

R. 6526

EFFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA
CINETICA DE LA ABSORCION IN VIVO DE AMINOACIDOS EN RATA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

Francisco Murillo Bermejo

Tesis Doctoral

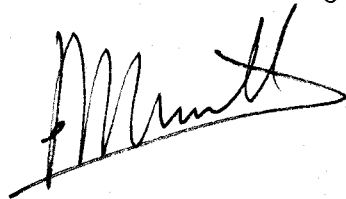
Sevilla, Julio de 1984

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Memoria para optar al grado de
Doctor en Farmacia, presentada
por el Licenciado

Francisco Murillo Bermejo

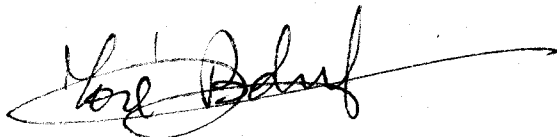


Fdo. : Francisco Murillo Bermejo

Vº Bº

Los Directores de la Tesis

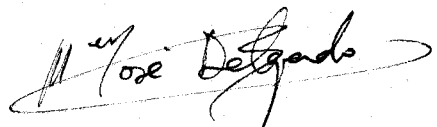
Director:



Fdo.: Prof. Dr. José Bolufer

González

Co-Director :



Fdo.: Dra. María Josefa Delgado

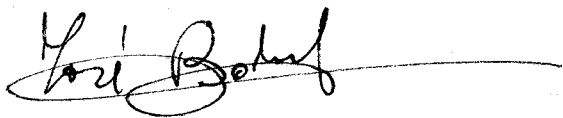
Guerrero

D. JOSE BOLUFER GONZALEZ, Catedrático Director del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de Sevilla y Dña. MARIA JOSEFA DELGADO GUERRERO.

CERTIFICAN:

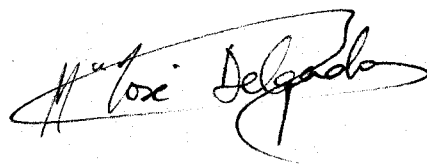
Que FRANCISCO MURILLO BERMEJO, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección, los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral, reuniendo este estudio las condiciones necesarias para su presentación.

Director:

Handwritten signature of José Bolufer in cursive script, with a long horizontal line extending to the right.

Prof. Dr. D. José Bolufer
González

Co-Director:

Handwritten signature of María Josefa Delgado in cursive script, with a long horizontal line extending to the right.

Fdo. Dra. María Josefa Delgado
Guerrero

A mis padres,
a mi mujer y
a mis hijos.

Mi más sincero agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. José Bolufer González, por su fundamental apoyo científico, y constante dedicación e interés con que ha dirigido esta Tesis Doctoral.

A la Prof. Dra. Dña. María Luisa Murillo Taravillo, por el cariño, apoyo moral y científico incondicional, mostrado en todo momento a lo largo de esta Tesis.

A la Prof. Dra. Dña. Ana Ilundain Larrañeta, por su gran asesoramiento durante la realización de esta Tesis.

A la Dra. Dña. María José Delgado Guerrero, por su insustituible ayuda, sin la cual no hubiese sido posible la confección de esta memoria.

A todos mis compañeros del Departamento de Fisiología Animal, con especial mención a la Dra. Dña. Carman María Vazquez Cueto, A Dña. Carmen Torrent, Dña. Olimpia Carreras y D. Bernardo Murillo.

Al Dr. D. Rafael Fernández, Jefe del Servicio de animales de la Facultad de Medicina de Sevilla, pues gracias a su ayuda, pudimos disponer de los animales de experimentación.

INDICE

INDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
I.1.- RESECCION INTESTINAL	1
I.1.1.- Consideraciones generales..	1
I.1.2.- Variaciones morfológicas intestinales	12
I.2.- ABSORCION INTESTINAL	19
I.2.1.- Mecanismos de transporte ..	19
I.2.1.1.- Difusión	19
I.2.1.2.- Transporte activo ..	25
I.3.- TRANSPORTE DE AMINOACIDOS	29
I.3.1.- Absorción de aminoácidos ..	29
I.3.2.- Papel del sodio en el trans- porte	35
I.3.3.- Modelos cinéticos	37
I.3.4.- Cinética de la absorción intestinal	49
I.3.5.- Factores que alteran la ci- nética normal	53
I.3.6.- Metabolismo protéico y re- sección	57

I.3.7.- Absorción intestinal de aminoácidos tras resección ...	60
II.- OBJETO DEL TRABAJO	65
III.- MATERIAL Y METODOS	67
III.1.- ANIMALES UTILIZADOS	67
III.2.- PREPARACION QUIRURGICA	67
III.3.- RESECCION INTESTINAL	68
III.4.- PERIODO POSTOPERATORIO	69
III.5.- TECNICA DE ABSORCION <u>IN VIVO</u>	70
III.5.1.- Descripción del dispositivo experimental	70
III.5.2.- Composición del líquido de perfusión	71
III.5.3.- Realización del experimento	73
III.5.4.- Composición del líquido de centelleo	75
III.5.5.- Determinación de aminoácidos	75
III.6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS	77
III.7.- CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS	80
III.7.1.- Medida de la absorción del aminoácido en función de su concentración en el líquido de perfusión	81

III.7.2.- Medida del componente de difusión y del transporte mediado	82
III.7.3.- Cálculo de la K_T y V_{max} por el método de Lineweaver-Burk	83
IV.- RESULTADOS	85
IV.1.- OBSERVACIONES GENERALES. ABSORCION DE AMINOACIDOS EN FUNCION DE SU CON- CENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION	85
IV.2.- ABSORCION DE L-FENILALANINA EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS, EN FUNCION DE SU CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION	88
IV.3.- CALCULO DEL COMPONENTE DE DIFUSION EN LA ABSORCION DE L-FENILALANINA EN RATAS PATRONES Y RESECADAS	90
IV.4.- CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS, PARA LA ABSORCION INTESTINAL DE L- FENILALANINA EN RATAS PATRONES Y RE- SECADAS	92
IV.5.- ABSORCION DE L-LEUCINA EN RATAS PATRO- NES Y RESECCIONADAS, EN FUNCION DE SU CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION	108

IV.6.- CALCULO DEL COMPONENTE DE DIFUSION EN LA ABSORCION DE L-LEUCINA, EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS ..	109
IV.7.- CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS PARA LA ABSORCION INTESTINAL DE L- LEUCINA, EN RATAS PATRONES Y RESEC- CIONADAS	111
IV.8.- ABSORCION DE L-CICLOLEUCINA EN RA- TAS PATRONES Y RESECCIONADAS, EN FUNCION DE SU CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION	127
IV.9.- CALCULO DEL COMPONENTE DE DIFUSION EN LA ABSORCION DE L-CICLOLEUCINA, EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS .	129
IV.10. CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS PARA LA ABSORCION INTESTINAL DE L- CICLOLEUCINA EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS	131
IV.11. ESTUDIO DE LA DIFUSION TRANSCELULAR Y PARACELULAR DE L-FENILALANINA EN RATAS CONTROL Y RESECADAS	146

V.- DISCUSION	149
V.1.- METODOLOGIA	149
V.2.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS	151
V.3.- VELOCIDAD DE ABSORCION DE LOS AMINO- ACIDOS. EFECTOS DE LA RESECCION IN- TESTINAL	154
V.4.- DETERMINACION DEL COMPONENTE NO SA- TURABLE, MEDIANTE LA INHIBICION POR L-METIONINA	157
V.5.- EFECTO DE LA 2,4,6 - TRIAMINOPIRIMI- DINA (TAP), SOBRE LA ABSORCION INTES- TINAL DE AMINOACIDOS	164
V.6.- VALORES DE TRANSPORTE ACTIVO Y DE LAS CONSTANTES CINETICAS. EFECTO DE LA RESECCION	169
V.7.- RESUMEN FINAL	178
VI.- CONCLUSIONES	181
VII.- BIBLIOGRAFIA	185

INTRODUCCION

I.1.- RESECCION INTESTINAL

I.1.1.- CONSIDERACIONES GENERALES

La importancia e interés de esta intervención quirúrgica, debe ser contemplada tanto desde el punto de vista terapéutico como experimental.

En el hombre, es frecuente que por una situación digestiva patológica o por obesidad, haya que extirpar un segmento intestinal con el fin de conseguir su supervivencia o unas mejores condiciones de vida. Por otra parte, esta interrupción es muy útil para lograr profundizar en el conocimiento del fisiologismo digestivo, así como en la capacidad de adaptación del organismo ante una situación carencial.

Los primeros antecedentes constatados de aplicación de esta técnica, han sido los de SEEN (186) y FLINT (57) en humanos, y los posteriores de BOCHKOV (10) en perros.

En las últimas décadas, se han publicado un gran número de trabajos referentes a este tema, sin que se pueda considerar en la actualidad, que los me-

canismos íntimos responsables de las alteraciones y adaptaciones producidas tras la resección intestinal, sean perfectamente conocidos.

Esto es debido en parte, al gran abanico de posibilidades experimentales (61), que hace difícil comparar resultados y unificar conclusiones.

Por regla general, en las resecciones proximales, la adaptación es mayor y máxima cerca de la anastomosis, disminuyendo distalmente (44)(15). Por otro lado, las resecciones distales, por peor adaptación del yeyuno remanente, son menos toleradas.

En el hombre, BUTLER (21) indica que puede ser extirpado el 50% del intestino delgado sin que se produzcan muy marcadas alteraciones en su capacidad absorbente.

La mortalidad de los animales disminuye si se conserva la válvula ileocecal (34)(35); cuando se reconstruye una válvula en el yeyuno (22), la recuperación de los animales es mucho mejor, ya que su ausencia permite la colonización bacteriana del intestino remanente, produciéndose competencia por la vitamina B₁₂,

desconjugación de sales biliares y empeoramiento de la diarrea y esteatorrea.

No hay uniformidad de criterios sobre si los efectos de la resección intestinal son los mismos que los del bypass intestinal; así, NYGAARD (146) encuentra los mismos efectos trabajando en ratas, y SWAN(204) estima que la recuperación tras resección es peor que con bypass intestinal. Por otro lado, LAPLACE (101) encuentra diferencias en el tiempo de renovación celular y velocidad de migración celular en la vellosidad intestinal.

Otro factor a tener en cuenta en este tipo de intervenciones quirúrgicas, es la edad en que se realizó, pues mientras PILLING (158) y CLAYTON (24) opinan que los jóvenes se adaptan mejor a la resección, ALTMANN (2) cree que la edad óptima es cuando acaba el crecimiento. Hay casos descritos de resección subtotal de intestino delgado en recién nacido (49).

Existe una clara evidencia de que el resultado de estas intervenciones tendrá características distintas según el animal de experimentación utilizado, y en su caso el hombre. NYGAARD (145) compara los efectos

de la resección en rata y perro con el hombre, afirmando que este último muestra más analogía en las transformaciones morfológicas con la rata tras resección distal; sin embargo, COLIN (26) afirma que por ser la rata un animal de crecimiento continuo, los resultados obtenidos en esta especie no se pueden comparar con los del hombre.

Existe disparidad de opiniones sobre el tiempo en que se alcanza el máximo de adaptación morfológica en rata, así HANSON (77) y WILLIAMSON (228) establecen que ésta llega a los doce días después de la operación, y WESER indica que es un mes (221), continuando la hiperplasia de la mucosa durante varios meses (222)(227). LAPLACE (101) indica que tras un largo periodo, es posible la regresión de las transformaciones, o quizás una segunda etapa de cambios morfológicos.

Es interesante hacer constar que la mayor parte de las pruebas experimentales se han hecho en periodos cortos de tiempo, incluso antes de las 48 horas tras la intervención, midiendo RNA, DNA e incorporación de ³H-TdR, mostrando una gran hiperplasia de la mucosa ileal de rata (76)(147)(211); no se considera en este periodo el stress quirúrgico y la disminución de ingesta de comida en este periodo.

En el postoperatorio de una resección intestinal, aumenta grandemente el número de deposiciones diarias (123)(29), aumentando en la yeyunectomía terminal y disminuyendo en el caso de anastomosis yeyuno-cólica, distal y proximal. También se ve afectado el tiempo de tránsito intestinal (68) que disminuye mucho. Para soslayar estas consecuencias no deseadas, se han hecho o bien anastomosis especiales (156) o interposición de asas antiperistálticas (200)(201).

Existen muchos trabajos sobre bypass y pérdida de peso, como los de MASON (114) y SCHLIENGER (177) que estudian la relación entre la longitud de intestino en continuidad y la pérdida de peso, además de los parámetros afectados.

Es evidente que como consecuencia de una resección intestinal, existan cambios en la microflora intestinal, así DANO (38) observó que tras anastomosis yeyuno-ileal, aumentaba el número de enterobacterias del yeyuno superior, indicando además que había modificaciones en el metabolismo de los ácidos biliares, con un aumento de sales biliares no conjugadas; BJORNEKLETT (9) tras bypass, encontró en el yeyuno superior, una flora típica de colon.

Tras la resección intestinal, ocurre de manera casi general, una disfunción hepática, así SIPAROV (193), en perros, encontró que la resección ileal producía serios disturbios en la función hepática.

Posteriormente, MURILLO (137), realizando resección en perros, observó a los tres meses de la operación, que el análisis microscópico de cortes histológicos de hígado, mostraba un deterioro parcial de los hepatocitos.

SPIN (199), GRENIER (71) y GARCIA (63) encuentran valores muy elevados de las transaminasas séricas.

O'LEARY (148) en hombre, ha encontrado que el bypass produce serias y progresivas alteraciones hepáticas e incluso cirrosis. Estas anomalías se presentan en los primeros 18 meses que siguen al bypass, y a menudo se asocia con periodos de rápida pérdida de peso.

MARUBBIO y col. (113) y SALMON y col. (173), hallaron que posteriormente al periodo de pérdida de peso, se produce un proceso adaptativo, y la histología hepática mejora.

La etiología de estos cambios hepáticos, está mal conocida, pero quizás un factor determinante, sea la malnutrición producida por la disminución en la absorción de nutrientes. En apoyo a estas hipótesis, están los resultados obtenidos en rata por VANDERHOOF y col. (214), en los que se ponía de manifiesto que al aumentar el área absorptiva del intestino, disminuye la gravedad de los desórdenes hepáticos.

DRENICK (46) observó el deterioro que se producía en el riñón tras bypass intestinal, ocurriendo cambios estructurales con una nefritis intersticial y fibrosis periglomerular, producidas por un depósito en el parénquima renal de oxalato cálcico. Este deterioro de la función renal, puede llegar a ser irreversible (242). BROCHNER-MORTENSEN (18) también tras bypass intestinal, observó una disminución en el GFR (fracción de filtración glomerular) con respecto a sujetos patrones.

Tras bypass yeyuno-ileal, DEAN (39) y FULLER (59), observaron un aumento de cloruros en sangre junto a una acidosis metabólica (65), indicando que este aumento se debe a una disfunción renal, apoyada

por la hiperoxaluria y por los cálculos de oxalato cálcico.

También McCABE (115) encuentra tras la resección intestinal, una acidemia y aciduria, atribuyéndola a la malabsorción digestiva, pues las materias alimenticias pasan más rápidamente al colon, donde son metabolizadas por bacterias, y sus metabolitos absorbidos, siendo a continuación eliminados por orina, por no servir como intermediarios en el metabolismo humano.

En experiencias hechas con perros, PIETZ (157) observó una pérdida fecal de Na^+ diez veces superior de lo normal. Esto fué confirmado en el hombre por PULLAN (163) y SAUTIER (175) además de encontrar aumentada la pérdida fecal de K^+ y la de Cl^- .

Según PIETZ (157), la absorción de Na^+ y Cl^- se inicia a nivel del intestino delgado proximal, incrementándose a medida que nos aproximamos a la parte distal, existiendo la máxima absorción en el colon. La disminución de superficie intestinal, supondría por tanto un descenso en los niveles corporales de iones.

Para paliar estas alteraciones, el organismo presenta dos mecanismos compensadores:

1º.- El colon aumenta su capacidad de absorber electrolitos y agua.

2º.- Los riñones tienden a mantener la homeostasia segregando orina muy ácida.

Con resección proximal del 70% de intestino delgado en perros, ROBINSON (170) observó una disminución in vivo de la absorción de agua, Na^+ y K^+ , encontrando sin variación la de Cl^- , indicando que la absorción de K^+ queda suprimida en el íleon remanente.

Según VAZQUEZ (215), trabajando con resección de intestino delgado distal en ratas, la diuresis muestra tendencia a la disminución en los animales con resección del 50% y disminuye considerablemente tras la resección del 80%, siendo más significativo este descenso a los cinco meses que a los tres meses.

Se encuentra abundante bibliografía sobre la nutrición adecuada para estos tipos de intervención quirúrgica, así GARCIA (63) trabajando con ratas

con bypass intestinal, indica que lo más favorable son dietas hiperpróteicas suplementadas con antibióticos. STREMMEL (202) y MALLISON (111) proponen utilizar dietas con ácidos grasos de cadena corta, por no necesitar sales biliares para su absorción. MENICK (123) indica lo nocivo de dietas ricas en grasas y alcohol.

Entre otros desórdenes del fisiologismo tras la resección, podemos citar los encontrados en nuestro Departamento por DELGADO (40) que obtiene un incremento de la fosfatasa alcalina sérica a lo largo del tiempo, tras una resección del 50% de intestino delgado distal en ratas.

También se han descrito alteraciones articulares (25) después de un bypass intestinal, y CASTELNUOVODESCO (23) constata trastornos nerviosos que necesitaron tratamiento psiquiátrico.

COMPSTON y CREAMER (27) encuentran niveles plasmáticos de 25-hidroxivitamina D disminuídos tras resección intestinal, atribuyéndolos a la interrupción de la circulación enterohepática.

Muchos autores estudian la situación de la vitamina B₁₂ en estados postoperatorios (210)(97) (150)(88), indicando que como se absorbe en el segmento ileo-terminal, en resecciones distales en el hombre, se producen diferencias, pero a largo plazo, ya que las reservas corporales llegan hasta 4 ó 5 años. Por esta razón recomiendan la administración de vitamina B₁₂ en estos casos.

Vistos los efectos poco deseados de la resección o bypass intestinal, se está sustituyendo en la actualidad este tratamiento quirúrgico de la obesidad morbosa, por un bypass gástrico (90), o incluso realizando conversiones de bypass intestinal a gástrico (72)(174).

I.1.2.- VARIACIONES MORFOLOGICAS INTESTINALES

Algunos autores (14)(43)(44) indican unos cambios más acusados cuando la resección es proximal, ya que en este caso la porción remanente se ve sometida a una llegada de nutrientes y secreciones intestinales superior a la que tiene lugar en condiciones normales, mientras que tras resección distal, los alimentos siguen su ruta normal, y la alteración tiene lugar cuando estos llegan al ciego. Prueba de lo expuesto anteriormente, es que cuando la resección es media, las modificaciones son más acusadas en la zona distal del intestino delgado (195), así HANSON y col. (77), indican que en ratas con resección media del 70% el número de células epiteliales de yeyuno por ve- llosidad, aumenta en un 125% con respecto a los controles, mientras que en íleon, el aumento es del 180%.

Con respecto a la renovación celular de la mucosa intestinal, sabemos que la división celular del epitelio intestinal, está restringida a la base de las criptas de Lieberkühn, donde se encuen-

tran altas actividades de timidina cinasa y de enzimas que intervienen en la síntesis de ácidos nucleicos (86). El ciclo celular completo, dura de 10 a 17 horas en roedores, y 24 horas en el hombre (116). El epitelio intestinal, es completamente renovado en dos o tres días en rata y ratón, y en tres a seis días en el hombre. La migración celular, se realiza con más rapidez en íleon que en yeyuno, como consecuencia de un descenso gradual de la altura de la vellosidad a lo largo del intestino delgado. Esta migración, finaliza con la expulsión de las células inservibles por el ápice de la vellosidad(2).

En los casos estudiados con resección, esta renovación celular aumenta en el postoperatorio próximo (230)(26), para llegar después de un periodo corto de tiempo, a una situación similar a los controles.

Muchos autores (52)(62)(56)(70) indican que la modificación más apreciable, es que aumenta la longitud y el diámetro del intestino remanente. En contra de esta opinión, NYGAARD (146) afirma que tras resección proximal en rata, la longitud del intestino remanente, disminuye incluso

en las ratas operadas control.

Existe un aumento de la población celular en la vellosidad y en la cripta tras resección (75), pero no se modifica la fracción RNA/DNA(229), por aumentar tanto el numerador como el denominador, Estas razones demuestran que lo que ocurre es que la renovación celular se produce por hiperplasia tisular, y no por hipertrofia de células epiteliales.

Con respecto a la madurez de los enterocitos tras resección intestinal, no hay uniformidad de criterios en la bibliografía consultada, así mientras ROBINSON (171) al encontrar disminuída la velocidad máxima de absorción de azúcares y aminoácidos, trabajando con ratas sometidas a resección proximal, indica la posibilidad de que sea debido a una falta de maduración de la población celular del íleon remanente, COLIN (26) manifiesta que los enterocitos tras resección intestinal, se comportan como células maduras.

Después de una resección intestinal, hay un crecimiento compensatorio del intestino remanen-

te, que afecta a todas las capas de la pared intestinal, siendo lo más notable, el efecto sobre la altura de la vellosidad y en la profundidad de la cripta. Se ha encontrado (52) un aumento del 33% de la altura media de la vellosidad en yeyuno funcionando en humanos con bypass intestinal, igualmente se encontró un aumento del 70% en la altura del íleon funcionando, mientras que en yeyuno inactivo, la altura disminuye en un 30%. En esta línea están las investigaciones realizadas con un bypass del 50% por GRENIER (70), que nos indica que mientras la altura de la vellosidad funcionando se dobla, la no funcionando se atrofia moderadamente. HANSON (78), con resección media de un 60%, con y sin fístula Thiry-Vella, encuentra hipertrofia del intestino residual, y de la zona correspondiente a la fístula, tanto en yeyuno como en íleon, MILONE (125), tras resección en rata del 90%, encuentra también una mayor longitud de la vellosidad. COLIN (26), en resección humana, observa también mayor longitud de la vellosidad. BONDAR (13), con resección yeyuno-ileal del 80% en perro y cobaya, encuentra también hipertrofia de las vellosidades. FELDMAN (50)(51), con perros con resección

proximal del 50%, a las seis semanas, observa aumento de la altura de la vellosidad en animales alimentados por boca, mientras que los alimentados parenteralmente, no solo no presentan aumento, sino que disminuye.

En nuestro Departamento, DELGADO (40), observa un claro aumento en la altura de las vellosidades intestinales de yeyuno de ratas sometidas a resección distal, sin que encuentre modificaciones en la altura de las microvellosidades de los enterocitos en estas condiciones.

Respecto a la superficie media de la vellosidad, ROBINSON (171), en ratas tras resección proximal, afirma que tras tres semanas de la operación, la superficie media de la vellosidad, es 2,5 veces mayor que la correspondiente a animales controles.

Debido a que hay una mayor actividad proliferativa en las criptas tras la resección, numerosos autores se han ocupado de este tema, así BOCHKOV (12), en perros con 70% de resección media, encuentra que en diez días tras la operación, se dobla

el espesor de la cripta. COLIN (26), describe aumento de profundidad en el hombre, NAKAI (140), en perros, encuentra además de acentuada hiperplasia, un aumento de espesor de la cripta, con incremento de mitosis. McDERMOTT (117), a los 60 días tras resección del 40% en ratas, encuentra un aumento de la renovación celular, expandiéndose la zona proliferativa de la población celular de la cripta.

Si se comparan resecciones de distintas longitudes de intestino delgado, HANSON (76) describe que al aumentar el intestino resecado, se produce un aumento casi lineal de la cantidad de $^3\text{H-TdR}$ incorporada por cripta, excepto en íleon residual, desconociéndose la causa de esta diferencia. Se sabe, que la resección no altera la cantidad de $^3\text{H-TdR}$ incorporada a las células individuales, sino que el incremento de dpm por cripta, refleja un aumento en el número de células por cripta. Por tanto, las criptas aumentan de tamaño, permaneciendo su número constante en duodeno, sea cual sea la cantidad de yeyuno e íleon extirpado.

Conviene significar, que tras la resección,

regularmente se observa un aumento en el grosor de la pared intestinal. Así para BOCHKOV (10) el incremento es de un 20% a 30% ; LORAN y ALTHAUSER (107) describen un 37% de aumento, que para MONARY (127) sería del 100%.

I.2.- ABSORCION INTESTINAL

I.2.1.- MECANISMOS DE TRANSPORTE

I.2.1.1.- DIFUSION

Durante la digestión, en condiciones fisiológicas, se liberan grandes cantidades de aminoácidos, absorbiéndose a favor de gradiente (169).

En estudios cinéticos in vivo, se observa una absorción lineal con la concentración no saturable, típica de la difusión pasiva, que no aparece o es mucho menor in vitro.

HELLIER y col. (81) indican que los mecanismos de transporte sirven para absorber los aminoácidos libres que retornan al lumen después de la hidrólisis intracelular de los dipéptidos, que se absorben frecuentemente de una manera más eficiente que los aminoácidos.

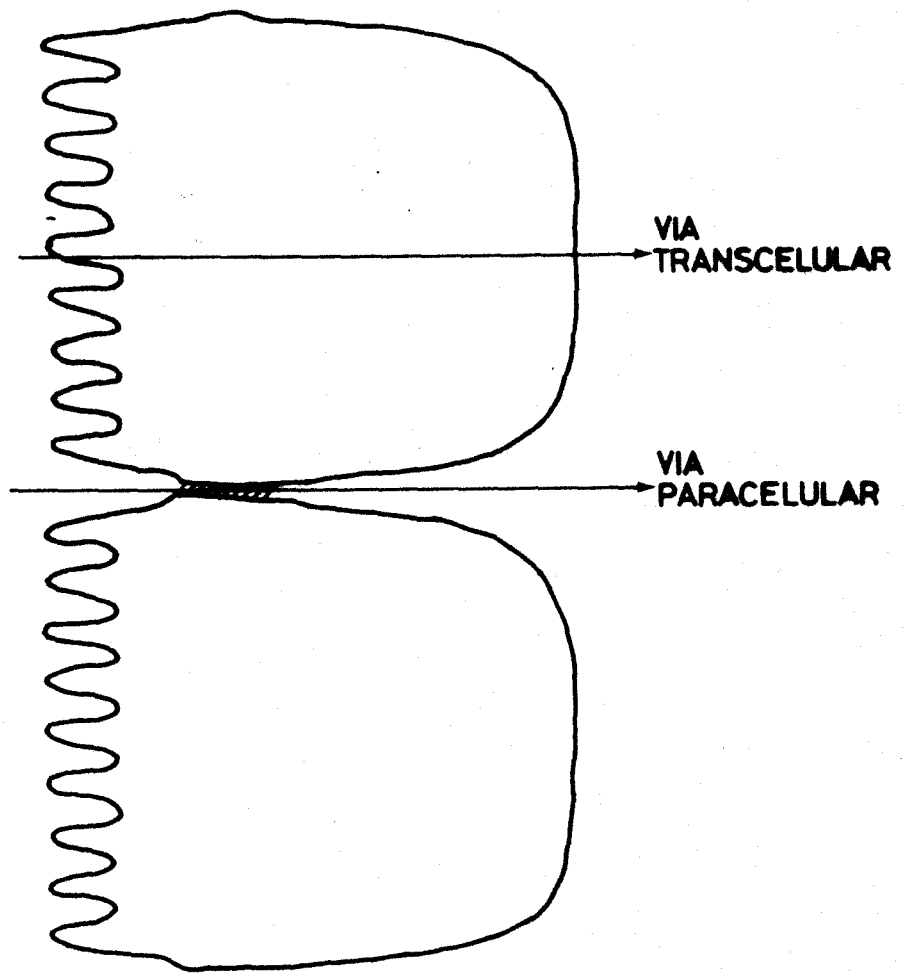
BOOTH y col. (15) manifiestan que la difusión tiene un papel muy importante en la absorción de sustrato in vivo. ROBINSON y col.(169)

apoyan esta hipótesis, indicando que cuando un sustrato es absorbido por perfusión in vivo, una gran parte entra en la sangre a favor de gradiente; solo cuando la concentración en la luz es más baja que en la sangre empezaría el transporte activo a actuar, no solo transportando el sustrato que permanece en el lumen, sino también reabsorbiendo la parte de sustrato que vuelve a la luz por difusión desde la sangre o el espacio subepitelial, con el fin de minimizar esa pérdida. Por otra parte, por difusión pueden entrar todos los aminoácidos, sin especificidad, lo que supone un gran ahorro de energía para los enterocitos.

Existen dos vías de difusión a través de los enterocitos, la vía paracelular y la transcelular, como se muestra en el Esquema 1.

DIFUSION PARACELULAR

ROBINSON y col. (169) postulan que la difusión se da casi exclusivamente por una vía paracelular a través de las uniones estrechas y de los espacios intracelulares, ya que hay sustancias como EDTA e inulina (142) que no penetran en los enterocitos, pero que en presencia de oxifenisatina



Esquema 1

(droga que in vitro hace las uniones estrechas más permeables (198)), se ve aumentado el transporte. Otros autores (95), sugieren que el paso de inulina no se da necesariamente a través de esta vía. WINNE (234), vió que la desaparición de fenilalanina desde el lumen intestinal, no es un fenómeno tan estereoespecífico como la entrada en el enterocito.

Además, las uniones estrechas son permeables al lantano in vitro (110), y pueden hacerse menos permeables con 2,4,6, triaminopirimidina, y más permeables con oxifenisatina (198). El lantano in vivo atraviesa libremente las uniones estrechas en los túbulos renales de sapo.

MUNCK y col. (131), haciendo medidas de potencial eléctrico, vieron que la lisina no utiliza la vía paracelular, en conformidad con los trabajos de ANTONIOLI y col. (7), que observan que el transporte de lisina es totalmente saturable. In vitro, se observa un componente difusivo para la lisina en presencia de glucosa(134), este azucar, parece aumentar la importancia relativa

del camino paracelular (132)(133).

La vía paracelular, ofrece el riesgo de una difusión libre de sustratos del plasma hacia la luz intestinal, no habiendo seguridad de que exista algún sistema en las uniones estrechas que evitase la difusión desde la serosa a la mucosa, o de que exista alguna especificidad en el mecanismo de transporte.

Referente a la existencia de un cierto grado de especificidad en las uniones estrechas, ANTONIOLI y col. (7) vieron que in vivo la fenilalanina es inhibida por leucina y metionina en condiciones en que su absorción no es saturable, pero no está claro que la inhibición no sea solo del componente saturable. Si existe especificidad, no hay evidencia del lugar: unión estrecha, pared capilar, o incluso membrana basal. ANTONIOLI (7), postula que el paso a través de las uniones estrechas, se da por apertura y cierre del complejo de unión, tal vez en respuesta al peristaltismo intestinal. Así se podría explicar porqué la difusión in vivo es más importante que in vitro, y con un

sencillo modelo estructural de la unión estrecha, imaginar un impedimento del flujo de serosal a mucosal.

Esta ruta paracelular, influye en el movimiento de soluto a través de las células, ya que por sus características eléctricas de baja resistividad y alta conductancia afecta a las diferencias de potencial transmembrana, Ψ_{mc} (mucosal-célula), a la que hace más negativa, y Ψ_{cs} (célula-serosal), que resulta menos positiva. Este aumento de la negatividad celular, favorece la entrada reogénica de aminoácidos y otros solutos acoplada al sodio (184).

DIFUSION TRANSCELULAR

Además de la vía paracelular de absorción de aminoácidos, estos pueden difundir en más o menos cantidad a través de una vía transcelular; para ello tienen que atravesar dos membranas plasmáticas, mucosal y basolateral.

La difusión a través de la membrana plas-

mática, se ha explicado por paso a través de poros acuosos permanentes de la membrana constituidos por espacios hidrofílicos de las proteínas intrínsecas; sin embargo, LIEB y col. (105), postulan que los solutos hidrofílicos pueden difundir directamente a través de la capa lipídica por medio de poros transitorios que se abren y cierran continuamente en la matriz lipídica.

I.2.1.2.- TRANSPORTE ACTIVO

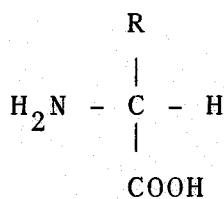
Las características principales del transporte activo de aminoácidos en intestino de mamífero son:

- a) Gran velocidad de transporte en contra de un gradiente de concentración.
- b) Elevada especificidad. Presenta los siguientes requerimientos estructurales:

- Los aminoácidos deben pertenecer a la serie L, aunque algunos aminoácidos de la serie D también pueden ser absorbidos por transporte activo.
- La molécula debe poseer un grupo carboxílico unido al carbono alfa.

- La molécula debe poseer un grupo amino unido al carbono alfa; su sustitución por otro grupo o la unión al carbono beta, disminuye mucho la afinidad por el transportador.
- Debe haber un hidrógeno en el carbono alfa; su sustitución por otro grupo, disminuye también la afinidad.
- El radical unido al carbono alfa del aminoácido, no tiene demasiada influencia en el transporte activo, aunque su longitud aumenta la afinidad por el transportador.

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



c) El transporte activo, requiere energía del metabolismo celular, así es bloqueado por desacoplantes de la fosforilación oxidativa, entre ellos el dinitrofenol y otros inhibidores (1).

- d) Es dependiente de sodio en el lado mucosal (31) (180)(188). También se puede dar transporte de aminoácidos no dependiente de sodio, pero se puede explicar por difusión facilitada, y en algunos casos puede darse por acumulación en contra de gradiente; esta acumulación, puede interpretarse en términos de cotransporte (sistema L de las células de Erlich), o en favor de un potencial eléctrico (transporte de lisina en íleon de conejo (130)).
- e) Tiene cinética de saturación tipo Michaelis-Menten, semejante a las reacciones enzimáticas, pudiéndose calcular una velocidad máxima, V_{max} , y una constante de transporte K_T , que guarda relación inversa con la afinidad del transportador por su sustrato.
- f) Existen inhibiciones de tipo competitivo entre aminoácidos pertenecientes al mismo grupo de transporte.
- g) La presencia de aminoácidos activamente transportados en el lado mucosal, estimula el transporte activo de sodio hacia el lado serosal (183), que se pone de manifiesto por un aumento del potencial transmural y de la corriente de cortocircuito.

El paso de los aminoácidos activamente

transportados desde mucosal a serosal (técnicas in vitro), o desde el lumen intestinal a la sangre (técnicas in vivo), tiene lugar previa acumulación del aminoácido en contra de gradiente en el interior de los enterocitos, y salida posterior a favor de gradiente a través de las membranas basolaterales. Desde hace tiempo, se suponía que el transporte de aminoácidos a través de las membranas basolaterales, es mediado por transportador, ya que parecía improbable que aminoácidos solubles en agua, relativamente grandes, puedan salir fácilmente de la célula por simple difusión. Esta teoría ha sido plenamente confirmada (73)(124)(134), y el sistema es independiente de sodio. Por otra parte, no existe evidencia de transporte activo de aminoácidos dependiente de sodio a través de la membrana serosal.

I.3.- TRANSPORTE DE AMINOACIDOS

I.3.1.- ABSORCION DE AMINOACIDOS

Son numerosos los investigadores que se han dedicado al estudio del transporte de aminoácidos, bien sea para conocer las características cinéticas del transporte, o para tratar de interpretar los mecanismos por los cuales se produce éste. Para ello, se han aplicado técnicas in vitro, empleando anillos intestinales, cámaras, enterocitos, o vesículas aisladas de borde en cepillo; asimismo, algunos autores emplean técnicas in vivo, intentando aproximar las condiciones experimentales a la realidad.

