

Instituto de Biología Aplicada
Sección de Fisiología Animal
(Prof. F. Ponz)

Acción de la tiroxina sobre la actividad fosfatásica, del intestino delgado de rata

FRANCISCO PONZ

Recibido para publicar el día 12 de mayo de 1945

Hemos observado recientemente en ratas (Ponz 1945) una alteración del metabolismo del fósforo en el intestino durante la absorción de monosacáridos, por efecto de la administración de tiroxina. Este hecho nos sugirió el presente trabajo. Por lo demás, son relativamente abundante los datos que demuestran la influencia de las sustancias tiroideas sobre la actividad fosfatásica del plasma y de los extractos de diferentes órganos.

Scoz y Marangoni (1934) encontraban un aumento del 200 ó 300 por ciento en la actividad fosfatásica del plasma de perro por administración de tiroxina. En enfermos hipertiroideos señalaron Jiménez Díaz y colaboradores (1935) algunos datos que indicaban su aumento. Estos resultados han sido comprobados por Cera (1941) en conejillos de Indias, demostrando que la extirpación del tiroides va seguida de un descenso de la acción fosfatásica del suero, mientras que la inyección de tiroxina provoca su aumento. Y Dudler (1942), en ratas, ha llegado a la misma conclusión de aumento de actividad fosfatásica del suero por inyección de tiroxina.

En papillas musculares se había dicho (Irvine y Deuticke, 1927) que se inhibía la síntesis de exosa-fosfórico cuando

aquéllas procedían de conejos tratados previamente con extractos tiroideos. Herr (1934) encontró resultados ondulantes en la acción *in vitro* de la tiroxina sobre la hidrólisis de glicero-fosfato y exosadifosfato por el músculo. En cambio, sobre el mismo proceso en el hígado, dice que hay una fuerte inhibición.

En intestino de rata, Austoni y Coggi (1934) no veían variación de la fosfatasa por extirpación conjunta de tiroides y paratiroides.

Gran interés ha tomado en estos años la investigación de las variaciones de actividad fosfatásica del intestino en relación con la teoría de la absorción de azúcares al estado de esteres fosfóricos. Westenbrink (1936) atribuye las altas cifras de fosfatasa alcalina encontradas por Kay (1928) a esta misión digestiva. Por su parte, trata de averiguar si hay influencia de la composición del alimento y de la velocidad de absorción de glucosa sobre el contenido de fosfatasa del intestino; llega a la consecuencia de que la adaptación de la velocidad de absorción de glucosa ante la presencia o ausencia de glucosa en la alimentación no se consigue por variación del contenido de fosfatasa del intestino delgado; sin embargo, en una de sus experiencias se revela que en trozos de intestino — yeyuno — con máximo contenido en fosfatasa, la velocidad de absorción de glucosa es mayor que en porciones de ileum de contenido mínimo. Relacionadas con esto mismo están las experiencias investigando la acción de las suprarrenales que intervienen en la absorción selectiva de monosacáridos sobre la fosfatasa intestinal. Kutscher y Wüst (1942) dicen que la suprarrenalectomía conduce a un descenso de la actividad fosfatásica a valores mitad de los normales, corregible por hormona suprarrenal.

Puesta de manifiesto la influencia de la tiroxina sobre la absorción de monosacáridos, convenía estudiar si esta acción alcanzaba también al contenido en fosfatasa intestinal o si éste no era modificado.

Material y métodos

Hemos utilizado ratas jóvenes, de 60 a 90 gramos, de la misma edad, criadas en las instalaciones del laboratorio.

Después de un ayuno de veinte horas, se da muerte a los animales con gas. Tras rápida laparotomía, se extrae todo el intestino delgado y se mide, evitando en lo posible su distensión. Se cortan las porciones a estudiar, que se vacían en su caso de contenido deslizando suavemente los dedos a su largo. Con pinzas y tijeras se libera bien el intestino de restos de mesenterio, etc. Se cortan de cada porción tres trocitos contiguos de aproximadamente 1,5 a 2 cg. que se pesan inmediatamente con exactitud en una balanza aperiódica Sartorius, para reducir el mínimo la pérdida de peso por desecación. Cada uno se lleva a un pequeño mortero donde se tritura con arena Merck lavada a los ácidos y 1 c. c. de agua; al final se obtiene una suspensión de aspecto lechoso que se arrastra con la solución caliente (38°) de substrato y se pasa al frasco donde quedará en el baño.

