

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Laboratorio de Fisiología Animal
Universidad de Santiago de Compostela

Sobre la aplicación del método de absorciones sucesivas en la absorción intestinal de aminoácidos

por

I. Cividanes,* J. Bello * y J. Larralde

(Recibido para publicar el 12 de agosto de 1963)

Desde hace tiempo en este laboratorio se viene utilizando el método de absorciones sucesivas para investigar el mecanismo del transporte activo de monosacáridos (4, 5, 7).

Este método, descrito por vez primera por SOLS y PONZ (12), es con ligeras variantes (14), una de las técnicas *in vivo* más usadas actualmente en la absorción intestinal (3, 1, 16). No obstante, que sepamos, siempre se ha estudiado con ella exclusivamente la absorción de monosacáridos. Ello es consecuencia de que la utilidad de la misma es máxima, a condición de que a lo largo de varias pruebas sucesivas, la velocidad de absorción de una sustancia se mantenga prácticamente constante. Hasta ahora, sólo se ha ensayado esta uniformidad con monosacáridos, para los que se ha probado (6) que no varía más que débilmente la velocidad con que se absorben por el intestino —incluso en pruebas de más de diez absorciones sucesivas de media hora de duración— a pesar del aumento de la concentración de estos azúcares en sangre y de otros factores que pudieran modificarla.

Con objeto de estudiar con este método la influencia de algu-

* Con una Beca del Patronato de Protección Escolar.

nos inhibidores o aceleradores en la absorción intestinal de aminoácidos, hemos ensayado en el presente trabajo si la glicina presenta una absorción análoga a la glucosa o su comportamiento es distinto. Una previa comunicación de este trabajo se hizo en la VII Reunión de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (9).

Métodos

Usamos ratas blancas, de nuestro laboratorio, de peso comprendido entre 100 y 200 gr. Se anestesiaron los animales con solución de etiluretano al 12 %. La técnica de absorciones sucesivas se llevó a cabo en cámara adecuada para mantener constante la temperatura de los animales sometidos a las experiencias (12). La presión de repleción fue de unos 13 cm de agua. El volumen de la solución a absorber de 10 ml. Las concentraciones de glicina variaron de 20 mM a 160 mM, preparadas en el momento del uso.

Los resultados se expresan en las tablas en micromoles de glicina absorbidos por centímetros de longitud fisiológica de intestino (15).

En la valoración de la glicina empleamos la técnica de FRAME y RUSSELL, modificada para nuestras condiciones experimentales (2).

Resultados

En el cuadro que sigue se recogen los datos obtenidos con un lote de 24 animales en los que se practicaron ocho absorciones sucesivas de treinta minutos de duración.

Siguiendo la línea de nuestras experiencias con glucosa, ensayamos en primer lugar el comportamiento de una solución hipotónica de glicina 20 mM.

La media aritmética de los micromoles de glicina absorbidos por cm de intestino da un valor de 2,4 con un error típico de 0,13. Este valor representa una velocidad de absorción bastante menor que la encontrada por nosotros en análogas circunstancias para la glucosa, que era del orden de $5,4 \pm 0,3$ (8). La glicina 20 mM se absorbe, pues, a una velocidad prácticamente mitad de la glucosa. En la tabla adjunta vemos también que a esta concentración la glicina se absorbe con una gran uniformidad a lo largo de las ocho pruebas. Al comparar dentro de cada animal la primera y la octava no se acusan variaciones mayores de 0,1 micromoles/cm, variación realmente pequeña. Al hacer el tratamiento estadístico de la primera absorción con cada una de las restantes, tampoco se encuentra ninguna variación significativa.

TABLA I
Ensayos acerca de la constancia en la absorción intestinal de glicina. Pruebas sucesivas de 30 minutos de duración. Micromoles absorbidos por centímetro de intestino.

N.º ratas	Glicina mM	Períodos de absorción							
		1.º	2.º	3.º	4.º	5.º	6.º	7.º	8.º
6	20	2,4 ± 0,13	2,4 ± 0,11	2,4 ± 0,12	2,4 ± 0,16	2,4 ± 0,12	2,4 ± 0,11	2,3 ± 0,15	2,4 ± 0,12
6	40	4,8 ± 0,38	4,8 ± 0,35	4,8 ± 0,39	4,9 ± 0,40	4,9 ± 0,39	4,8 ± 0,36	4,8 ± 0,40	4,8 ± 0,37
6	80	7,5 ± 0,38	7,5 ± 0,33	7,6 ± 0,35	7,5 ± 0,34	7,5 ± 0,32	7,5 ± 0,33	7,5 ± 0,35	7,5 ± 0,36
6	160	10,5 ± 0,32	10,2 ± 0,36	9,8 ± 0,37	9,3 ± 0,35	8,8 ± 0,36	8,3 ± 0,32	8,0 ± 0,31	7,6 ± 0,30

A una concentración doble, es decir, a 40 mM la absorción prácticamente se duplica. En estos límites la velocidad con que se absorbe la glicina es bastante proporcional a la concentración de la misma presente en el asa. El valor medio de la primera absorción en los animales ensayados es de 4,8 micromoles/cm, con un error típico de 0,38. En este caso se mantiene también la constancia en los distintos períodos. En efecto, entre la primera y la última absorción, dentro de un mismo animal, apenas existen variaciones del orden de 0,2 micromoles. También en este caso, al comparar la primera con cada una de las restantes, no se encuentra variación estadísticamente significativa.