A continuación, recopilamos los trabajos que nos parecen más significativos en el camino para lograr un mejor conocimiento de la entrada de los distintos aminoácidos a través de la pared intestinal.

Las características de la absorción de leucina en células intestinales aisladas de rata,

fueron estudiadas por REISER y cols (164) en 1971, constatando que la L-leucina se absorbe mucho mejor que la D-leucina, siendo la absorción concentrativa, y la K_T aparente de 3,2 mM; el pH óptimo de absorción es muy amplio, de 4 a 8, sin que afecten a la absorción de L-leucina los inhibidores de la síntesis de proteína. BURSTON y col. en 1978 (20) obtuvieron con anillos evertidos de yeyuno de hamster, a pH 7,2 y 37°C, una K_T para la leucina de 2,0 mM y V_{max} $1,1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, que equivale a un 3%.

SMITH y col. en 1981 (194) han comparado in vitro, con cámaras, la absorción de fenilalanina y alanina en cinco especies animales (cobaya, cerdo, conejo, rata y hamster) observando que la K_T permanece invariable para todas las especies estudiadas, pero no el J_{max} del proceso, que es mayor en hamster, y disminuye progresivamente en cerdo, conejo, rata y hamster. Al descartar que estas diferencias estuvieran producidas por variaciones en el tamaño y área de las vellosidades entre las diferentes especies, estos autores sugieren que las diferencias en V_{max} podrían reflejar variaciones en la cantidad de transportador en las distintas especies.

Al realizar estudios in vivo, ANTONIOLI y col. en 1978 (7) encuentran un componente de absorción de fenilalanina no saturable (de 1 a 20 mM), y otro menor, saturable, obteniendo valores de transporte de lisina cuantitativamente menores que los hallados para la fenilalanina.

Más recientemente, en 1982 (212), se han empleado técnicas in vivo, perfundiendo en intestino delgado de rata, aminoácidos metabolizables (fenilalanina y leucina), o no (cicloleucina y ácido alfa-amino isobutírico), obteniendo valores para la constante aparente de transporte K_T , inferiores a los obtenidos sin tener en cuenta el componente de difusión, pero superiores a los calculados con técnicas in vitro.

Está bien establecido (162)(164), que los inhibidores del metabolismo energético, y los procesos que dañan la morfología de la célula, reducen el flujo de aminoácidos a través de la pared intestinal. El hecho encontrado por PRESTON (162), de que la preincubación con papaína durante 60 a 90 minutos, disminuye el flujo de fenilalanina un 10-15% respecto al control, en íleon de conejo, lo que parece indicar que la papaína ataca a la proteína de membrana requerida para el transporte. No afecta a la absorción intestinal, el pretratamiento con proteasa de Streptomyces griseus (162).

Los requerimientos iónicos para que se produzca el transporte, han sido objeto de múltiples investigaciones. NEWEY y col. en 1970 (144), trabajando con sacos evertidos de rata in vitro, muestran la dependencia de Na^+ para la absorción de metionina, ya que ésta se activa de un 30 a un 60% al reemplazar 5' el medio sin Na^+ por un medio que contenga este ión. REISER y col. en 1971 (164), ponen de manifiesto el descenso de la absorción de L-leucina en ausencia de Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} .

En anillos intestinales de cobaya, ROBINSON y col. en 1976, obtienen valores decrecientes de K_T para la absorción de fenilalanina al aumentar la concentración de Na^+ en el baño de 0 a 143 mM,(168), ratificando estos hallazgos posteriormente SEPULVEDA y ROBINSON en 1978 (189) e indicando que el cambio de concentraciones de Na^+ , no afecta al J_{max} del proceso, siendo los flujos de entrada del aminoácido función de la concentración de sodio a distintas concentraciones de aminoácido(188).

En vesículas aisladas de intestino humano, también se ha comprobado (108), que la absorción de fenilalanina y alanina en presencia de un gradiente de Na^+ , es mayor que con un gradiente de K^+ .

BUCLON y col. (19), trabajando con anillos intestinales de cobaya y en presencia de ouabaína, que actúa como inhibidor, observan que el flujo de fenilalanina o β -metilglucósido, sodio dependientes a través del enterocito, es independiente de los ni-

veles intracelulares de Na^+ .

PATERSON y col. (152), más recientemente, han estudiado los parámetros cinéticos para la absorción de serina, alanina y metionina, en medios carentes de sodio, encontrando que las K_T aparentes en estas condiciones, coinciden con sus respectivas constantes de inhibición aparentes (K_i).

En presencia de un gradiente de sodio, la existencia de distintos aniones, modifica la velocidad de absorción del aminoácido, como describe LUCKE (108), al incubar vesículas de borde en cepillo humano, con SCN^- , Cl^- y SO_4^- , encontrando una mayor absorción de L-alanina con SCN^- , que con Cl^- , resultando dicha absorción aún más disminuída cuando el anión utilizado es el sulfato.

Se ha comprobado asimismo, la influencia de muy diversos factores sobre la absorción intestinal de aminoácidos. MITCHELL y col. (126) en 1981, haciendo perfusión intestinal en gallinas, encuentran que la V_{max} en yeyuno, es 1,9 veces mayor que en el íleon, e indican la importancia de las capas no agitadas a la hora de calcular los valores de absorción.

PATERSON y col. (153), que anteriormente habían postulado sistemas de transporte de aminoácidos neutros, en íleon de conejo in vitro, indican que la agitación no tuvo efecto en el sistema 2 de entrada de alanina, reduciéndose significativamente la K_T en el sistema 1.

Las variaciones del flujo vascular, producen cambios en el transporte de aminoácidos, como han puesto de manifiesto PARSONS y col. (151), en 1980, trabajando en perfusión intestinal en rana, observando que la absorción de cicloleucina es dependiente del flujo vascular.

PENZES (154), aplicando la técnica in vivo de SHEFF y SMYTH (190) en ratas jóvenes y viejas (6 y 24 meses respectivamente), encuentran distintas afinidades para los distintos aminoácidos ensayados según la edad; así observan absorciones parecidas para la L-leucina y glicina en ambos grupos de animales, siendo más baja la afinidad para la L-alanina en ratas viejas.

El efecto del alcohol sobre la absorción de aminoácidos, ha sido igualmente estudiado por HAJJAR (74), resultando ser igual al de las ratas patrones si referían los valores a longitud de intestino, pero aumentando la absorción por peso seco de mucosa, ya que ésta disminuye su espesor.

Han sido empleados métodos autorradiográficos para localizar la absorción de aminoácidos a lo largo de la vellosidad intestinal (94)(152), llegando a la conclusión de que el proceso absorptivo tiene lugar solamente en los enterocitos perfectamente diferenciados. PATERSON y col. (152) sitúan el 80% de la absorción de alanina en íleon de conejo in vitro, en el tercio superior de la vellosidad.

I.3.2.- PAPEL DEL SODIO EN EL TRANSPORTE

La teoría de que el ión sodio estimula la absorción intestinal de una serie de solutos orgánicos e inorgánicos, fué establecida por QUASTEL, CSAKY y CRANE (revisada por CRANE en 1977 (30)), siendo generalmente asumida en la actualidad, aunque se han postulado al menos doce diferentes clases de sistemas de transporte dependientes de sodio en el intestino delgado (180), nos limitaremos a estudiar con más detalle los que conciernen al transporte de aminoácidos. Se acepta la teoría de que los aminoácidos y el sodio utilizan un transportador común.

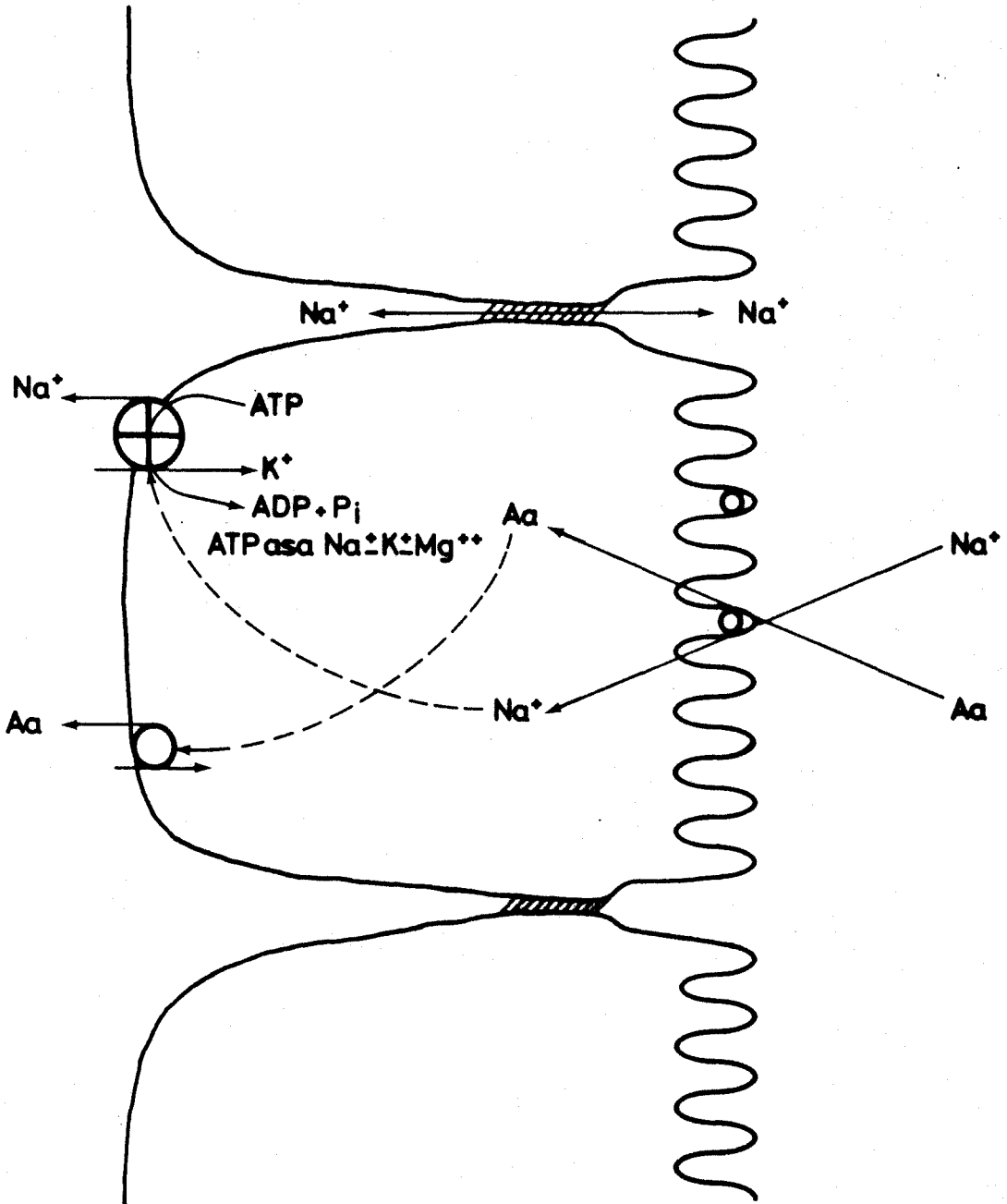
El Na^+ entra en la célula en el lado mucosal, a favor de gradiente, transportando el aminoácido mediante un sistema de transporte acoplado, lo que permite la acumulación de éste en el interior de los enterocitos. Este mecanismo cumple los criterios de un transporte activo secundario, que se representa en el Esquema 2

El Na^+ es expulsado activamente fuera de la célula a través de la membrana basolateral del enterocito, siendo una reacción exergónica que utiliza la energía liberada por la hidrólisis de ATP, catalizado por el enzima ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPasa (5). Por lo tanto, se mantiene una baja concentración intracelular de Na^+ .

SANGRE

CELULA

LUZ



○ Transportador

⊕ Mecanismo de bombeo activo

Esquema 2

I.3.3.- MODELOS CINETICOS

Varios modelos cinéticos se han propuesto para explicar el cotransporte de solutos y sodio, (abreviadamente : cotransporte S/Na⁺). Todos ellos postulan la existencia de un "carrier" de membrana, poseyendo sitios específicos para cada sustrato.

La información existente sobre la cinética del transporte intestinal de aminoácidos, procede generalmente de experiencias in vitro.

ALVARADO y LHERMINIER (5), proponen un modelo general en que bien el aminoácido o bien el sodio, pueden unirse primero al transportador. El Esquema 3 ilustra el modelo.

En este modelo, la ecuación para el flujo de entrada sería:

$$V_S = \frac{V}{1 + \frac{K_S}{|S|} \frac{K_a + |A|}{K_a + A|R|} \frac{K'_a + |A|}{K'_a + |A|Q}}$$

siendo $R = \frac{K_S}{K'_S} = \frac{K_a}{K'_a}$

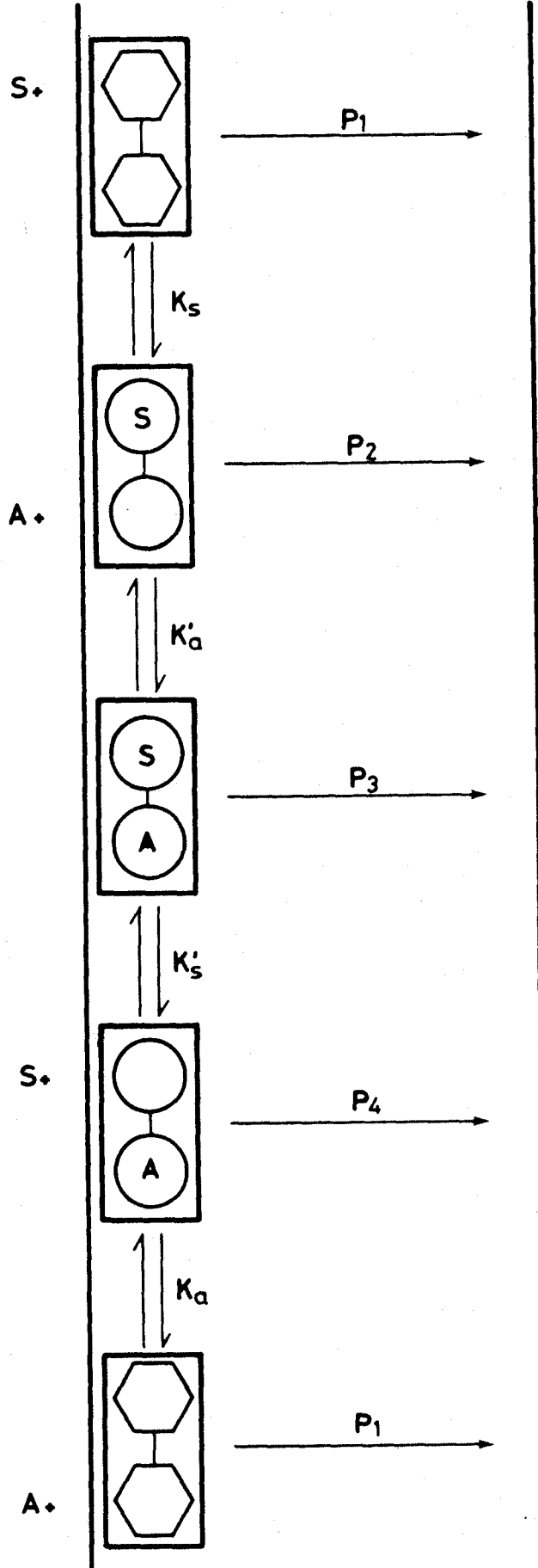
y $Q = \frac{P_3}{P_2} = \frac{V'}{V}$

y la $K_T = K_S \frac{K_a + |A|}{K_a + |A| R}$ siendo $R = \frac{K_S}{K'_S} = \frac{K_a}{K'_a}$

MEDIO

MEMBRANA

CELULA



Esquema 3

Las movilidades son diferentes

$$P_1 \neq P_2 \neq P_3 \neq P_4 \quad \text{y}$$

$$K_S \cdot K'_a = K_a \cdot K'_S$$

lo que significa que ambos caminos tienen la misma probabilidad global.

Aquí, la velocidad máxima de entrada vendría dada por la ecuación

$$v_S^{\max} = V \frac{K'_a + |A| Q}{K'_a + |A|}$$

ambos parámetros v_S^{\max} y K_T son funciones hiperbólicas de $|A|$ y varían entre dos límites

$$\text{Cuando } |A| = 0, \quad v_S^{\max} = V \quad \text{y} \quad K_T = K_S$$

$$\text{Cuando } |A| = \dots, \quad v_S^{\max} = V' \quad \text{y} \quad K_T = K'_S \quad \text{siendo}$$

$$V' = P_3 |C_t| \quad \text{y} \quad |C_t| = |C| + |C-A| + |S-C| + |S-C-A|$$

dónde C_t es la concentración total de "carrier".

Este modelo general, está basado en la hipótesis de formación del complejo terciario aminoácido-"carrier"-sodio. Debe tenerse en cuenta sin embargo, que la formación de éste per se, no implica transferencia de energía a menos que afecte a las afinidades del transportador y/o su movilidad (79).

Según que la formación del complejo modifique la afinidad o la velocidad del transportador, se puede hablar de modelos tipo afinidad, y modelos tipo velocidad.

El efecto afinidad, se produciría si la unión del sodio aumentara la afinidad del transportador por el otro sustrato y viceversa. Este efecto es en sí mismo suficiente para explicar una acumulación activa en contra de gradiente.

El efecto velocidad se produciría, si el complejo terciario y el "carrier" libre, atravesaran la membrana más rápidamente que cualquiera de los complejos binarios. Este modelo en su forma más pura, con afinidades constantes, sólo producirá acumulación activa si el producto de los coeficientes de velocidad del transportador vacío y del complejo ternario, es mayor que el producto de los coeficientes de velocidad de los complejos binarios.

Diferenciar experimentalmente estos dos modelos, es difícil. En principio, con el primer modelo, la presencia del ión, disminuiría la K_T , en el segundo aumentaría la velocidad máxima. Un factor que complica el estudio, es el potencial eléctrico que está siempre presente a través de la membrana, y que influye en el movimiento del ión sodio y de algunos de los complejos resultantes.

Las investigaciones sobre K_T y V_{max} durante el cotransporte en varios sistemas, han dado resultados conflictivos. En muchos casos, la K_T

disminuye claramente al ir aumentando la concentración de sodio, sin variar la V_{\max} (6)(87); otras veces, solo varía la V_{\max} , y otras ambos.

Es posible que un tipo mixto esté presente en todos los sistemas, y que según las circunstancias, uno u otro de los parámetros sufra un mayor cambio en presencia del cosustrato (79).

Una fuente de conflictividad entre los resultados obtenidos, radica en la técnica in vitro que se utilice, dado que presentan peculiaridades diversas. Desde hace varios años, muchos de los datos de cinética, se han obtenido con vesículas de membrana de borde en cepillo, por lo que es interesante verlas diferencias que ocurren respecto a los tejidos intactos.

Primero.- Usando preparaciones de tejido intacto, generalmente, la absorción de sustrato sigue una cinética de Michaelis-Menten cuando el borde mucosal es bañado en tampón sin Na^+ (2).

Por el contrario, con vesículas aisladas, la absorción de sustrato desciende hasta niveles prácticamente despreciables cuando no hay sodio en el espacio extravascular (136). Por tanto, el sodio parece comportarse como un activador no obligatorio en epitelios intactos, y como un activador obligatorio en vesículas aisladas.

Segundo.- En tejidos intactos, no se observan efectos de transconcentración, por lo tanto la acumula-

ción de S ó Na^+ en el tejido, no tiene efecto sobre las velocidades de entrada de cualquiera de estos cosustratos (54)(179)(167)(19). Por el contrario, los efectos de transconcentración son fácilmente demostrables en vesículas aisladas (85)(191).

Tercero.- La absorción Na^+ -dependiente por vesículas aisladas, es reogénica, esto es, el Na^+ entra como catión libre con carga neta positiva. Sin embargo en tejidos intactos, los resultados experimentales pueden explicarse mediante modelos cinéticos no reogénicos, es decir, que no incluyen el componente eléctrico (180)(6).

Las diferencias observadas en el comportamiento entre tejidos intactos y vesículas aisladas, sugieren la existencia de factores externos que modifican la cinética en estas preparaciones. Una diferencia importante entre los dos, puede consistir en la presencia de Na^+ en la región inmediata adyacente a la cara externa de la membrana en borde en cepillo, que se mantiene aún en incubaciones largas en ausencia de Na^+ (4).

Sin embargo, las vesículas de membrana se obtienen después de una fragmentación de tejido, y su aislamiento implica varios lavados, por lo que la composición del medio que está en contacto con las vesículas, puede estar libre de Na^+ . Pero en tejidos intactos, parece virtualmente imposible el asegurar exactamente las concentraciones de Na^+ libres en el microclima que baña la cara externa de

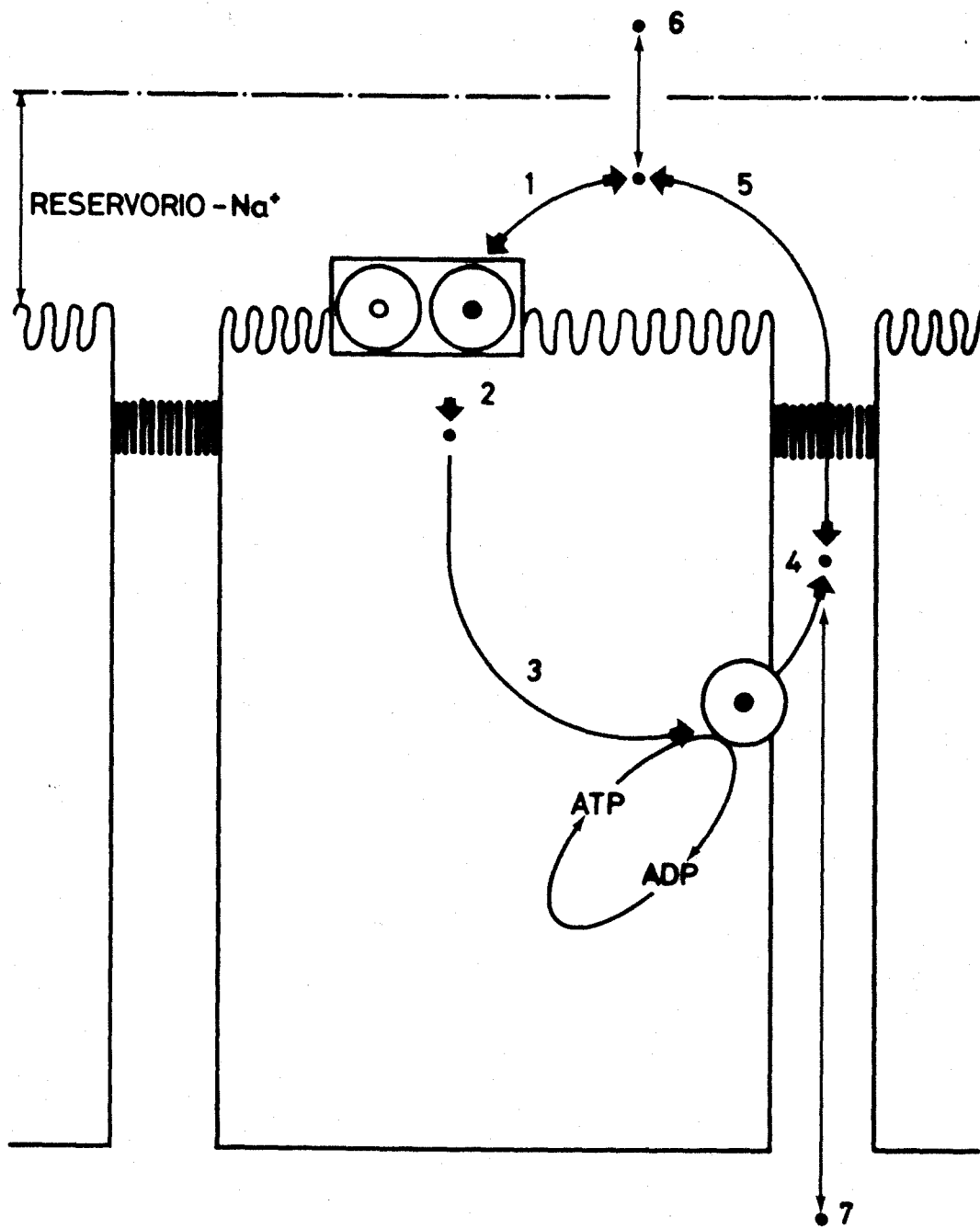
la membrana del borde en cepillo, porque el espacio extracelular en contacto con el borde en cepillo, constituye un gran reservorio de Na^+ , que puede libremente atravesar las uniones intracelulares que separan los enterocitos (58).

Por tanto, según la teoría expuesta recientemente por ALVARADO y LHERMINIER (5), este Na^+ apical puede modificar el co-transporte S/Na^+ , particularmente cuando se usan preparaciones de epitelios intactos, no solo in vivo, sino también in vitro.

La persistencia de este reservorio de Na^+ a pesar de que los tejidos se preincuban por periodos largos en tampones sin Na^+ , puede explicarse por la existencia de un ciclo del ión Na^+ (4). Este ciclo implica el paso de Na^+ a través de la vía celular y paracelular (Esquema 4).

El camino paracelular conecta el tejido almacén de Na^+ con el reservorio apical a través de los espacios intercelulares y los poros de las uniones estrechas (paso 7 y 5). Por esta vía, algunos iones Na^+ procedentes del reservorio, podrían pasar al medio libre de Na^+ (paso 6) fácilmente.

En principio, este camino paracelular, puede llevar Na^+ en forma electroneutra, como ClNa ; pero puede también llevar una carga neta positiva (paso 5), para compensar alguna carga neta transferida a través de la ruta celular.



Esquema 4

Más aún, los mecanismos electroneutros (no ilustrados en el esquema), pueden contribuir decisivamente en el mantenimiento de la actividad del Na^+ en el reservorio apical, ya que hay un sistema de cotransporte Cl^-/Na^+ , localizado en la membrana del borde en cepillo (182). En este sistema, los movimientos de Cl^- y Na^+ parecen obligatoriamente unidos, y ya que no se transporta carga neta, el ClNa en teoría podría moverse en ambas direcciones. Parece probable que esta fuente de Na opere más efectivamente cuando no hay sodio en el medio de incubación, ya que en este caso el gradiente de concentración transmembrana de Na^+ , puede favorecer la salida de ClNa (182).

El camino celular (2 al 4 en el Esquema), incluiría dos pasos unidireccionales: La entrada de Na a través del borde en cepillo, mediado por el cotransporte S/Na^+ (paso 2), y el subsiguiente bombeo del catión dentro del espacio intercelular(30). La unidireccionalidad del pso 4 es indiscutible, al tratarse de una reacción exergónica (hidrólisis de ATP catalizada por $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPasa}$. Pero la unidireccionalidad del paso 2, necesitaría una mejor aclaración.

Partimos de la base de aceptar la hipótesis generalizada de transporte de solutos orgánicos sodio dependiente (revisiones hechas por SCHULTZ y CURRAN (180), ALVARADO (4) y CRANE (30) que presupone que el cotransporte S/Na⁺ implica sistemas típicos de "carrier". Por definición, tales sistemas "carrier" son reversibles, significando que el sustrato utiliza el mismo camino de entrada y salida. La acumulación de sustrato, se pensó que dependía de un funcionamiento asimétrico del ciclo de transporte; por ejemplo, la distribución asimétrica de Na⁺ en ambas caras de la membrana en borde en cepillo, puede causar un gradiente de afinidad tal que para lograr una velocidad de salida igual a la de entrada, sería necesario conseguir un estado estacionario con concentraciones intracelulares de sustrato mucho más altas. Sin embargo, este mecanismo no puede explicar adecuadamente una propiedad importante del cotransporte intestinal S/Na⁺, que es que siguen una cinética perfecta de Michaelis-Menten para periodos relativamente largos de tiempo, aún cuando los tejidos sean incubados en tampones libres de sodio (4). Parece que bajo condiciones fisiológicas (buena oxigenación, ausencia de inhibidores), el sistema de co-

transporte S/Na^+ es más asimétrico que lo que generalmente es creído.

Es opinión generalizada que el transporte intestinal es "reversible" como se pone de manifiesto por el paso de solutos orgánicos tales como azúcares y aminoácidos desde la sangre al lumen (36)(37). Pero no hay evidencia de que el flujo de salida ocurra a través del cotransporte S/Na^+ . Hay razón para pensar que, por el contrario, la salida de sustrato hacia el lumen en estos experimentos a tiempos largos, ocurra principalmente a través del camino paracelular (169).

FINCH (54) fué probablemente el primero en afirmar que " la disociación interna de los "carriers" de aminoácidos, es efectivamente irreversible", ya que no pudo demostrar el cambio de difusión con intestino de rata precargada con aminoácidos. Desde entonces, la ausencia de efecto de transconcentración en intestino, ha sido ampliamente confirmada (179)(167)(19).

El fenómeno de "counter-transport" (3) o de la salida de sustratos intraluminales ligada al sodio (32), pueden ser demostrados claramente

solo cuando el tejido es tratado con inhibidores (por ejemplo, 2,4 dinitrofenol, ouabaína), que anula el gradiente de concentración de Na^+ , y por tanto la fuente de irreversibilidad. La aparente demostración de "counter-transport" en ausencia de inhibidores en experimentos de larga duración descritos por ROBINSON (167), podrían quizás ser explicados en base a la salida neta de sustrato que se produce principalmente a través de la vía paracelular.

Para explicar la base funcional de la irreversibilidad de la entrada S/Na^+ en experimentos con tejidos intactos, se propuso primeramente por ALVARADO en 1976 (4) una acción específica del potasio intracelular, pero actualmente el mismo autor se inclina más por atribuir este fenómeno a la reogenicidad del transporte S/Na^+ , ya que el sodio entra en la célula como catión libre, existiendo en el interior del enterocito un potencial de membrana negativo.

I.3.4.- CINETICA DE LA ABSORCION INTESTINAL

En la absorción in vivo, junto a los procesos mediados, suele haber un componente de absorción no saturable, lineal con la concentración, que no se observa o es mucho menor in vitro.

Este componente es un proceso de difusión, y la proporcionalidad entre flujo y gradiente de concentración del sustrato, se establece mediante una constante de transferencia de masa K_D .

Por tanto, in vivo, el transporte intestinal total, será la suma del transporte activo y de la difusión.

Se considera la utilización de un solo mecanismo de transporte mediado, y despreciable la concentración de soluto al otro lado del epitelio.

La medida del componente pasivo en un sistema de transporte, es un paso previo indispensable para un cálculo aceptable de las constantes cinéticas, pues si no conduciría a desviaciones

respecto de la cinética de Michaelis, y a valores de constantes muy superiores a las reales.

La medida de este componente pasivo, no es fácil hacerla experimentalmente; el método más utilizado es inhibir totalmente el transporte activo.

In vitro, la ausencia total de Na^+ en el medio de incubación (si el sistema es dependiente de Na^+), la disminución de temperatura a 0°C y el empleo de inhibidores metabólicos, anulan totalmente el transporte activo.

In vivo, no son aplicables los procedimientos anteriores. En el caso de los azúcares, la floricina llega a inhibir totalmente el transporte activo in vivo (159)(160), debido a que su afinidad por el "carrier" es mucho mayor.

Pero para los aminoácidos, no se conoce ningún inhibidor específico, tal como ocurre en los azúcares; lo que se hace es utilizar aminoácidos análogos de mayor, o al menos, igual afinidad a concentraciones muy superiores a la del sustrato,

que actúan como inhibidores competitivos.

Es posible que la difusión medida en presencia de un inhibidor del transporte activo, sea algo mayor que el componente pasivo del transporte total en ausencia del inhibidor, ya que el gradiente de concentración en el primer caso, puede ser superior debido a que no está desapareciendo sustrato por transporte activo. Este efecto puede ser importante a bajas concentraciones de sustrato, y especialmente en presencia de capas no agitadas. WINNE (237), ha desarrollado una ecuación en la que conociendo el espesor y la superficie de las capas no agitadas, se puede corregir los valores cinéticos en un sistema experimental de estas características.

Otra manera para calcular la difusión de un L-aminoácido, es medir la absorción de su D-isómero, pero estos, aunque con mucha menor afinidad, son también susceptibles de transporte mediado (89)(181).

Por último, la absorción a partir de altas concentraciones de sustrato, se debe fundamen-

talmente a la difusión, y se hace lineal con la concentración, de tal forma que la pendiente de la recta es una aproximación de la K_D ; el error será menor cuanto mayor sea la afinidad (menor K_T) del sustrato por el transportador.

Calculados los valores de transporte activo mediante rectas de los valores de difusión pasiva al transporte total, podemos calcular sus constantes cinéticas, siendo el método de Lineweaver-Burk, el más utilizado, con la representación de los inversos de la velocidad en función de los inversos de la concentración de sustrato. Con ésta y con otras transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten, se puede caer en engaño, si los resultados experimentales no son suficientemente consistentes y en número adecuado (141).

Por otra parte, para mayor exactitud de este modelo, se debe medir la velocidad de transporte usando concentraciones de sustrato mucho más altas y más bajas que la K_T (42).

I.3.5.- FACTORES QUE ALTERAN LA CINÉTICA NORMAL

Existen una serie de factores reales, que pueden alterar una cinética teórica de entrada de aminoácidos, y que implican por tanto, una no linealidad en la representación de Lineweaver-Burk, así:

1.- La entrada paracelular de sustrato de la luz al plasma

Como ya sabemos, esta entrada es más importante in vivo que in vitro, quizás en respuesta a los movimientos peristálticos del intestino.

Aunque para el organismo es conveniente el paso de nutrientes a la sangre a favor de un gradiente de concentración, la vía paracelular, ofrece el riesgo de una difusión libre del plasma hacia la luz intestinal.

2.- La presencia de capas no agitadas en la superficie celular

Este efecto es mucho más patente a bajas concentraciones de sustrato, que a altas concentraciones.

Así cuando una molécula se mueve desde la fase acuosa del contenido intestinal hacia el epitelio de la célula, debe atravesar, una capa de agua no agitada y la membrana lipídica de la superficie del microvilli.

Esta capa no agitada, provoca limitaciones en el transporte pasivo (41)(172)(231)(232)(176), dando como resultados unos coeficientes de permeabilidad más bajos, y en el transporte activo, unos valores más altos de K_T (233)(47)(236)(240), lo que exigiría modificaciones en cuanto al cálculo de dicha constante (237)(239)(207)(209).

El grosor de esta capa, oscila entre 100 y 50 nm en los reodores (223)(236).

Según WINNE (235) la K_T aparente sería

$$K_{T \text{ ap}} = K_T + 0,5 V_{\text{max}} \frac{\delta}{D}$$

donde δ sería el espesor de las capas no agitadas y D el coeficiente de difusión del sustrato en la

fase acuosa.

3.- Presencia de exceso de sustrato

Cuando existe mucho sustrato en el contenido intestinal, se produce una cierta inhibición, principalmente por dos causas:

- a) La acumulación excesiva de las moléculas de sustrato en los sitios de unión con el "carrier", que hacen que la unión no sea efectiva.
- b) Por unión de la molécula de sustrato a otro centro del "carrier" que sea inhibidor.

Ambas causas provocarían distorsión de la ecuación de Lineweaver-Burk.

4.- Dependencia de una fuente de energía limitada

Un hecho constatado, es que cuando se aumenta la concentración de sustrato, el nivel de acumulación en el estado estacionario disminuye, llegando a ser uno o menor que la unidad, la relación concentración intracelular/concentración extracelular.

