

## Efectos de la ovariectomía sobre la capacidad de absorción y la morfología del intestino delgado de la rata

B. Herreros, E. Barbosa, J. L. Ojeda, F. J. García-Sancho y C. González

Departamento de Fisiología  
y Departamento de Anatomía  
Facultad de Medicina  
Valladolid (España)

(Recibido el 17 de junio de 1974)

B. HERREROS, E. BARBOSA, J. L. OJEDA, F. J. GARCIA-SANCHO and C. GONZALEZ. *Effects of Ovariectomy on the Absorptive Capacity and Morphology of the Rat Small Intestine*. Rev. esp. Fisiol., 30, 235-240. 1974.

The absorptive capacity (everted sacs) and the morphology of the small intestine were compared in ovariectomized Wistar rats and sham-operated female controls. The ovariectomy was performed when the animals were 5-6 weeks old. One month after ovariectomy absorption of glucose and proline were not modified. After three months, the absorption of glucose, galactose, proline and water were significantly increased (20-40 %) in the castrated group. Six months after ovariectomy, the absorption of the two hexoses and water remained increased (40-60 %), proline being not tested.

The total wet weight and length of the small intestine, the mitotic index, and the heights (as number of cells) of crypts and villi were not modified by ovariectomy. These findings suggest that the observed increases in absorption are the result of true increases in the absorptive capacity of the mucosal cells.

En determinados estados funcionales del sistema endocrino en la rata, tales como tras la adrenalectomía (12), en el hipertiroidismo (13), en el hipotiroidismo (14), en el embarazo (5, 10, 11) o en la lactación (4, 5), pueden producirse cambios en la morfología y en la capacidad de absorción del intestino delgado. La influencia de la ovariectomía sobre la capacidad de absorción de las células de la mucosa intestinal ha sido escasamente estudiada. Empleando una técnica *in vivo*, ALTHAUSEN (1) observó una disminución

de la absorción de glucosa tras la ovariectomía en ratas jóvenes. En dicho estudio, sin embargo, factores ajenos a las propias células absorbentes como son la velocidad de evacuación gástrica, la motilidad intestinal o la intensidad del flujo sanguíneo, pudieran haber influido en los resultados. Por otro lado, es sabido que los estrógenos son capaces de acortar la duración del período S y la de los ciclos mitóticos de las células proliferantes de las criptas intestinales (6), lo que a su vez podría ocasionar cambios en la dinámica de re-

novación del epitelio absorbente y en el tamaño de las vellosidades intestinales. Por todo ello, consideramos que la influencia de la ovariectomía sobre la morfología y la capacidad de absorción del intestino merecía un estudio más detallado. En este trabajo se presentan datos morfológicos y de absorción de glucosa, galactosa y prolina, obtenidos en ratas ovariectomizadas y en controles normales.

### Material y métodos

**Animales.** Ratas de raza Wistar, de 5 a 6 semanas (50-70 g), fueron ovariectomizadas bajo anestesia con éter. Animales controles, de la misma edad y peso, sufrieron idéntica operación sin extirpación de los ovarios. La absorción se estudió al cabo de uno, tres y seis meses después de la operación, cuando los pesos medios de las ratas eran 120, 175 y 210 g, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre las curvas ponderales de los dos grupos de animales.

**Absorción.** La absorción intestinal se estudió *in vitro* con la técnica de WILSON y WISEMAN (17). Los animales se sacrificaron por decapitación y de cada uno se prepararon dos o tres sacos de unos 4 cm (glucosa) u 8 cm (galactosa o prolina), utilizando segmentos de la porción proximal del yeyuno para los azúcares y de la porción distal para la prolina. Los sacos se llenaron con 0,5 ml (azúcares) ó 1 ml (prolina) de medio con la siguiente composición iónica (mM): ClNa 118,6, ClK 4,75, Cl<sub>2</sub>Ca 2,54, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 1,19, SO<sub>4</sub>Mg 1,19, CO<sub>3</sub>HNa 24,6, equilibrado con 5 % CO<sub>2</sub>-95 % O<sub>2</sub>, y pH de 7,4. Cada saco se incubó en 10 ml del mismo medio, en atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub>-95 % O<sub>2</sub>, durante una hora a 37° C. El volumen serosal final y el peso del tejido se determinaron a partir de los pesos de los sacos llenos y vacíos al final de la incubación.

