

Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Barcelona
(Prof. Juan Jiménez Vargas)

Cátedra de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
de la Universidad de Barcelona.
(Prof. Francisco Ponz)

Nueva técnica para el estudio de la absorción intestinal y datos para la mejor interpretación del mecanismo de la absorción selectiva de glúcidos en relación con la fosfatasa de la secreción intestinal.

por **A. SOLS y F. PONZ**

(Recibido para publicar el 31 de Agosto de 1946)

SUMARIO

	<u>Págs.</u>
Introducción	284
MÉTODOS	
Determinación de fosfatasa	289
Determinación de fósforo	295
Extracción de fosfatasas de intestino	297
Determinación de azúcares	297
Experiencias de absorción	300
PARTE I	
Nueva técnica para el estudio de la absorción intestinal ...	302
Aplicación de la técnica a perros	305
Aplicación de la técnica a ratas	311
Determinación de azúcares	314
Comprobación	317
PARTE II	
Datos para la mejor interpretación del mecanismo de la selectividad	324
1. Secreción de fosfatasa durante la absorción de azúcares selectivos y no selectivos	324
2. La absorción de glucosa «en circulación por asa abierta»	329

3. Acción de los inhibidores de las fosfatasas sobre la absorción selectiva	333
4. Aceleración de la absorción selectiva por la adición de fosfatasas	338
5. Sobre el pH óptimo para la absorción de azúcares selectivos	345
6. Participación del fósforo segregado en la absorción selectiva	349
7. Sobre la naturaleza del fósforo de la secreción intestinal	356
8. Síntesis de ésteres hexosafosfóricos por fosfatasa de secreción intestinal	358
DISCUSION	362
RESUMEN	372
BIBLIOGRAFIA	376

INTRODUCCION

La absorción selectiva de glúcidos por el intestino ha sido tan firmemente establecida que no deja lugar a la menor duda. El hecho consiste en que algunos de ellos son absorbidos preferentemente a otros, sin que se pueda explicar este distinto comportamiento por simples factores físicoquímicos. Así, de dos hexosas, glucosa y levulosa, la primera es absorbida a mayor velocidad que la segunda. Más aún, las hexosas, de mayor molécula que las pentosas, son absorbidas considerablemente más de prisa que éstas. La manifestación absoluta de selectividad está en que la absorción de estos azúcares tiene lugar a velocidad constante (para cada uno) con práctica independencia de la concentración en luz intestinal, y por consiguiente con independencia de las diferencias de concentración a ambos lados del epitelio intestinal (CORI y GOLTZ, 32).

Por lo demás, la absorción selectiva no es exclusiva de determinados azúcares, al menos en algunos aspectos. Así, los aminoácidos (o al menos algunos de ellos) se absorben a velocidad constante con independencia de la concentración (CORI, 29). Y también para las grasas existen ciertas selectividades de absorción.

El conocimiento de este hecho fisiológico data de comienzos de siglo (HÉDON en 1900 (61) y NAGANO en 1902 (110)). Ya a fines del pasado se acercaron algunos, atisbando parcialmente el hecho, singularmente HÖBER, en 1899 (63). Pero es sobre todo a partir de los trabajos de CORI (1925 y siguientes), de la escuela de VERZÁR, de WESTENBRINK, etc., cuando se ha llegado a un conocimiento amplio de las características de la absorción selectiva.

La selectividad tiene distintos grados. Hay una serie de transiciones entre las hexosas más absorbibles (galactosa y glucosa) y la pentosa menos absorbible (l-arabinosa). Los escalones fundamentales del conocimiento de esta gradación son :

Cualitativos :

HÉDON (1900) : glucosa > galactosa > arabinosa

NAGANO (1902) : galactosa > glucosa > levulosa > manosa
xilosa > arabinosa

Cuantitativos : Dando a la glucosa el valor de 100 y expresando los demás en % con respecto a la glucosa.

CORI (1925) (28) :

galactosa	110
glucosa	100
levulosa	43
manosa	19
xilosa	15
arabinosa	9

WILDBRANT y LASZT (1933) (151) :

galactosa	115
glucosa	100
levulosa	44
manosa	33
xilosa	30
arabinosa	29

Resalta que la levulosa ocupa un lugar intermedio entre los extremos de mucha y escasa absorción. Coincide con ello el comportamiento en función de la concentración, encontrado por VERZAR (133) : glucosa y galactosa se absorben a velocidad constante, manosa y pentosa en función de la concentración en luz intestinal ; la levulosa se absorbe o no con independencia de la concentración según la magnitud de ésta.

Por otra parte resalta que no hay identidad de resultados para los distintos autores que han estudiado el problema (esto aun limitándonos a citar los más representativos). Estas divergencias pueden obedecer a tres factores : diferencias de estructura molecular en los azúcares, diferencias de técnicas, diferencias de especie animal y de tramo intestinal en que estudia.

En cuanto a diferencias en la constitución de los azúcares se ha encontrado que la d (+) xilosa se absorbe más de prisa que la l (—) xilosa (WESTENBRIK, 147). DAVIDSON y GARRY (40) han presentado después un estudio más completo del comportamiento de distintas pentosas :

					absorción (relativa)
d	(+)	xilosa	.	.	17,3
l	(—)	xilosa	.	.	10,1
d	(—)	arabinosa	.	.	9,5
l	(+)	arabinosa	.	.	8,6
d	(—)	ribosa	.	.	10,7

Las diferencias de técnica, esenciales o secundarias, pueden influir considerablemente. Ante todo, como invocan WILBRANDT y LASZT (151), cuando se comparan los dos métodos fundamentalmente usados, CORI, y asa aislada, por participación en el primero de influjos sobre la motilidad del tracto gastrointestinal, con aceleración o retardo del transporte de las sustancias a absorber. Además, como indicó WESTENBRINK (144) por diferencias en el régimen alimenticio previo del animal y tiempo de ayuno preparatorio. Y aun diferencias de ejecución dentro de un mismo método, en cuanto a duración de la experiencia, anestésico, etc. Este último factor puede ser muy importante, por ejemplo el amital inhibe casi totalmente la absorción de glucosa en el perro (OLMSTED y GIRAGOSSINTZ, 114).

Y por último, decíamos, diferencias de especie animal. Desde luego la absorción selectiva es un hecho ampliamente establecido en fisiología comparada. Se ha demostrado en mamíferos: conejo (HEDON), perro (NAGANO), gato (HEWITT, 62), rata (CORI, 28), cobayo (FORNAROLI y FABIETTI, 52). Para el hombre se demostró por MACCANCE y MADDERS, 104). En aves (WESTENBRINK, 147) y animales de sangre fría (WESTENBRINK y GRATAMA, 149).

Pero distan mucho de ser constantes las proporciones de selectividad en distintos animales. Por ejemplo, WESTENBRINK (147) da los siguientes valores para rata y paloma:

	rata	paloma
d — galactosa	108	115
d — glucosa	100	100
d — levulosa	42	55
d — manosa	15	33
l — xilosa	13	33
l — arabinosa	2	16

Aunque el investigador es el mismo, los métodos fueron distintos. Por ello tiene más fuerza la diferencia encontrada, en igualdad de condiciones técnicas, por LÓPEZ NAVARRO (95) entre rata y cobayo: en la rata obtiene una relación glucosa/xilosa del orden de 100/25, y en el cobayo de 100/66.

Un factor importante de selectividad es el tramo intestinal que se considere. En general, la absorción selectiva se refiere al delgado. En el grueso no la hay apreciable. Pero dentro del delgado se encuentran diferencias más o menos acusadas entre partes proximales y distales, entre yeyuno e íleon. Singularmente en el gato se ha encontrado una desaparición casi total de la absorción selectiva en el íleon (DAVIDSON y GARRY (39). En contraste con el intestino, CORI y GOLTZ (33) encontraron que desde la cavidad peritoneal se absorben lo mismo pentosas y hexosas.

En el intestino muerto aumenta la difusión, pero desaparece la

absorción selectiva: la xilosa se absorbe algo más de prisa que la glucosa. También desaparece en el intestino vivo manteniendo a temperatura baja, inferior a 20° (AUCHINCLOSS, McLEOD y MAGEE (7)).

La interpretación del mecanismo de la absorción selectiva dista aún bastante de estar resuelta. Ya HÖBER invocaba una actividad vital de las células del epitelio intestinal que transformaba el azúcar... VERZÁR (132) sostenía en principio que esta transformación consistía en la síntesis de glucógeno y que la absorción selectiva dependía de ella y no de un proceso de absorción particularmente activo.

Son WILBRANDT y LASZT (151) y LUNDGAARD (96) quienes partiendo de distintos fundamentos llegaron simultáneamente (1933) a la hipótesis de que la transformación del azúcar en la mucosa intestinal que condicionaba su absorción selectiva era un proceso de fosforilización. VERZÁR (124), se adhirió a esta hipótesis. Muchos trabajos posteriores hablan en favor de ella; otros en contra. CORI no la admitía todavía en el año 1941 (31). El propio LUNDGAARD decía en 1939 (98) que la teoría de la fosforilización para explicar la absorción selectiva «debe considerarse como pura hipótesis de trabajo». Y en opinión ajena, DANIELLI (41) dice recientemente refiriéndose a ella «Esta teoría requerirá, desde luego, un examen experimental mucho mayor antes de que pueda ser considerada como correcta».

Ha habido muchas más teorías, pero la que goza con mucho de mayor predicamento, pese a las impugnaciones mencionadas, es la de la fosforilización, según la definición de WILBRANDT y LASZT: «Las hexosas son fosforilizadas en la pared intestinal, las pentosas no. Por la fosforilización aumenta la caída de difusión de la hexosa libre, con lo que la absorción se acelera».

Los hechos experimentales o de observación en que se apoya la teoría de la fosforilización han sido: 1) para WILBRANDT y LASZT, la inhibición de la absorción selectiva por el ácido monoyodoacético, inhibidor de la fosforilización en los tejidos.

2) Para LUNDGAARD el testimonio de KAY (70) de ser el intestino el tejido más rico en fosfatasa (entonces no se conocía la fosfatasa ácida de la próstata), seguido de cerca por el riñón, el otro órgano en que se da una absorción — reabsorción — selectiva de azúcares, junto con la inhibición por la florricina, inhibidor clásico también de las fosforilizaciones.

3) El antiguo hallazgo de MAGEE y REID (100) de la aceleración de la absorción de azúcares selectivos por la presencia de fosfatos, hecho que aun rebatido experimentalmente por LASZT en cuanto a especificidad (87), ha venido a ponerse de nuevo en primer plano por

el estudio del comportamiento del fósforo segregado por el propio intestino, iniciado recientemente por el mismo LASZT (89).

4) Por otra parte, la demostración «in vitro» de la esterificación de la glucosa con el ácido fosfórico por extractos de mucosa intestinal, ya mencionada por KAY en 1928 (70) y estudiada por WILBRANDT y LASZT en 1933 (151).

5) El aumento de fósforo orgánico en la mucosa intestinal durante la absorción de hexosas (LASZT y SÜLLMANN, 91) vino también a apoyar esta hipótesis.

En contran hablan una serie de observaciones. Singularmente resalta el estudio estadístico realizado por WESTENBRINK (146) en ratas del que deduce no existir relación entre contenido de la pared intestinal en fosfatasas y cuantía de absorción de azúcares selectivos.

La fosforilización de los azúcares está condicionada evidentemente a la presencia de fosfatasas. Pero fosfatasas no sólo hay en las células de la mucosa, sino también en la luz intestinal. Ninguno de los que hasta ahora han estudiado la absorción selectiva ha atendido a esta existencia de fosfatasas en la luz.

Bajo nuestra dirección, LÓPEZ NAVARRO (95) ha realizado un detenido estudio sobre la secreción intestinal de fosfatasas, que debe tener un indudable interés fisiológico. Nos propusimos investigar en el presente trabajo el posible influjo de la fosfatasa segregada, en la absorción selectiva. Esto exigía algunas experiencias imposibles de abordar por las técnicas de absorción conocidas y que han podido en cambio llevarse a cabo mediante un procedimiento original, el que, por otra parte, se presta a multitud de aplicaciones en las investigaciones de absorción de toda clase de sustancias hidrosolubles, aumentando considerablemente las posibilidades de trabajo.

MÉTODOS

Los métodos utilizados son tanto bioquímicos (determinación de fosfatasas, de azúcares, de fósforo, extracción de fosfatasas, esterificación de azúcares) como de experimentación animal para el estudio de la absorción «in situ». Algunos de ellos son completamente originales y en los demás hemos introducido modificaciones que nos aconsejaba la práctica.

DETERMINACION DE FOSFATASAS

En el orden técnico, la primera dificultad radica en el difícil manejo de las técnicas de determinación de fosfatasa cuando se las quiere utilizar fuera de los caminos trillados para que fueron propuestas.

Así si JIMÉNEZ DÍAZ y colaboradores (67) decían a propósito de la determinación de fosfatasa (alcalina) del suero que «siendo una técnica cuidadosa y larga [emplean la de KAY] es lento el acopio de experiencia» y AMMON y CHYTREK (5) algo más en general, que «desgraciadamente la determinación de fosfatasa no es suficientemente sencilla para un laboratorio clínico, de modo que la valoración de las determinaciones de fosfatasa no es universalmente realizable». KAY (70), abordando el problema de la determinación de fosfatasa de tejidos, enumeraba una serie de dificultades concretas concluyendo que «es imposible evitar todas estas posibles fuentes de error».

Así nos ocurrió que comenzamos intentando aplicar el método de BODANSKY (15, 16 y 19) que ya desde tiempo antes veníamos utilizando para fosfatasa sérica.

Advirtiendo o sospechando una serie de causas de error procedimos a interrumpir el camino conducente a investigar la misión de la fosfatasa en el mecanismo de la absorción selectiva, para dedicarnos a resolver los distintos problemas que presentaba el manejo de las fosfatasa en las múltiples condiciones proyectadas. Inicialmente adoptamos la técnica de uno de nosotros, que ya dió buenos resultados en manos de LÓPEZ NAVARRO (l. c.) en su estudio cuantitativo y cualitativo sobre las fosfatasa de la secreción intestinal. Posteriormente hemos introducido modificaciones hasta llegar a la técnica que en nuestros protocolos calificamos de «decimal» y de la que expondremos el plan general y todas las variantes utilizadas en los trabajos objeto de la presente memoria.

Hemos conservado la expresión de valores fosfatásicos por la clásica unidad de BODANSKY por parecernos lógica y ser ya universalmente conocida. En realidad su base fundamental fué ya propuesta por LEVENE y DILLON (93) y consiste en referir la unidad de la fosfatasa a la cantidad de la misma que libera en 1 hora 1 mg. de fósforo de un substrato de glicerofosfato sódico.

Como sustrato utilizamos β -glicerofosfato sódico, cristalizado, o algunos glicerofosfatos anhidros comprobados equivalentes al beta en hidrólisis comparadas a la misma molaridad de 1/50. Como tampón, el acetato veronal de MICHAELIS (107) que permite toda la gama de pH desde el óptimo de las fosfatasas alcalinas hasta por debajo del de las más ácidas conocidas. Dada la propia capacidad tampón del glicerofosfato hemos modificado la preparación de la serie de MICHAELIS para que no resulte un desplazamiento del pH deseado. Tiempo de hidrólisis, una hora. Temperatura, 37°.

La disposición de reactivos se ha planeado según una concepción decimal que facilita cálculos y utilización de múltiplos o submúltiplos. Como tipo, el volumen de mezcla hidrolizante asciende a 10 c. c. Para todos los reactivos sirve la fórmula :

$$C_f = C_i \frac{V}{10}$$

Se reserva un volumen para la eventual adición de activadores e inhibidores, u otras sustancias cuyo efecto se quiere estudiar : en defecto de ellos se completa con agua.

La hidrólisis se interrumpe por adición de ácido a concentración suficiente para desplazar el pH a tal extremo que suspenda totalmente la misma.

Esto tiene lugar según los casos en dos formas distintas, en la técnica ordinaria por el tricloroacético destinado a desalbuminizar, en la simplificada, para líquidos tan pobres en proteínas que hacen superflua aquélla, por la adición directa del reactivo de ácido molíbdico destinado ya a la valoración del fósforo inorgánico. Más adelante demostraremos la licitud de este proceder. La reducción del complejo fosfomolíbdico la realizamos de preferencia con el 2-4-clorhidrato de diamidofenol (Amidol) propuesto por MÜLLER (109).

Para desarrollo del color dejamos transcurrir un cuarto de hora, de preferencia en el baño a 37°. No hay inconveniente en que transcurra más tiempo, incluso horas y aun días, el color sigue aumentando muy lentamente en intensidad después de los primeros 15 minutos, pero el resultado es siempre el mismo dado nuestro método colorimétrico ; prácticamente, el aumento de color puede considerarse como «aumento de impurezas», automáticamente compensadas.

Para la colorimetría empleamos el sistema para corrección

automática de aparentes desviaciones a la ley de Beer, mediante el uso de dos soluciones standard, según uno de nosotros (122). El glicerofosfato utilizado como sustrato para las fosfatasas ejerce una acción inhibidora sobre el desarrollo del azul de molibdeno de los métodos usuales en la determinación del fósforo. Este factor, sumado a la ya delicada especificidad de la reacción y a la interferencia del tricloroacético utilizado para desalbuminizar, complica extraordinariamente el problema. Ya BODANSKY (15) dedicó un valioso trabajo sólo a la solución de este problema. Su insuficiencia se deduce de las siguientes experiencias realizadas por nosotros:

Por una parte, a los factores mencionados hay que agregar la casi inevitable presencia de impurezas. Con ausencia de glicerofosfato, en pura determinación de fósforo, es ya difícilísimo suprimirlas por completo. Para lograrlo tuvo que purificar NORBERG (113) reactivos pro analysi. Pero el glicerofosfato representa un grave peligro de introducción de impureza, de fósforo inorgánico, ya inicial o al menos por hidrólisis espontánea de la solución conservada. A esta impureza no atendía BODANSKY en sus tablas para el cálculo de fosfatasas. Que la hidrólisis espontánea puede influir en los resultados ha sido señalado por varios. Pero no así a la impureza inicial del producto, que puede ser considerable. A continuación damos reunidos los resultados de comparar entre sí standards de fósforo adicionados de cuatro glicerofosfatos distintos a la concentración constante de M/50 y disueltos inmediatamente antes de uso:

Lecturas colorimétricas

Standards 6 mg. %

Merck, cristalizado	20
McKesson	20,2
Boheber	19
Sociedad Anónima Farmacéutici, Italia.	12,2

A concentraciones elevadas de fósforo, el azul de molibdeno no sigue la ley de Beer, debiéndose diluir, según BODANSKY, el filtrado desalbuminizado sobrante. Con esto se introduce un error, ya que dejan de ser constantes las concentraciones de las sustancias interferentes. Para evitar tales errores, hemos

seguido la técnica de mezclas diluidoras expuesto en otro trabajo (123).

La supresión de la desalbuminización ha venido a simplificar extraordinariamente la determinación en serie de fosfatasas de líquidos o extractos de órganos cuya desproporción entre contenido de fosfatasas y otras proteínas hace que a la dilución de los mismos a que se efectúa la determinación de fosfatasas, sea insignificante la presencia de proteínas en cuanto a perturbación de la determinación colorimétrica del fósforo. La siguiente experiencia demuestra la licitud de su empleo.

Fosfatasa: autolizado intestino rata al $1/100 \times 1/3$.

Medias de determinaciones duplicadas.

Técnica ordinaria: 19,1 UB % (= 57,3 UB/gr.)

Técnica simplificada: 19,0 UB % (= 57,0 UB/gr.).

La elección de esta técnica simplificada es consecuencia de un tanteo previo en la siguiente forma: 1 c. c. problema + 9 centímetros cúbicos de agua + 2 c. c. de tricloroacético al 30 %; mezclar. Si pasan un par de minutos sin enturbiamiento notorio, puede utilizarse la simplificación.

Reactivos

1. — β -glicerofosfato sódico M/10: 3,06 gr. % de sal cristalizada, ó 2,16 % de sal anhidra.

2. — Solución tampón madre acetato-veronal M/7 de Michaelis:

9,714 gr. de acetato sódico (cristalizado con tres moléculas de agua), más 14,714 gr. de veronal sódico; disolver en agua y completar hasta el volumen de 500 c. c.

Tampones para uso:

pH.	Sol. madre.	ClH N/10.	acético N.	agua
9,4	20 c. c.	—	—	h. 100 c. c.
9	"	1,6 c. c.	—	"
8	"	10,4	—	"
7	"	24,0	1,0 c. c.	"
6	"	28,4	2,6	"
5	"	35,0	4,4	"
4,5	"	42,0	6,6	"
4	"	50,0	17,0	"

3. — Ácido tricloroacético al 30 %.

4. — Reactivo molíbdico: Molibdato amónico al 2,5 % en sulfúrico aproximadamente 3N. 25 gr. de molibdato amónico se pulverizan en mortero y se suspenden en unos 200 c. c. de agua; esta suspensión se añade a 300 c. c. de ácido sulfúrico aproximadamente 10 N colocados en un matraz aforado a 1.000 c. c., completando este volumen con agua.

5. — Reductor: 2-4 clorhidrato de diamidofenol (Amidol) al 0,5 % en sulfito sódico al 5 %. Es inestable. Debe conservarse en frasco oscuro y al resguardo del aire (de preferencia bajo una capa de aceite de parafina). Aun así se altera en pocos días (una o dos semanas a lo sumo). Se manifiesta la alteración por el desarrollo de una coloración parduzca marcada. Sólo debe utilizarse el reactivo incoloro o débilmente coloreado. Un grado discreto de alteración no introduce ningún error, dado nuestro sistema colorimétrico.

6. — Standards de fósforo.

a) Sol. madre de fósforo al 1 ‰. Unos 5 gr. de fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) para análisis, pulverizado en mortero, se desecan sobre sulfúrico. Se pesan exactamente 4.393 gr. y se disuelven en agua en un matraz aforado de litro; se añaden unos 8 c. c. de ácido sulfúrico diluido al medio y se completa con agua hasta los 1.000 c. c. Se conserva indefinidamente.

b) Soluciones standards para uso: la sol. madre descrita se diluye al 1/20 y 1/10 dando soluciones que contienen respectivamente 5 y 10 mgr. % de P. Ambas se conservan bastante tiempo por adición de unas gotas de toluol. Nosotros las renovamos cada 1-2 meses. La solución de 5 mgr. % se utiliza como standard habitual y la de 10 mgr. % como elemento de comparación, base del sistema de cálculo colorimétrico.

Técnica

En doble número de tubos que problemas (y mejor triple, para duplicar las fosfatasas), más dos tubos para los standards, se ponen 2 c. c. de glicerofosfato M/10 (reactivo 1), 5 c. c. del tampón correspondiente (habitualmente, para fosfatasas intestinales, el de pH 9,4) y 2 c. c. de agua (o sol. de activador o inhibidor) (1). Se llevan al baño a 37°, uno (o dos) tubos por

(1) Si se trabaja en serie y no se precisa utilizar ningún activador ni inhibidor es más práctico diluir al 1/2 el glicerofosfato (M/20) y poner 4 c.c. de la dilución.

problema. Entre tanto se calientan, se ponen a los reservados para standards 1 c. c. de las soluciones de P de 5 y 10 mg. % respectivamente.

Después de calentados los tubos llevados al baño (unos 5') se pone en cada uno (o en cada dos) 1 c. c. del problema correspondiente, mezclando y anotando la hora exactamente. Trabajando en serie ponemos en marcha un reloj avisador después de preparado el primer tubo y cuidamos de preparar los demás con intervalos regulares (15 ó 30''); con el mismo ritmo, pasados los 60' del primer tubo, se añaden los 2 c. c. del tricloraacético o molíbdico.

En el tubo problema que no se llevó al baño se ponen 2 centímetros cúbicos de tricloraacético o molíbdico antes que el problema. Así, no pudiendo desarrollar su acción la fosfatasa, servirá para determinación de fósforo inorgánico.

En la técnica ordinaria, pasados 10' desde la adición del tricloraacético se filtran los problemas y se trasladan a otros tubos 5 c. c. de cada uno. Se añade a los standards 2 c. c. de tricloraacético y 2,1 c. c. de molíbdico y a los problemas 1 c. c. y a todos en serie, reductor: 2,4 c. c. a los standards y 1 c. c. a los problemas.

En la técnica simplificada, después de añadidos los 2 c. c. de molíbdico a los tubos de fosfatasa y standards (los tubos de fósforo ya lo llevaban), se añade directamente 2 c. c. de reductor a cada tubo.

Después de un cuarto de hora de la adición del reductor se llevan al colorímetro, comparando con el standard 5, de preferencia a 20 mm. — si se usa colorímetro tipo Duboscq — el standard 10 y todos los problemas. En las estaciones frías del año conviene mantener los tubos en el baño durante este cuarto de hora para facilitar el desarrollo del color.

Si algún problema da lectura inferior a 5 mm. (con standard a 20) se procede a preparar una «mezcla diluidora final» (MDF) de composición análoga a los standards, pero con agua en lugar de solución de fósforo y se diluye 1 c. c. del mismo con 5 de la MDF, comparando con el standard 5 después de cinco minutos.

Los resultados se calculan mediante las fórmulas:

$$I = \frac{C_s (2 L_{2s} - L_s)}{L_s - L_{2s}}$$

$$y \quad \frac{(C_s + I) L_s}{L_p} - I = \text{mg. de P \%}$$

o más sencillamente mediante las tablas colorimétricas (122).

El valor de actividad fosfatásica en unidades BODANSKY es igual a las diferencias entre el fósforo inorgánico total y el inicial (tubos de fosfatasa y fósforo respectivamente).

Observaciones

1.^a Cuando se disponga de escasa cantidad de un líquido puede reducirse su consumo a la mitad, haciéndolo también con los demás reactivos.

2.^a Como decíamos, es aconsejable efectuar determinaciones duplicadas de fosfatasas. Es superfluo hacerlo del fósforo cuando el objeto es sólo la fosfatasa. Con todo el método ofrece escaso riesgo de errores accidentales de consideración, particularmente en la técnica simplificada.

3.^a En la técnica ordinaria, si se trabaja en serie, puede resultar más cómodo y rápido el agregar de una vez molíbdico y reductor (4, 8 c. c. ó 2 c. c. de su mezcla, preparada para uso inmediato). Experimentalmente hemos comprobado la identidad de resultados.

Determinación de fósforo inorgánico de contenido de asas

Dada la pequeñez de su cantidad procedíamos inicialmente a diluir el contenido de cada asa sólo a 10 c. c. Pero como esto presentaba inconvenientes por probable insuficiencia de lavado y requería diluciones posteriores para determinación de fosfatasas y, por otra parte, ni aun así la concentración de fósforo era suficiente para practicar una determinación correcta con la técnica expuesta de fosfatasas y fósforo, ni siquiera haciendo determinaciones aparte con supresión del glicerofosfato innecesario, procedimos a planear una técnica que se adaptara bien a las circunstancias del caso.

Llegamos a ella sobre las dos bases fundamentales siguientes: aumentar al máximo la proporción de líquido problema que entrase por determinación, y aumentar también al máximo el color desarrollado a igualdad de fósforo.

Lo primero se consiguió procediendo en la forma que exponemos a continuación ; lo segundo utilizando para la reducción del complejo fosfomolibdico cloruro estannoso, que dando unas cuatro veces más color que los reductores fotográficos, apenas es menos seguro, desde la introducción de la colorimetría de dos standards.

Reactivos :

- 1.—Ácido tricloroacético al 30 %.
2. — Reactivo molibdico : el mismo utilizado en la técnica de fosfatasas.
3. — Cloruro estannoso al 1 % recientemente preparado a partir de una solución al 60 % en ácido clorhídrico, conservada en frasco de tapón esmerilado, de buen cierre y en la nevera. Para preparar la dilución se colocan 60 c. c. de agua en un matraz y se añade 0,1 c. c. de la sol. madre, mezclando bien.