Una posible explicación, es que la fuente

de energía para el transporte sea limitada; si la cesión de energía es durante la translocación del complejo "carrier"-sustrato, la V_{\max} intrínseca disminuye, y la K_T aumentará al aumentar la concentración de sustrato.

Así la representación de Lineweaver-Burk a altas concentraciones de sustrato, da una velocidad máxima aparente y una K_T mayores que las calculadas a bajas concentraciones de sustrato.

Si el acoplamiento de energía fuera durante la asociación, la velocidad máxima no variaría, mientras que K_T disminuiría al aumentar la concentración de sustrato. Si por el contrario, la cesión de energía fuera durante la disociación, la V_{\max} intrínseca, disminuiría, mientras que K_T aumentará al aumentar la concentración de sustrato (98).

I.3.6.- METABOLISMO PROTEICO Y RESECCION

La necesidad de estudiar los efectos que produce la resección, llevó a SCHWARTZ y col. en 1955 (185), a realizar estudios metabólicos, de los que dedujeron que en estas condiciones, la falta de absorción protéica es fuerte, y la pérdida de nitrógeno fecal es grande. Al no obtener ningún efecto favorable con los agentes terapéuticos que ensayaron, recomendaron una dieta rica en proteínas, con comidas frecuentes de alto contenido energético. Varios autores se han ocupado de estudiar el metabolismo protéico en distintas condiciones experimentales, tanto en el hombre (92), como en animales de experimentación (99). WILDEGANS (225) observa un incremento en la pérdida fecal de nitrógeno, del 40% una semana después de resección ileal, llegando a valores normales cuatro semanas después; se admite en general (99)(91)(163)(8), que la adaptación de la absorción protéica es relativamente buena.

Las pérdidas de nitrógeno, han sido estimadas por SAUTIER y col. (175), en 40 pacientes después de dos meses de la operación, por el método de fecalograma. La composición media de las heces de 48 horas, mostró una excreción dia-

ria de 4,1 g de nitrógeno total (3,4 veces el valor normal) y 1,8 g de nitrógeno soluble (6 veces el valor normal). Esta excreción representa 2,6 g / 24 horas en cinco pacientes con resección proximal de intestino delgado, y alcanza 16,8 / 24 horas en 4 pacientes sometidos a resección ileal distal, preservando la válvula ileocecal. Según los autores, esto representa una pérdida media de proteínas correspondiente a 150 g de carne. Valores similares obtienen PALMER (149) (un incremento de la pérdida fecal de nitrógeno de 4-5 veces) después de resecciones de la mitad distal del intestino delgado, estableciendo también una alta proporción de ión amonio en la excreción urinaria de nitrógeno.

NYGAARD (145), relaciona la extensión de la resección con la excreción de nitrógeno, que es mayor a medida que aumenta la longitud de intestino extirpado. Observa también una cierta adaptación en la absorción protéica.

Para reducir las pérdidas fecales de nitrógeno, STAHLGREN y col. (200) prueban la interposición de un asa antiperistáltica, pero este procedimiento implica riesgos y no parece aconsejable.

La absorción intestinal de albúmina sérica marcada, ha sido estudiada por CUTHBERTSON y col (33) en perros sometidos a una resección de intestino delgado del 85%. La curva normal se sitúa generalmente entre 10 y 25% (nivel estacionario), mientras en perros reseca- dos alcanza solo de un 2 a 15%. Estos valores no mejoran dos años después de la operación. En la misma especie con resección distal, KRYUKOVA (100) estudió la absorción y utilización de metionina ^{35}S , así como la velocidad de incorporación de azufre radiactivo a las seroproteínas. La reducción normalmente observada durante los primeros meses del postoperatorio, es seguida después, de 9-10 meses por un incremento en la utilización e incorporación de metionina capaz de alcanzar valores superiores a los registrados en animales normales, en dos de los tres perros utilizados.

I.3.7.- ABSORCION INTESTINAL DE AMINOACIDOS TRAS RESECCION

Ya en 1970, GOLD y col. (66), tras observar que en la rata se producía un máximo de hiperplasia en el intestino remanente a las cuatro semanas de extirpar 50 cm de intestino proximal o distal, incubaron 6 semanas después de la operación segmentos intestinales evertidos en soluciones conteniendo leucina marcada. Después de la homogeneización, estos autores no encontraron modificación en la cantidad de proteínas/mg de tejido procedente de ratas normales y operadas. Sin embargo, sí que se incrementó la cantidad de DNA/mg tejido ó por mg de proteína en las muestras procedentes de intestino remanente.

La incorporación de leucina en proteínas (actividad específica), se incrementa en casos de resección proximal en el íleon remanente, y sufre un aumento muy significativo en el yeyuno remanente tras resección distal.

En 1973, DOWLING y col. (45), intentan relacionar los cambios morfológicos producidos por la operación, con las variaciones en la capacidad absorptiva en las mis-

mas condiciones, indicando que el aumento de la superficie absorptiva que origina la hiperplasia, compensa la desventaja de la inmadurez funcional de las células, resultando una absorción neta por unidad de longitud intestinal, incrementada respecto a las condiciones normales. Este mismo equipo de investigadores (50)(51), continúan sus trabajos con perros sometidos a resección proximal del 50%, observando que mientras la absorción de glucosa por unidad de longitud de intestino aumentaba, la absorción de leucina in vitro (nmoles/mg tejido), no se incrementaba.

ROBINSON y col. (166), tras someter a perros a una resección proximal del 70 u 80%, trabajando con anillos intestinales, encuentran un aumento en el transporte de azúcares y aminoácidos, proporcional a la hipertrofia de las vellosidades.

MENGE y ROBINSON (120) obtienen valores decrecientes en la absorción de L-fenilalanina y β -metil-D-glucósido en anillos intestinales in vitro, a medida que la resección practicada es de mayor extensión. Los datos se expresan en μ mol de sustrato absorbido por 100 mg de tejido fresco en el periodo de incubación.

Paralelamente, estos autores al evaluar las actividades específicas de sacarasa y estearasa inespecíficas en las condiciones anteriores, encuentran un fuerte descenso de las mismas, a medida que aumenta la longitud de intestino extirpado.

GARRIDO y col. (64) han realizado estudios de la absorción de aminoácidos y péptidos in vivo, en ratas con resección proximal masiva. Empleando mezcla de aminoácidos y dipéptidos (leucina y glicina, L-leucil-glicina y glicil-L-leucina), obtienen valores significativamente mayores en el íleon, aunque las velocidades de absorción de los dos dipéptidos difieran tras la resección, pues la absorción de L-leucina y L-leucil-glicina, es mucho mayor que la de glicil-L-leucina.

Empleando células aisladas de epitelio intestinal de rata, WESER y HERNANDEZ (220)(221), estudiaron la absorción de leucina, tanto en animales control como sometidos a una resección proximal o distal. Los resultados obtenidos en los enterocitos procedentes del intestino remanente, no difieren de los encontrados en los animales patrón. Los resultados anteriores, coinciden con los de WILMORE (226), pues no encuentran variación en la incor-

poración de α -metil-D-glucosa, ni aminoácidos como lisina, valina o cistina en células aisladas de perros al año de sufrir una resección distal del 90% de intestino delgado.

Trabajando con vesículas aisladas de borde en cepillo, MENGE y col. (119), revelan que las características funcionales de las membranas de diferentes regiones del intestino, se mantenían después de una resección proximal o una transposición yeyuno-ileal en la rata. Las vesículas procedentes de íleon control, desarrollan una capacidad de absorción de glucosa que es 3-4 veces más pequeña que la de las vesículas yeyunales, encontrando la misma diferencia en las membranas preparadas de mucosa del tramo ileal, después de resección proximal o interposición de yeyuno.

Recientemente, ROBINSON y col. (171), interpretaban la disminución de la absorción, como debidos a cambios en la madurez de la población celular en el íleon remanente, debida sobre todo al aumento de la velocidad de migración celular hacia el ápice de la vellosidad.

Pero ni los métodos que obtienen un aumento de

la capacidad absorptiva (absorción de nutrientes/longitud intestinal) (44)(64), ni los que obtienen resultados contrarios al referir la absorción a unidades de peso intestinal o superficie mucosal (221)(120)(121), habían tenido en cuenta que solo una parte de los enterocitos es capaz de absorber nutrientes (96)(94), y que la distribución de estas células en la vellosidad no es estable, sino que depende del estado nutricional del animal (205).

OBJETO

DEL

TRABAJO

II.- OBJETO DEL TRABAJO

Tras una resección de intestino delgado, se desarrolla una patente hiperplasia de la mucosa del intestino residual. En estas circunstancias, se ha comprobado que in vivo la capacidad absortiva por unidad de longitud intestinal es mayor que la normal, estimándose que el incremento se debía al mayor número de células existentes y no a un cambio en la capacidad de transporte de los enterocitos individuales.

Por otra parte, estudios in vitro, revelan que la capacidad absortiva de no electrolitos en la mucosa hiperplásica decrece, atribuyendo la disminución a una inmadurez de la población celular.

En nuestro Departamento, se ha estudiado la absorción de monosacaridos in vivo, después de una resección distal de intestino, habiendo obtenido valores superiores a los controles. Sin embargo, al distinguir entre los distintos componentes de la absorción, se comprobó que el aumento era debido en realidad a una mayor capacidad difusiva del yeyuno remanente, sin que se modifique la cantidad de azúcar transportado por un

mecanismo activo.

Continuando la misma línea de trabajo, investigamos el comportamiento de la mucosa intestinal hiperplásica, respecto a la entrada de aminoácidos tras resección del 50%, a los cuatro meses de la intervención quirúrgica, calculando los componentes activo y pasivo del transporte, con el fin de conocer en profundidad los mecanismos que intervienen en el mismo, en nuestras condiciones experimentales.

MATERIAL

Y

METODOS

III.1.- ANIMALES UTILIZADOS

Para este trabajo se han utilizado ratas blancas (Ratus norvergicus raza Wistar albina), machos, adultos, procedentes del Servicio de animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, con pesos en el momento de la operación de 250 - 300 g .

La alimentación desde el destete, se ha realizado utilizando el pienso comercial "Sandermus"^R.

III.2.- PREPARACION QUIRURGICA

Los animales se mantienen en ayunas las 24 horas que preceden a la operación, permitiéndoseles la ingesta de agua " ad libitum " .

Pasado este periodo de ayuno, son anestesiadas por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a dosis de 4 mg / 100 g de peso corporal.

El grado de anestesia se controla por la observación del reflejo óculo-parpebral, su-

plementando la anestesia de ser necesario con inhalación de éter.

III.3.- RESECCION INTESTINAL

Tras laparatomía media, mediante la que se seccionan los diversos planos musculares, se penetra en la cavidad abdominal; una vez localizado el intestino y tomando como guía un hilo de lino, se mide la longitud total del intestino delgado, contando desde el comienzo del duodeno hasta la válvula ileocecal.

Se han realizado resecciones del 50% de intestino delgado distal (IDD), midiendo de nuevo para identificar el punto medio, y a partir del mismo, se comienza a ligar los vasos de la zona restante, preservando intacta la vascularización del primer tramo de intestino.

Los vasos ligados, se seccionan, dejando libre la zona a resecar; a continuación, se secciona el intestino, tanto por la parte anterior, como por la posterior próxima a la válvula

ileocecal.

La unión del segmento proximal al ciego, se efectúa mediante anastomosis término-terminal, cuidando de preservar la válvula ileocecal.

Debido al tamaño del intestino en la rata, el material de sutura empleado es Mersilene 5/0 con aguja atraumática.

Una vez efectuada la intervención, se procede a cerrar el plano muscular con puntos entrecortados de catgut nº 6; y la aponeurosis, con puntos sueltos de lino del nº 60.

La herida se trata con desinfectante local (tintura de yodo) siendo la duración de la operación aproximadamente de una hora.

III.4.- PERIODO POSTOPERATORIO

Tras la intervención quirúrgica, los animales se mantienen privados de agua durante 24 horas, y a las 48 horas, se les administra comida "ad libitum". No se les ha sometido a nin-

gún tratamiento farmacológico.

Observando la evolución del animal, se puede considerar, que por término medio, estos se han recuperado a la semana de la intervención.

III.5.- TECNICA DE ABSORCION IN VIVO

La absorción intestinal se ha medido mediante la técnica de absorción in vivo de PONZ y col. (160), consistente en el estudio de la absorción en un segmento del intestino delgado aislado mediante cánulas conectadas a un sistema de perfusión que bombea la solución a absorber, a lo largo del asa intestinal. La cantidad de sustrato absorbido se calcula por diferencia entre la cantidad contenida en el líquido a la entrada del intestino y la contenida en el líquido efluente, referida al tiempo de absorción elegido.

III.5.1.- DESCRIPCION DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

Se trabaja en un vitrina mantenida a una temperatura de 28-30 °C, mediante un sistema de calefacción regulable. En el interior de la misma se encuentra una camilla calentada con una

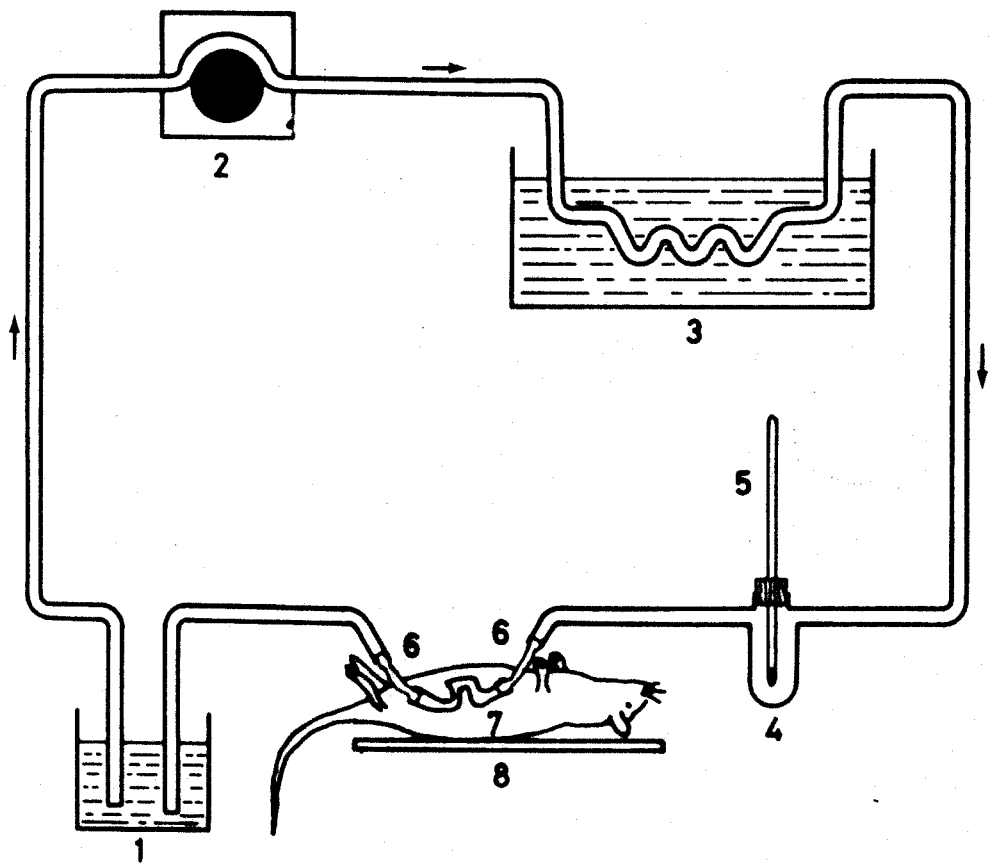
manta eléctrica , para evitar el descenso de temperatura provocado por la anestesia.

El sistema de perfusión consta de los siguientes elementos, acoplados como muestra el Esquema 5

- 5 - Reservorio que contenga la solución a perfundir.
- Tubo de plástico flexible por el que circula el líquido.
- Bomba peristáltica (GILSON mod. minipuls 2) que impulsa el líquido a una velocidad de 5,6 ml/min.
- Baño termostataado ajustado a la temperatura adecuada para que el líquido penetre en el intestino a 37°C.
- Cánulas de entrada y salida de líquido ligadas al intestino.

III.5.2.- COMPOSICION DEL LIQUIDO DE PERFUSION

Todos los experimentos realizados en este trabajo, han sido realizados utilizando como líquido de perfusión una solución de cloruro sódico



Esquema 5

al 9 %, que contenía el aminoácido estudiado a las distintas concentraciones.

Los aminoácidos usados han sido:

L- fenilalanina (Phe), L-leucina (leu) y L-metionina de la casa Merck, y cicloleucina (ácido 1-amino ciclopentano, 1-carboxílico) de Sigma.

Junto a los anteriores, se han utilizado los correspondientes aminoácidos marcados: L-(2,4,6-³H) fenilalanina; L-(4,5-³H) leucina y (carboxil-¹⁴C) cicloleucina de Radiochemical Centre Amersham.

III.5.3.- REALIZACION DEL EXPERIMENTO

Una vez transcurridos 4 meses de la resección del 50% de IDD, se mantiene a los animales 24 horas ayunas con agua "ad libitum" y se anestesia con uretano al 12,5%, mediante inyección subcutánea a razón de 10 ml/Kg.

Se realiza la laparatomía, se selecciona

el asa a perfundir desde unos dos centímetros a partir del asa de Treitz hasta unos 20 centímetros aproximadamente en dirección caudal. Se introducen a través de un pequeño corte en la pared intestinal, las cánulas de vidrio de entrada y salida del líquido de perfusión, que se atan con dos hilos dispuestos previamente para tal fin. Con anterioridad se ligan los vasos sanguíneos del mesenterio que irrigan la zona donde va a realizarse el corte.

Se reintroduce el asa intestinal en la cavidad abdominal y se conectan ambas cánulas al sistema de perfusión, posteriormente, se procede a lavar el intestino con suero fisiológico, hasta que el líquido recogido aparezca claro y transparente (aproximadamente 50 ml).

Seguidamente se procede a la perfusión con reciclado de las soluciones en estudio, tomando como tiempo cero el momento en que se comienza a succionar el líquido, y al final del periodo experimental deseado (5 minutos) se interrumpe la aspiración de la solución y se recoge todo el líquido contenido en el sistema mediante paso de aire.

La temperatura rectal del animal se mantenía con un valor constante de $37,2 \pm 0,2$ °C durante todo el proceso experimental.

III.5.4.-COMPOSICION DEL LIQUIDO DE CENTELLEO

El líquido de centelleo utilizado fué:

Tolueno 2 litros

Tritón X-100 1 litro

P.P.O.15 gramos

Se disuelve el P.P.O. en medio litro de tolueno; a la mezcla se le incorpora la parte de tritón X-100 y finalmente se completa con el tolueno restante.

El conjunto queda con un aspecto turbio, por lo que se procede a añadir agua destilada hasta que la solución quede transparente.

III.5.5.- DETERMINACION DE AMINOACIDOS

El líquido de perfusión contenía el aminoácido marcado, con el aminoácido inerte en la cantidad adecuada para obtener la concentra-

ción adecuada y radioactividad deseadas en la solución de perfusión.

La concentración final de sustrato en el líquido efluyente, se determinó tomando partes alícuotas de la solución y comparando las desintegraciones por minuto finales en relación a las iniciales patrón:

$$C_f = C_i \frac{DPM_f}{DPM_i}$$

siendo C_f = concentración final

C_i = ,, inicial

DPM_f = desintegraciones por minuto finales

DPM_i = ,, ,, iniciales

Todas las determinaciones fueron hechas por duplicado en un contador de centelleo líquido Betamatic I (Kontron).

III.6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Los resultados se han expresado en nanomoles absorbidos por cm^2 y por 5 minutos, especificando la superficie del asa intestinal, la velocidad de perfusión V_p , y habiéndose realizado todas las determinaciones en circuito con reciclado. Todos estos datos influyen en los resultados obtenidos para un determinado asa intestinal.

También se especifica la concentración final del aminoácido en el líquido de salida, la cual nos indica la proporción de sustrato absorbido, y nos da una idea del error cometido al considerar como concentración real en la luz intestinal la concentración de entrada en el intestino.

Se estudió la posibilidad de corregir la concentración inicial de sustrato en función de la concentración final, como proponen algunos autores (55)(67), con el fin de que al calcular la afinidad del sustrato por el portador, se obtengan valores de afinidad más reales; sin embargo, no se ha utilizado ninguno de estos métodos, debido

a que en realidad lo que hacen es corregir la concentración de aminoácido en la fase libre luminal, corrección que en nuestro caso es de escasa significación, pero no dan la concentración real de aminoácido en contacto directo con los enterocitos, la cual sería necesaria para medir la afinidad real del aminoácido por su transportador, debido a que no tienen en cuenta la diferencia de concentración entre fase libre y membrana, por la resistencia que las capas no agitadas ofrecen a la difusión del sustrato, la cual es muy importante en los sistemas de transporte in vivo.

Por otra parte, la corrección de la concentración inicial por distintos métodos:

a) media aritmética entre C_i y C_f

b) media geométrica entre C_i y C_f

$$c) C_i' = \frac{C_i - C_f}{\ln \frac{C_i}{C_f}}$$

En nuestros experimentos obtendríamos valores similares debido a que la diferencia entre C_i y C_f es pequeña, alrededor del 10 - 15%.

El aminoácido absorbido se ha calculado por la cantidad de aminoácido desaparecida del líquido de perfusión, siendo $V_i C_i - V_f C_f$, (V_i y V_f son los volúmenes de líquido contenidos en el circuito en los momentos inicial y final.

Las medidas de volumen inicial y final se han hecho por pesada, encontrándose que las variaciones eran del orden del orden del 5% en uno u otro sentido. Por este motivo, se ha considerado en la práctica $V_i = V_f = 15$ ml.

Para la medida de la superficie intestinal perfundida, se ha seguido el método descrito por VIDAL-SIVILLA (216), y que describimos a continuación. Al acabar el experimento se extrae el asa intestinal con sus dos cánulas, se fija por una de ellas y se cuelga por la otra un peso de 30 g, lo que provoca una distensión máxima. La longitud en estas condiciones se multiplica por el factor 0,6 para referirlo aproximadamente a la longitud propia del intestino in situ.

El ancho se mide abriendo longitudinalmente el asa sobre una superficie lisa y distendiendola convenientemente.

III.7.- CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS

El objetivo del presente trabajo, era la determinación in vivo de los parámetros cinéticos para tres aminoácidos neutros, tanto en ratas patrones como en reseccionadas, así:

- 1º.- K_T , concentración de sustrato para que la velocidad sea la mitad de la velocidad máxima.
- 2º.- V_{max} , velocidad máxima de transporte mediado.
- 3º.- K_D , coeficiente de transferencia de masa del componente pasivo.

Se ha seguido el siguiente esquema de trabajo, tanto en ratas operadas como en intactas, y para cada aminoácido:

- 1º.- Absorción del aminoácido en función de su concentración en la luz intestinal.
- 2º.- Medida del componente de difusión y del transporte mediado.
- 3º.- Cálculo de la K_T y V_{max} por el método de los dobles inversos de Lineweaver - Burk.

III.7.1.- MEDIDA DE LA ABSORCION DEL AMINOACIDO EN FUNCION DE SU CONCENTRACION EN EL LIQUIDO DE PERFUSION

Se estudió la velocidad de absorción de cada aminoácido dentro de una amplia gama de concentraciones diferentes en el líquido de perfusión, que varió entre 1 y 50 mM.

Los resultados se representaron colocando en ordenadas las velocidades de absorción, y en abcisas las concentraciones del sustrato. En todos los casos, se obtuvo una curva cuyo trazado correspondía a un proceso con un componente saturable, y otro no saturable, de modo que a partir de ciertas concentraciones, se hace recta con una determinada pendiente. Matemáticamente corresponde a una ecuación suma de una transferencia de sustrato directamente proporcional a la concentración (difusión pasiva), y un transporte mediado saturable tipo Michaelis - Menten, es decir,

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_t + S} + K_D \cdot S$$

siendo

V = absorción neta del aminoácido

V_{\max} = velocidad máxima del transporte
mediado

S = concentración del sustrato

K_T = concentración del sustrato en que el
transporte mediado alcanza la mitad
de su velocidad máxima.

K_D = coeficiente de transferencia de masa
del proceso pasivo.

III.7.2.- MEDIDA DEL COMPONENTE DE DIFUSION Y DEL TRANSPORTE MEDIADO

El componente de difusión pasiva, es función lineal de la concentración, y puede medirse inhibiendo totalmente el transporte activo del aminoácido, o bien trazando desde el origen una paralela a la porción recta final de la curva de absorción total. Este último método es menos riguroso y puede dar mayores errores en la medida posterior de la K_T , especialmente cuando ésta tiene valores altos.

Como inhibidor, se utilizó otro aminoácido

neutro, la L-metionina, que actúa compitiendo con un grupo de aminoácidos neutros, por el mismo transportador, para el que tiene elevada afinidad según se ha demostrado in vitro (87)(161).

La absorción de un aminoácido neutro en presencia de metionina a elevada concentración, representada en función de la concentración del sustrato, define una recta cuya pendiente es K_D .

El valor del componente de transporte mediado, se ha obtenido restando de cada valor de absorción total, el correspondiente al componente pasivo a la misma concentración, y la curva diferencia sigue bastante bien la ecuación de Michaelis-Menten.

III.7.3.- CALCULO DE LA K_T Y V_{max} POR EL METODO DE LINEWEAVER - BURK

Los datos correspondientes a transporte mediado a cada concentración de sustrato, se utilizaron para realizar el método de los dobles inversos

de Lineweaver - Burk.

La representación gráfica de los inversos de la velocidad frente a los inversos de la concentración, se ajusta muy aceptablemente a una recta, lo que confirma que es un transporte tipo Michaelis-Menten. El corte de esta recta con el eje de abscisas, corresponde al punto $-1/K_T$, y el corte con el eje de ordenadas corresponde al punto $1/V_{\max}$.

RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

IV.1.- OBSERVACIONES GENERALES. ABSORCION DE AMINOACIDOS EN FUNCION DE SU CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION.

Se han ensayado para el cálculo de la absorción total, seis concentraciones de aminoácido: 1, 2, 5, 5, 10, 25 y 50 mM.

En el mismo animal, se realizaron absorciones sucesivas de 5 minutos cada una, dos para cada una de las concentraciones estudiadas. Se operó con perfusión en circuito cerrado, velocidad de perfusión de 5,6 ml/min y recogida total del líquido de perfusión al final de cada periodo de absorción.

El área perfundida, se localiza a unos 2 cm. después del asa de Treitz, calculando la longitud de la misma, de manera que la superficie utilizada fuera de unos 15 cm².

El protocolo de trabajo que se ha seguido en todos los casos, ha sido idéntico, perfundiendo

do siempre de menor a mayor concentración de aminoácido.

Después de cada absorción, se deja un intervalo de 5 minutos sin pasar ningún tipo de solución por el asa intestinal, solo aire, con el fin de eliminar los restos de líquido de la perfusión anterior.

Tanto en ratas patrones como en reseccionadas, se observa una curva de absorción que a concentraciones altas se convierte en una recta, lo que sugiere que es suma de dos componentes, uno de transporte activo y otro de difusión.

Para conocer el aminoácido transportado por difusión, el método empleado ha sido el de introducir en el medio un L-aminoácido, en este caso L-metionina, a una concentración muy elevada (60mM); al ser la concentración de L-metionina más alta que la del aminoácido estudiado, teniendo en cuenta además que la afinidad por el transportador es superior a la de estos, se puede considerar que las cantidades de aminoácidos (L-Fenilalanina, L-Leucina, L-Cicloleucina) que se absorben en presencia de L-Metionina,

corresponden casi totalmente al componente de difusión.

En los experimentos con L-Metionina, la pauta de perfusión fué:

- 1º.- Aminoácido 1 mM con una perfusión de 5 minutos.
- 2º.- Vaciado del asa, con paso de aire de 5 minutos.
- 3º.- Aminoácido 1 mM, más L-Metionina 60 mM durante 5 minutos.
- 4º.- Vaciado del asa, con paso de aire durante 5 minutos.
- 5º.- Lavado del asa con solución salina fisiológica de 5 minutos.

.....

Y así sucesivamente y en la misma secuencia para todas las concentraciones ensayadas, en orden creciente de concentración.

Durante todas las perfusiones se controló la temperatura del líquido a la entrada del asa intestinal, que fué de 37°C, mediante un baño termotático interpuesto en el circuito, que se reguló a una temperatura de 45°C.

El volumen inicial utilizado en cada perfusión, fué de 15 ml, comprobando por pesada tanto el volumen inicial como el volumen final. Al efectuar los cálculos de absorción, dado que las diferencias de volumen se pueden considerar despreciables, se considera solamente el volumen inicial.

Una vez terminada la perfusión, se sacrificaba el animal, se extraía el asa intestinal, y se determinaba la superficie serosal, por medida de su longitud (colocando un peso de 30g en un extremo y midiendo), y de su anchura.

IV.2.- ABSORCION DE L-FENILALANINA EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS, EN FUNCION DE SU CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION.

Se han perfundido asas intestinales de ratas patrones y reseccionadas, con soluciones conteniendo concentraciones de L-Fenilalanina entre 1 y 50 mM, realizándose estas perfusiones en orden creciente de concentraciones. Los resultados obtenidos se encuentran en las tablas 1 para ratas patrones, y 3 para animales reseccionados, habiéndose representado gráficamente en las Fig. 1 y 2 respectivamente.

La absorción de L-Fenilalanina en los dos lotes de animales, sigue una evolución semejante, encontrándose los valores correspondientes a ratas con resección del 50% de intestino delgado distal, por encima de los obtenidos para ratas controles. Las diferencias son menores a bajas concentraciones de sustrato en el medio de perfusión, incrementándose a medida que la cantidad de L-Fenilalanina presente en la solución perfundida es mayor.

Los errores calculados en ambas series para cada concentración, se encuentran dentro de los límites admisibles en estas clases de experimentos, incrementándose como es lógico, a medida que la concentración de aminoácido presente en el medio, es mayor.

Los porcentajes de caída de concentración respecto a la L-Fenilalanina presente inicialmente en el medio, se han calculado en las Tablas 2 y 4 (patrones y resecadas respectivamente), habiéndose obtenido dichos datos, de la diferencia entre los valores de concentración inicial y final en cada uno de los medios estudiados.

Estos porcentajes, van disminuyendo su cuantía a medida que es mayor la concentración en el medio de perfusión, pudiéndose considerar bastante similares cuando los comparamos dos a dos en ambos grupos de animales estudiados.

IV.3.- CALCULO DEL COMPONENTE DE DIFUSION EN LA ABSORCION DE L-FENILALANINA EN RATAS PATRONES Y RESECADAS

En presencia de altas concentraciones de L- Metionina en el medio de perfusión (60 mM), obtenemos una disminución patente en los valores de absorción de L-Fenilalanina, tanto en animales control como en los que han sufrido una resección distal del 50%. En las Tablas 5 y 7 se encuentran los resultados obtenidos en ambos grupos de animales. Se ha perfundido previamente la solución de L-Fenilalanina sin L-Metionina, y posteriormente con el aminoácido a la concentración en estudio y con L-Metionina 60 mM, para lavar luego con el fin de eliminar la L-Metionina presente en el medio, y poder comenzar la perfusión de la siguiente solución sin ningún tipo de interferencia. Se comprueba que el lavado es efectivo, pues los valores de absorción total obtenidos res-

pecto a las experiencias en que no se ha usado inhibidor, son similares.

Las concentraciones restantes en las soluciones, una vez perfundidas, se encuentran en la Tabla 6 para ratas patrón, y 8 en las de resección del 50% de intestino delgado distal. Los porcentajes de caída de concentración, en los dos grupos de animales, son muy inferiores en los experimentos realizados en presencia de L-Metionina, puesto que dicho aminoácido inhibe la absorción de L-Fenilalanina presente en la solución que perfunde.

Los resultados de las Tablas 5 y 7, se han representado en las Figuras 3 y 4. En dichas Figuras, se observan claramente cada uno de los componentes de la absorción de éste aminoácido, correspondiendo la línea superior, a la absorción total, sin inhibidor, la intermedia, a los valores de difusión (obtenidos en presencia de L-Metionina 60 mM, que inhibe el transporte activo), siendo la inferior saturable y procedente de la diferencia entre el transporte total y la difusión a cada una de las concentraciones estudiadas, es decir, representa

las cantidades de L-Fenilalanina que atraviesan la pared intestinal, por un mecanismo activo.

Los valores de difusión, se ajustan a una recta que pasa por el origen, cuyas pendientes indican la constante de difusión (K_D). En las ratas patrones da un valor de $K_D = 0,060 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/\text{l}$, siendo el coeficiente de regresión $r = 0,997$, y en las reseccionadas es de $K_D = 0,075 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/\text{l}$, con un coeficiente de regresión $r = 0,999$. Estos valores nos indican que el componente difusivo es mayor en las ratas con resección intestinal.

IV.4.- CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS, PARA LA ABSORCION INTESTINAL DE L-FENILALANINA EN RATAS PATRONES Y RESECADAS.

Los valores de transporte activo, se han obtenido por diferencia entre la absorción total y la difusión (en presencia de L-Metionina 60 mM).

En la Tabla número 9, se encuentran los valores de $1/|S|$ y $1/V$, que al ser representados gráficamente en la Figura 5, dan una recta cuya

ecuación es $y = 0,532 + 13,465 x$, con un coeficiente de regresión $r = 0,999$. De donde se deduce una $V_{\max} = 1,88 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$ y una K_T aparente = 25 mM.

TABLA 1

ABSORCION TOTAL DE L-FENILALANINA EN FUNCION DE SU
CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION. RATAS PATRONES.