En los experimentos con glucosa, su concentración inicial era de 5 mM a am-

bos lados de la pared intestinal. En los de galactosa este azúcar estaba presente inicialmente solo en el líquido mucosal (10 mM), mientras que el serosal contenía glucosa (100 mM) como sustrato metabolizable (15); en estas condiciones la glucosa que difundía al lado mucosal sólo en raras ocasiones alcanzaba el 5 % de la concentración de galactosa. Con la prolina el medio era idéntico en ambos lados, conteniendo glucosa 5 mM, L-prolina 3 mM, y 0,02 microcurios/ml de L-prolina-C<sup>14</sup>(U) (a.e.: 7,8 mC/mM, *The Radiochemical Centre*, Amersham).

La glucosa se determinó por el método de la glucosaoxidasa (9) con reactivos de Boehringer (Manheim). La galactosa en presencia de glucosa se valoró por diferencias entre la concentración total de azúcares reductores (16) y la de glucosa determinada enzimáticamente. La concentración de prolina se determinó por conteo de radioactividad; muestras de 0,3 ml del medio de incubación inicial y de los líquidos serosales y mucosales finales se mezclaron con 0,7 ml de etanol absoluto, y 0,5 ml de estas mezclas se contaron por centelleo líquido en 10 ml de solución de BRAY (3). El aminoácido acumulado en el tejido fue extraído tratando cada saco con 5 ml de etanol al 70 % durante 48 horas a 0-3° C (2), y 0,5 ml de estos extractos se contaron en 10 ml de solución de Bray. El contenido de agua total del tejido al final de la incubación se estimó por desecación a 110° C hasta peso constante.

Para cada saco se calcularon el cociente de concentraciones finales serosal/mucosal (glucosa y prolina), la captación mucosal (azúcares y prolina), el transporte neto (glucosa) y el consumo-retención en el tejido (glucosa), como se definen en un trabajo previo (7). Para la prolina se calculó también el cociente de concentraciones en el agua del tejido/líquido mucosal, y en los experimentos con galactosa se determinó el transporte neto de agua al lado serosal.

Tabla I. *Absorción de glucosa por el intestino de rata in vitro al cabo de 1, 3 y 6 meses después de la ovariectomía.*

Entre paréntesis, el número de sacos por grupo. Los demás valores son medias  $\pm$  error estándar. La captación mucosal, el transporte neto y el consumo-retención, están expresados en mg de glucosa/100 mg de peso húmedo final de tejido/hora.

	Cociente ser./muc.	Captación mucosal	Transporte neto	Consumo-Retención
<b>1 mes:</b>				
Controles (16)	5,2 $\pm$ 0,7	1,69 $\pm$ 0,09	0,37 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,06
Castradas (16)	5,1 $\pm$ 0,4	1,88 $\pm$ 0,08	0,36 $\pm$ 0,03	1,51 $\pm$ 0,08
<b>3 meses:</b>				
Controles (24)	5,7 $\pm$ 0,3	1,98 $\pm$ 0,08	0,68 $\pm$ 0,05	1,30 $\pm$ 0,06
Castradas (24)	6,8 $\pm$ 0,3 *	2,33 $\pm$ 0,11 **	0,87 $\pm$ 0,06 **	1,46 $\pm$ 0,08
<b>6 meses:</b>				
Controles (14)	7,7 $\pm$ 0,4	2,31 $\pm$ 0,09	0,90 $\pm$ 0,05	1,40 $\pm$ 0,09
Castradas (14)	12,4 $\pm$ 1,8 *	3,31 $\pm$ 0,22 ***	1,48 $\pm$ 0,24 *	1,83 $\pm$ 0,10 **

(\*):  $P < 0,05$ ; (\*\*):  $P < 0,01$ ; (\*\*\*):  $P < 0,001$ .

