

Sobre los aminoácidos libres, de procedencia endógena, en intestino perfundido de rata

M. A. Otero,* F. J. Mataix y G. Varela

Departamento de Nutrición
Patronato Juan de la Cierva. C.S.I.C.
Facultad de Veterinaria
Ciudad Universitaria
Madrid - 3

(Recibido el 27 de julio de 1975)

M. A. OTERO, F. J. MATAIX and G. VARELA. *Free Endogenous Aminoacids in Perfused Intestine in Rats*. Rev. esp. Fisiol., 32, 47-52. 1976.

The intestinal content of free aminoacids from endogenous origin is studied by perfusion through the small intestine of rats under the influence of several factors, pancreatic and biliary secretions, the addition of L-glutamic acid at two different concentrations to the perfusion liquid either with the pancreatic and biliary secretion or without them.

The conclusion is reached that the pancreatic juice contributes significantly to the intestinal amount of free aminoacids; the addition of L-glutamic acid to the perfusion liquid under the fixed experimental conditions decreases the amount of free aminoacids transferred by active mechanisms in the intestinal contents. This effect shows a certain selective preference to the essential aminoacids against the non-essential aminoacids. Such effect is not observed, however when the pancreatic secretion is not present in the intestinal contents.

El gran interés que en los últimos años ha despertado el nitrógeno endógeno se basa fundamentalmente en su significado nutricional en cuanto supone un ahorro en las necesidades proteicas dietarias (9). Existen abundantes trabajos acerca de la cuantificación *in totum* de este componente nitrogenado endógeno (2, 3, 7), del contenido intestinal, pero por el contrario es relativamente escasa la información cualitativa. Teniendo en cuenta que su reutilización, una vez secretado o vertido en el

tracto digestivo a partir de sus diversas fuentes (células descamadas de la mucosa, enzimas digestivos, proteínas plasmáticas, etc.), impide una pérdida de proteína considerable, es interesante conocer la naturaleza de los aminoácidos que componen el citado nitrógeno endógeno para saber en qué grado podrían satisfacer los requerimientos proteicos del animal.

En un estudio previo (8), se puso de manifiesto la gran contribución del jugo pancreático a este componente nitrogenado y la influencia sobre el mismo de otros nutrientes; en el presente trabajo se determina la composición en aminoácidos

* Con una Beca de Formación Personal Investigador.

del componente nitrogenado endógeno, bajo la influencia del aporte pancreático y de la presencia de ácido L-glutámico en el intestino.

Material y métodos

Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo la técnica de perfusión continua en el total del intestino delgado de rata. Los animales de experimentación eran machos, adultos, de un peso comprendido entre 250 y 300 g. de raza Wistar, de nuestro criadero, de notable homogeneidad genética y alimentados con una misma dieta estándar.

Para eliminar posibles interferencias por residuos de comida, previamente a los ensayos las ratas permanecieron 48 horas en ayuno, con agua *ad libitum*.

La perfusión se llevó a cabo en cámara termorregulada, controlándose de modo continuo la temperatura de los animales rectalmente. Una vez anestesiados (pentobarbital sódico, 50 mg/100 g de peso, por vía parenteral) se les practicó laparotomía y se ligaron o no los conductos pancreático y colédoco, según lo que conviniese en el ensayo; es de destacar que debido a la dificultad de ligar únicamente el conducto pancreático y basándose en la no influencia de la secreción biliar sobre el contenido intestinal de aminoácidos libres (9) se ligaron conjuntamente ambos conductos. A continuación, se introdujo una cánula de polivinilo en el comienzo del duodeno y otra al final del íleon, de forma que el líquido perfundiese a través del intestino delgado. La velocidad de perfusión fue regulada de manera que el líquido avanzase mediante los movimientos peristálticos y por otra parte se consiguiese la acomodación de éste al rango de pH fisiológico, por lo que se fijó la citada velocidad en 13 ml/hora, y el volumen en 20 ml. Las soluciones perfundidas han sido: cloruro sódico 9‰ y ácido L-glutámico 0,5 y 1 mM, en solución salina.

Previamente a la perfusión se lavó el

tramo intestinal a perfundir con solución salina (ClNa 9‰). En todos los casos las soluciones se introdujeron a $38^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ C. Los líquidos procedentes de dicha perfusión se recogieron en un matraz sobre hielo, y en ellos se determinaron, previa desproteinización con ácido tricloroacético al 10 %, los aminoácidos libres, mediante la técnica de MOORE y STEIN en un autoanalizador Multichrom (6).

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos, expresados en valor medio con sus límites fiduciales, así como el grado de significación, cuando existe, aparecen en la tabla I. Su análisis estadístico se llevó a cabo mediante la determinación de la constante «t» de Student comparando cada parámetro de las ratas tratadas con el correspondiente control.

