

Significado del Na^+ en la absorción intestinal de azúcares

F. Ponz

Los procesos por los que los distintos azúcares pasan desde el tubo digestivo a la sangre se investigan desde hace ya unos 75 años. Siempre ha llamado la atención que azúcares muy similares pasaran a la sangre con velocidades muy diferentes y que en concreto la glucosa pudiera hacerlo desde concentraciones prácticamente nulas en la luz del intestino delgado a las relativamente altas a que está en la sangre. En este tiempo se ha alcanzado un enorme progreso en el conocimiento de la absorción de azúcares, pero se está aún lejos de comprenderla suficientemente.

En los comienzos, por apartarse de lo que cabía esperar según las leyes físicas de la difusión, se habló de "permeabilidad fisiológica"¹¹³ para expresar una complejidad en la que de algún modo estaría implicada la actividad biológica de las células. Más adelante, desde 1933 y durante más de 20 años, se trató de explicar la absorción mediante la hipótesis de la fosforilación de los azúcares²²⁷, que se produciría al entrar éstos en las células epiteliales, desfosforilándose después al salir hacia la sangre;

así se mantendría bajo el nivel de azúcar libre intracelular y se facilitaría la continua entrada desde la luz del intestino a favor del gradiente de concentración hasta que se agotase. Hacia mediados de siglo se acumulan muchos datos incompatibles con esta hipótesis que termina por ser abandonada. A la vez, se desarrolla una amplia temática en torno a la existencia en las células de sistemas específicos de transporte, cuyas propiedades condicionan en muchos casos el paso de sustancias a través de las membranas biológicas, siendo algunos de ellos capaces de hacer posible que este paso se realice contra un gradiente de potencial electroquímico (transporte activo).

No cabe en el espacio de estas páginas resumir la ingente información reunida en lo que se lleva de siglo sobre la absorción intestinal de azúcares ni sobre la permeabilidad biológica en general, lo que por otra parte ha sido objeto de diversas publicaciones (cfr., p. ej., 46, 51, 66, 182, 228, 229) y que, en forma sumaria ha sido ya ofrecida antes de ahora por el autor^{153, 154, 155}. Para tratar

el tema concreto que nos ocupa, bastará recordar las características más significativas del proceso de absorción intestinal de azúcares.

La glucosa, la galactosa y un buen número de otros monosacáridos o derivados, son capaces de atravesar la pared del intestino a gran velocidad, a pesar de su carácter fuertemente hidrófilo, y contra un gradiente de concentración, es decir, por "transporte activo". Otros azúcares y derivados pasan solo a favor del gradiente, y en general muy despacio. El transporte activo de azúcares presenta especificidad, como las reacciones enzimáticas. La cinética del transporte es también muy similar a la de los procesos enzimáticos, tipo Michaelis-Menten, con una velocidad máxima a concentraciones altas de sustrato que saturan el proceso y con constantes de semisaturación, K_T (concentración de sustrato a la que la velocidad de transporte es mitad de la máxima), equivalentes a las K_m de enzimas. Entre sustratos análogos que utilizan un mismo sistema de transporte hay inhibición competitiva. El transporte activo requiere directa o indirectamente acoplamiento de energía metabólica, por lo que en general los inhibidores metabólicos suelen inhibirlo. El paso del azúcar desde la luz del intestino a la sangre *in vivo* o al lado serosal en experimentos *in vitro* se hace gracias a que se acumula primero en las células epiteliales hasta concentraciones bastante altas por transporte activo a nivel de la membrana mucosal, donde se encuentran las microvellosidades del borde en cepillo, para salir luego por la membrana basal o por las laterales a favor de gradiente. La entrada del sustrato por el borde en cepillo parece requerir la constitución de un complejo con una molécula transportadora que en principio se admite puede desplazarse en ambos sentidos a través del espesor de la membrana mucosal. La acumulación contra gradiente dentro de la célula se

explica por algún factor que introduce asimetría en el sentido de hacer más fácil la entrada que la salida con el resultado de un paso neto hacia el interior hasta alcanzar una relación de concentraciones propia del estado estacionario. El mantenimiento de ese factor de asimetría consume la energía imprescindible para la acumulación contra gradiente.

