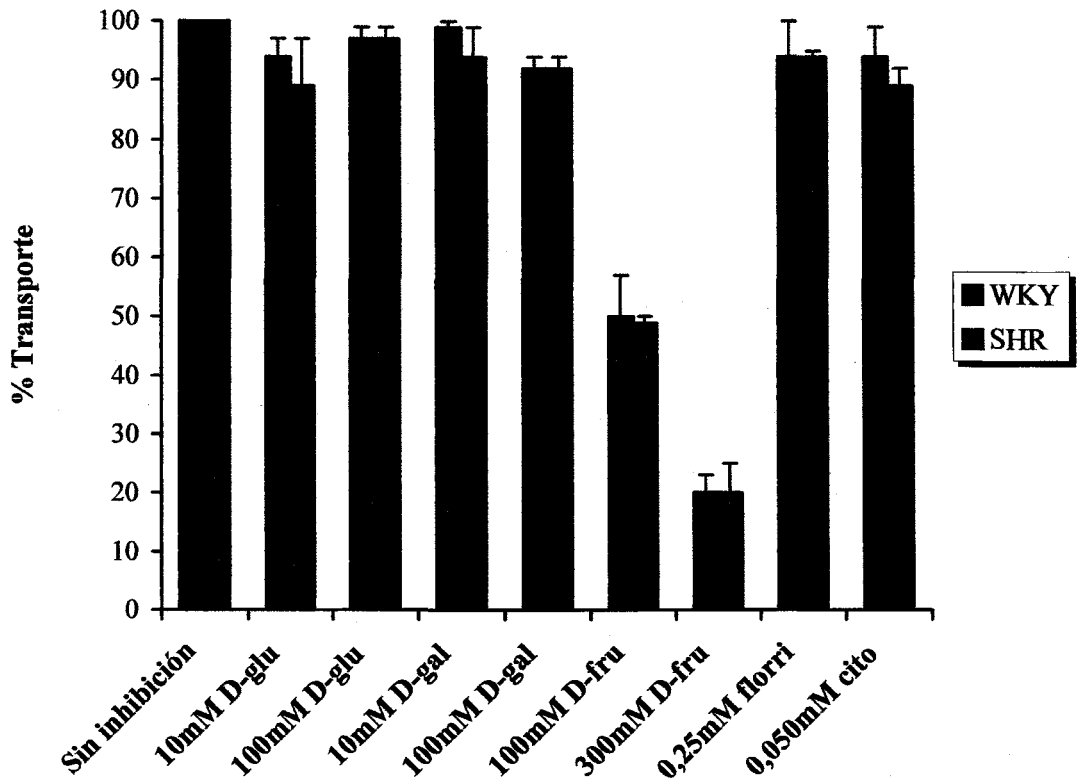


Figura 4.21. *Cis*-inhibición del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY y SHR. Los substratos ensayados como inhibidores han sido D-glucosa (D-glu), D-galactosa (D-gal), citocalasina B (cito), florricina (florri), y D-fructosa (D-fru), a las concentraciones indicadas. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 3$ aislamientos).

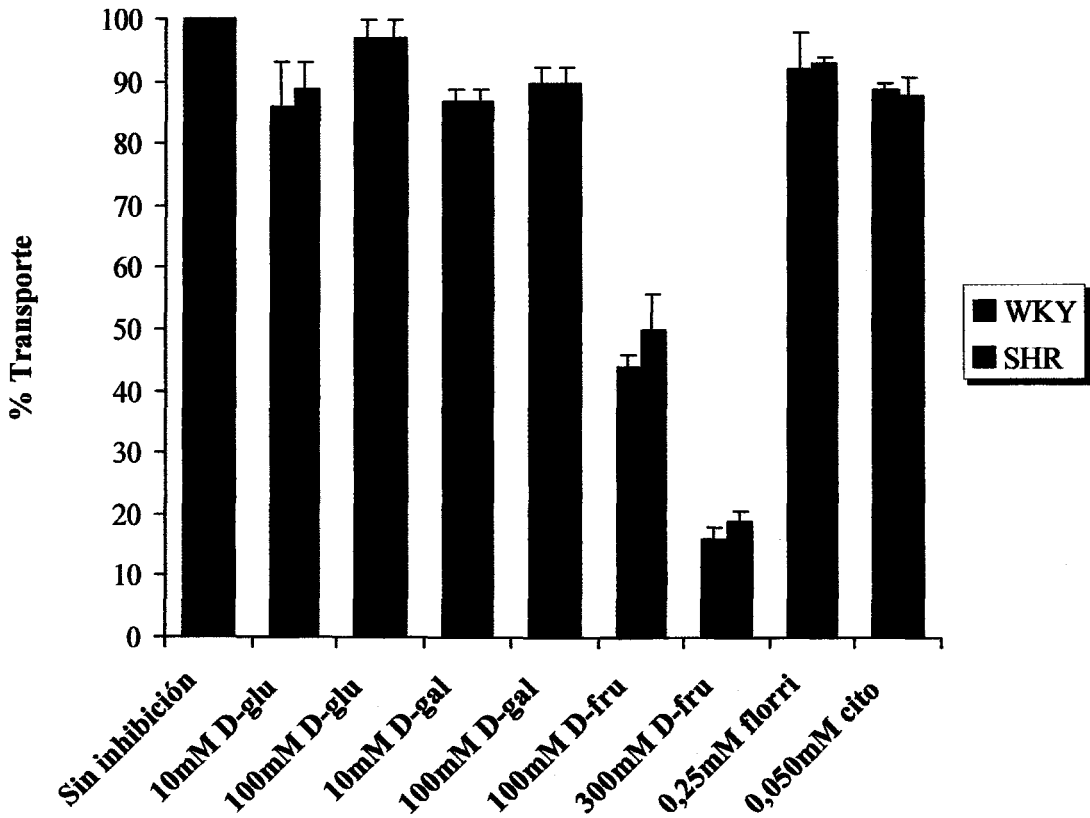


Figura 4.22. *Cis*-inhibición del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY y SHR. Los substratos ensayados como inhibidores han sido D-glucosa (D-glu), D-galactosa (D-gal), citocalasina B (cito), florricina (florri), y D-fructosa (D-fru), a las concentraciones indicadas. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 3 aislamientos).

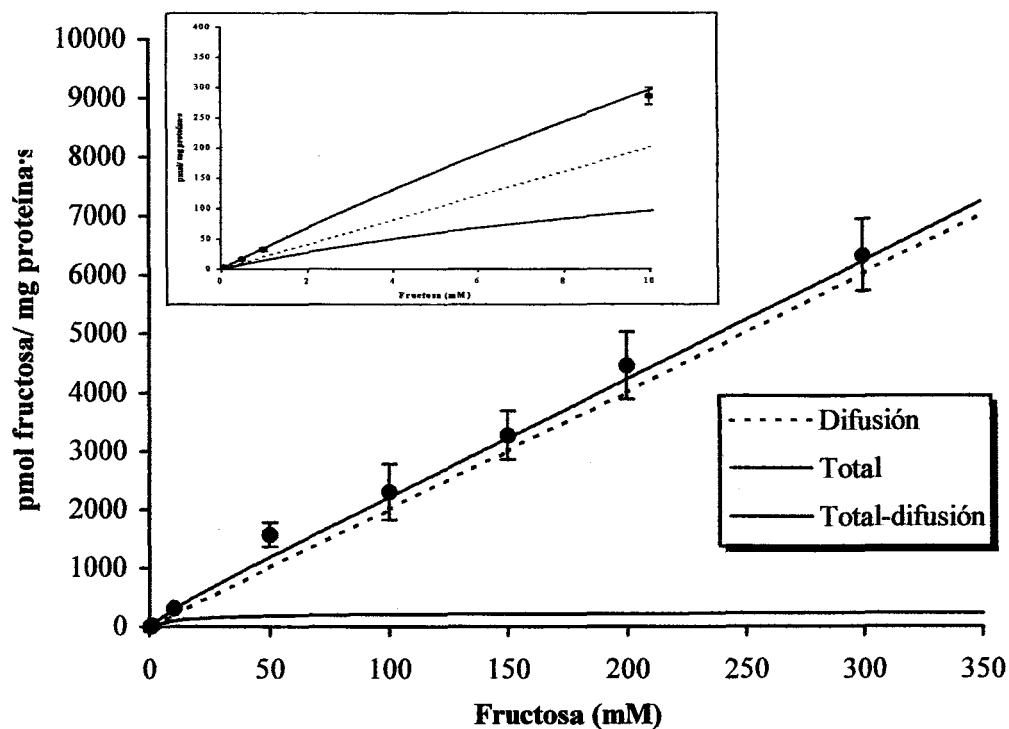


Figura 4.23. Curvas de cinética del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de ayuno de ratas WKY. La concentración de D-fructosa empleada ha sido de 0,1-300 mmol/L. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 4 experimentos)

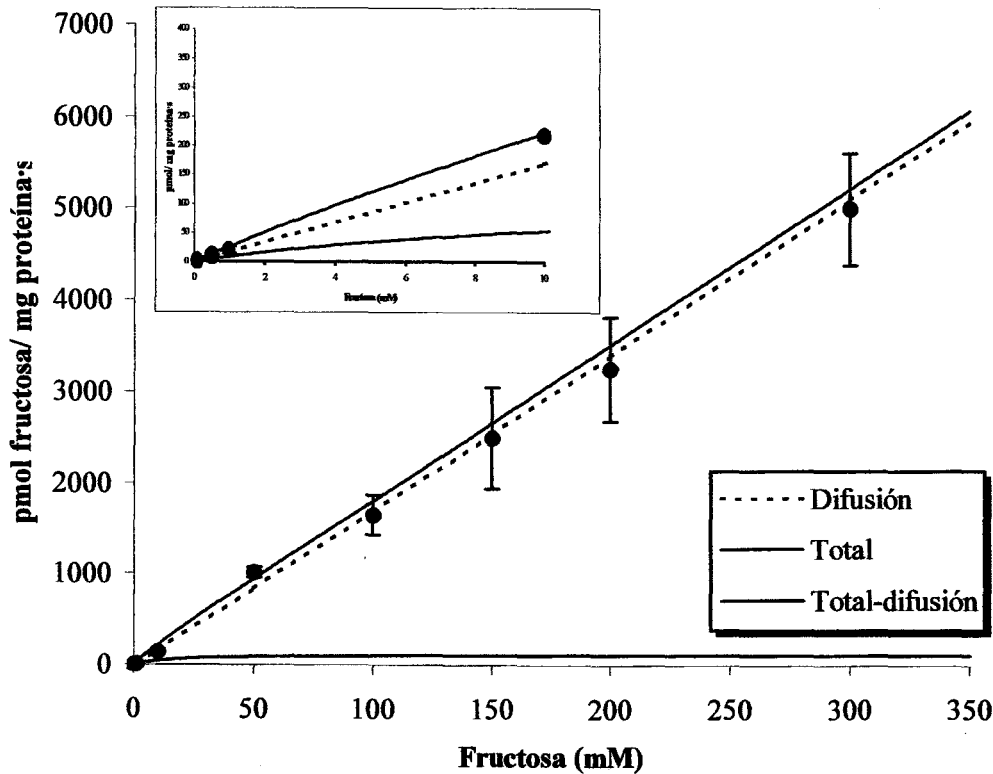


Figura 4.24. Curvas de cinética del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas SHR. La concentración de D-fructosa empleada ha sido de 0,1-300 mmol/L. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 4 experimentos)

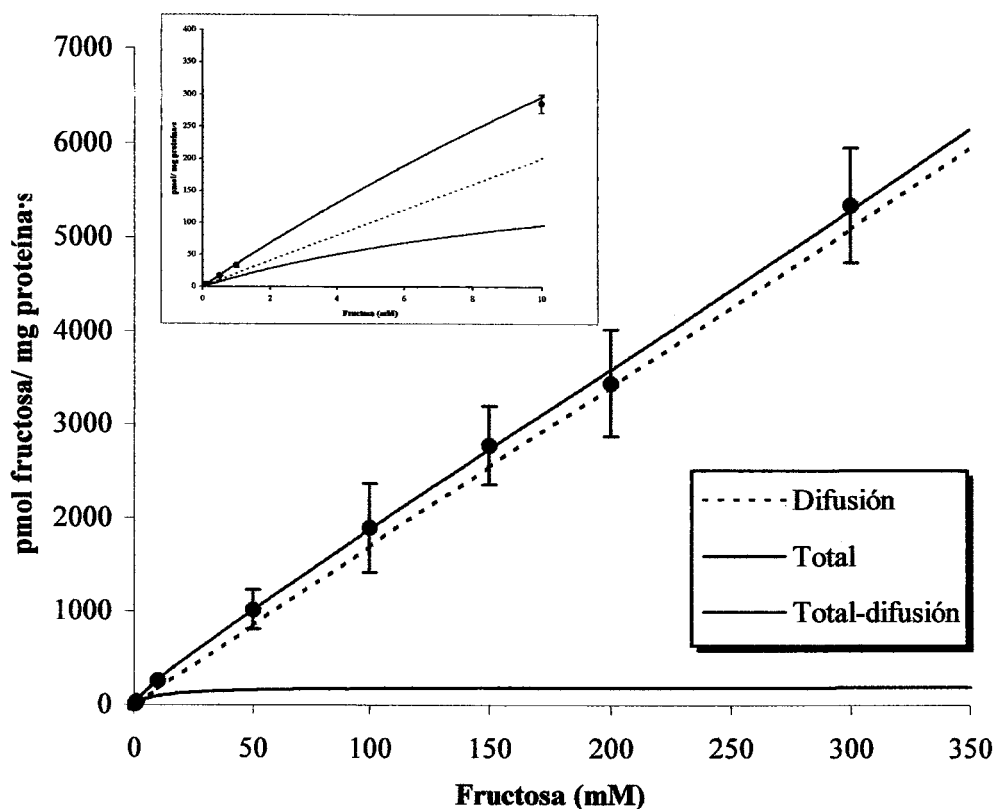


Figura 4.25. Curvas de cinética del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de ileon de ratas WKY. La concentración de D-fructosa empleada ha sido de 0,1-300 mmol/L. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 4 experimentos)

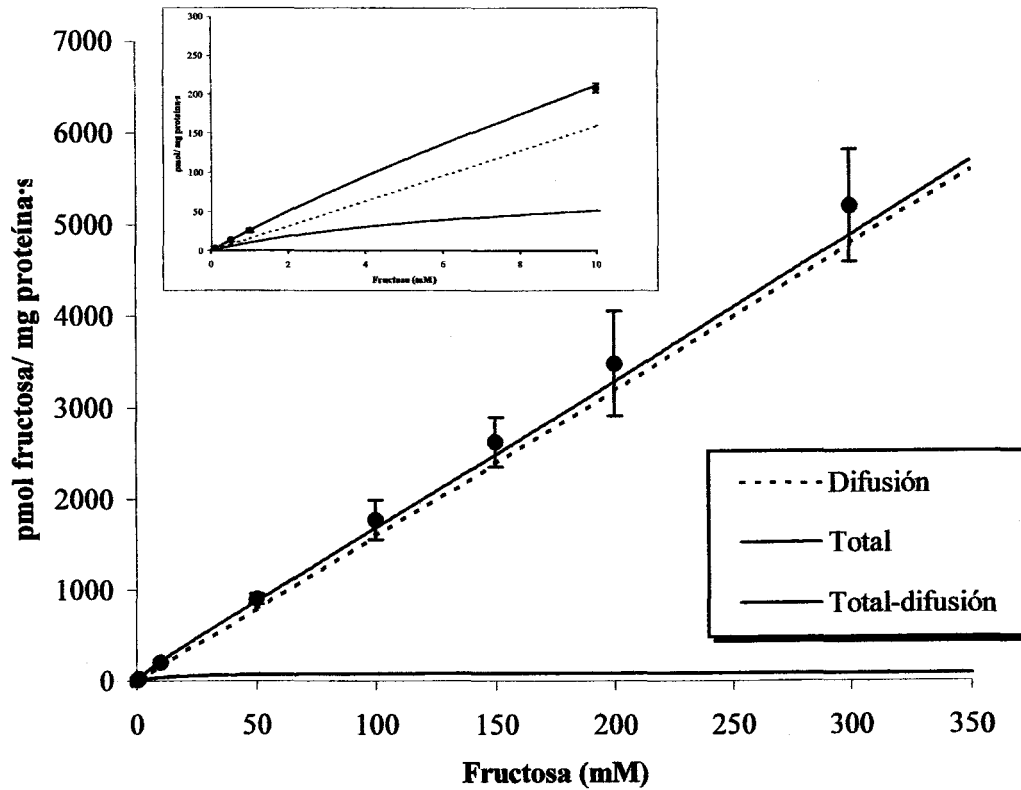


Figura 4.26. Curvas de cinética del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de fleon de ratas SHR. La concentración de D-fructosa empleada ha sido de 0,1-300 mmol/L. Las curvas se han representado a partir de las ecuaciones definidas por los valores medios de las constantes cinéticas, calculadas mediante ajuste por regresión no lineal de las curvas obtenidas en cada experimento por separado. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (n = 4 experimentos)

**PARÁMETROS CINÉTICOS DEL TRANSPORTE DE D-FRUCTOSA EN
YEYUNO E ÍLEON.**

	WKY	SHR
YEYUNO		
V_{\max} (pmol/mg proteína·s)	240 ± 20 (4)	120 ± 15 (4)*
K_m (mmol/L)	15 ± 2 (4)	13 ± 2 (4)
K_d (nL/mg proteína·s)	20 ± 3 (4)	17 ± 3 (4)
ÍLEON		
V_{\max} (pmol/mg proteína·s)	196 ± 12 (4)	92 ± 10 (4)*
K_m (mmol/L)	11 ± 3 (4)	8 ± 3 (4)
K_d (nL/mg proteína·s)	17 ± 2 (4)	16 ± 1 (4)

Tabla 4.17. Constantes cinéticas del transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales aisladas de yeyuno e íleon de ratas WKY Y SHR. Las constantes han sido calculadas por regresión no lineal, a partir de las curvas cinéticas representadas en las figuras 4.23.–4.26. Los valores de velocidad máxima (V_{\max}) se expresan en picomoles de D-fructosa captados por las vesículas por cada miligramo de proteína y segundo; la constante de afinidad del sistema de transporte implicado (K_m) en milimoles/L y la constante de difusión de D-fructosa a través de la membrana apical (K_d), en nanolitros por cada miligramo de proteína y segundo. Los resultados están expresados como media ± error estándar, y entre paréntesis se indica el número de curvas ajustadas. Las diferencias estadísticamente significativa entre los dos grupos de animales se indican mediante asteriscos: *P < 0,05 comparado con ratas WKY.

4.4. EFECTO DE LA OSMOLARIDAD EXTRAVESICULAR SOBRE EL TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS.

Las figuras 4.27.-4.32. muestran la captación de D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa, en vesículas de yeyuno (figuras 4.27.-4.29.) e íleon (figuras 4.30.-4.32.) de ratas WKY, medida a diferentes osmolaridades extravésiculares. Tanto en el yeyuno como en el íleon, las pendientes positivas de las rectas de regresión calculadas indican que la capacidad de captación de los distintos monosacáridos por las vesículas varían en función de la osmolaridad externa y del volumen de las mismas, verificándose así que estos azúcares son transportados hacia el interior de las vesículas.