Con nuestro método no es necesario un ajuste exacto de la concentración final del cloruro estannoso, sobre lo que tanto se ha insistido desde el trabajo de KUTTNER y COHEN (81), sino que se puede efectuar la dilución sencillamente con una pipeta que dé aproximadamente XXX gotas por c. c., desde la que se dejan caer III gotas sobre los 60 c. c. de agua.

4. — Standards de fósforo de 0,2 y 0,4 mg. %, preparados a partir de la sol. standard de 5 mg. %, utilizada en la técnica de fosfatasas (diluida al 1/25 y 2/25 respectivamente) y conservadas por adición de III o IV gotas de toluol.

Técnica

A 5 c. c. del contenido de asa diluida se agrega 1 c. c. de ácido tricloroacético al 30 %. Después de 10' se filtra (1) por papel lavado a los ácidos, trasladando a otro tubo 3 c. c. del filtrado.

Se preparan los standards con 5 c. c. de cada sol. de fósforo y 1 c. c. de tricloroacético.

Se añade el reactivo molibdico a razón de 0,6 c. c. a los problemas y 1,2 c. c. a los standards y cloruro estannoso diluido en las mismas proporciones, pero cuidando de agitar el tubo durante la adición e inmediatamente después para que la mezcla sea *rápida*.

(1) Aunque el mismo líquido se utiliza para fosfatasas sin separación de las proteínas, aquí hay que hacerlo por entrar en proporción 10 veces mayor.

Después de unos cinco minutos se efectúa la colorimetría y cálculo en la forma descrita. Dividiendo por 100 volumen a que se llevó el contenido del asa, se obtiene el resultado en mg. de P por asa, y como es inferior a 1 mg. lo multiplicaremos por 1.000, para expresarlo en gammas.

Extracción de fosfatasas de intestino

Para su adición a soluciones de glucosa a absorber necesitábamos fosfatasas intestinales. Hemos seguido la pauta de KAY autolizando una porción de intestino triturado con arena con diferentes volúmenes de agua clorofórmica según el objeto perseguido: Para determinar el contenido de fosfatasas, autolizados al 1 % (con 100 veces su peso de agua clorofórmica); para obtener extractos de gran riqueza en fosfatasa al 1/3 (con 3 veces su peso). En ambos casos, se dejaban hasta el día siguiente (22 ± 2 horas), a la temperatura ambiente, filtrando por algodón y guardando los filtrados en la nevera hasta el momento de su utilización. Para determinar fosfatasas diluíamos el filtrado correspondiente al 1 % al 1/3, con lo que la determinación se efectúa en óptimas condiciones. Los extractos concentrados se diluían al 1/50 cuando se quería conocer su contenido de fosfatasa (la extracción es menos eficaz si se efectúa con volúmenes pequeños de líquido). Al 1 % y filtrando por algodón se determina, como ya indicó KAY y hemos comprobado nosotros, la casi totalidad de fosfatasa contenida en el intestino. El que quede una pequeña porción no solubilizada carece de importancia, dado que se trabaja siempre en las mismas condiciones.

Determinación de azúcares

Inicialmente utilizábamos el método de HAGEDORN-JENSEN. Pensando que era impropio utilizar un micrométodo, dada la cantidad de líquido de que disponíamos, quisimos sustituirlo por el de ISSEKUTZ-BOTH (64). Pero ante las dificultades que suponía el cambio de desalbuminización, efectuamos una serie de tanteos hasta llegar a un método que a la vez era simplificación de la técnica de HAGEDORN-JENSEN y reducción de proporciones de los reactivos de ISSEKUTZ-BOTH. En efecto, si la primera pecaba — en nuestro caso — por bajo, la otra requería tal cantidad (10 c. c. para determinación duplicada) que dificultaba la

realización de otras experiencias. Es verdad que hay modificaciones de la técnica de HAGEDORN más sencillas que la de ISSEKUTZ (HANES, 59; ZELLER, 154), pero la técnica planeada por nosotros presenta algunas ventajas sobre ellas por su sencillez. El error introducido por las proteínas se reduce tanto por el hecho de precipitarlas, que, sin ser separadas del líquido puede llegar a ser inapreciable en líquidos muy pobres en proteínas como lo muestran las siguientes experiencias:

El contenido de un asa de intestino de rata de unos 20 cm., a los 30' de introducir en ella, previo lavado, 1,5 c. c. de solución isotónica de glucosa (5,4 %), se arrastró con suero fisiológico, diluyendo hasta 25 c. c., se filtró y se determinó el azúcar restante por el método de HAGEDORN con y sin filtrar después de la precipitación de las proteínas, y con omisión de ésta (1). Las medias de los resultados duplicados fueron:

Hagedorn	130 mg. %
» sin filtrar	129 » »
» sin precipitación	183 » »

En consecuencia de lo expuesto llegamos a sistematizar la técnica siguiente:

Reactivos:

1. — Solución de sulfato de cinc al 0,45 %. Como se conserva pocos días, se renueva semanalmente a partir de una solución al 45 % de $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
2. — Solución N/10 de sosa.
3. — Solución N/20 de ferricianuro potásico: 16,5 gr. de ferricianuro potásico para análisis y 70 gr. de carbonato sódico se disuelven en agua hasta 1.000 c. c. Se conserva en frasco de color.
4. — Sol. de yoduro potásico-sulfato de cinc: 5 gr. de yoduro potásico, 10 gr. de sulfato de cinc y 50 gr. de cloruro sódico se disuelven en 200 c. c. de agua. Se conserva en frasco de color.
5. — Ácido acético al 9 %.
6. — Almidón al 1 %, 1 gr. de almidón soluble se mezcla con unos pocos c. c. de solución saturada de cloruro sódico, se

(1) No ebullición.

calienta hasta punto de ebullición y se completa el volumen de 100 c. c.

7. — Solución N/20 de tiosulfato sódico: 13 gr. de tiosulfato se disuelven en 1 litro de agua saturada de alcohol caprílico (1 ‰) o con 2-3 ‰ de alcohol amílico. El alcohol aumenta la estabilidad del reactivo y hace que dé gotas más pequeñas.

En estas condiciones de concentración y conservación, el tiosulfato es prácticamente estable, sobre todo después de unos días de preparado.

8. — Solución N/20 de yodato potásico: 1,783 grs. de yodato potásico deshidratado se disuelven en agua hasta volumen de 1.000 c. c.

Técnica

En tubos de Hagedorn (de unos 30 × 100 mm.) en número doble que problemas más uno para testigo se ponen 5 c. c. de la solución 1 y 1 c. c. de sol. 2. Se añade el líquido problema en cantidad tipo de 1 c. c. (puede ser 0,5 a 2 c. c., sin inconveniente), exactamente medido, y se llevan al baño hirviendo donde se mantienen unos tres minutos.

A continuación se añaden a cada tubo 2 c. c., exactamente medidos, de la solución 3 (ferricianuro) y se tienen en el baño hirviendo por espacio de 20 minutos. Pasado este tiempo se sacan del baño y se dejan enfriar (o se acelera el enfriamiento sumergiéndolos en agua fría).

Una vez enfriados se titulan uno por uno. Para ello se añade a cada uno 2 c. c. de la solución 4 (yoduro), 2 c. c. de la 5 (ácido acético) y III gotas de la solución de almidón, y se añade tiosulfato desde microbureta de 2 c. c. graduada en centésimas hasta desaparición del color azul.

Los volúmenes consumidos se multiplican por el factor del tiosulfato, si ha lugar. Dada la buena conservación a que aludíamos, se puede diluir la solución (que habrá resultado algo fuerte), después de algunos días de preparada, de tal forma que quede exactamente a la normalidad deseada, con lo que no quedará más que comprobar de tiempo en tiempo que el tiosulfato conserva su título de 1. Las diferencias entre los volúmenes de tiosulfato correspondiente a testigo y problemas multiplicados por 1,5 dan los valores de glucosa en tanto por mil, de líquido de partida supuesta la utilización de un c. c. de éste (y multiplicados por 3 ó 0,75 si dichos volúmenes fueron

respectivamente 0,5 ó 2 c. c.). A este coeficiente llegamos después de obtener una curva de calibración con soluciones de glucosa de concentraciones conocidas, preparadas a partir de glucosa Merck, desecada al vacío sobre sulfúrico y utilizando balanza analítica y matraces contrastados. La curva experimental resulta diferir tan poco de una recta que optamos para simplificar por la utilización de un coeficiente medio de 1,5, que entre concentraciones de 0,1 a 3 gr. %, puede dar un error máximo no superior al 4 %, exactitud suficiente para nuestro objeto, dado además que comparamos valores próximos entre sí, con lo que los errores son mucho menores del máximo indicado.

En la práctica, con la técnica clásica de asas aisladas que describiremos después, cuyo contenido se diluía a 25 c. c., tomando un c. c. de la dilución para la determinación de azúcar multiplicábamos directamente el tiosulfato gastado por 37,5 obteniendo la cantidad de azúcar restante en mg.

Para nuestras experiencias de absorción de azúcares según el método original que proponemos, no acaba de satisfacernos esta técnica, modificación del Hagedorn-Jensen, por razones de organización del trabajo y rapidez en conocer los resultados, e incluso por las cantidades necesarias de reactivos y manipulaciones. Por ello, preferimos utilizar otro método colorimétrico, más sencillo y de tanta o mayor exactitud derivado del clásico Folin-cobre colorimétrico (51) que expondremos como complemento a la técnica de absorción.

EXPERIENCIAS DE ABSORCIÓN

Además de la nueva técnica que proponemos y justificaremos luego, hemos utilizado la de asas aisladas, como sigue:

Ratas de peso no inferior a 100 gr., sometidas a alimentación mixta ordinaria, eran dejadas en ayunas 24 horas antes de la experiencia. Una hora después de anestesiadas con uretano (al 12 %, a razón de 1 c. c. por 100 gr. de peso, por vía subcutánea), completada eventualmente con éter, y tras laparotomía, se ligaba el comienzo del yeyuno y el extremo del íleon. Abierto el intestino inmediatamente por debajo de la primera ligadura e inmediatamente por encima de la segunda, se introducía por la abertura superior suero fisiológico a 37°

en cantidad de unos 60 c. c., hasta que fluía completamente claro por la inferior. Se vaciaba el intestino lavado por expresión suave y se medían asas de 15 a 20 cm., bien una continuación de otra a partir del comienzo del yeyuno, o bien una en dicho punto y otra en la última porción del íleon. Al final de cada porción medida se hacía una ligadura. En cada asa aislada se introducía con jeringa calibrada 1,5 c. c. de la solución o soluciones a ensayar, también a 37°, con intervalos de una a otra inferiores a un minuto ligando los orificios de entrada con hilo de color distinto para cada asa. Repuesto el intestino a la cavidad abdominal se cerraba ésta con una pinza de Pean. Desde la anestesia, durante la operación y después de ésta, se mantenía un calentamiento artificial de los animales, que se aumentaba si la temperatura rectal de los mismos caía por debajo de 36°.

Transcurrido el tiempo previsto para la observación, generalmente 30', se quitaba la pinza, se extraía el intestino delgado por sección del mismo por encima y debajo de las ligaduras extremas y del mesenterio y se lavaba exteriormente con suero fisiológico frío. Separadas las asas se introducía el extremo distal en un embudo colocado sobre un matraz aforado a 25 c. c. y abierto aquél y el proximal se introducía por éste suero fisiológico frío en cantidad de unos 20 c. c., arrastrando su contenido. Completando el volumen del matraz, y mezclado su contenido, se filtraba a continuación practicando en seguida las determinaciones en el mismo, o conservándolo en la nevera para las que permitían demora.

Cada asa era liberada después de los restos de mesenterio y, suspendida por un extremo, se medía su longitud entre las dos ligaduras que la limitaban. Ni en las primeras ni en las últimas experiencias hemos conseguido aislar asas de longitud uniforme. Por ello estimamos más exacto referir los resultados a centímetros de intestino que a «asa de x cm.».

Algunas veces hemos pesado además las asas para referir también los resultados a unidad de peso del intestino.

PRIMERA PARTE

NUEVA TECNICA PARA EL ESTUDIO DE LA ABSORCION INTESTINAL

Los métodos clásicos para la investigación de la absorción intestinal pueden reducirse a cinco grupos :

1. — Los que como CORI administran a animales en ayuno una substancia con sonda gástrica o la dejan ingerir espontáneamente, y tras un cierto tiempo determinan el contenido del tracto gastro-intestinal entero ;

2. — Las técnicas de asas aisladas con animales anestesiados en los que se limita por ligaduras una o más asas «in situ» en las que se haya inyectado una substancia para averiguar después de un determinado tiempo la parte residual no absorbida ;

3. — Los que utilizan porciones de intestino aisladas, sumergidas en Ringer, encerrando también en ellas la substancia cuya absorción se estudia «in vitro» ;

4. — Los métodos de fístulas establecidas en distintas secciones del intestino delgado, por las que se puede investigar el quimo circulante a diferentes niveles ; o fístulas según el principio de THIRY-VELLA en las que un asa aboca por uno o dos de sus extremos en la pared abdominal, pudiendo llenarse y después de un tiempo lavarse determinando lo absorbido ; por último,

5. — Puede abordarse el estudio de la absorción investigando la sangre de la vena porta o el quilo del conducto torácico.

El método de CORI (1925) es sin duda el más fisiológico ; sin embargo, la motilidad gástrica e intestinal juega un importante papel, independiente en muchos casos de las condiciones que se estudian (ver últimamente FENTON, 50) ; además, el intestino y aun el estómago en varias especies animales de las usuales en el laboratorio, no están enteramente vacíos aun después del ayuno previo a la experiencia, por lo que puede introducirse errores.

La técnica de asas aisladas que utilizó ya HÖBER, exige la anestesia y ya hemos visto que en algunos animales este factor influye en la absorción ; además hay un imprescindible masaje visceral y la operación — aun con la mayor delicadeza — siempre puede repercutir en la experiencia. Ofrece en cambio garantías precisas : tras un lavado del asa, se inyecta la sustancia, con lo que puede más tarde saberse exactamente la parte absorbida en el tiempo que se desee, por diferencia con la residual. La absorción se refiere a longitud constante de asa o a centímetro o gramo de asa. Los resultados son bastante comparativos y ha sido ampliamente utilizado.

Las experiencias «in vitro» (COHNHEIM, HÖBER, LASZT, etcétera) son las menos fisiológicas. MAGEE (1930) opina fuertemente que las asas aisladas bañadas en Ringer sólo pueden suponerse «vivas» durante los primeros treinta minutos ; mientras se conserva durante días la motilidad, la mucosa, muy sensible, se desprende a los pocos minutos. Además, la supresión de la circulación es un factor muy considerable.

Con las fístulas se consigue investigar en condiciones fisiológicas ; mas si se trata del método de las polifístulas (LONDON y su escuela), la absorción depende del vaciamiento gástrico y éste de la repleción del duodeno, con lo que se precisa — de haber fístula duodenal — otra fístula con la que se llene el duodeno continuamente. Aplicando el principio de THIRY-VELLA, se dispone de un asa sólo después de mucho tiempo de haber dejado ya de ser funcional, lo que conduce a resultado anómalo, con frecuente desarrollo de estados catarrales. Por otra parte, resulta en extremo trabajoso preparar suficiente número de animales con fístulas adecuadas imprescindible para deducir conclusiones.

Fácilmente se comprende que las investigaciones de sangre portal o linfa del conducto torácico, además de ofrecer a veces las dificultades de tener que concentrar las sustancias a determinar, por su excesiva dilución en sangre (circulación restringida de KÖRÖSY, vividifusión de ABEL (1913), etc.) no se prestan bien a un estudio cuantitativo de la absorción.

Nosotros habíamos utilizado siempre la técnica de asas aisladas tal como se ha descrito más arriba, con las que hemos obtenido buenos resultados. Pero no nos acababa de satisfacer. Es sumamente difícil conseguir medir con precisión la longitud

del asa que se aísla dado el diferente estado de contracción o relajación de sus paredes; esto lleva a tener que medirlas o pesarlas postmortem y a dar los valores de absorción referidos a centímetro o a gramo y tampoco esto es cosa sencilla; la distensibilidad del intestino hace que su longitud pueda variar y en el peso fresco entran también ciertas fuentes de error: mesenterio no separado, líquido residual de lavado, etcétera, que no siempre se consigue eliminar; el referirlos a peso de sustancia seca, por el quehacer que da disminuye la capacidad de trabajo. Con todo ello, para poder confiar en un resultado, se hace necesario repetir la experiencia con numerosos animales de edad y peso semejante y tomar la media. Con la técnica de CORI ocurre lo propio, se precisa un animal por prueba y lo absorbido ha de referirse a peso de animal, a longitud de intestino entero, etc., lo que sumado a las fuentes de error propias del método, exige trabajar con un gran número de animales.

Estas dificultades se agrandan cuando quiere estudiarse no el valor absoluto de la absorción de una sustancia, sino comparar éste con los de otra, o investigar el efecto de distintos factores sobre tales absorciones. Para reducir algo la variabilidad individual, la escuela de VERZAR y LASZT utilizan en ratas dos asas *de un mismo animal* entre las cuales se compara la absorción; así podía verse cómo un factor inhibe o favorece la absorción de una sustancia sin tener efecto sobre la de otra; o las diferencias entre la absorción de unas y otras. Como la «posición» del asa influye en la absorción, había que acudir también a muchos animales en los que, para compensar tales influencias, se invertía el orden de colocación de las sustancias en las asas. Todos estos artificios los hemos utilizado también nosotros en otros trabajos.

Pensamos en que la comparación ideal se tendía a conseguir con animales lo más iguales posibles y con asas de la misma longitud que estuvieran en idéntico tramo intestinal. Y de aquí nuestro propósito de conseguir *comparar absorciones en la misma asa de un mismo animal dado*.

En nuestros protocolos (véase efecto del cerio sobre la absorción) aparece un grosero primer intento en este sentido: se estudia la absorción en un asa y luego de bien arrastrado su contenido, se utiliza la misma asa, dos centímetros más corta

por salvar las incisiones hechas para el lavado, para una nueva experiencia ; esto exigía nuevas manipulaciones en el animal a más de pequeñas hemorragias, diferencias de longitud de asa, etc., y con ello se tenía una serie de inconvenientes.

Conseguimos establecer la técnica apropiada, *introduciendo en los extremos del asa intestinal «in situ», dos cánulas de vidrio* para dar entrada y salida respectivamente a los líquidos de lavado y a las soluciones o sustancias a absorber ; las cánulas permanecen colocadas durante todas las pruebas de absorción y a ellas se empalman tubos de goma que permiten el paso de líquido ; pinzas de presión o llaves de vidrio pueden convertir sencillamente el asa abierta en cerrada.

Este procedimiento se presta a realizar dos tipos de experiencias.

1. — *Pruebas de absorciones sucesivas en asa cerrada*, arrastrando cada vez lo no absorbido con suero fisiológico o solución de Ringer, con lo cual queda el asa apta para ser utilizada de nuevo para otra prueba.

2. — *Pruebas de absorción en circulación continua*, en las que la solución a absorber fluye a velocidad regulable a lo largo de la asa, haciéndola pasar si se quiere una y otra vez por ella.

Claro está que pueden combinarse experiencias mixtas.

Hemos aplicado nuestra técnica al estudio de la absorción en perros y ratas, pero en principio nada se opone a que se utilice en otros mamíferos. Describiremos detalladamente los pasos de la técnica tal como la realizamos.

APLICACION DE LA TECNICA A PERROS

DESCRIPCIÓN DEL DISPOSITIVO

Esquema. — Un depósito a 38° desde el que se hace descender por tubo de goma hasta la cánula de entrada en el asa intestinal, los líquidos de lavado o soluciones a absorber. Un tubo de goma en la cánula de salida del asa para recoger los líquidos después de atravesarla o de permanecer en ella cierto tiempo.

Detalle. — Se fija a un soporte de amplia base, mediante dos aros, un recipiente de vidrio (1) con dos bocas anchas en sus

extremos y una tubuladura lateral (véase fig. 1). La abertura inferior se cierra con un tapón de caucho atravesado por el

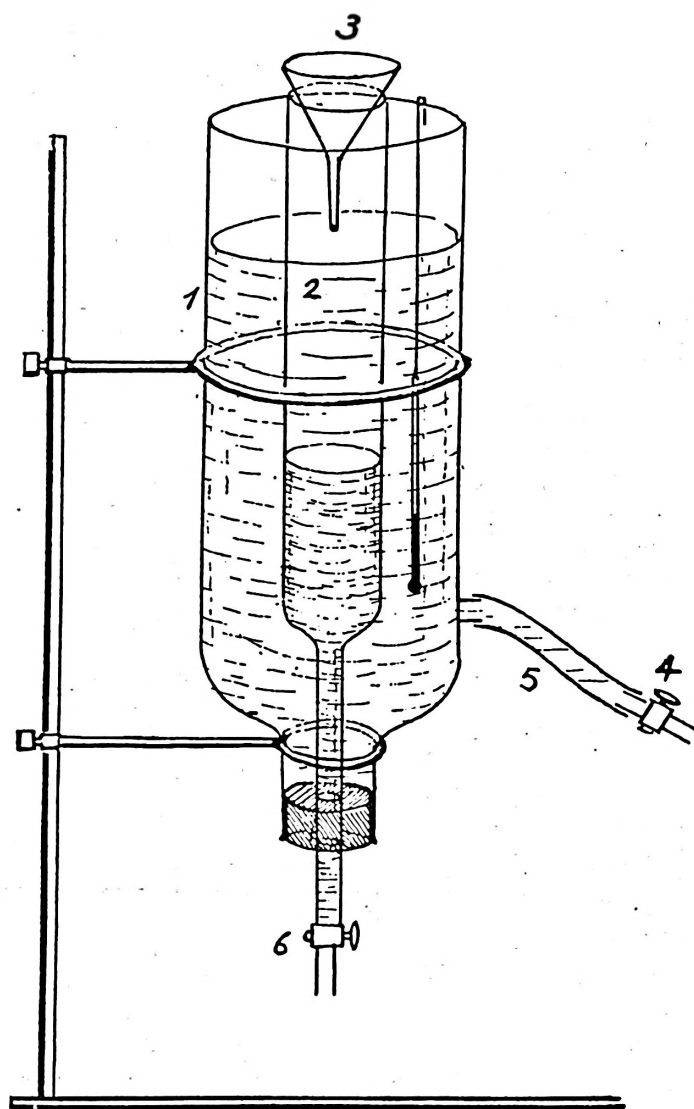


Fig. 1

tubo terminal sin llave, de 4 ó 5 mm. de diámetro, de una bureta ancha (2) de 250 c. c. graduada en c. c. que queda en el interior del recipiente. Por la abertura superior se coloca

un embudo (3) para llenar la bureta. El recipiente exterior sirve de baño para mantener la temperatura del líquido contenido en la bureta; a este efecto se llena de agua a 38 ó 39° teniendo cerrada la llave (4) del tubo de goma (5) que cuelga de la tubuladura lateral; a medida que se va enfriando, se deja salir algo de agua y se rellena con otra caliente hasta alcanzar la temperatura deseada. Hay un termómetro colgado del borde.

A la salida inferior de la bureta se adapta una llave de cristal de amplio paso (6) y a ésta un tubo de caucho bastante blando en cuyo extremo se ajustará la cánula de entrada en el asa.

El soporte se coloca en la misma mesa donde se opera el animal de modo que la llave de salida de la bureta quede a unos 40 ó 45 cm. de altura sobre ella.

Por otro tubo blando de goma se comunica la cánula de salida del asa con una probeta de 500 ó 1000 c. c. para recoger el líquido; una pinza de Hoffmann de presión a tornillo con parte inferior móvil, permite cerrar o no el paso por este tubo.

El suero fisiológico y las soluciones a absorber se mantienen en baño a 38°.

Cánulas. — No toda cánula sirve para nuestros fines y hubimos de hacer una serie de modelos hasta conseguir el más sencillo y eficaz. La frecuencia de parásitos intestinales y la mayor rapidez para el lavado aconseja trabajar con cánulas anchas a cuyo través puede conseguirse una limpieza perfecta del asa. Si la cánula termina cortada por un plano perpendicular o en bisel, es fácil que con los movimientos del asa se adapte contra la pared intestinal dificultando o impidiendo la entrada o salida del líquido. El modelo que adoptamos (figura 2) es el de una cánula curvada en ángulo recto; por un extremo, cortada normalmente, se adapta al tubo de goma; por el otro, termina en un par de prolongaciones ligeramente dirigidas hacia el eje de la cánula, y es por donde se introduce en el intestino. Gracias a estas prolongaciones se permite siempre el paso del líquido a través de la cánula, resultando imposible que la pared intestinal se adapte al extremo y cierre enteramente el paso de líquido. El que las prolongaciones se acerquen ligeramente hacia el eje hace que el «pico» de la cánula esté sólo «entreabierto» por delante, con lo que no tiene dificultad ninguna su introducción en el intestino.

MODUS OPERANDI

Anestesia con dial o cloralosa manteniendo caliente al animal todo el tiempo. Una incisión cutánea media ventral de unos 10 cm. que se profundiza luego a través de la capa muscular hasta el peritoneo. Rasgado éste, se reconoce la primera porción del yeyuno — hemos utilizado siempre este tramo intestinal, pero podría hacerse en cualquier otro — y se pasa hilo doble para hacer dos ligaduras: una proximal que se cierra y otra a 1 ó 2 cm. que no se aprieta. A la distancia que

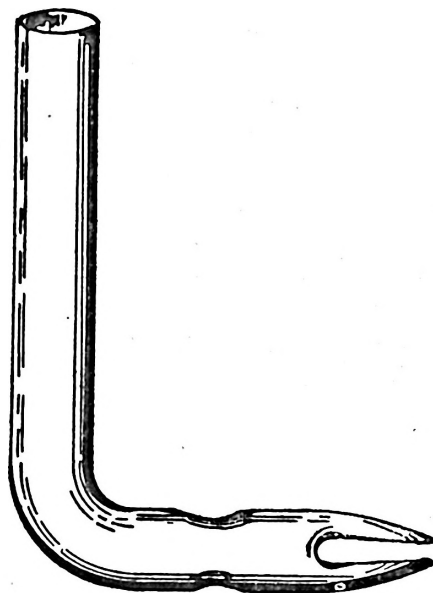


Fig. 2

se desee, según la longitud de asa con que se quiera trabajar, se pasa otro hilo doble para otras dos ligaduras: un distal que se cierra y otra uno o dos centímetros por delante que sólo se inicia.

Se da un corte con tijeras en el intestino por el borde menos vascularizado, después de la ligadura proximal cerrada y antes de la que no se ha apretado, introduciendo por él la cánula y asegurando esta ligadura fuertemente sobre ella. Se

hace lo mismo en el extremo distal del asa, poniendo la cánula en sentido contrario. Queda así aislada un asa intestinal con una cánula de entrada, y otra de salida; se adaptan a ambas los respectivos tubos de goma y se cierra la cavidad abdominal con pinzas de Pean, dejando espacio para que pasen los tubos con las cánulas; el que los tubos de goma sean blandos facilita que el asa no sufra tirones y pueda adoptar una posición normal dentro de la cavidad abdominal.

Antes de que el nivel del líquido de lavado descienda hasta el tubo de salida de la bureta, cuando alcanza el estrechamiento de la misma, se cierra la llave de paso (6), con lo cual no queda aire en el tubo, que podría luego entorpecer la sucesiva adición de líquido. Por el embudo (3) se vierte ahora en la bureta una cantidad exacta de la solución con la substancia a absorber, se dispone una nueva probeta para recoger el líquido que fluye del asa por el tubo de salida, se abre la llave (6) con lo que la solución va desalojando al suero fisiológico que quedase en los tubos y en el asa, ocupando completamente ésta e incluso saliendo a la probeta. Al abrir la llave, se empieza a medir exactamente el tiempo. La cantidad de solución a absorber puesta en la bureta ha de ser suficiente para llenar el asa y el «espacio muerto» correspondiente a los tubos de entrada y salida. Esto depende de la longitud y diámetro del asa, pero es fácil hacer un cálculo aproximado, de una vez para siempre, lavando con suero fisiológico coloreado (por azul de metileno, por ejemplo), y viendo la cantidad de otro líquido no teñido que hace falta dejar luego penetrar en el asa, para que salga por el otro extremo prácticamente incoloro. Es preferible poner un exceso de solución para tener seguridad de que el asa está ocupada por ella cuando el nivel de la solución va a alcanzar el estrechamiento de la bureta, se cierra el tubo de salida del asa si quieren hacerse experiencias «en asa cerrada» o se reduce más o menos el paso, si se desea estudiar la absorción «en circulación por asa abierta».