Los disacáridos procedentes de los alimentos sufren hidrólisis en la misma superficie mucosal del borde en cepillo donde se encuentran situadas las disacaridasas correspondientes y los monosacáridos resultantes pueden a continuación atravesar la barrera de la membrana sin necesidad de quedar libres en la luz.

INFLUENCIA DEL Na^+ SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE AZÚCARES. DEPENDENCIA DEL Na^+

Ya a principio de siglo se observó que la absorción de glucosa se facilitaba cuando había Na^+ en la luz del intestino¹⁶³. Ha sido sin embargo, en los últimos quince años cuando se ha puesto de manifiesto la alta significación de la relación entre el Na^+ y el transporte de azúcares y de otros no electrolitos en diferentes materiales biológicos, entre ellos el intestino^{51, 121, 154, 181, 186}.

En 1958, Riklis y Quastel¹⁶⁷ observaron que para que tuviera lugar la absorción intestinal de glucosa por el intestino delgado de cobayo *in vitro* era imprescindible la presencia de Na^+ en la solución mucosal. Csaky y sus colaboradores refirieron el mismo hecho en intestino de anfibio extendiéndolo a la absorción de la 3-o-metil-glucosa, que no es metabolizable, de algunos aminoácidos y de uracilo^{56, 57, 62, 63}. Crane y su grupo también lo advirtieron en preparados de anillos de yeyuno de hamster *in vitro*^{30, 31, 47}. En hamster se demostró además,

que la acumulación en el tejido de azúcares capaces de ser transportados activamente era función de la concentración de Na⁺ en el medio³⁰ sin que nada similar se apreciase con los azúcares que no son transportados activamente.

En los últimos años se ha aportado mucha más información acerca de la influencia del Na⁺ en el transporte de diversos solutos —azúcares, aminoácidos, pirimidinas, etc.— por muy distintas células animales, a la vez que se concedía creciente consideración a la posibilidad de que el gradiente iónico entre el interior y el exterior de la célula jugara un papel importante^{72, 75}. La asimetría en la distribución de Na⁺ y K⁺ a ambos lados de las membranas celulares encontraría así una nueva e interesante justificación. El grado de generalización que parece presentar el transporte de solutos dependiente del Na⁺ ha dado gran interés al estudio de la naturaleza de esta dependencia.

Características de la dependencia del Na⁺

Extensión. La dependencia del Na⁺ que muestra el transporte intestinal de azúcares ha sido comprobada *in vitro* en numerosas especies de vertebrados, y también en diversos invertebrados¹⁸⁶. En moluscos, en que no se había detectado todavía, lo ha sido recientemente en el caracol¹⁵. Parece ser un fenómeno muy general que también se revela en el epitelio de los túbulos renales^{124, 125, 173, 222, 223} y en el plexo coroides del perro⁶¹ cuyas células poseen estructura similar y acumulan hexosas. Depende asimismo del Na⁺ el transporte activo de ciertos aminoácidos y de otras sustancias por diferentes células animales¹⁸⁶.

La mayor parte de estos trabajos se han hecho *in vitro*. Pero también *in vivo* ha podido comprobarse que la absorción de glucosa disminuye con niveles muy bajos de Na⁺ en yeyuno de rata y se es-

timula por la adición de Na⁺^{57, 63, 126}. También en el perro¹⁰ y en el hombre^{149, 265} se ha hecho análoga observación. Con la técnica de absorciones sucesivas de Sols y Ponz²¹⁰ en rata hemos podido estudiar con más detalle la influencia de la concentración de Na⁺ sobre la absorción de galactosa¹³³ y de glucosa¹⁵⁷, entre 0 y 231 meq de Na⁺/l revelándose una clara dependencia mientras que la absorción de arabinosa no se modifica por el Na⁺. Con fructosa hay alguna inhibición con valores muy bajos de Na⁺¹⁵⁷.