Al extrapolar las rectas de regresión hasta el eje de ordenadas se obtienen puntos de corte, ordenadas en el origen de estas rectas, cuyos valores representan la cantidad de sustrato que queda unida a la membrana de las vesículas cuando el transporte ha alcanzado el equilibrio, ya que en condiciones de osmolaridad infinita el volumen vesicular es nulo. Los valores obtenidos, expresados en pmol/mg proteína · 30 minutos, son en el yeyuno de ratas WKY 1.2 ± 0.1 ; 1.8 ± 0.2 y 1.2 ± 0.12 , para la D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa, respectivamente; y en el caso del íleon 3.2 ± 0.2 ; 1.1 ± 0.2 y 4.8 ± 0.4 para la D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa, respectivamente.

4.5. ESTUDIOS DE FLUIDEZ DE MEMBRANA.

El estudio de la fluidez de las membranas apicales obtenidas de yeyuno e íleon de ratas normotensas e hipertensas, ha sido determinada por medio de la inclusión de DPH en las mismas. En la tabla 4.18. se muestran los valores de la polarización de fluorescencia (P_{DPH}) y de la anisotropía de fluorescencia (r_s) en el estado estacionario, originados por el movimiento de las moléculas de DPH ancladas en las membranas. Como puede observarse, no existen modificaciones significativas en ambos parámetros entre las ratas WKY y SHR, tanto para el yeyuno como para el íleon, valores que nos indican una similitud en la microviscosidad de las membranas apicales entre las ratas normotensas e hipertensas en ambos segmentos sometidos a estudio.

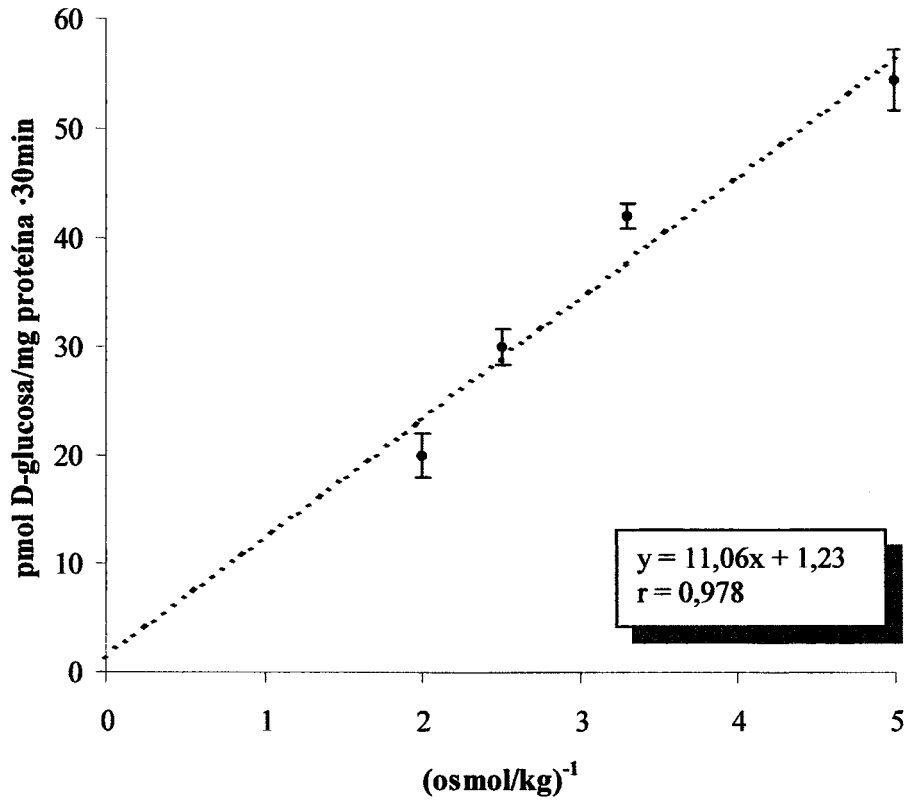


Figura 4.27. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY. Los resultados se expresan como media \pm error estándar (n = 3 aislamientos). La ecuación de la recta, representada mediante una línea discontinua se ha calculado por regresión lineal.

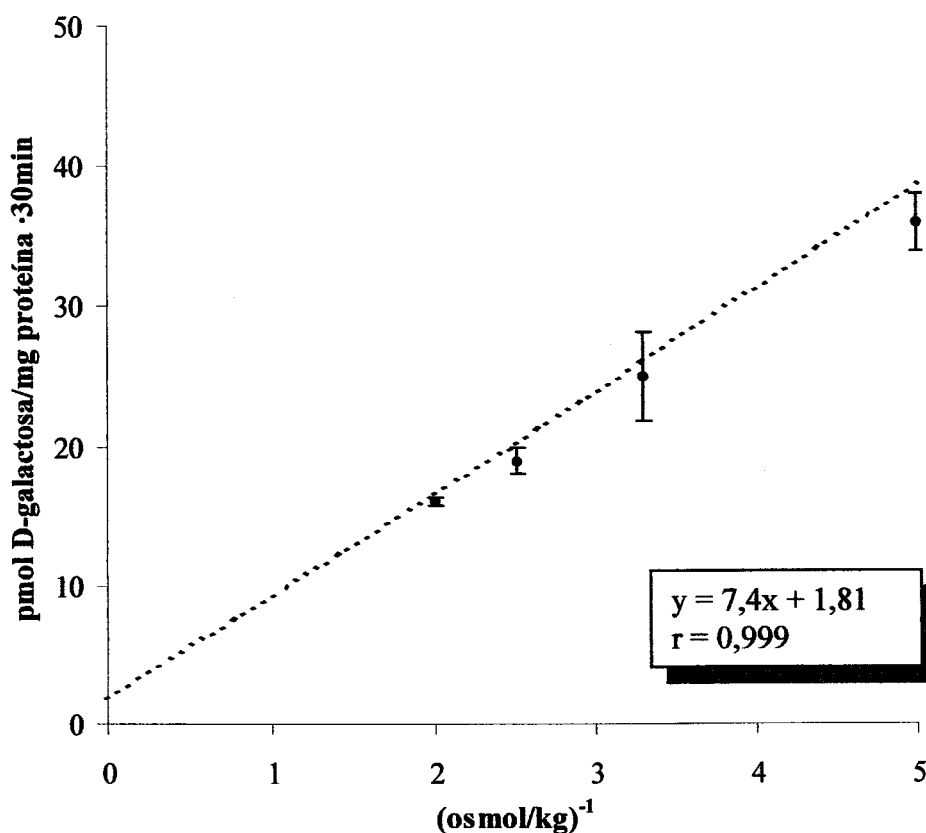


Figura 4.28. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de yeyuno de ratas WKY. Los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 3$ aislamientos). La ecuación de la recta, representada mediante una línea discontinua se ha calculado por regresión lineal.

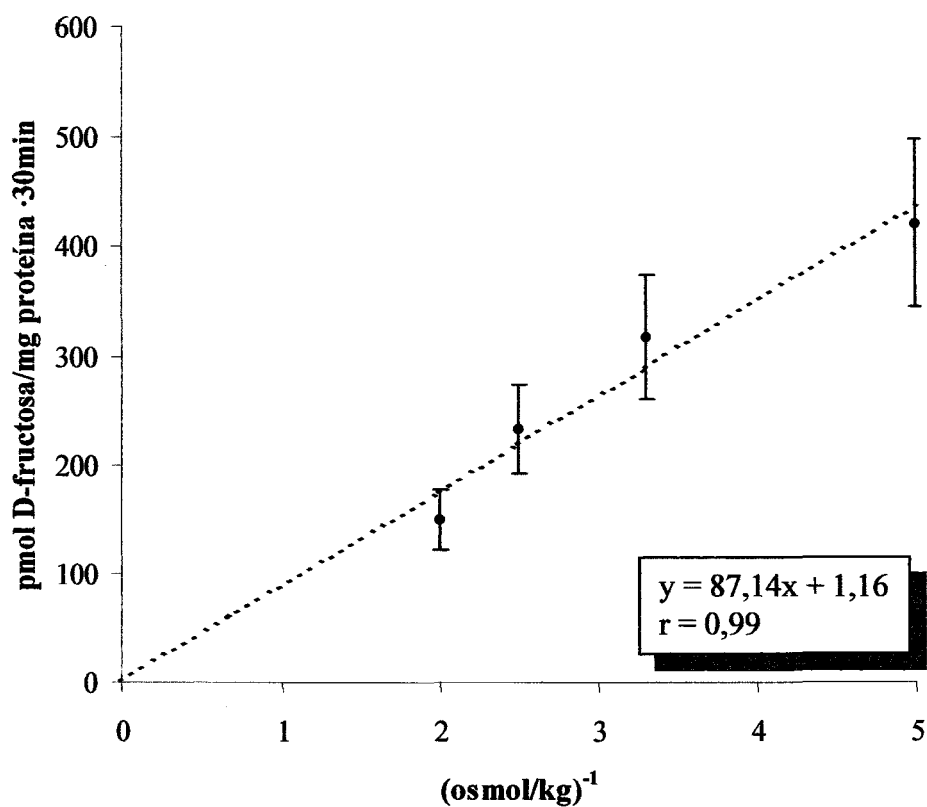


Figura 4.29. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales de yeyuno de ratas WKY. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 3$ aislamientos). La ecuación de la recta, representada mediante una línea discontinua, se ha calculado por regresión lineal.

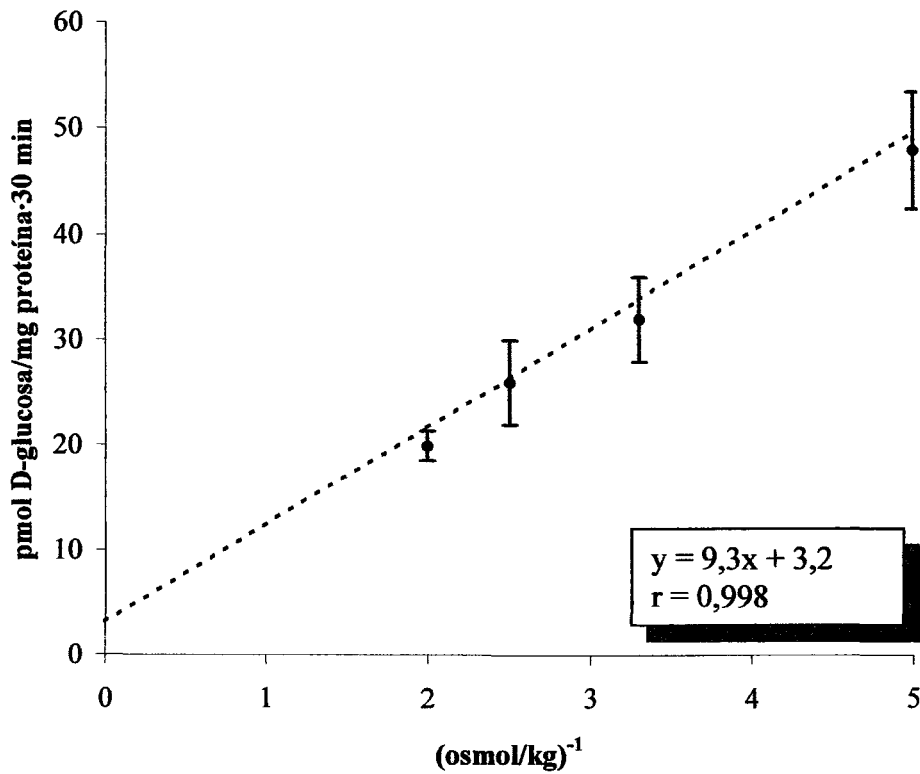


Figura 4.30. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-glucosa en vesículas de membranas apicales procedentes de ileon de ratas WKY. Los resultados están expresados como media \pm error estándar ($n = 3$ aislamientos). La ecuación de la recta representada mediante una línea discontinua se ha calculado por regresión lineal.

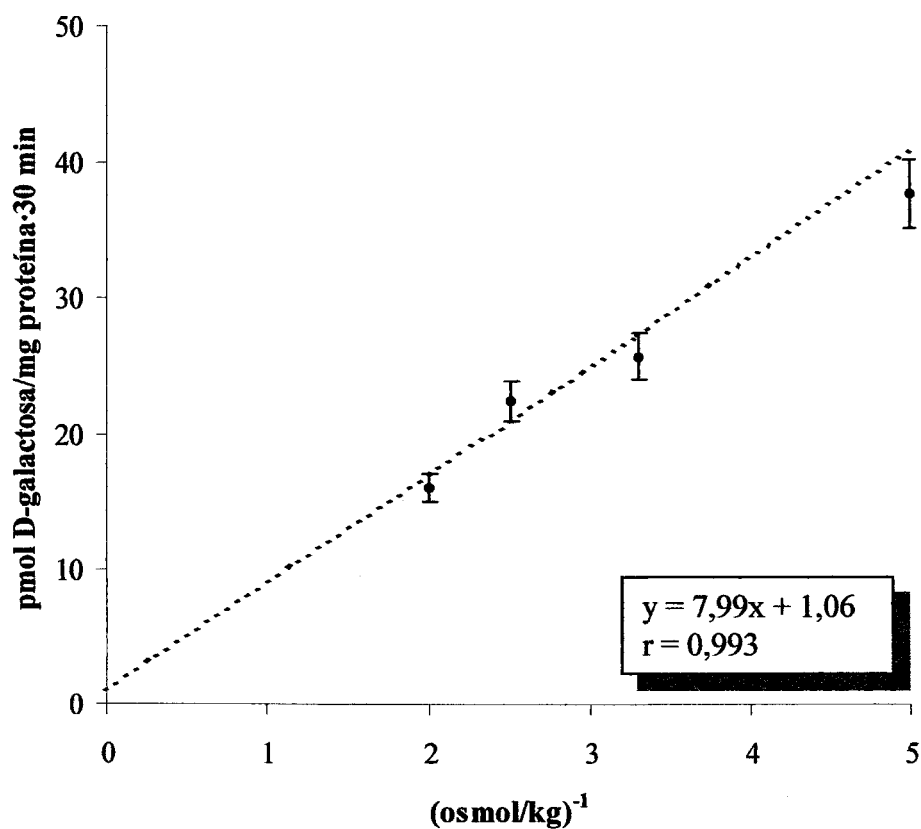


Figura 4.31. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-galactosa en vesículas de membranas apicales procedentes de fleón de ratas WKY. Los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 3$ aislamientos). La ecuación de la recta representada mediante una línea discontinua se ha calculado por regresión lineal.

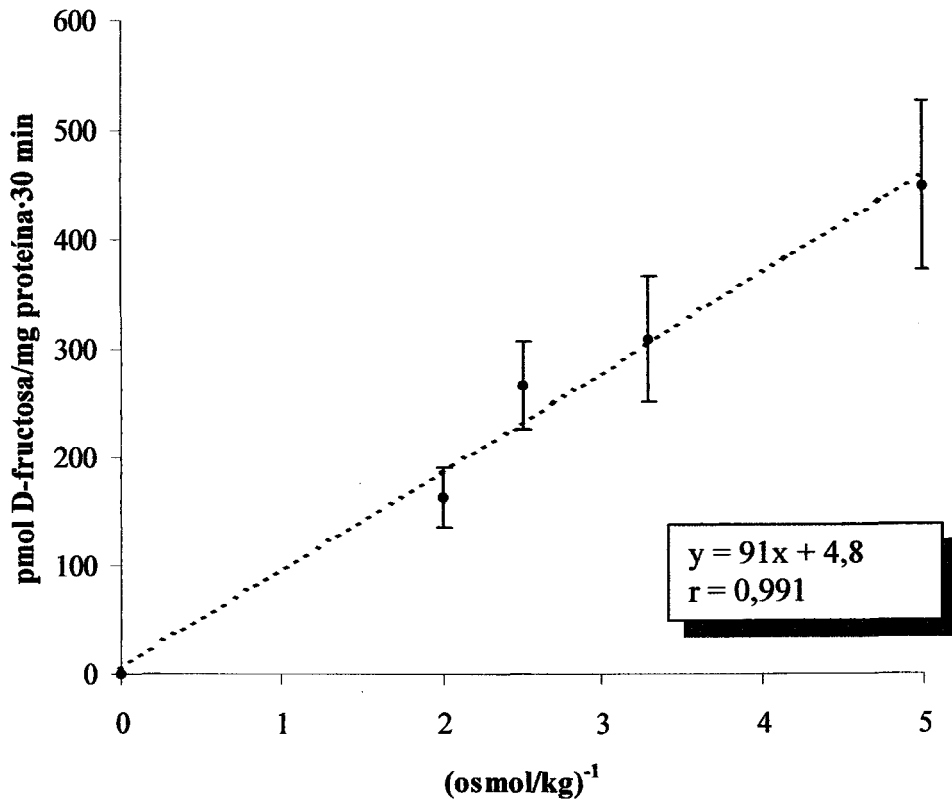


Figura 4.32. Efecto de la osmolaridad extravesicular sobre el transporte de D-fructosa en vesículas de membranas apicales procedentes de íleon de ratas WKY. Los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n = 3$ aislamientos). La ecuación de la recta representada mediante una línea discontinua se ha calculado por regresión lineal.

POLARIZACIÓN Y ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA EN MEMBRANAS APICALES PROCEDENTES DE YEYUNO E ÍLEON.

	P_{DPH}	r_s
YEYUNO		
WKY	$0,36 \pm 0,008$ (8)	$0,27 \pm 0,007$ (8)
SHR	$0,37 \pm 0,007$ (8)	$0,28 \pm 0,007$ (8)
ÍLEON		
WKY	$0,36 \pm 0,009$ (9)	$0,27 \pm 0,007$ (9)
SHR	$0,38 \pm 0,007$ (9)	$0,29 \pm 0,006$ (9)

Tabla 4.18. Polarización de fluorescencia (P_{DPH}) y anisotropía de fluorescencia (r_s) en el estado estacionario, en membranas apicales procedentes de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR. Los valores se han obtenido mediante incursión de trans-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) en las membranas, siendo las longitudes de onda de excitación y emisión 365 y 430 nm, respectivamente. Los resultados están expresados como media \pm error estándar, indicándose entre paréntesis el número de muestras analizadas. No existen diferencias estadísticamente significativas para estos parámetros entre yeyuno e íleon, ni para ambos grupos de animales.

4.6. ESTUDIO MICROSCÓPICO.

4.6.1. Análisis estructural.

En las figuras 4.33. y 4.34. se muestran secciones semifinas procedentes de yeyuno (figura 4.33.) e íleon (figura 4.34.) de ratas normotensas e hipertensas. En las ratas normotensas, las vellosidades intestinales presentan su forma digitiforme característica, regularmente repartidas a lo largo de todo el epitelio, tanto en el yeyuno (figura 4.33.a) como en el íleon (figura 4.34.a). Por el contrario, las ratas hipertensas presentan alteraciones en la morfología de las vellosidades intestinales. Para el caso del yeyuno, una gran variedad de formas aparecen en las vellosidades y pueden observarse vellosidades indentadas, globulares, con deformaciones en las puntas y aparentemente unidas por su base (figura 4.33.b). En el íleon, la modificación morfológica se manifiesta por un aparente incremento en la anchura de toda la vellosidad, adquiriendo la punta forma de meseta (figura 4.34.b).