En la columna A de la tabla citada anteriormente están expresados los niveles de aminoácidos libres (μ moles) de procedencia endógena de los contenidos intestinales de animales considerados como valores testigo. En los ensayos en que a los animales se les había privado del aporte pancreático y biliar, mediante ligadura de los correspondientes conductos, se utilizaron 50 ratas en un intento de cuantificar las pequeñas proporciones de aminoácidos pero en ningún caso se ha logrado, por lo que sólo se puede hablar de trazas para expresar la citada cuantificación y no se presentan en la tabla I.

A la vista de estos valores se puede deducir, como era de esperar, por los datos recogidos en la información bibliográfica acerca del aporte de nitrógeno endógeno que supone el jugo pancreático y como se puso de manifiesto en un reciente trabajo sobre eliminación intestinal del nitrógeno endógeno, que la secreción pancreática contribuye significativamente al contenido intestinal de aminoácidos libres.

Es muy posible que la ausencia de los enzimas procedentes del jugo pancreático

Tabla I. Contenido intestinal de aminoácidos (μ moles) libres de procedencia endógena bajo distintas condiciones.

En los ensayos en que manteniendo las variables obtenidas no hubo aporte pancreático y biliar, sólo se observaron trazos de los aminoácidos. Perfusión de los distintos lotes: A = solución salina; B = ácido L-glutámico 0,5 M en solución salina; C = ácido glutámico 1 mM en solución salina.

Aminoácidos	A	B	C
<i>Esenciales</i>			
Treonina	1,38 \pm 0,42	1,09 \pm 0,08 *	1,08 \pm 0,15 *
Valina	1,65 \pm 0,48	1,24 \pm 0,06 *	1,04 \pm 0,13 **
Metionina	— —	0,51 \pm 0,06 **	— —
Isoleucina	1,21 \pm 0,08	0,91 \pm 0,06 **	0,85 \pm 0,10 **
Leucina	2,33 \pm 0,23	1,68 \pm 0,07 *	1,49 \pm 0,17 **
Fenilalanina	1,03 \pm 0,12	0,67 \pm 0,07 *	0,50 \pm 0,06 **
Lisina	2,60 \pm 0,19	1,52 \pm 0,07 **	1,38 \pm 0,18 **
Histidina	0,97 \pm 0,08	0,47 \pm 0,05 **	0,38 \pm 0,04 **
Total esenciales	11,22 \pm 0,84	8,08 \pm 0,54 **	6,72 \pm 0,60 **
<i>No esenciales</i>			
Acido aspártico	1,37 \pm 0,12	1,23 \pm 0,08	1,34 \pm 0,23
Serina	1,51 \pm 0,18	1,32 \pm 0,08	1,47 \pm 0,26
Acido glutámico	2,65 \pm 0,43	3,38 \pm 0,09	9,31 \pm 0,18
Prolina	— —	— —	— —
Glicocola	1,94 \pm 0,23	1,66 \pm 0,08 *	1,70 \pm 0,20
Alanina	2,03 \pm 0,24	1,46 \pm 0,07 *	1,67 \pm 0,08 *
Tirosina	0,75 \pm 0,07	0,52 \pm 0,09 *	0,65 \pm 0,04 *
Arginina	1,11 \pm 0,17	0,77 \pm 0,10 *	0,77 \pm 0,08 *
Total no esenciales	11,99 \pm 1,56	10,34 \pm 0,37 *	16,91 \pm 0,37
TOTAL	23,21 \pm 2,25	18,41 \pm 0,91 *	23,63 \pm 0,37 *

* $P < 0,2$; ** $P = 0,05 - 0,001$.

supusiera una actividad enzimática tan disminuida en el lumen que no permitiera llevar a cabo la habitual digestión del otro gran componente endógeno, las células de descamación de la mucosa intestinal y en consecuencia la no aparición de aminoácidos libres. Por otra parte, la activación de los propios enzimas pancreáticos supone la aparición en el lumen de pequeños péptidos (4) que pueden hidrolizarse fácilmente dando lugar a aminoácidos. Por ello, la no existencia de estos enzimas en el lumen está evitando por un mecanismo doble la aparición de aminoácidos en forma libre.

En cuanto a las pequeñas trazas de ami-

noácidos que aparecen en el lumen en las condiciones de ligadura de los conductos pancreático y colédoco podrían ser debidos a las actividades enzimáticas del jugo entérico y a los existentes en el contenido intracelular de las células de descamación que sufren autólisis en el tracto intestinal.

A pesar de que se observa una cierta diferencia en la cantidad total de aminoácidos libres en los contenidos intestinales de los distintos animales, que podría explicarse dado el carácter individual del fisiologismo animal, en todos los casos destacan los siguientes hechos:

Que no existe metionina en forma libre

en el contenido intestinal de la rata, en las condiciones experimentales establecidas. Asimismo se encuentran pequeñas cantidades de histidina y tirosina. En cuanto a la prolina tampoco se presentó habitualmente, aunque en este caso la conclusión no es tan evidente como para la metionina. Esta ausencia o pequeña proporción de los citados aminoácidos podría explicarse además de por la rápida velocidad con que los aminoácidos se absorben, por ser los componentes antes citados poco frecuentes en la mayoría de las proteínas y enzimas que componen el cuerpo animal, siendo la menos abundante la metionina (5).