**Parámetros morfológicos.** En un lote de animales se determinó el peso y la longitud totales del intestino delgado. El intestino se lavó *in situ* perfundiendo desde el píloro con solución salina templada, y una vez aislado del mesenterio se evertió en su totalidad, introduciéndolo nuevamente en solución salina templada; la longitud total se midió a continuación suspendiendo el órgano verticalmente de un extremo, e inmediatamente se secó entre dos hojas de papel de filtro y se obtuvo el peso del mismo.

Para el estudio histológico se emplearon piezas de yeyuno tomadas a 10 cm del píloro. De estas piezas, fijadas en alcohol acético (3:1) e incluidas en parafina, se obtuvieron cortes transversales de 5 micras de grosor, que se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las preparaciones de ambos grupos de animales se marcaron al azar con una clave numérica, y un solo operador desconocedor de la misma realizó todos los contajes al microscopio. De cada animal se determinó la altura (número de células) de un mínimo de 20 criptas y vellosidades, seleccionándose aquellas en las que se observaba una continuidad del epitelio desde el fondo de la

cripta hasta el extremo de la vellosidad. En parte de las criptas se contó asimismo el número total de células de sus dos tercios más profundos y el número de mitosis, datos con los que se calculó el índice mitótico.

**Análisis estadístico.** La comparación entre los valores medios obtenidos en las ratas controles y castradas se realizó apli-

Tabla II. *Captación mucosal de galactosa y transporte neto de agua al lado serosal por el intestino de rata in vitro, a los 3 y 6 meses después de la ovariectomía.*

Entre paréntesis, el número de sacos por grupo. Los demás valores son medias  $\pm$  error estándar, y están expresados en mg de galactosa o  $\mu$ l de agua/100 mg en peso húmedo final de tejido/hora.

	Galactosa	Agua
<b>3 meses:</b>		
Controles (26)	0,98 $\pm$ 0,07	70,5 $\pm$ 6,7
Castradas (26)	1,22 $\pm$ 0,06 *	98,6 $\pm$ 7,0 **
<b>6 meses:</b>		
Controles (20)	1,01 $\pm$ 0,08	52,3 $\pm$ 8,1
Castradas (20)	1,41 $\pm$ 0,11 *	89,9 $\pm$ 10,1 **

(\*):  $P < 0,05$ ; (\*\*):  $P < 0,01$ .

cando el t-test de Student para comparación de grupos.

### Resultados

En la tabla I se resumen los resultados de absorción de glucosa. Al mes de la castración no se encontraron diferencias significativas entre las ratas controles y castradas, mientras que a los tres y a los seis meses era evidente un aumento de la ca-

pacidad de absorción de los intestinos de las ratas ovariectomizadas. La captación mucosal, el cociente serosal/mucosal y el transporte neto aumentaron a los tres meses entre un 17 y un 27 % con respecto a los controles, y entre un 40 y 60 % a los seis meses. No se observaron diferencias significativas en el consumo-retención de glucosa por el tejido ni al mes ni a los tres meses de la castración, mientras que apareció un incremento significativo de un 30 % a los seis meses; no obstante, no se puede deducir de estas cifras que estuviera aumentada realmente la degradación de glucosa por el tejido en las ratas castradas, ya que al ser mayor la concentración en el líquido serosal cabe esperar también mayor concentración de glucosa libre en el agua del tejido. Por otro lado, los datos de la tabla I considerados en conjunto parecen sugerir que la capacidad de absorción del intestino de rata para la glucosa aumenta con la edad del animal, dentro del rango de edades estudiado.

La captación mucosal de galactosa (tabla II) se encontró también significativamente aumentada en las ratas castradas,

Tabla III. *Absorción de prolina por el intestino de rata in vitro, al mes y a los tres meses después de la ovariectomía.*

Número de sacos por grupo: 10. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. La captación mucosal está expresada en  $\mu$ moles de prolina/100 mg de peso húmedo final del tejido/hora.

	Cociente ser./muc.	Cociente tej./muc.	Captación mucosal
<b>1 mes:</b>			
Controles	2,27 $\pm$ 0,14	2,84 $\pm$ 0,18	1,51 $\pm$ 0,18
Castradas	2,32 $\pm$ 0,23	3,21 $\pm$ 0,29	1,53 $\pm$ 0,27
<b>3 meses:</b>			
Controles	2,04 $\pm$ 0,09	2,01 $\pm$ 0,10	1,41 $\pm$ 0,11
Castradas	2,70 $\pm$ 0,25*	2,99 $\pm$ 0,25**	2,11 $\pm$ 0,17**

(\*):  $P < 0,05$ ; (\*\*):  $P < 0,01$ .