Operando como se indica, no puede evitarse cierta mezcla entre el suero fisiológico y la solución a absorber, con lo que puede quedar la substancia a investigar a una concentración en asa algo distinta de la de partida. Esto no es inconveniente tratándose de glucosa u otras substancias que se absorben selectivamente, con independencia de la concentración; pero en

otro caso, la dificultad se obvia simplemente dejando pasar todo el líquido de lavado y vaciando completamente el asa de suero por deslizamiento de los dedos a su largo, a presión suave. Aunque quede aire en los tubos y en el asa, lo desaloja fácilmente el líquido a absorber, pinzando con los dedos si es preciso el tubo de entrada para quitar las burbujas de aire.

Experiencias «en asa cerrada». — Se mantiene la pinza de salida cerrada y la llave 6 abierta durante todo el tiempo que se desee dure la absorción. El nivel del líquido en el tubo de salida de la bureta oscila registrando las modificaciones de presión a que está sometida en el asa por la motilidad intestinal y las variaciones respiratorias de la presión intraabdominal; luego desciende más, pues algo de líquido se absorbe. Un minuto antes de finalizar dicho tiempo se cierra la llave 6 y se carga la bureta con suero fisiológico a 38° para el lavado; al cumplir el tiempo exacto, se abre la pinza de presión del tubo de salida y la llave 6 dejando pasar 250 c. c. de suero que arrastran toda la substancia no absorbida (si se opera con substancia liposolubles, habría que arrastrar con mezclas alcohol-éter, pero entonces ya no podría utilizarse el asa para una nueva experiencia porque se alteraría la mucosa). El líquido recogido en la probeta o matraz aforado se completa con agua destilada hasta 500 ó 1000 c. c., y se determina cuantitativamente la substancia residual; la diferencia entre ésta y la puesta inicialmente corresponde a la parte absorbida. El asa ha quedado disponible para una nueva experiencia. Nosotros hemos realizado muchas veces en una tarde, pruebas de absorción en la misma asa del mismo perro, durante 3 ó 4 horas, dependiendo el número de las que pueden hacerse, de la duración de cada una de ellas: así, con tiempos de absorción de 30 minutos, pueden llegarse a hacer 6 pruebas sucesivas; con tiempos de 60 minutos, tres o cuatro. En este tiempo la presión arterial se mantenía bastante constante.

Experiencias «en circulación por asa abierta». — Graduando la presión de la pinza de Hoffmann, en el tubo de salida, puede dejarse paso al líquido del asa a la velocidad que se desee. Simultáneamente puede abrirse pracialmente la llave 6 con lo que entra en el asa nuevas cantidades de solución a

absorber que se van poniendo en la bureta. Como ésta es graduada, la llave de vidrio (6) regula fácilmente la velocidad de circulación en centímetros cúbicos por minuto. Puede incluso suprimirse la pinza de Hoffmann, lo que es más cómodo y eficaz, si se tiene cuidado en que el tubo de salida se encorve un poco por encima del nivel del abdomen del animal; así, si se tiene la seguridad que el asa está llena de líquido que no puede salir más que a medida que penetra nuevo líquido en el asa y de acuerdo con el peristaltismo intestinal que hace fluir el líquido, no continuamente, sino «a oleadas». Este procedimiento se puede plantear en experiencias de absorción de líquidos circulando continuamente en el asa, con lo que se reduce al mínimo la acción en la luz intestinal de fermentos u otros factores intestinales sobre ella. Tiene el inconveniente de que si la velocidad es grande, la absorción ha de ser relativamente pequeña y difícilmente podrán valorarse diferencias; mas esto se resuelve haciendo que el líquido que sale del asa pueda volver a pasar por ella introduciéndolo de nuevo en la bureta; además ofrece una valiosa posibilidad: la de suprimir virtualmente algún factor intestinal; así, en nuestros protocolos, se refieren experiencias en las que antes de devolver el líquido a la bureta se le desproveía de un factor: la actividad fosfatásica por inactivación por el calor; de igual modo puede hacerse con otros fermentos y aun factores no fermentativos.

APLICACION DE LA TECNICA A RATAS

DESCRIPCIÓN DEL DISPOSITIVO.

Esquema. — El mismo que para perros.

Detalle. — Trabajamos en ambiente calentado hasta 30°, disponiendo los animales dentro de una vitrina de laboratorio en la que se monta la calefacción necesaria. Con esto, suprimimos el baño exterior de la bureta, aunque se conserva el baño a temperatura constante, para disponer de las soluciones necesarias a 38°. En un bastidor de madera que se apoya por cuatro patas de 15 ó 20 cm. de altura, hay ganchos en los que se atan dos lonas pequeñas (ver fotografía fig. 3) que servirán para acostar en ellas a las ratas. Si la temperatura ambiente

lo requiere, se coloca en la parte inferior del bastidor una almohadilla eléctrica. Sujetos al bastidor hay dos soportes a los que se fijan con pinzas sendos embudos de cristal con llave, que sustituyen a la bureta graduada que utilizábamos con los perros y que comunican con las cánulas por tubos de goma blanda.

Para evitar la formación de burbujas, conviene que los em-

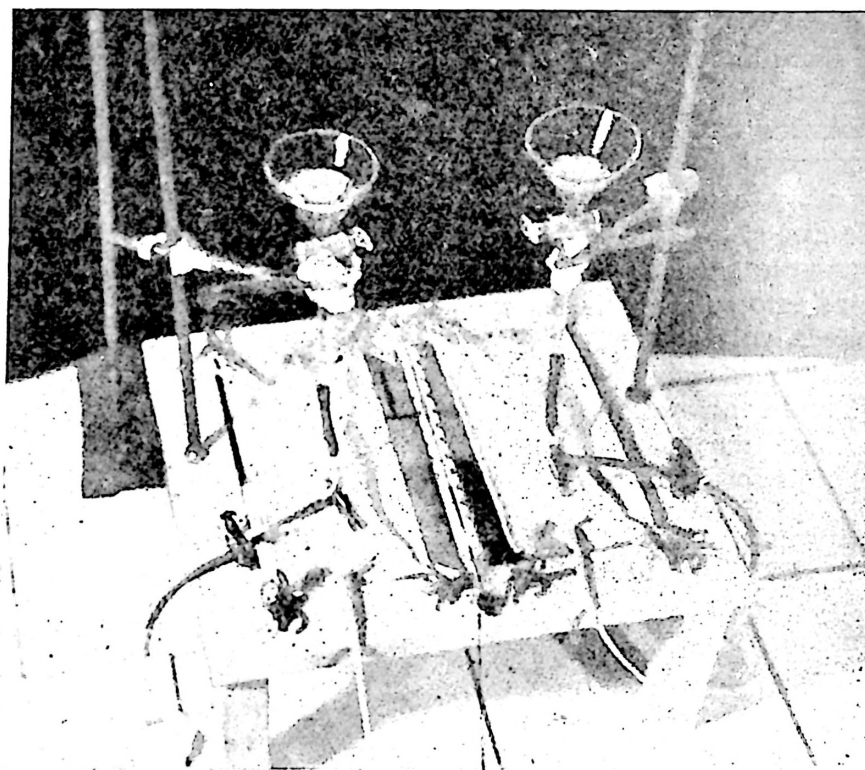


Fig. 3

budos sean de forma que la llave esté inmediata a la copa, sin dejar cuello, es decir, el embudo debe abrirse inmediatamente por encima de la llave. La llave del embudo queda a unos 15 cm. sobre las ratas; la poca solidez del mesenterio de la rata aconseja, aun más que en el perro, que los tubos de goma que unen los embudos con las cánulas carezcan de rigidez; con ello, además, se consigue evitar acodamientos y tirones anor-

males del asa. La sustitución de la bureta por los embudos se funda en que en perros, diferencias de presión de varios centímetros de agua, no suponen prácticamente nada, mientras que en ratas tratamos de trabajar con presión sensiblemente constante.

Las cánulas son de la misma forma que allí se usaba y proporcionalmente más pequeñas, para que ajusten al intestino de la rata. Los diámetros de las cánulas, salidas de embudos y tubos de goma han de ser aproximadamente iguales y pequeños para reducir al mínimo el «espacio muerto». La altura a que está el bastidor sobre la vitrina, permite que los tubos de salida del asa desagüen en matraces aforados puestos de pie; en estos tubos se intercala también una pinza de Hoffmann. Los bastidores que hemos construido son capaces para dos ratas.

Modus operandi. — Ratas sin ayuno previo, anestesia de ureterano. A la media de hora de inyectado, conservadas calientes (temperatura vitrina 30-31°), se atan a los ganchos del bastidor, sobre las lonas. Tras laparatomía, se identifica el comienzo del yeyuno; las ligaduras y colocación de las cánulas, se hacen como se indicó en perro. Se aísla un asa de unos 30 cm. de longitud. Se empalma la cánula de entrada al tubo de goma del embudo; la cánula de salida está ya unida al tubo de desagüe (de unos 15 cm.). Se lava el asa, dejando caer por el embudo (abriendo su llave) unos 30 c. c. de suero fisiológico a 38°; para ello en el baño a esta temperatura se tienen preparados una porción de tubos con tal cantidad de suero. Se cierra la cavidad abdominal con un clip. Se cierra la llave de paso del embudo antes de que el nivel del suero descienda por debajo de ella y se vierte al embudo la cantidad exacta de solución a absorber; unos 10 c. c. serán suficientes para desalojar el suero fisiológico del asa y quedar ésta llena con la solución. Se hacen los mismos preparativos con la otra rata. Se hacen desaguar los tubos en matraces de 50 c. c., se abre la llave del embudo en una de ellas empezando entonces a contar el tiempo; se deja fluir líquido hasta que el nivel en el tubo está a unos 6 ó 7 cm. sobre el abdomen del animal, cerrando en este momento la pinza de presión del tubo de salida del asa. Con un minuto de diferencia se abre la llave del embudo de la otra rata, cerrando también la salida del asa cuando

el líquido está al nivel dicho. Se hacen así pruebas *en asa cerrada* de la duración que se desee. Un minuto antes de finalizar el tiempo de absorción se cierran las llaves de los embudos y se pone en cada uno de ellos unos 15 c. c. de suero fisiológico; y a la hora exacta se abre la pinza de presión y la llave del embudo; una vez que han pasado estos 15 c. c., se vuelve a lavar el embudo con otros 15 c. c.; por último, se retiran los matraces, se enrasan a 50 c. c. y se sustituyen por otros, para iniciar una segunda prueba de absorción.

De la misma manera que en perros, pueden realizarse en ratas experiencias de absorción «en circulación por asa abierta».

Con ratas, pueden hacerse bien en unas 3 horas hasta 5 pruebas de absorción sucesivas de 30 minutos, en cada rata, o tres de una hora. Nosotros hemos trabajado muchas veces con dos juegos de bastidores con 4 ratas simultáneamente. Resulta evidente que nuestra técnica se presta muy bien a un estudio de la absorción «en serie», que ahorra mucho tiempo y obtiene el máximo rendimiento de los animales utilizados.

Tanto en ratas como en perros, se controla cada 10 minutos la temperatura rectal, adecuando la calefacción a las oscilaciones de aquélla para reducirlas al mínimo. Cuando se incluye en las tablas este dato, la temperatura puesta es la media de la prueba con oscilaciones de $\pm 0,2^{\circ}$ C. Y al finalizar los experimentos se extrae el asa utilizada, se escurre deslizando suavemente los dedos, se limpia de mesenterio, se mide dejándola colgar de un extremo y se pesa.

DETERMINACION DEL AZUCAR ABSORBIDO

Como complemento de la técnica expuesta hemos procurado conseguir una determinación rápida a la vez que suficientemente exacta del azúcar. No satisfechos de la economía de tiempo lograda, con la simplificación del HAGEDORN ya expuesta, nos dirigimos a los métodos colorimétricos llegando a una adaptación del método clásico de FOLIN-cobre (51) que une a la rapidez la sencillez de ejecución.

Se funda el método en comparar los problemas con la propia solución de azúcar utilizada, llevados unos y otra a un mismo grado de dilución adecuada. Partimos de azúcares al 5 por 100 de concentración, que aunque no corresponde a iso-

tonía exacta simplifica considerablemente el cálculo. Manteni-
da esta solución a 37° durante el tiempo de las experiencias,
se toman de ella los volúmenes adecuados al tipo de animal
y asa a utilizar con pipeta aforada para trasladarlos a los em-
budos descritos. Con la misma pipeta se traslada otro volumen
a un matraz aforado a 50 c. c. en el caso de emplear ratas,
para las que se utiliza un volumen de 10 c. c. de solución de
azúcar; de 500 c. c. en el caso de perros para los que se utili-
za 100 ó 200 c. c. de azúcar, etc. El azúcar no absorbido se re-
coge con los líquidos de lavado en matraces aforados de la
capacidad indicada.

Se desalbuminiza según el método del tungstato de cobre de
SOMOGYI (125) con cantidades adecuadas de reactivos. Es sen-
cillo y cómodo y ofrece dos cualidades que pueden ser de inte-
rés; si esta desalbuminización no interfiere para otras determi-
naciones, colocando en el matraz que recoge lo que sale del
intestino el reactivo de cobre-sodio se impiden acciones fosfa-
tásicas, por ejemplo, glucolíticas; su isotonía pone en parte
a cubierto de liberación del contenido de células o fragmentos
de mucosa descamada. Se utilizan en el caso de las ratas 9,2
centímetros cúbicos de solución isotónica de sulfatos de cobre
y sodio y 0,5 c. c. de tungstato sódico al 10 %. (Para perros,
cantidades proporcionales mayores). Se completa con agua
hasta el enrase, se dejan pasar tres o cuatro minutos y se filtra
a tubos de ensayo, después de mezclar.

De cada filtrado desalbuminado se toman 2 c. c. (pipeta
de 2 aforos) que se trasladan a matraz aforado a 100 c. c., cuyo
volumen se completa con agua. Análogamente se procederá
con la solución «tipo». La dilución llega así a 1/250, corres-
pondiente a una concentración de 0,2 ‰, igual al tipo fuerte de
la técnica de FOLIN. Los problemas tendrán concentraciones
alrededor de 0,1-0,15. Los ligeros errores que determinarían
estas diferencias de concentración por tratarse de una reacción
que no sigue la ley de BEER se suprimen calculando con arre-
glo a la desviación encontrada con un tipo auxiliar que se pre-
para con 1 c. c. del filtrado diluido a 100 (dilución total 1/500).
Colorimetría de uno de nosotros (122 y 123).

De cada una de las últimas diluciones se trasladan 2 c. c.
a otros tantos tubos de FOLIN, utilizando pipeta de un aforo
cuya punta se apoya en la pared de la parte estrecha del tubo.

Se añade a cada tubo 2 c. c. del reactivo de cobre alcalino, según SOMOGYI (127), lo que puede hacerse con pipeta graduada, y se llevan a un baño de agua hirviendo. Pasados 8 minutos de permanencia en el mismo, se sacan los tubos añadiendo a cada uno 4 c. c. del reactivo fosfomolibdico de FOLIN. Si son bastantes tubos deben colocarse en el baño con ritmo uniforme, análogo al que se seguirá al sacarlos, a fin de que el tiempo de calentamiento sea el mismo en todos. Después de enfriados, se completa con agua hasta el enrase, se mezcla bien y se hace la comparación colorimétrica en cualquier momento en un plazo de varias horas. La altura óptima para el «tipo» en colorímetro Duboscq es 20 mm. El cálculo es:

$$\frac{(C_s - I) L_s}{L_p} + I = \text{mg. de glucosa no absorbida si se toma como } C_s \text{ 500 mg.}$$

O simplemente multiplicando por 1.000/2 los valores de la tabla correspondiente al tipo auxiliar (122).

La gran estabilidad del color permite una notable rapidez en la apreciación de los resultados, que pueden llegar a hacerse *sobre la marcha* de nuestra técnica de experiencias en serie a lo largo del tiempo. En efecto: como el color no varía — según hemos observado — en el plazo de dos o tres horas que puede durar una serie de experiencias, se puede preparar el tipo junto con la primera experiencia (o primeras) y luego ir haciendo las demás, comparándolas todas con el tipo inicialmente preparado, que puede seguir en la misma cubeta todo el tiempo. Unos 20 minutos después de terminada una experiencia — y por lo tanto antes de la media hora habitual por experiencia de absorción — se puede tener valorada la absorción en la misma, quedando sólo la referencia a unidad de intestino, peso o longitud, de las que la primera no puede hacerse y la segunda — en nuestra opinión — no debe hacerse hasta después de retirada el asa del animal.

Por lo demás, la regularidad del método (oscilación alrededor del 1 %) es ampliamente suficiente para las experiencias de absorción en las condiciones dadas. La exactitud ha sido comprobada en numerosas determinaciones paralelas con el método de HAGEDORN-JENSEN.

Cuando se comparan azúcares se preparan tantos tipos como azúcares (supuesto que todos sean reductores) y se comparan con cada uno de ellos los problemas correspondientes.

También eventualmente deberán prepararse tipos de concentraciones habitual y mitad por si la «desviación» de ese azúcar fuese distinta de la de la glucosa. Lo mismo se hace cuando se ha agregado cualquier substancia a las soluciones de glucosa.

COMPROBACION DE LAS TECNICAS

Una condición fundamental para la aplicación de nuestras técnicas de absorción sucesiva, es el estudiar la constancia en los valores de absorción en las diferentes pruebas con la misma asa del mismo animal. Si tal constancia existe, las modificaciones que se presenten al hacer actuar o variar diferentes factores, serán, por sí solos, de un valor demostrativo indiscutible. Si por el contrario los valores de absorción varían en el sentido de aumentar o disminuir en las sucesivas pruebas, sólo podrán deducirse conclusiones cuando las modificaciones que se presenten sean o de sentido contrario o de intensidad mucho mayor.

Hemos aplicado hasta ahora casi exclusivamente nuestra técnica al estudio de la absorción de monosacáridos, aunque tenemos ya en preparación una serie de trabajos con otras substancias. Vamos a dar unos ejemplos de nuestras experiencias de absorción de glucosa.

EN PERROS

En la tabla I se reúnen los resultados de una serie de experiencias de absorción sucesivas de glucosa «en asa cerrada». Los tiempos de absorción son de 30 ó 60 minutos según los casos; se hacen dos o tres pruebas sucesivas en cada animal. La glucosa se pone en solución al 5 % que, sin apartarse mucho de la isotonía, facilita los cálculos; la cantidad de solución a absorber que se pone en la bureta es de 100, 150 ó 200 centímetros cúbicos, a los que corresponden respectivamente 5, 7,5 ó 10 g. de glucosa. Los lavados para arrastrar después de cada prueba la glucosa residual son correlativamente de unos 250, 375 ó 500 c. c.; estas cantidades fueron suficientes para ello, según se comprobó recogiendo las últimas porciones de

lavado y observando daban al BENEDICT una reacción negativa o sumamente débil, despreciable para el cálculo.

Los valores de absorción se dan en mg. de glucosa y se refieren luego a g. de peso del asa y a cm. de longitud de la misma.

En la tabla I se ve como hay una relativamente amplia variabilidad individual, absorbiendo más unos perros que otros.

TABLA I.

Absorción de glucosa «en asa cerrada» de perros en pruebas sucesivas de 30 ó 60 minutos

Peso Kg.	Asa		Tiempo Minutos	Pruebas	Glucosa (mg.)			
	Long. cm.	Peso g.			Puesta	Absorbida	/g.	/cm.
12	24	42	30	1. ^a	5.000	1.262	31	52,6
				2. ^a	5.000	1.304	32	54,3
10	33,5	56	30	1. ^a	5.000	1.568	28	46,8
				2. ^a	5.000	1.624	29	48,4
				3. ^a	5.000	1.540	27,5	45,9
7	35	50	30	1. ^a	7.500	1.275	25,5	36,4
				2. ^a	7.500	1.250	23	35,7
				3. ^a	7.500	1.200	24	34,3
9	40	65	30	1. ^a	10.000	2.275	35	56,9
				2. ^a	10.000	2.307	35,5	57,7
				3. ^a	10.000	2.145	33	53,6
8	38,5	60	60	1. ^a	10.000	2.580	43	67,0
				2. ^a	10.000	2.700	45	70,1
8	41	64	60	1. ^a	7.500	3.326	52	81,1
				2. ^a	7.500	3.232	50,5	78,8
				3. ^a	7.500	3.200	50	78,0
6	36	45	60	1. ^a	10.000	2.587	57,5	71,8
				2. ^a	10.000	2.646	58,8	73,5

Mas, a los efectos de nuestra técnica, lo que sí se ve es la casi igualdad de valores de absorción en las diferentes pruebas del mismo animal; las desviaciones son lo suficientemente pequeñas para poder admitir una «constancia» de absorción tanto en pruebas sucesivas de 30 minutos como de una hora. Así,

de acuerdo con lo que decíamos antes, las modificaciones que se presenten en el mismo animal, tendrán valor demostrativo. Esto dentro del margen de unas tres horas que aparece en los protocolos. Hemos hecho tanteos de si podrían continuarse las experiencias más tiempo, llegando a hacer nueve experiencias seguidas de una hora de duración; se observa entonces una progresiva disminución de la absorción que llega en las últimas horas a valores 30 % más bajos que en las primeras. Así, pues, no debe esperarse la igualdad de absorción más que durante tres o cuatro horas.

Con asas de 30 a 40 cm. como las utilizadas, la glucemia sube sólo discretamente. En la experiencia de nueve horas empezó en 1 g. 0/00 y no se acercó a los 2 g hasta las últimas horas.

No damos aquí experiencias de absorción de glucosa «en circulación por asa abierta» porque entran en nuestros protocolos de la segunda parte del trabajo (pág. 329).

EN RATAS

Trabajamos en ratas sin ayuno previo. Para glucosa hemos elegido un tiempo de absorción de 30 minutos. En los embudos se vierte, con pipeta aforada, 10 c. c. de solución de glucosa al 5 %. Se lava con suero fisiológico, completando los matraces a 50 c. c. También aquí comprobamos que las últimas porciones de lavado daban negativo o muy débilmente positivo a la reacción de BENEDICT.

La tabla II recoge los resultados de experiencias con sólo dos pruebas sucesivas de absorción en cada animal.

TABLA II

Absorción de glucosa «en asa cerrada» de rata en dos pruebas sucesivas de 30 minutos. Glucosa puesta, 500 mg.

Peso gr.	Asa		Pruebas	Glucosa (mg.)				
	Long. cm.	Peso g.		Residual	Absorbida	/g.	/cm.	Temp. ^a
127	28,5	2,2	1. ^a	340	160	73	5,6	37,5
			2. ^a	344	156	71	5,5	
136	30	2,7	1. ^a	320	180	66,7	6,0	36,8
			2. ^a	314	186	69	6,2	
150	36	1,56	1. ^a	272	228	71,2	6,2	38,1
			2. ^a	258	242	75,6	6,8	
125	16,5	3,2	1. ^a	406	94	60,3	5,7	37,0
			2. ^a	404	96	61,5	5,8	
169	26	2,3	1. ^a	339	161	70	6,2	38,0
			2. ^a	348	152	66	5,8	
167	19	1,5	1. ^a	374	126	84	6,6	37,4
			2. ^a	385	115	77	6,0	
188	25	2,1	1. ^a	300	200	95	8,0	38,1
			2. ^a	292	208	99	8,3	
195	30,5	2,7	1. ^a	306	194	71,8	6,3	37,8
			2. ^a	295	205	75,9	6,7	
184	22	1,7	1. ^a	350	150	88	6,8	37,2
			2. ^a	342	158	93	7,2	

En varias ocasiones hicimos experiencias «en serie», con cuatro ratas simultáneamente, y con cuatro pruebas de absorción sucesivas, en cada animal, determinando también el curso de la glucemia por el micrométodo de uno de nosotros (SOLS, 124), derivado también del de FOLIN. La aplicación del método descrito para la determinación colorimétrica de glucosa residual y la absorbida, permite haber terminado todas las determinaciones correspondientes muy poco después de la última serie de absorciones, ya que, dada la estabilidad del color final, pueden irse realizando sobre la marcha. La sangre

(0,05 c. c.) se extraía de la cola de los animales. La tabla III recoge los protocolos de uno de estos días.

TABLA III

Absorción de glucosa «en asa intestinal cerrada» de ratas en varias pruebas sucesivas, con determinación de la glucemia. Glucosa puesta, 500 mg.

Peso	Asa		Prue- oa	Tiemp- po	Tem. per.	Glucosa (mg.)				
	Long.	Peso				Residual	Absor.	g.	cm.	Glucemia
152	31	2,4	1. ^a	30	36,6	285	215	90	6,9	1,2-1,8
			2. ^a	30	37,7	300	200	83	6,4	1,8-2,2
			3. ^a	30	37,5	285	215	90	6,9	2,1-2,4
			4. ^a	15	37,3	390	110	45,8	3,5	2,4-2,6
155	27,5	2,3	1. ^a	30	38,9	318	182	79	6,6	1,0-1,5
			2. ^a	30	37,6	295	205	89	7,4	1,5-1,8
			3. ^a	30	37,6	292	208	90	7,5	1,8-2,3
			4. ^a	15	37,0	393	107	46,5	3,8	2,3-2,5
180	21	2,25	1. ^a	30	37,8	358	142	63	6,7	1,1-1,4
			2. ^a	15	37,2	425	75	33	3,5	1,4-1,6
			3. ^a	30	37,5	352	148	66	7,0	1,6-2,0
			4. ^a	30	37,4	362	138	61	6,6	2,0-2,4
198	26	2,5	1. ^a	30	37,5	342	158	63	6,0	1,0-1,6
			2. ^a	30	37,8	337	163	65	6,2	1,6-2,1
			3. ^a	15	38,3	417	83	33	3,2	2,1-2,2
			4. ^a	30	38,1	340	160	64	6,1	2,2-2,5

Como puede apreciarse, a lo largo de las cuatro pruebas de cada rata se registran valores de absorción muy próximos; y cuando el tiempo de la prueba era sólo de 15 minutos, la absorción también se reducía a la mitad. La glucemia sube, como era de esperar, considerablemente. Con ello queda bien de manifiesto que la concentración de la glucosa en sangre influye poco o nada sobre la velocidad de absorción; es una prueba más en favor de la absorción selectiva.

Gracias a nuestra técnica, hemos podido observar el distinto comportamiento de las ratas en ayuno respecto de las que reciben la alimentación mixta ordinaria. En la tabla IV se in-

cluyen los datos recogidos en experiencias de absorciones en serie en animales en ayuno de 24 horas.

TABLA IV

Absorción de glucosa en pruebas sucesivas en un asa cerrada de intestino de ratas en ayuno de 24 horas. Tiempo de las pruebas, 30 minutos. Glucosa puesta 500 mg.