Como substrato utilizamos el glicerofosfato sódico en disolución preparada diariamente incluyendo la solución amortiguadora. Empleamos el β -glicerofosfato sódico Merck a concentración final 1/50 molar; por cada 3,2 partes de agua hay 1 parte de sol. amortiguadora (sosa-glicocola, según Sönsen, para pH 9,7 a 37°). Esta concentración del glicerofosfato es óptima para la acción del fermento: escinde cantidades máximas de ácido fosfórico.

Se calienta el substrato a 38° a la vez que se introduce en el baño los envases vacíos. La cantidad de substrato a utilizar en el arrastre y lavado de cada mortero es tal que la relación del peso del intestino a volumen de líquido sea 1/3000 (3 c. c. por cada miligramo de intestino, descontando 1 c. c. de agua que se ha puesto ya en el mortero). A esta concentración la cantidad de P liberado es correctamente medible con el colorímetro.

En el momento en que el substrato caliente entra en contacto con el triturado del mortero, comienza a contarse el tiempo. La cantidad de substrato es más que suficiente para que el lavado del mortero pueda realizarse cuantitativamente. Los frascos con fermento y substrato se mantienen en el baño a 38° hasta que pasan 60 minutos.

Las soluciones tipo de fosfato se preparaban a partir de soluciones madres de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ que contiene 1,5 g. de P en 1000 centímetros cúbicos. (Fosfato monopotásico Merck para análisis, pulverizado en mortero y desecado sobre sulfúrico, del que se pesan exactamente 6,5893 grs. que se disuelven en agua; se añaden 8 c. c. SO_4H_2 al 50 % para aumentar la estabilidad y se completa hasta 1000 c. c. con agua destilada.) Las soluciones diluidas que hemos necesitado contenían 6 y 12 mg. de P % respectivamente (diluir 25 ó 12,5 veces) y se conservaban con 1V gotas de toluol. Dada la influencia del substrato en la producción de color, las tratábamos de igual manera: en dos tubos de ensayo se vierten 1 c. c. de solución tipo de fosfato de 6 y 12 mg. de P % respectivamente; a cada uno se agregan 8 c. c. de substrato con lo que quedan los integrantes de éste a concentración prácticamente igual que en los frascos y se introducen también en el baño.

Durante los 60 minutos de hidrólisis se preparan tubos de ensayo con 3 c. c. de ácido tricloracético al 20 %. Al terminar ese tiempo, se agitan los frascos para homogeneizar su contenido y se toman 9 c. c. de cada uno que se vierten en los respectivos tubos con tricloracético, agitando; a los 10 minutos, se filtra; 6 c. c. del filtrado se pasan a tubos de ensayo para la determinación del fósforo inorgánico. Lo hacemos colorimétricamente por reducción del ácido fosfomolibdico por el clorhidrato de diamidofenol, según variante de Müller. Para evitar los errores colorimétricos debidos a los efectos del ácido tricloracético y del substrato sobre la producción e intensidad del color, hemos utilizado un método de cálculo de Sols que será objeto de una nota próxima.

Expresamos los resultados en mg. de fósforo (P) liberados por gramo de intestino; se toma la media de las determinaciones de las tres muestras contiguas de intestino.

Un grupo de animales se dejó para control y otro fué tratado con Tiroxina (Roche) en dosis de 0,5 mg. al día inyectadas subcutáneamente; algunas de éstas lo fueron además con Percortén (Ciba) intraperitoneal, en dosis de 1 mg. diario.