En vista de los resultados anteriores, elevamos la concentración de glicina a 80 mM, ello provoca un aumento de la cantidad absorbida, pero no duplica la anterior. No hay, pues, proporcionalidad directa entre la glicina puesta en asa y la que se absorbe. La absorción media es de 7,5 micromoles/cm, con un error de 0,34. A esta concentración todavía persiste una gran constancia a lo largo de las ocho pruebas ensayadas. La absorción de glicina se mantiene constante con variaciones que no pasan de los 0,2 micromoles, a lo largo de las cuatro horas de experiencia, aún cuando la glicina en sangre aumente.

Finalmente, probamos glicina 160 mM. En las primeras absorciones los micromoles absorbidos vienen a ser de unos 10 por cm. En este caso el incremento en la absorción al aumentar la molaridad del aminoácido es mucho menor que en concentraciones anteriores. Nos acercamos a una absorción límite, en que un aumento en la concentración no se acompaña del correspondiente incremento del transporte.

Por otra parte, tenemos que destacar cómo al pasar de 80 a 160 mM falla la uniformidad en las sucesivas absorciones. Incluso, a partir de la segunda, hay una caída gradual y estadísticamente significativa. De una velocidad de absorción de 10,3 micromoles en la primera prueba pasamos a 8,8 en la quinta, y 7,6 en la octava. Esta disminución se presenta de modo constante e irreversible en todos los animales.

La representación gráfica de los datos anteriores aparece en la figura número 1 en la que se observa una constancia a las concentraciones 20, 40 y 80 mM y una caída notable a partir de 160 mM. También se puede apreciar en la figura la falta de proporcionalidad directa entre concentración de glicina en luz de intestino y velocidad de absorción por el mismo. Con mayor claridad se aprecia este último comportamiento en la fig. 2, en que se expresa la glicina absorbida en el primer período de absorción en función de la concentración de la solución a absorber.

El tratamiento estadístico de la significación de las diferencias entre la primera absorción y las siete restantes en función de

las distintas concentraciones se presenta en la tabla II, en la que los valores de absorción individuales se han referido en tanto por ciento respecto de la primera.

El efecto de una concentración de glicina 160 mM sobre las vellosidades intestinales, a juzgar por la caída fuertemente significativa que encontramos en las absorciones sucesivas, debe ser bastante intenso.

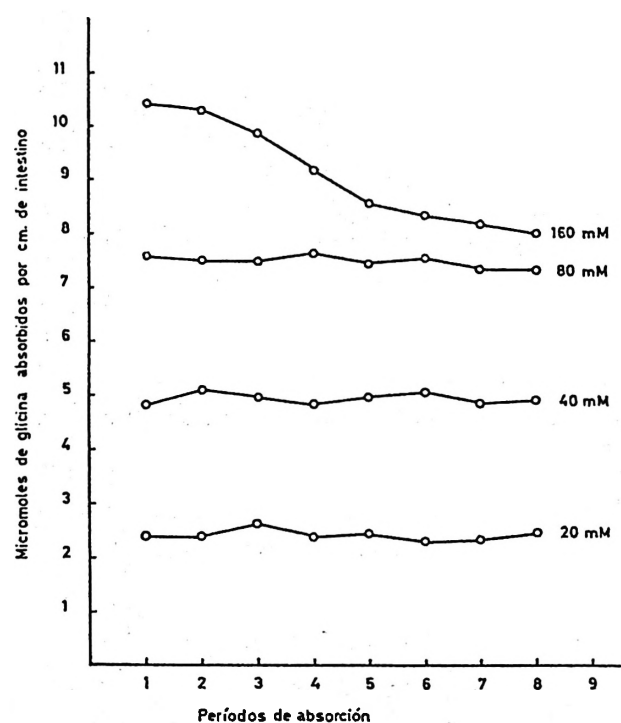


FIG. 1. Micromoles de glicina absorbidos por el intestino de rata en función de la concentración a lo largo de ocho pruebas sucesivas en un mismo animal.