Peso	Long.	Peso	Pruebas	Temp. ^a	Glucosa (mg.)			
					Resid.	Abs.	g.	cm.
170	38	3,5	1. ^a	38	387	113	32,3	3,0
			2. ^a	38,3	265	235	67	6,2
			3. ^a	38,2	270	230	61	6,0
			4. ^a	38,1	287	213	66	5,6
217	41	3,6	1. ^a	37,1	336	164	45,5	4,0
			2. ^a	38,3	290	210	58	5,1
			3. ^a	37,9	289	209	53	5,1
			4. ^a	37,8	310	190	58	4,6
190	25	2,3	1. ^a	37,2	385	115	50	4,6
			2. ^a	36,2	374	126	55	5,0
			3. ^a	36,5	341	159	69	6,4
			4. ^a	37,0	348	152	66	6,1

Parece constante el hecho de que en la primera media hora las ratas en ayuno absorben menos glucosa que las normales (media de éstas 77 mg./g. ó 6,4 cm.; media en ayuno 43 miligramos g. ó 3,9 cm.) en las pruebas sucesivas, se va recuperando la capacidad de absorción normal. Dejamos para otro trabajo el análisis de este comportamiento. En el presente, todas las experiencias realizadas con nuestra técnica lo han sido en ratas sin ayuno, a diferencia de la que habíamos realizado antes, según la técnica de asas aisladas «in situ», en las que ciertamente encontramos siempre valores de absorción por centímetro de asa algo más bajos que los correspondientes con la nueva técnica.

En la gráfica (fig. 4) se recogen todos los datos correspondientes a la comprobación del método en la rata. Salta a la vista la escasa variación entre experiencias sucesivas en el

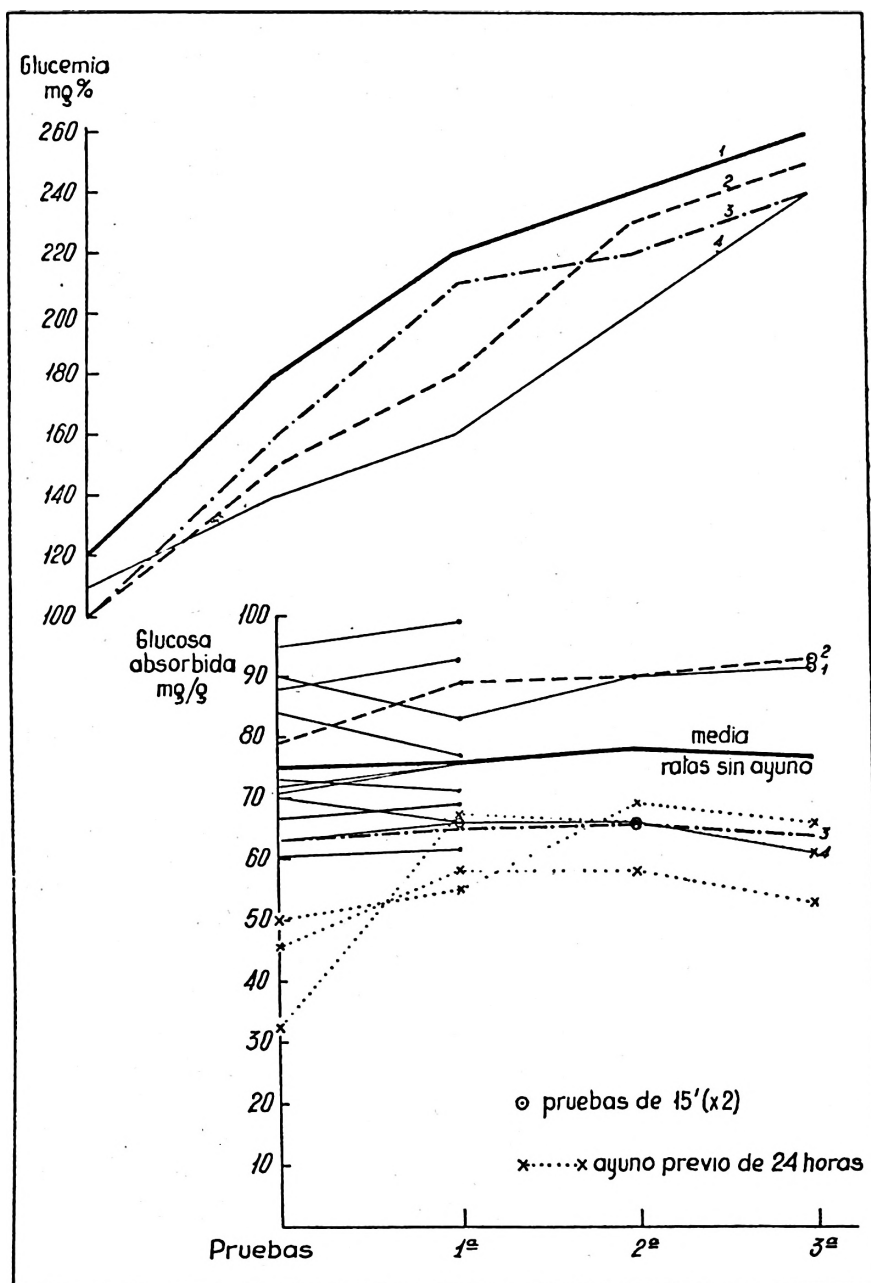


Fig. 4

Absorciones sucesivas en asa aislada de rata. Duración de cada experiencia, 30'. Glucosa puesta, 500 mg.
Curva de glucemia de las experiencias cuádruples en rata, sin ayuno previo.

mismo animal frente a la amplia variabilidad individual. Y es evidente la horizontalidad casi completa de la línea que representa las medias de todas las experiencias en ratas sin ayuno previo.

PARTE II

Datos para una nueva interpretación del mecanismo de la selectividad

Como hemos dejado ya dicho en la introducción, nos propusimos recoger una serie de datos experimentales para investigar el posible papel de las fosfatasa segregadas por la mucosa intestinal durante la absorción de azúcares sobre los procesos de selectividad.

Las experiencias realizadas en asas aisladas, según la técnica antigua son todas anteriores a las que practicamos con la nueva técnica propuesta. Las determinaciones de azúcar se hicieron respectivamente con los métodos de HAGEDORN-JENSEN, la adaptación descrita y el derivado del de FOLIN.

I. La secreción intestinal de fosfatasa durante la absorción de azúcares selectivos y no selectivos.

La existencia de fosfatasa en la luz intestinal es un hecho descubierto hace mucho tiempo. Nada menos que en 1914 — nos referimos, salvo excepción, a las fosfomonocesterasas (las nucleasas se descubrieron antes) — refirió SCHMIDT (119), que los meconios de los recién nacidos daban «fuerte positividad» (empleaba un test cualitativo de fosfatasa).

En 1923 la encontró CLEMENTI (25) en el jugo intestinal de perro y elaboró la primera hipótesis sobre su misión: hidrolizar lípidos fosforados. Esta misión digestiva, hidrolítica, sigue siendo la única considerada por quienes cuentan con la presencia de fosfatasa en jugo intestinal. Por ejemplo, HARRROW en su «Textbook of Biochemistry» (3.^a ed., 1943), dice acerca del jugo intestinal: «Una fosfatasa hidroliza varios de los compuestos de fósforo (nucleótidos, hexosafosfatos), dando, como uno de sus productos, fosfato inorgánico». Y entre los que no cuenta con ella, FEARON, en la 2.^a edición (1940) de su libro «An Introduction to Biochemistry», cita nueve fer-

mentos del jugo intestinal y añade que «la mucosa intestinal contiene dos importantes endoenzimas: una fosfatasa que fosforiliza las hexosas...», etc. (1).

Volviendo al desarrollo histórico, CLEMENTI (27) insiste en 1930 sobre la constante presencia de fosfoglicerasa en el jugo intestinal. Y LEVENE y DILLON en 1930 y 1932 (93 y 94), estudiando la nucleotidasa del jugo intestinal estudian también su actividad sobre glicero y hexosafosfatos.

Por el mismo tiempo, casi sorprende a O. BODANSKY, R. M. BAKWIN y H. BAKWIN (20) que los líquidos con que habían lavado intestinos de peces de los que iban a determinar fosfatasas contenían a veces tanta fosfatasa como el propio extracto de órgano.

WESTENBRINK, que fué como decíamos el primero (1936) en estudiar fosfatasa intestinal en relación con la absorción selectiva, no atendió más que a fosfatasas de pared (146), y no encontró relación entre ambas.

BELLINI y CERA, en 1940 (12, 13, 23 y 24), encuentran en cambio, por camino distinto, relación entre la absorción de distintas sustancias, entre ellas la glucosa, y el contenido de la pared intestinal en fosfatasa: comparando con animales en ayuno disminuyen durante la absorción de glucosa y glicero-fosfato, aumentando durante la de grasas neutras.

De un modo indirecto, hay una serie de testimonios sobre la relación entre fosfatasas de intestino y la absorción intestinal. BODANSKY descubrió en 1934 (17) que la hiperglucemia alimenticia se acompañaba de aumento de la fosfatasa sérica, lo que atribuye a «hipersecreción o hiperproducción de fosfatasa por mucosa intestinal, hígado, riñón y probablemente músculo». De todos modos, las variaciones no son grandes ni al parecer constantes.

Mucho más llamativo es el segundo hallazgo de BODANSKY (18) en una curiosa serie de experiencias efectuadas en perros recién nacidos: «18 horas después del nacimiento, la fosfatasa sérica es de 25 unidades, por término medio, en los controles no alimentados y de 95 en los bien alimentados». Y sigue relacionando estas variaciones con mucosa intestinal

(1) En prensa el trabajo recibimos la 3.^a edición (abril del año en curso); no hay cambio substancial.

e hígado. En 1935 refieren FREEMAN y FARMER (53), que perros sometidos a dieta fundamentalmente proteica, al pasar a dieta fundamentalmente hidrocarbonada presentaban aumento de la fosfatasa sérica. Por el contrario, WEIL y RUSSELL (141) encuentran en la rata que tras la disminución de fosfatasa sérica, provocada por el ayuno, no hay normalización por alimentación con hidratos de carbono y sí en cambio con la de ácidos grasos y cefalina.

Por último, mencionaremos la observación hecha por ALTHAUSEN (3), de que, con su prueba de sobrecarga de galactosa, hay hipergalactosemia superior a la normal en la enfermedad de Paget y en el hipertiroidismo, ambas afecciones relacionadas con alteraciones cuantitativas de fosfatasa, de modo extraordinariamente considerable en la primera (KAY, 71 y observación propia no publicada) y mucho menor, pero al parecer con repercusión concreta en el intestino, según ha encontrado uno de nosotros (116), en la segunda.

Ya dijimos que bajo nuestra dirección ha efectuado LÓPEZ NAVARRO (95) un detenido estudio sobre la secreción de fosfatasas por la mucosa intestinal. Independientemente de sus trabajos, realizados en su mayor parte en cobayos, quisimos comparar la secreción intestinal de fosfatasas ante el estímulo de dos azúcares representativos de los que se absorben selectiva y no selectivamente: glucosa y xilosa (Merck) en la rata, de gran poder selectivo.

Si había más secreción con la primera, la correlación entre selectividad de absorción y selectividad secretora, sería muy significativa. Para ello, utilizando la técnica de asas aisladas y las de determinación de fosfatasas y azúcares descritas, investigamos en una serie de ratas la secreción de fosfatasas ante el estímulo de soluciones isotónicas de glucosa y xilosa en experiencias de 30 y 60 minutos, y en igualdad de condiciones: en cada animal un asa con cada azúcar; en la serie, posiciones de asas alternadas. Los resultados se expresan en las siguientes tablas.

TABLA V

Secreción intestinal de fosfatasa y absorción de azúcares. Asas aisladas con glucosa y xilosa. Tiempo de experiencia, 30 minutos.

Peso	Asa	Long. cm.	Monosa	Fosfatasa presente (UB)		Azúcar abs. (mg.)	
				Total	Por cm.	Total	Por cm.
105	1. ^a	19	Xil.	1,1	0,06	13,3	0,7
	2. ^a	18	Gluc.	1,3	0,07	52,2	2,9
112	1. ^a	21	Gluc.	1,0	0,05	56,7	2,7
	2. ^a	23	Xil.	1,4	0,06	18,4	0,8
108	1. ^a	19	Xil.	1,7	0,09	11,4	0,6
	2. ^a	22	Gluc.	1,5	0,07	61,6	2,8
131	1. ^a	18	Gluc.	1,4	0,08	59,4	3,3
	2. ^a	21	Xil.	2,1	0,10	18,9	0,9
123	1. ^a	17	Xil.	1,2	0,07	8,5	0,05
	2. ^a	20	Gluc.	1,0	0,05	52,0	2,6
Medias				Xilosa	0,076		0,7
				Glucosa	0,064		2,86

TABLA VI

Secreción de fosfatasa intestinal y absorción de azúcares. Asas aisladas con glucosa y xilosa. Duración de la experiencia, 60 minutos.

Peso	Asa	Long. cm.	Azúcar	Fosfatasa presente (UB)		Azúcar abs. (mg)	
				Total	Por cm.	Total	Por cm.
103	1. ^a	19	Gluc	4	0,21	79,8	4,2
	2. ^a	20	Xil.	5,6	0,28	32,0	1,6
120	1. ^a	18	Xil.	4,7	0,26	23,1	1,3
	2. ^a	21	Gluc	4,2	0,20	75,1	3,1
118	1. ^a	20,5	Gluc	4,5	0,22	77,9	3,8
	2. ^a	19	Xil.	5,7	0,30	19,0	1,0
108	1. ^a	22	Xil.	5,5	0,25	33,0	1,5
	2. ^a	21	Gluc	4,8	0,23	73,5	3,5
125	1. ^a	17	Gluc	3,1	0,18	61,2	3,6
	2. ^a	19	Xil.	4,5	0,24	22,8	1,2
Medias				Glucosa	0,208		3,64
				Xilosa	0,266		1,32

Como se ve en la tabla, la realidad es distinta de lo que suponíamos. Hay más fosfatasa, bien que no es grande la diferencia, cuando el estímulo secretor era debido a la xilosa que cuando se absorbía glucosa, en experiencias de una hora de duración. En realidad, no se puede hablar de un estímulo más intenso, pues quizá se trate simplemente de un estímulo más duradero: las diferencias de fosfatasa segregada son muy pequeñas en la primera media hora y después de este tiempo como la glucosa se ha absorbido en mayor proporción, hay una considerable diferencia entre las cantidades de uno y otro azúcar restantes en las asas.

El punto de vista teleológico que apuntábamos, no podía sostenerse. Aun siendo inútil la fosfatasa para la absorción de xilosa, dado que ésta no puede fosforilizarse, se segrega en tanta cantidad o más que cuando se ha de absorber glucosa. Cabía esperar que si con el estímulo de glucosa y xilosa no había grandes diferencias de respuesta secretora, menos las hubiese entre las distintas hexosas. Así nos comunicó LÓPEZ NAVARRO haber encontrado en cobayos; como las diferencias de absorción son más marcadas en ratas, quisimos investigar de todos modos si ocurría lo mismo en estos animales.

Una serie de experiencias tomando dos asas en cada animal, en las que se ponía glucosa y fructosa respectivamente, alternando en los distintos animales el orden de las asas con uno u otro azúcar, nos dió los resultados que se reúnen en la siguiente tabla:

TABLA VII

Secreción de fosfatasa intestinal y absorción de azúcares en la rata. Asas aisladas con glucosa y fructosa. Duración de la experiencia, 60 minutos.

Peso	Asa	Long. cm.	Azúcar	Fosfatasa presente		Azúcar absorbido (mg.)	
				Total	Por cm.	Total	Por cm.
130	1. ^a	21	Gluc.	4,62	0,22	77,7	3,7
	2. ^a	20	Fruct.	3,6	0,18	58,0	2,9
108	1. ^a	18	Fruct.	3,8	0,21	59,8	3,3
	2. ^a	22	Gluc.	5,3	0,24	74,8	3,4
126	1. ^a	19	Gluc.	3,6	0,19	76,0	4,0
	2. ^a	21	Fruct.	4,8	0,25	60,0	3,0
Medias				Glucosa	0,217		3,7
				Fructosa	0,206		3,1

Los valores de fosfatasa segregada por centímetro de intestino son lo suficientemente parecidos, para que no pueda establecerse diferencia entre la respuesta a la glucosa y a la fructosa. En cambio, las cantidades absorbidas de uno y otro azúcar son distintas, de acuerdo con la mayor selectividad para la glucosa que para la fructosa.

2. La absorción de glucosa «en circulación por asa abierta».

Si se hace pasar una solución de glucosa, a suficiente velocidad, a través de un asa intestinal, puede admitirse que no tiene prácticamente tiempo de sufrir transformaciones de tipo fermentativo en ella; además, las secreciones intestinales son «barridas» continuamente y no pueden acumularse en la luz intestinal, con lo que quizá no se consiguen alcanzar concentraciones eficaces de las mismas. Cabía esperar, pues, un descenso de absorción de glucosa en tales condiciones.

Para reducir al mínimo la concentración de fosfatasas en luz intestinal, puede también acudir al procedimiento de recoger el líquido que ha pasado ya una vez por el asa y some-

terlo a ebullición durante unos minutos con lo que se suprime totalmente la actividad fosfatásica que tuviera ; una vez enfriado hasta 38°, se le vuelve a hacer pasar por el asa, todo ello de manera continua. Si la glucosa absorbida es menor, significará que la fosfatasa segregada es necesaria para la selectividad.

Planteamos, pues, en este sentido una serie de experiencias en perros, animales que por la capacidad del asa y de la absorción, son más aptos para este tipo de ensayos. Tienen, en cambio, el serio inconveniente de que la selectividad no es tan alta como en ratas. A continuación se incluyen los respectivos protocolos.

1. Dos perros de 9 y 11 kg. Ayuno de 24 horas. En cada uno de ellos se hacen tres pruebas en absorción de 30 minutos : en la primera se parte de 100 c. c. de solución de glucosa en asa cerrada ; en la segunda se opera con circulación del líquido (200 c. c. de solución) en asa abierta : se ponen 100 centímetros cúbicos inicialmente en la bureta, se vierten al asa y se carga con otros 100 c. c. la bureta abriendo la llave de modo que la velocidad de flujo sea de unos 3 c. c. por minuto ; en la tercera, además de los 100 c. c. se hacen pasar 250 c. c. más a razón de unos 8 a 9 c. c. minuto. Después de cada prueba se lava con 250 c. c. de suero fisiológico, completando las probetas de recogida a 500, 500 y 750 c. c. respectivamente. Simultáneamente a las determinaciones de glucosa no absorbida, se hacen valoraciones de fosfatasa alcalina total arrastrada en cada prueba que se da en unidades totales (miligramo de P liberado en 60 minutos).

TABLA VIII

Absorción de glucosa en perros, en pruebas de circulación por asa abierta, a distintas velocidades.

Peso	Asa		Prue.	Veloc. circulación	Glucosa (mg.)					Fosf. (UB) Total
	Long.	Peso			Puesta	Resid.	Absor.	/g.	/cm.	
9	41	66	1. ^a	0	5.000	3.020	1.980	30	48,3	220
			2. ^a	3 cc/min.	10.000	8.218	1.782	27	43,4	202
			3. ^a	8-9 cc/min.	17.500	15.916	1.584	24	38,6	207
11	44	76	1. ^a	0	5.000	3.024	1.976	26	44,9	173
			2. ^a	3 cc/m.	10.000	8.252	1.748	23	39,7	210
			3. ^a	8-9 cc/m.	17.500	16.056	1.444	19	32,8	156

2. Un perro de 6 kg. Ayuno de 24 horas. Tres pruebas sucesivas de absorción de 30 minutos cada una. Las tres veces, con circulación de la solución de glucosa a velocidad uniforme de unos 6-7 c. c. minuto ; volumen total de solución, por prueba, de 300 c. c., recogiendo en probetas y enrasando a 750 c. c. Se determina la absorción y la fosfatasa de cada prueba.

TABLA IX

Absorción de glucosa en perro, en pruebas de circulación por asa abierta, a velocidad constante.

Peso	Asa		Pruebas	Velocidad	Glucosa (mg.)					Fosf. total
	Long.	Peso			Puesta	Residual	Absor.	/ g.	/ cm.	
6	33	35	1. ^a	67 cc/m	15.000	14.103	897	23	27	229
			2. ^a	»	15.000	14.220	780	20	23	197
			3. ^a	»	15.000	14.142	858	22	26	181

3. Dos perros de 7,4 y 8 kg. Ayuno de 24 horas. En cada uno de ellos se hacen dos pruebas sucesivas de absorción de 60 minutos : en ambas se hace pasar de nuevo al asa el líquido que va saliendo de ella, pero en una de ellas se inactiva antes la fosfatasa. Se parte de soluciones obtenidas mezclando volúmenes iguales de glucosa al 5 % y suero fisiológico. Cada prueba con 400 c. c. de esta mezcla (10 g. de glucosa) y su circulación se regula a 25-30 c. c. minuto. Para inactivar la fosfatasa se substituyen las probetas por Erlenmeyers de 250 c. c. de vidrio Jena, que son calentados directamente a la llama, con lo que el líquido que en ellos va fluyendo está prácticamente siempre en ebullición ; cada 3 ó 4 minutos se cambia el Erlenmeyer (evitando pérdida del líquido que fluye, por momentáneo cierre del tubo) y mientras el nuevo líquido hierve, continúa la ebullición del anterior 1 ó 2 minutos más, llevándolo luego a enfriar al chorro de agua fría hasta que desciende la temperatura a los 38°, momento en el que se vuelve a verter a la probeta. Se establece así un ciclo en que el líquido que sale del asa vuelve a entrar en ella numerosas veces, pero siempre después de haber hervido al menos 3 minutos. En la otra prueba se establece el mismo ciclo, pero se substituye la ebullición por la estancia en el baño a 38°.

TABLA X

Absorción de glucosa en perros, en pruebas de 60 minutos, en circulación por asa abierta, inactivando o no la fosfatasa.

Peso	Long.	Peso	Pruebas	Inactivación	Glucosa (mg.)					Fosf. total
					Puesta	Resid.	Absor. total	/g.	/cm.	
8	49	76	1. ^a	No inactivada	10.000	5.660	4.340	57,1	88,5	890
			2. ^a	Inactivada	10.000	6.200	3.800	50,0	77,5	45
7,4	57	85	1. ^a	Inactivada	10.000	6.303	3.697	43,5	64,8	37
			2. ^a	No inactivada	10.000	5.240	4.760	56	83,5	850

4. Perro de 12 kgs. Ayuno de 24 horas. Tres pruebas sucesivas de 30 minutos de duración ; las tres en circulación por asa abierta. La de la primera y tercera inactivando la fosfatasa como anteriormente se ha referido, pero a distinta velocidad. La segunda sin inactivar y circulando más despacio.

TABLA XI

Absorción de glucosa en perro, en prueba de 30 minutos, en circulación por asa abierta a distintas velocidades, inactivando o no la fosfatasa.

Peso	Long.	Peso	Pruebas	Inactivación	Velocidad	Glucosa (mg.)				
						Puesta	Resid.	Absor.	/g.	/cm.
12	30	480	1. ^a	Inactivada	10-12 cc. m.	10000	9094	906	18,8	30
			2. ^a	No inactiva	3-4 cc. m.	10000	8876	1124	23,0	37
			3. ^a	Inactivada	20 cc. m.	10000	9250	975	15,6	25

Fosfatasa total : 1.^a, 60 ; 2.^a, 166 ; 3.^a, 15.

De los protocolos arriba expuestos se deduce que la absorción disminuye algo por el hecho de que circule la solución a lo largo del asa y que esta disminución se acusa más, cuanto más rápidamente circula el líquido.

Las experiencias de inactivación o no inactivación ponen de manifiesto un sensible descenso, del orden del 20 % en la absorción de glucosa cuando se inactiva la fosfatasa antes de devolver al asa el líquido; la eficacia de tal inactivación se muestra en los valores de fosfatasa encontrados al final de las pruebas.

3. *Acción de los inhibidores de las fosfatasas sobre la absorción selectiva.*

Las experiencias anteriores permitían establecer relación entre las fosfatasas segregadas y la absorción selectiva. Convenía confirmarla con otras en las que se viera si realmente se alteraba la selectividad mediante el empleo de inhibidores de las fosfatasas. Tal alteración había sido demostrada hace largo tiempo, pero en experiencias que no permiten dilucidar si la disminución en la absorción corresponde a la inhibición de las fosfatasas endocelulares exclusivamente o está condicionada, en parte al menos, a la simultánea inhibición de las segregadas.

Bien conocido era el paralelismo entre la acción inhibidora de la florricina y el ácido monoyodoacético sobre la fosforilización y sobre la absorción selectiva (WILSON, 152, LUNDSGAARD, 97, WERTHEIMER, 143, ROBERS y WESTENKÖFFER, 117, para la florricina, y WILBRANDT y LASZT, 151, VERZÁR y LASZT, 137, LASZT y VERZÁR, 92, y VERZÁR y WIRZ, 140, para el monoyodoacético).

Particularmente demostrativas son las experiencias de WERTHEIMER: la florricina inhibe en ratas la absorción selectiva de azúcares tanto cuando se introduce en el asa con la solución de azúcar como administrándola por vía subcutánea, y no influye sobre la absorción de pentosas; actúa sobre las hexosas tanto más cuanto más selectivamente se absorban, hasta el punto de que puede igualarse la absorción de glucosa a la de arabinosa. Afirmaciones similares hace la escuela de VERZÁR con el ácido monoyodoacético.

Pese a la categoría de estos hechos, no faltan afirmaciones en contra. WESTENBRINK (147), encuentra con el ácido monoyodoacético inhibición de la absorción de glucosa, pero también disminuye la de l-xilosa y explica el hecho admitiendo que la inhibición no se debe a una acción directa sobre el proceso de la absorción, sino a trastornos circulatorios. KLINGHOFFER (75), afirma que el monoyodoacético no es un inhibidor específico de la fosforilización, sino un veneno general que inhibe indiferentemente la absorción de gluco-

sa, xilosa y aun cloruro sódico. Quizá sea cuestión de dosis. Desde luego, tienen más valor los hechos positivos de inhibición de hexosas sin influencia sobre las pentosas, en asas de un mismo animal. Frente a la inhibición pretendida por KLINGHOFFER para el cloruro sódico, está la completa falta de influjo encontrada por VERZÁR y LASZT para el sulfato sódico.

LUNDGAARD (96) observó la acción inhibidora de la florricina sobre los procesos de fosfo y defosforilización a concentraciones de $m/200$ y $m/50$. Ya a $1/5.000$ encuentra LASZT (88) inhibición de la síntesis de ésteres hexosafosfóricos por extractos de mucosa intestinal. Contra la inhibición de las fosfatasa por la florricina ha hablado LAMBRECHTS (83), con argumentos poco sólidos. Precisamente ELLINGER y LAMBRECHTS (47), han dado luego una excelente demostración del tóxico en los túbuli proximales para varios derivados de la florricina. Ultimamente, FANTL y ROME (49) han encontrado que la florricina inhibe más la actividad de la fosfatasa (de hígado de conejo) sobre el glucosa-6-fosfato que sobre el glicerofosfato o fenilfosfato. Esta diferencia de comportamiento, unida a ser los dos últimos los substratos habituales para la valoración de la actividad fosfatásica, podría aclarar algunas aparentes contradicciones.

Quedamos, pues, en que con toda seguridad la florricina y el ácido monoyodoacético pueden inhibir la absorción selectiva y que muy probablemente se debe ello a la inhibición de los procesos de fosforilización.

Análoga acción se ha encontrado para la amigdalina, arbutina y salicina por ABDERHALDEN y EFFKEMANN (1). Igualmente inhiben, al menos las dos primeras, la reabsorción de glucosa en los tubuli.

Quisimos en primer término, ampliar este tipo de observaciones con la introducción en asas aisladas de sustancias fuertemente inhibidoras de la fosfatasa. Utilizamos el cadmio y cobre a concentraciones $m/10$ y $m/100$ respectivamente, a las que LÓPEZ NAVARRO había encontrado ejercen una inhibición sobre la actividad hidrolítica de la fosfatasa de la secreción intestinal, de 90 y 80 % respectivamente.