Localización. En los experimentos *in vitro* se ha podido ver con seguridad que para que se dé el transporte activo de azúcares se precisa la presencia de Na⁺ en el lado mucosal y cuando allí falta, es inútil que esté presente en el serosal^{43, 26, 167}. Como *in vivo* el nivel de Na⁺ en sangre y líquidos intersticiales es siempre alto, la dependencia del Na⁺ se refiere sólo a la concentración del catión en el lado mucosal.

La floricina es un glucósido que inhibe fuertemente el transporte de azúcares. Su acción se ejerce en la superficie mucosal, y ya en 1952 se vio que su efecto desaparecía muy fácilmente por simple lavado del intestino¹⁵⁶. La inhibición se debe muy probablemente a competencia con los azúcares respecto del sistema de transporte^{9, 214}, en una región de la membrana que tapiza las microvellosidades de las células epiteliales un poco más interna que el lugar en que se encuentran las disacaridasas y otras hidrolasas^{138, 139, 147}. Así la floricina, que no inhibe a las disacaridasas, inhibe la absorción de la glucosa liberada por estas enzimas. Hay amplia coincidencia entre la sensibilidad del transporte de azúcares a la floricina y la dependencia del Na⁺ y también hay buenas razones para pensar que ambas influencias se ejercen en la membrana, justo a la entrada de la barrera a la difusión⁴⁷.

Especificidad por parte de los azúcares. En el intestino delgado hay buena correlación entre la especificidad de los azúcares para utilizar el sistema de transporte activo y su dependencia del Na^+ ⁵¹, de modo que los azúcares capaces de ser activamente transportados son dependientes del Na^+ y los demás no lo son ^{1, 2, 28, 30, 31, 47, 49, 157}. Esto habla a favor de una íntima relación entre el Na^+ y los mecanismos de utilización del sistema de transporte activo de azúcares.

Especificidad por parte del Na^+ . En todos los casos en que se ha estudiado la dependencia de un sistema de transporte respecto del Na^+ , este catión se ha revelado insustituible, es decir, la dependencia es muy específica. De ordinario, los experimentos se han realizado con soluciones isoosmóticas, en las que el Na^+ se sustituye a efectos osmóticos por diferentes cationes inorgánicos u orgánicos o por no electrolitos y con ninguno de ellos se ha conseguido reemplazar funcionalmente al Na^+ de modo que continúe el transporte activo ¹⁸⁶. En intestino delgado de hamster, se ha referido cierta capacidad del Li^+ para sustituir al Na^+ , no en permitir el transporte activo sino en hacer que la entrada del azúcar sea más rápida y que ésta se inhiba competitivamente por la floridina y por otros azúcares análogos, lo que no se consiguió con otros sustituyentes ²⁹. En ileon de conejo, ni siquiera se da esa posibilidad ¹⁰³.

De todas formas, recientes resultados *in vivo* permiten apreciar diferencias en el grado de inhibición de la absorción intestinal por supresión de Na^+ según la naturaleza de sus sustituyentes ¹⁵⁸. Aun cuando *in vivo* se segrega a la luz algo de Na^+ , es difícil justificar las amplias diferencias de inhibición observadas según los distintos sustituyentes, porque se alcancen niveles de Na^+ en luz en correlación inversa al grado de inhibición. Hay que pensar en que la absorción de azúcares es realmente de-

pendiente del Na^+ pero que también se afecta de algún modo según el sustituyente empleado. En este sentido hablan diversas observaciones sobre inhibición del consumo de O_2 y del metabolismo aerobio por la falta de Na^+ ^{14, 117, 118, 211}.

En experimentos *in vitro* se ha observado con frecuencia que la sustitución por K^+ hace que la velocidad de entrada de sustrato en las células sea particularmente lenta, lo que ha hecho pensar en algún tipo de antagonismo con el Na^+ ^{49, 53, 78, 79}. En intestino de hamster, altas concentraciones de K^+ inhiben en grado parecido la entrada de azúcar y de Na^+ en forma que sugiere competencia entre iones ³⁴. No obstante, la interpretación del efecto del K^+ como catión que compite con el Na^+ respecto de algún lugar del sistema de transporte no está suficientemente fundada ¹⁸⁶.