4.6.2. Análisis ultraestructural.

El estudio ultraestructural muestra que los enterocitos de las ratas normotensas mantienen la integridad de las microvellosidades tanto en el yeyuno (figuras 4.35.a) como en el íleon (figura 4.36.a). Por el contrario, los enterocitos de las ratas hipertensas, tanto del yeyuno (figura 4.35.b) como del íleon (figura 4.36.b), presentan zonas con pérdidas de microvellosidades. No se observan modificaciones en el área lateral así como en las uniones intercelulares de los enterocitos en las ratas hipertensas en los dos segmentos estudiados (fig. 4.35.b. y 4.36.b).

4.6.3. Estudio inmunohistoquímico.

Secciones semifinas, similares a las empleadas en el estudio estructural del intestino, fueron utilizadas para la inmunolocalización de la proteína SGLT1 en el yeyuno (figura 4.33.) e íleon (figura 4.34.) de ratas WKY y SHR. El marcaje

correspondiente a la localización de la proteína SGLT1 aparece de forma continuada a lo largo de toda la superficie de la vellosidad del yeyuno (figura 4.33.c, 4.33.d) e íleon (figura 4.34.c, y 4.34.d), estando ausente en las criptas. Aparentemente, no se aprecian diferencias significativas en la intensidad y localización del marcaje entre ambos grupos de animales ni entre los dos segmentos de intestino estudiados. Las incubaciones en ausencia del primer anticuerpo suprimió el marcaje de la proteína en estudio tanto en el yeyuno (figura 4.33.e) como en el íleon (figura 4.34. e).

4.3.4. Estudios de inmunocitoquímica.

El estudio inmunocitoquímico de la proteína SGLT1 se muestra en las figuras 4.35.c-e para el yeyuno y 4.36.c-e para el íleon. En la ratas normotensas aparece el marcaje de la proteína, por tanto existencia del cotransportador, en las microvellosidades de los enterocitos correspondientes al yeyuno (figura 4.35.c) e íleon (figura 4.36.c). Por el contrario, en las ratas hipertensas no se observa la presencia de la proteína SGLT1 en aquellas zonas de los enterocitos con pérdidas de microvellosidades, tanto en el yeyuno (figura 4.35.d) como en el íleon (figura 4.36.d). Sin embargo, en aquellas zonas adyacentes donde existen microvellosidades, se mantiene el marcaje y por tanto la presencia de la proteína SGLT1, en ambos segmentos intestinales. Estudios realizados en ausencia del anticuerpo anti-SGLT1 suprimió el marcaje de la proteína en estudio (figura 4.35.e y 4.36.e, para el yeyuno e íleon, respectivamente).

Figura 4.33. Estructura e inmunolocalización al microscopio óptico del epitelio de yeyuno de ratas WKY y SHR. La micrografía (a) expone la estructura de las vellosidades pertenecientes al epitelio de yeyuno de rata WKY, la micrografía (b), muestra la perteneciente al epitelio de ratas SHR. En las micrografías (c) y (d) se muestra la inmunolocalización de la proteína SGLT1 a lo largo del epitelio de yeyuno de rata WKY (c) y SHR (d). Las flechas (—▶) indican la superficie apical donde se registra el marcaje de la proteína y el indicador (◀) las zonas de la cripta donde no existe marcaje. La micrografía (e), pertenece al control realizado en ausencia del primer anticuerpo para las ratas WKY. V = vellosidad. Barra de escala: a y b = 50 μm , c, d, y e = 20 μm .

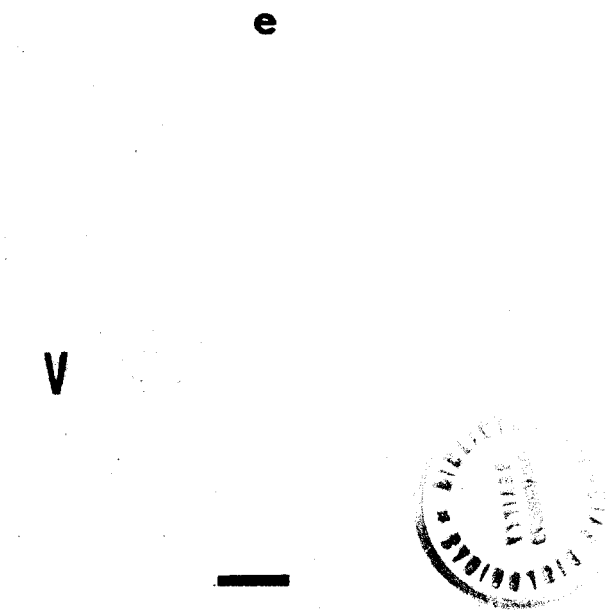
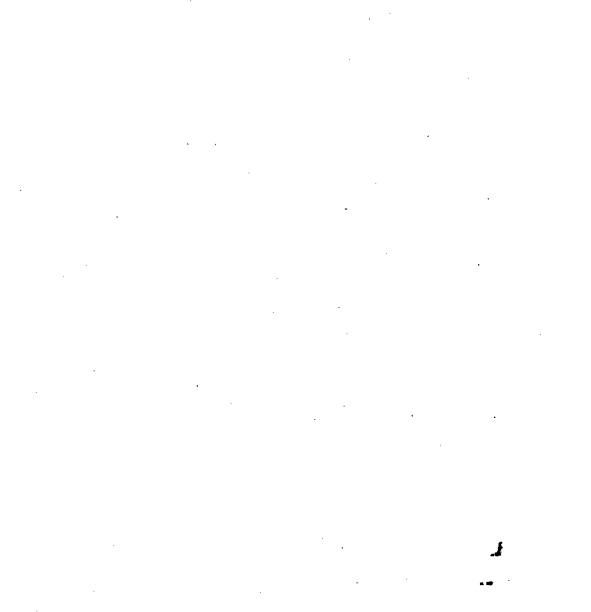
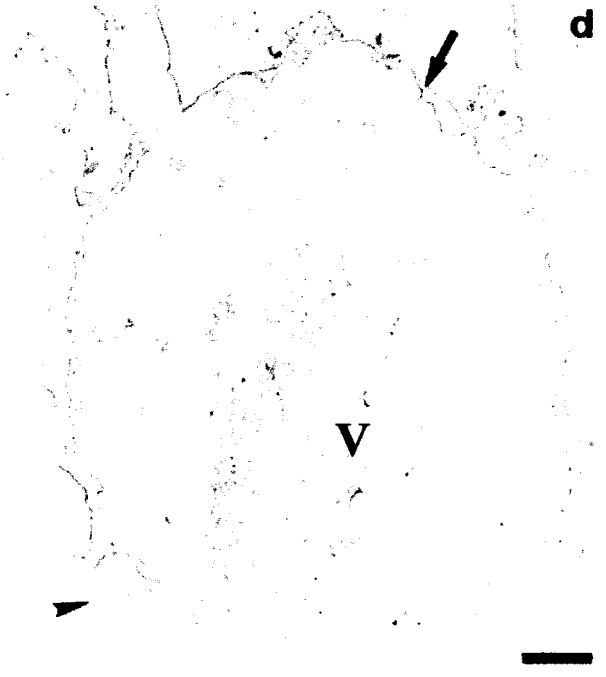
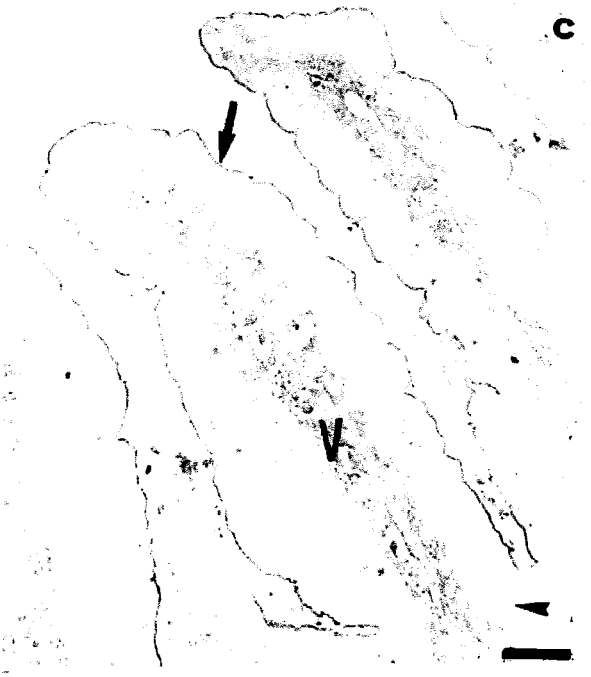


Figura 4.34. Estructura e inmunolocalización de la proteína SGLT1 a microscopía óptica, del epitelio de íleon de ratas WKY y SHR. La micrografía (a) expone la estructura de las vellosidades pertenecientes al epitelio de ratas WKY y la micrografía (b) muestra la perteneciente a ratas SHR. En las micrografías (c) y (d) se muestra la inmunolocalización de la proteína SGLT1 a lo largo del epitelio de íleon de ratas WKY (c) y SHR (d). Las flechas (—▶), indican la superficie apical donde se registra el marcaje de la proteína y el indicador (.▶) las zonas de la cripta donde no existe marcaje. La micrografía (e), pertenece al control realizado en ausencia del primer anticuerpo para las ratas WKY. V = vellosidad. Barra de escala: a y b = 50 μm , c, d, y e = 20 μm .

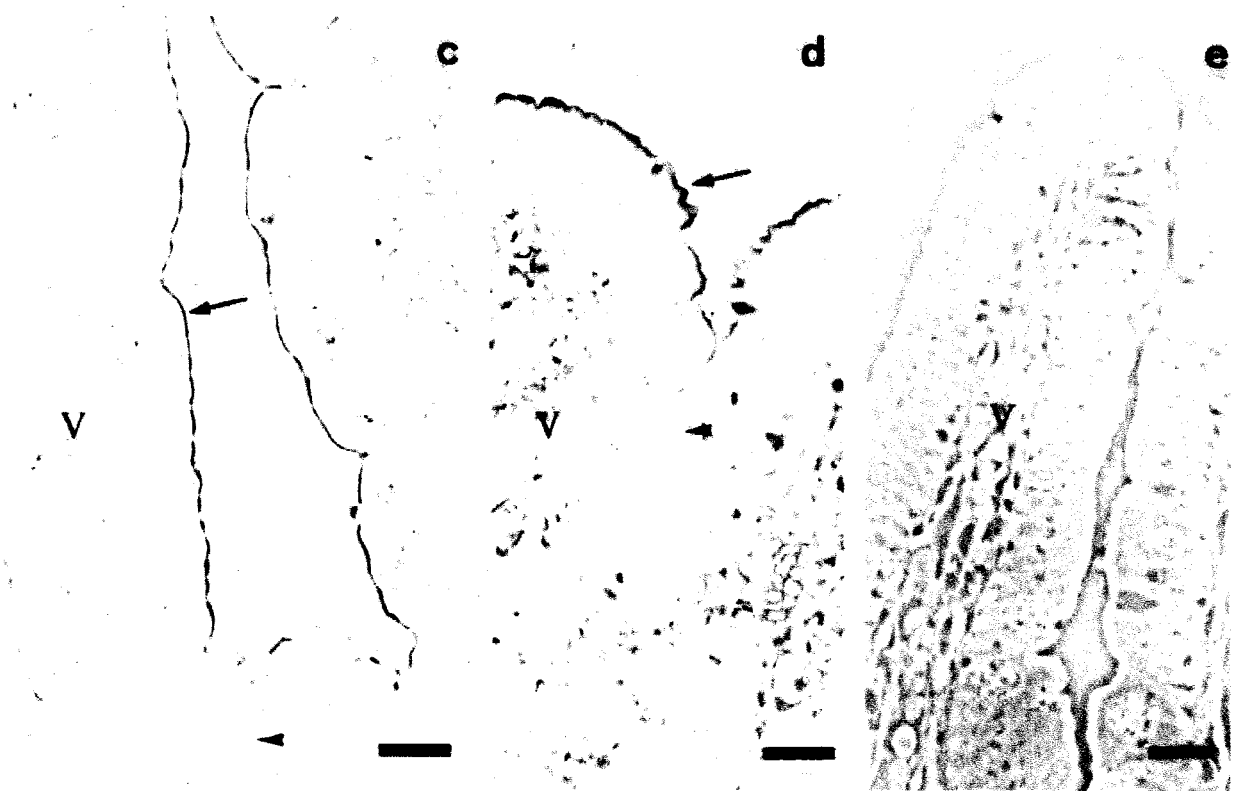
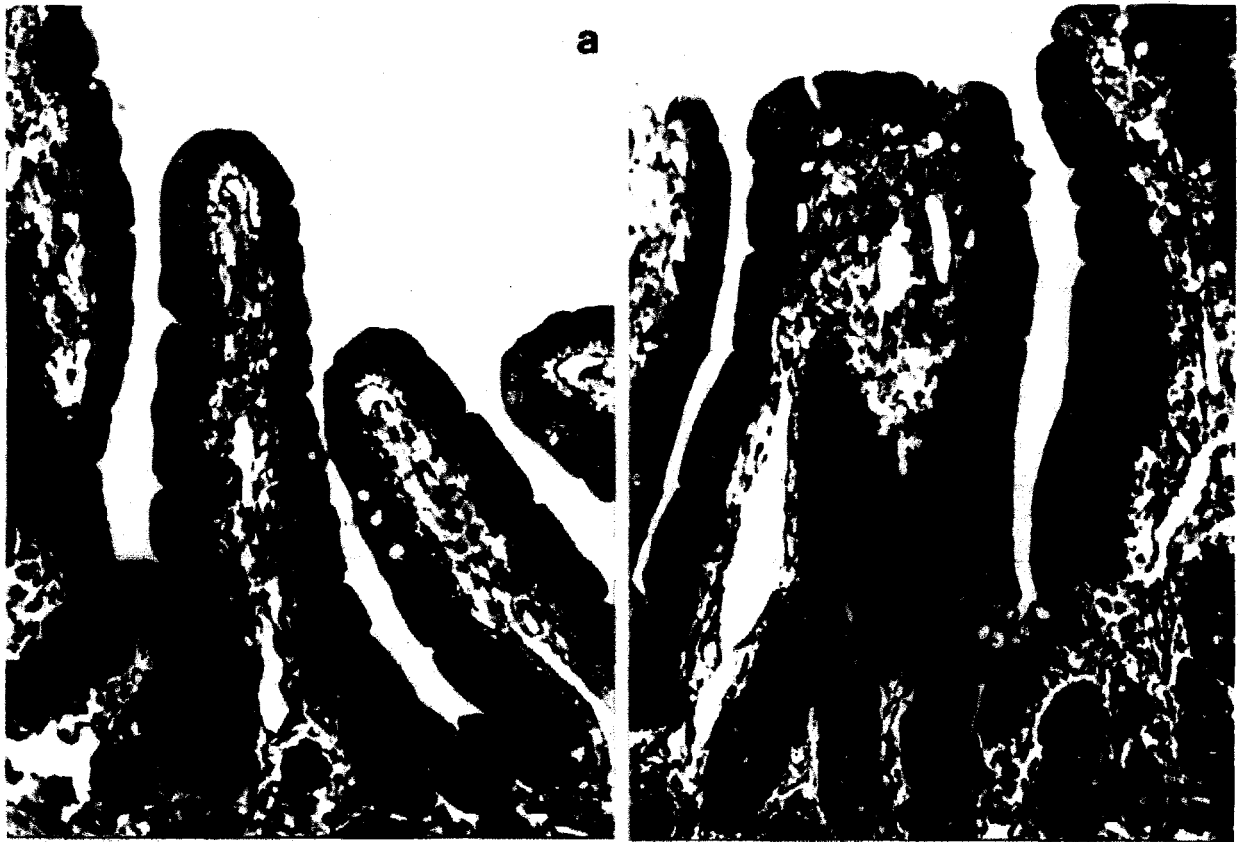


Figura 4.35. Ultraestructura y localización inmunocitoquímica de la proteína SGLT1 en enterocitos de yeyuno procedentes de ratas WKY y SHR. Las micrografías (a) y (b), muestran las microvellosidades de enterocito de yeyuno de ratas WKY (a) y SHR (b). La flecha (\rightarrow) indica la zona apical con una microvellosidad normal en el epitelio de yeyuno de ratas WKY (a). Las dobles flechas (\Rightarrow) indican la zona apical con una pérdida parcial de microvellosidad en el epitelio de yeyuno de ratas SHR (b). Barra de escala = 0,5 μm .

En las micrografías (c) y (d) se muestra la inmunolocalización de la proteína SGLT1 al microscopio electrónico por el método de marcaje con partículas de oro, en ratas WKY (c) y SHR (d). Las flechas indican la presencia de partículas de oro localizadas sobre las microvellosidades. El indicador (\blacktriangleright) muestra la escasa densidad de partículas de oro que aparece sobre la superficie apical de los enterocitos de yeyuno procedentes de ratas SHR (d). Barra de escala = 0,5 μm .

El control inmunocitoquímico de la membrana apical de enterocitos de yeyuno procedentes de ratas WKY se muestra en la micrografía (e), mostrando la ausencia de partículas sobre el epitelio cuando la muestra se trató sólo con el segundo anticuerpo. Barra de escala = 0,5 μm .