Tabla IV. *Datos morfológicos del intestino delgado de rata, a los 3 y a los 6 meses después de la ovariectomía.*

Entre paréntesis, el número de animales de cada grupo; en negrita, el número de criptas y vellosidades analizadas. Los valores de «índice mitótico» son las medias de los porcentajes de células en mitosis en la zona de proliferación de las criptas. Los demás valores son medias  $\pm$  error estándar. La altura de criptas y vellosidades está expresada en número de células del epitelio.

	Longitud (cm)	Peso (g)	Índice mitótico	Altura de criptas	Altura de vellosidades
<b>3 meses:</b>					
Controles (10)	—	—	7,1 261	25,9 $\pm$ 0,2 367	63,5 $\pm$ 0,7 367
Castradas (10)	—	—	7,5 206	27,6 $\pm$ 0,2 300	63,2 $\pm$ 0,6 300
<b>6 meses:</b>					
Controles (7)	91,9 $\pm$ 1,1	3,72 $\pm$ 0,10	7,8 203	22,8 $\pm$ 0,2 270	52,2 $\pm$ 0,5 270
Castradas (7)	87,4 $\pm$ 1,6	3,70 $\pm$ 0,12	8,0 179	23,6 $\pm$ 0,3 234	54,2 $\pm$ 1,0 234

siendo un 24 % mayor que el valor control a los tres meses y un 40 % a los seis meses. En estos experimentos se calculó el paso neto de agua al lado serosal de la preparación; los datos de la tabla II muestran que la transferencia neta de agua fue un 40 % mayor en las ratas castradas a los tres meses de la ovariectomía, y un 72 % a los seis meses.

Como en el caso de la glucosa, no se encontraron diferencias en la absorción de prolina al mes de la operación (tabla III). A los tres meses, sin embargo, el cociente serosal/mucosal, el cociente de concentración en el agua del tejido/concentración en el líquido mucosal, y la captación mucosal, eran mayores en las ratas castradas en un 32, 48 y 49 %, respectivamente.

Finalmente, los resultados del estudio morfológico realizado a los tres y a los seis meses de la operación, cuando los cambios en la capacidad de absorción eran ya manifiestos, muestran que la ovariectomía no modificó significativamente ninguno de los parámetros morfológicos analizados (tabla IV).

### Discusión

Nuestros resultados sugieren que la ovariectomía practicada en ratas jóvenes va seguida de un aumento progresivo de la capacidad de absorción del intestino delgado, aumento que ya es manifiesto a los tres meses de la castración y que se hace aún más evidente seis meses después de la operación.

La experiencia previa en estudios de esta naturaleza (5, 12, 13) aconseja contrastar los resultados de los experimentos de absorción con la posible existencia de cambios morfológicos en el intestino, si lo que se intenta valorar es la capacidad de absorción de las células de la mucosa intestinal. Por ejemplo, un cambio aparente de la absorción de determinado substrato expresado en cifras absolutas por asa o por unidad de longitud de intestino, pue-

de no aparecer (12, 13) o incluso cambiar de signo (5) si se expresa en función del peso del tejido. En el presente caso, el hecho de que no se encontraran diferencias significativas en el peso y longitud de los intestinos entre ratas castradas y controles, justifica el que los datos de absorción se expresaran únicamente por unidad de peso del tejido. Por otro lado, la evidencia histológica de que las dimensiones de las vellosidades intestinales son similares en los dos grupos de animales sugiere que no existen diferencias en el área de mucosa por unidad de peso del órgano, y todo ello hace pensar que el aumento de absorción observado en las ratas castradas corresponde realmente a un aumento de la capacidad de absorción de las células de la mucosa.