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado

$$V_p = 5,6 \text{ ml/min. Datos en } \mu\text{mol/cm}^2 / 5'$$

Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Fenilalanina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
380	17,82	0,134	0,345	0,718	1,132	2,585	3,161
		0,122	0,344	0,668	1,317	2,873	---
476	13,20	0,143	0,216	---	1,087	1,969	5,250
		0,113	0,325	0,408	---	1,671	3,471
417	10,20	0,189	0,411	0,541	1,379	3,826	5,126
467	13,86	0,136	0,267	0,360	---	2,119	3,188
		---	0,226	---	1,196	2,241	3,600
525	9,90	0,136	0,204	0,745	0,837	1,627	2,854
		0,131	0,260	---	---	1,840	---
\bar{x}		0,138	0,288	0,573	1,158	2,305	3,807
ϵ		0,007	0,024	0,067	0,078	0,234	0,367
n		8	9	6	6	9	7

TABLA 2

CONCENTRACIONES FINALES DE L-FENILALANINA CORRESPONDIENTES
A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 1

Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Fenilalanina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
380	17,82	0,76	1,88	3,72	7,98	20,39	44,37
		0,78	1,89	3,81	7,65	19,88	---
476	13,20	0,85	2,28	---	8,89	23,00	44,75
		0,88	2,17	4,58	---	23,30	46,53
417	10,20	0,87	2,22	4,63	9,06	22,40	46,51
467	13,86	0,87	2,25	4,67	---	23,04	47,05
		---	2,29	---	8,89	22,93	46,67
525	9,90	0,91	2,36	4,51	9,45	23,93	48,11
		0,91	2,33	---	---	23,78	---
\bar{x}		0,85	2,19	4,32	8,65	22,52	46,28
ϵ		0,02	0,06	0,18	0,28	0,48	0,49
n		8	9	6	6	9	7
% caída de concentración		15	12,4	13,6	13,5	9,9	7,4

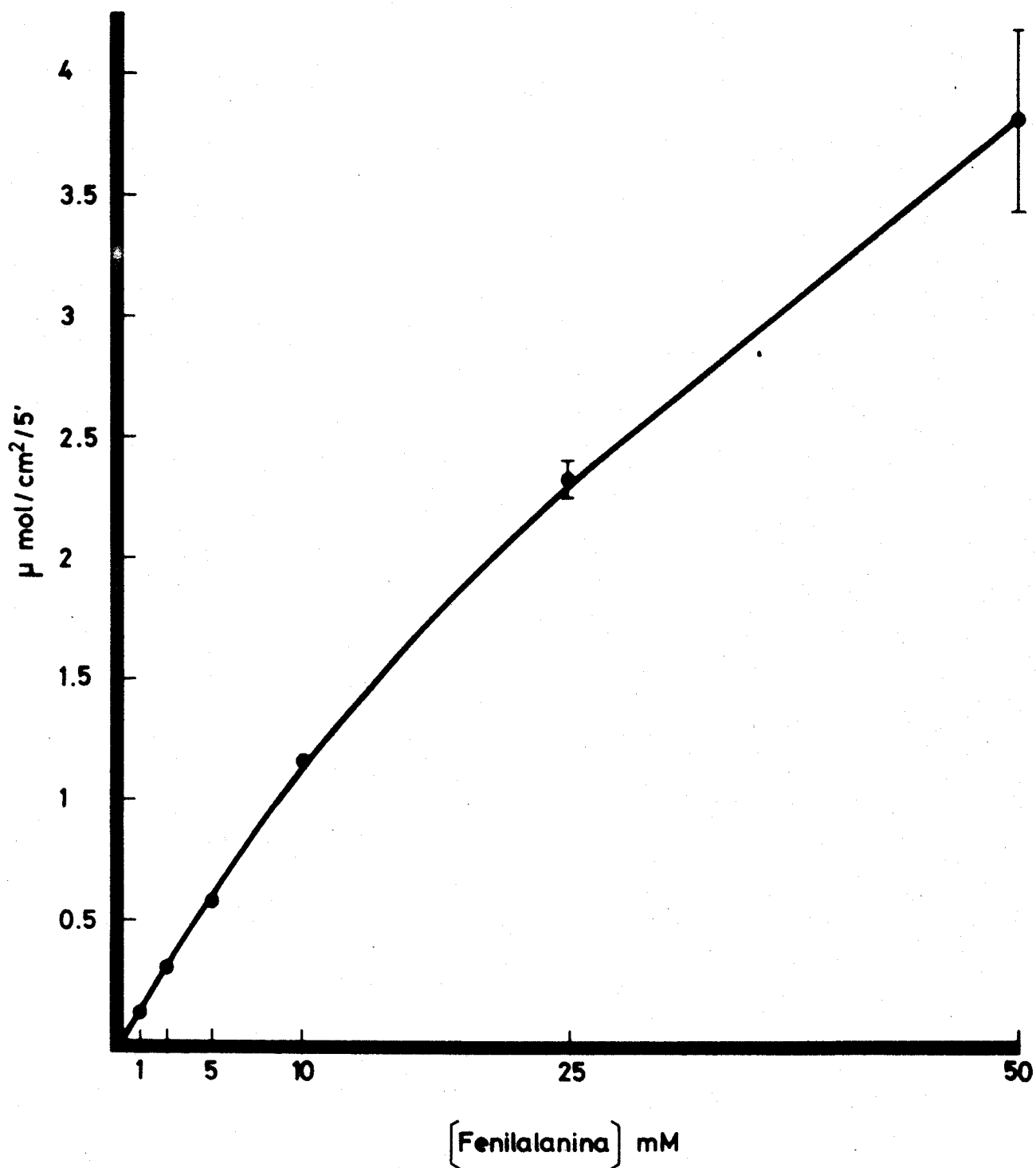


Fig. 1

Absorción total de L-Fenilalanina, en función de la concentración.
Ratas patrones.

TABLA 3

ABSORCION TOTAL DE L-FENILALANINA EN FUNCION DE SU
CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION . RATAS RESECCIONADAS

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado

$V_p = 5,6$ ml/min. Datos en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2 / 5'$

Peso (g)	Asa (cm^2)	L-Fenilalanina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
416	12,60	0,164	---	0,732	1,314	---	---
		0,134	0,291	0,582	1,341	4,211	5,459
553	36,00	0,135	0,219	0,380	0,783	---	---
		---	0,250	---	---	---	---
288	13,02	0,228	0,308	0,711	1,538	3,974	4,800
		0,114	0,308	---	1,168	2,370	4,163
312	11,07	0,264	0,412	0,821	1,125	1,729	4,266
		0,147	0,438	0,530	1,203	---	5,096
421	12,90	0,186	0,504	0,782	1,263	2,698	---
		0,191	0,358	0,976	1,004	2,740	5,103
402	13,20	0,190	0,406	0,692	1,461	---	---
		0,127	0,311	0,623	---	1,594	2,277
	\bar{x}	0,170	0,346	0,683	1,220	2,759	4,452
	ϵ	0,013	0,025	0,052	0,069	0,382	0,403
	n	11	11	10	10	7	7

TABLA 4

CONCENTRACIONES FINALES DE L-FENILALANINA
CORRESPONDIENTES A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 3

Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Fenilalanina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
416	12,60	0,86	---	4,38	8,89	---	---
		0,88	2,26	4,51	8,87	21,46	45,41
553	36,00	0,68	1,97	4,09	8,12	---	---
		---	1,90	---	---	---	---
288	13,02	0,80	2,23	4,38	8,67	21,55	45,83
		0,88	2,23	---	8,99	22,94	46,39
312	11,07	0,79	2,18	4,36	9,12	23,65	46,67
		0,88	2,16	4,58	9,06	---	46,03
421	12,90	0,84	2,07	4,33	8,91	22,68	---
		0,84	2,19	4,16	9,14	22,64	45,61
402	13,20	0,83	2,14	4,39	8,71	---	---
		0,89	2,23	4,45	---	23,60	47,99
\bar{x}		0,83	2,14	4,36	8,85	22,65	46,28
ϵ		0,01	0,03	0,04	0,09	0,33	0,33
n		11	11	10	10	7	7
% caída de concentración		17,0	14,4	12,8	11,5	9,4	7,4

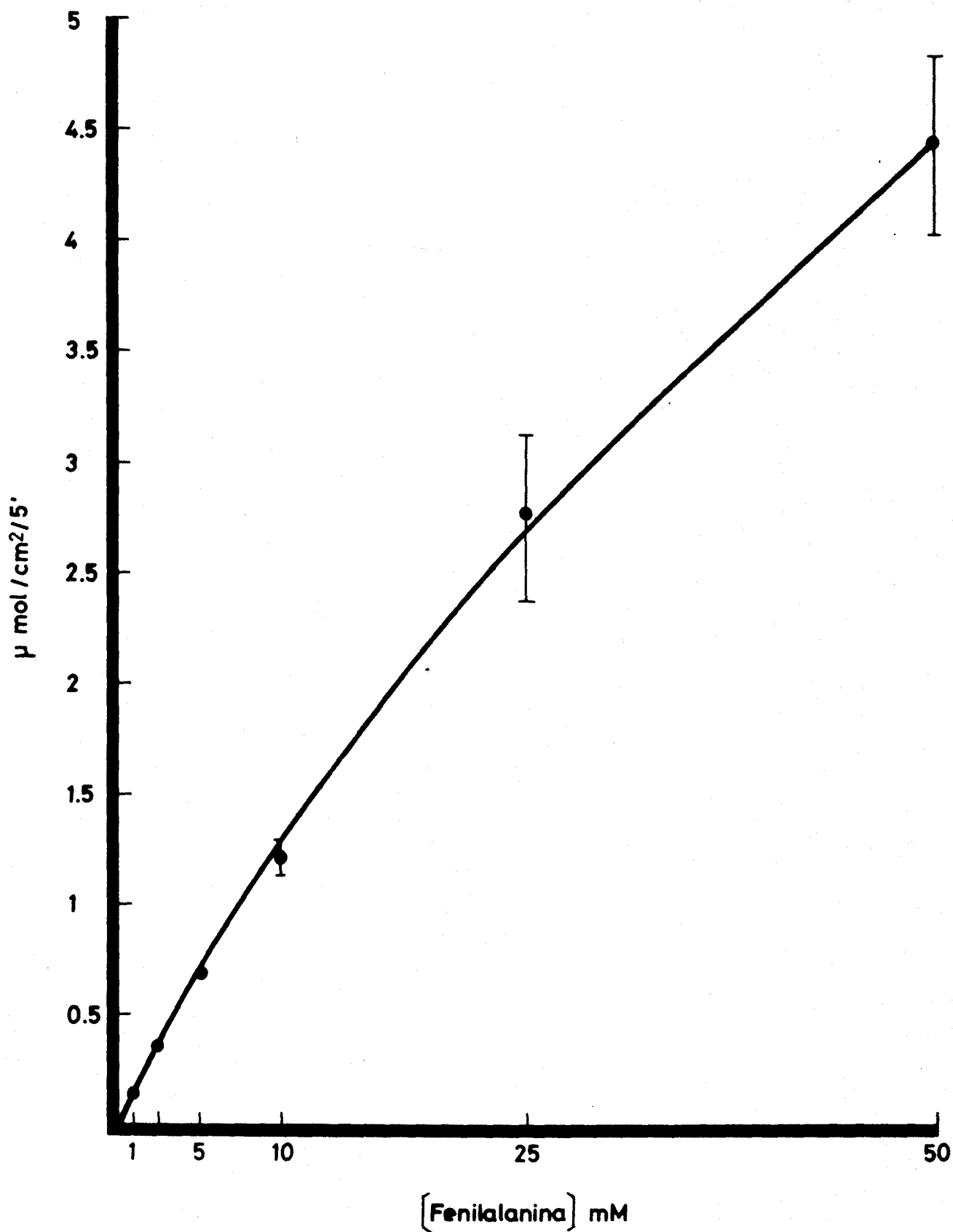


Fig. 2

Absorción total de L-Fenilalanina, en función de la concentración.
Ratas reseccionadas.

TABLA 5

ABSORCION DE L-FENILALANINA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE L-METIONINA 60 mM
 EN FUNCION DE SUS CONCENTRACIONES EN EL MEDIO DE PERFUSION. RATAS PATRONES.

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado.

$$V_p = 5,6 \text{ ml/min. Datos en } \mu\text{mol/cm}^2 / 5'$$

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con metionina				
		L-Fenilalanina mM					L-Fenilalanina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
436	22,32	0,101	0,348	0,550	0,901	3,059	0,059	0,173	0,381	0,811	1,502
404	12,27	0,125	0,285	0,833	1,191	2,954	0,064	---	---	0,845	2,469
431	18,33	0,130	0,293	---	1,349	---	0,014	0,048	---	---	1,533
502	24,78	0,136	0,251	---	---	2,172	0,021	0,087	0,278	0,338	1,083
453	17,16	0,130	0,218	0,602	0,922	1,590	0,109	---	0,455	---	0,970
542	14,70	0,136	0,325	0,496	1,014	---	0,032	---	0,404	0,521	2,217
569	14,10	---	0,262	0,544	0,841	2,110	---	0,050	0,355	0,531	---
559	15,72	0,125	0,309	0,570	---	2,417	0,078	0,166	0,293	0,329	0,735
	\bar{x}	0,126	0,286	0,599	1,036	2,383	0,053	0,105	0,361	0,562	1,501
	ϵ	0,004	0,015	0,044	0,073	0,226	0,013	0,027	0,027	0,091	0,244
	n	7	8	6	6	6	7	5	6	6	7

100

TABLA 6

CONCENTRACIONES FINALES DE L-FENILALANINA CORRESPONDIENTES

A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 5

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Fenilalanina mM					L-Fenilalanina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
436	22,32	0,85	1,98	4,18	8,66	20,45	0,91	2,24	4,43	8,79	22,76
404	12,27	0,89	2,27	4,32	9,03	22,58	0,95	---	---	9,31	22,98
431	18,33	0,89	2,14	---	8,35	---	0,98	2,44	---	---	23,13
502	24,78	0,77	2,08	---	---	21,41	0,96	2,36	4,54	9,36	23,21
453	17,16	0,85	2,25	4,31	8,94	23,18	0,87	---	4,47	---	23,89
542	14,70	0,86	2,18	4,51	9,00	---	0,96	---	4,60	9,49	23,50
569	14,10	---	2,25	4,48	9,21	23,02	---	2,45	4,51	9,67	---
559	15,72	0,89	2,17	4,40	---	22,46	0,91	2,32	4,69	9,66	24,23
	\bar{x}	0,86	2,17	4,36	8,86	22,18	0,93	2,36	4,54	9,38	23,38
	ξ	0,01	0,03	0,05	0,13	0,43	0,01	0,04	0,04	0,13	0,20
	n	7	8	6	6	6	7	5	6	6	7
	% caída de concentración	14,0	13,2	12,6	11,2	11,2	7,0	5,6	9,2	6,2	5,9

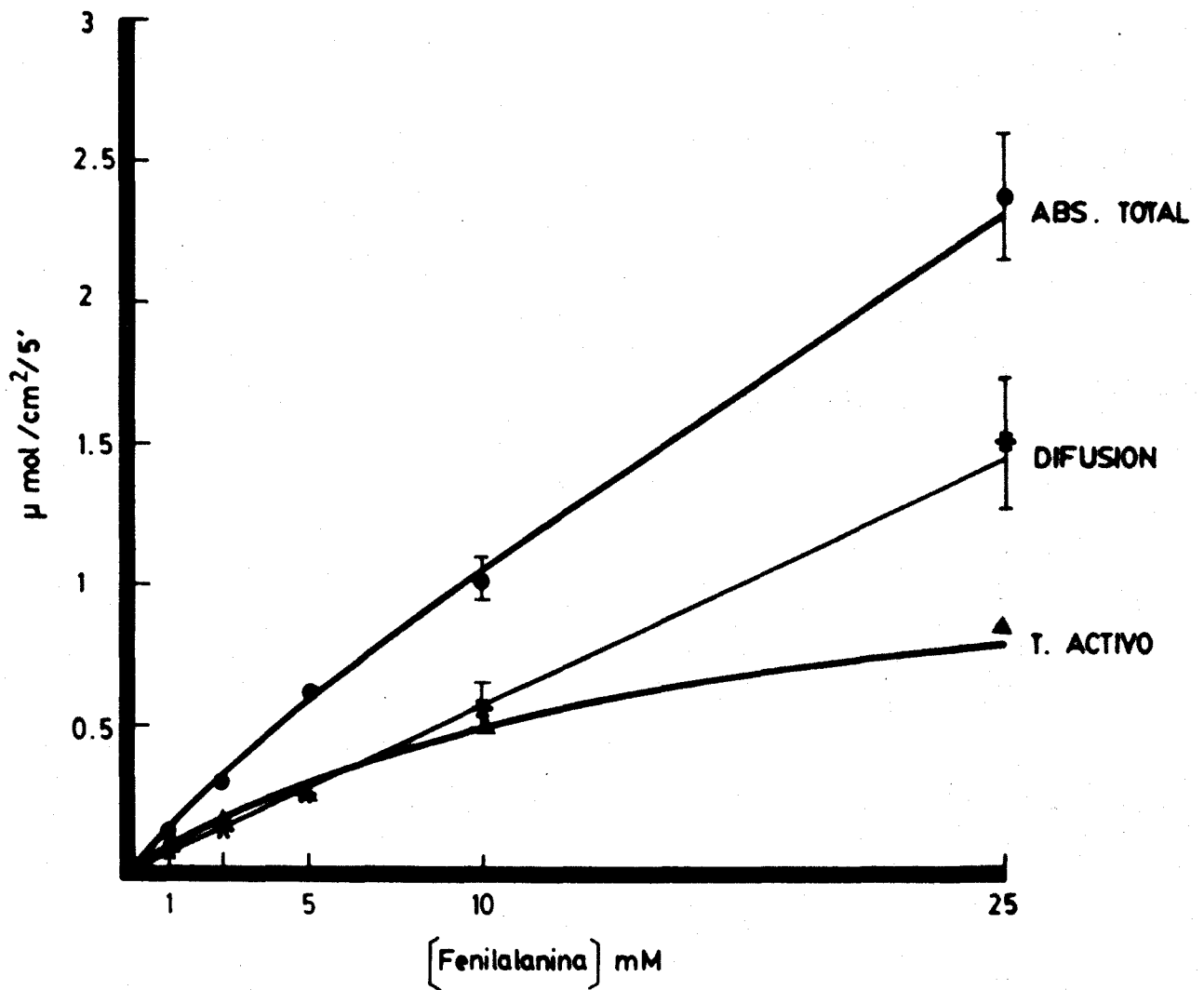


Fig. 3

Cinética de la absorción intestinal in vivo, de L-Fenilalanina en ratas patrones.

● Absorción total

* Absorción en presencia de L-Metionina 60 mM = Difusión

▲ Transporte activo

TABLA 7

ABSORCION DE L-FENILALANINA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE L-METIONINA 60 mM
EN FUNCION DE SUS CONCENTRACIONES EN EL MEDIO DE PERFUSION. RATAS RESECCIONADAS

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado

$V_p = 5,6 \text{ ml/min. Datos en } \mu\text{mol/cm}^2/5'$

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Fenilalanina mM					L-Fenilalanina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
305	15,84	0,133	0,219	---	0,929	---	---	0,169	---	---	---
397	11,40	0,189	0,382	0,930	1,746	2,792	0,106	0,215	---	0,780	3,146
283	14,44	0,122	0,287	0,530	0,910	2,452	0,097	0,114	0,235	0,625	1,806
499	13,80	0,155	0,489	---	---	---	0,090	---	0,588	---	---
268	13,87	0,202	---	0,765	1,593	3,651	0,060	---	---	0,833	1,860
405	17,82	0,152	0,402	0,800	1,377	3,638	0,090	---	0,494	---	2,063
407	16,83	0,139	0,295	0,791	0,914	2,589	0,091	0,189	0,314	0,851	1,909
389	21,30	0,106	0,314	0,609	1,076	1,808	0,045	0,127	0,374	0,589	1,209
426	23,10	---	---	0,442	1,211	2,570	0,067	0,176	---	0,434	1,242
\bar{x}		0,150	0,341	0,695	1,220	2,786	0,081	0,165	0,400	0,685	1,890
ϵ		0,012	0,033	0,065	0,114	0,250	0,007	0,015	0,063	0,067	0,244
n		8	7	7	8	7	8	6	5	6	7

TABLA 8

CONCENTRACIONES FINALES DE L-FENILALANINA CORRESPONDIENTES

A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 7

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Fenilalanina mM					L-Fenilalanina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
305	15,84	0,86	2,27	---	9,01	---	---	2,32	---	---	---
397	11,40	0,86	2,21	4,29	8,67	22,88	0,92	2,34	---	9,41	23,98
283	14,44	0,88	2,22	4,49	9,12	22,64	0,91	2,39	4,77	9,39	23,26
499	13,80	0,86	2,05	---	---	---	0,92	---	4,46	---	---
268	13,87	0,81	---	4,29	8,53	21,62	0,94	---	---	9,23	23,28
405	17,82	0,82	2,02	4,05	8,36	20,68	0,89	---	4,41	---	22,55
407	16,83	0,84	2,17	4,11	8,97	22,09	0,90	2,29	4,64	9,05	22,86
389	21,30	0,85	2,05	4,13	8,47	22,43	0,94	2,32	4,47	9,16	23,28
426	23,10	---	---	4,32	8,13	21,04	0,90	2,23	---	9,33	23,09
	\bar{x}	0,85	2,14	4,24	8,66	21,91	0,91	2,32	4,55	9,26	23,18
	ϵ	0,002	0,04	0,06	0,12	0,31	0,006	0,02	0,06	0,06	0,17
	n	8	7	7	8	7	8	6	5	6	7
	% caída de concentración	15,0	14,4	15,2	13,4	12,3	9,0	7,2	9,0	7,4	7,2

104

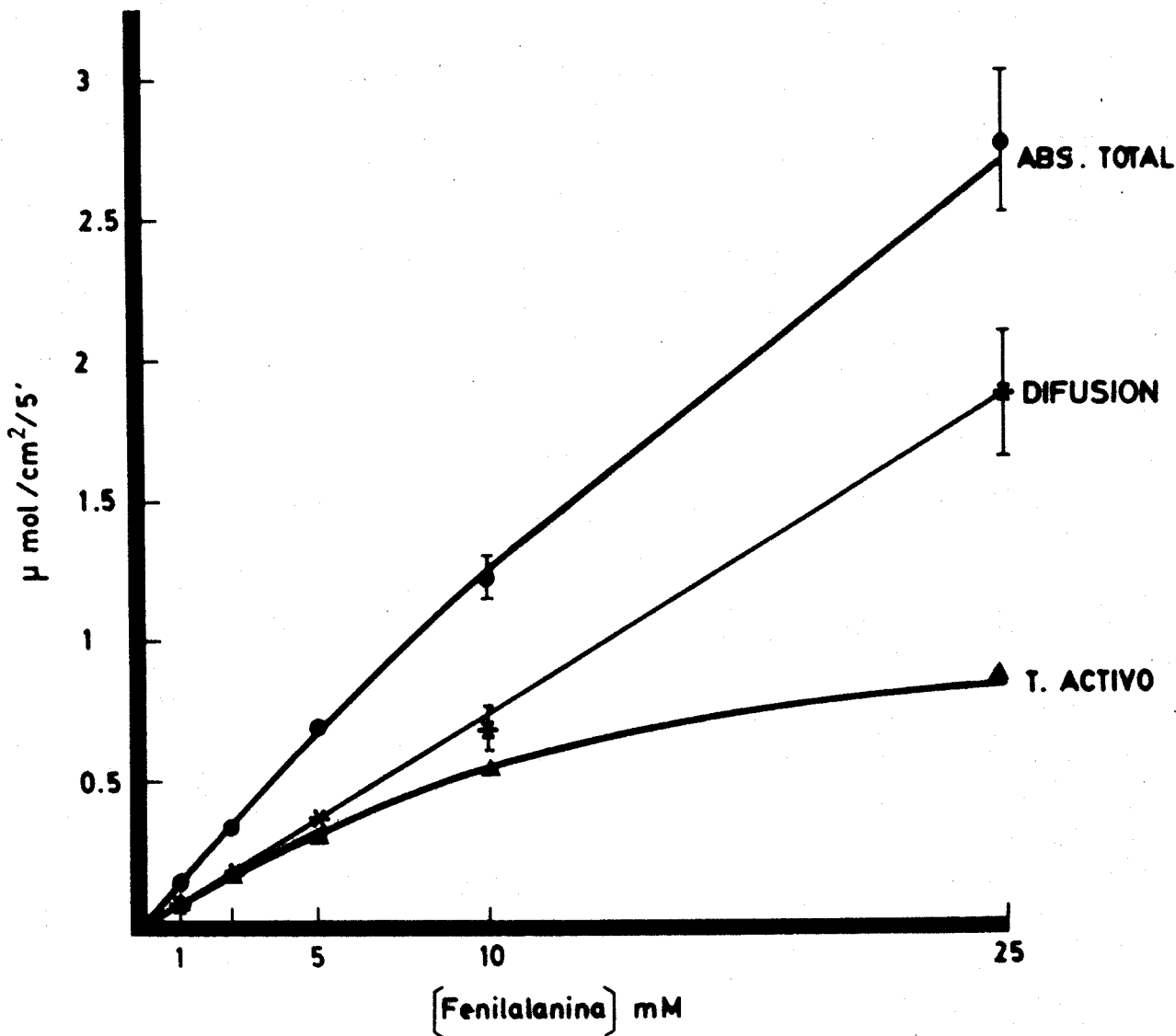


Fig. 4

Cinética de la absorción intestinal in vivo, de L-Fenilalanina en ratas reseccionadas.

● Absorción total

* Absorción en presencia de L-Metionina 60 mM = Difusión

▲ Transporte activo

TABLA 9

VALORES MEDIOS DE ABSORCION TOTAL, DIFUSION Y TRANSPORTE ACTIVO DE L-FENILALANINA
EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS

Periodos de absorción 5 min. Perfusión con reciclado. V = 5,6 ml/min. Datos en $\mu\text{mol/cm} / 5'$

mM	Patrones					Reseccionadas				
	Absor.Total	Difusión	T.activo	1/V	1/ S	Absor.Total	Difusión	T.activo	1/V	1/ S
1	0,126 \pm 0,004 (7)	0,053 \pm 0,013 (7)	0,073	13,7	1	0,150 \pm 0,012 (9)	0,081 \pm 0,007 (9)	0,069	14,5	1
2,5	0,286 \pm 0,015 (8)	0,105 \pm 0,027 (5)	0,181	5,5	0,4	0,341 \pm 0,033 (7)	0,165 \pm 0,015 (6)	0,176	5,7	0,4
5	0,599 \pm 0,044 (7)	0,361 \pm 0,027 (6)	0,238	4,2	0,2	0,695 \pm 0,065 (7)	0,400 \pm 0,063 (5)	0,295	3,4	0,2
10	1,036 \pm 0,073 (7)	0,562 \pm 0,091 (6)	0,474	2,1	0,1	1,220 \pm 0,114 (8)	0,685 \pm 0,067 (6)	0,535	1,9	0,1
25	2,383 \pm 0,226 (6)	1,501 \pm 0,244 (7)	0,882	1,1	0,04	2,786 \pm 0,250 (7)	1,890 \pm 0,244 (7)	0,896	1,1	0,04

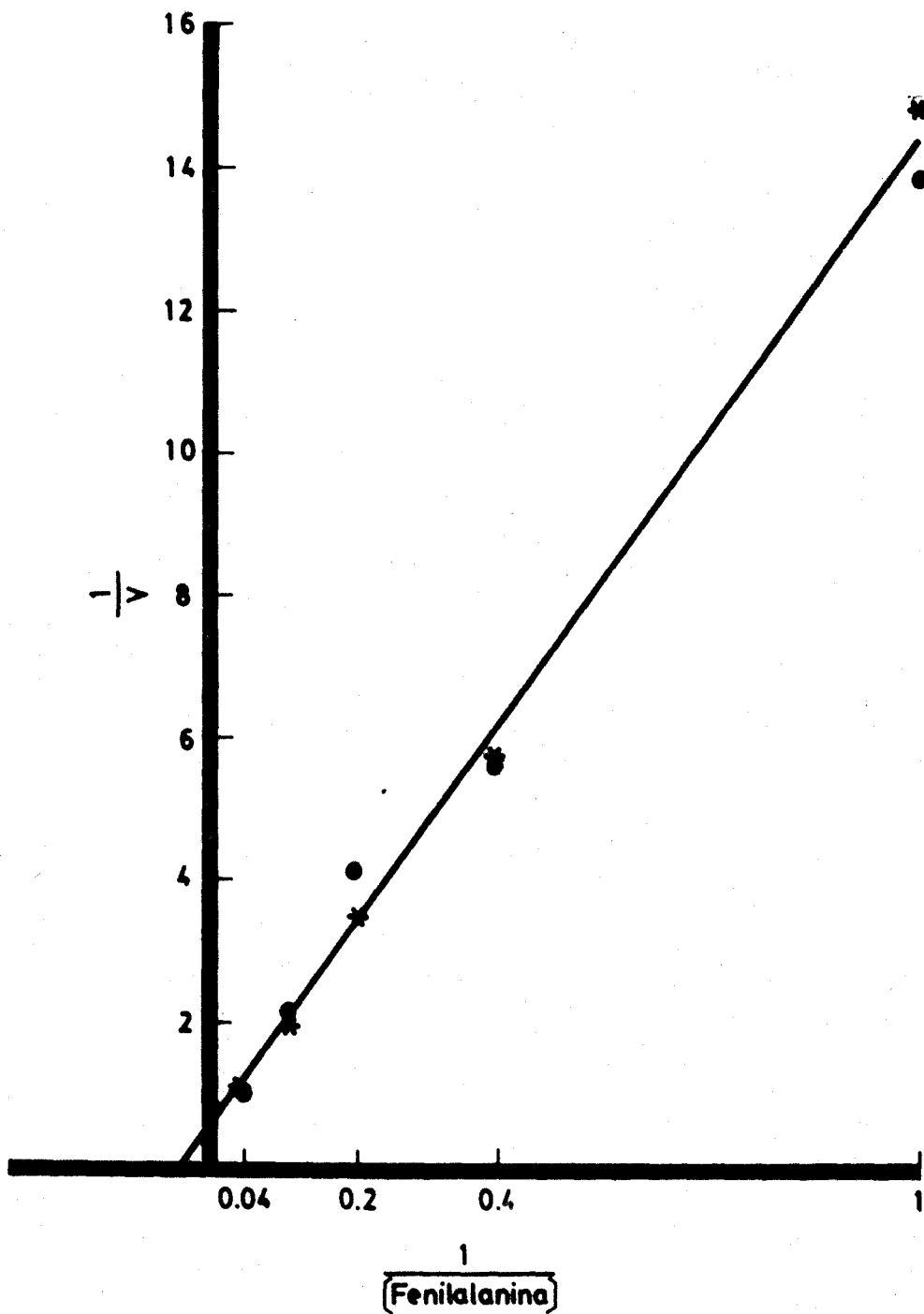


Fig. 5

Representación de los dobles inversos para el transporte activo de L-Fenilalanina, en ratas control (●) y reseccionadas (*).

IV.5.- ABSORCION DE L-LEUCINA EN RATAS PATRONES
Y RESECCIONADAS, EN FUNCION DE SU CONCEN-
TRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION.

Se usaron concentraciones de L-Leucina en el medio de perfusión, de 1 a 50 mM. Los datos obtenidos en cada animal, se muestran en las Tablas 10 y 12, que se representan gráficamente en las Figuras 6 y 7.

En las Tablas 11 (ratas patrones) y 13 (con resección del 50% de intestino delgado distal), están reflejados los valores de concentración que quedan en el líquido de perfusión después de los 5 minutos de experimentación, observándose una caída de concentración que va desde un 13% que corresponde a una concentración inicial de L-Leucina 1 mM, hasta un 3,8%, correspondiente al de 50 mM para animales control; la caída de concentración en las ratas reseçadas, oscila entre 8,5 y 16%, como queda reflejado en la Tabla 13.

Al comparar los resultados de absorción de L-Leucina en ratas patrones y con resección del 50% de intestino delgado distal, resultan valores

similares cuando las concentraciones existentes en el medio de perfusión son bajas (1, 2,5, 5 y 10 mM); sin embargo, a altas concentraciones del aminoácido, la absorción se ve incrementada en los animales operados, pasando de unos valores de 1,443 a 1,869 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$ a 25 mM, y de 2,215 a 2,873 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$, cuando la concentración fué de 50 mM.

IV.6.- CALCULO DEL COMPONENTE DE DIFUSION EN LA ABSORCION DE L-LEUCINA, EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS.

Se han usado concentraciones de 1, 2,5, 5, 10 y 25 mM, y altas concentraciones de L-Metionina (60 mM), para estudiar el componente difusivo de la absorción de L-Leucina, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

En las Tablas 14 y 16, se encuentran los valores obtenidos a las diferentes concentraciones empleadas.

Como era de esperar, la absorción disminuye claramente cuando existe L-Metionina, por inhibir competitivamente el transporte activo de

L-Leucina, correspondiendo estos valores a la L-Leucina que pasa por difusión.

En las Tablas 15 y 17, se encuentran los valores de concentraciones finales de L-Leucina en el medio de perfusión, correspondientes a los experimentos de las Tablas 14 y 16.

Si se observan los resultados de absorción total de L-Leucina de la Tabla 10, con los de la Tabla 14 sin L-Metionina, comprobamos que son comparables, lo que indica que se elimina la L-metionina durante el lavado del asa. Lo mismo ocurre cuando se comparan los datos contenidos en las Tablas 12 y 16, que corresponden a ratas reseccionadas.

En las Figuras 8 y 9, se han representado gráficamente, tanto los datos de absorción total, como los correspondientes al aminoácido absorbido por difusión, en ratas patrones y reseccionadas respectivamente; asimismo, la curva inferior, corresponde a la diferencia entre el transporte total y difusión, en cada una de las concentraciones ensayadas, por consiguiente, expresa las cantidades de aminoácido transportado mediante un mecanismo

activo, que como se observa en las Figuras, es saturable.

Se puede comprobar a simple vista, la linealidad de los datos obtenidos en presencia de L-Metionina, que se reflejan en una recta de coeficiente de regresión $r = 0,999$, cuya pendiente nos indica la K_D , que es igual a $0,065 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/\text{l}$, en ratas patrón, y $K_D = 0,073 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/\text{l}$, en los animales operados. Esto indica que en los animales resecaados, el componente difusivo es mayor.

IV.7.- CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS PARA LA ABSORCION INTESTINAL DE L-LEUCINA, EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS.

El cálculo de los parámetros cinéticos del componente de transporte activo, se ha hecho mediante la representación de dobles inversos, calculándose las V_{max} y K_T aparentes, a partir de las intersecciones de las rectas resultantes, con los ejes de ordenadas y abscisas respectivamente.

Los valores inversos de $|S|$ y V utilizados

para el cálculo, se encuentran en la Tabla 18, encontrándose representados en la Figura 10, tanto los valores correspondientes a ratas control como a las resecadas, pudiéndose apreciar la gran coincidencia de puntos encontrada en ambos casos. Esta similitud, se refleja en el cálculo de K_T y V_{\max} , resultando una K_T aparente alrededor de 14 mM y $V_{\max} = 1,10 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$.