TABLA II

N.º ratas	Glicina mM	Absorciones		Significación P < 0,01
		Primera	Media de las restantes	
6	20	100,0	100,4 ± 0,50	No significativa
6	40	100,0	100,2 ± 0,31	No significativa
6	80	100,0	99,7 ± 0,17	No significativa
6	160	100,0	85,0 ± 1,29	Significativa

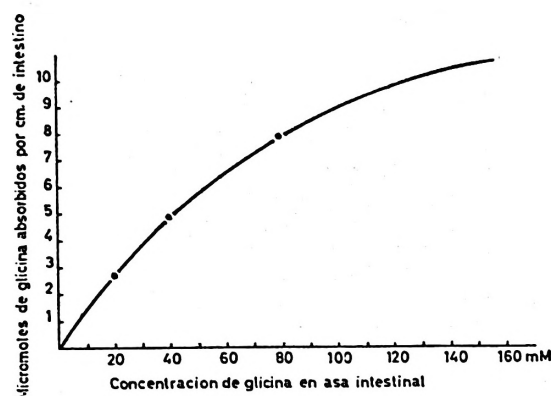


FIG. 2. Influencia de la concentración de glicina en su absorción por el intestino

TABLA III

Influencia de la glicina 160 mM sobre la constancia de la absorción intestinal de glicina 40 mM. Tiempo de absorción: 30 minutos.

Rata n.º	Peso gr	Asa cm	mM glicina	μ M/cm absorbidos	Absorción %	Inhibición %
1	125	15	40	5,5	100	50
			40	5,5	100	
			160	12,0		
			40	2,8	50	
2	121	25	40	4,6	100	31
			40	4,7	102	
			160	10,5		
			40	3,2	69	
3	139	16	40	4,0	100	40
			40	4,1	102	
			160	10,2		
			40	2,4	60	
4	125	16	40	5,5	100	51
			40	5,4	98	
			160	11,6		
			40	2,7	49	

La inhibición media de la 4.ª absorción de glicina 40 mM respecto a la 1.ª tomada como tipo, da un valor de un 43,0 % $\pm$ 4,7 de error típico. Inhibición altamente significativa.

Podría ser que la simple presencia durante media hora de la glicina 160 mM provocara efectos irreversibles en la mucosa. Para dilucidar este punto llevamos a cabo, en varias ratas, cuatro experiencias sucesivas de absorción con glicina 40 mM en primera, segunda y cuarta pruebas —cuya constancia ya conocemos— e intercalando entre segunda y cuarta, otra de 160 mM.

Los resultados aparecen en la tabla III. En ella se ve cómo después de mantener la solución de glicina de 160 mM treinta minutos en el asa, la absorción siguiente de glicina 40 mM descende aproximadamente un 50 % de su valor normal. Esto indica que el epitelio intestinal ha sufrido intensas alteraciones que no se reducen por el lavado con la solución isotónica de cloruro sódico.

Discusión

Es conocida la constancia con que se absorben por el intestino de rata monosacáridos como glucosa, galactosa, o fructosa. LARRALDE y GIRÁLDEZ (6) comprobaron que soluciones de glucosa 160 mM se absorben a lo largo de más de catorce períodos con una velocidad prácticamente constante, a pesar de la fuerte hiperglucemia y con independencia de las variaciones nictemerales. Precisamente esta constancia, postulada por vez primera por SOLS y PONZ, es la base del amplio uso de su técnica.

No obstante, todos los monosacáridos no se comportan de la misma manera. Fue también demostrado por LARRALDE y GIRÁLDEZ (4) que algunos de ellos, como la arabinosa, manosa, o sorbosa, presentan la curiosa característica de la notable diferencia entre la primera absorción y las restantes. En la primera media hora estos azúcares se absorben mucho más rápidamente que en las sucesivas. Existe una caída de un 30 % entre primera y segunda absorción, a partir de la cual la velocidad se mantiene constante. Este interesante fenómeno ha sido posteriormente confirmado por los trabajos de PONZ y LLUCH (11).

Por otra parte gran número de sustancias no presentan esta constancia. Una serie de drogas manifiesta una velocidad de absorción que varía en función de la concentración de la sustancia en la luz del intestino y de la cantidad absorbida. Parece ser que se alcanza un umbral de saturación que impide sucesivas absorciones (10).

Por consiguiente, antes de estudiar los posibles inhibidores o aceleradores en la absorción intestinal de un aminoácido con la técnica de las absorciones sucesivas, es imprescindible ensayar previamente su comportamiento con esta técnica.

Respecto a la glicina, el aminoácido elegido, de los datos an-

teriores se deduce que afortunadamente y de modo análogo a la glucosa, se mantiene constante a lo largo de ocho pruebas sucesivas cuando se opera a concentraciones de 20 a 80 mM.

A la concentración de 160 mM esta constancia desaparece.