Se procedió en la siguiente forma: Se preparó una solución de glucosa al 5,4 % adicionada de 0,9 % de Cl_2Cd ; para compensar la hipertonía introducida por la sal de cadmio, se disolvió en otra porción de solución de azúcar un 0,3 por 100 de $ClNa$. Para el cobre nos limitamos a adicionar a dos muestras de solución de glucosa un 1 % de solución molar de sulfato de cobre y cloruro sódico respectivamente. En cada rata se preparaban dos asas, una con la sustancia ensayo y la otra con la solución compensada correspondiente, invirtiendo, de un animal a otro, el orden de colocación de las mismas. Los resultados se consignan en la siguiente tabla:

TABLA XII

Acción de cadmio y cobre sobre la absorción de glucosa. En asa, 108 mg. Tiempo de experiencia, una hora

Peso	Asa	Long.	Inhibidor	Glucosa absorbida (mg.)		Fosfatasa segregada (UB)		P inorgánico (γ)	
				Total	Por cm.	Total	Por cm.	Total	Por cm.
108	1. ^a	18	Cd	18	1,0	0,45	0,025	12	0,67
	2. ^a	18	—	41	2,3	0,5	0,028	82	4,5
117	1. ^a	18	—	90	5,0	0,7	0,039	55	3,0
	2. ^a	16	Cd	48	3,0	0,5	0,031	39	2,4
105	1. ^a	16	—	92	5,7	1,7	0,106	82	5,1
	2. ^a	21	Cu	72	3,4	1,9	0,090	160	7,6
102	1. ^a	18	Cu	65	3,6	2,4	0,133	162	9,0
	2. ^a	17	—	60	3,5	4,7	0,276	43	2,5

Las ratas con cadmio estaban frías (por debajo de 34°); también las de cobre manifestaban tendencia al enfriamiento. Las asas con cadmio y cobre aparecían repletas de líquido al final de la experiencia en contraste con las controles. La evidente acción tóxica quita valor a las variaciones de absorción. La fosfatasa segregada es considerablemente inferior a la normal, particularmente en los animales con cadmio, a no ser que se tratase de inhibición de la misma en el propio animal, cosa ésta poco verosímil, dado que tal disminución de actividad se manifiesta igualmente en las asas con cadmio y sin él. En cambio, en los animales en los que una de las asas contuvo cobre se observa una neta diferencia entre los valores de actividad fosfatásica del contenido en las asas, con y sin cobre.

En cuanto al fósforo, hay que resaltar el constante aumento de fósforo inorgánico presente en las asas que contenían cobre, con respecto a los controles.

Vista la acción inhibidora del cobre y cadmio, nos planteamos unas experiencias con nuestra técnica de absorción para tratar de ver si tal efecto se ejercía por la inhibición de las fosfatasas endocelulares o de la segregación. La acción de un determinado factor que se incorpora a la luz intestinal, puede ejercerse en esta misma luz o en la mucosa o en el interior del organismo, una vez que ha penetrado en el torrente circulatorio.

rio. Si después de confirmar en una prueba de absorción la inhibición se arrastra el contenido del asa por un lavado suficiente y rápido, poniendo ahora la solución a absorber sin el factor inhibidor, es lógico pensar en que la acción central debería subsistir, pues continuará en la sangre el absorbido en la prueba anterior y no puede eliminarse en el tiempo de la experiencia; tampoco se ha podido suprimir un efecto tóxico precedente sobre la mucosa; ni es fácil que en breve tiempo de lavado desaparezca tal factor de las células; cabe pensar que a lo largo de la siguiente prueba vaya desapareciendo por paso a la sangre, o regreso a la luz intestinal; pero si el efecto del factor desaparece, al menos en buena parte, por no acompañarlo en la solución a absorber, se tiene bastante fundamento para atribuir gran parte del mismo a su acción en luz.

Por ello, en dos ratas hicimos tres pruebas sucesivas de absorción: la primera, de solución de glucosa, al 5 %; la segunda, con solución de glucosa al 5 %, adicionada de Cl_2Cd que quedaba al 0,9 %; la tercera, con la misma solución de glucosa que tenía ClNa al 0,43 % para compensar la hipertonía por el Cl_2Cd .

En otras dos, la primera y tercera prueba eran con glucosa al 5 % y a la segunda se le adicionaba SO_4Cu (0,1 c. c. de SO_4Cu molar, por cada 10 c. c. de solución de glucosa).

La tabla XIII expresa los resultados.

TABLA XIII

Absorción de glucosa en intestino de rata, en pruebas sucesivas de 30 minutos en asa cerrada, con adición o no de cobre y cadmio a concentración m/100 y m/20 respectivamente. Glucosa puesta, 500 mg.

Peso	Asa		Prueba	Temp.	Inhibidor	Glucosa (mg.)			
	Long.	Peso				Resid.	Absorb.	/g.	/c.
125	26	2,0	1. ^a	37,5	cobre	395	105	52,5	4,0
			2. ^a	37,4		480	20	10	0,8
			3. ^a	37,1		420	80	40	3,1
129	19	1,3	1. ^a	36,5	cobre	388	112	56	5,9
			2. ^a	36,7		425	75	37,5	3,9
			3. ^a	36,4		380	120	60	6,3
182	30	2,3	1. ^a	37,5	cadmio	325	175	76	5,8
			2. ^a	37,6		408	92	40	1,3
			3. ^a	—		Murió en el curso de la prueba			
120	38	2,6	1. ^a	37,5	cadmio	305	195	75	5,1
			2. ^a	36,8		444	56	20	1,5
			3. ^a	—		Murió en el curso de la prueba			

Se confirma la inhibición por cobre y cadmio. La toxicidad del cadmio se pone de manifiesto porque llega a producir la muerte de los dos animales en el curso de las pruebas posteriores; con el cobre, las ratas sobrevivieron bien. Después de la absorción con cadmio o cobre se lavaba abundantemente (con 90 c. c. de suero, en lugar de 30 c. c.). Las terceras pruebas sucesivas a las de cobre, tienden a dar valores de absorción normales: el efecto inhibitor cesa por el lavado.

Quisimos ver si también desaparecía la inhibición de la selectividad por florricina, después del lavado del asa, operando de manera semejante: Dos ratas son sometidas a tres pruebas sucesivas de absorción; la primera y tercera con glucosa al 5 % solamente; la segunda con solución de glucosa al 5 % adicionada de florricina a concentración m/50, la misma que había utilizado LUNDSGAARD para demostrar la inhibición. Después de esta segunda prueba se lava con 90 c. c. de suero. A diferencia del citado investigador, no estimamos necesario

eliminar la florricina previamente a la determinación de glucosa : con la técnica que utilizamos, soluciones tipo de glucosa sola o glucosa con florricina — a la concentración correspondiente — dan exactamente los mismos valores.

TABLA XIV

Acción de la florricina m/50 sobre la absorción de glucosa en asa cerrada de intestino. Glucosa puesta, 500 mg.

Peso	Asa		Prueba	Glucosa (mg.)			
	Long.	Peso		Resid.	Absorb.	/g.	/cm.
110	17	1,3	1. ^a	375	125	96	7,3
			2. ^a	480	20	15	0,9
			3. ^a	385	115	88	6,8
98	16,5	1,3	1. ^a	355	145	111	8,5
			2. ^a	475	25	19	1,5
			3. ^a	380	120	92	7,2

La florricina, inhibidora de las fosforilizaciones, y concretamente de las fosfatasas de la secreción intestinal (LÓPEZ NAVARRO) inhibe la absorción selectiva. El lavado de la luz intestinal es suficientemente eficaz para que tal inhibición desaparezca casi totalmente.

4. *Aceleración de la absorción selectiva por la adición de fosfatasas.*

Las fosfatasas segregadas, según los resultados anteriores, deben intervenir en los procesos de absorción selectiva. Hasta aquí, se trataba de experiencias en las que reduciendo o suprimiendo prácticamente su actividad se seguía una disminución paralela de la absorción. Pensamos averiguar ahora si aumentando experimentalmente su concentración en luz, se facilitaba en algún grado la absorción selectiva.

Quisimos iniciar este ensayo en cobayos que por tener un menor grado de selectividad podían tal vez acusar mejor un aumento del mismo.

Utilizamos asas aisladas en las que se introducía una solu-

ción que contenía glucosa, tampón fosfatos y, además, en una o dos asas del mismo animal, fosfatasa. Se preparaba mezclando volúmenes iguales de solución de glucosa al 16,2 %, tampón de fosfatos m/ 15 de pH 7 ó 6,5, según las experiencias y un medio rico en fosfatasas. Este consistía en unos casos en autolizado de intestino, en otros, era un contenido intestinal, no diluido, de asas de perro que poseían abundante fosfatasa segregada por estímulo de glucosa o glicocola. Otras asas eran llenadas con la misma mezcla, pero sustituyendo el medio rico en fosfatasas por agua, sirviendo como control. De los dos líquidos utilizados en cada caso, se tomaban 2 c. c. con la misma jeringa que usábamos en nuestras experiencias y determinábamos la cantidad exacta de glucosa que contenían.

1. Cobayos

Se utilizaron cobayos con ayuno previo de 48 horas y anestesia de uretano. En cada animal se hicieron 2 ó 3 asas, inyectando en cada una 2 c. c. de líquido. El tiempo de absorción fué de 45 minutos. Se tamponaba a pH 7. La fosfatasa utilizada consistió en un autolizado de intestino de cobayo al 1/10 de 24 horas filtrado por algodón. Los resultados se reúnen en la tabla XV.

TABLA XV

Absorción de glucosa, en asas intestinales de cobayo, tamponada a pH 7 con fosfatos, con y sin adición de fosfatasa de intestino de cobayo. Tiempo, 45 minutos.

Peso	Asa	Long.	Fosfatasa Unidades % (a pH 9,4)	Puesta	Glucosa (mg.) absorbida	
					Total	Por cm.
450	1. ^a	24	0	100	29,5	1,23
	2. ^a	24	155	102	55,5	2,31
350	1. ^a	22	155	100	71,5	3,25
	2. ^a	18	0	100	41,5	2,30
420	1. ^a	21	0	102	66	3,14
	2. ^a	20	180	111	59	2,95
395	3. ^a	23,5	0	102	52	2,21
	1. ^a	20,0	180	111	77	3,85
	2. ^a	21,0	0	102	63	3,0
	3. ^a	22	180	111	70	3,18
Medias					con fosfatasa	3,11
					controles	2,37

Como se ve, en las asas con fosfatasa se absorbe en general más glucosa que en las control; las diferencias por posición de asa se compensan por haber alternado el orden de colocación en las mismas. Las medias revelan un aumento del 31 por 100 aproximadamente. Puede verse también cómo en un mismo animal las 2^{as}. asas con fosfatasa absorben incluso más que las 1^{as}. sin ella, a pesar de que en ese nivel está ya la absorción bastante disminuída.

2. Ratas

Ratas con ayuno de 24 horas y anestesia de uretano. Dos o tres asas en cada animal con 1,5 c. c. de líquido. El tiempo de absorción fué siempre de 30'. Tampón fosfatos de pH 6,5. Se ha utilizado fosfatasa de autolizado de intestino de rata al 1/3. Otras veces, fosfatasa de la secreción intestinal de perro recogida tras estímulo de glucosa o de glicocola. En algún caso se inactivó la fosfatasa.

TABLA XVI

Absorción de glucosa en asas intestinales de rata tamponada con fosfatos a pH 6,5, con y sin adición de fosfatasa de intestino de rata. Tiempo, 30 minutos.

Peso	Asa	long.	Fosfatasa Unidades % (a pH 9,4)	Glucosa (mg.)		
				Puesta	Absorbida	
					Total	Por cm.
100	1. ^a	16	170	82,5	52,3	3,27
	2. ^a	14	0	79,5	22,8	1,63
110	1. ^a	16	0	79,5	39,5	2,46
	2. ^a	12	170	82,5	25,0	2,09
103	1. ^a	14	0	79,5	60	4,28
	2. ^a	15,5	170	82,5	44,3	2,86

TABLA XVII

Absorción de glucosa en asas intestinales de rata, tamponada con fosfatos a pH 6,5, con y sin adición de fosfatasa de secreción intestinal de perro. Tiempo, 30 minutos.

Peso	Asa	Long.	Fosfatasa Unidades % (a pH 9,4)	Glucosa		
				Puesta	Absorbida	
					Total	Por cm.
215	1. ^a	16	0	78	47	2,94
	2. ^a	18	126	93	56	3,05
310	1. ^a	18,5	0	78	61	3,3
	2. ^a	17,5	126	93	49	2,8
295	1. ^a	18	0	78	48	2,67
	2. ^a	19,5	126	93	58	2,97
210	1. ^a	15	0	78	37	2,47
	2. ^a	13	126	93	47	3,61
	3. ^a	12	126	93	35	2,92
				Medias	con fosfatasa	3,07
					controles	2,84

TABLA XVIII

Absorción de glucosa en asas intestinales de rata, tamponada con fosfatos a pH 6,5, con y sin adición de fosfatasa de secreción intestinal de perro (estímulo, glicocola).

Peso	Asa	Long.	Fosfatasa Unidades % (a pH 9,4)	Glucosa			Fosfatasa fi- nal presente Unid. en cm.
				Puesta	Absorbida		
					Total	Por cm.	
Tiempo 30 minutos							
187	1. ^a	15	0	81	57	3,8	0,18
	2. ^a	12	250	85	51,3	4,27	3,36
	3. ^a	15,5	0	81	47,7	3,07	0,77
157	1. ^a	15	250	85	54,7	3,65	3,36
	2. ^a	14,5	0	81	52,1	3,59	1,06
	3. ^a	15,5	250	85	47,7	3,07	3,86
345	1. ^a	21	250	85	77,7	3,70	3,86
	2. ^a	22,5	0	81	60,3	2,68	1,32
	3. ^a	17	250	85	49,8	2,93	5,63
Tiempo 60 minutos							
140	Ileon	11,5	Inactivada	72	30	2,61	—
	Colon	9,5	380	72	10	1,05	—
100	Ileon	9,5	380	72	48	5,05	—
	Colon	7	Inactivada	72	9,5	1,35	—
110	Ileon	13,5	Inactivada	46	22	3,23	—
	Colon	7,5	385	46	13,6	1,81	—
110	Ileon	9,5	385	46	30	3,16	—
	Colon	9	Inactivada	46	8	0,88	—

Las tablas XVI, XVII y XVIII, expresan los resultados obtenidos. Como puede verse en la tabla XVI, en las primeras asas, que quedaron siempre como controles, se absorbe menos glucosa que en las segundas que tenían fosfatasa; la media respectiva es de 2,84 mg/cm. y 3,07, respectivamente. La diferencia tiene más valor, dado que por la posición de las asas, la absorción normal sin adición de fosfatasas debería ser bastante más baja en las segundas que en las primeras. Incluso en asas en porciones considerablemente más bajas (fran-

camente en íleon), se llega a nivelar o aun superar la capacidad de absorción gracias a la adición de fosfatasas.

En las tablas XVII y XVIII se aprecia también, como la adición de fosfatasas acelera, aunque haya alguna excepción, la absorción de glucosa, en proporciones variables.

En los cuatro últimos animales de la Tabla XVIII se recogen datos de íleon y colon; la media en íleon, con adición de fosfatasa inactivada es de 2,9 frente a 4,1 cuando se proporciona abundante fosfatasa. En colon los resultados son inciertos.

Los resultados no permiten establecer diferencias por el distinto origen de las fosfatasas adicionadas.

Nuestra técnica de absorciones sucesivas permitió plantear otra serie de experiencias en ratas para comparar la absorción con o sin adición de fosfatasas en la misma asa del mismo animal.

Se prepararon asas en unos casos en yeyuno, otras veces en íleon o en colon. Se hacían en cada animal tres pruebas: la primera con glucosa y tampón fosfatos; la segunda con glucosa, tampón fosfatos y fosfatasa de secreción intestinal de perro; y la tercera, de nuevo con glucosa y tampón fosfatos. Las soluciones se preparaban de la manera descrita antes. El pH fué 6,5. En algunos casos, como control, se ponía fosfatasa inactivada por permanencia previa durante 15 minutos a 73-75°. En íleon y colon-recto, conviene no introducir la cánula de salida antes de limpiarlos de contenido; para ello, hecho el corte en el asa se aboca ésta a una cápsula y se hace entrar a presión — con jeringa ajustada al tubo de goma de la cánula de entrada en el asa — el suero fisiológico necesario. La escasa longitud del colon, y su pobre capacidad de absorción de glucosa, nos llevó a no poner más que 5 c. c. de solución a absorber; la cánula de salida se introducía sencillamente por el ano y se ligaba sobre el recto desde la cavidad abdominal.

TABLA XIX

Absorción de glucosa en pruebas sucesivas en asa cerrada de intestino de rata, tamponada con fosfatos a pH 6,5 con o sin adición de fosfatasa de secreción intestinal de perro (estimulo glicocola). Tiempo, 30 minutos.

Peso	Asa			Prue- ba	Fosfatasa U. % (a pH 9,4)	Glucosa (mg.)				
	Long.	Peso	Posición			Pues- ta	Resid.	Ab- sor.	/g.	/cm.
115	15	1,22	Yeyuno	1	0	530	425	105	86	7,0
				2	220	535	420	115	94	7,7
				3	0	530	432	98	80	6,5
128	14	1,1	Yeyuno	1	0	530	448	82	75	6,0
				2	220	530	443	87	79	6,8
				3	0	530	367	163	88	8,0
131	20	1,85	Yeyuno	1	0	530	367	163	88	8,0
				2	Inactiv.	530	382	158	85	7,9
				3	0	530	382	158	85	7,9
135	18	1,73	Yeyuno	1	0	530	371	159	92	8,8
				2	175	530	360	170	98	9,5
				3	0	530	365	165	95	9,2
148	17,1	1,5	Ileon	1	0	530	438	92	61	5,4
				2	220	530	425	105	70	6,0
				3	0	530	436	94	63	5,6
133	18,5	1,7	Ileon	1	0	530	424	106	62	5,7
				2	175	530	434	96	56	5,2
				3	0	530	447	83	49	4,5
112	8	0,76	Colon	1	0	265	245	20	26	2,5
				2	220	267,5	232,4	35,1	46	4,3
				3	0	265	253,5	11,5	15	1,4
108	8	0,7	Colon	1	0	265	244	21	30	2,6
				2	175	265	242	23	33	2,9
				3	0	265	254	11	16	1,4

El resultado coincide en general con el obtenido con la otra técnica. Es casi constante el aumento de absorción, aunque ligero, cuando se adicionan fosfatasas; tal incremento no se

presenta si se han inactivado éstas previamente por el calor. El aumento observado también en colon, no es constante.

5. *Sobre el pH óptimo para la absorción de azúcares selectivos.*

En 1931, MAGEE y REID (100) descubrieron que la absorción de un azúcar selectivo, la glucosa, era acelerada un 50 % por la presencia de fosfatos (a pH 7,0), mientras que uno no selectivo, la xilosa, no experimentaba modificación. La experiencia tiene un valor considerable, se había conseguido aumentar una absorción que ya de suyo superaba con bastante a las fuerzas físicoquímicas. Y esta aceleración debía recaer sobre el propio mecanismo de la absorción selectiva, ya que no influía sobre la xilosa.

Sugirieron que debía estar quizá en relación con la formación de ésteres hexosa-fosfóricos, pero sin atreverse a afirmarlo, ya que no los habían encontrado. WILBRANDT y LASZT confirmaron en el año 1933 (151) la aserción de MAGEE y REID, pero dos años más tarde el propio LASZT (87) rebatió experimentalmente que dicha aceleración se debiera precisamente al fósforo: seguía obteniéndola con el tampón de fosfatos empleado por MAGEE y Reid, pero se daba también — y de la misma intensidad — con otros tampones (borato y acetato) del mismo pH. La aceleración estaba ligada al pH neutro; a pH alcalino o ácido disminuía marcadamente la aceleración. La absorción de xilosa no es modificada por ningún pH. Estas son sus conclusiones. Su interpretación (téngase en cuenta que ya dos años antes había formulado con WILBRANDT la teoría de la fosforilización en el epitelio intestinal) es que se favorece «un proceso fermentativo que tiene lugar en el epitelio de la mucosa intestinal... cuyo pH óptimo es 7,0».

No han faltado testimonios en contra, no ya de la interpretación, sino del hecho en sí de la aceleración por fosfatos. CAJORI y KARR (22), afirman que la presencia de fosfatos no acelera la absorción de glucosa en asa de Thiry en perros. Lo mismo dice WESTENBRINK (148) para ratas con el método de CORI, añadiendo que elevando la concentración de fosfatos se llega a retardar la absorción un 20 %.

En este orden de cosas un testimonio negativo a penas resta valor a uno positivo: la absorción selectiva *puede ser acelerada* por modificación del pH.

La interpretación de LASZT, entendiendo «en el epitelio» como en el interior de sus células, está subordinada, como decíamos, a su teoría de la absorción, previamente formulada. En sí, nos parece poco verosímil. No es tan sencillo — ni quizá fuera tan eficaz — el modificar el pH endocelular. SPEK y CHAMBERS (129), entre otros, lo han comprobado. La introducción en el protoplasma de una amiba de soluciones ácidas o alcalinas (ClH o NaOH) adicionadas de un indicador es seguida del viraje de ésta al pH del protoplasma (7,3), sin que se consiga modificarlo aún con la inyección de líquidos

«¡ en la extraordinariamente amplia zona de pH de 2,5 — 9,0 !» Por debajo de pH 2,5 se sigue la coagulación del protoplasma en el lugar de entrada del ácido. No resta valor el que el propio SPEK reconozca (128) que no toda esta invulnerabilidad aparente es real, sino debida en parte a artificio de técnica. Aun con ello, hablan los hechos bastante en contra de la hipótesis de que se modifique el pH del epitelio intestinal por la introducción de tampones en la luz del intestino.

LASZT había utilizado tampones de :

pH 4,0 — 4,7 — 7,0 — 7,4 — 7,8 y 8,4, encontrando absorciones de :

34,4 — 38,5 — 50,4 — 37,8 — 31,6 y 27,6 % respectivamente, siendo la absorción en ausencia de tampón de 30,4. No estaba, pues, muy claro el fundamento para establecer un óptimo a pH 7,0. Para dilucidarlo efectuamos una serie de experiencias de absorción, en asas aisladas de ratas, de glucosa al 5,4 por 100, disuelta en tampones acetato-veronal según MICHAELIS, salvo el cloruro sódico que omitimos, para no aumentar la hipertonia (y sin el acético que indicábamos en la técnica de determinación de fosfatasa). Alternábamos el orden de las asas para comparar dentro del mismo animal los pH 7,0 y 6,0, correspondiendo este último a la zona pasada por alto en las experiencias de LASZT. Los protocolos se resumen en la tabla siguiente :

TABLA XX

Absorción de glucosa en asas aisladas de rata, tamponada a pH 7,0 y 6,0 (tampón acetato-veronal). 30 minutos de duración. 81 mg. en asa.

Peso	Asa	Long.	pH	Glucosa Total	Absorbida Por cm.	Fosfatasa segregada	
						Total	Por cm.
135	1. ^a	17	7,0	63	3,70	1,46	0,08
	2. ^a	18	6,0	44	2,44	1,32	0,07
145	1. ^a	20,5	6,00	64	3,12	1,36	0,07
	2. ^a	17,5	7,00	50	2,86	1,66	0,09
100	1. ^a	22,5	7,0	63	2,80	2,4	0,11
	2. ^a	17,5	6,0	29	1,66	2,5	0,14
118	1. ^a	17	6,0	69	4,06	2,8	0,16
	2. ^a	18,5	7,0	47	2,54	1,2	0,07
Medias						asas :	1. ^a s. 2. ^a s.
						pH 7,0	3,25 2,7
						pH 6,0	3,59 2,05

No hay, por tanto, diferencia apreciable en la absorción de glucosa entre los pH 7,0 y 6,0. La reunión de este dato con los de LASZT permite sentar la conclusión de que hay una zona — no un punto — de pH óptimo para la absorción selectiva, situada precisamente en la neutralidad e inmediatamente por debajo de ella. Los resultados de fosfatasa y fósforo, caen dentro de la variabilidad fisiológica, por lo que no queremos aventurar conclusiones. En cambio, sí queremos resaltar algo que pudiendo ser casual también podría tener un significado fisiológico: las medias de absorción dan una ligera ventaja a pH 6,0 en las primeras asas (yeyuno) y una ventaja del mismo orden a pH 7 en las segundas (íleon). La reacción del contenido intestinal en condiciones fisiológicas es habitualmente ácida, si bien con acidez decreciente a lo largo del intestino. Por ejemplo, en el perro han encontrado GRAYSEL y MILLER (57) unos valores medios de 5,99 en el yeyuno proximal y 6,36 en el íleon distal. La introducción de un tampón de pH 6,0 es, pues, más fisiológica en yeyuno que en íleon.

Para concretar más la zona de pH óptima para la absorción, utilizamos nuestra técnica de pruebas sucesivas en la misma asa. El tampón acetato veronal ejerce cierto efecto tóxico que comienza a influir sobre la absorción, según observamos, a partir de la hora y media de ponerlo en el asa, y que puede llegar a producir la muerte del animal a las dos horas o aun antes. Por ello, sólo hicimos tres pruebas en cada rata, de 30 minutos. Preparamos soluciones amortiguadoras de pH 7,66, 7,0, 6,75, 6,12 y 5,0, substituyendo los 2 c. c. de ClNa al 8,5 %, por 6 c. c. de glucosa al 18 % (1,08 g.) y poniendo el ClH que corresponde para cada pH y completando con agua a 25 c. c. Queda así tampón isotónico, glucosado al 4,32 %.

En la tabla XXI se ve cómo se planteó la experiencia.

TABLA XXI

Absorción de glucosa a distintos pH (acetato-veronal) en pruebas sucesivas de 30 minutos de duración, en asa cerrada de rata. Glucosa puesta, 430 mg.

Peso	Asa		Prueba	pH	Glucosa mg.			
	Long.	Peso			Resid.	Absorb.	/g.	/cm.
155	19	1,57	1	7,66	355	75	48	3,9
			2	7,00	295	135	84	7,1
			3	6,75	289	141	90	7,4
145	15,5	1,1	1	7,00	342	88	80	5,7
			2	6,75	326	104	95	6,7
			3	6,12	335	95	86	6,1
140	18	1,45	1	6,75	318	116	80	6,4
			2	6,12	318	112	77	6,2
			3	5,0	336	95	65	5,2

Hay claro descenso a pH 7,66 y a pH 5,0 ; entre 7 y 6, hay una zona óptima e incluso podrá hablarse de un vértice sobre 6,7-6,5 ; pues en los datos recogidos se aprecia una serie de absorción que groseramente puede expresarse así :

$$7,66 < 7 < 6,75 > 6,12 > 5.$$

6. *Participación del fósforo segregado en la absorción selectiva*

De lo que más nos había llamado la atención, era el doble hecho referido por LASZT (89 y 90) de que el fósforo segregado por el intestino ofrece un comportamiento relacionado con la absorción selectiva y que tan importante era para ella que su eliminación funcional la inhibía por completo.

Determinando fósforo inorgánico en el contenido intestinal de asas de rata en absorción de azúcares encontró que a lo largo del tiempo aumentaba constantemente cuando los azúcares no eran selectivos (xilosa y manosa) mientras que la curva presentaba una inflexión cuando se trataba de galactosa o glucosa; después de 15 ó 30 minutos respectivamente no sólo no seguía aumentando, sino que *disminuía*, con particular intensidad en el caso de la glucosa. Este hecho ha sido confirmado por uno de nosotros (PONZ, 115).

En una segunda serie de experiencias adicionaba LASZT al azúcar cloruro de cerio (al 0,25 %) que precipitaba los fosfatos. El resultado fué completamente demostrativo: el fósforo disuelto encontrado en luz intestinal fué constantemene nulo, la glucosa se absorbía a la misma velocidad que la xilosa, y ésta y la manosa se absorbían a la misma velocidad que en ausencia de cerio; o dicho más brevemente: el cerio inhibía completamente la absorción selectiva sin influir lo más mínimo sobre la no selectiva.