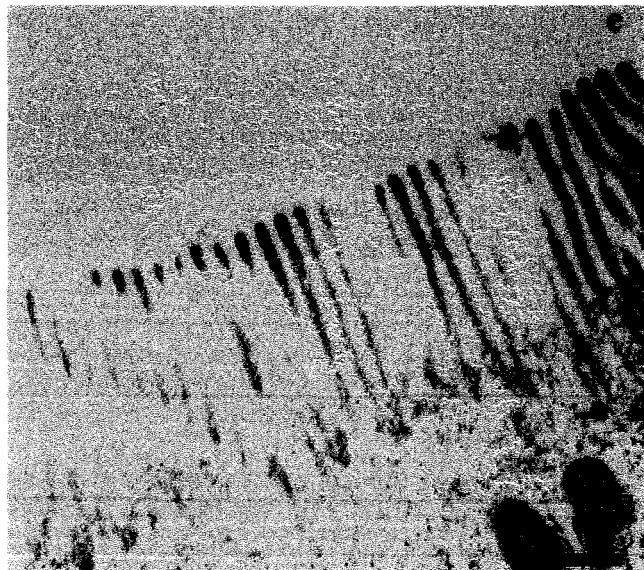
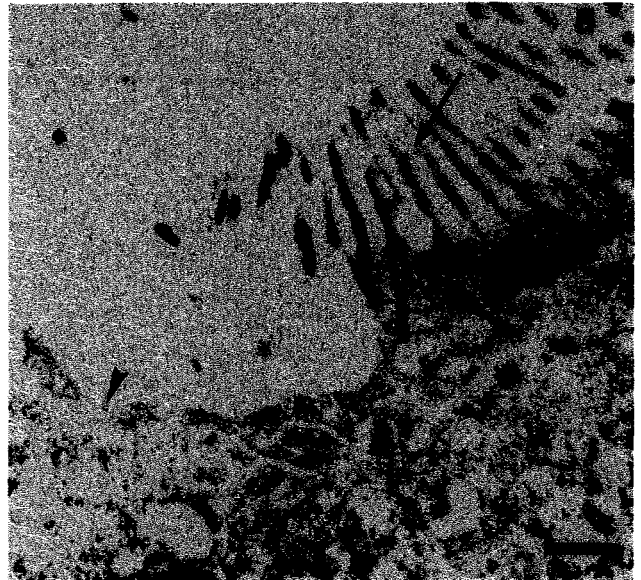
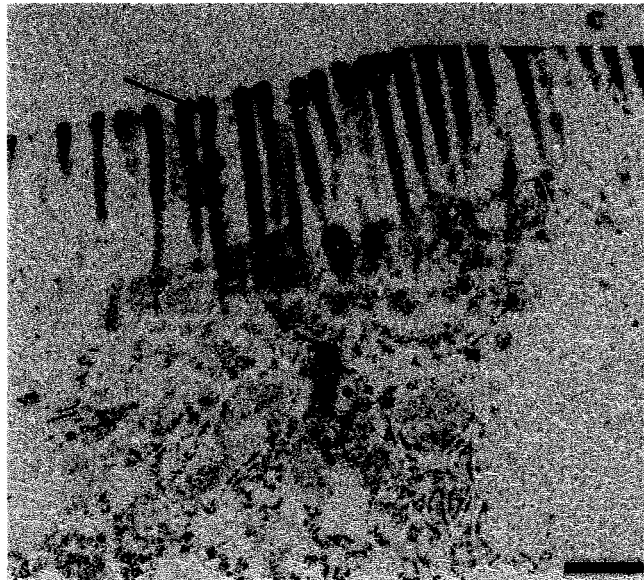
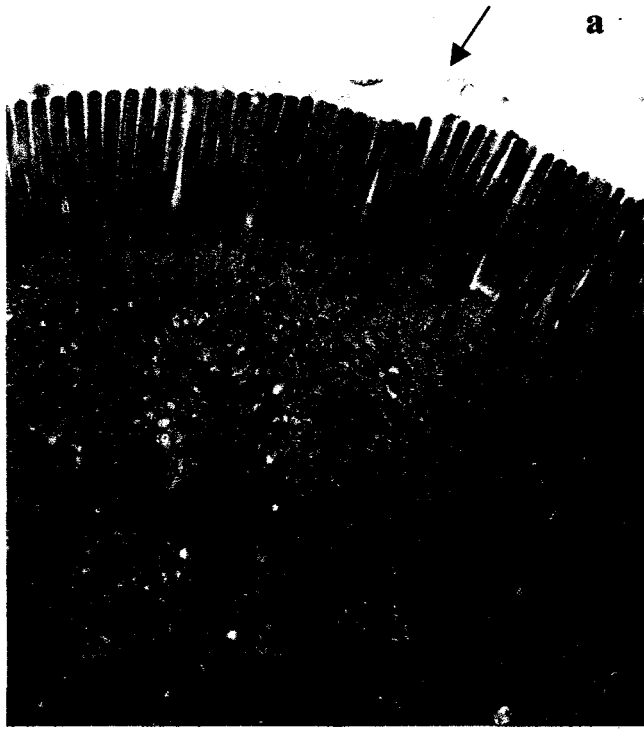
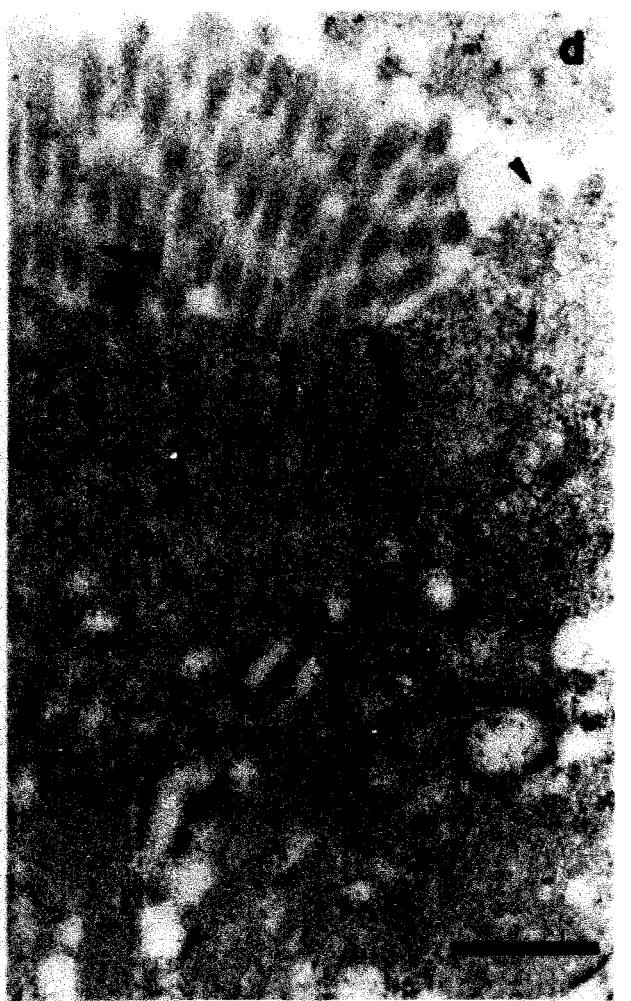
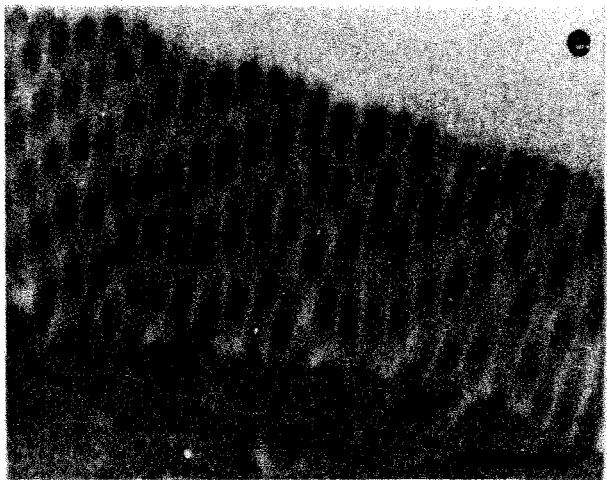
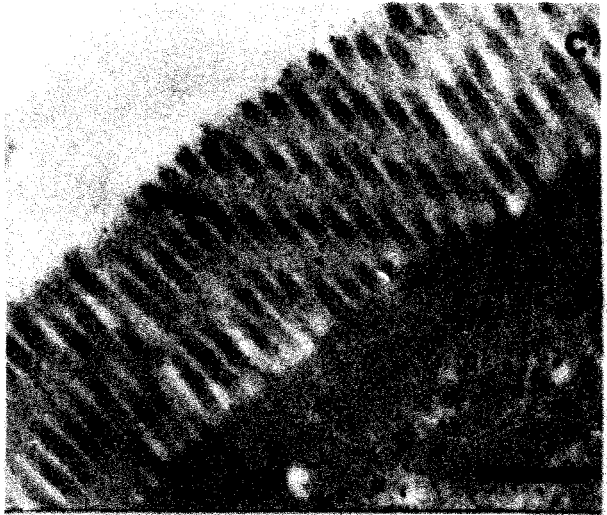
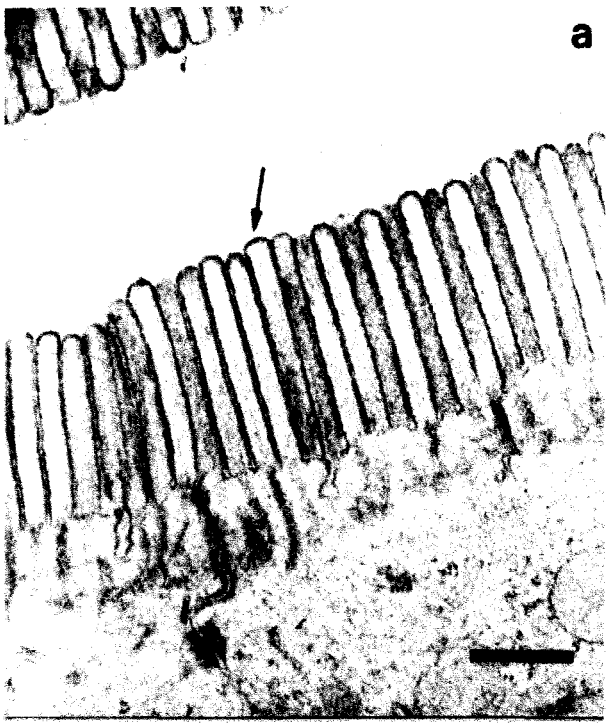


Figura 4.36. Ultraestructura y localización inmunocitoquímica de la proteína SGLT1 en enterocitos de íleon procedentes de ratas WKY y SHR. Las micrografías (a) y (b), muestran las microvellosidades de enterocito de íleon de ratas WKY (a) y SHR (b). La flecha (→) indica la zona apical con una microvellosidad normal en el epitelio de íleon de ratas WKY (a). Las dobles flechas (⇒) indican la zona apical con una pérdida parcial de microvellosidad en el epitelio de íleon de ratas SHR (b). Barra de escala = 0,5 µm.

En las micrografías (c) y (d) se muestra la inmunolocalización de la proteína SGLT1 al microscopio electrónico por el método de marcaje con partículas de oro, en ratas WKY (c) y SHR (d). Las flechas indican la gran densidad de partículas de oro localizadas a lo largo de toda la membrana apical de los enterocitos. El indicador (▶) muestra la baja densidad de partículas de oro que aparece sobre la superficie apical de los enterocitos de íleon procedentes de ratas SHR (d). Barra de escala = 0,5 µm.

El control inmunocitoquímico de la membrana apical de enterocitos de íleon procedentes de ratas WKY se muestra en la micrografía (e), mostrando la ausencia de partículas sobre el epitelio. Barra de escala = 0,5 µm.



5. DISCUSIÓN

5.1. AISLAMIENTO DE VESÍCULAS DE MEMBRANAS APICALES: PUREZA Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

El transporte de azúcares en la membrana apical de los enterocitos del yeyuno e íleon se ha estudiado empleando vesículas de membranas apicales (VMA) aisladas de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR. Las ratas SHR constituyen un modelo genético experimental de hipertensión esencial, muy usado en los estudios sobre el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen en esta patología (Devynck y col., 1982; Drüeke y col., 1990; Rosskopf y col., 1995). Para su control normotensa se usan las ratas WKY. Ambos grupos de ratas se usan paralelamente para llevar a cabo esta memoria.

Las vesículas preparadas a partir de ambos grupos de ratas y segmentos intestinales, son apropiadas para la realización de estudios comparativos puesto que constituyen preparaciones de una gran pureza. Esta purificación se pone de manifiesto con el enriquecimiento de la enzima marcadora de las membranas apicales, sacarasa, de 14 a 16 veces tanto en ratas normotensas como hipertensas, y en ambos segmentos intestinales (tablas 4.3. y 4.4.). Además, existe en las vesículas una escasa contaminación con membranas basolaterales, lisosomales y mitocondriales, como así lo muestra la baja recuperación de la enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, fosfatasa ácida y succinato deshidrogenasa, respectivamente, para ambos grupos experimentales y segmentos intestinales estudiados (tablas 4.7.- 4.12.). Por otro lado, las vesículas muestran valores similares de volumen vesicular medio y la recuperación del contenido total de proteínas presente en los homogeneizados de yeyuno e íleon de partida, es también semejante en los dos grupos en estudio (tablas 4.1. y 4.2.). El hecho de que las VMA no presenten diferencias en su tamaño permite poder realizar estudios comparativos en su capacidad de transporte.

La determinación de las actividades específicas de las enzimas sacarasa y fosfatasa alcalina indican una mayor actividad en el yeyuno que en el íleon tanto para ratas normotensas como hipertensas. Estos resultados coinciden con estudios previos

realizados en ratas (Raul y col., 1988; Takase y col., 1990), pollos (Planas y col., 1997; Garriga y col., 1999), cerdos (Puchal y Buddington, 1992) y corderos (Le Huerou y col., 1992), en los cuales se observa una menor actividad de estas enzimas en la región distal del intestino delgado con respecto a la proximal.

Cuando comparamos la actividad de las enzimas analizadas entre las ratas normotensas e hipertensas comprobamos una disminución significativa en la actividad enzimática de la sacarasa y de la fosfatasa alcalina en el yeyuno e íleon de ratas hipertensas con respecto a las normotensas. Esta reducción es aproximadamente de 1,7 veces, tanto para el yeyuno como para el íleon, para el caso de la sacarasa (tablas 4.3. y 4.4.). Sin embargo, la disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina es dos veces mayor en el íleon que en el yeyuno de las ratas hipertensas (tablas 4.5. y 4.6.). El resto de las enzimas ensayadas, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, fosfatasa ácida y succinato deshidrogenasa no presentan modificaciones en su actividad entre ambos grupos experimentales de ratas, en ninguno de los dos segmentos intestinales estudiados.

Estos resultados no concuerdan con estudios previos en los que se encontró que la actividad de la sacarasa no se modificaba en la membrana del borde en cepillo aislada del duodeno de ratas SHR (Hennesen y col., 1990; Hennesen y col., 1993). Por el contrario, una disminución de 1,3 veces en la actividad específica de la fosfatasa alcalina se observó en las membranas apicales aisladas del duodeno de ratas SHR al comparar con las ratas WKY (Gilles-Baillien y col., 1986; Drüeke y col., 1990). En cambio, la fosfatasa alcalina no se modifica al analizar las membranas apicales aisladas del riñón de ratas SHR (Blakeborough y col., 1990; Hennesen y col., 1993; Mate y col., 2000).

Todos estos resultados parecen indicar que el comportamiento de las diferentes enzimas intestinales ante esta patología depende del enzima analizado, del tejido y dentro del mismo de la región sometida a estudio.

5.2. TRANSPORTE DE MONOSACÁRIDOS EN LA MEMBRANA APICAL DEL YEYUNO E ÍLEON DE RATAS SHR

5.2.1. Transporte acoplado al sodio: sistema SGLT1

Nuestros resultados indican que el transporte de D-glucosa acoplado al sodio se encuentra disminuido en las VMA procedentes de ratas SHR con respecto a las WKY, tanto en el yeyuno (figura 4.3.) como en el íleon (figura 4.4.). La velocidad inicial de transporte y la relación de acumulación de la D-glucosa son 1,7 veces menor en el yeyuno de las ratas hipertensas que en el yeyuno de las normotensas. En el íleon de las SHR, esta disminución pasa a ser aproximadamente de 2,2 veces con respecto a las ratas WKY normotensas (tabla 4.13.).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Morduchowicz y col. (1989) y, más recientemente, por Mate y col., (2000). Estos autores observaron una disminución en el transporte de D-glucosa dependiente de sodio en VMA obtenidas de riñón de ratas SHR. Por el contrario, Parenti y col. (1986) no encontraron modificaciones de dicho transporte en VMA procedentes de la corteza renal de un modelo de rata hipertensa alternativo a las SHR, las ratas *Milan hypertensive strain* (MHS).

El estudio de los flujos iniciales de la entrada de la D-glucosa a concentraciones crecientes de la misma se presentan en las figuras 4.9. y 4.10. para el yeyuno de ratas WKY y SHR, respectivamente, y en las figuras 4.11. y 4.12. para el íleon de ratas WKY y SHR, respectivamente. En todos los casos estudiados, la consideración de un modelo con un único sistema de transporte mediado es la que ha conducido al mejor ajuste de las curvas cinéticas obtenidas a partir de los flujos iniciales totales. Esta observación contradice al estudio realizado por Freeman y Quamme (1986) en VMA de intestino delgado de ratas, los cuales sugirieron la presencia de dos transportadores para la D-glucosa en el yeyuno y en el íleon, uno de menor capacidad y mayor afinidad (SGLT1) y otro de mayor capacidad y menor afinidad (SGLT2). Sin embargo, en las VMA

aisladas del yeyuno e íleon de ratas normotensas e hipertensas, el análisis cinético del transporte de la D-glucosa, sustrato que puede usar los sistemas de transporte SGLT1 y SGLT2 (Oulianova y Berteloot, 1996), indica que los flujos iniciales se ajustan a un sólo sistema de transporte que presenta baja capacidad y alta afinidad para dicho sustrato.

El análisis de las constantes cinéticas de este sistema de transporte pone de manifiesto que, la disminución encontrada en el transporte de D-glucosa en el yeyuno e íleon de ratas SHR obedece a una menor capacidad de este sistema para transportar la D-glucosa, ya que la velocidad máxima de transporte se ve reducida en un 52% en el yeyuno y en un 60% en el íleon al compararla con la obtenida en las ratas WKY (tabla 4.14.). Sin embargo, la afinidad del sistema de transporte para la D-glucosa no se modifica entre ratas normotensas e hipertensas ni en el yeyuno ni en el íleon, puesto que los valores de K_m son similares en los dos grupos de animales.

Otros autores han observado modificaciones en la capacidad del transporte intestinal de la D-glucosa ante otras situaciones tales como la diabetes (Debnam y col., 1990; Fedorak y col., 1991); malnutrición (Butzner y col., 1990); desarrollo (Ghishan y Wilson, 1985; Vázquez y col., 1997); tratamiento con hormonas (Cheeseman, 1997); exposición a bajas temperaturas (Thomas y col., 1996) y dietas (Brasitus y col., 1989; Ferraris y Diamond, 1989; Miyamoto y col., 1993).

Los resultados cinéticos indican una mayor V_{max} para la D-glucosa en el yeyuno que en el íleon, tanto en ratas normotensas como en hipertensas, coincidiendo con trabajos previamente realizados en ratas (Freeman y Quamme, 1986), cerdos (Puchal y Buddington, 1992) y pollos (Planas y col., 1997; Garriga y col., 1999). Además, se confirma que hay un solo sistema de transporte mediado con valores de K_m que oscilan entre 0,12 y 0,15 mM, concordantes con los obtenidos en VMA de intestino de rata (Cheeseman, 1997), pescado (Maffia y col., 1996) y conejo (Butzner y col., 1990) utilizando como sustrato la D-glucosa, siendo entre 4-10 veces menor que el observado

en VMA de pollos (resultados no publicados) y en intestino de cerdos (Puchal y Buddington, 1992).

Los estudios de inhibición del transporte de D-glucosa dependiente de sodio ponen de manifiesto que la presencia de altas concentraciones de D-galactosa (100 mM frente a 0,1 mM de D-glucosa) provoca entre un 96-97% de inhibición sobre el transporte de la D-glucosa tanto en el yeyuno (figura 4.7.) como en el íleon (figura 4.8.), lo que indica que la D-galactosa es un sustrato específico para el sistema de transporte presente en el intestino de rata, siendo compatible con el sistema de transporte descrito como SGLT1 (Hirayama y col., 1996). El transporte de la D-glucosa llega a inhibirse totalmente con su autoinhibición y con la presencia de florricina (figuras 4.7. y 4.8.). Además, el estudio de la inhibición del transporte de la D-glucosa en presencia de la florricina indica que su CI_{50} (concentración de florricina que reduce a la mitad el transporte de la D-glucosa) se sitúa alrededor de 5 μ M, tanto para el yeyuno (figura 4.5.) como para el íleon (figura 4.6.) y para ambos grupos de ratas, valores que están de acuerdo con los obtenidos previamente (Ikeda y col., 1989; Birnir y col., 1990; Lin y col., 1998).