VIDAL-SIVILLA (13) encontró que una solución de glucosa de 320 mM se absorbe con velocidad constante a lo largo de cuatro pruebas sucesivas, pero esta uniformidad desaparece al aumentar la concentración. Mientras la absorción de una solución isotónica se mantiene constante, la de soluciones hipertónicas disminuye progresivamente. Una concentración de 10,8 % altera profundamente el epitelio de la mucosa intestinal.

Para VIDAL-SIVILLA el estudio histológico del intestino, después de una absorción a esta molaridad, muestra separación de las vellosidades por efecto de la distensión, engrosamiento de las mismas por edema, discreta infiltración celular del estroma y alteraciones del epitelio, especialmente en las crestas, escasez de células caliciformes y a veces destrucción de las mismas vellosidades.

La importancia de estos resultados ha obligado a revisar muchas experiencias sobre la absorción de glucosa en las que se emplearon soluciones de la misma igual o superior a la indicada (13).

Es interesante hacer constar que en nuestro caso la presencia de lesiones irreversibles en las vellosidades aparece con concentraciones de glicina menores que las correspondientes de glucosa. Las alteraciones de las vellosidades, que también han sido comprobadas por nosotros histológicamente, obligan a tener en cuenta esta concentración límite de 160 mM en el estudio de la absorción intestinal de glicina.

Resumen

Se ha estudiado *in vivo*, por la técnica de absorciones sucesivas de SOLS y PONZ, la absorción intestinal de glicina en rata.

La absorción se mantiene estadísticamente constante ($p. < 0,01$) durante ocho períodos sucesivos de absorción de 30 minutos, para soluciones de glicina de una misma concentración, dentro de los límites de 20 a 80 mM. La constancia desaparece con glicina 160 mM, presentándose una progresiva caída en la velocidad de absorción a lo largo de los sucesivos períodos, siendo en el octavo un 26,4 % inferior a la del primero.

La velocidad de absorción de glicina aumenta con la concentración de la solución a absorber y es de 2,4, 4,8, 7,5 y 10,3 μM por cm de intestino en 30 minutos a partir de soluciones 20, 40, 80 y 160 mM respectivamente, presentando clara tendencia a la saturación.

Summary

Applicability of the successive absorption method to studies of intestinal absorption of aminoacids

A study has been made *in vivo*, using the successive absorption technique of Sols and Ponz, of the intestinal absorption of glycine in rats.

The absorption remains constant ($p < 0.01$) through eight successive absorption periods of 30 minutes, from solutions of glycine of the same concentration, within the limits of 20 to 80 mM. The constancy disappears with glycine 160 mM, and a progressive fall is noted in the speed of the absorption throughout the successive periods, that in the eighth being 26.4 % lower than that in the first.

The velocity of glycine absorption increases with the concentration of the solution to be absorbed, and is of 2.4, 4.8, 7.5 and 10.3 μM per cm. of intestine in 30 minutes from solutions of 20, 40, 80 and 160 mM respectively, presenting a clear tendency to saturation.

Bibliografía

- (1) CRANE, R. : *Physiol. R.*, **40**, 789, 1960.
- (2) FRAME y RUSSELL : *J. Biol. Chem.*, **149**, 255, 1945.
- (3) IVANOV, N. : *R. esp. Fisiol.*, **14**, 193, 1958.
- (4) LARRALDE, J. y GIRÁLDEZ, A. : *R. esp. Fisiol.*, **18**, 253, 1957.
- (5) LARRALDE, J. y GIRÁLDEZ, A. : *IV Int. Congress of Biochem.* Viena, 149, 1958.
- (6) LARRALDE, J. y GIRÁLDEZ, A. : *R. esp. Fisiol.*, **14**, 31, 1958.
- (7) LARRALDE, J. y GIRÁLDEZ, A. : *R. esp. Fisiol.*, **17**, 193, 1961.
- (8) LARRALDE, J., BELLO, J., FERNÁNDEZ-OTERO, P. : *R. esp. Fisiol.*, **18**, 127, 1962.
- (9) LARRALDE, J., CIVIDANES, I. y BELLO, J. : *VII Reunión Nac. de la Soc. Esp. de Fisiol.*, Cádiz, 1962.
- (10) LARRALDE, J. y GONZÁLEZ, M. : Datos no publicados.
- (11) LLUCH, M. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **16**, 327, 1960.
- (12) SOLS, A. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **3**, 207, 1947.
- (13) VIDAL-SIVILLA, S. : *R. esp. Fisiol.*, **6**, 143, 1950.
- (14) VIDAL-SIVILLA, S., SOLS, A. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **6**, 195, 1950.
- (15) VIDAL-SIVILLA, S. : *R. esp. Fisiol.*, **8**, 269, 1952.
- (16) WILSON, T. H. : *Intestinal absorption*, 26, 1962.