TABLA 10

ABSORCION TOTAL DE L-LEUCINA EN FUNCION DE SU
CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION
RATAS PATRONES

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado
V = 5,6 ml/min. Datos en $\mu\text{mol/cm} / 5'$

Peso (g)	Asa (cm^2)	L-Leucina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
538	10,08	0,139	0,376	0,653	---	---	---
		0,098	0,278	0,586	---	1,778	2,584
410	10,56	0,147	0,348	---	0,995	1,099	1,919
		0,210	0,367	---	---	---	---
497	11,22	0,169	0,398	---	1,365	---	3,863
		0,168	0,241	0,498	0,858	1,066	1,469
406	15,12	0,156	0,258	0,501	0,585	1,109	1,726
		0,117	0,247	0,362	0,777	1,408	1,872
486	15,62	0,197	0,331	0,633	0,982	2,396	1,776
		0,165	---	0,459	1,015	1,249	2,513
\bar{x}		0,156	0,316	0,527	0,939	1,443	2,215
ξ		0,011	0,020	0,039	0,091	0,184	0,271
n		10	9	7	7	7	8

TABLA 11

CONCENTRACIONES FINALES DE L-LEUCINA
CORRESPONDIENTES A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 10

Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Leucina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
538	10,08	0,91	2,25	4,56	---	---	---
		0,93	2,31	4,61	---	23,81	48,26
410	10,56	0,90	2,26	---	9,30	24,23	48,65
		0,85	2,24	---	---	---	---
497	11,22	0,87	2,20	---	8,98	---	47,11
		0,87	2,32	4,63	9,36	24,20	48,90
406	15,12	0,84	2,24	4,49	9,41	23,88	48,26
		0,88	2,25	4,64	9,22	23,58	48,11
486	15,62	0,79	2,16	4,34	8,98	22,50	48,15
		0,83	---	4,52	8,94	23,70	47,38
\bar{x}		0,87	2,25	4,54	9,17	23,70	48,10
ϵ		0,01	0,02	0,04	0,08	0,22	0,21
n		10	9	7	7	7	8
% caída de concentración		13	10	9,2	8,3	5,2	3,8

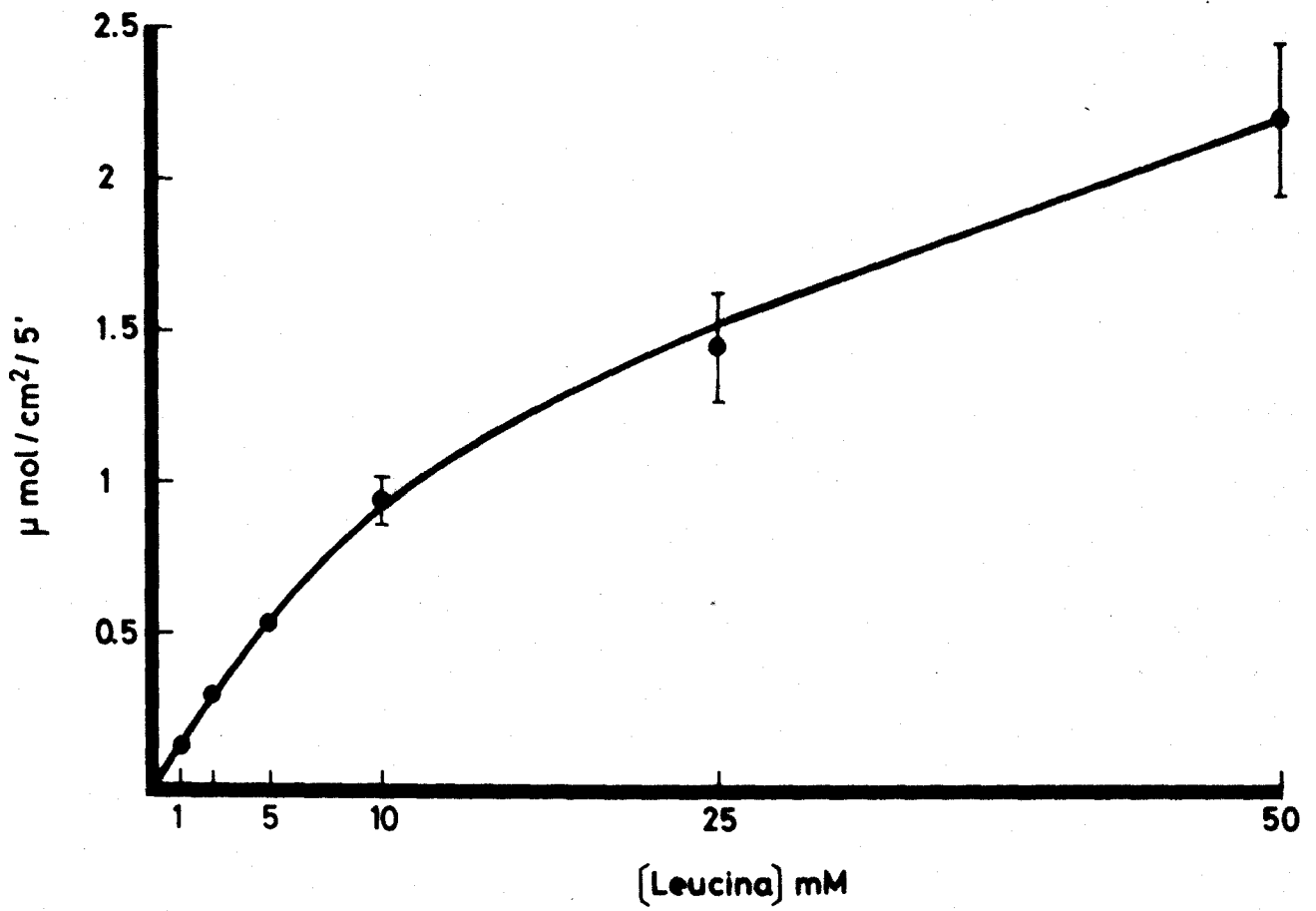


Fig. 6

Absorción total de L-Leucina, en función de la concentración.

Ratas patrones.

TABLA 12

ABSORCION TOTAL DE L-LEUCINA EN FUNCION DE SU
 CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION
 RATAS RESECCIONADAS

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado
 $V_p = 5,6 \text{ ml/min. Datos en } \mu\text{mol/cm}^2 / 5'$

Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Leucina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
492	20,50	0,139	0,399	---	1,436	3,102	---
		0,160	0,343	0,649	1,091	2,752	5,328
484	14,40	0,171	0,368	0,633	0,806	1,986	2,217
		0,181	0,397	0,630	1,160	1,330	2,531
402	17,10	0,137	0,347	0,517	0,972	1,567	2,362
		0,123	0,309	0,510	0,806	---	2,423
323	12,60	0,133	0,235	0,611	0,804	1,759	2,401
		0,091	0,192	0,371	0,514	1,285	3,202
404	18,00	0,151	0,311	0,535	0,751	1,840	3,104
		0,132	0,310	0,412	0,715	1,190	2,291
	\bar{x}	0,142	0,321	0,541	0,906	1,869	2,873
	ξ	0,008	0,021	0,033	0,084	0,221	0,328
	n	10	10	9	10	9	9

TABLA 13

CONCENTRACIONES FINALES DE L-LEUCINA
CORRESPONDIENTES A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 12

Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Leucina mM					
		1	2.5	5	10	25	50
492	20,50	0,81	1,95	---	8,04	20,76	---
		0,78	2,03	4,11	8,51	21,24	42,71
484	14,40	0,84	2,15	4,36	9,23	23,09	47,81
		0,82	2,12	4,40	8,89	23,72	47,57
402	17,16	0,84	2,10	4,40	8,88	23,19	47,27
		0,86	2,14	4,41	9,07	---	47,20
323	12,60	0,89	2,30	4,49	9,32	23,52	47,98
		0,92	2,34	4,69	9,57	23,92	47,31
404	18,00	0,82	2,13	4,36	9,10	22,79	46,27
		0,84	2,13	4,51	9,14	23,57	47,25
\bar{x}		0,84	2,14	4,41	8,98	22,87	42,82
ϵ		0,01	0,04	0,05	0,14	0,37	0,54
n		10	10	9	10	9	9
% caída de concentración		16	14,4	11,8	10,2	8,5	14,3

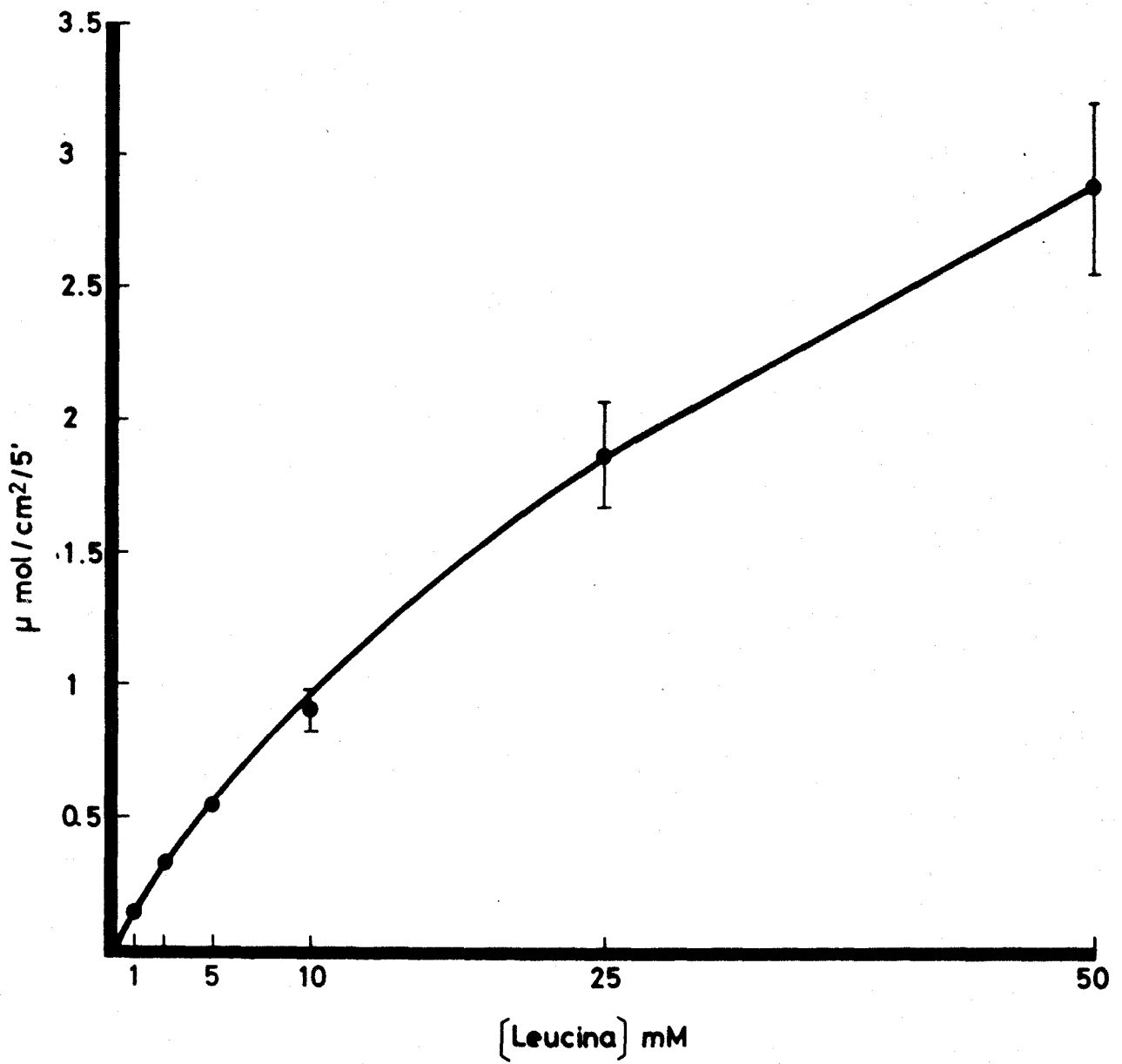


Fig. 7

Absorción total de L-Leucina, en función de la concentración.
Ratas reseccionadas.

TABLA 14

ABSORCION DE L-LEUCINA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE L-METIONINA 60 mM
 EN FUNCION DE SUS CONCENTRACIONES EN EL MEDIO DE PERFUSION. RATAS PATRONES

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado

$V_p = 5,6 \text{ ml/min. Datos en } \mu\text{mol/cm}^2 / 5'$

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Leucina mM					L-Leucina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
416	11,40	0,161	0,367	0,578	1,046	2,163	0,082	0,156	0,338	0,643	1,342
549	12,60	0,126	0,252	0,565	0,780	1,535	0,032	0,092	0,163	0,427	1,055
490	15,97	0,169	0,376	0,691	1,214	2,683	0,100	0,200	0,522	---	2,166
438	19,89	0,119	0,276	0,684	1,010	2,086	0,070	0,154	0,344	0,710	1,175
540	14,85	0,185	0,449	0,809	1,442	2,752	0,111	---	---	---	2,374
535	18,60	0,154	0,352	0,716	1,363	2,541	0,071	---	0,525	1,008	1,418
474	14,40	0,084	0,350	---	---	---	0,052	0,241	---	---	---
570	14,70	0,169	0,436	---	1,114	2,294	---	---	---	0,662	2,008
	\bar{x}	0,145	0,357	0,673	1,138	2,293	0,074	0,168	0,378	0,690	1,648
	ϵ	0,011	0,024	0,037	0,084	0,158	0,010	0,024	0,067	0,093	0,198
	n	8	8	6	7	7	7	5	5	5	7

TABLA 15
 CONCENTRACIONES FINALES DE L-LEUCINA CORRESPONDIENTES
 A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 14

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Leucina mM					L-Leucina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
416	11,40	0,88	2,22	4,56	9,21	23,36	0,94	2,38	4,74	9,51	23,98
549	12,60	0,89	2,29	4,53	9,34	23,71	0,97	2,42	4,86	9,64	24,11
490	15,97	0,82	2,10	4,26	8,71	22,14	0,89	2,29	4,44	---	22,69
438	19,89	0,84	2,13	4,09	8,66	22,23	0,90	2,29	4,54	9,06	23,41
540	14,85	0,82	2,06	4,20	8,57	22,28	0,89	---	---	---	22,65
535	18,60	0,81	2,06	4,11	8,31	21,85	0,91	---	4,35	8,75	23,24
474	14,40	0,92	2,16	---	---	---	0,95	2,27	---	---	---
570	14,70	0,83	2,07	---	8,91	22,75	---	---	---	9,24	23,03
	\bar{x}	0,85	2,13	4,29	8,81	22,62	0,92	2,33	4,59	9,24	23,30
	ϵ	0,01	0,03	0,08	0,14	0,26	0,01	0,03	0,09	0,16	0,22
	n	8	8	6	7	7	7	5	5	5	7
	% caída de concentración	15,0	14,8	14,2	11,9	9,5	8,0	6,8	8,2	7,6	6,8

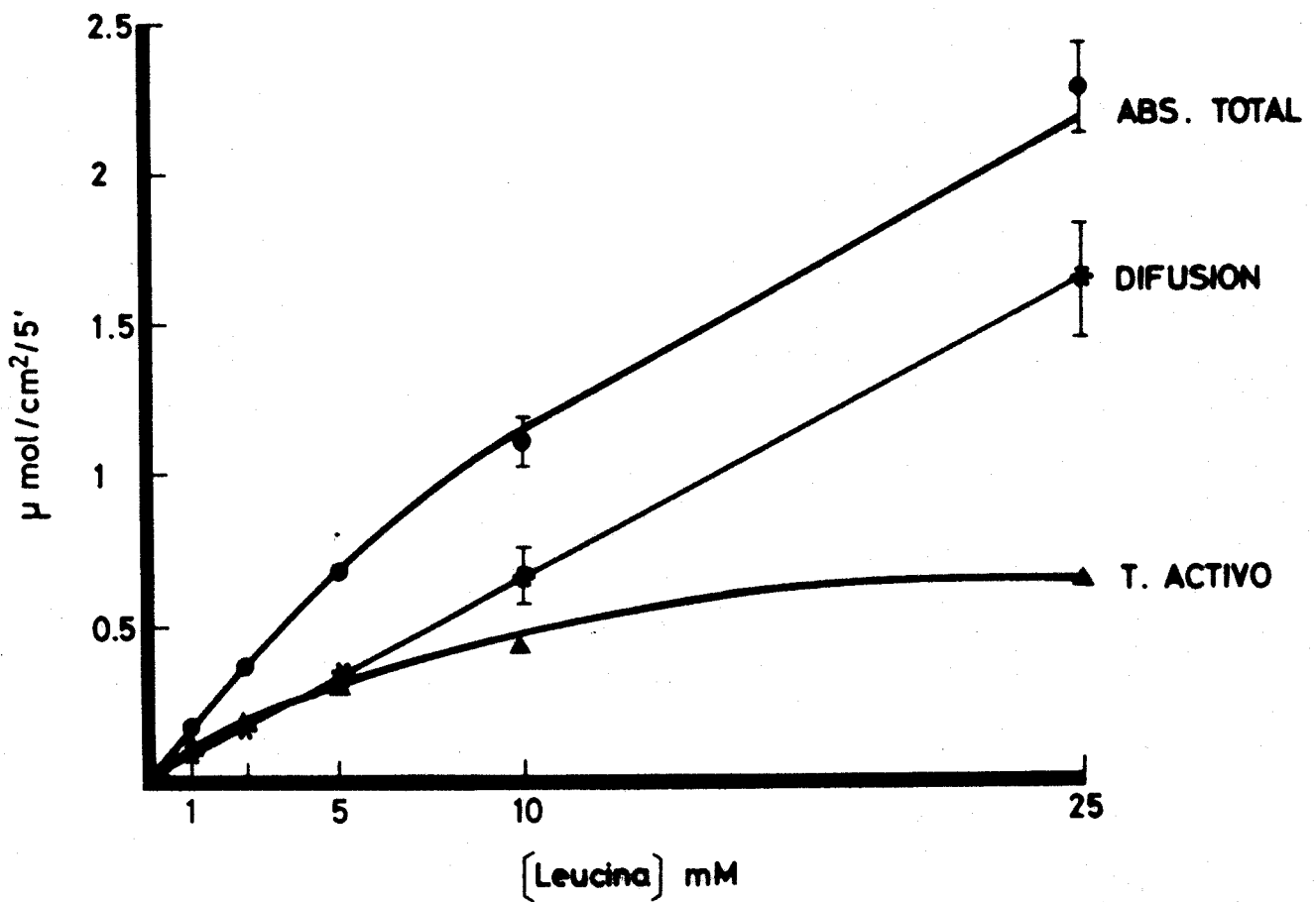


Fig. 8

Cinética de la absorción intestinal in vivo, de L-Leucina en ratas patrones.

● Absorción total

* Absorción en presencia de L-Metionina 60 mM = Difusión

▲ Transporte activo

TABLA 16

ABSORCION DE L-LEUCINA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE L-METIONINA 60 mM
 EN FUNCION DE SUS CONCENTRACIONES EN EL MEDIO DE PERFUSION. RATAS RESECCIONADAS

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado

$$V_p = 5,6 \text{ ml/min. Datos en } \mu\text{mol/cm}^2/5'$$

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Leucina mM					L-Leucina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
420	17,94	0,131	0,357	0,660	1,032	2,831	0,081	0,225	0,387	---	1,514
427	12,69	0,177	0,348	0,663	0,982	2,653	0,070	0,196	0,326	0,859	2,015
452	21,12	0,117	0,361	0,594	1,049	2,460	0,068	0,235	0,423	0,869	1,498
445	18,06	0,157	---	---	---	---	0,078	---	---	---	---
405	16,56	0,163	0,384	0,664	1,339	3,259	0,082	---	---	---	2,184
472	15,48	0,142	0,301	0,676	1,248	2,227	0,052	0,168	0,443	0,902	---
417	17,16	0,122	0,273	0,482	0,915	2,214	0,047	0,143	0,372	0,558	1,553
461	12,54	0,163	0,466	---	---	---	0,082	---	---	---	---
466	10,08	0,174	---	0,675	2,002	---	0,083	---	---	---	2,449
457	13,80	0,183	0,388	0,840	1,638	---	0,095	---	---	---	1,533
467	20,13	0,102	0,276	0,533	1,032	2,171	0,070	0,154	0,318	0,769	1,856
	\bar{x}	0,148	0,350	0,643	1,248	2,545	0,073	0,187	0,378	0,791	1,825
	ϵ	0,008	0,020	0,038	0,120	0,151	0,004	0,015	0,020	0,062	0,128
	n	11	9	9	9	7	11	6	6	5	8

TABLA 17
 CONCENTRACIONES FINALES DE L-LEUCINA CORRESPONDIENTES
 A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 16

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Leucina mM					L-Leucina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
420	17,94	0,84	2,07	4,21	8,76	21,61	0,90	2,23	4,54	---	23,19
427	12,69	0,85	2,20	4,44	9,17	22,75	0,94	2,33	4,72	9,27	23,29
452	21,12	0,83	1,99	4,16	8,52	21,54	0,90	2,17	4,40	8,78	22,89
445	18,06	0,81	----	----	----	----	0,90	----	----	----	----
405	16,56	0,82	2,07	4,27	8,52	21,40	0,91	----	----	----	22,59
472	15,48	0,85	2,19	4,30	8,71	22,70	0,94	2,33	4,54	9,07	----
417	17,16	0,86	2,19	4,44	8,95	22,46	0,94	2,33	4,57	9,36	23,22
461	12,54	0,86	2,11	----	----	----	0,93	----	----	----	----
466	10,08	0,88	----	4,54	8,65	----	0,94	----	----	----	23,35
457	13,80	0,83	2,14	4,23	8,49	----	0,91	----	----	----	23,59
467	20,13	0,86	2,13	4,28	8,61	22,09	0,91	2,29	4,57	8,97	22,51
	\bar{x}	0,84	2,12	4,32	8,71	22,08	0,92	2,28	4,56	9,09	23,08
	ϵ	0,006	0,02	0,04	0,07	0,21	0,005	0,03	0,04	0,10	0,13
	n	11	9	9	9	7	11	6	6	5	8
	% caída de concentración	16,0	15,2	13,6	12,9	11,7	8,0	8,8	8,8	9,1	7,7

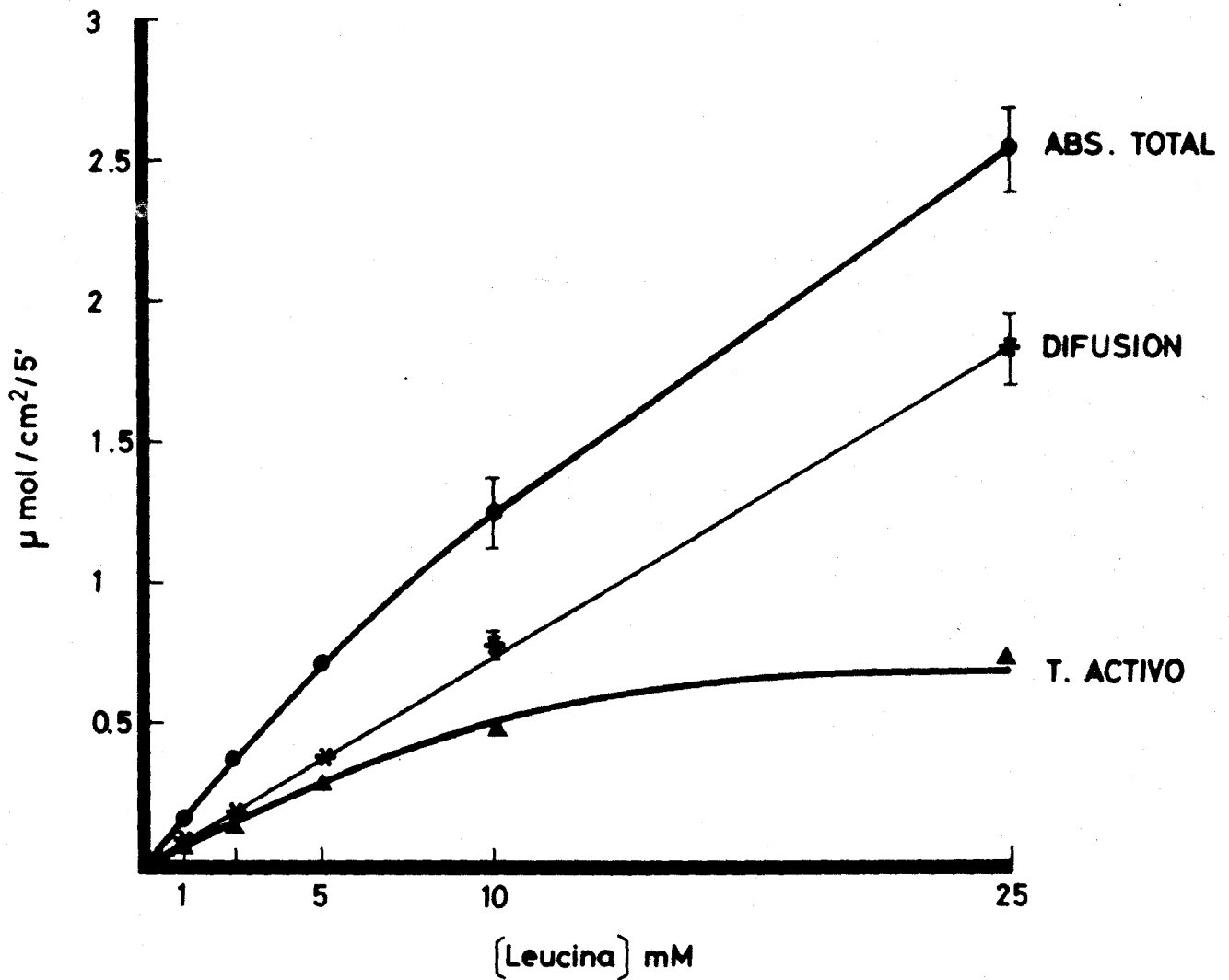


Fig. 9

Cinética de la absorción intestinal in vivo de L-Leucina
en ratas reseccionadas

● Absorción total

* Absorción en presencia de L-Metionina 60 mM = Difusión

▲ Transporte activo

TABLA 18

VALORES MEDIOS DE ABSORCION TOTAL, DIFUSION Y TRANSPORTE ACTIVO DE L-LEUCINA
EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS

Periodos de absorción 5 min. Perfusión con reciclado. $V_p = 5,6$ ml/min. Datos en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$

mM	Patrones					Reseccionadas				
	Absor.Total	Difusión	T.activo	1/V	1/ S	Absor.Total	Difusión	T.activo	1/V	1/ S
1	0,145 \pm 0,011 (8)	0,074 \pm 0,010 (7)	0,071	14,1	1	0,148 \pm 0,008 (11)	0,073 \pm 0,004 (11)	0,075	13,3	1
2,5	0,357 \pm 0,024 (8)	0,168 \pm 0,024 (5)	0,189	5,3	0,4	0,350 \pm 0,020 (9)	0,187 \pm 0,015 (6)	0,163	6,1	0,4
5	0,673 \pm 0,037 (6)	0,378 \pm 0,067 (5)	0,295	3,4	0,2	0,643 \pm 0,038 (9)	0,378 \pm 0,020 (6)	0,265	3,8	0,2
10	1,138 \pm 0,084 (7)	0,690 \pm 0,093 (5)	0,448	2,2	0,1	1,248 \pm 0,120 (9)	0,791 \pm 0,062 (5)	0,457	2,2	0,1
25	2,293 \pm 0,158 (7)	1,648 \pm 0,198 (7)	0,645	1,5	0,04	2,545 \pm 0,151 (7)	1,825 \pm 0,128 (8)	0,720	1,4	0,04

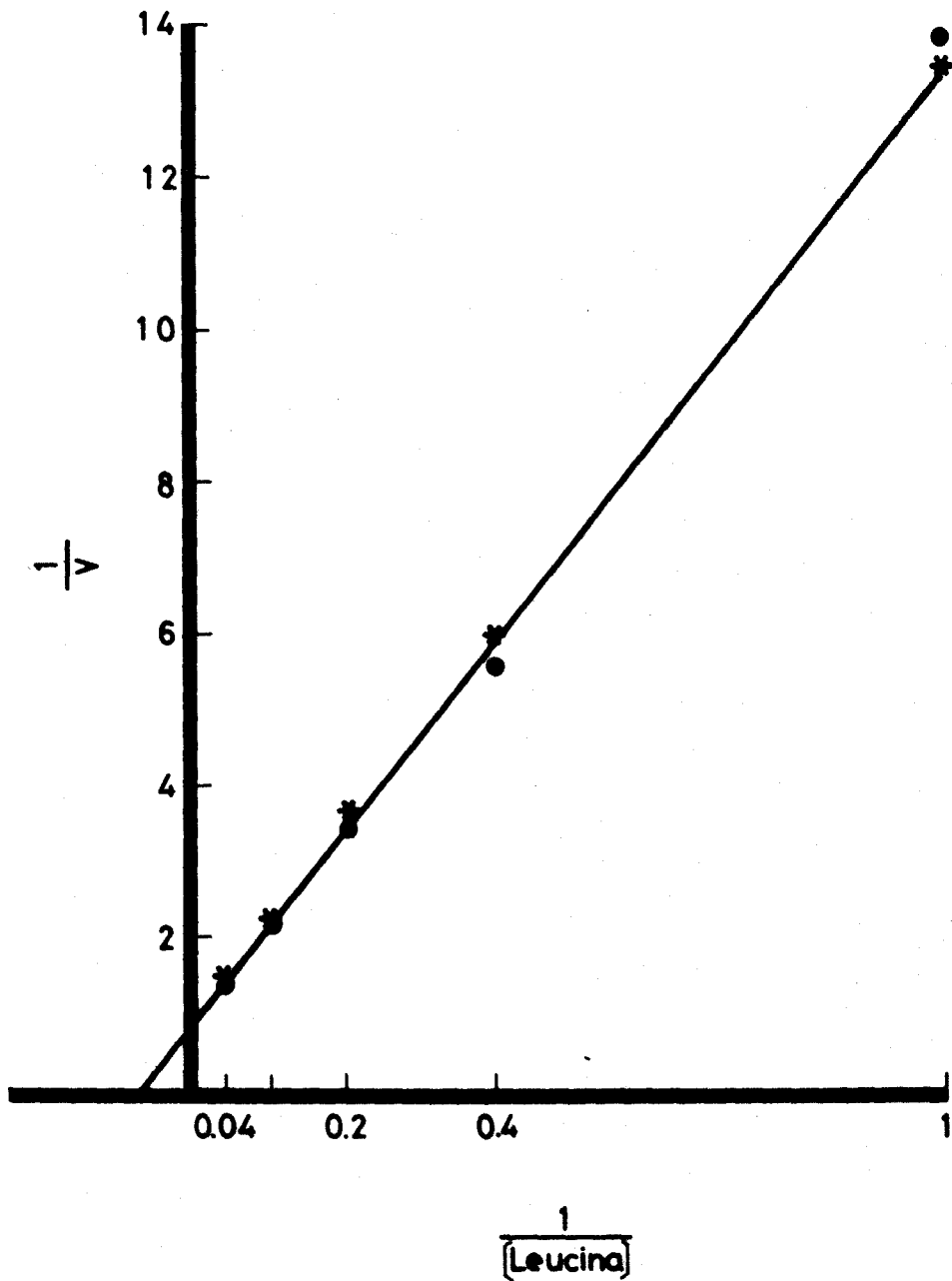


Fig.10

Representación de los dobles inversos para el transporte activo de L-Leucina, en ratas control (●) y reseccionadas (*).

IV.8.- ABSORCION DE L-CICLOLEUCINA EN RATAS PATRO-
NES Y RESECCIONADAS, EN FUNCION DE SU CON-
CENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION.

Siguiendo la línea de trabajo iniciada, parecía interesante estudiar la absorción de un aminoácido como la L-Cicloleucina, que no es metabolizable. Se ha usado un protocolo idéntico a las anteriores ocasiones, es decir, concentraciones de L-Cicloleucina en el medio de perfusión, entre 1 y 50 mM. Los resultados se encuentran en las Tablas 19 y 21, y en las Figuras 11 y 12, para ratas patrón y con resección de intestino delgado distal respectivamente.

En ambos casos, se produce un aumento progresivo de la absorción del aminoácido a medida que la concentración del mismo se eleva en el medio de perfusión. En los animales operados, se advierten valores superiores a los control, cuando las concentraciones presentes en el medio, son más elevadas (10, 25 y 50 mM).

Se han calculado asimismo, los porcentajes de caída de concentración producidos en las

medidas de perfusión después de los 5 minutos en contacto con la superficie intestinal. En la Tabla 20, están los valores obtenidos en animales control, observándose que a medida que aumenta la concentración de aminoácido en el medio de perfusión, la caída de concentración es menor. Cuando los animales están operados (Tabla 22), se produce también una disminución progresiva del porcentaje, pero menor que en animales intactos.

De los experimentos descritos anteriormente, se deduce que en animales resecados, la absorción de L-Cicloleucina, es similar a los controles cuando la concentración del aminoácido en el medio es baja (1, 2,5 y 5 mM), pero se incrementa en valores superiores de concentración, pasando de 0,798 a 0,913 (10 mM), de 1,640 a 1,930 (25 mM), y de 2,845 a 3,122 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$, cuando la L-Cicloleucina presente en el medio de perfusión, fué 50 mM.

IV.9.- CALCULO DEL COMPONENTE DE DIFUSION EN LA
ABSORCION DE L-CICLOLEUCINA, EN RATAS PA-
TRONES Y RESECCIONADAS.

Utilizando concentraciones de 1 a 25 mM de L-Cicloleucina en el medio de perfusión con o sin L-Metionina 60 mM para estudiar el componente difusivo de la absorción de L-Cicloleucina, se ha comprobado que el método es válido, puesto que la inhibición en presencia de L-Metionina, se produce siguiendo un comportamiento análogo al comprobado con los aminoácidos estudiados anteriormente.

En la Tabla 23, se encuentran los resultados obtenidos en ratas patrón, y en la Tabla 25, los correspondientes a ratas con resección del 50% de intestino delgado distal. Al representar gráficamente dichos valores, se obtuvieron la Figura 13 para ratas patrones, y la Figura 14 para ratas reseçadas.

Los valores de concentración final en los medios de perfusión, se expresan en la Tabla 24 para animales control, y 26 para los intervenidos quirúrgicamente, resultando porcentajes de caída de concentración, siempre inferiores cuando había L-Metionina

en el medio.

En las Figuras 13 y 14, se ha representado gráficamente, tanto los datos de absorción total, como los correspondientes al aminoácido absorbido por difusión, en ratas patrones y resecadas respectivamente. En ambos casos, la curva inferior corresponde a la diferencia entre el transporte total y difusión, a cada una de las concentraciones ensayadas, por tanto, expresan las cantidades de L-Cicloleucina transportadas por un mecanismo activo. Se puede observar en ambas Figuras, la naturaleza saturable del transporte activo de L-Cicloleucina, si bien se advierte cierto retraso en alcanzar la saturación respecto a los aminoácidos estudiados anteriormente.

Los valores de difusión (en presencia de L-Metionina), son lineales en ambos casos (ratas patrón y resecadas), con un coeficiente de regresión de 0,999. Las pendientes de las rectas, nos indican los valores de K_D , que son de 0,058 y 0,069 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/\text{l}$ para animales control y con resección respectivamente.

IV.10.- CALCULO DE LOS PARAMETROS CINETICOS PARA
LA ABSORCION INTESTINAL DE L-CICLOLEUCINA
EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS.

El cálculo de los parámetros cinéticos del componente de transporte activo, se ha hecho mediante la representación de dobles inversos, calculándose la V_{\max} y K_T aparentes a partir de las intersecciones de las rectas resultantes con los ejes de ordenadas y abscisas respectivamente.

Los valores inversos de $|S|$ y V utilizados para el cálculo, se encuentran en la Tabla 27. Se ha representado en la Figura 15, tanto los valores correspondientes a animales control, como a los de resección, pudiéndose advertir, que en ambos casos, el trazado de la recta es muy similar. Se ha calculado un valor de $V_{\max} = 1,16 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$ y una K_T aparente igual a 19 mM.

TABLA 19

ABSORCION TOTAL DE L-CICLOLEUCINA EN FUNCION DE SU
CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION. RATAS PATRONES.