Nuestros resultados no están de acuerdo con los obtenidos por ALTHAUSEN (1), quien observó una disminución de la absorción de glucosa *in vivo* tras la ovariectomía en ratas jóvenes. Es probable que esta discrepancia sea atribuible a las diferentes técnicas empleadas en uno y otro caso, lo cual supone de hecho una seria limitación para la comparación de los resultados de ambos trabajos.

El mecanismo que da lugar al aumento de la capacidad de absorción de la mucosa intestinal en las ratas ovariectomizadas nos es desconocido. Hasta donde llega nuestra información, se carece de datos sobre efectos directos de las hormonas ováricas sobre la absorción intestinal en la rata. La observación de que el estrógeno de síntesis dietilestilbestrol inhibe la absorción de glucosa *in vitro* (8) es probablemente irrelevante a este respecto. Por otro lado, cabe pensar que la ovariectomía practicada en ratas jóvenes dé lugar a alteraciones del sistema endocrino más complejas de lo que en sí supone la simple deficiencia de hormonas sexuales femeninas.

Por último, los resultados del estudio morfológico sugieren que las concentraciones fisiológicas de estrógenos presentes

en el animal normal no están ejerciendo efecto apreciable sobre la velocidad de proliferación del epitelio de la mucosa intestinal. Esta conclusión no está necesariamente en desacuerdo con la observación de que tales efectos aparecen cuando se administran al animal cantidades mucho mayores de estas hormonas (6).

### Resumen

Se compara la capacidad de absorción *in vitro* y la morfología del intestino delgado en ratas ovariectomizadas y controles que sufrieron idéntica operación sin extirpación de los ovarios. Al mes de la ovariectomía no había diferencias significativas en la absorción de glucosa y prolina. A los tres meses, la absorción de glucosa, galactosa, prolina y agua era mayor en las ratas castradas (20-40 %). A los seis meses, este aumento de absorción de las dos hexosas y de agua era todavía más acusado (40-60 %), no habiéndose estudiado la absorción de prolina.

El peso húmedo total, la longitud del intestino, el índice mitótico y la altura (número de células) de las criptas y vellosidades no se modificaron por la ovariectomía. Se concluye que los aumentos de absorción observados representan verdaderos aumentos de la capacidad de absorción de las células de la mucosa intestinal.

### Bibliografía

1. ALTHAUSEN, T. L.: *Gastroenterology*, **12**, 467, 1949.
2. BAKER, R. D. y GEORGE, M. J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **225**, 315, 1971.
3. BRAY, G. A.: *Anal. Biochem.*, **1**, 279, 1960.
4. CAMPBELL, F. M. y FELL, B. J.: *J. Physiol.*, **171**, 90, 1964.
5. CRAFT, I. L.: *Clin. Sci.*, **38**, 287, 1970.
6. GOLAND, P., RODESCH, F., LEROY, F. y CHRETIEN, J.: *Nature*, **216**, 1211, 1967.
7. HERREROS, B., BARBOSA, E. y SOPENA, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **28**, 191, 1972.
8. HERREROS, B., BARBOSA, E., OJEDA, J. L. y BOSQUE, P. G.: *Experientia*, **26**, 518, 1970.
9. HUGGETT, A. ST. G. y NIXON, D. A.: *Lancet*, **ii**, 368, 1957.
10. LARRALDE, J. y FERNÁNDEZ-OTERO, P.: *Rev. esp. Fisiol.*, **24**, 49, 1968.
11. LARRALDE, J., FERNÁNDEZ-OTERO, P. y GONZÁLEZ, M.: *Nature*, **209**, 1356, 1966.
12. LEVIN, R. J., NEWBY, H. y SMYTH, D. H.: *J. Physiol.*, **177**, 58, 1965.
13. LEVIN, R. J. y SMYTH, D. H.: *J. Physiol.*, **169**, 755, 1963.
14. LONDON, D. R. y SEGAL, S.: *Endocrinology*, **80**, 623, 1967.
15. SMYTH, D. H.: En «Intestinal transport of electrolytes, amino acids, and sugars» (W. McD. Armstrong y A. S. Nunn, ed.). Charles C. Thomas, Springfield, 1971, pág. 52.
16. SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19, 1952.
17. WILSON, T. H. y WISEMAN, C.: *J. Physiol.*, **123**, 116, 1954.