Al estudiar el transporte de la D-galactosa dependiente del sodio se observa igualmente una disminución en la velocidad inicial y en la relación de acumulación en ratas hipertensas con respecto a las normotensas (tabla 4.15.), disminución aún mayor para el íleon (2,1 veces) que para el yeyuno (1,8 veces), similar a lo que ocurre en el transporte de la D-glucosa. El análisis de las constantes cinéticas (figuras 4.15.-4.18.; tabla 4.16.) indica que, los flujos iniciales totales presentan un mejor ajuste a un solo modelo saturable y que la V_{max} disminuye en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas, sin observar cambios en las constantes de afinidad (K_m), tanto en el yeyuno como en el íleon. Las reducciones en las V_{max} son de nuevo mayores para el íleon (un 64%) que para el yeyuno (un 51%), reducciones muy parecidas a las observadas para el transporte de la D-glucosa. De nuevo, los estudios de cinética confirman que existe un sólo sistema de transporte para la D-galactosa tanto en el yeyuno como en el íleon, en ratas normotensas e hipertensas, con una K_m que oscila

entre 0,9-1,2 mM, equivalente a 8-10 veces mayor que la observada para la D-glucosa y compatible con el SGLT1 previamente descrito por otros autores (Hirayama y col., 1996).

Los estudios cinéticos realizados en las ratas normotensas para el yeyuno e íleon concuerdan con los encontrados por otros laboratorios, siendo la capacidad de transportar la D-galactosa mayor en el yeyuno que en el íleon (Puchal y Buddington, 1992), y con valores de K_m cercanos a los observados en intestino delgado de ratas (Vinardell y Bolufer, 1983; Carreras y col., 1988), cerdos (Puchal y Buddington, 1992) y humanos (Bieberdorf y col., 1975).

Si se comparan los parámetros cinéticos calculados para el transporte de ambos azúcares (tabla 4.14. y 4.16.) se observa que la D-glucosa y la D-galactosa comparten el mismo sistema de transporte de forma competitiva, con valores de V_{max} aproximados y presentando para la D-glucosa una afinidad 8-10 veces superior que para la D-galactosa. Estos resultados refuerzan los obtenidos en el estudio de inhibición descrito anteriormente y reproducen, las características del sistema de transporte de azúcares acoplado al sodio SGLT1, indicando que esta proteína es la única responsable del transporte intestinal de estos azúcares.

La disminución en la capacidad intestinal observada en el yeyuno e íleon de ratas hipertensas, podría deberse a la existencia de un menor número de moléculas SGLT1 transportadoras en la membrana apical de ambos segmentos intestinales, como lo demuestra el hecho de la existencia de una menor V_{max} , aunque este hecho también puede indicar una disminución en la translocación (turnover) de dichas moléculas SGLT1. La determinación de la unión específica de la florricina a los transportadores, medidas en las condiciones apropiadas, refleja indirectamente la cantidad relativa de moléculas transportadoras que se localizan en una determinada muestra. En nuestro caso, el estudio de la unión específica de florricina a las VMA aisladas del intestino delgado de ratas no fue posible técnicamente. Sin embargo, en riñón hemos podido comprobar que la disminución en la capacidad renal del transporte de la D-glucosa y D-

galactosa observada en ratas hipertensas estaba directamente relacionada con una reducción en la unión específica a la florricina (Mate y col., 2000). Por otro lado, estudios previos realizados por nuestro grupo utilizando la técnica de Western blot demuestran una disminución en la abundancia de la proteína SGLT1 en las VMA procedentes del yeyuno e íleon de ratas hipertensas, que confirma la existencia de un menor número de transportadores.

Otra posible explicación a la disminución observada en el transporte intestinal de la D-glucosa y D-galactosa podría ser un cambio en los mecanismos de transporte del ión sodio que alteraría su gradiente electroquímico y por tanto, la actividad del cotransportador SGLT1, ya que estos azúcares son transportados dependientes del ión sodio. Estudios previos han observado modificaciones en la permeabilidad al sodio en la hipertensión arterial, usando diferentes tejidos y tanto en pacientes hipertensos como en modelos experimentales animales (Parenti y col., 1986; Heckmann y col., 1989; Yokomatsu y col., 1992; Mate y col., 2000). Concretamente en el intestino, Lubcke y Barbezat (1988) observaron un aumento en la permeabilidad al sodio en el íleon de ratas SHR con respecto a las ratas WKY, no existiendo cambios evidentes en el yeyuno entre ambos grupos de animales. Además de la entrada pasiva del Na^+ , uno de los sistemas más alterados en la hipertensión arterial que provoca un aumento del sodio intracelular es el intercambiador Na^+-H^+ (Hoffmann y col., 1995; Kelly y col., 1997). En nuestro laboratorio demostramos un aumento en la actividad del intercambiador Na^+-H^+ en el íleon de ratas SHR con respecto a las WKY (Vázquez y col., 1997a), que podría también explicar la disminución del gradiente del Na^+ en las ratas hipertensas y consecuentemente la reducción en la actividad SGLT1.

También hay que tener en cuenta la acción de la bomba Na^+-K^+ ATPasa, cuya actividad queda alterada en esta patología según algunos autores (Pickar y col., 1994; Sweadner y col., 1994). Sin embargo, coincidiendo con otros trabajos realizados en VMA procedentes del duodeno de ratas SHR (Hennesen y col., 1990), nosotros no encontramos modificaciones en la actividad de esta enzima ni en el yeyuno ni en el íleon de ratas hipertensas con respecto a las normotensas.

5.2.2. Transporte independiente de sodio: sistema GLUT5.

El transporte mediado de D-fructosa en las membranas apicales tiene lugar a través de la proteína GLUT5. En la membrana apical del enterocito, el sistema GLUT5 permite la absorción de fructosa procedente de la dieta tanto en humanos (Davidson y col., 1992) como en conejos (Miyamoto y col., 1994), cobayas (Mavrias y Mayer, 1973), hamsters (Honegger y Semenza, 1973) y en ratas (Crouzoulon y Korieh, 1991; Rand y col., 1993). Además, se ha detectado su presencia en otras células como los espermatozoides (Burant y col., 1992), riñón, adipocitos (Thorens, 1996), barrera hematoencefálica (Mantych y col., 1993), músculo esquelético (Hundal y col., 1998) y eritrocitos humanos (Concha II y col., 1997). A lo largo del intestino delgado, la distribución del GLUT5 no es la misma, expresándose mayoritariamente en el intestino proximal más que en el distal (Rand y col., 1993; Miyamoto y col., 1994; Thorens, 1996).

En este trabajo estudiamos el transporte de D-fructosa en VMA de yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR. Al realizar el transporte de 1 mM de D-fructosa, en función del tiempo de incubación en las VMA procedentes de yeyuno (figura 4.19.) e íleon (figura 4.20.), se obtienen unos valores de transporte inferiores en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas para 15 segundos, 1 y 10 minuto en el yeyuno y 15 segundos y 1 minuto en el íleon, momento a partir del cual los valores comienzan a igualarse hasta alcanzar el equilibrio, tanto en el yeyuno como en el íleon.

Para determinar la especificidad del transportador GLUT5 sobre la D-fructosa y excluir la vía de entrada de este monosacárido a través del sistema SGLT1, se han realizado experimentos en VMA de yeyuno (figura 4.21.) e íleon (figura 4.22.) tanto en ratas WKY como SHR, en los que en el medio de incubación además del substrato en estudio, se han incluido otros substratos como la D-glucosa, D-galactosa, florricina y citocalasina B. Como era de esperar, la presencia de D-glucosa, D-galactosa y florricina no causan ningún efecto inhibitor sobre el transporte de D-fructosa ni en el yeyuno ni en el íleon de ambos grupos de animales, demostrándose que esos substratos no utilizan

el GLUT5 como vía de entrada al interior vesicular. La citocalasina B, que inhibe la difusión facilitada de azúcares a través de otros miembros de la familia GLUT (Burant y Bell, 1992), no tiene efectos sobre el transporte de D-fructosa por parte del GLUT5 en yeyuno e íleon de ratas normotensas e hipertensas. Estos resultados concuerdan con estudios previos de inhibición en VMA de conejo (Miyamoto y col., 1994) y ratas (Rand y col., 1993) y en oocitos inyectando el ARNm del GLUT5 humano (Burant y col., 1992). Este hecho refuerza los resultados obtenidos con los estudios enzimáticos en cuanto a la pureza de las preparaciones de membranas apicales, puesto que de existir contaminación con membranas basolaterales, estaría presente el transportador GLUT2, sistema que transporta D-fructosa de manera inhibible por citocalasina B (Garriga y col., 1997).

Al igual que ocurre con el transporte de D-glucosa y D-galactosa, las VMA de yeyuno e íleon procedentes de ratas SHR tienen menor capacidad de transportar D-fructosa que las obtenidas a partir de ratas WKY. Los flujos iniciales totales de la D-fructosa se ajustan a un modelo de un sólo sistema de transporte mediado. El cálculo de las constantes cinéticas indica una reducción de aproximadamente un 50% para la V_{\max} del transporte de D-fructosa en las ratas hipertensas, sugiriendo la presencia de una menor densidad de moléculas transportadoras, tanto para yeyuno como para el íleon. La constante de afinidad, por el contrario no experimenta variaciones entre los dos grupos de estudio, en yeyuno e íleon.

Los resultados de cinética obtenidos tanto para ratas normotensas como hipertensas, indican una mayor V_{\max} para el yeyuno que para el íleon, confirmando estudios previos en cuanto a la distribución de la proteína GLUT5 a lo largo del intestino delgado (Rand y col., 1993; Miyamoto y col., 1994), oscilando los valores de K_m entre 8-15 mM, de acuerdo con los valores recogidos en la bibliografía para el transporte de D-fructosa en VMA de intestino de conejo (Schultz y Strecker, 1970), y hamster (Honegger y Semenza, 1973), en células ováricas de hamster chino (CHO) (Inukai y col., 1995), oocitos de *Xenopus* (Burant y col., 1992; Rand y col., 1993; Miyamoto y col., 1994; Kane y col., 1997), vesículas de sarcolema (Hundal y col.,

1998) y eritrocitos (Concha II y col., 1997). Sin embargo, Crouzoulon y Korieh (1991) encontraron en VMA de intestino de rata una afinidad menor para la fructosa con una K_m de 110 mM.

Modificaciones en la expresión del GLUT5 se han observado durante el desarrollo (Davidson y col., 1992; Miyamoto y col., 1992; Castello y col., 1995); en la diabetes (Burant y col., 1994; Corpe y col., 1996); tras la exposición a fructosa (Inukai y col., 1993; Miyamoto y col., 1993; Shu y col., 1997) así como a glucosa (Matosin-Matekalo y col., 1999).

Concluyendo, en la presente memoria se demuestra que todos los procesos de transporte mediado de azúcares que tienen lugar en la membrana apical de yeyuno e íleon se encuentran alterados en las ratas hipertensas, no sólo aquellos cuya función depende de la existencia de un gradiente iónico, sino también los procesos independientes de éste. No está claro, sin embargo, si estas alteraciones en el transporte de azúcares pueden contribuir de algún modo en la instauración de la hipertensión, o más bien son una consecuencia de ésta, dada la existencia de otras alteraciones de la membrana celular provocadas por esta enfermedad.

5.2.3. Transporte por difusión simple

El transporte mediado de D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa a través de los correspondientes sistemas de transporte localizados en la membrana apical de yeyuno e íleon se encuentra alterado en las ratas hipertensas. Sin embargo, la captación de estos tres monosacáridos por difusión simple hacia el interior vesicular no pone de manifiesto modificaciones entre las ratas WKY y SHR en ninguno de los dos segmentos intestinales estudiados. Cuando se analiza al transporte de D-glucosa y D-galactosa, la difusión simple en las vesículas se puede estudiar directamente, por medio de la supresión del gradiente de sodio necesario para que tenga lugar el transporte mediado. Así, al estudiar el transporte de estos azúcares en función del tiempo, se obtienen gráficas superpuestas para los dos grupos de animales y para los dos segmentos

intestinales en estudio, en presencia de un gradiente de KSCN. Igual resultado se obtiene cuando se estudia el transporte en función de la concentración de sustrato empleando esta misma sal de potasio tanto en yeyuno como en el íleon. En el caso del transporte de D-fructosa, la contribución de la difusión simple en las VMA es, en la práctica, difícil de medir directamente, al no ser imprescindible la presencia de un gradiente iónico para que tenga lugar el transporte mediado. En cualquier caso, los experimentos cinéticos ponen de manifiesto valores muy similares para la constante de difusión (K_d) en las ratas normotensas e hipertensas y en los dos segmentos intestinales estudiados, siendo ligeramente superiores en el caso de la D-fructosa.

Sin embargo, existe una clara diferencia en lo que se refiere a la contribución de la difusión simple respecto del transporte total. Así, en el transporte intestinal de la D-glucosa y D-galactosa, la difusión simple en el yeyuno es únicamente superior al transporte mediado a partir de una concentración de sustrato de aproximadamente 30 mM en ratas WKY y SHR y en el íleon de 10-15 mM, igualmente para ambos grupos de animales. A una concentración de sustrato igual a 0,1 mM, y en condiciones de velocidad inicial, el transporte mediado supone aproximadamente el 99% del total de transporte en las VMA estudiadas. Sin embargo, para el transporte de D-fructosa, la baja afinidad y capacidad del sistema GLUT5 hace que la difusión sea, en todas las concentraciones estudiadas, superior al transporte mediado. Para una concentración de D-fructosa igual a 0,1 mM, aproximadamente de un 35 a un 40% del transporte total corresponde al transporte mediado por el GLUT5, correspondiendo el resto a la entrada por difusión simple.

5.3. ESTUDIOS ESTRUCTURALES

Las ratas hipertensas utilizadas en este estudio presentan importantes alteraciones en el transporte de azúcares a través de la membrana apical de los enterocitos del yeyuno e íleon, comparándolas con el correspondiente grupo control de ratas normotensas. Para completar este estudio y explicar en parte las alteraciones producidas en el transporte de monosacáridos, se ha llevado a cabo un análisis de la

estructura y ultraestructura de los epitelios del yeyuno e íleon en las ratas WKY y SHR, bajo microscopía óptica y electrónica, con el objeto de poder relacionar, si así fuese, cambios funcionales con cambios estructurales.

Nuestros resultados demuestran que las ratas hipertensas presentan alteraciones en la estructura del intestino delgado, apareciendo diferencias morfológicas en el epitelio tanto del yeyuno como del íleon de ratas SHR respecto a las WKY. Mediante microscopía óptica puede observarse la diferente morfología que adquiere la vellosidad del yeyuno de ratas SHR (figura 4.33.b.), cuando son comparadas con las vellosidades de aspecto digitiformes que presentan las ratas WKY (figura 4.33.a.). En el caso del íleon, las vellosidades intestinales de las ratas hipertensas presentan un aparente ensanchamiento y fusión con la vellosidad adyacente (figura 4.34.b). Por el contrario, el íleon de ratas normotensas no presenta alteraciones en sus vellosidades (figura 4.34.a). El estudio ultraestructural del epitelio intestinal muestra pérdidas parciales de microvellosidad en los enterocitos de ratas hipertensas, con imágenes similares en el yeyuno (figura 4.35.b) y en el íleon (figura 4.36.b). Sin embargo, los cortes procedentes de ratas WKY presentan una regularidad en la forma y disposición de las microvellosidades en los enterocitos del yeyuno (figura 4.35.a) y del íleon (figura 4.36.a).

Drüeke y col., (1990) igualmente observaron zonas con pérdidas de microvellosidad en los enterocitos del duodeno de ratas SHR, mientras que las microvellosidades de los enterocitos de las ratas WKY se mantenían intactas. Además, estos autores encontraron modificaciones en las membranas basolaterales de las células del epitelio duodenal, con un ensanchamiento de los espacios intercelulares, alteraciones ambas no observadas por nosotros ni en el yeyuno ni en el íleon de ratas SHR. Estos autores relacionaron estos cambios ultraestructurales con modificaciones en el transporte de calcio a través de las membranas apicales aisladas del duodeno de ratas SHR (Hennesen y col., 1993). Las mismas modificaciones fueron observadas al microscopio electrónico en el riñón de ratas SHR.

Para explicar estos resultados, Drücke y col. (1990) analizaron la expresión de la villina, proteína del citoesqueleto del enterocito, para observar si cambios en su expresión era la causante de la modificación ultraestructural encontrada en la hipertensión arterial. Los resultados mostraron que no existían modificaciones en la expresión de la villina entre el duodeno de ratas WKY y SHR. Resultados similares fueron encontrados por nosotros determinando la expresión de la actina en el riñón de ratas SHR y WKY (Mate y col., 2000).

Ya que los cambios funcionales observados en el intestino delgado de las ratas hipertensas se acompañan de cambios estructurales y de la pérdida de microvellosidad en los enterocitos de ratas SHR, comprobamos si esta pérdida de microvellosidad afectaba a la presencia de los transportadores estudiados. Para ello realizamos estudios de inmunolocalización a nivel óptico y electrónico de una de las proteínas objeto de estudio, la SGLT1, responsable del transporte de la D-glucosa y D-galactosa a nivel intestinal, cuya actividad encontramos modificada en las ratas hipertensas.

El estudio bajo microscopía óptica mostró un marcaje correspondiente a la proteína SGLT1 a lo largo de toda la vellosidad del yeyuno (figura 4.33.c) e íleon (figura 4.34.c) de ratas normotensas. En las ratas hipertensas este marcaje se mantenía de igual forma en la superficie de la vellosidad del yeyuno (figura 4.33.d) e íleon (figura 4.34.d), no observándose aparentemente cambios ni en la intensidad ni en la distribución de la proteína SGLT1, la cual estaba ausente en las células de la cripta en ambos grupos de animales, tanto en el yeyuno como en el íleon.

Los estudios de inmunocitoquímica ponen de manifiesto la localización de las partículas de oro repartidas a lo largo de toda la microvellosidad en el yeyuno (figura 4.35.c) e íleon (figura 4.36.c) de ratas normotensas, de acuerdo con lo previamente descrito por Takata y col. (1993). Sin embargo, no existía una presencia significativa de la proteína SGLT1 en aquellas zonas del enterocito con pérdida de microvellosidad procedentes del yeyuno (figura 4.35.d) e íleon (figura 4.36.d) de ratas hipertensas, aunque sí aparecía en aquellas zonas adyacentes donde se mantiene la presencia de la

microvellosidad. Por consiguiente, las alteraciones encontradas en la membrana apical del yeyuno e íleon de ratas hipertensas pueden originar una importante reducción en la superficie de absorción apical, con sus consecuencias funcionales. Además, la falta del cotransportador SGLT1 en determinadas zonas de la membrana apical, explica la disminución observada en el transporte de la D-glucosa y de la D-galactosa en el yeyuno y en el íleon de ratas SHR.