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado

$$V_p = 5,6 \text{ ml/min. Datos en } \mu\text{mol/cm}^2/5'$$

Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Cicloleucina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
492	21,45	0,092	0,266	0,432	0,648	1,330	2,339
		0,083	0,256	0,448	0,594	1,206	2,183
508	16,83	0,114	0,204	0,404	0,713	1,733	2,859
		0,097	0,228	0,364	0,623	1,500	2,213
501	15,18	0,161	0,339	0,590	0,849	1,688	3,799
		0,153	0,330	0,650	0,956	1,877	3,552
477	14,82	0,138	0,334	0,548	0,907	2,255	3,483
		0,117	0,267	0,486	0,986	1,765	3,222
511	11,70	0,143	0,308	0,557	0,869	1,616	2,832
		0,117	0,282	0,556	0,833	1,426	1,971
\bar{x}		0,121	0,281	0,504	0,798	1,640	2,845
ϵ		0,008	0,014	0,028	0,045	0,094	0,205
n		10	10	10	10	10	10

TABLA 20

CONCENTRACIONES FINALES DE L-CICLOLEUCINA CORRESPONDIENTES

A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 19

Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Cicloleucina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
492	21,45	0,87	2,12	4,38	9,07	23,10	46,66
		0,88	2,13	4,36	9,15	23,27	46,88
508	16,83	0,87	2,27	4,55	9,20	23,06	46,79
		0,89	2,24	4,59	9,30	23,32	47,52
501	15,18	0,84	2,16	4,40	9,14	23,29	46,20
		0,85	2,17	4,34	9,03	23,12	46,41
477	14,82	0,86	2,16	4,46	9,10	22,77	46,56
		0,88	2,23	4,52	9,03	23,26	46,82
511	11,70	0,89	2,26	4,57	9,32	23,74	47,79
		0,91	2,28	4,56	9,35	23,89	48,46
\bar{x}		0,87	2,20	4,47	9,17	23,28	47,00
ϵ		0,01	0,02	0,03	0,04	0,10	0,22
n		10	10	10	10	10	10
% caída de concentración		13	12	10,6	8,3	6,9	6

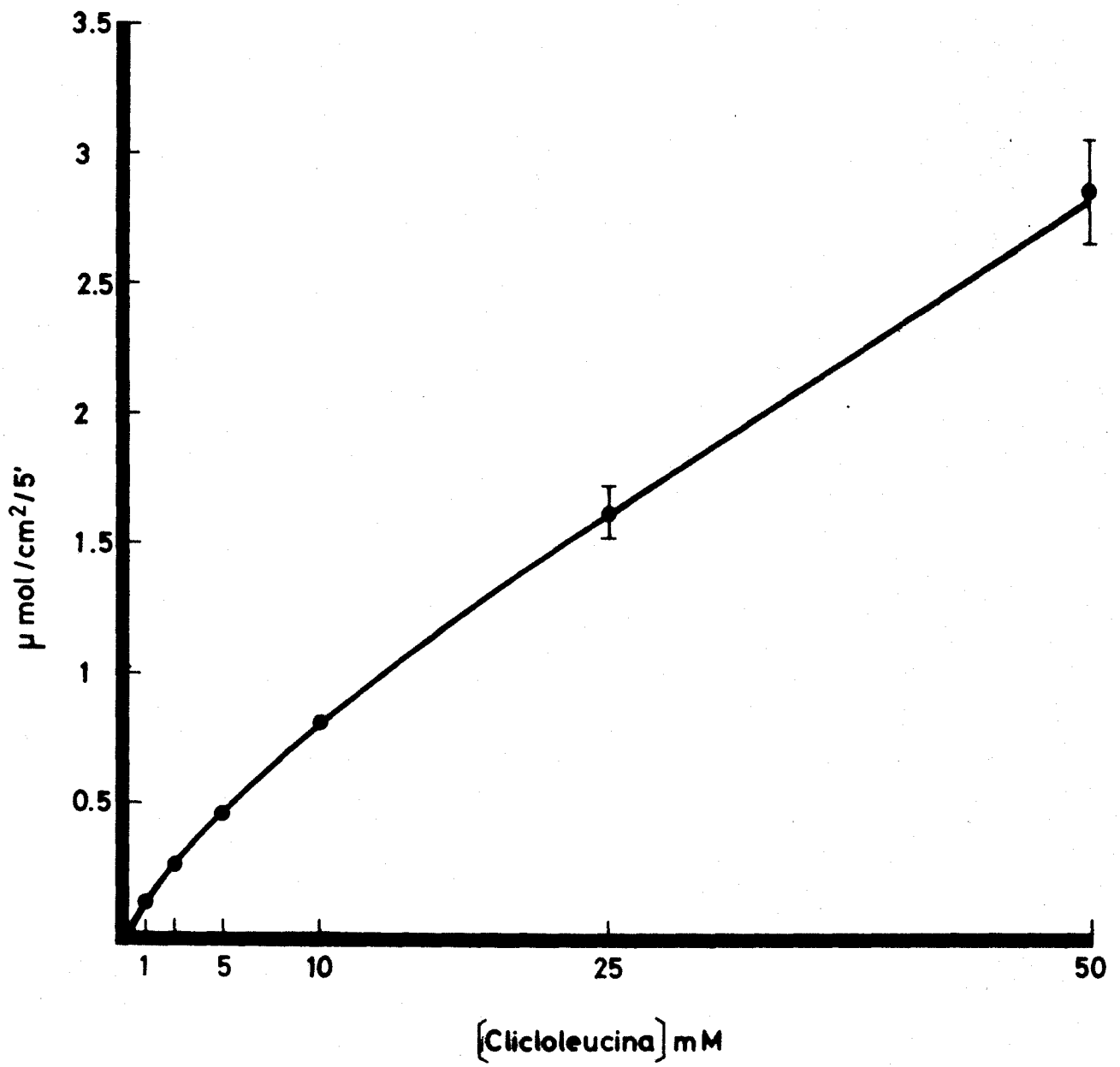


Fig. 11

Absorción total de L-Cicloleucina, en función de la concentración.
Ratas patrones.

TABLA 21

ABSORCION TOTAL DE L-CICLOLEUCINA EN FUNCION DE SU
CONCENTRACION EN EL MEDIO DE PERFUSION. RATAS RESECCIONADAS

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reci-
clado, $V_p = 5,6$ ml/min. Datos en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$.

Peso (g)	Asa (cm^2)	L-Cicloleucina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
483	23,04	0,105	0,237	0,401	0,841	1,581	2,902
		0,092	0,209	0,434	0,840	1,451	2,354
373	21,60	0,083	0,210	0,403	0,776	1,801	2,877
		0,084	0,211	0,404	0,729	1,618	2,395
456	19,47	0,151	0,322	0,589	1,113	2,535	4,011
		0,130	0,338	0,591	1,033	2,265	2,952
351	17,16	0,122	0,283	0,519	0,998	2,146	3,659
		0,107	0,271	0,507	0,863	1,700	2,311
392	16,50	0,159	0,339	0,615	1,047	2,161	4,178
		0,144	0,310	0,568	0,888	2,044	3,584
\bar{x}		0,117	0,273	0,503	0,913	1,930	3,122
ϵ		0,008	0,017	0,027	0,040	0,111	0,219
n		10	10	10	10	10	10

TABLA 22

CONCENTRACIONES FINALES DE L-CICLOLEUCINA EN mM

CORRESPONDIENTES A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 21

Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Cicloleucina mM					
		1	2,5	5	10	25	50
483	23,04	0,84	2,14	4,38	8,71	22,57	45,54
		0,86	2,18	4,33	8,71	22,77	46,38
373	21,06	0,88	2,20	4,42	8,88	22,41	45,86
		0,87	2,20	4,42	8,95	22,67	46,55
456	19,47	0,80	2,08	4,24	8,56	21,71	44,79
		0,83	2,06	4,23	8,66	22,06	46,17
351	17,16	0,86	2,18	4,41	8,86	22,54	45,81
		0,88	2,19	4,42	9,01	23,06	47,36
392	16,50	0,82	2,13	4,32	8,85	22,62	45,40
		0,84	2,16	4,38	9,02	22,75	46,06
\bar{x}		0,85	2,15	4,36	8,82	22,52	45,99
ξ		0,01	0,02	0,02	0,05	0,12	0,22
n		10	10	10	10	10	10
% caída de concentración		15	14	12,8	11,8	9,9	8,0

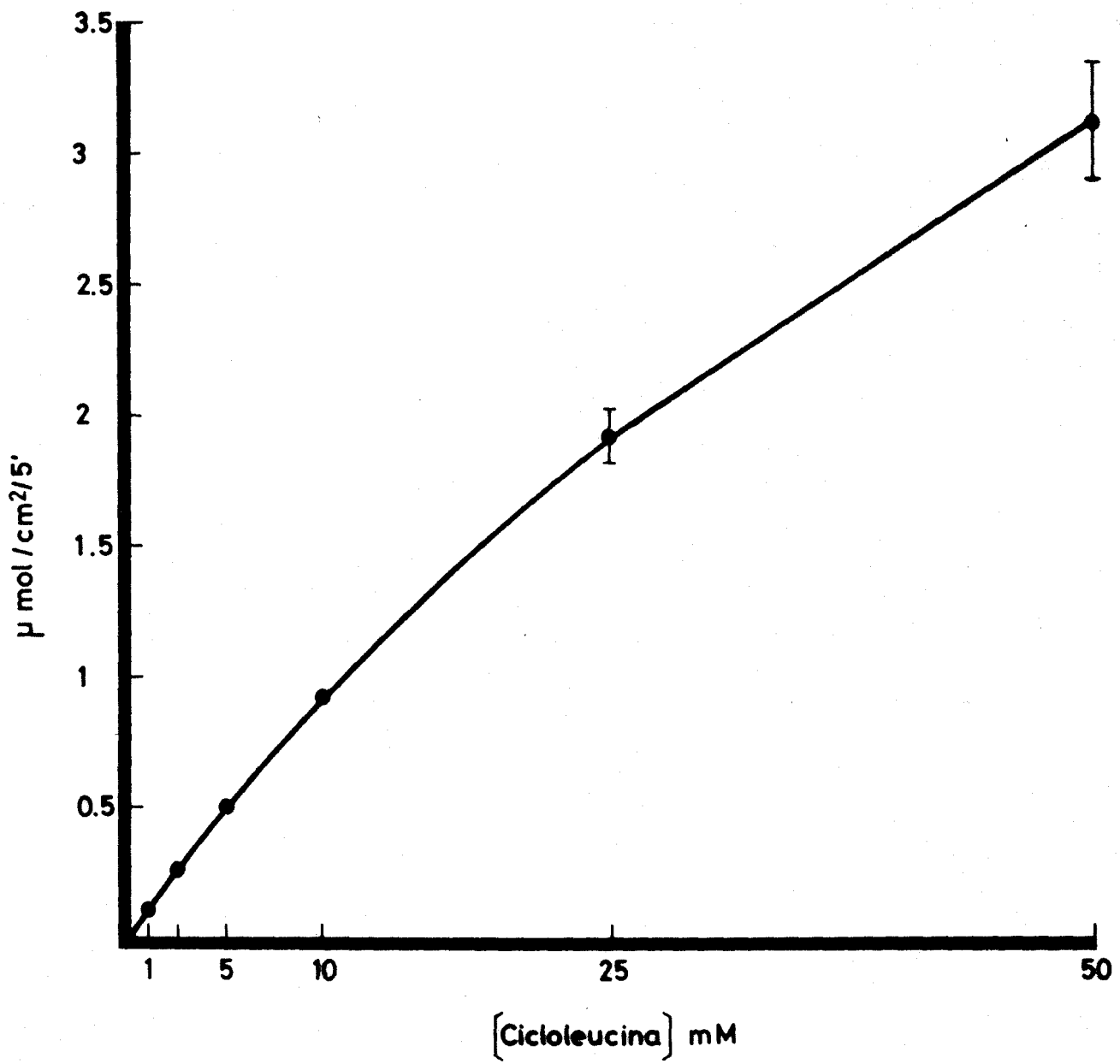


Fig. 12

Absorción total de L-Cicloleucina, en función de la concentración.
Ratas reseccionadas.

TABLA 23

ABSORCION DE L-CICLOLEUCINA. EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE L-METIONINA 60 mM
EN FUNCION DE SUS CONCENTRACIONES EN EL MEDIO DE PERFUSION. RATAS PATRONES

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado

$$V_p = 5,6 \text{ ml/min. Datos en } \mu\text{mol/cm}^2 / 5'$$

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Cicloleucina mM					L-Cicloleucina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
447	14,40	0,156	0,401	0,660	1,140	2,537	0,086	0,177	0,405	0,771	1,635
527	17,16	0,103	0,243	0,534	0,749	2,291	0,059	0,157	0,343	0,529	---
485	18,60	0,121	0,304	0,523	0,908	2,287	0,068	0,173	0,321	0,614	1,785
454	18,48	0,125	---	---	---	---	0,074	---	---	---	---
437	17,82	0,132	0,285	0,475	0,857	2,507	0,066	0,177	0,371	0,733	1,760
455	18,00	0,130	0,275	0,491	0,868	1,882	0,051	0,142	0,336	0,553	1,222
596	10,50	0,127	0,362	0,620	1,255	2,282	0,087	0,161	0,270	---	1,204
535	10,80	---	---	---	---	1,454	---	---	---	---	---
516	13,20	0,128	---	0,553	1,193	2,654	0,077	0,154	0,367	0,769	1,218
	\bar{x}	0,128	0,311	0,551	0,996	2,236	0,071	0,163	0,344	0,661	1,470
	ξ	0,005	0,024	0,025	0,074	0,139	0,004	0,005	0,016	0,044	0,116
	n	8	6	7	7	8	8	7	7	6	6

TABLA 24

CONCENTRACIONES FINALES DE L-CICLOLEUCINA CORRESPONDIENTES
A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 23

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Cicloleucina mM					L-Cicloleucina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
447	14,40	0,85	2,12	4,37	8,90	22,56	0,92	2,33	4,61	9,26	23,43
527	17,16	0,88	2,22	4,38	9,14	22,71	0,93	2,32	4,60	9,39	---
485	18,60	0,85	2,12	4,35	8,87	22,16	0,92	2,29	4,60	9,24	23,21
454	18,48	0,85	----	----	----	---	0,91	----	----	----	---
437	17,82	0,84	2,16	4,44	8,98	22,02	0,92	2,29	4,56	9,13	22,91
455	18,00	0,84	2,17	4,41	8,96	22,74	0,94	2,33	4,60	9,34	23,53
596	10,50	0,91	2,25	4,57	9,12	23,40	0,94	2,39	4,81	----	24,16
535	10,80	----	----	----	----	23,95	----	----	----	----	---
516	13,20	0,89	----	4,51	8,95	22,66	0,93	2,36	4,68	9,32	23,93
	\bar{x}	0,86	2,17	4,43	8,99	22,78	0,92	2,33	4,64	9,28	23,53
	ϵ	0,01	0,02	0,03	0,04	0,22	0,003	0,01	0,03	0,04	0,19
	n	8	6	7	7	8	8	7	7	6	6
	% caída de concentración	14,0	13,2	11,4	10,1	8,9	8,0	6,8	7,2	7,2	5,9

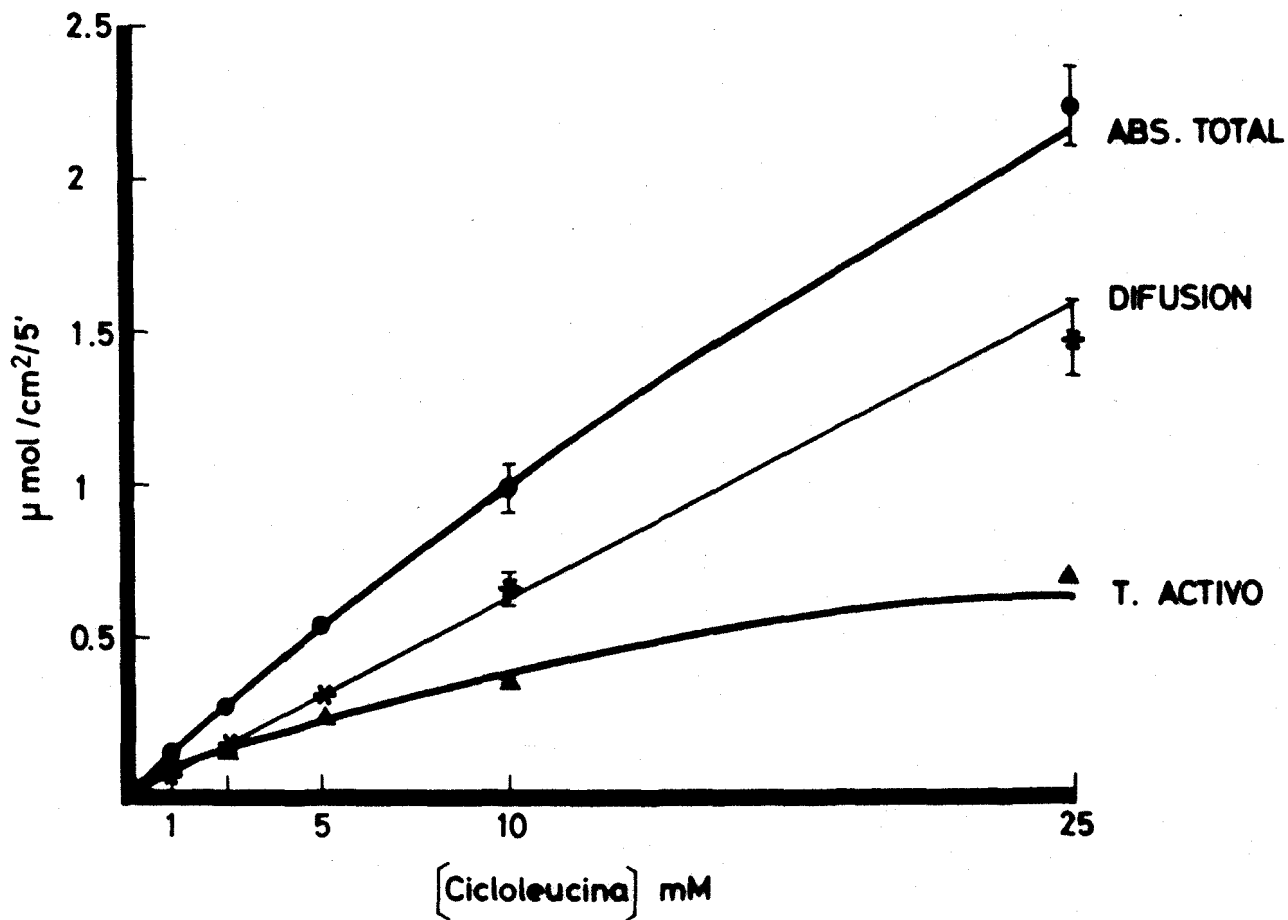


Fig. 13

Cinética de la absorción intestinal in vivo, de L-Cicloleucina en ratas patrones.

● Absorción total

* Absorción en presencia de L-Metionina 60 mM = Difusión

▲ Transporte activo

TABLA 25

ABSORCION DE L-CICLOLEUCINA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE L-METIONINA 60 mM
 EN FUNCION DE SUS CONCENTRACIONES EN EL MEDIO DE PERFUSION. RATAS RESECCIONADAS

Periodos de absorcion de 5 min. Perfusión con reciclado

$V_p = 5,6$ ml/min. Datos en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$

141

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Cicloleucina mM					L-Cicloleucina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
431	14,85	0,139	0,376	0,715	1,328	---	0,072	0,229	0,403	0,744	1,911
340	14,10	0,130	0,334	0,664	1,376	3,229	0,059	0,194	0,410	0,850	1,888
279	11,09	0,113	0,251	0,669	1,172	2,164	---	0,102	---	---	---
432	19,47	0,116	0,287	0,517	0,952	2,435	0,053	0,167	0,355	---	---
343	15,84	0,119	0,254	0,526	1,083	2,658	0,055	0,185	0,362	0,659	1,436
433	16,17	0,089	---	0,492	1,346	2,355	0,056	0,129	0,378	0,760	1,655
	\bar{x}	0,117	0,300	0,597	1,196	2,568	0,059	0,167	0,381	0,753	1,722
	ξ	0,006	0,024	0,039	0,075	0,183	0,003	0,017	0,011	0,039	0,111
	n	6	5	6	6	5	5	6	5	4	4

TABLA 26

CONCENTRACIONES FINALES DE L-CICLOLEUCINA CORRESPONDIENTES
A LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 25

Peso (g)	Asa (cm ²)	Sin Metionina					Con Metionina				
		L-Cicloleucina mM					L-Cicloleucina mM				
		1	2,5	5	10	25	1	2,5	5	10	25
431	14,85	0,86	2,13	4,29	8,69	----	0,93	2,27	4,60	9,26	23,11
340	14,10	0,88	2,19	4,36	8,71	21,96	0,94	2,32	4,61	9,20	23,22
279	11,09	0,92	2,31	4,50	9,13	23,40	----	2,42	----	----	---
432	19,47	0,85	2,13	4,33	8,76	21,84	0,93	2,28	4,54	9,22	---
343	15,84	0,87	2,23	4,44	8,94	22,19	0,94	2,30	4,62	9,30	23,48
433	16,17	0,90	----	4,47	8,55	22,27	0,94	2,36	4,59	9,18	23,22
	\bar{x}	0,88	2,20	4,40	8,80	22,33	0,94	2,33	4,59	9,23	23,26
	ξ	0,01	0,03	0,03	0,08	0,28	0,002	0,02	0,01	0,05	0,08
	n	6	5	6	6	5	5	6	5	5	4
	% caída de concentración	12,0	12,0	12,0	12,0	10,7	6,0	6,8	8,2	7,7	6,9

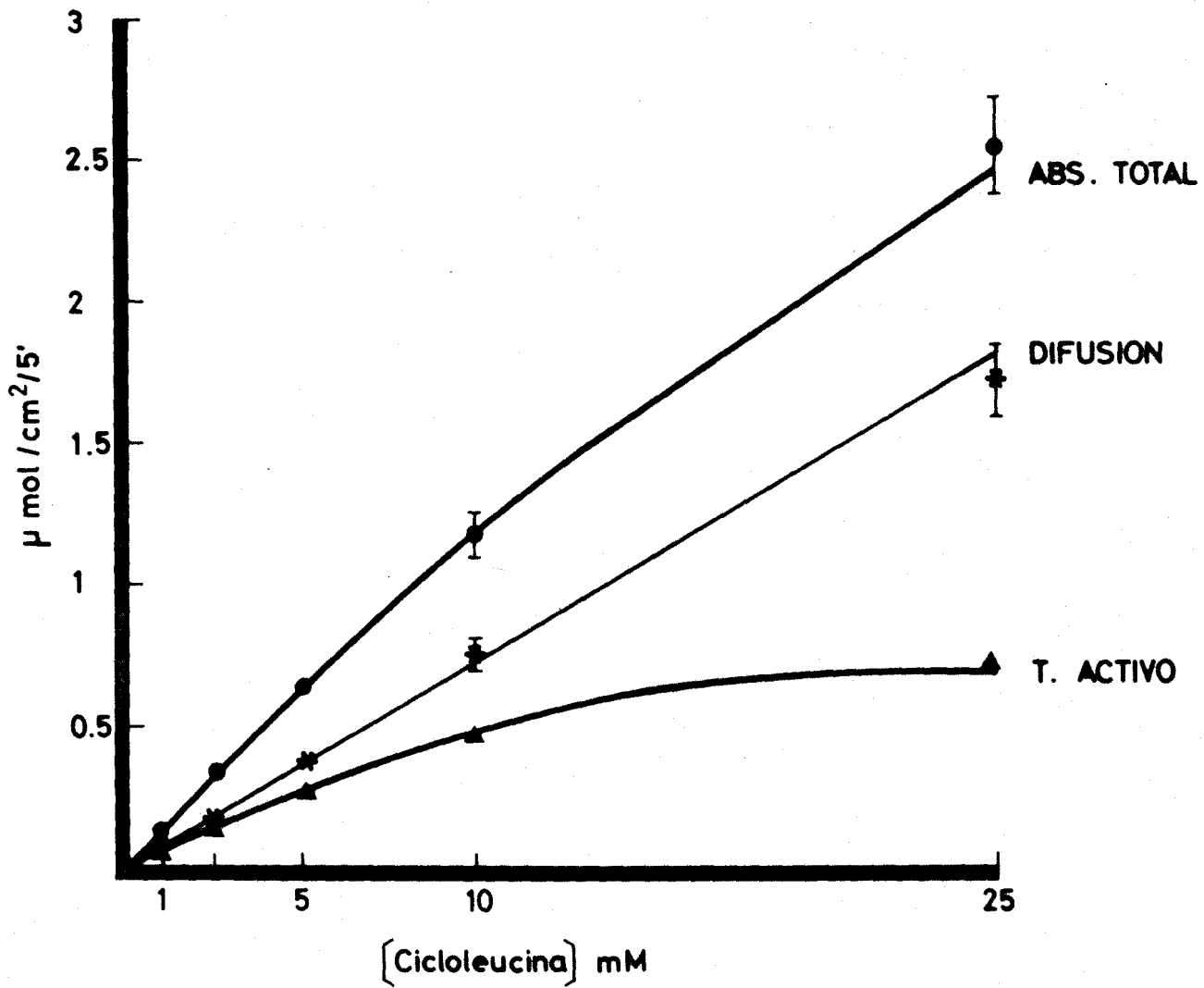


Fig. 14

Cinética de la absorción intestinal in vivo, de L-Cicloleucina en ratas reseccionadas.

● Absorción total

* Absorción en presencia de L-Metionina 60 mM = Difusión

▲ Transporte activo

TABLA 27

VALORES MEDIOS DE ABSORCION TOTAL, DIFUSION Y TRANSPORTE ACTIVO DE L-CICLOLEUCINA
EN RATAS PATRONES Y RESECCIONADAS.

Periodos de absorción 5 min. Perfusión con reciclado. $V_p = 5,6$ ml/min. Datos en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$

mM	Patrones					Reseccionadas				
	Absor.Total	Difusión	T.activo	1/V	1/ S	Absor.Total	Difusión	T.Activo	1/V	1/ S
1	0,128 \pm 0,005 (8)	0,071 \pm 0,004 (8)	0,057	17,5	1	0,117 \pm 0,006 (6)	0,059 \pm 0,003 (5)	0,058	17,2	1
2,5	0,311 \pm 0,024 (6)	0,163 \pm 0,005 (7)	0,148	6,7	0,4	0,300 \pm 0,024 (5)	0,167 \pm 0,017 (6)	0,133	7,5	0,4
5	0,551 \pm 0,025 (7)	0,344 \pm 0,016 (7)	0,207	4,8	0,2	0,597 \pm 0,039 (6)	0,381 \pm 0,011 (5)	0,216	4,6	0,2
10	0,996 \pm 0,074 (7)	0,661 \pm 0,044 (6)	0,335	3,0	0,1	1,196 \pm 0,075 (6)	0,753 \pm 0,039 (4)	0,443	2,2	0,1
25	2,236 \pm 0,139 (8)	1,470 \pm 0,116 (6)	0,766	1,3	0,04	2,568 \pm 0,183 (5)	1,722 \pm 0,111 (4)	0,846	1,2	0,04

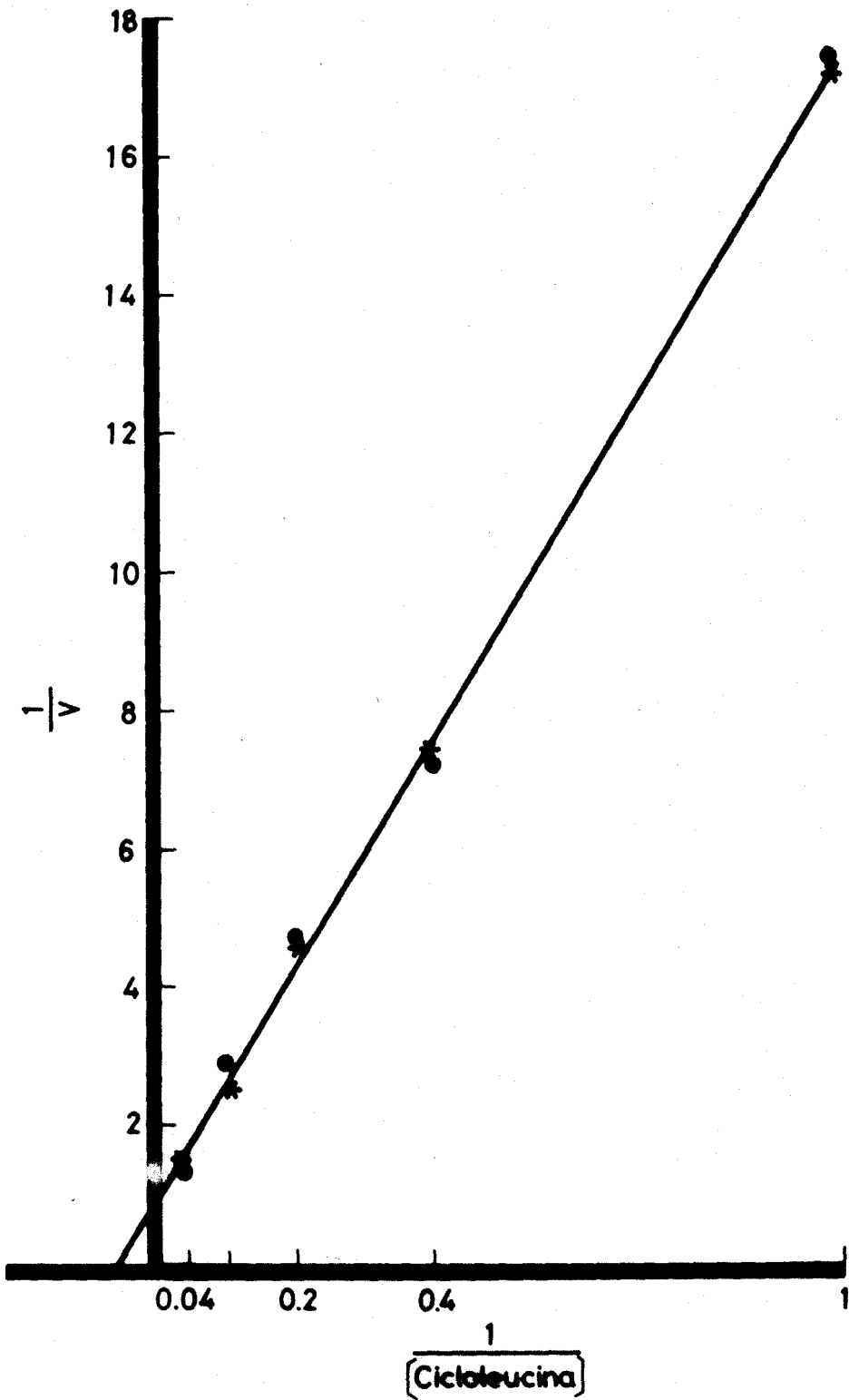


Fig. 15

Representación de los dobles inversos para el transporte activo de L-Cicloleucina, en ratas control (●) y reseccionadas (*).

IV-11.- ESTUDIO DE LA DIFUSION TRANSCELULAR Y PARACELULAR
DE L-FENILALANINA EN RATAS CONTROL Y RESECADAS.

Se ha iniciado el estudio de la influencia que la resección intestinal pudiera tener sobre la difusión trans y paracelular, partiendo de la base de que en presencia de 2,4,6 Triaminopirimidina (TAP), decrece el paso de sustancias a través de las uniones estrechas, sin que tenga ningún efecto en el transporte transcelular (129)(138)(139).

Para ello, se han llevado a cabo experimentos con L-Fenilalanina 10 mM y L-Metionina 60 mM en el medio de perfusión. Alternativamente se añadía o no TAP 20 mM al medio. Los resultados obtenidos, con ratas patrón y resecadas se expresan en las Tablas 28 y 29. Como se observa en la Tabla 29, la difusión transcelular fué de 0,46 y 0,32 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$ en las ratas patrón y resecadas respectivamente, lo cual indica que la difusión paracelular es alrededor de un 43% (patrones) y 61% (reseccionadas) de la difusión total.

TABLA 28

ABSORCION DE L-FENILALANINA (10 mM)
 EN PRESENCIA DE L-METIONINA (60 mM), CON Y SIN INCLUSION
 DE T A P (20 mM) EN EL MEDIO DE PERFUSION,
 EN RATAS PATRONES Y CON RESECCION

Periodos de absorción de 5 min. Perfusión con reciclado.

$$V_p = 5,6 \text{ ml/min. Datos en } \mu\text{mol/cm}^2/5'$$

	Peso (g)	Asa (cm ²)	L-Fenilalanina 10mM + L-Metionina 60mM	
			Sin TAP	Con TAP (20 mM)
PATRONES	479	6,0	1,00	0,56
	530	8,4	0,73	--
	492	7,5	0,93	0,31
			0,60	0,52
RESECCIONADAS	423	6,9	0,97	0,32
	470	7,2	0,87	0,16
			0,70	0,19
	411	8,1	1,10	0,38
			0,68	0,54
			0,68	--

TABLA 29

VALORES MEDIOS DE DIFUSION TOTAL , TRANSCELULAR Y
 PARACELULAR DE L-FENILALANINA, CORRESPONDIENTES A
 LOS EXPERIMENTOS DE LA TABLA 28

Dif. paracelular = Dif. total - Dif. transcelular

$\mu\text{mol L-Fenilalanina/cm}^2/5'$

Animales	Difusión	TAP 20 mM	
		Dif. Transcelular	Difusión Paracelular
Patrones	0,81 \pm 0,09 (4)	0,46 \pm 0,07 (3)	0,35
Resecadas	0,83 \pm 0,07 (6)	0,32 \pm 0,06 (5)	0,51

DISCUSSION

V.- DISCUSION

V.1.- METODOLOGIA

La técnica de absorciones sucesivas(196) con la introducción de un sistema de perfusión continuada (160), consigue una situación más fisiológica y asegura una mayor constancia en la concentración de sustrato, lo que hace más fiables los estudios cinéticos de la absorción. Este método ha sido aplicado, con resultados satisfactorios, en estudio de azúcares (160) y aminoácidos (213).

La absorción de los aminoácidos, in vivo, es menor que la de azúcares activamente transportados (unas 10 veces menor); esto hace que haya que utilizar una velocidad y tipo de perfusión adecuados. Una velocidad de perfusión alta, produce una mayor absorción por cm^2 que otra menor, debido a que disminuye el espesor de las capas no agitadas, pero si es demasiado alta puede llegar a lesionar el epitelio, y además, la caída de concentración de sustrato es tan pequeña, que puede ser difícil de detectar. Esto se evita, por un lado escogiendo

una velocidad de perfusión intermedia, de 5,6 ml/min. y por otro, utilizando un circuito de perfusión con reciclado y un tiempo de absorción de 5 minutos, con lo que se consigue que la caída de concentración de sustrato, debida a su absorción, sea medible. El volumen inicial era de 15 ml y teniendo en cuenta la velocidad y el tiempo de perfusión, se deduce que todo el líquido pasa varias veces por el asa intestinal durante cada periodo de perfusión. Otra ventaja es que la regulación de la temperatura del líquido al entrar en el asa intestinal, es más fácil que si la velocidad fuese menor, ya que en este último caso, la solución de perfusión se enfría más.

Las variaciones de volumen durante la perfusión, se calcularon por pesada, y en general dieron resultados inferiores al 4% del volumen inicial, tanto en un sentido como en otro, y los cálculos hechos teniendo en cuenta la corrección del volumen final, daban valores menos homogéneos, por lo que no se tuvieron en cuenta y no se incluyen en esta memoria. ANTONIOLI y col. (7), midiendo movimientos de agua con rojo fenol, obtuvieron un aumento en su concentración del 20% en

experimentos con reciclado de 60 minutos de duración.

Se ha descrito la existencia de un ritmo circadiano en la absorción de azúcares (60) (135), por lo cual, hemos realizado el experimento siempre a la misma hora, entre las 8 y las 11 de la mañana, con el fin de obtener unos resultados más homogéneos y reducir las posibles modificaciones debidas al cambio horario.

Los valores de absorción obtenidos con ratas control, son comparables a los obtenidos por otros autores (7) (213) en condiciones similares, y superiores a los obtenidos por GREEN y col. (69), quizás porque estos autores utilizan todo el intestino delgado, y de este modo, no distinguen las diferencias de absorción que existen entre las zonas del intestino delgado (218).

V.2.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Los resultados de absorción intestinal in vivo, obtenidos por distintos autores, se han expresado de muy distintas maneras. CORI (28)

utilizó un coeficiente de absorción definido como la cantidad absorbida/100g de peso corporal/hora, lo cual implica una proporcionalidad entre superficie mucosal y peso corporal, que solo es comparable en un rango muy estrecho de peso. También se han expresado en relación con el peso del tejido, fresco o seco (67), longitud del intestino (112)(102) (203)(48), peso de la mucosa raspada (192), área de la serosa (84), cantidad absorbida por todo el intestino (104), porcentaje absorbido (93).

Un término bastante aceptado, es la de "longitud fisiológica" que se representa por la expresión $I_{30g} \times 0,6$, donde I_{30g} es la longitud del asa intestinal perfundida, separada del cuerpo y de la que pende un peso de 30g, con lo que se evita la variabilidad del asa in situ, por cambios del tono muscular. El factor 0,6 es arbitrario, calculado por relación entre I_{30g} y la longitud del asa intestinal en condiciones fisiológicas (216)(160).