Ya desde el primer momento consideró LASZT este comportamiento del fósforo como un valioso dato en favor de su teoría de la fosforilización. Pero al final del último trabajo dice todavía «la relación cuantitativa entre el fósforo segregado y el azúcar reabsorbido no la podemos todavía comprobar ni aun con estas experiencias».

Nos planteamos el siguiente dilema: el cerio actúa en la luz intestinal o también en el epitelio después de absorbido. Por el testimonio de LASZT (90), de no encontrarse ninguna alteración histológica en mucosa intestinal, y tolerar el animal dosis administradas por vía parenteral cuatro veces mayores que las utilizadas en sus experiencias parecía menos probable la segunda. Para ver de aclararlo planeamos la siguiente experiencia:

Observar en un mismo animal la absorción de hexosa y pentosa con cerio e inmediatamente después de arrastrarlo. De actuar el cerio en la mucosa, después de absorbido, era de esperar una persistencia de influjo más o menos duradera, pero que debía ser apreciable en experiencias de corta duración. Procedimos de la siguiente forma: En dos asas distintas de un mismo animal se pone glucosa y xilosa con cerio; después de media hora se abren «in situ» los extremos distal y proximal de cada una, arrastrando su contenido con unos 20 c. c. de suero fisiológico a 37°. Se vacía el residuo de líquido de lavado exprimiendo con suavidad; se liga inmediatamente por encima de la abertura distal y se introduce una nueva dosis de solución de azúcar, la misma que la primera vez, sin cerio. Los resultados se consignan en la tabla siguiente:

TABLA XXII

Absorción de glucosa y xilosa en presencia de cerio e inmediatamente después de arrastrarlo. Tiempo de absorción, 30 minutos. El Cl_2Ce al 0,25 %. Glucosa y xilosa al 5,4 % y 4,5 %, respectivamente. Secreción de fosfatasa y fósforo inorgánico en luz.

Peso	Asa	Long. (1)	Azúcar	Con Cerio (2)			Sin Cerio		
				Absor. cm.	Fosfatasa Por cm.	P/cm.	Abs. cm.	Fosfatasa cm.	P/cm.
135	1. ^a	19	G.	1,75	0,021	0	2,58	0,048	3,3
	2. ^a	20	X.	1,2	0,013	0	1,2	0,035	2,6
			G/X	1,45			2,15		
135	1. ^a	21,5	X.	1,02	0,05	0	1,2	0,065	3,3
	2. ^a	15	G.	1,06	0,062	0	3,13	0,058	1,0
			G/X	1,04			2,6		

De los resultados consignados se desprende que efectivamente el cerio introducido en luz intestinal inhibe la absorción

(1) Longitud medida después de la segunda parte de la experiencia; en la primera, serían unos 2 cm. más largas; los cálculos por centímetro se hacen sobre este supuesto.

(2) Los resultados de esta primera parte de la experiencia son forzosamente aproximados dadas las condiciones de extracción de los contenidos de las asas y la referencia a longitudes no exactas.

de glucosa sin influir sobre la de xilosa, si bien dicha inhibición no es tan completa que suprima de un modo absoluto la absorción selectiva.

Y que inmediatamente o muy poco después (a lo sumo en el plazo de un cuarto de hora) de arrastrar el cerio de la luz intestinal, se reanuda la absorción selectiva. A este respecto hay que observar que si las relaciones glucosa-xilosa no llegan en las dos experiencias realizadas al nivel habitual en animales normales, se explica perfectamente por la sola razón de que en este caso el considerable número de manipulaciones en los animales ponía a éstos en el curso de la segunda parte de la experiencia en manifiesta inferioridad de condiciones, lo que se objetivaba por el enfriamiento de los mismos.

Posteriormente, hemos podido repetir estas experiencias con nuestra técnica de absorciones sucesivas, que suprime todos estos inconvenientes.

Por lo general hacemos tres pruebas por asa, poniendo o no en la solución a absorber, Cl_2Ce al 0,25 %. Es de gran importancia lavar mucho el asa, después de que ha contenido cerio (con unos 90 c. c.). El orden de las pruebas se alterna, como se ve en la tabla que reúne los resultados.

TABLA XXIII.

Absorción de glucosa en pruebas sucesivas de 30 minutos, con adición o no de cerio, en asa intestinal de rata. Glucosa puesta, 500 mg.

Peso	Asa Long.	Peso	Prueba	Glucosa absorbida (mg.)		
				Total	Por g.	Por cm.
180	30	2,5	1	— 247	118	8,2
			2	+ cerio 145	58	4,8
			3	— 210	84	7,0
115	40	3,2	1	— 240	75	6,0
			2	+ cerio 155	48,5	3,9
			3	— 200	62,5	5,0
128	18	1,2	1	— 100	83	5,5
			2	+ cerio 68	56	3,7
			3	— 110	91	6,0
130	26	2	1	— 145	72,5	5,6
			2	+ cerio 90	45	3,5
			3	— 120	60	4,6
200	35,5	2,8	1	— 229	82	6,5
			2	+ cerio 27	45	3,6
			3	+ cerio 30	46	3,7
220	25	2	1	— 160	80	6,4
			2	+ cerio 120	60	4,8
			3	+ cerio 85	42	3,2
165	27	2	1	— 188	94	7,0
			2	+ cerio 116	58	2,2
			3	+ cerio 64	32	1,2
186	20	1,7	1	— 181	112	9,5
			2	+ cerio 95	55	4,7

El efecto inhibitor del cerio se manifiesta con gran constancia. Después de arrastrar el cerio del asa, las pruebas de absorción sucesivas tienden a recuperar los valores normales, lo que no siempre se llega a conseguir. Las medias de las experiencias son las siguientes :

- 1.^a prueba con glucosa 89 mg./g. y 6,8 mg./cm.
- 2.^a prueba con glucosa y cerio 53 mg./g. y 3,9 mg./cm.
- 3.^a prueba con glucosa 74 mg./g. y 5,6 mg/cm.

Por la supresión del cerio de la luz intestinal se restablecen mucho los procesos que condicionan la absorción selectiva. El que rara vez se consiga la recuperación completa puede ser debido a que también interviene el cerio en las células epiteliales, ya que LASZT afirma que no tiene acción tóxica.

No encontramos, sin embargo, una *supresión total* de la selectividad por el cerio. Bien se ve en la tabla XXIV que la absorción de glucosa con cerio no desciente tanto que iguale a la de xilosa.

La gráfica de la fig. 5 refleja todos estos resultados.

TABLA XXIV

Absorción de xilosa comparada con la de glucosa adicionada de cerio. Ratas. Pruebas de 30 minutos.

Peso	Asa		Prueba	Azúcar absorbido (mg.)		
	Long.	Peso		Total	/g.	/cm.
172	24,5	2,0	1. ^a	Xilosa 40	20	1,6
			2. ^a	Glu + Ce 82	41	3,3
			3. ^a	Glucosa 136	68	5,5
148	10,6	1	1. ^a	Xilosa 17	17	1,6
			2. ^a	Glu + Ce 30	30	2,8
			3. ^a	Glucosa 62	62	5,8

También estudiamos en *perros* la acción del cerio. En la tabla XXV se da idea del planteamiento de la experiencia. Se parte de 100 c. c. de glucosa al 5 % y la adición de cerio se hace en forma de Cl_2Ce al 0,25 %.

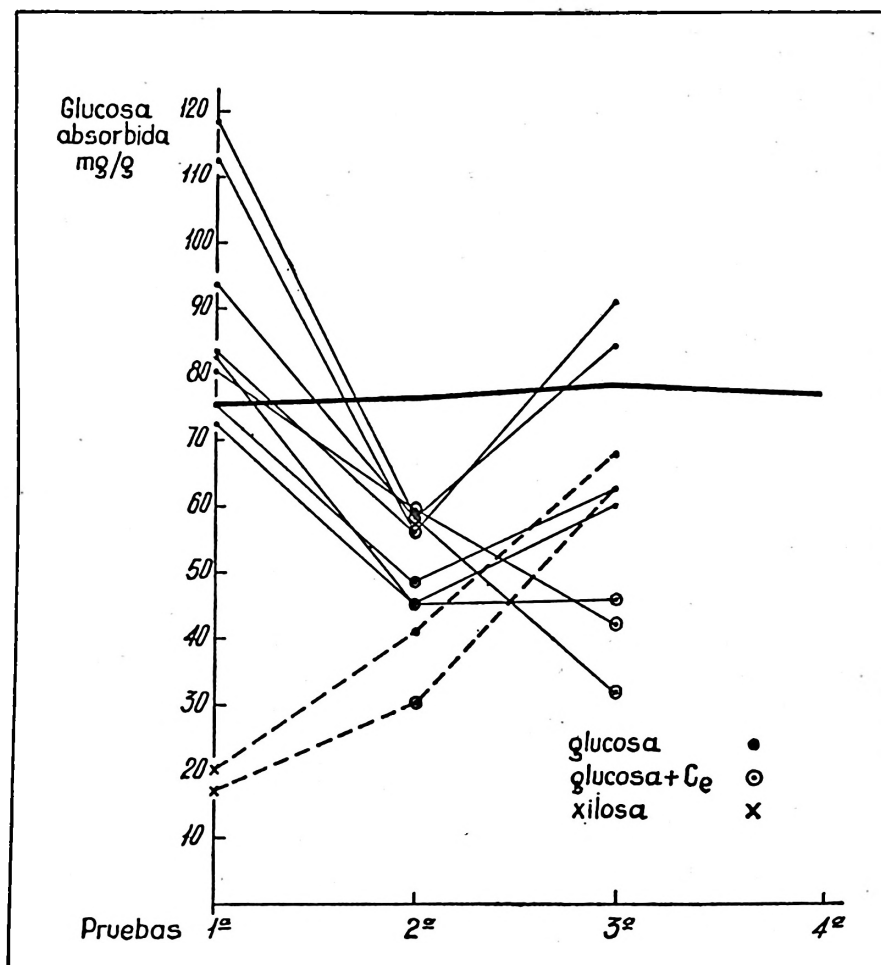


Fig. 5

Absorción de glucosa, glucosa con cerio y glucosa después de una absorción con cerio y comparación con xilosa.

En trazo grueso las medias de las ratas normales sin ayuno previo de la fig. 4.

TABLA XXV

Absorción de glucosa en pruebas sucesivas de 30-60 minutos, con adición, o no, de cerio en asa intestinal de perro.

Peso	Peso del asa	Prueba	Tiempo	Glucosa absorbida (mg.)		
				Total		Por g.
7	113	1. ^a	30	+ cerio	3000	26,5 mg.
		2. ^a	30	—	3160	28 "
6	63	1. ^a	60	—	2580	41 "
		2. ^a	60	+ cerio	2210	35 "
5	52	1. ^a	60	—	1900	36,5 "
		2. ^a	60	+ cerio	1100	21,2 "
7	60	1. ^a	60	—	3280	54,6 "
		2. ^a	60	+ cerio	2780	46 "
		3. ^a	60	+ florricina	2750	45,0 "
9	54	1. ^a	60	+ cerio	2520	46,6 "
		2. ^a	60	—	3125	57,8 "

Se comprueba por tanto en perros el hecho de la inhibición de la absorción de glucosa por efecto del cerio, señalado por LASZT en la rata; sin embargo, el grado de tal inhibición es menor en perros: sólo es de un 15 a 25 % por término medio. Hay que relacionar esto con el menor grado de selectividad; en el cuarto perro puede apreciarse como no es mayor la inhibición que se consigue por la florricina.

El efecto del arrastrado del cerio residual fuera del asa, permite recuperar más o menos la capacidad de absorción.

Tanto en ratas como en perros, los hechos hablan, pues en contra de aquella posibilidad de que el cerio actuase en la mucosa intestinal después de absorbido, posibilidad que ya de antemano considerábamos improbable.

Supuesto ya que el cerio actúa en luz intestinal, es decir, por precipitación de ese fósforo segregado por la pared intestinal, se planteó un nuevo dilema: ¿Ese fósforo que condiciona la absorción selectiva actúa en la luz intestinal o en el epitelio después de reabsorbido? Que se reabsorbe, es un hecho

cierto (1), ya que *disminuye* su cantidad después de la primera media hora. Pero es muy distinto que tal reabsorción sea factor integrante o sólo condicionante de la absorción selectiva de azúcares. Esto no lo puede aclarar el cerio. Desde luego nos parece poco verosímil la segunda hipótesis, que en todo caso pretendería explicar un fenómeno sobre la base de otro similar no más explicado: que la absorción selectiva de azúcares *comenzase* por una reabsorción selectiva de fósforo.

7. *Sobre la naturaleza del fósforo de la secreción intestinal*

No hemos encontrado en la literatura referencias concretas sobre la naturaleza del fósforo de la secreción intestinal. (Véase bibliografía citada por BABKIN (8, pág. 73 y siguientes). LABBÉ y FABRYKANT (75), no dicen (pág. 202) más que: que parte del fósforo de las heces procede «de secreciones intestinales». En una determinación aproximada (dada la escasa cantidad de material de partida) encontramos una cantidad de fósforo total apreciablemente mayor que el orgánico. Pensando en los ésteres hexosafosfóricos procedimos a realizar unas experiencias consistentes en determinar fósforo inorgánico inmediatamente de arrastrado el contenido de asa con glucosa con suero fisiológico frío y después de haberlo dejado algún tiempo en el baño a 37°. Encontramos, con sorpresa, en lugar de un presunto aumento por acúmulo de ésteres, un aumento constante y algunas veces considerable del fósforo inorgánico.

A partir de este hallazgo, proyectamos la determinación sistemática de fósforo inorgánico presente al final de las experiencias de absorción y el que aparecía después de una a tres horas de mantenimiento del líquido a 37°. Para suprimir causas de error, adoptamos la siguiente técnica:

Se lavan las asas y se arrastra su contenido inmediatamente después de separarlas del cuerpo utilizando para ello suero fisiológico frío (a unos 5°), se diluye al volumen habitual (25 centímetros cúbicos); sin pérdida de tiempo se mezcla y se sacan con pipeta de dos aforos dos muestra de 5 c. c. de líquido frío; los primeros 5 c. c. se mezclan en un tubo de en-

(1) En rigor cabría una disminución de fosfato por conversión en un compuesto orgánico de fósforo. Pero también ligaría íntimamente las fosfatasas de luz con la absorción selectiva influenciada por dicha disminución de PO_4 .

Transcurrido el lapso de tiempo destinado a conseguir el equilibrio entre fósforo orgánico y fósforo inorgánico, se añade 1 c. c. de tricloraacético a los tubos del baño, y, pasados unos minutos, se filtran todos y se procede a la determinación *simultánea* de fósforo inorgánico según la técnica descrita. En algunas determinaciones duplicadas hemos comprobado la regularidad de los resultados. Por de pronto, efectuamos una serie de experiencias en que sólo atendimos al fósforo, lo que simplificaba considerablemente el trabajo, tanto de vivisección como de análisis. Son los consignados en la tabla siguiente :

Fósforo inorgánico y fácilmente hidrolizable contenido en asas aisladas de intestino de rata, previamente lavadas, tras permanencia en ellas durante 30 minutos, de soluciones isotónicas de glucosa, xilosa y glicocola.

Peso	Asa	Long.	Subs.	P inorgánico				P hidro- lizado Por cm.
				Total		Por cm.		
				Inicial	Final	Inicial	Final	
171	1. ^a	55	Glucosa	145	180	2,64	3,27	0,63
146	1. ^a	42	Glicocola	84,7	120	2,02	2,86	0,84
105	1. ^a	17	Xilosa	44	49	2,58	2,88	0,30
	2. ^a	15,5	»	48	60	3,09	3,87	0,78
145.	1. ^a	17	Glucosa	39	59	2,29	3,47	1,18
	2. ^a	20	»	64,5	78,5	3,22	3,92	0,70
117	1. ^a	21	»	110,5	110,5	5,26	5,26	0,—
	2. ^a	17,5	»	85	87,5	4,85	5,—	0,15
129	1. ^a	19	»	24	23	1,26	1,21	0,05
	2. ^a	21	»	53,5	55,5	2,55	2,64	0,09
146	1. ^a	16	»	29	28,5	1,81	1,78	0,03
	2. ^a	18,5	»	77	104,5	4,16	5,65	1,49
180	1. ^a	21,5	»	66	75	3,07	3,48	0,41
	2. ^a	17	»	72	150	4,23	8,52	4,59
Media								0,79

La presencia de ésteres fosfóricos fácilmente hidrolizables por la propia fosfatasa de la secreción intestinal, es, pues, un hecho constante e independiente, al menos en parte, de la formación de ésteres hexosafosfóricos, ya que también se da con la glicocola y xilosa. Decimos en parte, por dos razones. La primera, porque está demostrada la incapacidad de esterificación de la xilosa (LASZT, 80) y la segunda porque precisamente, de radicar la absorción selectiva en la formación de ésteres hexosafosfóricos en la luz intestinal, deberían, lógicamente, ser muy rápidamente absorbidos. Y decimos esto, aun teniendo en cuenta el trabajo publicado por MATHIEU (95), precisamente en la misma fecha que el último citado de LASZT, ya que, como más adelante discutiremos, no demuestra en modo alguno la imposibilidad de tal absorción rápida.

8. *Síntesis de ésteres hexosafosfóricos por las fosfatasas de la secreción intestinal*

El conocimiento de la formación enzimática de ésteres hexosafosfóricos en el organismo, es casi tan antiguo como el conocimiento de la absorción selectiva: data de comienzos de siglo. Pero el relacionarlo con ella data sólo de 1933.

Al principio se tendía a considerar la síntesis y la hidrólisis como producida por fermentos distintos («Fosfatasas» de EULER). Todavía no está suficientemente aclarado. Pero es casi seguro que una misma fosfatasa puede realizar ambas funciones, o mejor, cataliza la reacción de doble sentido hasta un equilibrio cuyo resultado será síntesis o hidrólisis según el punto de partida y según — y esto es muy importante — la participación de factores que influyen sobre el punto de equilibrio. En este sentido están realizando una serie de trabajos ROCHE y colaboradores con la fosfatasa intestinal (103, 104 y 110).

Con todo, desde el descubrimiento de las primeras síntesis por la levadura hasta el aislamiento de la hexoquinasa logrado en el año último y simultáneamente por BERGER y colaboradores (13) y KUNITZ y MAC DONALD (72) se ha ido complicando la interpretación de los procesos de fosfo y defosforilización. No faltan los que insisten todavía en que se trata de procesos

distintos, particularmente entre los que han estudiado el problema en el riñón. KALCKAR (63) lo supone, atribuyendo la acción favorecedora del fluoruro sódico sobre la síntesis «in vitro» por extractos renales, a la *inhibición de la fosfatasa*. CRITZLER y GUTMAN (35) pretenden demostrarlo por el hecho de no encontrar en el riñón de rata intoxicada con florricina disminución de actividad fosfatásica, ni siquiera histoquímicamente (recuérdese la concentración selectiva de la florricina (45) en el epitelio de los tubuli).

El hecho es que los extractos de mucosa intestinal, de considerable capacidad hidrolítica frente a ésteres monofosfóricos, pueden también sintetizarlos. KAY (64) obtuvo diversos ésteres; concretamente el glucosafosfato tan sólo en muy débil proporción. LASZT (66) obtiene una esterificación del 13 al 14 por 100 del fósforo inorgánico inicialmente presente, con glucosa y galactosa a pH 7,0; ninguna esterificación consiguió con manosa y xilosa; un 10 % con fructosa. El monoyodoacetato inhibe totalmente estas fosforilizaciones a concentración de 1/5.000. Las experiencias son muy interesantes, pero todas ellas se hicieron con extractos de mucosa, sin poner atención en la posibilidad de que las fosfatasas segregadas a la luz intestinal pudieran asimismo esterificar las hexosas de un modo semejante.

Iniciamos por esto una serie de pruebas de esterificación «in vitro» con fosfatasa de secreción intestinal.

Operábamos como sigue:

Saturamos de glucosa una solución tampón de fosfatos, de pH 6,5 (recuérdese la zona de pH 7,0-6,0) y de concentración m/15. Esta solución se mezcla a volúmenes iguales con el líquido cuya actividad esterificante se quiere observar, añadiendo eventualmente sustancias activadoras o inhibidoras disueltas en no más de un décimo del volumen de la mezcla glucosa-fosfato-fosfatasa (la dilución desplaza el equilibrio hacia la hidrólisis). Se reparte la mezcla en tubos de ensayo provistos de tapón esmerilado a razón de 1 c. c. por tubo, cuidadosamente medidos. Después, a una parte de ellos, se añaden presuntos activadores o inhibidores a ensayo, disueltos en la mínima cantidad de líquido posible (de preferencia una gota). Se tapan los tubos y se dejan en la estufa a 37°. Dos de los tubos contenían ya 9 c. c. de ácido tricloroacético al 6 % y

servirán para la determinación de fósforo inorgánico inicial, que no efectuamos sino después de cumplir el tiempo máximo de incubación previsto. A intervalos de tiempo que varían según los casos, se agrega a dos de los tubos (o a cuatro, cuando se ensaya un presunto activador, dos con él y dos sin él), 9 centímetros cúbicos de tricloroacético al 6 %, o 9-V c. c., siendo V el volumen del líquido agregado para experimentación, cuando éste fué superior a una gota (en cuyo caso los tubos testigos llevaban el mismo volumen de agua destilada para igualar la dilución de las mezclas hidrolizantes).

También aquí la desproporción entre sustancia a determinar — fósforo inorgánico — y proteínas, permite, aun no siendo pequeña de ordinario la cantidad de éstas, omitir la separación de las mismas. El tricloroacético las precipita interrumpiendo toda actividad enzimática, pero sería superfluo filtrar. A cada 1 c. c. de los líquidos ligeramente turbios resultantes, se añade 9 c. c. de agua, 2 c. c. de molíbdico y 2 c. c. de amidol; se ponen también las mismas cantidades de estos líquidos en dos tubos que contienen ya 1 c. c. de soluciones standard de fósforo de 5 y 10 mg. % respectivamente. Después de un cuarto de hora se efectúa la colorimetría en la forma descrita.

El cálculo es más sencillo; como no interesan cifras absolutas sino que basta, y aun es lo más demostrativo, conocer el tanto por ciento de fósforo, «desaparecido» por esterificación, utilizamos para calcular éste, los valores que dan las tablas colorimétricas de uno de nosotros, varias veces citadas, prescindiendo por completo de la concentración del standard y de la dilución de los problemas.

Dado el escaso volumen de líquido contenido en un intestino delgado de rata y dado que aquí no nos convenía diluir, hemos utilizado para la mayor parte de las experiencias el líquido contenido en grandes asas de intestino de perro después de media o una hora de introducida una solución isotónica o de concentración doble, respectivamente, de glucosa o glicocola, en cantidad tal que se apreciase moderada repleción del intestino.

Pronto conseguimos demostrar la esterificación de glucosa con fósforo por la acción de contenido intestinal tanto de perro

como de rata y lo mismo si se utilizó como estímulo secretor glucosa que glicocola. Ahora bien, esto sucedía después de un día de incubación. LASZT (66) obtenía esterificaciones del orden del 13 por ciento en plazos de 8 a 14 horas, después de haber mantenido los extractos de mucosa intestinal otras 10 ó 12 horas a 37°, ya que estos extractos liberaban fósforo inorgánico, por sí mismos.

Hemos hablado de nuestro hallazgo de que el líquido contenido en el intestino durante las experiencias de absorción libera también fósforo inorgánico. Con incubación previa del contenido intestinal hemos conseguido acelerar la aparición de la síntesis. Pero lo que no hemos conseguido es obtener una cantidad significativa de síntesis en menos de algunas horas. Un ejemplo típico es el consignado en la siguiente tabla.

TABLA XXVII

Esterificación de glucosa con fosfato a pH 6,5 por líquido contenido en intestino de perro a los 30 minutos de introducida una solución isotónica de glucosa. En presencia de FNa al 0,2 por 100 a 37°.

Tiempo en horas	Fósforo inorgánico	Esterificado en %
0	0,73	
1/2	0,71	2,7
16	0,68	6,9
24	0,65	10,9
44	0,59	19,6
48	0,58	20,5
72	0,63	13,7

La máxima esterificación la hemos obtenido en presencia de fluoruro sódico al 0,2 % y taurocolato sódico a concentración m/100, para el que tan notable diferencia de comportamiento presenta la fosfatasa intestinal a esta concentración ; es indiferente o incluso activador según el pH (LÓPEZ NAVARRO, l. c.), mientras que sobre la fosfatasa de próstata hemos encontrado a la misma concentración una inhibición del 95 %.

La esterificación en estas condiciones importó a las 72 horas un 24,7 %.

DISCUSION

Dividiremos la discusión de acuerdo con las dos partes, claramente delimitadas, de nuestro trabajo: métodos de trabajo propuestos y resultados de las experiencias de absorción.

1. Técnicas:

Excepcional interés tiene la *nueva técnica que proponemos para el estudio de la absorción intestinal*.

Con ella, no se aumentan de ninguna manera las manipulaciones que se necesita hacer en toda técnica de asas aisladas «in situ»; por el contrario, se obtienen una serie de ventajas en este aspecto:

Se suprime la necesidad de impulsar el líquido de lavado inicial del asa hacia el intestino final y el ano, que implicaba el manoseo del intestino y dejar siempre un no pequeño volumen de líquido en otros tractos intestinales. No hay que deslizar los dedos por el asa para conseguir su limpieza completa, gracias a las cánulas introducidas, puede lavarse cómodamente con cuanto suero fisiológico se precise. La gran mayoría de las veces, no hay que sacar el asa de la cavidad abdominal para obtener la total limpieza de la misma, con lo que se reduce el enfriamiento. También se evita el medir el asa «in vivo» antes de la prueba, con nueva reducción del masaje visceral; basta calcular «a ojo», aproximadamente, la longitud del asa a utilizar; la medición exacta se hace después de la experiencia, reduciendo los valores a cm. de longitud y a gramo de asa intestinal. Vigilando la calefacción y la temperatura durante la experiencia se consigue conservarla casi constante. También es prácticamente constante la presión arterial.

Mucho mayores son las ventajas en cuanto a posibilidades de la técnica. Con nuestro método se tiene «virtualmente» una fístula de Thiry-Vella en muy pocos minutos; no importa que el resto del intestino quede interrumpido por las ligaduras del asa, pues no le hace falta al animal dado que la experiencia dura unas horas. Con el inconveniente de la anestesia, pero

con las ventajas de trabajar con una mucosa «fisiológicamente normal», mientras que con la fistula ya dijimos que se investigaba con mucosas que habían dejado de ser funcionales durante todo el tiempo postoperatorio de consolidación.

Comparativamente a las técnicas clásicas de asas aisladas «in situ», la nuestra conserva todas sus posibilidades y le permite muchas más:

1. — Puede estudiarse la absorción de soluciones que circulan por el asa a las velocidades que se quiera; aunque esto precise el paso de una gran cantidad de líquido y por ende suponga cierta dificultad para apreciar la proporcionalmente escasa cantidad de substancia absorbida, sobre todo con circulaciones rápidas; se consigue soslayar este inconveniente, haciendo volver a pasar por el asa el líquido que ya ha circulado por ella, con lo que un reducido volumen del mismo puede estar circulando continuamente.

2. — Con el estudio de la absorción «en circulación por asa abierta» se puede reducir a un mínimo la concentración de un determinado factor segregado por la mucosa; basta eliminarlo antes de volver el líquido al asa. Así hemos hecho nosotros, inactivando la fosfatasa segregada.

3. — La realización de pruebas de absorción sucesivas en la misma asa, está totalmente resuelta con nuestra técnica. Con ello, se dispone de un medio que permite como ninguno estudiar comparativamente los diferentes grados de absorción de substancias hidrosolubles, y las influencias de distintos factores sobre la absorción, ya que se investiga en la misma asa del mismo animal. En el corto espacio de tres, cuatro o cinco pruebas sucesivas, no hay factores internos (derivados de la anestesia o de la operación) que modifiquen la absorción de glucosa, por ejemplo; ni siquiera los altos valores de glucemia alcanzados, según se aprecia en nuestros protocolos. Tal constancia garantiza que cuando por la introducción de cierta condición experimental se modifique la cuantía de la absorción, hay que atribuir con seguridad el efecto a la condición experimental introducida.