Al objeto de poder estudiar la influencia de un aminoácido sobre el conjunto de los mismos que aparecen libres en el lumen intestinal, se eligió el ácido L-glutámico, por ser uno de los componentes más frecuentes en las proteínas tisulares, por su gran incidencia en las vías metabólicas de los restantes aminoácidos y además por presentar un mecanismo de absorción por simple difusión, que según la mayoría de los autores (1, 11) apenas interfiere los mecanismos de transporte activo que caracterizan al resto de los aminoácidos con exclusión del ácido aspártico y probablemente lisina, que presentan asimismo transporte a favor de gradiente. El ácido L-glutámico se perfundió a dos concentraciones diferentes 0,5 y 1 mM (10 μ moles y 20 μ moles). Los resultados se muestran en las columnas B y C de la tabla.

A la vista de los valores expuestos en las citadas columnas B y C, y sometidos aquéllos a su correspondiente tratamiento estadístico, se puede deducir que el ácido L-glutámico disminuye la cantidad de cada uno de los aminoácidos libres presentes en el tracto intestinal a excepción del ácido aspártico, lo que hace pensar que el ácido L-glutámico podría afectar el transporte activo ya que el único aminoácido que no se encuentra disminuido es el transportado pasivamente.

También se observa con estos datos que el equilibrio de aminoácidos no esenciales frente a esenciales que presentan los animales del lote control, está desnivelado en favor de los primeros, siendo más marcado este efecto, como en el caso anterior, cuando se perfundió el ácido L-glutámico en concentración doble. Esto se podría explicar por el hecho de que el ácido glutámico junto al ácido aspártico es componente transcendental en la síntesis de aminoácidos no esenciales y al ser aportado aquí exógenamente es muy posible que el organismo animal de forma selectiva actúe absorbiendo proporcionalmente mayor cantidad de aminoácidos esenciales.

El propio ácido L-glutámico aparece en mayor cantidad, pero comparando el exceso respecto de los valores control, frente a los 10 μ moles y 20 μ moles que se adicionaron del aminoácido, no es de gran consideración, lo que habla en favor de una gran absorción del mismo. La mayor cantidad, correspondiente a la perfusión de 20 μ moles podría atribuirse a la saturación de su transportador o al establecimiento del equilibrio de concentración a ambos lados de la membrana (10).

Asimismo se estudió el efecto del ácido L-glutámico en el caso de ausencia de aporte pancreático y biliar. En estas condiciones, el contenido intestinal de aminoácidos libres no parece afectarse, tan sólo se observaron cantidades mesurables, pero pequeñas de ácido glutámico en el caso de adicionar 20 μ moles, lo cual tampoco extraña a la vista de los resultados anteriores.

Resumen

Se estudia por perfusión a través del intestino delgado de rata el contenido intestinal de aminoácidos libres de procedencia endógena, bajo la influencia de diversos factores, aporte pancreático y biliar y la adición al líquido de perfusión de ácido L-glutámico en dos concentraciones diferentes, a su vez, con y sin la contribución del jugo pancreático y la bilis. De

todo ello se puede concluir que el jugo pancreático contribuye de forma significativa al contenido intestinal de aminoácidos libres, y que la adición de ácido L-glutámico al líquido de perfusión, en las condiciones experimentales establecidas, disminuyó el contenido intestinal de aminoácidos libres transportados activamente, con cierto carácter selectivo sobre los esenciales frente a los no esenciales, mientras que no se observa efecto sobre dicho contenido intestinal cuando no existe aporte pancreático y biliar.

Bibliografía

1. AGAR, W. T., HIRD, F. J. R. y SIDHU, G. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 21, 1956.
2. BIRD, F. H.: *Fed. Proc.*, **27**, 1194, 1968.
3. BOLTON, W.: En «The role of the gastrointestinal tract in protein metabolism» (Munro, H. N., ed.). Blackwell, Oxford, 1964, pp. 117.
4. GRAY, G. M. y COOPER, H. L.: *Gastroenterology*, **61**, 535, 1969.
5. LEHNINGER, A. L.: *Biochemistry*. Worth Publishers, Inc., New York, 1971.
6. MOORE, S. y STEIN, W. H.: En «Methods in Enzymology» (Collowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.). Academic Press, New York, 1963, p. 819.
7. NASSET, E. S.: *Fed. Proc.*, **24**, 953, 1965.
8. OTERO, M. A.: Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Santiago de Compostela, 1975.
9. OTERO, M. A., MATAIX, F. J. y VARELA, G.: *Rev. Nutr. Animal*, **13**, 99, 1975.
10. SCHULTZ, S. G., YU-TU, L., ALVAREZ, O. y CURRAN, P. F.: *J. Gen. Physiol.*, **56**, 621, 1970.
11. WISEMAN, G. J.: *J. Physiol.*, London, **127**, 414, 1956.