EXPERIENCIAS

1 Actividad fosfatásica normal

Los trabajos de Bawkin y Bodansky (1933) y Westenbrink (1935) pusieron ya de manifiesto algunas dificultades que presenta la determinación de fosfatasa intestinal, a pesar de la simplicidad teórica, limitada a conocer la cantidad de ácido fosfórico separado de un ester fosfórico dado en cierto tiempo. La velocidad de la reacción disminuye con el tiempo, no tanto por los productos de la reacción como por una posible alteración del fermento. Hay pequeñas diferencias según se hidroliza uno u otro sustrato. La actividad de las soluciones de fosfatasa no es proporcional a su concentración. La concentración del sustrato influye sobre el desarrollo de la reacción. Por otra parte el glicerofosfato y el ácido tricloracético influyen sobre la reducción del ácido fosfomolibdico. Sin embargo, todos estos inconvenientes pueden anularse cuando se verifican todas las experiencias en la más rigurosa igualdad de condiciones, sobre todo, tratándose de estudios comparativos más que de determinaciones de cantidades absolutas de fermento. Así hemos operado siempre de la misma manera, de forma que el sustrato quedaba a concentración 1/50 molar y el volumen de líquido era 3.000 veces el peso de tejido. Tanteos previos nos mostraron que en estas condiciones había prácticamente proporcionalidad entre cantidades de fosfatasa y acción fosfatásica, al menos dentro de límites comprendidos entre la mitad y el doble de una dada. Como las desviaciones por causa del tratamiento con tiroxina no sobrepasaban estos límites, las condiciones eran buenas. En la tabla I se ve cómo tomando trozos de intestino divididos cada uno longitudinalmente en dos iguales, en los que por tanto hay que suponer existe la misma cantidad de fosfatasa, puestos en presencia 1.500 y 3.000 veces su peso de líquido, o de 3.000 y 6.000 veces, respectivamente, se encuentran los mismos valores de actividad fosfatásica al reducir a mg. de P por gramo de tejido.

T A B L A I

Mg. de P/gr. de tejido, liberados a distintas concentraciones de papilla/sustrato

Porción Intestino	Muestras	Concentración	mg. de P/ gr.
A	I	1/1500	71,7
	II	1/3000	72,5
B	I	1/3000	67,5
	II	1/6000	66,9

Las diferencias están dentro de los límites de error del método. Podemos, pues, trabajar con concentraciones de fosfatasa en intestinos dobles o mitad que los normales.

El mismo Westenbrink (1936) estudió la distribución de la fosfatasa a lo largo del intestino delgado de rata, demostrando que era alta al principio del duodeno, tenía un máximo al llegar alrededor de un sexto de la longitud total, para caer progresivamente en las porciones siguientes hasta el grueso. Por esto elegimos para tener un índice de la actividad fosfatásica normal en nuestras condiciones de trabajo, muestras de intestino correspondientes a la zona más rica (a 1/6 de la longitud total a partir del estómago) y otras de una zona media (hacia la mitad del intestino delgado). Los resultados de doce ratas se reúnen en la tabla II.

T A B L A I I

Mg. de P/gr. de tejido, liberados en 60 minutos por la acción de la fosfatasa alcalina intestinal de ratas normales

Rata n.º	Peso g.	Long. intest. delegado (cm.)	Distancias a partir del píloro	
			A 1/6	A 1/2
22	60	70	81,3	30,6
24	65	72	70,1	28,3
26	61	69	60,1	32,0
28	67	71	93,5	30,4
30	85	77	86,8	33,4
36	80	75	65,1	30,1
42	75	74	56,8	29,4
46	78	76	90,6	31,7
54	66	68	67,4	30,4
56	71	75	80,5	32,8
58	82	77	70,0	—
62	79	74	87,3	—
Media			75,8	30,9

Como se observa corrientemente al revisar la bibliografía, hay una variabilidad normal bastante acusada en los distintos animales; sin embargo, gracias a los cuidados puestos en su selección, hemos podido reducir algo tales desviaciones.

Los valores medios que obtenemos son 75,8 mg. de P para la porción óptima y 30,9 mg. para la media, observándose una mayor constancia en los valores de esta última que en los de aquélla.

2. Actividad fosfatásica después de tratamiento con tiroxina

Durante tres o cuatro días se les inyectaba 0,5 mg. de tiroxina por vía subcutánea. Al día siguiente de la última dosis se sacrificaban los animales. Las determinaciones solían hacerse simultáneamente con las de ratas normales. Los resultados de diez ratas se reúnen en la tabla III.