Entre diferentes animales, se observa siempre una variabilidad individual en los valores de absorción. Para obtener medias de la cuantía absoluta de tales valores en una especie dada, hará siempre falta utilizar considerable número de ani-

males y aplicar a los resultados el correspondiente análisis estadístico. Mas cuando se pretende ver el efecto que sobre la absorción de una substancia tiene un determinado factor, gracias a nuestro método, bastará comprobar suficiente número de veces el hecho de que el citado factor modifica, en el sentido que sea, tal absorción en experiencias de pruebas sucesivas en la misma asa del mismo animal. Las diferencias individuales absolutas no cuentan. Importan sólo las diferencias relativas en cada individuo. Con las técnicas clásicas no había modo práctico de soslayar la variabilidad individual. Obtenemos de los animales un rendimiento considerablemente mayor.

Concretamente, aplicando el método a la absorción de azúcares en ratas, hemos conseguido organizar el trabajo de modo que logramos un gran ahorro de tiempo. Se trata de un verdadero estudio «en serie» de los problemas: en una tarde, un operador y un ayudante pueden realizar experiencias con cuatro ratas, haciendo cuatro pruebas de absorción en cada una de ellas y determinando simultáneamente el azúcar absorbido y la glucemia. Gran parte ha tenido en esto la adaptación que hemos descrito al método colorimétrico de FOLIN, que ofrece gran rapidez.

Las técnicas originales expuestas para la determinación de la actividad fosfatásica en diversos medios biológicos, han sido ampliamente comprobadas. Tiene al efecto suma importancia la aplicación del sistema de colorimetría de dos standards para la valoración del fósforo liberado, así como del inicialmente presente.

Nuestra simplificación al método de HAGEDORN-JENSEN se adapta bien al estudio de la absorción de azúcares y da mayor rapidez, con más seguridad, precisamente por el menor número de manipulaciones.

II. — *Fosfatasas y selectividad.*

1. — Las experiencias sobre la secreción intestinal de fosfatasa por estímulo de glucosa, fructosa y xilosa, no dejan lugar a dudas sobre su inespecificidad. La absorción selectiva no implica secreción selectiva. No es extraño que así suceda: hay estímulos que provocan respuestas inútiles. Que la xilosa

provoque secreción, no dice, pues, nada, aunque habría dicho mucho lo contrario.

2. — Las experiencias sobre la absorción de glucosa «en circulación por asa abierta» de intestino de perro, indican que la absorción disminuye algo por el hecho de que circule la solución a lo largo del asa, acusándose más tal disminución cuanto más rápidamente circule el líquido. No nos parece esto explicable por factores puramente físicos derivados de influencias de la corriente sobre la difusión, dadas las condiciones experimentales; y sí más bien parecen indicar que se reduzca algo un proceso más complejo de tipo químico — ¿quizá fermentativo? — al disminuir el tiempo de permanencia en el asa de cada molécula particular de glucosa, así como por la imposibilidad de acumularse en el contenido intestinal, factores implicados en él segregados por la mucosa, ya que son constantemente arrastrados por la solución.

Cuando se va haciendo pasar un determinado volumen de líquido repetidamente por el asa, inactivando o no las fosfatasa por el calor, se observa un comportamiento interesante; por la inactivación de fosfatasa se reduce hasta un 20 % la absorción de glucosa. Cuanto menos tiempo permanece la glucosa en el asa, tanto menos pueden actuar las secreciones de la mucosa sobre ella; la fosfatasa, concretamente, puede actuar antes de ser inactivada, es decir, antes de salir del asa, pero tanto menos, cuanto mayor sea la velocidad de paso del líquido: correlativamente, según se ve en la tabla, la absorción de glucosa disminuye; parece, pues, deducirse que la fosfatasa segregada tiene algún papel en la selectividad.

El hecho de que el perro no tenga una alta selectividad, explicaría que no sean de mayor grado los descensos de absorción, al reducir factores que suponemos de importancia en tal absorción selectiva.

3. — Al cúmulo de argumentos en favor de que la absorción selectiva esté condicionada a las fosfo y defosforilaciones, hemos añadido la observación del comportamiento de dos inhibidores de las fosfatasas: el cadmio y el cobre; comprobamos asimismo la inhibición por la florricina. Todos estos inhibidores de las fosforilaciones, se muestran también inhibidores de la selectividad. Es interesante y significativa la tendencia observada a un aumento del fósforo inorgánico presen-

te en el contenido intestinal en las asas con cadmio y cobre. Al cabo de 60 minutos encontró LASZT lo mismo durante la absorción de xilosa y tras la suprarrenalectomía. El descenso de la absorción selectiva parece pues acompañarse de una acumulación de fósforo en la luz intestinal. Con nuestra técnica de absorciones sucesivas, pretendimos aclarar si la inhibición por los tres factores estudiados estaba condicionada a su presencia en el contenido intestinal o no. Ya discutimos allí el valor de las experiencias que se hicieron al efecto. Las mismas asas, en las que se ha inhibido la absorción por acompañar a la solución de azúcar, cobre o florricina, vuelven a absorber casi normalmente en una prueba posterior, si se lava suficientemente el asa, antes de comenzar ésta.

La florricina puede administrarse al animal en grandes cantidades sin que produzca su muerte (137), tanto por vía oral como parenteral. La inyección de unos 100 mg. del glucósido, inhibe durante 6 horas al menos, las fosforilizaciones. Nosotros damos con la solución de glucosa, unos 100 mg. directamente en el asa en estudio; si la acción inhibidora de la florricina se ejerciera exclusivamente sobre fosforilizaciones en el interior de las células de la mucosa, no se explica bien que desaparezca tal inhibición después del lavado, pues hay que suponer que una buena parte de la florricina haya sido absorbida, y por lo tanto podría seguir ejerciendo su acción en la prueba de absorción siguiente; si cabe pensar en que la florricina absorbida se diluya por el organismo, también ocurre esto cuando se inyecta o se administra por vía oral, y más posibilidad hay de que se acumule en las mismas células por las que ha tenido que pasar al absorberse. La experiencia habla mucho en favor de que la inhibición observada, con florricina sobre todo, debe relacionarse principalmente con su presencia en luz, es decir: a inhibiciones de procesos de fosforilización en el contenido intestinal; después del lavado, la inhibición es muy escasa, y ésta habría que atribuirla a que también inhibe fosforilaciones endocelulares.

4. — Aumentando la concentración de fosfatasas intestinales en luz, se obtiene un ligero aumento de la absorción de glucosa, que no se consigue si se adiciona fosfatasa inactiva en lugar de activa. Esto habla también en favor de una rela-

ción entre las fosfatasa de la secreción intestinal, y la absorción de azúcares. No puede pensarse en que este efecto se ejerza en las células del epitelio, ya que es muy improbable penetre en ellas la fosfatasa adicionada. Es quizá, el único medio que ofrece la posibilidad de influir sobre la absorción selectiva por una acción exclusivamente localizada en el contenido intestinal.

5. — Hemos hecho experiencias en las que se ha puesto de manifiesto que el pH óptimo para la absorción selectiva no es exclusivamente 7, sino que se extiende bastante hacia el lado ácido, entre 7 y 6, correspondiendo al pH fisiológico del contenido intestinal.

Es interesante que en pH ácido LÓPEZ NAVARRO refiere haber encontrado una ligerísima tendencia de la actividad fosfática del contenido intestinal hacia la síntesis, hechos todos que hablan en favor de una posible multiplicidad de acción de la fosfatasa, según participación de factores ajenos a ella. Estamos de acuerdo con LASZT en que el que exista un óptimo de absorción a un determinado pH, pueda significar que a ese pH se influya beneficiosamente un proceso fermentativo, implicado en la absorción selectiva. Pero nos parece más razonable, que para ser influenciado tal proceso, debería darse fuera de las células, ya que es poco probable que por la presencia en luz intestinal de un líquido tamponado a pH 7 ó 7,6, se vaya a modificar correlativamente el pH endocelular; ya dijimos cómo éste tiene gran independencia respecto del pH del medio.

6. — La inhibición de la absorción selectiva por el cerio es otro hecho que hemos comprobado en las ratas y visto que también se da en perros. En nuestros resultados no se reconoce una supresión total de la selectividad, pues se absorbe en general más glucosa que xilosa, aun estando adicionada de cerio; la relación viene a ser $x : (G + Ce) : G$, como 20 : 35 : 65, en ratas. En los perros es bastante menor que en ratas el grado de inhibición por el cerio, lo que explicamos por la menor importancia de la selectividad en ellos; con florricina, no se inhibe más que con cerio. En todo caso, el lavado del asa que ha contenido cerio, a igual que se ha visto ocurría con el cobre y florricina, tiende a restablecer la cuantía de la absorción normal.

Habla también en favor de que la inhibición por el cerio esté en gran parte condicionada por su presencia en luz intestinal, más que tratarse de una acción endocelular.

7. — Es interesante el hecho de que en el contenido intestinal, durante la absorción de glucosa, xilosa o glicocola, hay un fósforo orgánico fácilmente hidrolizable, que puede ser en efecto hidrolizado espontáneamente fuera del organismo por la propia fosfatasa segregada. Estamos llevando a cabo estudios para poder identificar la naturaleza precisa de tales ésteres fosfóricos y si entre ellos los hay hexosafosfóricos. CLEMENTI (1927) y SPERRY y ANGEVINE (1930) ya demostraron la presencia de lipóides en la secreción intestinal. Que son de origen epitelial, lo demuestra su presencia durante la absorción de xilosa o glicocola, que no forman ésteres fosfóricos.

8. — Hemos conseguido obtener «in vitro» ésteres exosafosfóricos por la acción de la fosfatasa de la secreción intestinal sobre la glucosa en presencia de tampón fosfatos a pH 6,5. Nuestros esfuerzos para lograr una esterificación rápida, fuera del organismo, a la velocidad imprescindible para que fuese eficaz en la absorción selectiva, no han dado todavía fruto. Mas tampoco se ha conseguido por otros investigadores en sus esterificaciones por fosfatasa de pared.

Del conjunto de los resultados de las experiencias se deduce que *hay relación cierta entre la absorción selectiva de azúcares y la fosfatasa segregada por la mucosa*, ya que la reducción de fosfatasa presente en luz se acompaña de un descenso de la absorción, y al aumento de concentración — adición de fosfatasa — sigue incremento de la absorción, y porque la inhibición de la selectividad por el cobre y florricina, se debe en gran parte a su acción inhibidora sobre la actividad de la fosfatasa presente en la luz intestinal.

¿Qué misión concreta puede así tener la fosfatasa segregada? Hay dos posibles acciones:

1. — Síntesis de ésteres hexosafosfóricos *fuera de las células*.
2. — Hidrólisis de ésteres orgánicos fácilmente hidrolizables.

Ambas acciones son teóricamente posibles y nosotros hemos podido comprobar que de hecho pueden darse fuera del

organismo, trabajando al mismo pH del contenido intestinal.

La dificultad estriba en relacionarlas con la selectividad. MAGEE y REID (1931) pensaron ya que la selectividad podría estar condicionada a la mejor permeabilidad para los ésteres hexosafosfóricos. MATHIEU (1935) intentó aclarar este extremo concluyendo en su trabajo que los ésteres hexosafosfóricos (Harden-Young, Neuberg y Robison) se absorbían más despacio que la glucosa y a la misma velocidad que la fructosa; mas sus resultados no pueden considerarse, ni con mucho, definitivos; él opera con sales magnésicas, lón que él mismo comprueba que es inhibidor de la absorción de glucosa; no sabemos tampoco si los ésteres que inyectaba en las asas se hidrolizarían antes de absorberse: extraña la afirmación de que «no se encuentra ácido fosfórico libre en el contenido intestinal después de la inyección de éster», siendo así que hay como ya hemos dicho (89, 115, 26, 130, nosotros mismos), una secreción de fósforo orgánico e inorgánico durante la absorción. Aparte de que un éster hexosafosfórico «neoformado», «in situ», junto al epitelio, puede tener propiedades bastante diferentes de las que tengan los hexosafosfatos magnésicos desde largo tiempo preparados.

Es cierto que el mayor volumen molecular de los hexosafosfatos dificultaría su difusión a través de una membrana inerte, pero éste no es el caso de la membrana de las células de la mucosa.

DANIELLI (41) explica la selectividad suponiendo que las membranas de las células epiteliales tienen diferente grado de permeabilidad para el azúcar que para el éster; si esto no fuera así, no se ve posibilidad de que las caídas de concentración simplemente bastaran a conseguir una absorción más rápida del azúcar fosforilizable, pues se comportarían prácticamente igual unas moléculas que otras. Y dice: Si suponemos que la membrana que da al contenido intestinal es más permeable al azúcar que al éster, penetra azúcar en la célula y sale al contenido poco o nada éster; el azúcar que ha penetrado, se fosforila en seguida, y no vuelve ya al contenido; cerca ya de la membrana que da al plasma sanguíneo, o en ella misma, debe haber un proceso de defosforilación con lo que el azúcar va a la sangre. Se admite pues la existencia de dos sistemas fosfatásicos endocelulares: uno de síntesis en la parte de la

célula próxima a la pared que da al contenido, y otro de hidrólisis en la mitad celular opuesto o en la membrana misma que da al plasma.

Pero las mismas ventajas se obtienen si se supone que las membranas sean menos permeables al azúcar que al éster hexosafosfórico; si en el contenido intestinal hay azúcar, fósforo inorgánico y fosfatasa, puede sintetizarse el éster y pasar a la célula preferentemente al azúcar; allí podría ser inmediatamente defosforilado en la región celular inmediata a la pared con lo que su concentración en el lado interior de la membrana se mantendría prácticamente nula y seguiría entrando éster; luego, en la parte opuesta de la célula, tendría lugar nueva fosforilación, con lo que el éster saldría al plasma con preferencia a la entrada de azúcares a la célula desde la sangre.

Harían falta aun tres sistemas fosfatásicos: uno constituido por la fosfatasa segregada, capaz de fosforilar hexosas en el contenido intestinal a pH ligeramente ácido — fisiológico — y otros dos defosforilante y fosforilante, endocelulares, distribuidos en las porciones celulares lindantes con el contenido intestinal y con el plasma respectivamente. La inhibición de cualquiera de ellos repercute en la reducción de la velocidad de absorción. Los estudios histoquímicos de GOMORI (1940), iniciaron el camino de la localización de tales sistemas endocelulares. EMMEL (1945) y DEANE y DEMPSEY (1945, 42) describen que la fosfatasa se encuentra localizada principalmente en las células de la mucosa intestinal, en el aparato de Golgi; la cantidad de fosfatasa allí es tan grande que las preparaciones para la revelación del fermento rivalizan con las del ácido ósmico en la elegancia con que se destaca el aparato de Golgi; es interesante el hecho de que no encuentre lo mismo en el epitelio renal. DEMPSEY y WISLOCKI (1946, 43) han señalado a las células láterobasales de las vellosidades como las que poseen un aparato de Golgi más rico en fosfatasa; las de los ápices son mucho más pobres. Y el aparato de Golgi es un órgano de síntesis de la célula «implicado con seguridad en la producción de la secreción de las glándulas exocrinas» (BOURNE, 21). Estamos pues todavía lejos de comprobar esa supuesta distribución de los sistemas fosfatásicos en las dos citadas regiones celulares con la diferencia de actuación en una y otra síntesis o hidrólisis.

No pueden entreeverse razones que expliquen tales diferencias de permeabilidad para éster y azúcar. La diferencia de volumen molecular es insuficiente. Ha de depender más bien de la distinta resistencia de la membrana a las diferencias de polaridad de la molécula. Dado el escaso conocimiento que se tiene de la membrana de la célula del epitelio intestinal, no se puede aventurar si un aumento de polaridad debido a la esterificación con el ácido fosfórico será causa de aumento o disminución de la resistencia total de la membrana al paso del azúcar; si se confirman los trabajos de BAKER (1942), el borde libre de las células epiteliales del intestino posee poros y canales de $0,5 \mu$ de diámetro — considerable — por donde pueden llegar finas gotas de grasa del mismo orden de tamaño (FRAZER, SCHULMAN y STEWART, 1944) hasta la capa granular inmediata al citoplasma.

Que realmente se forman ésteres fosfóricos en las células de la mucosa ha sido demostrado por muchos como ya hemos referido anteriormente. El estudio más detallado que conocemos es el de un discípulo de LUNDSGAARD: KJERULF-JENSEN (74) que determina la naturaleza de los ésteres acumulados en la mucosa durante la absorción de fructosa, glucosa y galactosa. Según él, la fructosa, o una parte de ella, se fosforiliza formando fructosa 1, fructosa 6, y quizá incluso fructosa 1-6 difosfórico, aunque este último en muy pequeña cantidad; los ésteres se defosforilan luego; parte del fructosa 6-fosfórico puede pasar a glucosa 6-fosfórico por la fosfohexomutasa de LOHMANN, de acuerdo también con KALKAR, y el resto de los ésteres se hidrolizan directamente; la causa de la más lenta absorción de fructosa por el intestino parece deberse más que a una menor capacidad de fosforilación, a una más lenta defosforilación del fructosa 6-fosfato (KALKAR, 1938), por causas complejas dependientes de los sistemas defosforilizantes endocelulares. La glucosa pasa a glucosa 1-fosfórico y a glucosa-6, fosfórico entre los que debe establecerse el equilibrio clásico en que la mayor parte es el éster 6-fosfórico. Luego se defosforilan ambos ésteres.

La otra posibilidad era la de que una hidrólisis de fósforo orgánico segregado por la mucosa favoreciera la selectividad.

La presencia de fósforo inorgánico en el contenido intestinal se ha demostrado necesaria para tal selectividad, según se

ha visto en las experiencias con cerio. Cabe pensar en que, si no se admite la fosforilización exocelular de las exosas, ese fósforo inorgánico haga falta en las células. Entonces tendría lugar una secreción de fósforo (86) orgánico, probablemente lipoídico, que tras la hidrólisis por fosfatasas también segregadas, serviría para obtener el fósforo inorgánico necesario para la fosforilación endocelular de azúcares selectivos. No tendría otra explicación esta hipótesis, que la relativa incapacidad para obtener el ácido fosfórico en el interior de la célula, por hallarse el fosfato orgánico de partida en una región en que, de acuerdo con DANIELLI, habría sólo un sistema desfosforilizante.

Resumen

Se propone un método original para el estudio de la absorción intestinal en asas aisladas, «in situ», que ofrece condiciones óptimas para la comparación de resultados. Mediante la colocación de dos cánulas en los extremos del asa se pueden estudiar la absorción de líquidos en circulación por ella, conseguir la reducción de la concentración de sustancias segregadas por la mucosa y el examen de la capacidad de absorción en pruebas sucesivas en la misma asa del mismo animal, con lo que se presta muy fácilmente a la investigación de factores modificadores de tal absorción. Sirve para estudiar la absorción de toda clase de sustancias hidrosolubles. Se aplica concretamente a la de glúcidos en ratas y perros. La técnica en este caso se complementa por una adaptación original al método Folin-cobre-colorimétrico para determinación de azúcares.

Se describe una técnica original para la determinación de fosfatasas. Se da un método, modificación del de HAGEDORN-JENSEN, especialmente adecuado a las experiencias de absorción de azúcares. Es más rápido y menos expuesto a errores accidentales.

No hay diferencias en la secreción intestinal de fosfatasa bajo estímulo de azúcares selectivos y no selectivos. La circulación de las soluciones de glucosa a través del asa reduce algo la capacidad de absorción y tanto más cuanto más rápidamente circula. Haciendo pasar varias veces el mismo líquido por el asa, inactivando por el calor previamente las fosfatasas segregadas, se observa una reducción de la absorción comparativamente a cuando no se inactivan.

Se encuentra inhibición parcial de la absorción selectiva de azúcares por el cadmio, cobre y florricina, enérgicos inhibidores de la fosfatasa. Tal efecto parece deberse a acciones sobre la actividad fosfatásica en el contenido intestinal.

Se consigue acelerar la absorción de glucosa tamponada a pH 7 y 6,5 por adición de fosfatasas de pared y de secreción intestinal.

El pH óptimo para la absorción selectiva está comprendido entre 6 y 7. Se confirma la inhibición de la selectividad en ratas por el cerio y se demuestra también en perros. Se atribuye a la precipitación del fosfato inorgánico por el cerio en el contenido intestinal, más

que en las células. En la luz intestinal, después de absorción de glucosa xilosa o glicocola se encuentra una fracción de fósforo orgánico fácilmente hidrolizable. Con fosfatasa de secreción intestinal se ha conseguido esterificar glucosa con fosfatos. La esterificación máxima lograda, en presencia de fluoruro y taurocolato sódico, importa un 25 % en 72 horas. De los hechos indicados se deduce que la absorción selectiva debe estar de algún modo relacionada con la actividad de las fosfatasas segregadas. Se discute la posibilidad de la fosforilización de las hexosas en el contenido intestinal, antes de penetrar en la célula, como base de la absorción selectiva.

Résumé

Les auteurs proposent une méthode originale pour l'étude de l'absorption intestinale dans des tracts isolés, «in situ», ce qui offre des conditions optimales pour la comparaison des résultats. Au moyen de l'emplacement de deux canules dans les extrémités du tract il est possible d'étudier l'absorption des liquides en circulation à travers lui et d'accomplir la réduction de la concentration de substances sécrétées par la muqueuse, ainsi que l'examen de la capacité d'absorption dans des essais successifs dans le même tract intestinal du même animal ; ce qui se prête très facilement à l'investigation des facteurs modificateurs d'une telle absorption. Il sert pour étudier l'absorption de toute sorte de substances hydrosolubles. Il s'applique concrètement à celle des glucides chez le rat et le chien. La technique dans ce cas on la complète avec une adaptation originale de la méthode Folin-cuivre-colorimétrique, pour la détermination des sucres.

Il est décrite une technique originale pour la détermination des phosphatases.

Les auteurs donnent une méthode, modification de celle de Hagedorn-Jensen, spécialement indiquée pour les expériences d'absorption des sucres. Elle est plus rapide et moins exposée à des erreurs accidentelles.

Il n'y a pas des différences dans la sécrétion intestinale de phosphatase sous le stimulus des sucres sélectifs et non sélectifs.

La circulation des solutions de la glucose à travers le tract réduit dans quelque mesure la capacité d'absorption, et cela d'autant plus que plus rapidement elles circulent. En faisant passer plusieurs fois le même liquide à travers le tract, mais inactivant préalablement par la chaleur les phosphatases sécrétées, l'on observe une réduction de l'absorption comparativement au cas de ne pas être activées.

L'on trouve une inhibition partielle de l'absorption sélective des sucres par le cadmium, le cuivre et la phlorhizine qui sont des inhibiteurs énergiques de la phosphatase. Un tel effet semble être dû à des actions sur l'activité phosphatasique du contenu intestinal.

L'on arrive à accomplir une accélération de l'absorption de la glucose tamponnée à pH 7 et 6,5, par addition de phosphatases de paroi et de sécrétion intestinale.

Le pH optimum pour l'absorption sélective est compris entre 6 et 7.

L'on confirme l'inhibition de la selectivité chez le rat par le cerium et l'on montre qu'elle a lieu aussi chez le chien ; ce qui est attribué à la précipitation du phosphate inorganique par le cerium, dans le contenu intestinal, plus bien que dans les cellules.

Dans la lumière intestinale, après l'absorption de glucose, xylose ou glycocole l'on trouve une fraction de phosphore organique facilement hydrolisable.

Avec phosphatase de secretion intestinale il a été accomplie l'estérification de la glucose avec des phosphates. Le maximum d'estérification accomplie, en présence du fluorure et du taurocholate sodiques, c'est d'un 25 % en 72 heures.

Des faits indiqués l'on déduit que l'absorption selective doit être relationnée de quelque façon avec l'activité des phosphatases secrétées. L'on discute la possibilité de phosphorilisation des hexoses dans le contenu intestinal, avant de pénétrer dans la cellule, comme base de l'absorption sélective.

Summary

We propose an original method for the study of intestinal absorption in insolated tracts, «in situ», which offers perfect conditions for the comparison of results. By means of two canules placed at the top of the intestinal tract, it is possible to study the absorption of circulating liquids and to accomplish the decreasing of concentration of substances secreted by the mucosa. Also it is possible the observation of the absorption capacity in a series of tests in the same tract of the study of the absorption of all types of hydrosoluble matters, and more specially, of glucids in rats and dogs. The technique in this case it is complet with an original adaptation to the method Folin-copper-colorimetric for the evaluation of sugars.

We explained an original technique for the phosphatases evaluations.

We give a method, as a modification of Hagedorn-Jensen technique, specially indicated to the sugars absorption experiments. It is more rapid and less inclined to accidental mistakes.

There are no differences in the intestinal secretion of phosphatase by the stimulating action of selective and unselective sugars.

The circulation of glucose solutions through the tract decreases slightly the absorption capacity and some more as the circulation takes place more rapidly. If the same liquid is passing several times through the tract but making previously inactive the secreted phosphatases by means of warm, it is observed a decrease of absorption comparatively to the case of not inactivation.

It is found a partial inhibition of selective absorption of sugars by means of cadmium and phloridzine actions, which act as very, energetic inhibitors of phosphatase. A such effect seems originated by actions on the phosphatasic activity in the intestinal content.

The authors have accomplished the acceleration of the glucose absorption, buffered to pH 7 and 6,5 by means of the addition of phosphatase of walls and intestinal secretion.

The best pH for the selective absorption is included between six and seven. We confirm the inhibition of the selectivity in rats by cerium, which is demonstrated also in dogs. We attribute this phenomenon, to the precipitation of inorganic phosphate by the cerium in the intestinal content, much better than on cells.

In the intestinal light, after the absorption of glucose, xylose or glicocole, it is found a fraction of organic phosphorus very easy to hydrolyse.

With phosphatase of intestinal secretion we have accomplished the esterification of glucose with phosphates. The maximum esterification in the presence of sodic fluoride and taurocholate, amounts to 25 per cent in 72 hours.

From indicated facts we conclude that the selective absorption must be related in some manner with the activity of secreted phosphatases. It is discussed the possibility of hexose phosphorylation in the intestinal content, before penetrating in the cell as the basis of selective absorption.

Zusammenfassung

Es wird eine neue Methode vorgeschlagen um die Darmabsorption in abgesonderten Darmschlingen zu untersuchen. Sie bietet ausgezeichnete Bedingungen zum Vergleich der Resultate. Mittels Einführung zweier Kanülen an den Enden des Darmstücks, kann man die Absorption der eingeführten Flüssigkeiten verfolgen, die Reduktion der Konzentration der Substanzen erlangen, die von der Schleimhaut sezerniert werden und die Absorptionsfähigkeit im selben Darm desselben Tieres wiederholt prüfen. Das erleichtert die Untersuchung der Faktoren die auf die Absorption wirken. Die Methode dient auch um die Absorption verschiedener in Wasser löslicher Körper zu untersuchen.

Sie wird mit Zuckern bei Ratten und Hunden benutzt. In diesem Falle wird die Methode durch eine eigene an die Folin-Cu-kolorimetrische Technik angepasste Methode zur Bestimmung der Zucker, vervollständigt.

Es wird eine eigene Technik zur Bestimmung der Phosphatasen beschrieben. Man beschreibt auch eine Methode die von der Hagedorn-Jensen schon abgeleitet ist, die für die Bestimmung der Absorption der Zucker empfehlenswert ist. Sie ist schneller auszuführen und weniger Irrtümern ausgesetzt.

Es besteht kein Unterschied in der durch selektive und nicht selektive Zucker verursachte Sezernierung der Phosphatasen. Die Zirkulation der Glykolösungen durch den Darm vermindert etwas das Absorptionsvermögen und zwar je mehr, desto schneller jene stattfindet. Wird dieselbe Flüssigkeit mehrmals durchgeführt, nachdem die sezernierten Phosphatasen durch Erhitzung inaktiviert worden sind, dann ist die Absorption kleiner als wenn jene nicht inaktiviert werden.