5.4. ESTUDIOS DE POLARIZACIÓN DE MEMBRANA, FLUIDEZ DE MEMBRANA.

La fluidez de membrana (término inverso de la microviscosidad) es una propiedad de las membranas biológicas que describe cuantitativamente la movilidad y la tasa de rotación de las moléculas que se encuentran ancladas en ellas. Estudios previos realizados en membranas y modelos experimentales han mostrado que las diferencias en la fluidez de membrana pueden deberse a alteraciones en la composición lipídica de ésta (Brasitus y Dudeja, 1988; Carriere y Le Grimmellec, 1986).

Nuestros resultados en cuanto a la determinación de la polarización de fluorescencia (P) y anisotropía de fluorescencia (r_s) del DPH en el estado estacionario no han puesto de manifiesto diferencias entre SHR y WKY tanto en el yeyuno como en el íleon. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en plaquetas de pacientes hipertensos (Le Quan y col., 1991) y más recientemente en VMA aisladas del riñón de ratas hipertensas (Vázquez y col., 2000). Sin embargo, algunos autores han descrito un incremento de la fluidez de membrana en microsomas hepáticos de ratas SHR (Foucher y col., 1997) y una reducción en los eritrocitos (Kitts y col., 1998), plaquetas (Dominiczak y col., 1991), hepatocitos, sinaptosomas y cardiomiocitos (Devynck y col., 1982) de ratas SHR, y también en eritrocitos humanos con hipertensión esencial (Tsuda y col., 1988). Por tanto, existen discrepancias en cuanto a los estudios de la microviscosidad de membrana realizados en la hipertensión arterial. Estas discrepancias en parte se deben a la molécula fluorescente usada, la DPH, como en nuestro caso o la trimetilamino-difenilhexatrieno (TMA-DPH), ya que los distintos fluorescentes se

insertan en diferentes dominios de las membranas informándonos de la fluidez correspondiente a ese dominio.

Diversos estudios alterando artificialmente la fluidez de las membranas mediante el uso de diferentes agentes, han encontrado una relación inversa entre la fluidez de membrana y el transporte de D-glucosa en VMA intestinales (Fernandez y col., 1984) y renales (Carrière y Le Grimellec, 1986). Esta relación no se cumple en nuestro caso, ya que las modificaciones observadas en el transporte de la D-glucosa en las ratas hipertensas no van acompañadas de cambios en la fluidez de las mismas membranas. Por otro lado, los agentes utilizados para inducir los cambios en la fluidez de la membrana, pueden alterar otros factores como el gradiente de sodio o el volumen intravesicular que afectarían el transporte de la D-glucosa por esas membranas.

6. CONCLUSIONES

PRIMERA. La evolución del peso corporal de las ratas WKY y SHR es similar entre las 8 y 14 semanas de edad, intervalo comprendido desde la adquisición de los animales hasta el momento de su sacrificio. La presión sanguínea aumenta progresivamente, para ambos grupos de animales, entre las 8 y las 11 semanas de vida, momento a partir del cual tienden a estabilizarse los valores. En el intervalo comprendido entre las 8-14 semanas de edad, los valores de presión arterial sistólica y diastólica siempre se mantienen superiores en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas.

SEGUNDA. La técnica usada para el aislamiento de las vesículas de membranas apicales (VMA) del yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR, permite la obtención de unas preparaciones de gran pureza, como se observa tras los análisis enzimáticos realizados. La recuperación de proteínas y de las actividades enzimáticas ensayadas, así como el volumen vesicular medio, son semejantes en las VMA aisladas de ratas WKY y SHR, lo que indica que las VMA obtenidas de ambos grupos experimentales son apropiadas para la realización de estudios comparativos.

TERCERA. Las actividades específicas de las enzimas sacarasa y fosfatasa alcalina son significativamente inferiores en ratas SHR comparadas con las ratas WKY, tanto en el yeyuno como en el íleon, siendo esta disminución mayor en el íleon para el caso de la fosfatasa alcalina. Por el contrario, las actividades específicas de las otras enzimas ensayadas, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, fosfatasa ácida y succinato deshidrogenasa no muestran modificaciones entre ambos grupos de animales, tanto en el yeyuno como en el íleon.

CUARTA. El estudio de los flujos iniciales del transporte de la D-glucosa, a concentraciones crecientes de la misma, indica que las curvas cinéticas analizadas se ajustan a un modelo con un solo sistema de transporte mediado correspondiente a la proteína SGLT1. Esta afirmación está basada en estudios de inhibición del transporte y en los experimentos cinéticos realizados. El análisis de las constantes cinéticas indica una reducción de un 52% y de un 60% en los valores de velocidad máxima en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas, para el yeyuno e íleon, respectivamente. Por el contrario, la afinidad del sistema SGLT1 no se modifica entre ratas normotensas e

hipertensas, tanto para el yeyuno como para el íleon, con unos valores de K_m que oscilan entre 0,12 y 0,15 mM.

QUINTA. El transporte mediado de la D-galactosa en las VMA del yeyuno e íleon de ratas normotensas e hipertensas, tiene lugar, al igual que en el caso de la D-glucosa a través del sistema SGLT1. Las ratas hipertensas presentan una disminución en la velocidad máxima de transporte de la D-galactosa con respecto a las normotensas, mayor en el íleon (64%) que en el yeyuno (51%), como ocurría para la D-glucosa. Sin embargo, la afinidad de este sistema de transporte no se modifica entre ratas WKY y SHR, ni para el yeyuno ni para el íleon, presentando valores de K_m entre 0,9-1,2 mM, 8-10 veces mayores que los registrados para la D-glucosa.

SEXTA. La D-fructosa es transportada en el yeyuno e íleon de ratas WKY y SHR a través de un único sistema de transporte, conocido como GLUT5, que se comporta como un sistema de baja afinidad y capacidad. Los valores de velocidad máxima para este sistema disminuyen en las ratas hipertensas con respecto a las normotensas, siendo esta reducción de aproximadamente un 50% tanto para el yeyuno como para el íleon. La constante de afinidad no experimenta variaciones entre los dos grupos experimentales ni en el yeyuno ni en el íleon, con valores que oscilan entre los 8-15 mM.

SÉPTIMA. La captación de la D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa por difusión simple, no se modifica entre las ratas normotensas e hipertensas en ninguno de los dos segmentos intestinales estudiados. Para el caso de la D-glucosa y D-galactosa, esta captación por difusión simple, es significativa para concentraciones altas de sustratos. Por el contrario, para la D-fructosa, la captación por difusión simple es significativa desde concentraciones bajas del sustrato.

OCTAVA. El análisis estructural y ultraestructural de los epitelios intestinales muestran alteraciones en las vellosidades del yeyuno e íleon de ratas hipertensas, en cuanto a su forma, disposición y simetría a lo largo de todo el epitelio. A nivel electrónico se observan pérdidas de microvellosidades en los enterocitos de ratas SHR,

con imágenes que se repiten en el yeyuno e íleon de ratas hipertensas. Por el contrario, las ratas normotensas presentan vellosidades regulares en cuanto a su forma y disposición y sus microvellosidades se disponen de manera regular y continua a lo largo de todo el epitelio del yeyuno e íleon.

NOVENA. Los estudios de inmunolocalización de la proteína SGLT1 al microscopio óptico nos muestran la presencia de esta proteína a lo largo de todo el epitelio de las vellosidades en yeyuno e íleon de ratas normotensas e hipertensas, destacando la ausencia de marcaje en la zona de la cripta de dichas vellosidades. El estudio inmunocitoquímico de la proteína SGLT1, utilizando el método de marcaje con partículas de oro, nos revela que las microvellosidades de yeyuno e íleon en ratas normotensas presentan una gran abundancia y regularidad de estas partículas. Por el contrario, en las ratas hipertensas la densidad de partículas es significativamente menor, tanto en yeyuno como en el íleon.

DECIMA. Los estudios de polarización y anisotropía de fluorescencia de la molécula DPH muestran que no existen diferencias entre las ratas WKY y SHR para los dos segmentos intestinales estudiados, indicando que las VMA presentan una misma fluidez entre ambos grupos de ratas experimentales en el yeyuno e íleon.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdulkarim M. P. y Beatle D. C. (1990). Kinetic properties of the Na⁺/H⁺ antiporter of lymphocytes from spontaneously hypertensive rat: role of intracellular pH. *J. Clin. Invest.* 85: 1734-1739.

Abreu M. A., Baroza L. G. V. y Rossi M. A. (1993). Toluidine blue-basic fuchsin stain for glycolmethacrylate embedded tissue. *The J. Histotechnol.* 16: 139-140.

Absolom D. R. (1986). Basic methods for the study of phagocytosis. *Methods Enzymol.* 132: 95-180.

Allan C.H. y Trier J. S. (1991). Structure and permeability differ in subepithelial villus and Peyer's patch follicle capillaries. *Gastroenterology* 100: 1172-1179.

Alpers D.H. (1972). The relation of size to the relative rates of degradation of intestinal brush border proteins, *J. Clin. Invest.* 51: 2621-2630.

Alvarado F. (1976) Sodium driver transport: A reevaluation of the sodium gradient hypothesis, in intestinal ion transport. (Ed, J.W.L. Robinson). *Medical and Technical Publishing Lancaster*, 117-152.

Annapurna V., Puniyani R. R. y Gupte R. V. (1990). Red cell deformability and erythrocyte lipids in hypertension. *Clin. Hemorheol.* 10: 95-98.

Arsenian M. A. (1993). Magnesium and cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 35: 271-310.

Axelrod J. D. y Pilch P. F. (1983). Unique cytochalasin B binding characteristics of the hepatic glucose carrier. *Biochemistry* 22: 2222-2227.

Bagdale J. D., Buchanan W. F., Pollare T. y Lithell H. (1995). Abnormal lipoprotein phospholipid composition in patients with essential hypertension. *Atherosclerosis* 117: 209-215.

Barber A., Jordana R. y Ponz F. (1979). Competitive Kinetics of sugar active transport in snail intestine. *Rev. Esp. Fisiol.* 2: 243-248.

Beierwaltes W. H., Arenshorst W. J. y Klemmer P. J. (1982). Electrolyte and water balance in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 4: 908-915.

Bell G. I., Burant C. F., Takeda J. y Gould G. W. (1993). Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.* 268: 19161-19164.

Benjamin N., Graham J. M. y Robinson B. F. (1990). Cholesterol/phospholipid ratio is increased in the plasma membrane of platelets from patients with primary hypertension. *J. Hypertens. Suppl.* 6: S706.

Berteloot A. (1984). Characteristics of glutamic acid transport by rabbit intestinal brush border membrane vesicles. Effects of Na^+ - K^+ and H^+ -gradients. *Biochim. Biophys. Acta* 775: 129-140.

Bihler I. y Cybulski R. (1973). Sugar transport at the basal and lateral aspect of the small intestinal cell. *Biochim. Biophys. Acta* 298: 429-433.

Bieberdorf F. A., Morawski S. y Fordtran J. S. (1975). Effect of sodium, mannitol, and magnesium on glucose, galactose, 3-o-methylglucose, and fructose absorption in the human ileum. *Gastroenterology* 68: 58-66.

Bing R. F., Heagerty A. M., Thurston H. y Swales J. D. (1986). Ion transport in hypertension: are changes in the cell membrane responsible ?. *Clin. Sci.* 71: 225-230.

Birnir B., Lee H.-S., Hediger M. A. y Wright E. M. (1990). Expression and characterization of the intestinal Na⁺/glucose cotransporter in COS-7 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1048: 100-104.

Blakeborough P., Neville S.G. y Rolls B.A. (1990). The effect of diets adequate and deficient in calcium on blood pressures and the activities of intestinal and kidney plasma membrane enzymes in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* 63: 65-78.

Blakemore S. J., Alrdo J. C., James J., Campbell F. C., Lucocq J. M. y Hundall H. S. (1995). The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. *Biochem. J.* 309: 7-12.

Blaustein M. P. (1984). Sodium transport and hypertension, where are we going?. *Hypertension* 6: 445-453.

Blok J., Farnsen J. A. y Ginsel L. A. (1984). Turnover of brush border glycoproteins in human intestinal absorption cells. Do lysosomes have a regulatory function?. *Cell Biol. Int. Rep.* 8: 993-1014.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brasitus T. A. y Schachter D. (1984). Lipid composition and fluidity of rat enterocyte basolateral membrane: regional differences. *Biochim. Biophys. Acta* 774: 138-146.

Brasitus T. A. y Dudeja P. K. (1988). In lipids domains and relationships to membrane function. 227-254. *Liss, New York*.

Brasitus T. A., Dudeja P. K., Bolt M. J., Sitrin M. D. y Baum C. (1989). Dietary triacylglycerol modulates sodium-dependent D-glucose transport, fluidity and fatty acid composition of rat small intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 27: 177-189.

Brethaudiere J. P., Vassault A., Amsellem L., Pourc M. L., Thieu-Phung H. y Bailly M. (1977). Criteria for establishing a standardized method for determining alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin. Chem.* 23: 2263-2274.

Bretscher A. (1991). Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Cell Biol.* 7: 337-374.

Brot-Laroche E., Serrano M. A., Delhomme B. y Alvarado F. (1986). Temperature sensitive and substrate specificity of two distinct Na⁺-activated D-glucose systems in guinea pig jejunal brush border vesicles. *J. Biol. Chem.* 261: 6168-6176.

Bukoski R. D. (1990). Intracellular Ca⁺⁺ metabolism of isolated resistance arteries and cultured vascular myocytes of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. *J. Hypertens.* 8: 37-43.

Burant C. F. y Bell G. I. (1992). Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* 31: 10414-10420.

Burant C. F., Takeda J., Brot-Laroche E., Bell G. I. y Davidson N. O. (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J. Biol. Chem.* 267: 14523-14526.

Burant C.F., Flink S., DePaoli A. M., Chen J., Lee W. S., Hediger M. A., Buse J. B. y Chang E. B. (1994). Small intestine hexose transport in experimental diabetes. Increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. *J. Clin. Invest.* 93: 578-585.

Burant C. F. y Saxena M. (1994). Rapid reversible substrate regulation of fructose transporter expression in rat small intestine and kidney. *Am. J. Physiol.* 267: G71-G79.

Butzner J. D., Brockway P. D. y Meddings J. B. (1990). Effects of malnutrition on microvillus membrane glucose transport and physical properties. *Am. J. Physiol.* 259: G940-G946.

Carr P., Taub N. A., Watts G. F. y Poston L. (1993). Human lymphocyte sodium-hydrogen exchange. The influences of lipids, membrane fluidity and insulin. *Hypertension* 21: 344-352.

Carreras O., Murillo M. L., Delgado M. J. y Bolufer J. (1988). Galactose absorption after jejunoileal bypass in rats. *Nutrition Reports International.* 38: 1219-1229.

Carrière B. y Le Grimellec C. (1986). Effects of benzyl alcohol on enzyme activities in kidney brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 600: 406-420.

Carruters A. (1990). Facilitative diffusion of glucose. *Physiol. Rev.* 70: 1135-1176.

Cheeseman C. I. (1993). GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology* 105: 1050-1056.

Cheeseman C. I. (1997). Upregulation of SGLT-1 transport activity of rat jejunum induced by GLP-2 infusion in vivo. *Am. J. Physiol.* 273: R965-R971.

Christie D. M., Dawson P. A., Thevananther S. y Shneider B. L. (1996). Comparative analysis of the ontogeny of a sodium dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *Am. J. Physiol.* 34: G377-G385.

Colas B. y Maroux S. (1980). Simultaneous isolation of brush border and basolateral membrane from rabbit enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 600: 406-420.

Concha II, Velasquez F. U., Martínez J. M., Angulo C., Droppelmann A., Reyes A. M., Slebe J. C., Vera J. C. y Golde D. W. (1997). Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose. *Blood* 89: 4190-4195.

Corpe C.P., Basaleh M. M., Affleck J., Gould G., Jess T.J. y Kellett G.L. (1996). The regulation of GLUT5 and GLUT2 activity in the adaptation of intestinal brush-border fructose transport in diabetes. *Pflügers Arch.* 432: 192-201.

Crane R. K. (1962). Hypothesis for mechanism of intestinal active transport of sugar. *Federation Proc.* 21: 891-895.

Crane R. K. (1965). Na⁺ dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Federation Proc.* 24: 1000-1005.

Crouzoulon G. y Korieh A. (1991). Fructose transport by rat intestinal brush border membrane vesicles. Effect of high fructose diet followed by return to standard diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 100: 175-182.

Currant F. P., Schultz S. G., Chez R. A. y Ferisz R. E. (1967). Kinetic relations of the Na⁺ aminoacid interaction at the mucosal border of the intestine. *J. Gen. Physiol.* 50: 1261-1267.

Dahlquist A. (1964). Method for assay of intestinal disaccharidases. *Analytical Biochem.* 7: 18-25.

Dall' Aglio E., Tosini P., Ferrari P., Zavaroni I., Passeri M. y Reaven G. H. (1991). Abnormalities of insulin and metabolism in Milan hypertensive rats. *J. Am. Med. Assoc.* 4: 773-775.

Darakshan F., Majduch E., Kristiansen S., Richter E. A. y Hundal H. S. (1998). Biochemical and functional characterization of the GLUT5 fructose transporter in rat skeletal muscle. *Biochem. J.* 336: 361-366.

Davidson N. O., Hausman A. M. L., Ifkovits C. A., Buse J. B., Gould G. W., Burant C. F. y Bell G. I. (1992). Human intestinal glucose transporter expression and location of GLUT5. *Am. J. Physiol.* 262: C795-C800.

Debnam E. S., Ebrahim H. M. y Swaine D. J. (1990). Diabetes Mellitus and sugar transport across the brush-border and basolateral membrane of rat jejunal enterocytes. *J. Physiol.* 424: 13-25.

Debnam E. S. y Chaurimootoo G. (1993). Insulin-induced hypoglycaemia and sugar transport across the brush-border and basolateral of rat jejunal enterocytes. *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 480-485.

Debnam E. S., Sharp P. S. y Srai S. K. S. (1995). Contribution of GLUT2 in brush border glucose uptake. *Ital. J. Gastroenterol.* 27: 153.

Delachambre M. C., Nerce M., Asdrubal P. y Poisson J. P. (1998). Changes in tissue polyunsaturated fatty acids with age, in spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 33: 795-801.

Devaskar S. U. y Mueckler M. M. (1992). The mammalian glucose transporters. *Pediatr. Res.* 31: 1-13.

Devynck M. A., Pernollet M. G., Nuñez A. M., Aragon I., Montenay-Garestier T., Helene C. y Meyer P. (1982). Diffuse structural alterations in cell membranes of spontaneously hypertensive rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5057-5060.

Dominiczak A. F. y Bohr D. F. (1991). The primacy of membrane microviscosity in genetic hypertension. *Am. J. Hypertension* 4: 963-969.