TABLA III

Mg. de P/gr. de tejido, liberados en 60 minutos por la acción de la fosfatasa alcalina intestinal de ratas tratadas con tiroxina

Rata n.º	Peso g.	Long. intest. delgado (cm.)	Tiroxina in- yectada (mg.)	Distancias a partir del píloro	
				A 1/6	A 1/2
23	65	71	2,0	85,7	43,4
25	62	68	1,5	95,5	39,8
27	62	70	1,5	69,5	39,3
31	75	73	1,5	96,8	40,0
33	80	75	2,0	103,4	41,7
35	79	72	2,0	73,5	36,8
39	73	70	1,5	86,7	35,9
43	60	69	2,0	91,9	38,3
55	68	71	1,5	99,0	44,8
57	72	74	2,0	84,8	40,6
Media				88,7	40,1

Se encuentran, por tanto, valores algo más altos que los normales. En la parte de máximo contenido de fosfatasa, el aumento relativo es de 17,1 % dentro de una amplia variabilidad. También aquí hay mayor constancia en la parte media del intestino delgado, lo que permite apreciar más el aumento que viene a ser de cerca del 30 % en relación con lo normal.

3. Actividad fosfatásica tras tratamiento simultáneo con tiroxina y acetato de desoxicorticosterona

Igual tratamiento que en la experiencia anterior, más un miligramo diario de Percortén intraperitoneal. Reunimos datos de cinco ratas en la tabla IV.

T A B L A I V

Mg. de P/gr. de tejido, liberados en 60 minutos por la acción de la fosfatasa alcalina intestinal de ratas tratadas con tiroxina y Percortén

Rata n.º	Peso g.	Long. intest. delgado (cm.)	mg. inyectados de		Distancias a partir del píloro	
			Tiroxina	Percortén	A 1/6	A 1/2
37	60	72	1,5	3,0	66,9	38,9
41	68	76	1,5	3,0	116,9	50,1
51	65	75	1,5	3,0	77,5	37,7
53	72	78	2,0	4,0	95,1	40,4
61	63	70	1,5	2,0	80,0	37,6
Media					87,5	40,9

Como se ve en ella, el Percortén no modifica, al menos aparentemente, el efecto tiroxínico, aun cuando aisladamente se haya obtenido en un caso valores que superan los de aquél.

4. Curso de la actividad fosfatásica a lo largo del intestino en ratas normales y tratadas con tiroxina

Los resultados precedentes nos indujeron a estudiar cómo variaba, por efecto de la tiroxina, la actividad fosfatásica a lo largo del intestino. Tomamos cuatro ratas de las que dejamos dos para control, mientras las otras dos recibían 0,5 mg. diarios de tiroxina durante cuatro días consecutivos. Las muestras dobles de intestino delgado se tomaban de 1/8 en 1/8 de su longitud total. Los resultados obtenidos son los de la tabla V que se representan gráficamente en la figura 1.

T A B L A V

Mg. de P/gr. de tejido, liberados en 60 minutos por la acción de la fosfatasa alcalina intestinal de ratas normales y tratadas con tiroxina

Rata n.º	Peso g.	Long. intest. delgado (cm.)	Distancias a partir del píloro							
			Inicial	1/8	2/8	3/8	4/8	5/8	6/8	7/8
Normales										
64	70	73	60,2	70,8	56,3	42,5	32,4	26,0	24,2	23,0
66	77	75	63,0	79,2	66,1	48,1	31,2	30,5	27,3	22,2
Con tiroxina										
63	66	71	65,8	82,7	69,2	56,4	42,7	38,3	32,0	26,2
65	80	76	70,6	90,4	75,0	63,6	45,2	40,5	34,3	24,7