La dependencia del Na^+ en déficit de energía. Los azúcares activamente transportables requieren energía para su acumulación en las células epiteliales. Si el tejido intestinal de hamster se mantiene en anaerobiosis o en presencia de un desacoplante de la fosforilación oxidativa, dichos azúcares no se acumulan pero pueden entrar en las células a favor de gradiente por un proceso de difusión facilitada, y la velocidad de penetración depende de la concentración exterior de Na^+ . Esta dependencia no se observa con los otros azúcares ³¹. Se produce así una disociación del transporte activo de azúcares en un proceso por el que pasa el sustrato gracias a un sistema de transporte dependiente del Na^+ y otro de acumulación que requiere energía y que desaparece cuando hay déficit de energía metabólica.

Cinética. La supresión del transporte activo de azúcares de mucosal a serosal por ausencia de Na^+ en mucosal se debe a la falta de acumulación intracelular del azúcar contra gradiente. La entrada de glucosa, galactosa y 3-o-me-

tilglucosa en las células epiteliales de ileon de conejo sigue una cinética del tipo Michaelis-Menten, con utilización de un sistema de transporte común¹⁰³. En ausencia de Na⁺, la entrada de azúcar es en cambio función lineal de su concentración y no se inhibe por floridina ni por otros azúcares. Con Na⁺ en mucosal, el paso de azúcar a la célula vuelve a seguir la cinética de Michaelis, con poco o ningún efecto de la concentración del Na⁺ sobre el valor de la constante de semisaturación (K_t), mientras que la velocidad máxima de entrada disminuye al hacerlo la concentración del catión.

La salida del sustrato a favor de gradiente desde la célula al lado serosal o a la sangre, sea por el polo basal o por las membranas laterales, no parece afectarse por el Na⁺, y puede explicarse por simple difusión o, más probablemente, según un proceso de difusión facilitada no dependiente del Na⁺¹⁴³.

En otros casos de transporte de azúcares dependiente del Na⁺, no se ha visto influencia del Na⁺ sobre la velocidad máxima de entrada y sí muy clara sobre la afinidad del sistema para el sustrato^{53, 67}. La acumulación de 6-desoxi-D-glucosa en intestino de hamster es muy demostrativa de este tipo de cinética disminuyendo la afinidad (aumento de K_t) al disminuir la concentración de Na⁺⁵³. Cuando el Na⁺ es sustituido parcialmente por K⁺ la afinidad se hace además menor que cuando lo es por Tris. Para Bihler²⁸ el paso neto de azúcares activa o no activamente transportados sigue una cinética de Michaelis-Menten con una misma velocidad máxima de saturación. Los activamente transportables difieren de los demás en que poseen K_T mucho más bajas (cien o más veces) en presencia de los niveles de Na⁺ ordinarios en el medio extracelular, en tanto que los otros no son sensibles al Na⁺. Esta idea atractiva tiene no obstante algunos aspectos discutibles^{186, 191}.

Inhibición por glucósidos cardiacos. Diversas observaciones revelaron que la ouabaina y algunos otros glucósidos cardiacos inhiben el transportes activo de azúcares por el intestino *in vitro*^{55, 57-60, 144} acción que tiene carácter bastante general en diversos preparados sobre procesos de transporte dependientes del Na⁺^{186, 168}. Experimentos en yeyuno de rata *in vivo*¹³⁴ permitieron comprobar la inhibición del transporte activo de glucosa por la ouabaina a concentraciones del orden de 10⁻⁶ M, en condiciones en que podían excluirse otros efectos farmacológicos más generales. La inhibición era mucho menor con la absorción de fructosa y no se apreciaba con arabinosa. Esta alta sensibilidad en la rata *in vivo* respecto de los resultados *in vitro* con rata¹⁴⁴ o hamster⁵⁴ se aprecia solo a concentraciones muy bajas de Na⁺ y se acompaña de una menor salida neta de este catión hacia la luz del intestino¹³⁴.