Dominiczak A. F., Lazar D. F., Das A. K. y Bohr D. F. (1991) Lipid bilayer in genetic hypertension. *Hypertension* 18: 748-757.

Drüeke T., Hennessen V., Nabarra B., Ben Nasr L., Lucas P. A., Dang P. Thomasset M., Lacour B. y Couchier E. (1990). Ultrastructural and functional abnormalities of intestinal and renal epithelium in the SHR. *Kidney International* 37: 1438-1448.

Dudeja P. K., Wali R. K., Klitzke A y Brasitus T. A. (1990). Intestinal D-glucose transport and membrane fluidity along crypt-villus axis of streptozocin-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 259: G571-G577.

Engelman B. y Duhm J. (1987). Intracellular calcium content in human erythrocytes: relation to sodium transport systems. *J. Membr. Biol.* 98: 79-87.

Engler M. M. y Engler M. B. (1998). Dietary borage oil alters plasma, hepatic and vascular tissue fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 59: 11-15.

Fedorak R. N., Chessemann C. I., Thomson A. B. R. y Porter V. M. (1991). Altered glucose carrier expression: mechanism of intestinal adaptation during streptozotocin-induced diabetes in rats. *Am. J. Physiol.* 261: G585-G590.

Feig P. U. (1990). Increased platelet membrane sodium proton antiport exchange rate in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 3: 927-932.

Fernandez Y. J., Boigegrain R. A. A., Cambon-Gros C. D. y Mitjavila S. E. (1984). Sensitivity of Na⁺-couple D-glucose uptake, Mg²⁺-ATPase and sucrase to perturbations of the fluidity of brush-border membrane vesicles induced by n-aliphatic alcohols. *Biochim. Biophys. Acta* 770: 171-177.

Ferraris R. P. y Diamond J.M. (1989). Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. *Ann. Rev. Physiol.* 51: 125-141.

Ferraris P., Torielli L., Salardi S., Rizzo A. y Binachi G. (1992). Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransport in resealed ghosts from erythrocytes of the Milan hypertensive rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1111: 111-119.

Ferraris R. P. (1994). Regulation of intestinal nutrient transport. A: Johnson, L.R. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Nova York: Raven Press, 1821-1844.

Fisher R. B. y Parsons D. S. (1949). A preparation of surviving rat small intestine for the study of absorption. *J. Physiol.* 110: 36-46.

Foster C. D., Honeyman T. W. y Scheid C. R. (1992). Alterations in Na^+/H^+ exchange in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 262: H1567-H1662.

Foucher C., Narce M., Nasr L., Delachambre M. C. y Poisson J. P. (1997). Liver microsomal membrane fluidity and microsomal desaturase activities in adult spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 15: 863-869.

Freeman, H.J. y Quamme, G.A. (1986). Aged related changes in sodium dependent glucose transport in rat small intestine. *Am. J. Physiol.* 251: G208-G217.

Fukumoto H. Seino S. Imura H. Seino Y. Eddy L. R. Fukushima Y. Byers M. G. Shows T. B. y Bell G. I. (1988). Sequence tissue distribution and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporters-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5434-5438.

Ganapathy V., Brandsch M. y Leibach F. H. (1994). Intestinal transport of amino acids and peptides. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract (3rd Ed)* Edited by L. K. Johnson. New York: Raven. 1773-1794.

Garriga C., Moretó M. y Planas J. M. (1997). Hexose transport across the basolateral membrane of the chicken jejunum. *Am. J. Physiol.* 272: R1330-R1335.

Garriga C., Moretó M. y Planas J. M. (1999). Hexose transport in the apical and basolateral membranes of enterocytes in chickens adapted to high and low NaCl intakes. *J. Physiol.* 514: 189-199.

Ghishan F. K. y Wilson F. A. (1985). Developmental maturation of D-glucose transport by rat jejunal brush border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 248: G87-G92.

Gilles-Baillien M., Carlier P. G. y Rorive G. L. (1986). Alterations of intestinal membrane-bound enzymes in three types of hypertensive rats. *Clin. Sci.* 70: 617-626.

Göbel B. O., Hoffmann G., Ruppert M., Stumpe K. O., Vetter H., Siffert W. y Düsing R. (1994). The lymphocyte Na^+/H^+ antiport: activation in primary hypertension and during chronic NaCl-loading. *Europ. J. Clin. Invest.* 24: 529-539.

Goldner A. M., Shultz S. G. y Curran P. F. (1969). Sodium and sugar fluxes across the mucosal border rabbit ileum. *J. Gen. Physiol.* 53: 362-383.

Goré J., Besson P., Hoinard C. y Bougnoux P. (1994). Na^+/K^+ antiporter activity in relation to membrane fatty acid composition and cell proliferation. *Am. J. Physiol.* 266: C110-C120.

Gould G. W., Thomas H. M., Jess T. J. y Bell G. I. (1991). Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: Kinetic characterization substrate specificities of the erythrocyte (GLUT1), liver (GLUT2) and brain (GLUT3) isoforms. *Biochemistry* 30: 5139-5245.

Haase W., Heitmann K., Friese W., Ollig D. y Koepsell H. (1990). Characterization and histochemical localization of the rat intestinal Na^+ -D-glucose cotransporter by monoclonal antibodies. *Eur. J. Cell Biology* 52: 297-309.

Hediger M. A., Coady M. J., Ikeda T. S. y Wright E. M. (1987). Expression cloning and cDNA sequence of the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature Lond.* 330: 379-381.

Hediger M. A., Budarf M. L., Emanuel B. S., Mohandas T. K. y Wright E. M. (1989). Assignment of the human intestinal Na⁺/glucose cotransporter gene (SGLT1) to the Q11.2_qter region of chromosome 22. *Genomics* 4: 297-300.

Hediger M. A., Mendelein J., Lee H. S. y Wright E. M. (1991). Biosynthesis of the cloned intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1064: 360-364.

Hediger M. A. y Rhoads D. B. (1994). Molecular Physiology of sodium glucose cotransporters. *Physiol. Rev.* 74: 993-1026.

Hediger M. A., Kanai Y., You G. Y Nussberger S. (1995). Mammalian ion-coupled solute transporters. *J. Physiol.* 482: 7S-17S.

Hennesen U., Drüeke T., Comte L., Steuf M.C., McCarron D.A. y Lacour B. (1990). Calcium uptake kinetics into brush-border membrane vesicles: higher V_{max} in the spontaneously hypertensive rat than in normotensive control. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 170: 742-747.

Hennesen U., Chabanis S., Silva S. L., Nabarra B., Drüeke T. y Lacour B. (1993). Increased brush border membrane calcium transport in the intestine, but not the kidney tubule, of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 6: 593-601.

Herotte J. G., Franck G., Santarromana M. y Bourdon R. (1991). Tissue and blood magnesium levels in spontaneously hypertensive rats, at rest and in stressful conditions. *Magnes. Res.* 4: 91-96.

Hilton M. P. (1986). Cellular sodium transport in essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 314: 222-229.

Hirayama B. A., Wong H. C., Smith C. D. Hagenbuch B. A., Hediger M. A. y Wright E. M. (1991). Intestinal and renal Na⁺/glucosa cotransporters share common structures. *Am. J. Physiol.* 261: C296-C304.

Hirayama B. A. y Wright E. M. (1992). Glycosilation of the rabbit intestinal brush-border Na⁺/glucose cotransporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1103: 37-44.

Hirayama B. A., Lostao M. P., Panayotova-Heiermann M., Loo D. D. F., Turk E. y Wright E. M. (1996). Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT1). *Am. J. Physiol.* 270: G919-G926.

Hoffmann G., Ko Y., Sachinidis A., Göbel B. O. Vetter H., Roskopf D., Siffert W. y Düsing R. (1995). Kinetics of Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR.: Effects of phorbol ester. *Am. J. Physiol.* 268: C14-C20.

Holman G. D. y Naftalin R. J. (1975). D-galactose accumulation in rabbit ileum. Effect of theophylline on serosal permeability. *Biochim. Biophys. Acta* 406: 386-401.

Holt P. R., Pascal R. R. y Kotler D. P. (1984). Effect of aging upon small intestinal structure in the fischer rat. *J. Gerontol.* 39: 642-647.

Honegger P. y Semenza G. (1973). Multiplicity of carriers for free glucalogs in hamster small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 318: 390-410.

Hopfer U., Sigrist-Nelson K., Perrotto J. E. y Isselbacher K. J. (1973). Glucose transport in isolated brush border membrane vesicles from rats small intestine. *J. Biol. Chem.* 248: 25-32.

Hopfer U. y Grosecloes R. (1980). The mechanism of the Na⁺ dependent D-glucose transport. *J. Biol. Chem.* 255: 4453-4462.

Hsu C. H., Chen P. S., Smith D. E. y Yang C. S. (1986). Pathogenesis of hypercalciuria in Spontaneously hypertensive rats. *Miner Electrolyte Metab.* 12: 130-141.

Hsu C. H., Yang C.-S., Patel S. R. y Stevens M. G. (1987). Calcium and vitamin D metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 253: F712-F718.

Hundal H. S., Daraksham F., Kristiansen S., Blakemore S. J. y Richter E. A. (1998). GLUT5 expression and fructose transport in human skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441: 35-45.

Hurtado de Catalfo G. E. y Gómez Dumm I. N. (1996). Spontaneously hipertensive rats: eicosa-8, 11, 14-trienoic acid metabolism and arachidonic acid biosynthesis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40: 759-768.

Hyun C. S. y Kimmich G. A. (1982). Effect of cholera toxin in cAMP levels and Na⁺ influx in isolated intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 243: C107-C115.

Ikeda T. S., Hwang E. S., Coady M. J., Hirayama B. A., Hediger M. A. y Wright E. M. (1989). Characterization of Na⁺/glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine. *J. Membrane. Biol.* 110: 87-95.

Inukai K., Asano T., Katagiri H., Ishirama H., Anai M., Fukushima Y., Tsukuda K., Kikuchi M., Yazaki Y. y Oka Y. (1993). Cloning and increased expression with fructose feeding of rat jejunal GLUT5. *Endocrinology* 133: 2009-2014.

Inukai K., Katagiri H., Takata K., Asano T., Anai M., Ishihara H., Nakazaki M., Kikuchi M., Yazaki Y y Oka Y. (1995). Characterization of rat GLUT5 and functional analysis of chimeric proteins of GLUT1 glucose transporter and GLUT5 fructose transporter. *Endocrinology* 136: 4850-4857.

Jaso M. J., Vial M. y Moretó M. (1995). Hexose accumulation by enterocytes from the jejunum and rectum of chickens adapted to high and low NaCl intake. *Pflügers Arch.* 429: 511-516.

Jones A. W. (1972). Altered ion transport in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. Influence of aldosterone, norepinephrine, and angiotensin. *Circ. Res.* 33: 563-572.

Kanai Y., Lee W. S., You G., Brown D. y Hediger M. A. (1994). The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. *J. Clin. Invest.* 93: 397-404.

Kane S., Seatter M. J. y Gould G. W. (1997). Functional studies of human GLUT5: effect of pH on substrate selection and an analysis of substrate interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 503-505.

Kaunitz J. D., Gunter R. y Wright E. M (1982). Involvement of multiples sodium ions in intestinal D-glucose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2315-2318.

Kaunitz J. D. y Wright E. M. (1983). Heterogeneity of the intestinal sodium D-glucose carrier (Abstract). *Federation Proc.* 42: 5831.

Kaunitz J. D., Gauthier R. D. y Wright E. M. (1982). Involvement of multiple sodium ions in intestinal D-glucose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 2315-2318.

Kaunitz J. D. y Wright E. M. (1984). Kinetics of sodium D-glucose cotransport in bovine intestinal brush border vesicles. *J. Membrane Biol.* 79: 41-51.

Kawano Y., Matsuoka H., Takishita S. y Omae T. (1998). Effects of magnesium supplementation in hypertensive patients. *Hypertension* 32: 260-265.

Kawarabayashi T., Kanayama Y., Takeuchi K., Oku H., Kohno M., Yoshimura T., Yasunari K., Tajeda T., Kageyama K. y Kinoshita Y. (1986). Decreased water and potassium content in erythrocytes in essential hypertension. *Hypertension.* 8: 618-624.

Kayano R., Burant C. F., Fukumoto H., Gould G. W., Fan Y. S., Eddy L. R., Byers M. G., Shows T. B., Seino S. y Bell G. I. (1990). Human facilitative glucose transporters: isolation, functional characterization and gene localization of cDNAs encoding and isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J. Biol. Chem.* 265: 13276-13282.

Kelly M. P., Quinn P. A., Davies J. E. y Ng L. L. (1997). Activity and expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 and 3 in kidney proximal tubules of hypertensive rats. *Circ. Res.* 80: 853-860.

Kessler H., Tannenbam J. y Tannenbam C. (1978). A simple apparatus for performing short time (1-2s) uptake measurement in small volumes its application to D-glucose transport studies in brush-border vesicles from rabbit jejunum and ileum. *Biochim. Biophys. Acta* 509: 348-359.

Kessler M. y Semneza G. (1983). The small intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter: an asymmetric gated channel. *J. Membrane Biol.* 76: 27-56.

Kimmich G. A. y Randles J. (1975). A Na⁺ independent phloretin sensitive monosaccharide transport system in isolated intestinal epithelial cells. *J. Membr. Biol.* 23:57-76.

Kimmich, G. A. y Randles, J. (1979). Regulation of Na⁺-dependent transport of intestinal epithelial cells by exogenous ATP. *Am. J. Physiol.* 238: C177-C183.

Kimmich G. A. (1981). Intestinal absorption of sugar. *Physiology of the gastrointestinal tract.* (Ed. L. R. Johnson), Raven Press, New York, 1035-1061.

Kitts D. D., Yuan Y. V. y Godin D. V. (1998). Plasma and lipoprotein lipid composition and hepatic antioxidant status in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76: 202-209.

Koepsell H. y Machala A. (1987). Interaction of phlorizin with the Na⁺/glucose cotransporter from intestine and kidney. *Top. Mol. Pharmacol.* 41: 169-202.

Le Huerou I., Guilloteau P., Wicker C., Mouats A., Chayvialle JL, Bernard C., Burton J., Toullec R y Puigserver A. (1992). Activity distribution of seven digestive enzymes along small intestine in calves during development and weaning. *Dig. Dis. Sc.* 37: 40-46.



Le Quan Sang K. H., Montenay-Garestier T. y Devynck M. A. (1991). Alterations of platelet membrane microviscosity in essential hypertension. *Clin Sci.* 80: 205-211.

Leatherbarrow R. J. (1987). Enzfitter. A non-linear regression data analysis program for the IBM PC. *Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.*

Lee H. Y., Kim K. R. y Park Y. S. (1991). Transport kinetics of glucose and alanine in renal brush-border membrane vesicles of cadmium-intoxicated rabbits. *Pharmacol. Toxicol.* 69: 390-395.

Lee W. S., Kanai Y., Wells R. G. y Hediger M. A. (1994). The high affinity Na⁺/glucose cotransporters: reevaluation of function and distribution of expression. *J. Biol. Chem.* 269: 12032-12039.

Lescale-Matys L., Dyer J., Scott D., Freeman T. C., Wright E. M. y Shirazi-Beechey S. P. (1993). Regulation of the ovine intestinal Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance. *Biochem. J.* 291: 435-440.

Levine J. S., Allen R. H., Alpers D. H. y Seetharam B. (1984). Immunocytochemical localization of the intrinsic factor-cobalamin receptor in dog-ileum: distribution of intracellular receptor during cell maturation. *J. Cell Biol.* 98: 1111-1117.

Lijnen P., Petrov V. y Amery A. (1994). Relationship between erythrocyte cation transport systems and membrane and plasma lipids in healthy men. *Am. J. Med. Sci.* 307: S146-S149.

- Lin J. T., Kormanec J., Wehner F., Wieler-Badt S. y Kinne R. K. (1998).** High-level expression of Na⁺/D-glucose cotransporter (SGLT1) in a stably transfected Chinese hamster ovary cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1373: 309-320.
- Loo D. D. F., Zeuthen T., Chandy G. y Wright E. M. (1996).** Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13367-13370.
- Louvard D. (1989).** The function of the major cytoskeletal component of the brush border. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1: 51-57.
- Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A. L. y Randall R. G. (1951).** Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lubcke R. y Barbezat G. O. (1988).** Intestinal ion transport in rats with spontaneous arterial hypertension. *Clin. Sci.* 75: 127-133.
- Madara J. L., Trier J. S. y Neutra M. R. (1980).** Structural changes in the plasma membrane accompanying differentiation of epithelial cells in human and monkey small intestine. *Gastroenterology* 78: 963-975.
- Madara J. L. y Trier J. S. (1994).** The functional morphology of the mucosa of the small intestine. *A Physiology of the Gastrointestinal Tract. L.R. Johnson Raven Press, New York*, cap. 45.
- Maenz D. D. y Cheeseman C. I. (1986).** Effect of hyperglycemia on D-glucose transport across the brush-border and basolateral membrane of rat small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 860: 277-285.

Maffia M., Acierno R., Cillo E. y Storelli C. (1996). Na⁺-D-glucose cotransport by intestinal BBMVs of the Antarctic fish *Trematomus Bernacchii*. *Am. J. Physiol.* 271: R1576-R1583.

Mahraoui L., Rousset M., Dussaulx E., Dramoul D., Zweibaum A. y Brot-laroche E. (1992). Expression and localization of GLUT5 in caco-2 cells in human small intestine and colon. *Am. J. Physiol.* 263: G312-G318.

Mahraoui L., Rodolosse A., Barbat A., Dussaulx E., Zweibaum A., Rousset M. y Brot-Laroche E. (1994). Presence and differential expression of SGLT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem. J.* 298: 629-633.

Mantych G. D., James D. E. y Devaskar S. U. (1993). Jejunal/kidney glucose transporter isoform (GLUT5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology* 132: 35-40.

Marquardt D. W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11: 431-441.

Mate A. (2000). Estudio del transporte renal de monosacáridos en ratas hipertensas. *Tesis Doctoral*.

Mate A., de la Hermosa, M.A., Barfull, A., Sánchez-Aguayo, I., Planas J.M. y Vázquez C.M. (2000) Decreased monosaccharide transport in renal brush-border membrane vesicles of spontaneously hypertensive rats. *CMLS, Cell Mol. Life Sci.* 57: 165-174.

Matosin-Matekalo M., Mesonero J. E., Laroche T. J., Lacasa M. y Brot-Laroche E. (1999). Glucose and thyroid hormone co-regulate the expression of the intestinal fructose transporter GLUT5. *Biochem. J.* 339: 233-239.

Mavrias D. A. y Mayer R. J. (1973) Metabolism of fructose in the small intestine I. The effect of fructose feeding on fructose transport and metabolism in guinea pig small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 291: 538-544.

McLaren Y., Kreutz R., Lindpaintner K., Bohr D. F., Ganten D., Reid J. L. y Dominiczak A. F. (1993). Membrane microviscosity does not correlate with blood pressure: a cosegregation study. *J. Hypertens.* 11: 25-30.

Messier B. y Leblond C. P. (1960). Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine- H^3 into male rats and mice. *Am. J. Anat.* 106: 247-285.