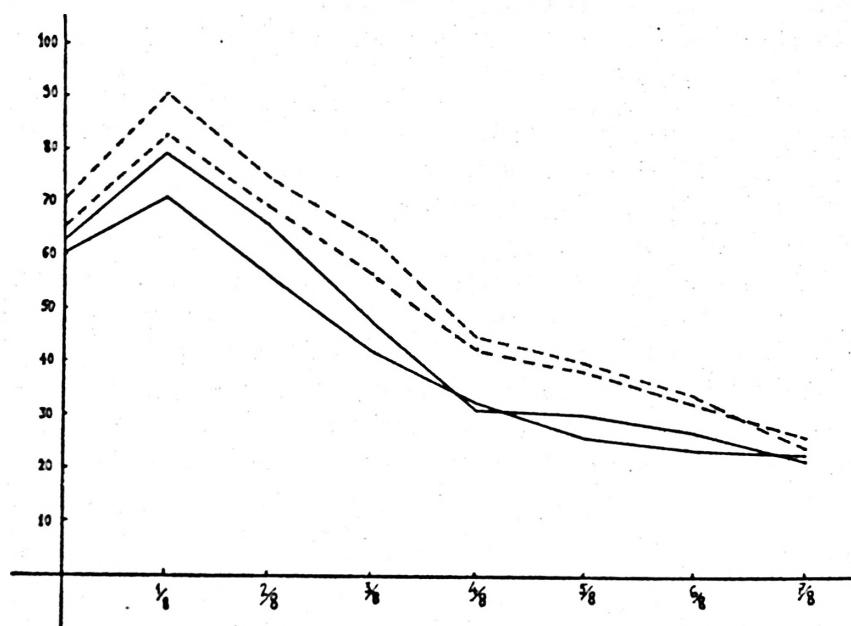


Fig. 1. — Curso de la actividad fosfatásica a lo largo del intestino delgado. Ordenadas, mg. de P. g. de tejido, liberado en 1 hora; abscisas, distancias a partir del píloro en fracciones de su longitud total.

Ratas normales: —————; con tiroxina: - - - - -

Indica cómo hay un aumento de actividad fosfatásica que si es algo confuso y discutible en la zona de máximos valores entre $1/8$ y $1/6$ debido a la gran variabilidad entre los animales del mismo grupo, se manifiesta mejor en la porción media del intestino, entre los $3/8$ y $6/8$ de su longitud, por ser menores las desviaciones.

Discusión de los resultados

El aumento de la actividad fosfatásica observado por el tratamiento tiroxínico no es muy considerable. Un 17 o un 30 % no es mucho cuando estamos acostumbrados a ver en la bibliografía aumentos del 100, 200, 500 o aún más por ciento. La reducción que encuentran Kutscher y Wüst por suprarrenalectomía es del 50 %. Sin embargo, el que hemos observado parece bastante constante. ¿Explica esto suficientemente los trastornos de igual origen en la absorción de glúcidos? No hay bastante fundamento para responder afirmativamente, pero tampoco puede desecharse tal posibilidad. Además, no conocemos aún la misión que realmente desempeña la fosfatasa en la absorción de glúcidos; porque o realiza su esterificación con el ácido fosfórico para que pueda penetrar en la célula de la mucosa, o hidroliza el ester fosfórico, ya formado por otro procedimiento e ingresado en la célula, para que pueda ser cedido a la sangre, o realiza ambas acciones. Sperber (1941) ha demostrado la participación de las fosfatasas de las células de levadura de pan en la absorción por ellas de aneurina que sólo consiguen previa fosforilización y paso a cocarboxilasa. Bien sabido es que la riqueza en fosfatasas intestinales se debe casi exclusivamente a la mucosa (Gomori 1941).

En todo caso Westenbrink ha puesto de manifiesto la no correlación entre contenido de fosfatasas y velocidades de absorción. El incremento o disminución de las de glucosa, por ejemplo, que se observa tras preparación de los animales con una dieta rica en glúcidos o en grasa respectivamente (Donhofer, 1942), no se acompañará, de acuerdo con las experiencias de Westenbrink, de variación del contenido de fosfatasas. Hay que admitir, por tanto, que el organismo posee medios para modificar la velocidad de absorción sin necesidad de que el