Sin embargo, cuando se estudia la absorción intestinal en animales en los que, por cual-

quier motivo, se ha producido una hipertrofia o hiperplasia intestinal, este método podría inducir a error, pues a igual longitud, puede darse distinta superficie. En estos casos, se hace necesario calcular la superficie serosal, el peso húmedo y el peso seco, refiriéndolo tanto a unidad de longitud, como a unidad de superficie, y de acuerdo con los resultados obtenidos, elegir la expresión más acertada y con menor error.

En nuestro caso, hemos trabajado con ratas control, y con resección del 50% de intestino delgado distal. Los valores obtenidos en los segmentos intestinales perfundidos, se representan en la Tabla 30.

TABLA 30

	\emptyset (mm)	Peso húmedo mg/cm	Peso húmedo mg/cm ²	Peso seco mg/cm	Peso seco mg/cm ²
Control	3,1	99	99	19,5	19,5
Resección 50%	3,5	112	102	22,8	20,8

Puede observarse que al referir el peso del intestino húmedo y seco / unidad de longitud, existe una cierta variabilidad, que se reduce casi completamente al expresarlo por unidad de superficie. Dado que tanto el peso húmedo como el seco, son un buen índice de la superficie mucosal, es decir, de la altura de las vellosidades, y teniendo en cuenta los resultados prácticamente idénticos, obtenidos al referirlos a unidad de superficie, se eligió como mejor modo de expresión de los resultados, la cantidad de sustrato absorbida por cm^2 durante todo el periodo de perfusión, es decir, los $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$.

V.3.- VELOCIDAD DE ABSORCION DE LOS AMINOACIDOS. EFFECTOS DE LA RESECCION INTESTINAL.

La absorción total de los tres aminoácidos estudiados, representada frente a las concentraciones iniciales de sustrato en el líquido de perfusión presenta, tanto en las ratas patrones como en las reseccadas, un trazado típico, que consiste en un primer tramo más o menos curvo, que se hace recto con las concentraciones más altas de sustrato (Fig. 1, 2, 6, 7, 11 y 12).

El tramo curvo indica la existencia de un componente saturable, atribuible a un componente activo, similar a los descritos in vitro, con cinética de saturación y capacidad de acumulación activa. El tramo recto de la gráfica, con concentraciones altas de sustrato, indica que la absorción total no es saturable, incluso con las concentraciones más altas utilizadas en este trabajo, que exceden de las que se dan en condiciones fisiológicas tras la digestión de los nutrientes. Este componente, es debido a difusión pasiva, sin que pueda descartarse a priori un sistema de difusión facilitada de alta capacidad.

La curva de absorción de fenilalanina, presenta un tramo curvo entre las concentraciones 1 y 25 mM, pasando a ser lineal con concentraciones superiores (Fig. 1). Los resultados obtenidos concuerdan con otros realizados en condiciones similares (7)(213)(241)(155). La resección proximal, produce un aumento de la absorción total, expresada en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ superficie serosal/5', que empieza a ser patente con concentraciones de sustrato de 5 mM, y se hace mayor a concentraciones superiores (Fig. 2).

La curva obtenida cuando el sustrato era leucina, puede observarse en la Fig. 6. Es semejante a la obtenida por la fenilalanina, aunque los valores de absorción son algo más bajos. También se observa que el componente saturable es más marcado, estableciéndose la linealidad a una concentración menor. Resultados semejantes han sido descritos por otros autores (212).

La resección del 50% de intestino delgado distal, no produce una variación significativa en la absorción total, a concentraciones bajas (1, 2,5, 5 y 10 mM), sin embargo, hay un aumento significativo a concentraciones mayores (25 y 50 mM)(Fig. 7).

En el caso de la cicloleucina (Fig. 11), la curva de absorción total, presenta un componente saturable menor que el de la leucina, estableciéndose antes la linealidad. Por otra parte, los valores de absorción son menores a concentraciones de 2,5, 5 y 10 mM, y mayores a las concentraciones de 25 y 50 mM, produciéndose el cruce de las curvas a una concentración alrededor de 20 mM, lo que sugiere que o bien su sistema de transporte

tiene mayor capacidad, o bien el componente de difusión pasiva es mayor.

La resección intestinal produce un aumento de la absorción total de cicloleucina que es significativo desde la concentración 10 mM, aumentando a 25 y 50 mM (Fig. 12).

V.4.- DETERMINACION DEL COMPONENTE NO SATURABLE MEDIANTE LA INHIBICIÓN POR L-METIONINA.

Los azúcares, pueden ser inhibidos competitivamente por floricina, que presenta una elevada afinidad, anulando totalmente su transporte mediado. Sin embargo, no se conoce ningún inhibidor semejante del transporte de los aminoácidos neutros.

Una posibilidad para suprimir el transporte mediado de aminoácidos, sería eliminar el ión sodio, pero esto es prácticamente imposible in vivo, e incluso con harmalina, inhibidor competitivo del transporte de Na^+ (69)(196)(197), no se observa disminución en la absorción (212).

Por estas razones se ha elegido el aminoácido L-metionina como inhibidor competitivo, pues está descrito en la bibliografía como uno de los que más afinidad tiene por los sistemas de transporte de los aminoácidos neutros, tanto in vitro (161)(143) (189), como in vivo (143)(213). Se ha utilizado una concentración de 60 mM para tener seguridad en la inhibición del transporte saturable.

El hecho de que en todos los aminoácidos estudiados, la pendiente de la recta de absorción en presencia de L-Metionina, sea igual o menor que la pendiente de la recta de absorción total con altas concentraciones, indica que la metionina bloquea el transporte activo. Esta pendiente, obtenida en presencia de metionina, permite calcular la constante K_D , cuyas unidades son: velocidad de absorción/concentración, es decir, $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$. Esta constante guarda relación directa con la difusión de los aminoácidos desde el borde mucosal hasta la sangre, tanto por rutas celulares como paracelulares.

La K_D calculada en presencia de metionina, sería igual al componente pasivo de la absorción

control en ausencia de capas no agitadas. Según WINNE (237), en presencia de capas no agitadas, el componente pasivo de la absorción total, es siempre menor que el obtenido en presencia de un inhibidor, ya que en el estado estacionario, S_m , será mayor en presencia que en ausencia de metionina, porque el transporte activo -2-, está inhibido (Fig. 18). Sin embargo, el estado estacionario que se establece con y sin metionina, es diferente, porque en ausencia de metionina, el gradiente $S_o - S_m$, será mayor y hará que el sustrato desde la fase libre, atraviese las capas no agitadas a mayor velocidad, -1-. Si además, parte de la difusión se da por la vía paracelular, la competencia entre difusión y transporte activo tendrá menos importancia. Por todo ello, la difusión en presencia de metionina se puede considerar como el exponente del componente pasivo.

Como puede observarse en las Fig. 3, 8 y 13, en las ratas control, el componente difusivo es importante, incluso a concentraciones relativamente bajas de sustrato en la luz intestinal. Concretamente, entre 2,5 y 5 mM, el 50% de la absorción total, se realiza por difusión, y es de

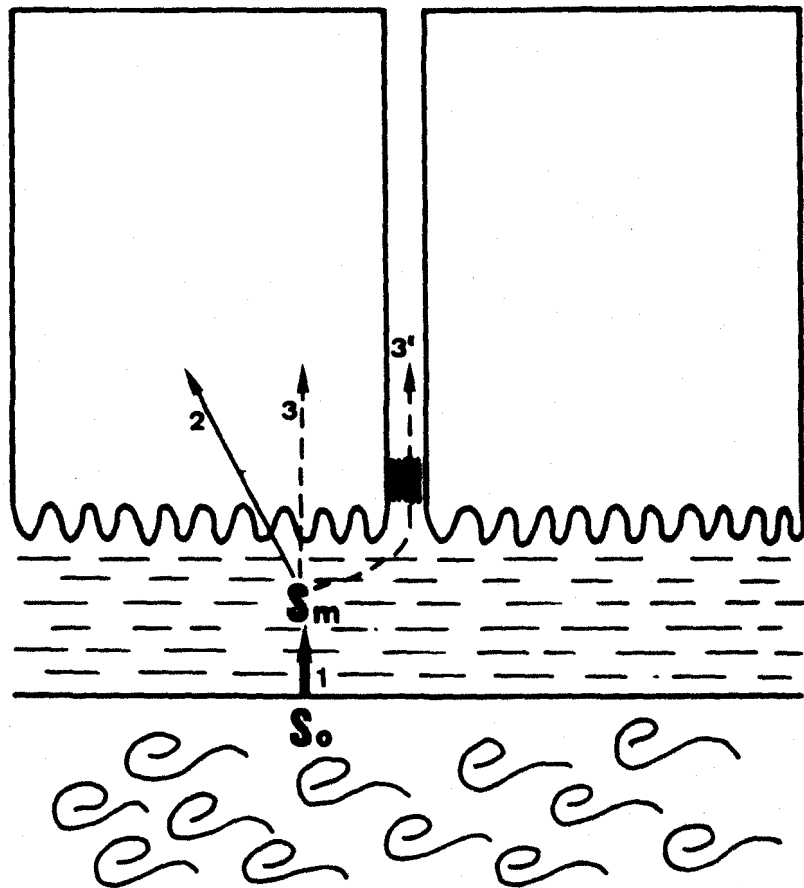


fig. 18

- 1.- Difusión a través de las capas no agitadas
 - 2.- Transporte activo
 - 3.- Difusión transcelular
 - 3'- Difusión paracelular
- S_o - Concentración de sustrato en la fase libre
- S_m - Concentración de sustrato en contacto con el borde en cepillo

suponer que después de las comidas, en el duodeno y yeyuno, las concentraciones de aminoácidos sean de este orden. Como la concentración de aminoácidos individuales en sangre de rata oscila de 0,08-0,17 mM (219), existe un gradiente de concentración favorable a la entrada de aminoácidos a través del intestino.

Los datos de difusión en animales control obtenidos a varias concentraciones, muestran una buena linealidad, con la recta pasando por el origen de coordenadas, y un coeficiente de correlación significativo. Las pendientes de estas rectas, como hemos dicho, nos permiten calcular las K_D , que son: 0,060 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para la fenilalanina (Fig. 3), 0,065 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para la leucina (Fig. 8), y 0,058 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para la cicloleucina (Fig. 13), muy similares entre sí.

En ratas con resección intestinal, se produce un aumento del componente de difusión, que se traduce en un aumento de las K_D aparentes, obtenidas de las pendientes de las rectas de regresión resultantes. Los valores de K_D ob-

tenidos, han sido:

0,075 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para la fenilalanina(Fig.4),
0,073 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para la leucina (Fig. 9),y
0,069 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para la cicloleucina(Fig.14).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que en las ratas con resección, el espesor de las capas no agitadas es mayor que en las control por dos motivos:

- 1.- Por ser el diámetro intestinal mayor (3,5 mm frente a 3,1 mm), y dado que la velocidad de perfusión utilizada en todos los casos ha sido la misma (5,6 ml/min), esto implica una disminución en la agitación del líquido de perfusión conforme nos acercamos a la pared de la luz intestinal.
- 2.- Porque en la bibliografía hay coincidencia unánime de que la resección intestinal provoca un aumento en la altura de las vellosidades, que aunque es más patente en la resección proximal, también es demostrable en la resección distal (77) (195), lo cual favorece el aumento de espesor en las capas no agitadas.

En el estado estacionario, es de esperar que la difusión de sustratos a través del intestino, sea igual a la que difunde a través de las capas no agitadas, y si igualamos obtendremos:

$$K_D \cdot S_o = \frac{D}{\delta} (S_o - S_m)$$

Siendo:

S_o = Concentración de sustrato en el líquido de perfusión.

S_m = Concentración de sustrato en contacto con el enterocito.

K_D = Constante de difusión aparente.

D = Coeficiente de difusión del sustrato a través de las capas no agitadas.

δ = Espesor de las capas no agitadas.

En un proceso pasivo, la velocidad de permeación de la mucosa intestinal es una función lineal de S_m , y al aumentar el espesor de las capas no agitadas, la concentración de sustrato en contacto con la membrana se hace menor por aumento de la resistencia de dichas capas. Por esta razón, si las condiciones experimentales no varían, un aumento en el espesor de las capas no agitadas, conduce a una disminución en el valor de las K_D , o lo que es lo mismo, a una subestimación de las K_D aparentes obtenidas experimen-

talmente.

Todo esto nos hace pensar, que las K_D reales de los intestinos remanentes de ratas resecionadas, son todavía mayores que las obtenidas por nosotros. Numerosos trabajos que de modo directo estudian el efecto de las variaciones de espesor en las capas no agitadas sobre parámetros cinéticos de absorción, demuestran este efecto (41)(236)(206)(208)(239)(237).

V. 5.- EFECTO DE LA 2,4,6-TRIAMINOPYRIMIDINA
(TAP), SOBRE LA ABSORCION INTESTINAL
DE AMINOACIDOS.

Se ha postulado que una de las vías de entrada de los azúcares por difusión, en experimentos in vivo, es la ruta paracelular (169), que se situaría a través de las uniones estrechas, ya que se comprobó que eran permeables al agua y a iones pequeños (58). Asimismo, se demostró in vitro, que dichas uniones eran permeables al lantano (110), comprobándose en colon de rata que la permeabilidad a este elemento disminuía por efecto del TAP (198). Otros autores observaron

que el TAP producía una inhibición de la permeabilidad de las uniones estrechas para los cationes, en tejidos como la vesícula biliar, intestino delgado y plexo coroideo (128)(192)(129).

Aunque estudios realizados in vitro parecen concluir que el componente paracelular del transporte de azúcares a través del intestino delgado es muy pequeño (106)(165)(16), recientemente se ha demostrado in vivo (217) que el TAP es capaz de inhibir la difusión pasiva de D-glucosa un 32%, por lo que si se asume que a la concentración de TAP utilizada se impermeabilizan totalmente las uniones estrechas, se podría predecir que el 32% de la difusión pasiva de glucosa se realizaría por la vía paracelular.

ANTONIOLI y col. (7), al estudiar la cinética de absorción de los aminoácidos fenilalanina y lisina, in vivo, comprueban que en el primero, el componente pasivo es muy importante, lo cual concuerda con nuestros resultados, mientras que la absorción de lisina sería debida casi exclusivamente a un proceso saturable. Los mismos resultados los encuentra in vitro MUNCK y SCHULTZ

(131).

Los resultados obtenidos por nosotros (Tabla 28), claramente demuestran que in vivo, la difusión de fenilalanina tiene un componente paracelular, el cual es inhibido por TAP. Si asumimos que a la concentración de TAP utilizada por nosotros, la inhibición de la vía paracelular es total, podemos postular que esta vía representa aproximadamente el 45% de la difusión total, sin embargo es posible que el % sea mayor, dado que no es fácil que el bloqueo de las uniones estrechas producido por el TAP sea del 100%. Este resultado es algo mayor que el encontrado para la glucosa en condiciones experimentales similares(217).

Cuando se utilizaron animales reseca- dos para ver el efecto del TAP(Tablas 28 y 29), pudo comprobarse que la inhibición de la difusión de fenilalanina producida era mayor que en el caso de las ratas controles, representando el componente paracelular en este caso alrededor del 60%. O sea que en las ratas reseccionadas el componente paracelular de la difusión de fenil-

alanina es mayor. Si aplicamos estos %, a los datos de difusión de la Tabla 9, asumiendo que el componente paracelular no varía con la concentración, y calculamos el componente transcelular en $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'$, obtenemos:

Fenilalanina mM	Patrones	Resecadas
1	0,029	0,032
2,5	0,057	0,066
5	0,198	0,160
10	0,309	0,274
25	0,825	0,756

Como puede observarse, las diferencias son pequeñas y en ambos sentidos, lo cual nos induce a pensar que el incremento de la difusión producido por la resección se explica exclusivamente por un aumento del componente paracelular y que el componente transcelular no varía. Esto coincide con los experimentos hechos con vesículas de borde en cepillo (119), donde se observa que la permeabilidad de la membrana no sufre al-

teraciones tras la resección.

Dado que , en trabajos previos (40) se ha demostrado que las uniones estrechas no presentan ninguna alteración apreciable al microscopio electrónico y sin descartar que tras la resección intestinal sean efectivamente más permeables, una posible explicación del aumento de la difusión paracelular sería el aumento del clearance subepitelial, puesto que la resección provoca un aumento de mastocitos con abundante degranulación (40), que produciría vasodilatación y aumento del flujo sanguíneo, con lo que los gradientes favorables a la entrada de aminoácidos por esta vía, se verían especialmente favorecidos, al no tener que atravesar una doble membrana.

V.6.- VALORES DE TRANSPORTE ACTIVO Y DE LAS CONSTAN-
TES CINÉTICAS. EFECTO DE LA RESECCION.

Los valores de transporte activo de cada aminoácido, se calcularon por diferencia entre los valores de absorción total y los de la difusión pasiva en presencia de metionina. La representación gráfica de estos valores según el método de los dobles inversos o de Lineweaver-Burk, se ajusta bien a una recta, cuya intersección con el eje de ordenadas nos da el valor de la velocidad máxima aparente, V_m , y la intersección con el eje de abscisas, el de la constante de transporte aparente, K_T .

La V_m es una medida bastante aproximada de la capacidad del sistema de transporte, siempre que las condiciones experimentales aseguren la saturación de dicho sistema. La K_T indica la concentración de sustrato que debe haber en la luz intestinal para que la velocidad de transporte sea la mitad de V_m .

En la Fig. 16, se representan los valores de transporte activo de los tres aminoácidos estu-

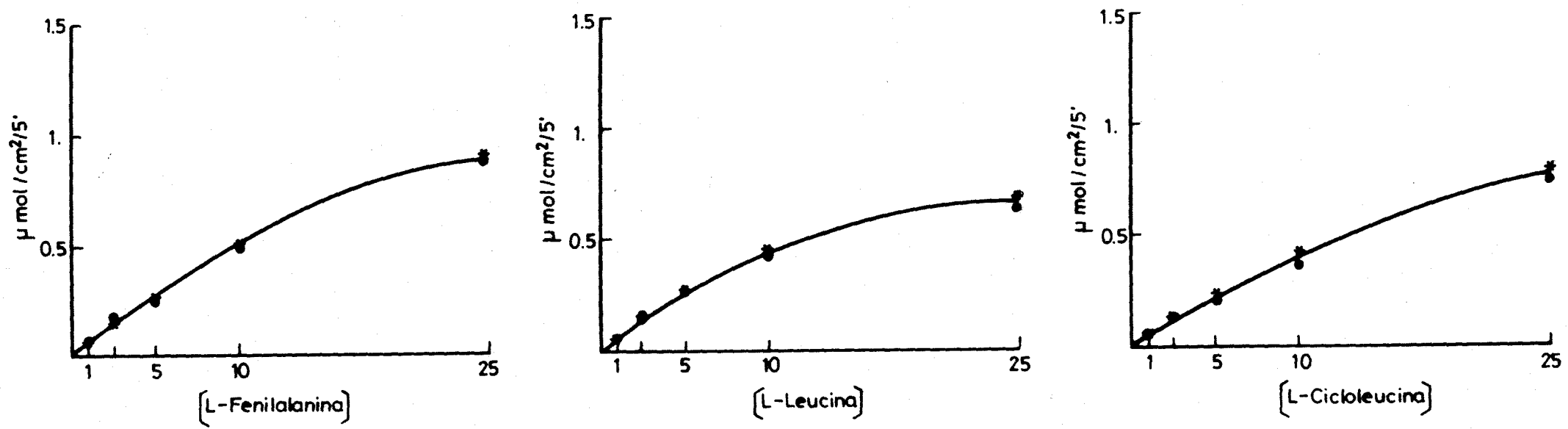


Fig. 16

Transporte activo de los aminoácidos estudiados, en ratas control (●)
y resecaadas (*).

diados, y en las Fig. 5, 10 y 15 están representados según el método de Lineweaver-Burk dichos valores para la fenilalanina, leucina y cicloleucina respectivamente.

La K_T aparente obtenida para la fenilalanina es de 25 mM, mucho mayor que la obtenida por ANTONIOLI y col. (7) y TORRE y col. (213), y semejante a la encontrada por PENZES y col. (155) y WINNE y col. (241) in vivo. Sin embargo, las comparaciones son muy difíciles, pues hay que tener en cuenta la velocidad de perfusión utilizada, la edad del animal, el espesor de las capas no agitadas, etc.. En cualquier caso, son valores mucho mayores que los obtenidos in vitro en rata, que son de 3,3 mM (54) y 1,4 mM (103). La V_m obtenida es de 0,376 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{min}$.

En el caso de la leucina, la K_T obtenida es de 14 mM, algo mayor que la encontrada por TORRE y col. (212) en rata, y BOYD (17) en rana, y semejante a la encontrada por PENZES en rata (154). Los valores encontrados in vitro son inferiores, 2,3 mM en rata (103), 1,5 mM en cobaya (83), 2,0 mM en pollo (82). La V_m obtenida es de 0,220 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{min}$, parecida a la obtenida por TORRE y col.(212).

Para la cicloleucina, la K_T obtenida es de 19 mM, parecida al único dato que se conocía in vivo para este aminoácido, que es de 15 mM (212). La V_m ha sido $0,232 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{min}$, semejante a la encontrada por TORRE y col. (212)

En los animales con resección intestinal, los valores de transporte activo obtenidos, no varían respecto a los controles, como puede observarse en la Fig. 16.

Lo mismo ocurre al representar los datos según el método de los dobles inversos, como se observa en la Fig. 5 (fenilalanina), Fig. 10 (leucina) y Fig. 15 (cicloleucina). (Fig. 17).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por MENGE y col. (119) al estudiar el transporte de glucosa por vesículas de borde en cepillo, tanto en yeyuno como en íleon, después de una resección proximal o una transposición yeyuno-ileal. Ellos demuestran que las características funcionales de las membranas apicales, se mantienen después de las operaciones indicadas, concluyendo que el aumento de absorción de íleon in vivo, tras la re-

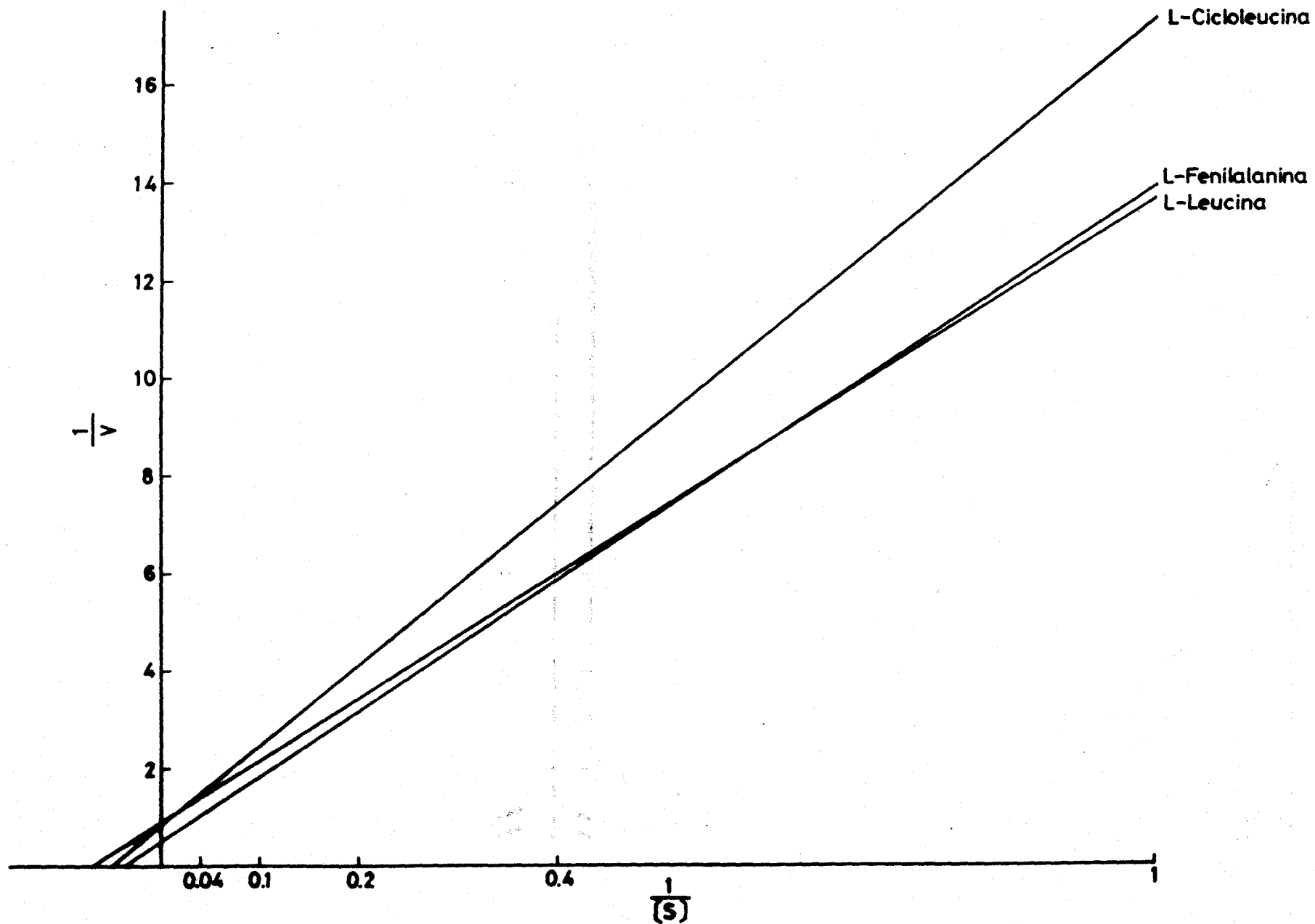


Fig. 17

sección proximal, se debe fundamentalmente a un aumento de la superficie, y no a cambios en las propiedades de la membrana del borde en cepillo de los enterocitos. Los mismos hechos se habían ya demostrado en enterocitos aislados del intestino remanente de perros (226).

En estos resultados, aparece sin embargo un aparente dato conflictivo. En la discusión de los resultados sobre la difusión, se decía que las K_D aparentes aumentaban en el intestino remanente, y que este aumento debía ser mayor en la realidad, debido al aumento de espesor de las capas no agitadas. Si esto es así, un aumento en el espesor de las capas no agitadas, llevaría a una disminución en la concentración de sustrato en contacto con el borde en cepillo, y por lo tanto, darían como resultado valores de K_T más altos que los reales. Según esto, nosotros deberíamos haber obtenido K_T aparentes mayores en los intestinos remanentes, y sin embargo, esto no ha sido así, como puede verse en las Fig. 5, 10 y 15.

Para intentar explicarlo, en la Fig. 19 se han representado los datos morfológicos que

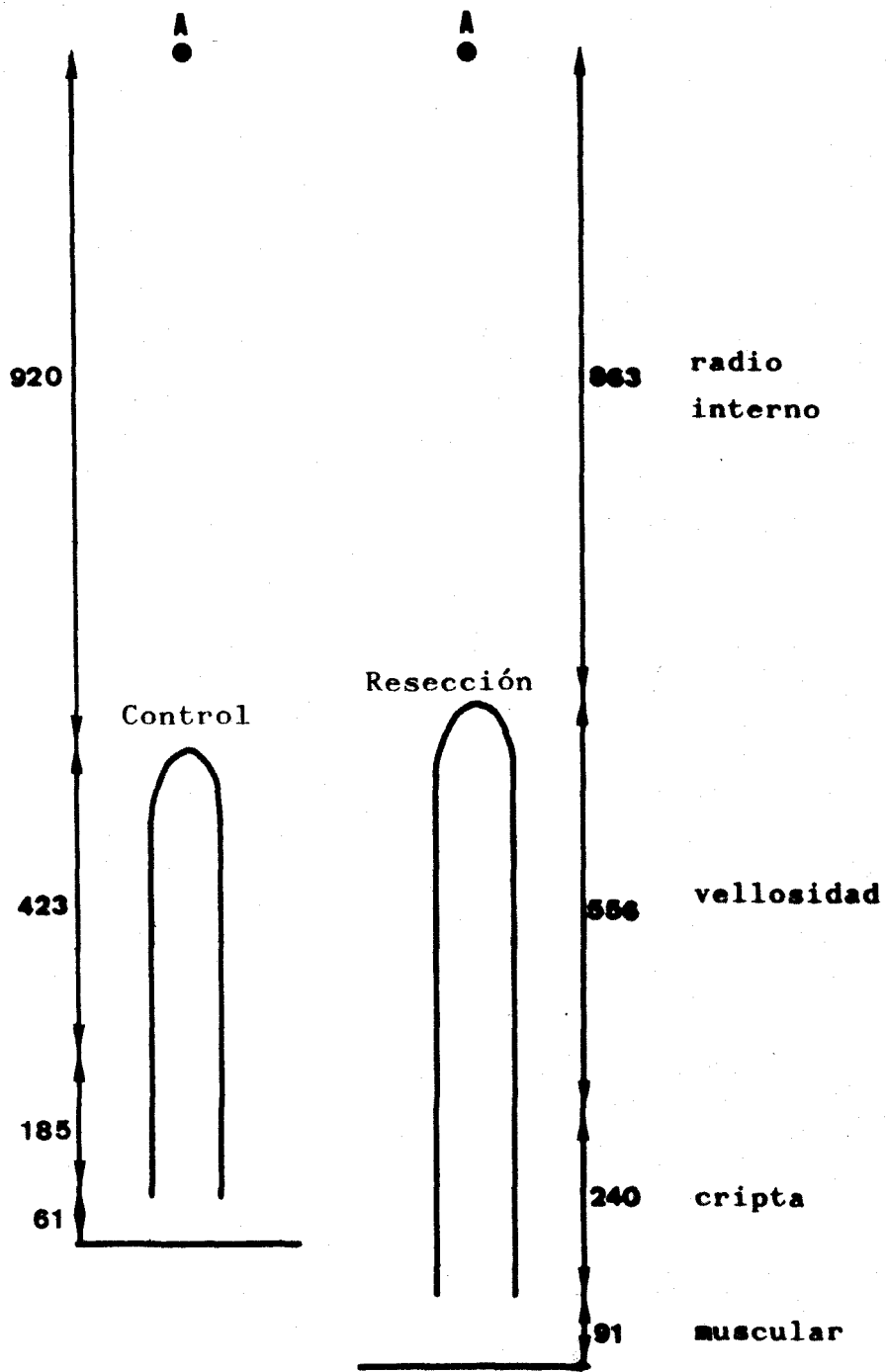


fig. 19

Morfología comparativa entre una vellosidad intestinal de un animal control, y con resección

conocemos. En primer lugar, el diámetro, que según nuestros resultados es de 3,1 mm en ratas control, y 3,5 mm en reseccionadas. MENGE y col. (118), en el único estudio morfológico completo que existe con resección distal del 60%, miden las criptas, vellosidades, etc., resultados que se representan en la Fig. 19. El punto A, representaría el centro del intestino.

Dos hechos llaman la atención; el primero es la mayor altura y anchura de las vellosidades, y el segundo, la similar distancia al centro desde la punta de las vellosidades.

En un reciente e interesante trabajo, MENGE y col. (122), estudian autoradiográficamente la distribución de los enterocitos maduros (es decir, con capacidad de acumular aminoácidos), a lo largo de la vellosidad, observando que en el íleon, tanto en ratas control como en ratas con resección proximal, estos enterocitos se circunscriben a la punta de la vellosidad (aproximadamente el tercio superior), aumentando con la resección su velocidad de migración desde las criptas.

Si, como es de esperar, lo mismo ocurre en el yeyuno tras una resección distal, observamos que los enterocitos con capacidad de transportar aminoácidos, están casi a la misma distancia del centro del intestino, por lo que el espesor de las capas no agitadas debe ser similar, y como consecuencia, las K_T aparentes, también lo serán.

En cuanto a los espacios entre las vellosidades, seguramente estarán menos agitadas en los intestinos remanentes, tanto por la mayor altura de las mismas, como porque según algunos autores (122), el número de vellosidades por mm^2 de superficie serosal no varía, y esto hará que este espacio sea más estrecho. Dado que la difusión, en principio, puede realizarse a lo largo de toda la vellosidad, aquí si que la resección supondría un aumento efectivo de espesor en las capas no agitadas, que conduciría a una subestimación de las K_D , tal como ya habíamos indicado.

V.7.- RESUMEN FINAL

De los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, puede deducirse que tanto en las ratas control como resecionadas, al hacer un estudio de la absorción in vivo, es necesario dilucidar los componentes activo y pasivo, pues de otra forma, se pueden obtener parámetros cinéticos equivocados.

Aún con la velocidad de perfusión, relativamente alta, utilizada por nosotros (5,6ml/min), los valores de K_T y V_m son en general mayores que los citados in vitro.

En cuanto a la resección intestinal, nuestros resultados indican que se produce un aumento de la absorción total por área de superficie serosal, que este aumento se debe fundamentalmente a un aumento del componente no saturable, obteniéndose unos valores de K_D mayores en el intestino de los animales resecionados, y que probablemente sean mayores todavía en la realidad, debido a los cambios morfológicos, y a las capas no agitadas. Dentro de este componente no saturable, una parte

significativa se absorbe por vía paracelular, que aumenta en el intestino remanente de ratas rese- cadas. Este aumento, sin descartar un efectivo aumento de permeabilidad en las uniones estrechas, puede explicarse por un mejor clearance del espacio subepitelial, producido por un aumento del flujo sanguíneo, que se deduce de estudios ultraestructu- rales previos. Falta la confirmación directa de es- te dato.

En cuanto al transporte activo, nuestros resultados indican que la K_T y V_m no varían en a- nimaes con resección intestinal, lo cual coincide con resultados in vitro. Debido a la disposición de los enterocitos maduros, en la punta de las ve- llosidades, la variación en la resistencia de las capas no agitadas, no afecta a las constantes ci- néticas.

De todo ello puede concluirse que ante un estímulo adaptativo fuerte, como es la resección, el intestino remanente responde aumentando su su- perficie, ligeramente la serosal y marcadamente la mucosal, y sin cambiar las características de las membranas del enterocito, aumenta la absorción

total, por aumento del componente no saturable. El hecho de que no se haya realizado una corrección efectiva de la resistencia de las capas no agitadas, no debe preocuparnos cuando intentamos explicar lo que ocurre al animal, pues en condiciones fisiológicas, la presencia de estas capas adyacentes a la membrana mucosal , es un fenómeno natural.

CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- La absorción intestinal total de los aminoácidos estudiados, L-fenilalanina, L-leucina y L-cicloleucina, representada frente a las concentraciones iniciales de sustrato, presentan un desarrollo característico, no saturable a las concentraciones ensayadas, tanto en animales control, como en los sometidos a una resección del 50% del intestino delgado distal.
- 2.- La resección intestinal produce un aumento de la absorción total de L-fenilalanina respecto a animales control, que empieza a ser patente a concentraciones de sustrato de 5 mM, haciéndose mayor a concentraciones superiores.

A bajas concentraciones de sustrato en el medio de perfusión, no se produce una variación significativa de la absorción total de L-leucina en los intestinos remanentes, resultando un aumento significativo, cuando las concentraciones son de 25 y 50 mM.

La extirpación del 50% del intestino delgado distal, provoca un aumento de la absorción total in vivo de L-cicloleucina, que es

significativo a la concentración 10 mM, aumentando la diferencia a 25 y 50 mM.

3.- Utilizando L-metionina 60 mM como inhibidor competitivo del transporte activo, se obtienen valores de absorción que guardan relación directa con la concentración de los aminoácidos en el líquido de perfusión, pudiéndose calcular la K_D o constante de difusión aparente.