Die selektive Absorption der Zucker wird durch Kadmium, Kupfer und Phlorrhizin erschwert. Diese Stoffe verbinden die Wirkung

des Phosphatasen, also scheint das auf Unterbrechung der Phosphatasenaktivität im Darm inhalt zurückgeführt werden zu können. Man kann die Absorption der bei einem pH von 7 und 6,5 gepufferten Glykose durch Zufügen von Phosphatasen der Darmwand oder Sekretes, beschleunigen. Das optimale pH für die selektive Absorption schwankt zwischen 6 und 7.

Es wird nach der Absorption von Glykose, Xilose oder Glykokol ein Teil leicht hydrolisierbaren organischen Phosphors gefunden.

Mit Phosphatasen des Darmsekretes ist es gelungen Glycose mit Phosphaten zu esterifizieren.

Die grösste Esterifizierung in Anwesenheit von Natriumfluorid und taurokolat beträgt 25 % in 72 Stunden.

Man kommt zur Schlussfolgerung, das die selektive Absorption irgendwie mit der Aktivität der sezernierten Phosphatasen in Zusammenhang steht. Es wird die Möglichkeit der Phosphorilisierung der Hexosen, im Darm, vor ihrem Eintritt in die Zellen, als Grundmechanismus der selektiven Absorption, in Betracht gezogen.

Bibliografia

1. ABDERHALDEN, E. y EFFKEMANN, G. (1934). — Über den Einfluss von alfa-und beta-Glucosiden auf die Phosphorylierung von Traubenzucker. *Biochem. Z.* 268, 461-468.
2. ABELIN, I (1945). — Zur Frage der Beteiligung der Nebennieren am Zuckerstoffwechsel. *Helv. Physiol. Acta*, 3, 71-82.
3. ALTHAUSEN, T. L. (1939). — Test for intestinal absorption. *Am. J. digest. Dis. Nutri.* 6, 544.
4. ALTHAUSEN, T. L. y STOCKHOLM, M. (1938). — Influence of the thyroid gland on absorption in the digestive tract. *Am. J. Physiol.*, 123, 577-588.
5. AMMON, R. y CHYTREK, E. (1939). — Die Bedeutung der Enzyme in der Klinischen Diagnostik. — *Erg. Enzymforschung*, 8, 91-134.
6. ARCURI, F. y FILIPPON, S. (1941). — Surrèni e fosfatasi. *Ormoni*, 3, 399-416.
7. AUCHINACHIE, D. W. MACLEOD, J. J. R. y MAGGEE, H. E. (1930). — Studies on diffusion through surviving isolated intestine. *J. Physiol.* 69, 185-209.
8. BABKIN, B. P. (1928). — Die Äussere sekretion der Verdauungsdrüsen (2.^a ed.). Springer, Berlin.
9. BAER, E. y FISCHER, H. O. L. (1940). — Synthesis of the d (+) — α — glycerophosphoric acid and the action of phosphatasen on synthetic d (+), l (—), and d l — α — glycerophosphoric acids. *J. biol. Chem.*, 135, 321-328.
10. BAKER, J. R. (1942). — *Quart J. micr. Sci.* 84, 73.
11. BEDFORD, T. H. B. (1939). — The effect of monosaccharides on water absorption from the subarachnoid space. *J. Physiol.* 96, 392-396.

12. BELLINI, L y CERA, B. (1940). — La fosfatasi intestinale durante l'assorbimento di grasso neutro in ratti normali e rachitici. *Pathologica*. 32, 195.
13. BELLINI, L y CERA, B. (1940). — Comportamento delle glicerofosfatasi intestinale durante l'assorbimento intestinale di glicerofosfato. *Biochimica e Ter. sper.* 27, 146-149.
14. BERGER, L., SLEIN, M. W. COLOWICK, S. P. y CORI, C. F. (1945). — Isolation of pure hexokinase from yeast. *J. Gen. Physiol.* 29, 141-142.
15. BODANSKY, A. (1933). — Determination of inorganic phosphate. Beer's law and interfering substances in the Kuttner-Lichtenstein method. *J. Biol. Chem.* 99, 197.
16. BODANSKY, A. (1933). — Determination of serum phosphate. Factors influencing the accuracy of the determination. *J. Biol. Chem.* 101, 93-104.
17. BODANSKY, A. (1934). — Non osseous origins of serum phosphatase. Its increase after ingestion of carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 104, 473-482.
18. BODANSKY, A. (1934). — Inorganic phosphorus and phosphatase of the serum in new born puppies. *J. Biol. Chem.* 104, 717-726.
19. BODANSKY, A. (1937). — Notes on the determination of serum inorganic phosphate and serum phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 120, 167-175.
20. BODANSKY, O., BAKWIN, R. M. y BAKWIN, H. (1931). — The distribution of phosphatase in the tissues of teleosts and elasmobranchs. *J. Biol. Chem.*, 94, 551-560.
21. BOURNE, G. (1945). — Cytology and cell physiology. University Press, Oxford.
22. CAJORI, F. A. y KARR, W. G. (1935). — The absorption of glucose and galactose from the intestine of the dog. *J. Biol. Chem.*, 109, XIV.
23. CERA, B. y BELLINI, L. (1940). — Comportamento delle glicerofosfatasi intestinale durante l'assorbimento di glucosio. *Pathologica*, 32, 294-295.
24. CERA, B. y BELLINI, L. (1940). — Assorbimento del grasso neutro associato a glicerofosfato di sodio e parallelo comportamento della fosfatasi intestinali. *Pathologica*, 32, 375-377.
25. CLEMENTI, A. (1923). — Sur un nouveau ferment propre du suc entérique: la phosphoglycerase. *Arch. internat. physiol.* 22, 121.
26. CLEMENTI, A. (1927). — Presenza di lipidi tra i costituenti normali del secreto enterico, *Boll. soc. ital. biol. Sper.* 2, 584.
27. CLEMENTI, A. (1930). — Sulla costante presenza delle fosfoglicerasi nel succo enterico. *Arch. Farmacol. sper.*, 49, 341-345.
28. CORI, C. F. (1925). — The rate of absorption of hexoses and

- pentoses from the intestinal tract. *J. Biol. Chem.*, 66, 690.
29. CORI, C. F. (1926). — Rate of absorption of glycine and d-l-alanine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 24, 125.
 30. CORI, C. F. (1931). — Mammalian carbohydrate metabolism. *Physiol. Rev.*, 9, 143-275.
 31. CORI, C. F. y CORI, G. T. (1941). — Carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, 10, 151.
 32. CORI, C. F., CORI, G. T., GOLTZ, H. C. (1929). — Mechanism of glucose absorption from the intestinal tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 26, 433.
 33. CORI, C. F. y GOLTZ, H. L. (1925). — Rate of absorption of hexoses and pentoses from peritoneal cavity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 23, 122-23.
 34. CORI, C. F. y GOLTZ, H. L. (1925). — Permeability of liver and muscles for hexoses and pentoses. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 22, 124.
 35. CRAMER, W. y LUDFORD, R. J. (1925). — On cellular changes on intestinal fat absorption. *J. Physiol.*, 60, 342-346.
 36. CRITZLER, R. A. y GUTMAN, A. B. (1941). — *Am. J. Physiol.*, 134.
 37. CSÁKY, T. (1943). — Über die Rolle der Struktur der Glucosomolcküls bei Resorption aus den Dünndarm. *Hoppe-Seylers. Z.*, 277, 47-57.
 38. DAVIDSON, J. N. y GARRY, R. C. (1939). — The absorption of monosaccharides from the large intestine of the rat under urethane anaesthesia. *J. Physiol.*, 96, 172-175.
 39. DAVIDSON, J. N. y GARRY, R. C. (1940). — The absorption of monosaccharides from the distal small intestine of anesthetized cats. *J. Physiol.*, 97, 509-516.
 40. DAVIDSON, J. N. y GARRY, R. C. (1941). — The absorption of pentoses from the small intestine of the rat under urethane anaesthesia. *J. Physiol.*, 99, 239-240.
 41. DAVSON, H. y DANIELLI, J. F. (1943). — The permeability of natural membranes. Cambridge University Press.
 42. DEANE, H. W. y DEMPSEY, E. W. (1945). — Localisation of phosphatases in Golgi region of intestinal and other epithelial cells. *Anat. Rec.*, 93, 401.
 43. DEMPSEY, E. W. y WISLOCKI, J. B. (1946) Histochemical contributions to physiology. *Physiol. Rev.*, 26, 1-27.
 44. DONHOFFER, S. (1942). — Ernährung und Resorption. *Pflügers Arch.*, 246, 92-97.
 45. EDKINS, N. y MURRAY, M. M. (1928). — Effect of alcohol on the absorption of glucose from the alimentary tract. *J. Physiol.*, 66, 102.
 46. EILER, J. J., STOCKHOLM, M. y ALTHAUSEN, T. L. (1940). — The effect of the rate of absorption of glucose on the phosphates in the intestinal mucosa. *J. biol. Chem.*, 134, 283-291.
 47. ELLINGER, P. y LAMBRECHTS, A. (1937). — Note on the lo-

- calization of the glycosurie action of phloridzine. *J. Physiol.*, 89, 33-35.
48. EMMEL, V. M. (1945). — Alkaline phosphatase in golgi zone, of absorbing cells of small intestine. *Anat. Rec.*, 91, 39-47.
49. FANTL, P. y ROME, M. N. (1945). — Dephosphorilation in liver extracts. *Austral. J. Exp. Biol.*, 23, 21.
50. FENTON, P. F. (1945). — Response of gastrointestinal tract to ingested glucose solutions. *Am. J. Physiol.*, 44, 609.
51. FOLIN, O. (1925). — *Laboratory Manual of Biological Chemistry*. New York.
52. FORNAROII, P. y FABIETTI, I. (1940). — Influenza della tiroide sull assorbimento intestinale del glucosio dello xilosio e del peptone. *Boll. Soc. ital. Biol. Sper.*, 15, 1079.
53. FREEMAN, S. y FARMER, C. J. (1935). — Corelated studies of colcium, inorganic phosphorus and serum phosphatase in normal animals and in animals influenced by irradiated ergosterol. *Am. J. Physiol.*, 113, 209.
54. FUSTINIONI, O. (1938). — *Insuficiencia suprarrenal*. Tes's. Buenos Aires.
55. GOLDSCHMIDT, S. (1921). — On the mechanism of absorption from the intestine. *Physiol. Rev.*, 1, 421-453.
56. GOMORI, G. (1941). — The distribution of phosphatase in normal organs and tissues, *J. comp. Physiol.*, 17, 71-83.
57. GRAYZEL, D. M. y MILLER, E. G. (1928). — The pH of the contents of the gastrointestinal tract in dogs in relation to diet and rickets. *J. biol. Chem.*, 76, 423.
58. HAMAR, N. (1940). — Wirkung des Hungerns und des Darminhaltes auf die Glucoseresorption des Düundarmes normaler und epinephrektomierter Ratten. *Pflügers Arch.*, 244, 157-163.
59. HANES, Ch. S. (1929). — On application of the method of Hagedorn and Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars. *Biochem. J.*, 23, 9-106.
60. HANES, Ch. S. y MASKELL, E. (1942). — The influence of hydrogen-ion concentration upon the equilibrium state on phosphorylase systems, *Biochem. J.*, 36, 76.
61. HÉDON, E. (1900). — Sur la resorption intestinale et l'action purgative des sucres en solutions hyperisotoniques, *C. r. Soc. Biol.*, 52, 41. Sur la resorption intestinale de sucres en solutions isotoniques. *C. r. Soc. Biol.*, 52, 87. *Arc. internat de pharmacodyn.*, 7, 163.
62. HEWITT, J. A. (1921). — Absortion of glucose, fructose and galactose from the small intestine. *Biochem. J.*, 18, 161.
63. HÖBER, R. (1899). Über Resorption in Dünndarm. *Pflügers Arch.*, 74, 246-271.
64. ISSEKUTZ, B. v. y BOTH, J. v. (1927). — Einfache Methode zur Bestimmung der Glucose in Mengen von 1 bis 15 mg. *Biochem. Z.*, 183, 298-302.
65. ISSEKUTZ, B. LASZT. L. y VERZÁR, F. (1928). — ZUCKER-

- und Fett-Resorptionsstörungen nach Nebennierene extirpation. Pflüg. Arch., 240, 612.
66. JEKER, D. 1936. — Mikroskopische Untersuchungen über die Fettresorption im normalen Darm und bei Hemmung der Fettresorption durch monojodessigsäure und Phlorrhizin. Pflügers. Arch., 237. 1-13.
 67. JIMÉNEZ DÍAZ, C., BASSADONE, E. y CLARIANA, J. 1935. — Sobre la fosfatasa del plasma y sus variaciones en distintas enfermedades. Rev. esp. enf. ap. digest. 1, 5-20.
 68. KALCKAR, H. 1938. — Phosphorylations in Kidney cortex. Copenhagen.
 69. KALCKAR, H. — 1939. Phosphorylation in kidney extracts. Enzymolog. 5, 365-371.
 70. KAY, H. D. — 1928. The phosphatases of mammalian tissues. Biochem. J., 22, 855-866.
 71. KAY, H. D. — 1930. Plasma phosphatase. II. The enzyme in disease, particularly in bone disease. J. biol. Chem., 89, 249-266.
 72. KING, E. J. — 1946. Micro-Analysis in medical Biochemistry. Churchill, Londres.
 73. KJERULF-JENSEN, K. y LUNSGAARD, E. — 1940. Quantitative Wertung des Umsatzes der Phosphatester in der Darm-schleimhaut von Ratten während der Fructoseresorption. Hoppe-Seylers Z., 266, 217-224.
 74. KJERULF-JENSEN, K. — 1942. The hexosemonophosphoric acids formed within the intestinal mucose during absorption of fructose, glucose and galactose. Acta physiol. Scand., 4, 225.
 75. KLINGHOFFER, K. A. — 1938. J. biol. Chem., 126, 201.
 76. KOKAS, E. v. y GÁL, G. — 1929. Resorptionbeschleunigung durch Hefeextract. Biochem. Z., 205, 260.
 77. KOKAS, E. v. y LUDANY, G. — 1935. Action de l'acide chlorhydrique introduit dans le duodenum sur l'absorption intestinale du glucose. C. r. Soc., Biol., 119, 283.
 78. KOSTER, L. — 1939. The presence of glycerophosphatase in human faeces. Estimation and clinical significance. Acta med. scand., 101, 482-490.
 79. KUNITZ, M. y McDONALD, M. R. — 1945. Isolation of crystalline hexokinase and other proteins from yeast. J. gen. Physiol., 29, 143-147.
 80. KUTSCHER, W. y WÜST, H. — 1942. Nebennierenrinde und alkalische Phosphatase. Hoppe-Seylers Z., 273, 235-247.
 81. KUTTNER, T. y COHEN, H. R. — 1927. Micro colorimetric studies. I. A molybdic acid stannous chloride reagent. The microestimation of phosphate and calcium in pus, plasma and spinal fluid. J. biol. Chem., 75, 517.
 82. LABBÉ, M. y FABRYKANT, M. — 1933. Le Phosphor. Masson et Cie., Paris.
 83. LAMBRECHTS, A. — 1937. Nouvelles recherches sur la diabète phlorhizique, la phlorhizine et quelques substances

- apparentées. Arch. internat. Physiol., 44, Suppl., 1-162.
84. LANGECKER, H. — 1928. Beeinflussung der Resorption vom Magen-Darmkanal aus durch Galle. Arch. exp. Path. Pharm., 136, 257.
85. LASCH, F. y BRÜGEL, S. — 1926. Über die Steigerung der peroralen Traubenzuckerresorption durch Saponin. Arch. exp. Path. Pharm., 116, 7.
86. LASKOWSKI, M. — 1937. Die Resorption von anorganischem und organischen Phosphat aus dem Darm. Biochem. Z., 292, 319-325.
87. LASZT, L. — 1935. Die Resorption von Glucose und xylose bei veshiedenen H-Konzentrationen. Biochem. Z., 276, 40.
88. LASZT, L. — 1935. Die Phosphorylierung verschiedener Zucker durch Darmschleimhautextracte. Biochem. Z., 276, 44.
89. LASZT, L. y DALLA TORRE, L. — 1941. Beziehungen zwischen Zuckerresorption und Phosphatstoffwechsel. I. Sekretion von Phosphor ins Darmlumen während der Resorption von Monosacchariden. Schweiz. med. Wschr., 1416.
90. LASZT, L. — 1942. Beziehungen... H. Wirkung von Ceriumchlorid auf die Zuckerresorption aus dem Dünndarm: Schweiz. med. Wschr., 193.
91. LASZT, L. y SÜLLMANN, H. — 1935. Nachweis der Bildung von Phosphorsäureestern in der Darmschleimbaut bei der Resorption von Zuckern und Glycerine, Biochem. Z., 278, 401.
92. LASZT, L. y VERZÁR, F. — 1936. Über chronische Jodessigsäurevergiftung und ihre Beziehung zur Gee-Herterschen Krankheit. Pflügers. Arch., 237, 483-493.
93. LEVENE, P. A. y DILLON, R. T. — 1930. Intestinal nucleotidase. J. biol. Chem., 88, 753.
94. LEVENE, P. A. y DILLON, R. T. — 1932. Intestinal nucleotidase and polynucleotidase. J. biol. Chem., 96, 461.
95. LÓPEZ NAVARRO, J. — La secreción intestinal de fosfatasas. R. esp. Fisiol., 2, en prensa.
96. LUNDGAARD, E. — 1933. Hemmung von Esterifizierungsvorgängen als Ursache der Phlorrhizinwirkung. Biochem. Z., 264, 209-220.
97. LUNDGAARD, E. 1933. Die Wirkung von Phlorrhizin auf die Glucose resorption. Biochem. Z., 264, 221-223.
98. LUNDGAARD, E. — 1939. Die säurelöslichen Phosphatverbindungen in der Darmschleimbaut bei Ruhe un während der Hexoseresorption. Hoppe-Seylers Z., 261, 193-208.
99. MAGEE, H. E. — 1930. The Rôle of the small intestine in nutrition. Physiol. Rev., 10, 473-505.
100. MAGEE, H. E. y REID, E. — 1931. The absorption of glucose from the alimentary canal. J. Physiol., 73, 163.
101. MAGEE, H. E. y SEN, K. CH. — 1931. The influence of calcium on the rate of diffusion of sugars through surviving intestine. Biochem. J., 25, 643.

102. MAGEE, H. E. y SEÑ, K. CH. — 1932. The influence of electrolytes on the function of the intestinal mucosa. *J. Physiol.*, 75, 433.
103. MATHIEU, FR. — 1935. Die Resorption von Hexose-di-und mono-phosphorsäure im Vergleich zu anderen Hexosen. *Biochem. Z.*, 275, 49.
104. McCANCE, R. A. y MADDERS, K. — 1930. The comparative rates of absorption of sugars from the human intestine. *Biochem. J.*, 24, 795-804.
105. McDougall, E. J. — 1935. The influence of calcium on intestinal absorption. *J. Physiol.*, 85, 109.
106. McDougall, E. J. y VERZAR, F. — 1935. Die Resorption von WASSER aus Kochsalz- und Zuckerslösungen. *Pflügers Arch.*, 236, 321-338.
107. MICHAELIS, L. — 1931. Der Acetat-Veronal-Puffer. *Biochem. Z.*, 234, 139-141.
108. MINIBECK, H. — 1939. Die selektive Zuckerresorption beim Kaltblüter und ihre Beeinflussung durch Nebennieren- und Hypophysenextirpation. *Pflügers Arch.*, 242, 344-353.
109. MÜLLER, E. — 1935. Die Phosphatasebestimmung in kleinen Serummengen. *Hoppe-Seylers Z.*, 237, 35-39.
110. NAGANO, J. — 1902. Zur Kenntnis der Resorption einfacher, im besonderen stereoisomerer Zucker im Dünndarm. *Pflügers Arch.*, 90, 389-404.
111. NGUYEN-VAN THOAI, ROCHE, J. y DANZAS, E. — 1944. Sur les activateurs de la synthèse enzymatique. I. Sur l'action synthétisante des phosphomonoestérases. *Bull. Soc. Chim. biol. (Trav.)*, 26, 1139.
112. NGUYEN-VAN THOAI, ROCHE, J. y DANZAS, E. — 1945. II. Action de divers corps azotés (alanine, peptides, acide adénylique), sur la synthèse phosphatasique des glycérophosphates in vitro. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 27, 401-405.
113. NORBERG, B. — 1942. On the histo- and cytochemical determination of phosphorus. *Acta Physiol. scand.*, 5, S. XIV.
114. OLMSTED, J. M. D. y GIRAGOSSINTZ, G. — 1929. Effect of amytal anesthesia on glucose tolerance. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 27, 103.
115. PONZ, F. — 1945. La influencia de la tiroxina sobre la absorción intestinal de monosacáridos. *R. esp. Fisiol.*, 1, 9-37.
116. PONZ, F. — 1945. Acción de la tiroxina sobre la actividad fosfatásica del intestino delgado de rata. *R. esp. Fisiol.*, 1, 173-185.
117. ROBBERS, H. y WESTENHÖFFER, O. — 1939. Action of lactoflavin on inhibition of carbohydrate absorption produced by phloridzin. *Z. exp. Med.*, 106, 714-718.
118. ROCHE, J., NGUYEN-VAN THOAI y DANZAS, E. — 1944. Activité phosphatasique et potentiel d'oxydoréduction. *Bull. Soc. Chim. biol. (Trav.)*, 26, 1153.
119. SCHMIDT, R. — 1914. Weitere Untersuchungen über Fer-

- menta im Darminhalt (Meconium) und Mageninhalt menschlicher Foeten und Neugeborener. *Biochem. Z.*, 63, 287-303.
120. SCHWABN, F. — 1941. Weitere studien über die Resorption von Traubenzuckerlösungen am normalen und entzündlich veränderten Dünndarm des Meerschweinchens. *Dtsch. Z. Verdgs. Krkh.*, 4, 161-174.
121. SINCLAIR, R. G. y FASSINE, R. J. — 1941. *J. biol. Chem.*, 141.
122. SOLS, A. — 1945. Fórmulas y tablas colorimétricas para corregir las aparentes desviaciones a la ley de Beer. *R. esp. Fisiol.*, 1, 355-414.
123. SOLS, A. — 1946 Colorimetría de dos standards. III. Mezclas diluidoras. *R. Esp. Fisiol.*, 2, 167-174.
124. SOLS, A. — Aun no publicado.
125. SOMOGYI, J. C. — 1931. Use of cooper und iron salts for deproteinization of blood. *J. biol. Chem.*, 90, 725.
126. SOMOGYI, J. C. y VERZÁR, F. — 1940. Die Zusammenhang zwischen selektiver Zuckerresorption und plasma Kalium. *Helv. med. Acta*, 7, Supl. 5, 30-34.
127. SOMOGYI, J. C. — 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. biol. Chem.*, 160, 61.
128. SPEK, J. — 1937. Das pH in der lebendem Zelle. *Ergebn. Enzymforschung*, 6, 1-22.
129. SPEK, J. y CHAMBERS, R. — 1933. Das Problem der Reaktion des Protoplasmas. *Protoplasma*, 20, 376-406.
130. SPERRY, W. M. y ANGEVINE, R. W. — 1930. The secretion of lipids into the intestine. *J. biol. Chem.* 87, XXII.
131. STEIN, L. y WERTHEIMER, E. — 1941. Effect of adrenalectomy on intestinal absorption involving osmotic work in rats. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 46, 172-174.
132. VERZÁR, F. — 1929. Resorption aus dem Darm. *Bethe-Handbuch norm. path. Physiologie*, IV, 1.
133. VERZÁR, F. — 1935. Die Rolle von Diffusion und Schleimhautaktivität bei der Resorption von verschiedenen Zuckern aus dem Darm. *Biochem. Z.*, 276, 17-27.
134. VERZÁR, F. — 1939. Die Funktion der Nebennierenrinde. Benno Schwabe, Basel.
135. VERZÁR, F. y JEKER, L. — 1936. Histologische Untersuchungen über die Fettresorption nach Extirpation der Nebennieren. *Pflügers Arch.*, 237, 14-18.
136. VERZÁR, F. y LASZT, L. — 1935. Die Resorption aus dem Darm von isotonischen Lösungen von Glucose und Sorbose, verglichen mit der von Natriumsulfat. *Biochem. Z.*, 276, 28-39.
137. VERZÁR, F. y LASZT, L. — 1935. Die Hemmung der Fettresorption durch Plorrhizin. *Biochem. Z.*, 276, 1-10.
138. VERZÁR, F. y McDOUGALL, E. J. — 1936. Absorption from the intestine. Longmans, Londres.
139. VERZÁR, F. y MONTIGEL, C. — 1941. Nachweis der Phos-

- phorylierungsstörungen nach Nebennierenextirpation. Schweiz. med. Wschr. (II), 1382-1383.
140. VERZAR, F. y WIRZ, H. — 1937. Weitere Untersuchungen über die Bedingungen der selektiven Glucoseresorption. Biochem. Z., 292, 174-181.
 141. WEIL, L. y RUSSELL, M. A. — 1940. Studies on plasma phosphatase activity in relation to fat metabolism in rats. J. biol. Chem., 136, 9-23.
 142. WELCH, C. S., WAKEFIELD, E. G. y ADAMS, M. — 1936. Function of the large intestine of man in absorption and excretion. Study of a subject with an ileostomy stoma an isolated colon. Arch. int. Med., 58, 1095-1110.
 143. WERTHEIMER, E. — 1934. Phloridzinwirkung auf die Zuckerresorption. Pflügers Arch, 233, 514-528.
 144. WESTENBRINK, H. G. K. 1934 Arch. néerls, Physiol., 19, 563.
 145. WESTENBRINK, H. G. K. — 1935. Beitrag zur Kenntnis der Darmphosphatase. Arch. néerl. Physiol, 20, 566.
 146. WESTENBRINK, H. G. K. — 1936. Über die Beziehungen zwischen der Geschwindigkeit der Glucoseresorption, dem Körpergewicht, der Körperoberfläche, dem Darmgewicht und dem Gehalt in Darmphosphatase bei der weissen Ratte un über einen Versuch zur Beeinflussung der Darmphosphatasegehaltes durch die Zusammenstellung der Nahrung. Arch. néerl. Physiol., 21, 18-37.
 147. WESTENBRINK, H. G. K. — 1936. Über die Spezifität der Resorption einiger Monosen aus dem Darne der Ratte und der Taube. Arch. néerl. Physiol., 21, 433-454.
 148. WESTENBRINK, H. G. K. — 1936. Über den Einfluss von Phosphat auf die Glucoseresorption aus dem Darm. Acta brev. néerl. Physiol, 6, 36-38.
 149. WESTENBRINK, H. G. K. y GRATAMA, K. — 1937. Arch. néerl. Physiol., 21, 433.
 150. WESTENBRINK, H. G. K. y MIDDELBECK, A. — 1936. Über die korrelationen zwischen den Geschwindigkeiten der Darmresorption einiger einfacher Zucker. Arch. néerl. Physiol., 21, 283-293.
 151. WILBRANDT, W. y LASZT, L. — 1933. Untersuchungen über die Ursachen der Selektiven Resorption der Zucker aus dem Darm. Biochem. Z., 259, 398-417.
 152. WILSON, R. H. — 1932. The effect of phlorhizin on the rate of absorption from the gastrointestinal tract of de white rat. J. biol. Chem., 97, 497.
 153. WISLOCKI, G. B. y DEMPSEY, E. W. — 1945. Histochemical reactions of the endometrium in pregnancy. Am. J. Anat, 77, 365.
 154. ZELLER, A. — 1939. Die Bestimmung von 0,31 bis 50 mg Glucose mit dem Verfahren von Hagedorn und Jensen. Biochem. Z., 300, 78-81.