Mitjans M., Barniol G. y Ferrer R. (1995). Epithelial surface area in chicken small intestine during development. *Ital. J. Gastroenterol.* 7: 162.

Miyamoto K. I., Hase K., Minami H., Taketani Y. y Oka T. (1991). Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1110-1117.

Miyamoto K., Hase K., Takagi T., Fujii T., Taketani Y., Minami H., Oka T. y Nakabou Y. (1993). Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. *Biochem. J.* 295: 211-215.

Miyamoto K. I., Tatsumi S., Morimoto A., Minami H., Yamamoto H., Sone K., Taketani Y., Nakabou Y., Oka T. y Takeda E. (1994). Characterization of the rabbit intestinal fructose transporter (GLUT5). *Biochem. J.* 303: 877-883.

Monteith G. R., Chen S. y Roufogalis B. D. (1994). Measurement of Ca^{2+} pump mediated efflux in hypertension. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 31: 117-124.

Morduchowicz G. A., Sheikh-Hamad D., Jo Ok D., Nord E. P., Lee D. B. N. y Manawa N. (1989). Increased Na^+/H^+ antiport activity in the renal brush border membrane of SHR. *Kidney Int.* 36: 576-581.

Moretó M., Planas J. M., De Gabriel C. y Santos F. J. (1984). Involvement of cellular cyclic AMP in theophylline-induced sugar accumulation in chicken intestinal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 771: 68-73.

Morrison A. I., Panayotova-Heiermann M., Feigl G., Schölermann B. y Kinne R. K. H. (1991). Sequence comparison of the sodium D-glucose cotransport systems in rabbit renal and intestinal epithelia. *Biochim. Biophys. Acta* 1089: 121-123.

Ng L. L., Davies J. E. y Ameen M. (1992). Intracellular free-magnesium levels in vascular smooth muscle and striated muscle cells of the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism* 41: 772-777.

Nishizaki T., Kammesheidt A., Sumikawa K., Asada T. y Okada Y. (1995). A sodium- and energy-dependent glucose transporter with similarities to SGLT1-2 is expressed in bovine cortical vessels. *Neurosci. Res.* 22: 13-22.

Ohta T. K., Isselbacher K. I. y Rhoads D. B. (1990). Regulation of glucose transporters and LCC-PK₁ cells: effect of D-glucose and monosaccharides. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6941-6949.

Orita Y., Fukuhara Y., Yanase M., Okada N., Nakanishi T., Horio M., Moriyama T., Ando A. y Abe H. (1984). The mechanism of decreased Na^+ -dependent D-glucose transport in brush-border membrane vesicles from rabbit kidneys with experimental Fanconi syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 771: 195-200.

Orlov S. N., Postnov I. Y., Pokudin N. I., Kukharenko V. Y. y Postnov Y. V. (1989). Na^+/H^+ exchange and other ion-transport systems in erythrocytes of essential hypertensives and spontaneously hypertensive rats: A comparative analysis. *J. Hypertens.* 7: 781-788.

Oulianova N. y Berteloot A. (1996). Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport models through an oligomeric protein? 1. Glucose transport studies. *J. Membr. Biol.* 153: 181-194.

Overback H. (1987). The vascular Na^+ , K^+ pump in experimental hypertension. *Hypertension* 10: 95-100.

Owen R. L., Pierce N. F., Apple R. T. y Cray W. C. J. (1986). M cells transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer' s patches: a mechanism for antigen samplers and for microbial transepithelial migration. *J. Infect. Dis.* 153: 110-118.

Pagman A., Ambrosio G.B., Baggio G., Pigozzo S., Visona A., Maiolino P., Carrozza A. y Ferrari S. (1986). Changes in lipid pattern and blood pressure after substitution of separable fats with olive oil or sunflower oil in the diet: feasibility and efficacy in normolipidemic families. *Giornale dell' Arteriosclerosis* 3: 180-181.

Pajor A. M. y Wright E. M. (1992). Cloning and functional expression of a mammalian Na^+ /nucleoside cotransporter. A member of the SGLT family. *J. Biol. Chem.* 267: 3557-3560.

Panayotova-Heiermann M., Loo D. D. F. y Wright E. M. (1995). Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na^+ /glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* 270: 27099-27105.

Panayotova-Heiermann M., Loo D. D., Kong C. T., Lever J. E. y Wright E. M. (1996). Sugar binding to Na⁺/glucose cotransporter is determined by the carboxyl terminal half of the protein. *J. Biol. Chem.* 271: 10029-10034.

Pappenheimer J. R. y Volpp K. (1992). Transmucosal impedance of small intestine: correlation with transport of sugar and amino acid. *Am. J. Physiol.* 263: C480-C493.

Parenti P., Hanozet G. M. y Bianchi G. (1986). Sodium and glucose transport across renal brush-border membranes of Milan hypertensive rats. *Hypertension* 8: 932-939.

Pennington R. J. (1961). Biochemistry of dystrophic muscle. Mitochondrial succinate-tetrazolium reductase and adenosine triphosphatase. *Biochem. J.* 80: 649-652.

Perdue M. H., Forstner J. F., Roomi N. W. y Gall D. G. (1984). Epithelial response to intestinal anaphylaxis in rats: goblet cells secretion and enterocyte damage. *Am. J. Physiol.* 247: G632-G637.

Pickar J. G., Carlsen R. C., Atrakchi A. y Gray S. D. (1994). Increased Na⁺-K⁺ pump number and decreased pump activity in soleus muscles in SHR. *Am. J. Physiol.* 267: C836-C844.

Planas J.M., Jamil-dalle K., Barfull A., Chesnokova L. y Amat C. (1997). Regional differences in the brush-border membrane transport of D-glucose in chicken intestine. *XXXIII Congress of the International Union of Physiological Sciences* P006.12.

Poch E., Botey A., Gaya J., Darnell A., Rivera F. y Revert L. (1994). Intracellular calcium concentration and activation of the Na^+/H^+ exchanger in essential hypertension. *Kidney Int.* 45: 1037-1043.

Poppe R., Karbach U., Gambaryan S., Wiesinger H., Lutzenburg M., Kraemer M., Witte O. W. y Koepsell H. (1997). Expression of the Na^+ -D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J. Neurochem.* 69: 84-94.

Potten C. S., Loeffler M. (1990). Stem cells: Attributes cycles, spiral, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110:1001-1020.

Puchal A. A. y Buddington R. K. (1992). Postnatal development of monosaccharide transport in pig intestine. *Am. J. Physiol.* 262: G895-G902.

Ragone E., Strazzullo P., Siani A., Pagano E., Sacchi A., Cipriano P., Vaccaro O. y Mananiam M. (1993). Essential hypertension impaired glucose tolerance and hyperlipidaemia: multiple relationships with sodium-lithium countertransport. *J. Hypertens.* 11: S256-S257.

Rand B. E., Depaoli M. A., Davidson N. O., Bell I. G. y Burant C. F. (1993). Sequence, tissue distribution and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *Am. J. Physiol.* 264: G1169-G1176.

Raul F., Gosse, F., Doffoel, M., Darmenton, P. y Wessely J.Y. (1988). Age related increase of brush border enzyme activities along the small intestine. *Gut* 29: 1557-1563.

Riklis E. y Quastel H. J. (1958). Effects of cations of sugar absorption by isolated surviving guinea pig intestine. *Can. J. Biochem. Physiol.* 36: 347-362.

Roskopf D., Siffert G., Osswald U., Witte K., Dusing R., Akkerman J. W. y Siffert W. (1992). Platelet Na^+/H^+ exchange activity in normotensive and hypertensive subject: effect of enalapril therapy upon antiport activity. *J. Hypertens.* 10: 839-847.

Roskopf D., Haider N., Quednau B. y Siffert W. (1995). Expression and activity of the Na^+/H^+ exchanger NHE-1 in various tissues of spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Cell Physiol. Biochem.* 5: 276-285.

Ruiz-Gutiérrez V., Santa María C., Planas J.M., Vázquez C. M., (1997). Membrane lipid composition and fluidity. Influence in membrane protein function. *Recent Research Developments in Lipids Research.* 1: 305-321.

Saleh A. y Battle D. C. (1990). Kinetic properties of the Na^+/H^+ antiporter of lymphocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J. Clin. Invest.* 85: 1734-1739.

Sasaki S., Nakamura K., Uchida A., Fujita H., Itoh H., Nakata T., Takeda K. y Nakagawa M. (1995). Effects of gamma-linolenic and eicosapentaenoic acids on blood pressure in SHR. *Clin. Exo. Pharmacol. Physiol.* 22: S306-S307.

Satoh Y. (1988). Effect of live and heat-killed bacteria on the secretory activity of Paneth cells in germ-free mice. *Cell Tissue Res.* 251: 87-93.

Sawyer W. H. (1988). Fluorescence spectroscopy in the study of membrane fluidity. En: *Advances in membrane fluidity*: 161-191. *Aloja R. C., Curtain C. C. y Gordon L. M., Eds. New York, Alan Liss.*

Schmidt U. M., Eddy B., Fraser C. M., Venter J. C. y Semenza G. (1983). Isolation of (a subunit of) the Na⁺/glucose cotransporter(s) of rabbit intestinal brush-border membranes using monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 161: 279-283.

Schultz S. G. y Strecker C.K. (1970). Fructose influx across the brush border of rabbit ileum. *Biochim. Biophys. Acta* 367: 247-254.

Sharp P. A. y Debnam E. S. (1994). The role of cyclic AMP in control of sugar transport across the brush-border and basolateral membranes of rat jejunal enterocytes. *Exp. Physiol.* 79: 203-214.

Shinitzky M. y Barenholz Y. (1974) Dynamics of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing dicetylphosphate. *J. Biol. Chem.* 249: 2652-2657.

Shirazi-Beechey S. P., Hirayama B. A. Wang Y., Scott D., Smith M. W. y Wright E. M. (1991). Ontogenic development of lamb intestinal sodium-glucose co-transporter is regulated by diet. *J. Physiol.* 437: 688-708.

Shu R., David E. S. y Ferraris R. P. (1997). Dietary fructose enhances intestinal fructose transport and GLUT5 expression in weaning rats. *Am. J. Physiol.* 272: G446-G453.

Siciksk P., Rowinski J., Warchol J. G., Jarzabek Z., Gut W., Szczygiel B., Bielecki K., Koch G. (1990). Poliovirus type I enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology* 98: 56-58.

Sierra A., Coca A., Pare J. C., Sánchez M., Valls V. y Urbano-Márquez A. (1993). Erythrocyte ion fluxes in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Circulation* 88: 1628-1633.

Silverman M., Speight P. y Loo L. (1993). Identification of two unique polypeptides from dog kidney outer cortex and outer medulla that exhibit different Na⁺/D-glucose cotransport functional properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1153: 43-52.

Smith M. W. (1981). Autoradiographic analysis of alanine uptake by newborn pig intestine. *Experientia* 37: 868-870.

Soleimani M. y Singh G. (1995). Physiologic and molecular aspects of the Na⁺/H⁺ exchangers in health and disease processes. *J. Investig. Med.* 43: 419-430.

Stevens B.R., Kaunitz J.D., Wright E. (1984) Intestinal transport of amino acid and sugar: avances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Physiol.* 46: 417-433.

Stevens B. R., Fernandez A., Hirayama B. y Wright E. M. (1990). Intestinal brush-border membrane Na⁺/glucose cotransporter function in situ as homotetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1456-1460.

Stidwill R. P., Wysolmerski T., Burgess D. R. (1984). The brush border cytoskeleton is not static. *In vivo* turnover of proteins. *J Cell Biol.* 98:641-645.

Stirling C. E. (1972). Radioautographic localization of sodium pump sites in rabbit ileum. *J. Cell Biol.* 53: 704-717.

Sugiyama T., Yoshizumi M., Takakau U. y Yazaki Y. (1990). Abnormal calcium handling in vascular smooth muscle cell of spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 8: 369-375.

Swarts H. G. P., Bouting S. L., De Pont J. J. H. H. M. , Stekhoven F. M. A. H. S., Thien T. A. y Vant Laar A. (1981). Cation fluxes and (Na⁺-K⁺)-activated ATPase activity in erythrocytes of patients with essential hypertension. *Clin. Exp. Hypertension* 3: 831-849.

Sweadner K. J., Herrera V. L. M., Amato S., Moellmann S., Gibbons D. K. y Repke K. R. H. (1994). Immunologic identification of Na⁺-K⁺ ATPase isoforms in myocardium. *Circ. Res.* 74: 669-678.

Takase S. y Gosa T. (1990). Effects of medium-chain triglycerides on brush border membrane-bound enzyme activity in rat small intestine. *J. Nutr.* 120: 969-976.

Takata k., Kasahara T., Kasahara M., Ezaki O. e Hirano H. (1992). Immunohistochemical localization of Na⁺-dependent glucose transporter in rat jejunum. *Cell Tissue Res.* 267: 3-9.

Takata K., Kasahara M., Oka Y e Hirano H. (1993). Mammalian sugar transporters: their localization and link to cellular function. *Acta Histochem. Cytochem.* 26: 165-177.

Tarpey P. S., Wood I. J., Shirazi-Beechey S. P. y Beechey R. B. (1995). Amino acid sequence and the cellular location of the Na⁺-dependent D-glucose symporters (SGLT1) in the ovine enterocyte and the parotid acinar cell. *Biochem. J.* 312: 293-300.

Thomas V., Pichon B., Crouzoulon G. y Barré H. (1996). Effect of chronic cold exposure on Na-dependent D-glucose transport along small intestine in ducklings. *Am. J. Physiol.* 271: R1429-R1438.

Thomson A. B. R. (1979). Unstirred water layer and age-dependent changes in rabbit jejunal D-glucose transport. *Am. J. Physiol.* 236: E685-E691.

Thomson A. B. R. (1981). Uptake of glucose of the intestine of diabetics rats. Effects of variations in the efective resistance of the unstirred water layer. *Diabetes* 30: 247-255.

Thorens B., Sarkar H. K., Kaback H. R. y Lodish H. B. (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and pancreatic islet cells. *Cell* 55: 281-290.

Thorens B., Cheng Z. Q., Brown D. y Lodish H. F. (1990). Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 259: C279-C285.

Thorens B. (1993). Facilitated glucose transporters in epithelial cells. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 591-608.

Thorens B. (1996). Glucose transporter in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am. J. Physiol.* 270: G541-G553.

Trier J.S. (1991). Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 20: 531-547.

Tsuda K., Tsuda S., Minatogawa Y., Iwahashi H., Shima H., Yoshikawa H, Ura M., Takeda J., Kimura K., Nishio I y col., (1988). Membrane fluidity of erythrocytes and its relevance to renin profile in essential hypertension. *Jpn. Circ. J.* 52: 1301-1308.

Turk E., Zabel B., Mundles S., Dyer J. y Wright E. M. (1991). Glucose/galactose malabsorption caused by defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature Lond.* 350: 354-356.

Turk E., Kenner C. J., Lostao M. P. y Wright E. M. (1996). Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *J. Biol. Chem.* 271: 1925-1934.

Umbach J. A., Coady M. J. y Wright E. M. (1990). Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys. J.* 57: 1217-1224.

Van Blitterswijk W. (1987). Quantitative contributions of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un)saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* 26: 1746-1756.

Vázquez C. M., Coletto R., Zanetti R. y Ruiz-Gutiérrez V. (1997a) Increased Na⁺/H⁺ exchanger activity in the ileal brush-border membrane of spontaneously hypertensive rats. *CMLS, Cell Mol. Life Sci.* 53: 442-446.

Vázquez C. M., Rovira N., Ruiz-Gutiérrez V. y Planas J. M. (1997b). Developmental changes in glucose transport, lipid composition, and fluidity of jejunal BBM. *Am. J. Physiol.* 273: R1086-R1093.

Vázquez C. M., Mate A., De la Hermosa M. A., Planas J.M. y Ruiz-Gutiérrez V. (2000). Abnormalities in lipid composition of brush-border membranes isolated from renal cortex of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* (In press).

Veyhl M., Spangerberg J., Puschel B., Poppe R., Dekel C., Fritzsche G., Haase W. y Koepsell H. (1993). Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁺/D-glucose cotransporters. *J. Biol. Chem.* 268: 25041-25053.

Vinardell M. P. y Bolufer J. (1984). Age dependent changes on sugars jejunal absorption by rat *in vivo*. *Experimental Gerontology* 19: 73-77.

Wadsworth R. M. (1990). Calcium and vascular reactivity in ageing and hypertension. *J. Hypertens.* 8: 975-983.

Wright E. M., Turk E., Zabel B., Mundlos S. y Dyer J. (1991). Molecular genetics of intestinal glucose transport. *J. Clin. Invest.* 88: 1435-1440.

Wright E. M., Hirayama B. A., Loo D. D., Turk E. y Hager K. M. (1994). Intestinal sugar transport. A: *Johnson L. R., Physiology of the Gastrointestinal Tract.* Nova York.: Raven Press 1751-1772.

Wright E. M. (1998). Genetic disorders of membrane transport. I. Glucose Galactose malabsorption. *Am. J. Physiol.* 275: G879-G882.

Yasuda H., Kurokawa T., Fujii Y., Yamashita A. e Ishibashi S. (1990). Decreased D-glucose transport across renal brush-border membrane vesicles from streptozocin-induced diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1021: 114-118.

Yokomatsu M., Fujito K., Numahata H. y Koide H. (1992). Erythrocyte sodium ion transport system in DOC-salt, Goldblatt and spontaneously hypertensive rats. *Scand. J. Clin. Invest.* 52: 497-506.

Yoshida A., Takata K., Kasahara T., Aoyagi T., Saito S. e Hirano H. (1995). Immunohistochemical localization of Na⁺-dependent glucose transporter in the rat digestive tract. *Histochemical Journal* 27: 420-426.

Young E. W., Drüeke T. y McCarron D. A. (1990). Intestinal calcium transport in the spontaneously hypertensive rat. *Miner. Electrolyte Metab.* 16: 154-158.

Yun C. H. C., Tse C. M., Nath S. K., Levine S. A., Stevens R. B. y Donowitz M. (1995). Mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family: structure and function studies. *Am. J. Physiol.* 269: G1-G11.

Zicha J., Talib H. K. y Duhm J. (1991). Na⁺ and K⁺ transport alterations in hypertension. *Physiol. Res.* 40: 555-576.

Zicha J. (1993). Red cell ion transport abnormalities in experimental hypertension. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 7: 129-141.

Zicha J., Kûnes J. y Devynck M. A. (1999). Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension. *Am. J. Hypertens.* 12: 315-331.

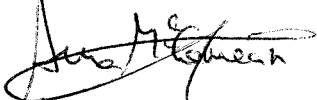
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Excmo. Sr. Doctor Integrado por los señores directores
en el Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de
D. M^{te} Angeles de la Hermosa Casallero
tema Transporte Intestinal de azúcares en ratas hipertensas

Se declara Doctorado de la Universidad de Sevilla
por unanimidad Sobresaliente Cum laude

Sevilla, 12 de Diciembre 2000

El Vocal



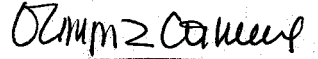
El Presidente

El Vocal



El Secretario

El Vocal



El Doctorado