fermento aumente o disminuya. Aun suponiendo tan simple la absorción de glúcidos que no intervinieran más que una esterificación para penetrar en la mucosa y una desesterificación para pasar a la sangre, la velocidad sería dependiente por una parte de la actividad del fermento, pero por otra de la rapidez con que desapareciera la glucosa de la sangre, pues de esto depende el equilibrio célula-sangre que a su vez condiciona el de luz intestinal-célula. Y la actividad del fermento puede estar influenciada por múltiples factores; no hay pruebas, sin embargo, para referir la activación por la tiroxina a variaciones del Zn o Mg en la célula de la mucosa, átomos metálicos que, según Cloetens (1941), son los esenciales para la actividad de las fosfatasas alcalina. El estado metabólico de la célula, alterado por la tiroxina, puede modificar de manera aun desconocida los procesos de absorción que no cabe explicar de modo tan simplista como antes hemos supuesto. Csaky (1943), por ejemplo, nos habla de que el monoéster fosfórico formado durante la absorción, debe estar en equilibrio con el fructosa 1-6-difosfato.

Puede también hablarse de una activación «in vivo» de la tiroxina sobre las monofosfatasas.

Resumen y conclusiones

Se investiga la actividad de la β -glicerofosfatasa alcalina de intestino de rata tras tratamiento con tiroxina.

Se encuentra un ligero aumento evaluado en un 17 % en la zona más rica del intestino delgado y en 30 % en su porción media.

Se estudia el curso de la actividad fosfatásica a lo largo de intestino comprobando los datos precedentes. El aumento más aparente se encuentra entre los 3/8 y 6/8 de su longitud total a partir del píloro.

No se modifican apenas estos resultados por administración de acetato de desoxicorticosterona.

Summary

It is tested the activity of alkaline B-glycerophosphatase of rat intestine after being treated with tyroxine.

It is found a light increase evaluated in a 17 per cent in the richest zone of Small intestine and in a 30 per cent in his meadle portion.

We study the course of the phosphatasic activity thru the intestine and are veriflicated the preceding data. The most aparently increase is observed Between the 3/8 and 6/8 of his total length parteing of pilorics.

This data are not very much modiflicated for desoxycorterone acetate administration.

Zusammenfassung

Bei Fatten wird die Tätigkeit der Alkali-glycerophosphatase der Dünndarm nach Thyroxinbehandlung, untersucht.

Man findet eine leichte Erhöhung auf 17 % gehätzt in der reichsten Zone des Dünndarmes und auf 30 % in deh mittelstück.

Man untersucht weiter die phosphatasische Aktivität in ganzen Dünndarm-Verlauf und bestätigt die obigen Daten. Die anscheinend grösste Zunahme findet man zwischen 3/8 und 6/8 seine Länge von Pylorus aus gemessen.

Diese Resultate verandern sich kaum durch Verabreichung von desoxycorticosteron-acetat.

Bibliografia

- AUSTONI, B. e h. G. COGGI : Arch. ital. Chir. 37, 313, 1934.
 CERA, B. : Riv. Clin. pediatr. 39, 97, 1941.
 CLOETENS, R. : Biochem. Z. 308, 37, 1941.
 CSAKY, T. : Hoppe Seylers Z. 277, 47, 1943.
 DONHOFFER. Sz. : Pflügers Arch. 246, 92, 1942.
 DUDLER, W. : Tesis, Bern, 1942.
 HERR, B. Diss. Muenster, 1934.
 GOMORI, G. : cellul. a comp. Physiol, 17, 71, 1941.
 IRVINA, L. H.-J. Deuticke : Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 24, 559, 1927.
 JIMÉNEZ DÍAZ y col. : Rev. españ. Enferm. Apar. digest. 1, gest. 1, 5-20, 1935. “
 KAY, H.-D. : Biochem. J. 22, 855, 7928.
 KUTSCHER W y H. Wüst : Hoppe Seylers Z. 273, 235, 1942.
 MÜLLIX, E. : Hoppe Seylers Z. 35, 237, 1935.
 PONZ, F. : Rev. Esp. Fisiol. 1, 9, 1945.
 SCOZ G. y P. L. MARANGONI : Boll. Soc. ital. Biol. Sper. 9, 973, 1934.
 SPERBER, E. Naturw. 29, 765, 1941.
 WESTENBRINK, H. G. K. : Arch. Néerl Physiol. 20, 567, 1935.
 WESTENBRINK, H. G. K. : Arch-Néerl. Physiol. 21, 18, 1936.