4.- En ratas control, los valores de K_D calculados son:

0,060 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para L-fenilalanina

0,065 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para L-leucina

0,058 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para L-cicloleucina

5.- En ratas resecaadas, se produce un aumento del componente de difusión de todos los aminoácidos estudiados, encontrando valores de K_D de:

0,075 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para L-fenilalanina

0,073 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para L-leucina

0,069 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/5'/\text{mmol}/1$ para L-cicloleucina.

Seguramente, las constantes de difusión obtenidas en los animales problema, están subestimadas, debido a la mayor influencia de

las capas no agitadas, por lo que las K_D reales, serían superiores a las encontradas.

- 6.- Se ha estudiado por primera vez, el efecto del 2,4,6-Triaminopirimidina (TAP) como inhibidor de la permeabilidad de las uniones estrechas para la L-fenilalanina en animales control y resecaados. Se han conseguido porcentajes de inhibición de la difusión de L-fenilalanina, del 45% en ratas control, alcanzando hasta un 60% tras la resección. De los datos anteriores, podemos deducir que el incremento de la difusión producido por la resección intestinal, se debe principalmente a un aumento del componente paracelular, sin que se afecte significativamente el componente transcelular.
- 7.- El componente activo del transporte, se ha determinado por diferencia entre absorción total y difusión pasiva (absorción en presencia de L-metionina), habiéndose calculado las constantes aparentes de transporte, así como las V_{max} , por el método de Lineweaver-Burk. En animales control, las K_T han resultado ser 25 mM para la L-fenilalanina, 14 mM para la

L-leucina, y 19 mM para la L-cicloleucina.

8.- Las V_{\max} en ratas control, fueron de 0,376 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{min}$ para la L-fenilalanina, 0,220 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{min}$ para la L-leucina, y 0,232 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{min}$ para la L-cicloleucina.

9.- Tras la resección intestinal, se obtienen datos de las constantes de transporte y V_{\max} coincidentes con los descritos en animales intactos, de lo que se deduce que no se modifica el componente activo del transporte intestinal de aminoácidos, al extirpar parte de la superficie intestinal.

10.- Estos resultados indican, que las discrepancias entre los valores obtenidos in vitro e in vivo por distintos autores tras resección intestinal, se debían a la comparación de resultados dispares, ya que in vitro normalmente se calcula el transporte activo, mientras que in vivo se calculan los dos componentes, el saturable, y el no saturable, siendo este trabajo el primero que discrimina entre estos dos últimos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- AGAR, W.T.; HIR, F.J.R.; SIDHU, G.S.
Biochim. Biophys. Acta, 14, 80-84, 1954.
- 2.- ALTMANN, G.G.; ENESCO, M.
Amer. J. Anat. 121, 319-336, 1967.
- 3.- ALVARADO, F.
Biochim. Biophys. Acta, 109, 478-494, 1965.
- 4.- ALVARADO, F.
En : " Intestinal ion transport ", Ed. Robinson,
J.W.L., Medical and Technical Publishing Co.
117-152, Lancaster, 1976.
- 5.- ALVARADO, F.; LHERMINIER, M.
J. Physiol. 78, 131-145, 1982.
- 6.- ALVARADO, F.; MAHMOOD, A.
Biochemistry, 13, 2882-2890, 1974.
- 7.- ANTONIOLI, J.A.; JOSEPH, C.; ROBINSON, J.W.L.
Biochim. Biophys. Acta, 512, 172-191, 1978.
- 8.- BARRIONUEVO, M.; SANCHEZ CAMPOS, M.; URBANO, G.;
VARELA, G.
Rev. Esp. Fisiol. 36, 119-122, 1980.
- 9.- BJØRNEKLETT, A.; VIDDAL, K.O.; MIDTVEDT, T.; NYGAARD, K.
Scand. J. Gastroenterol. 16/5, 681, 1981.
- 10.- BOCHKOV, N.P.
Bull. Exp. Biol. Med. 46, 104-108, 1958.

- 11.- BOCHKOV, N.P.
Bull. Exp. Biol. Med. 47, 339-343, 1959.
- 12.- BOCHKOV, N.P.
Bull. Exp. Biol. Med. 47, 76-80, 1959.
- 13.- BONDAR, J.F.; PSESKY, W.
Arch. Surg. 94, 707, 1966.
- 14.- BOOTH, C.C.; EVANS, K.T.; MENZIES, T.
Brit. J. Surg. 46, 403-410, 1959.
- 15.- BOOTH, C.C.; KANAGHINIS, T.
J. Physiol. 167, 18p, 1963.
- 16.-BOYD, C.A.R.; PARSONS, D.S.
J. Physiol. Lond., 287, 371-391, 1979.
- 17.-BOYD, C.A.R.; PERRING, V.S.
J. Physiol. 316, 55-56, 1981.
- 18.- BROCHNER-MORTENSEN, J.; RICKERS, H.; BALSLEV, I.
Scand. J. Clin. Lab. 40, 695, 1980.
- 19.- BUCLON, M.; ROBINSON, J.W.L.; SEPULVEDA, F.V.
J. Physiol. 75, 571-579, 1979.
- 20.- BURSTON, D.; GANDY, R.H.; MATTHEWS, D.M.;
SCHEDL, H.P.; TAYLOR, E.
J. Physiol. 287, 15-16, 1978.
- 21.- BUTLER, D.G.
Surg. Obstet. Gynec. 109, 479-481, 1959.

- 22.- CARESKEY, J.; WEBER, T.R.; GROSFELD, J.L.
Arch. Surg. 116/5, 618, 1981.
- 23.- CASTELNUOVOTEDESCO, P.
En: " Advances in psychosomatic medicine "
vol. 10, Ed. H. Freyberger, 206, 57, 1980.
- 24.- CLAYTON, B.G.; COTTON, D.A.
Gut, 2, 18-22, 1961.
- 25.- CLEGG, D.O.; SAMUELSON, G.O.; WILLIAMS, H.J.
WARD, J.R.
J. Rheumatol. 7/1, 65, 1980.
- 26.- COLIN, R.
Gastroenterol. Clin. Biol. 6, 153-155, 1982.
- 27.- COMPSTON, J.G.; CREAMER, B.
Gut, 18, 171, 1977.
- 28.- CORI, C.F.
J. Biol. Chem., 66, 691-715, 1925.
- 29.- COSNES, J.; GENDRE, J.P.; LACAINE, F.; NAVEAU, S.
LEQUINTREC, Y.
Gastroenterol. Clin. Biol. 6/2, 159, 1982.
- 30.- CRANE, R.K.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 78, 99-159, 1977.
- 31.- CSAKY, T.Z.
Federation Pro. 22, 3-7, 1963.

- 32.- CURRAN, P.F.; HAJJAR, J.J.; GLYNN, I.M.
J. Gen. Physiol. 55, 297-300, 1970.
- 33.- CUTHBERTSON, E.M.; GILFILLAN, R.S.; BURHENNE, H.J.
MACKBY, M.J.
Surgery, 68, 698-705, 1970.
- 34.- CHEN, K.M.
J. Formosan Med. Ass. 73/1, 35-44, 1974.
- 35.- CHEN, K.M.
J. Formosan Med. Ass. 74/2, 108-114, 1975.
- 36.- CHRISTENSEN, N.H.; FELDMAN, B.H.; HASTINGS, A.P.
Amer. J. Physiol. 205, 255-260, 1963.
- 37.- CHRISTENSEN, N.H.; GRAY, S.J.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 215-217, 1964.
- 38.- DANO, P.; LENZ, K.; JUSTENSEN, T.
Scand. J. Gastroenterol. 9, 767, 1974.
- 39.- DEAN, R.H.; SCOTT, H.W.; SHULL, H.J.; GLUCK, F.W.
Amer. J. Clin. Nutr. 30, 90, 1977.
- 40.- DELGADO, M.J.
Tesis Doctoral, Fac. Farmacia, Sevilla, 1983.
- 41.- DIETSCHY, J.M.; SALLE, V.L.; WILSON, F.A.
Gastroenterology, 61, 932-934, 1971.

- 42.- DOWD, J.E.; RIGGS, D.S.
J. Biol. Chem. 240, 863-869, 1965.
- 43.- DOWLING, R.H.; BOOTH, C.C.
Lancet, 2, 146-147, 1966.
- 44.- DOWLING, R.H.; BOOTH, C.C.
Clin. Sci. 32, 139-149, 1967.
- 45.- DOWLING, R.H.; GLEESON, M.H.
Digestion, 8, 176-190, 1973.
- 46.- DRENICK, E.J.; THOMAS, M.S.; WILLS, C.E.
Int. J. Obesity, 5, 501, 1981.
- 47.- DUGAS, M.C.; CRANE, R.K.
Biochim. Biophys. Acta, 401, 486-501, 1975.
- 48.-ECKNAUER, R.; FEYERARAZEND, G.; RAFFLER, H.
J. Brit. Soc. Gastroenterol., 19, 707-714, 1978.
- 49.- EXSS, R.; GREWE, B.; GIFFELS, G.; STRAATEN, H.G.
Z. Kinderchir. 16/4, 399-405, 1975.
- 50.- FELDMAN, E.J.; PETERS, T.J.; McNAUGHTON, J.;
DOWLING, R.H.
Gastroenterology, 66, 691, 1974.
- 51.- FELDMAN, E.J.; DOWLING, R.H.; McNAUGHTON, J.
Gastroenterology, 70, 712-719, 1976.
- 52.- FENYO, G.; BACKMAN, L.; HALLBERG, D.
Acta Chir. Scand. 142/2, 154-159, 1976.
- 53.-FINCH, L.R.; HIRD, F.J.R.
Biochim. Biophys. Acta, 43, 268-277, 1960.

- 54.- FINCH, L.R.
Biochim. Biophys. Acta, 64, 556-558, 1962.
- 55.- FISHER, R.B.; PARSONS, D.S.
J. Physiol. 119, 210-223, 1959.
- 56.- FLEJSIERONICZ, Z.; STAUWNY, B.; TUSZEWSKI, M.
Pol. Przegl. Radiol. Med. Nucl. 41/2, 131-134, 1977.
- 57.- FLINT, J.M.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 23, 127-144, 1912.
- 58.- FROMTER, E.; DIAMOND, J.M.
Nature New Biol. 235, 9-13, 1972.
- 59.- FULLER, T.J.; GARG, L.C.; O'LEARY, J.P.;
CERDA, J.J.; HARTY, R.F.
Clin. Res. 25, 311A, 1977.
- 60.- FURUYA, S.; YUGARI, Y.
Biochim. Biophys. Acta, 343, 558-564, 1974.
- 61.- GAON, D.
Acta Gastroenterol. Latinoamer. 8/1, 57-60, 1978.
- 62.- GARCIA, S.
Tesina Licenciatura, Fac. Medicina, Sevilla, 1980.
- 63.- GARCIA, S.
Tesis Doctoral, Fac. Medicina, Sevilla, 1982.
- 64.- GARRIDO, A.B.; FREEMAN, H.J.; CHUNG, Y.C.; KIM, Y.S.
Gut, 20, 114-120, 1979.

- 65.- GAZET, J.C.; PILKINGTON, T.R.; KALUCY, R.S.
CRISP, A.M.; DAY, S.
Brit. Med. J. 4, 311, 1974.
- 66.- GOLD, M.S.; HERNANDEZ, M.H.; WESER, E.
Gastroenterology, 58, 952, 1970.
- 67.- GORDON, H.A.; BUCKNER-KARDOSS, E.
Amer. J. Physiol., 201, 175, 1961.
- 68.- GOTHLIN, J.; ANDERSON, K.E.
Acta Chir. Scand. 144, 45-49, 1978.
- 69.- GREEN, R.S.; MacDERMID, R.G.; SCHEIG, R.L.; HAJJAR, J.J.
Amer. J. Physiol. 241, G176-G181, 1981.
- 70.- GRENIER, J.F.; ELOY, M.R.; JAECK, D.; DAUCHEL, J.
Chirurgie, 100, 59-65, 1974.
- 71.- GRENIER, J.F.; MARESCAUX, J.; STOCK, C.;
COUMAROS, G.; SAVA, P.; MICHEL, F.
Digest. Dis. Sci. 26/4, 334, 1981.
- 72.- GRIFFEN, W.O.; HOSTETTER, J.M.; BELL, R.M.
BIVINS, B.A.; BANNON, C.
Arch. Surg. 116/3, 320, 1981.
- 73.- HAJJAR, J.J.; KHURI, R.N.; CURRAN, P.F.
J. Gen. Physiol. 60, 720-734, 1972.
- 74.- HAJJAR, J.J.; TOMICIC, T.; SCHEIG, R.L.
Digestion, 22, 170-176, 1981.
- 75.- HANSON, W.R.; OSBORNE, J.W.
Gastroenterology, 60, 1087-1097, 1971.

- 76.- HANSON, W.R.; OSBORNE, J.W.; SHARP, J.G.
Gastroenterology, 73, 692-700, 1977.
- 77.- HANSON, W.R.; OSBORNE, J.W.; SHARP, J.G.
Gastroenterology, 72, 701-705, 1977.
- 78.- HANSON, W.R.; RIJKE, R.P.C.; PLAISIER, H.M.
Cell Tissue Kinet. 10, 543-555, 1977.
- 79.- HEINZ, E.
En: " Na-linked transport of organic solutes"
Ed. E. HEINZ, Springer-Verlag, New York, 1972,
pp 15-19.
- 80.- HEINZ, E.; WALSH, P.M.
Biol. Chem. 233, 1488-1493, 1958.
- 81.- HELLIER, M.D.; HOLDSWORTH, C.D.; PERRETT, D.
THIRUMALAI, C.
Clin. Sci. 43, 659-668, 1972.
- 82.- HERZBERG, R.G.; SHEERING, H.; LERNER, J.
Comp. Biochem. Physiol. 40A, 229-247, 1971.
- 83.- HIMUKAI, M.; HOSHI, T.
J. Physiol., 302, 155-170, 1980
- 84.- HINDLE, W.; CODE, C.F.
Amer. J. Physiol., 203, 215, 1962
- 85.- HOPFER, U.; NELSON, K.; PERROTTO, J.;
ISSELBACHER, K.J.
J. Biol. Chem. 248, 25-32, 1973.
- 86.- IMONDI, A.R.; BALIS, M.E.; LIPKIN, M.
Exp. Cell Res. 58, 323-330, 1979.
- 87.- INUI, Y.; CHRISTENSEN, N.H.
J. Gen. Physiol. 50, 203-224, 1966.

- 88.- JAGENBURG, R.; DOTEVAIL, G.; KEWENTER, J.
 KOCK, N.G.; PHILIPSON, B.
 Gut, 12, 437-441, 1971.
- 89.- JERVIS, E.L.; SMYTH, D.H.
 J. Physiol. 151, 51-58, 1960.
- 90.- JOFFE, S.N.
 Lancet, 8211/1, 93, 1981.
- 91.- KAI-MO-CHEN
 Surgery, 65, 931-938, 1969.
- 92.- KALSER, M.H.; ROTH, J.L.A.; TUMEN, H.; JOHNSON, T.A.
 Gastroenterology, 38, 605-615, 1960.
- 93.- KERSHAW, T.G.; NEAME, K.D.; WISEMAN, G.
 J. Physiol. (London), 152, 182, 1960
- 94.- KING, I.S.; SEPULVEDA, F.V.; SMITH, M.W.
 J. Physiol. 319, 355-368, 1981.
- 95.- KINGHAM, J.G.C.; BARKER, J.H.; LOEHRY, C.A.
 Gut, 19, 114-120, 1978.
- 96.- KINTER, W.B.; WILSON, T.H.
 J. Cell Biol. 25, 19-39, 1975.
- 97.- KOCK, N.G.
 Can. J. Surg. 24/3, 270, 1981.
- 98.- KOTYK, A.
 En: " Biochemistry of membrane transport" Ed.G.
 Semenza; E.Carafoli, Springer-Verlag, New York
 1977, pp 212-220.

- 99.- KREMEN, A.J.; FINNER, J.H.; NELSON, C.H.
Ann. Surg. 140, 439-448, 1954.
- 100.- KRYUKOVA, L.V.
Bull. Exp. Biol. Med. URSS, 33, 45-47, 1968.
- 101.- LAPLACE, J.P.
En: " World Review of Nutrition and dietetics"
Ed. S.KARGER, Basel, 1975.
- 102.- LARRALDE, J.
Rev. Esp. Fisiol., 3, 31, 1947
- 103.- LARSEN, P.R.; ROSS, J.E.; TAPLEY, D.F.
Biochim. Biophys. Acta, 88, 570-577, 1964
- 104.- LEVIN, R.J.
Gut, 7, 250, 1966
- 105.- LIEB, W.R.; STEIN, W.D.
En: " Current Topics in Membranes and Transport"
Ed. F. Bronner; A. Kleinzeller, Academic Press,
New York, Vol. 2, pp 1-39, 1971.
- 106.- LOESCHKE, K.; HARE, D.; CSAKY, T.A.
Pflugers Arch. Eur. J. Physiol., 328, 1-20, 1971
- 107.- LORAN, M.R.; ALTHAUSEN, T.L.
Amer. J. Physiol., 193, 516-520, 1958.
- 108.- LUCKE, H.; HAASE, W.; MURER, H.
Biochem. J. 168, 529-532, 1977.
- 109.- MACARONE-PALMIERI, R.; MIRKOVITCH, V.;
ROBINSON, J.W.L.; SAEGESSER, F.
Gastroenterol. Clin. Biol. 2, 279, 1978.

- 110.- MACHEN, T.E.; ERLIJ, D.; WOODING, E.B.P.
J. Cell Biol. 54, 302-313, 1972.
- 111.- MALLINSON, C.N.; MERVALE, W.H.H.
Guy's Hosp. Rep. 122/3-4, 269-298, 1973.
- 112.-MARRAZI, R.
Amer. J. Physiol., 131, 36, 1940
- 113.- MARUBBIO, A.T.Jr.; BUCHWALD, H.; SCHWARTZ, M.Z.
VARCO, R.
Amer. J. Clin. Pathol. 66, 684, 1976.
- 114.- MASON, E.E.; PRINTEN, K.J.
Surg. Gynec. Obstet. 142/2, 177-183, 1976.
- 115.- McCABE, E.R.B.; GOODMAN, S.I.; FENNESSEY, P.V.
MILES, B.S.; WALL, M.; SILVERMAN, A.
Biochem. Med. 28, 229-236, 1982.
- 116.- McDERMOTT, F.T.; ROUDNEW, B.
Gastroenterology, 33, 315, 1968.
- 117.- McDERMOTT, F.T.; ROUDNEW, B.
Gastroenterology, 70/5, 707-711, 1976.
- 118.- MENGE, H.; GRAFE, M.; LORENZ-MEYER, H.; RIECKEN, E.O.
Gut. 16, 468-472, 1975
- 119.- MENGE, H.; MURER, H.; ROBINSON, J.W.L.
J. Physiol. 274, 9-16, 1978.
- 120.- MENGE, H.; ROBINSON, J.W.L.
Res. Exp. Med. 173, 41-53, 1978.
- 121.- MENGE, H.; ROBINSON, J.W.L.; RIECKEN, E.O.
En: "Mechanisms of intestinal Adaptation"
Ed. J.W.L. ROBINSON, R. DOWLING, E.O. RIECKEN,
Lancaster MTP Press, pp 383-389, 1982.

- 122.- MENGE, H.; SEPULVEDA, F.V.; SMITH, M.W.
J. Physiol. 334, 213-223, 1983.
- 123.- MENICK, F.; KIM, C.G.; MENICK, F.J.
Int. Surg. 58/7, 500-503, 1973.
- 124.- MICHEFF, A.K.; VAN OS, C.H.; WRIGHT, E.M.
J. Membrane Biol. 52, 83-92, 1980.
- 125.- MILONE, E.; CHERUBINI, M.; PETTIROSSI, O.
Chir. Ital. 29/1, 79-89, 1977.
- 126.- MITCHELL, M.A.; LEVIN, R.J.
Experientia, 37, 265-266, 1981.
- 127.- MONARY, U.
Beitr. Klin. Chir. 16, 479-492, 1896.
- 128.- MORENO, J.H.
Nature, 251, 150, 1974
- 129.- MORENO, J.H.
J. Gen. Physiol. 66, 97-116, 1975.
- 130.- MUNCK, B.G.; SCHULTZ, S.G.
J. Gen. Physiol. 53, 157-182, 1969.
- 131.- MUNCK, B.G.; SCHULTZ, S.G.
J. Membrane Biol. 16, 163-174, 1974.
- 132.- MUNCK, B.G.
En: " Intestinal Ion and Transport", Ed. J.W.L.
ROBINSON, MTP Press, Lancaster, pp 41-43, 1976.
- 133.- MUNCK, B.G.; RASMUSSEN, S.N.
J. Physiol. 271, 473-488, 1977.

- 134.- MUNCK, B.G.; RAMUSSEN, S.N.
J. Physiol. 291, 291-303, 1979.
- 135.- MURAKAMI, E.; SAITO, M.; SUDA, M.
Experientia, 33, 1469-1470, 1977
- 136.- MURER, H.; HOPFER, U.
En: "Intestinal Permeation", Ed. M.KRAMER,
LAUTERBACH, F., Excerpta Medica Foundation,
Amsterdam, pp 249-311, 1977.
- 137.- MURILLO, M.L.
Tesis Doctoral, Fac. Farmacia, Granada, 1976.
- 138.- NAFTALIN, R.J.; SIMMONS, N.L.
J. Physiol. 258, 27-28p, 1976.
- 139.- NAFTALIN, R.J.; SIMMONS, N.L.
J. Physiol. 290, 331-350, 1979.
- 140.- NAKAI, K.
Yonago Acta Med. 17/3, 193-206, 1973.
- 141.- NEAME, K.D.; RICHARDS, T.G.
En: "Cinética del transporte a través de mem-
branas" Ed. H. BLUME, Madrid, pp 80-86, 1976.
- 142.- NELL, G.; FORTH, W.; RUMMEL, W.; WANITSCHKE, R.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 293,
31-37, 1976.
- 143.- NEWAY, H.; SMYTH, D.H.
J. Physiol., 170, 328-343, 1964
- 144.- NEWAY, H.; RAMPONE, A.J.; SMYTH, D.H.
J. Physiol. 211, 539-549, 1970.

- 145.- NYGAARD, K.
Acta Chir. Scand. 132, 731-742, 1966.
- 146.- NYGAARD, K.
Acta Chir. Scand. 133, 233-248, 1967.
- 147.- OBERTOP, H.; NUNDY, S.; MALAMUD, D.
Gastroenterology, 72, 267-270, 1977.
- 148.- O'LEARY, J.
J. Obesity, 5, 531, 1981.
- 149.- PALMER, W.W.
Amer. J. Med. Sci. 148, 856-866, 1914.
- 150.- PAPA ZIAN, A.; MINAIRE, Y.; DESCOS, L.; ANDRE, C.
MELANGE, M.; VIGNAL, J.
Hepato-Gastroenterol. 28/2, 106, 1981.
- 151.- PARSONS, D.S.; SANDERSON, I.R.
J. Physiol. 309, 447-469, 1980.
- 152.- PATERSON, J.Y. F.; SEPULVEDA, F.V.; SMITH, M.W.
J. Physiol. 298, 333-346, 1980.
- 153.- PATERSON, J.Y.F.; SEPULVEDA, F.V.; SMITH, M.W.
J. Physiol. 303, 788, 1980.
- 154.- PENZES, L.
Exp. Geront. 9, 243-252, 1974.
- 155.- PENZES, L.; BOROSS, M.
Exp. Geront., 9, 253-258, 1974.

- 156.- PERISSAT, J.; MASSON, B.; GOUFFRANT, J.M.;
TAMARELLE, C.
J. Chir. 108/1-2, 170-186, 1974.
- 157.- PIETZ, D.G.
Gastroenterology, 31, 56, 1956.
- 158.- PILLING, G.P.; CRESSON, S.L.
Pediatrics, 19, 940-948, 1957.
- 159.- PONZ, F.; LARRALDE, J.
Rev. Esp. Fisiol. 8, 71-82, 1952.
- 160.- PONZ, F.; ILUNDAIN, A.; LLUCH, M.
Rev. Esp. Fisiol. 35, 97-104, 1979.
- 161.- PRESTON, R.L.; SCHAEFFER, J.F.; CURRAN, P.F.
J. Gen. Physiol. 64, 443-467, 1974.
- 162.- PRESTON, R.L.
Life Sciences, 24, 663-638, 1979.
- 163.- PULLAN, J.M.
Proc. Roy. Soc. Med. 52, 31-37, 1959.
- 164.- REISER, S.; CHRISTIANSEN, P.A.
Biochim. Biophys. Acta, 225, 123-139, 1971.
- 165.- RINALDO, J.E.; JENNINGS, B.L.; FRITZELL, R.A.;
SCHUTZ, S.G.
Amer. J. Physiol., 228, 854-860, 1975
- 166.- ROBINSON, J.W.L.; HAROUD, M.; LUISIER, A.L.
WINISTORFER, B.; MIRKOVITCH, V.
Med. et Hyg. 31, 1319, 1973.
- 167.- ROBINSON, J.W.L.
Biochim. Biophys. Acta, 367, 58-101, 1974.

- 168.- ROBINSON, J.W.L.; SEPULVEDA, F.V.
J. Physiol. 266, 42-43, 1976.
- 169.- ROBINSON, J.W.L.; ANTONIOLI, J.A.
Gastroenterol. Clin. Biol. 4, 78-86, 1980.
- 170.- ROBINSON, J.W.L.; MACARONE-PALMIERI, R.;
WINISTORFER, B.; MIRKOVITCH, V.
2nd Int. Conf. Adap. Part. 1st, 399, 1981.
- 171.- ROBINSON, J.W.L.; VANMELLE, G.; RIECKEN, E.O.
MENGE, H.
Res. Ex. Med. 181/2, 95, 1982.
- 172.- SALLE, V.L.; DIETSCHY, J.M.
J. Lipid. Res. 14, 475-484, 1973.
- 173.- SALMON, P.A.; REEDY, K.L.
Surg. Gynecol. Obstet. 141, 55, 1975.
- 174.- SAPOTA, G.A.; GEGIELSKI, M.M.; ORGAN, C.H.
Surg. Gynecol. Obstet. 143/5, 757-762, 1976.
- 175.- SAUTIER, G.; RANDRIAMANANA, C.; FLAMENT, C.;
MIRCHAB, N.; TREMOLIERES, I.
Cah. Nutr. Diet. 6, 75, 1971.
- 176.- SCHIFF, E.R.; SMALL, N.C.; DIETSCHY, J.M.
J. Clin. Invest. 51, 1351-1362, 1972.
- 177.- SCHUENGER, J.L.; HOENING, V.; IMLER, M.
C.R. Soc. Biol. 175/1, 96, 1981.
- 178.- SCHOENENBERGER, J.A.
Tesina Licenciatura, Fac. Farmacia, Barcelona, 1981.
- 179.- SCHULTZ, S.G.; CURRAN, P.F.; CHEZ, R.A.; FUISZ, R.E.
Gen. Physiol. 50, 1241-1260, 1967.

- 180.- SCHULTZ, S.G.; CURRAN, P.F.
Physiol. Rev. 50, 637-718, 1970.
- 181.- SCHULTZ, S.G.; YU-TU, L.; STRECKER, C.K.
Biochem. Biophys. Acta, 288, 367-379, 1972.
- 182.- SCHULTZ, S.G.; FRIZZELL, R.A.; NELLANS, H.N.
Ann. Rev. Physiol. 36, 51-91, 1974.
- 183.- SCHULTZ, S.G.
Amer. J. Physiol. 233, E249-E254, 1977.
- 184.- SCHULTZ, S.G.
En: " Membrane transport in Biology " Vol.IVB
Ed. G. GIEBISCH, D.C.TOSTESON, H.H. USSING,
Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York,
pp 749-780, 1979.
- 185.- SCHWARTZ, M.K.; MEDWID, A.; ROBERTS, K.A.;
SLEISENGER, M.; RANDALL, H.T.
Surg. Forum, 6, 385-390, 1955.
- 186.- SENN, N.
Ann. Surg. 7, 99, 1888.
- 187.- SEPULVEDA, F.V.; ROBINSON, J.W.L.
J. Physiol. 74, 569-574, 1978.
- 188.- SEPULVEDA, F.V.; ROBINSON, J.W.L.
J. Physiol. Paris, 74, 575-583, 1978.
- 189.- SEPULVEDA, F.V.; SMITH, M.W.
J. Physiol., 282, 73-90, 1978
- 190.- SHEFF, M.F.; SMYTH, D.H.
J. Physiol. 128, 67P, 1955.

- 191.- SIGRIST-NELSON, K.; HOPFER, U.
Biochim. Biophys. Acta, 367, 247-254, 1974.
- 192.- SIMMONS, N.L.; NAFTALIN, R.J.
Biochim. Biophys. Acta, 447, 426-450, 1976
- 193.- SIPAROV, I.N.
Vestn. Khir. Grekova, 103, 47, 1969.
- 194.- SMITH, M.W.; JAMES, P.S.; PATERSON, J.Y.F.
Comp. Biochem. Physiol. 69A, 231-236, 1981.
- 195.- SOLHAUG, J.H.
Scand. J. Gastroenterol. 11/2, 155-160, 1976.
- 196.- SOLS, A.; PONZ, F.
Rev. Esp. Fisiol., 2, 283-284, 1946
- 197.- SOLS, A.; PONZ, F.
Rev. Esp. Fisiol., 3, 207-211, 1947
- 198.- SPECHT, W.
En: " Intestinal Permeation " Ed. M. Kramer,
F. LAUTERBACH, Excerpta Medica Amsterdam,
pp 4-40, 1977
- 199.- SPIN, F.P.; WEISMAN, R.E.
Amer. J. Surg. 88, 91, 1975.
- 200.- STAHLGREN, L.H.; UMANA, G.; ROY, R.; DONNELLY, J.
Ann. Surg. 156, 483-491, 1962.
- 201.- STERPINI, A.
Riv. Med. Aeronaut. 39/1-2, 163-198, 1976.
- 202.- STREMMEL, W.
Internist. Prax. 14/3, 439-443, 1974.

- 203.-SULLIVAN, M.F.
Amer. J. Physiol., 201, 1013, 1961
- 204.-SWAN, R.W.; FOWLER, W.C.Jr.; BORONOW, R.C.
Surg. Gynecol. Obstet. 142/3, 325-327, 1976.
- 205.-SYME, G.; SMITH, M.W.
Cell Biol. Int. Rep. 6, 573-578, 1982.
- 206.-THOMSON, A.B.R.; DICTSCHY, J.M.
J. Theor. Biol., 64, 277-294, 1977
- 207.- THOMSON, A.B.R.
Amer. J. Physiol. 236/6, E685-E691, 1979.
- 208.-THOMSON, A.B.R.
Amer. J. Physiol., 236, E701-E709, 1979
- 209.-THOMSON, A.B.R.
J. Membr. Biol. 47, 39-57, 1979.
- 210.-TOFFOLON, R.K.; WAISMAN, J.; WATT, C.M.H.
Gastroenterology, 73/6, 1406-1409, 1977.
- 211.-TOMPKINS, R.K.; WAISMAN, J.; WATT, C.M.H.
Gastroenterology, 73/6, 1406-1409, 1977.
- 212.-TORRE, M.P.
Tesis Doctoral, Fac. Biológicas, Pamplona, 1982.
- 213.-TORRE, P.; PONZ, F.
Rev. Esp. Fisiol., 39, 333-338, 1983

- 214.- VANDERHOOF, J.A.; METZ, M.J.; TUMA, D.J.
ANTONSON, D.L.; SONELL, M.F.
Digest. Dis. Sci. 25, 581, 1980.
- 215.- VAZQUEZ, C.M.
Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Sevilla, 1983.
- 216.- VIDAL-SIVILLA, S.; SOLS, A.; PONZ, F.
Rev. Esp. Fisiol. 6, 195-205, 1950.
- 217.- VINARDELL, M.P.; BOLUFER, J.
Rev. Esp. Fisiol., 39, 193-196, 1983
- 218.- WAKITA, M.; HOSHIMO, S.; MORIMOTO, K.
Poultry Science, XLIX/4, 1046-1050, 1970
- 219.- WAPNIR, R.A.; HAWKINS, R.L.; LIFSHITZ, F.
Amer. J. Physiol. 223, 788-793, 1972.
- 220.- WESER, E.; HERNANDEZ, M.H.
Gastroenterology, 56, 1206, 1969.
- 221.- WESER, E.; HERNANDEZ, M.H.
Gastroenterology, 60, 69-75, 1971.
- 222.- WESER, E.; TAWIL, T.
Gastroenterology, 71, 412-415, 1976.
- 223.- WESTERGAARD, H.; DIETSCHY, J.M.
J. Clin. Invest. 54, 718-732, 1974.
- 224.- WHITTEMBURY, G.; RAWLINS, F.A.
Pflügers Arch. 330, 302-309, 1971.

- 225.- WILDEGANS, H.
Dtsch. Med. Wschr. 38, 1558-1561, 1925.
- 226.- WILMORE, D.W.; HOLTZAPPLE, P.G.; DUDRICK, S.J.;
CERDA, J.J.
Surg. Forum, 22, 361-363, 1971.
- 227.- WILLIAMSON, R.C.N.; BAUER, F.L.R.; MALT, R.A.
Brit. J. Cancer, 36, 401, 1977.
- 228.- WILLIAMSON, R.C.N.; BAUER, F.L.R.; ROSS, J.S.
Gastroenterology, 74, 16-23, 1978.
- 229.- WILLIAMSON, R.C.N.; BUCHHOLTZ, T.W.; MALT, R.A.
Gastroenterology, 75, 249-254, 1978.
- 230.- WILLIAMSON, R.C.N.; CHIR, M.
N. Engl. J. Med. 298/25, 1393-1402, 1978.
- 231.- WILSON, F.A.; DIETSCHY, J.M.
J. Clin. Invest. 51, 3015-3025, 1972.
- 232.- WILSON, F.A.; DIETSCHY, J.M.
Clin. Res. 20, 783, 1972.
- 233.- WILSON F.A.; DIETSCHY, J.M.
Biochim. Biophys. Acta, 363, 112-126, 1974.
- 234.- WINNE, D.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 277,
113-138, 1973.

- 235.- WINNE, D.
Biochim. Biophys. Acta, 298, 27-31, 1973.
- 236.- WINNE, D.
Experientia 32/10, 1278-1279, 1976.
- 237.- WINNE, D.
Biochim. Biophys. Acta, 464, 118-126, 1977.
- 238.- WINNE, D.
En: " Intestinal permeation " Ed. M. KRAMER,
LAUTERBACH, F., Workshop Conference Hoechst,
Amsterdam-Oxford, Excerpta Medica, vol. 4,
pp 58-64, 1977.
- 239.- WINNE, D.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 304,
175-181, 1978.
- 240.- WINNE, D.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307/3,
265-274, 1979.
- 241.- WINNE, D.; KOPF, S.; ULNER, M.L.
Biochim. Biophys. Acta, 550, 120-130, 1979
- 242.- ZAWADA, E.T.; JOHNSTON, W.H.; BERGSTEIN, J.
Arch. Pathol. Lab. Med. 105, 379, 1981.

FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
FRANCISCO MURILLO BERMEJO

titulada Electo de La Resección Intestinal sobre la cinética de
La Absorción In Vivo de Aminocidos en Rata.

acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente
cum laude

Sevilla, _____ de _____ de 1.9. _____

El Vocal,

Lori Boluf

El Vocal,

H. Machado

El Vocal,

Reyrita García

El Presidente,

Francisco Boluf

El Secretario,

José L. Lillo

El Doctorado,

J. Murillo