Este grupo de sustancias es bien conocido como inhibidor de la bomba de Na⁺ con la que las células animales expulsan activamente Na⁺ fuera de la célula, con entrada simultánea de K⁺ contra gradiente¹⁰². Hay muchas razones para pensar que su acción se ejerza por inhibición de la ATPasa estimulable por Na⁺ y K⁺ que se encuentra en muchas estructuras membranosas con transporte activo de Na⁺²⁰⁵ y entre ellas en el material membranoso del borde en cepillo del epitelio del intestino delgado de cobayo²¹⁵, hamster⁸⁰, rata^{26, 27, 165}, etc. Es lógico que se haya relacionado la inhibición del transporte activo de azúcares con la inhibición de la ATPasa y la bomba de Na⁺ por las mismas sustancias.

Los efectos de la ouabaina *in vitro* sobre el transporte de azúcares solo se producen cuando el glucósido se encuentra en el lado serosal⁵⁹. Esta sustancia no parece transportarse activamente y puede pasar de mucosal a serosal a favor de gradiente^{127, 145} mientras que su

paso en sentido contrario es muy escaso o nulo¹⁴⁵. Se explica así que puedan encontrarse inhibiciones con concentraciones altas de ouabaina en mucosal¹⁴⁴ por su paso a serosal. La sensibilidad mucho mayor cuando se dispone en serosal obliga a pensar en que su acción se ejerza sobre algún proceso, muy probablemente el bombeo de Na^+ , situado a nivel del polo basal de las células epiteliales.

INFLUENCIA DE LOS AZÚCARES EN EL TRANSPORTE DEL SODIO

Transporte activo de Na^+ por el intestino y potencial transmural

Es bien conocido que el Na^+ puede pasar de un lado a otro de la pared del intestino en ambas direcciones^{220, 221}. Desde la luz del intestino delgado puede pasar *in vivo* Na^+ hacia la sangre contra un gradiente de concentración^{37, 115, 135} y también *in vitro* se ha demostrado transporte activo de mucosal a serosal^{112, 174}. En el caso de iones, el transporte es activo cuando hay movimiento neto contra un gradiente de potencial electroquímico, que incluye no solo a las diferencias de concentración sino también las de potencial eléctrico a ambos lados de la membrana.

En el intestino delgado y en el grueso de muchas especies puede medirse *in vivo* e *in vitro* una diferencia de potencial eléctrico "transmural", con positividad en el lado serosal respecto del mucosal, que es mayor en el colón que en el intestino delgado¹⁸⁴. En muy diversos laboratorios ha podido comprobarse que en preparados de intestino delgado se da de hecho un paso neto de Na^+ desde mucosal a serosal en contra de un gradiente de potencial electroquímico¹⁸⁴. La diferencia de potencial transmural

puede compensarse por aplicación de una corriente de cortocircuito según las técnicas de Ussing y Zehran²¹⁹, lo que permite operar en condiciones de diferencia de potencial 0 entre ambos lados del tejido, con lo que si la concentración inicial de un ión es también la misma, su paso neto en una dirección determinada no puede explicarse por difusión sino que requiere transporte activo o alguna interacción con otros flujos como sería el caso del fenómeno de arrastre por disolvente. Además, en adecuadas condiciones experimentales, la intensidad de la corriente de cortocircuito es una buena medida del paso neto de un ión contra gradiente de potencial electroquímico.

Con estas técnicas y con el empleo de dos isotopos radioactivos del Na^+ , ha podido comprobarse repetidamente un paso neto de este catión de mucosal a serosal contra un gradiente de potencial electroquímico. Este transporte neto de Na^+ se inhibe por anaerobiosis y por Dinitrofenol⁶⁴, que provocan una disminución del movimiento unidireccional del catión hacia serosal sin que apenas se modifique el flujo en sentido contrario, lo que lleva a pensar que el primero es activo y requiere energía y el segundo es pasivo. Diversos experimentos^{64, 63, 157} han permitido descartar la posibilidad de que el paso neto de Na^+ pueda explicarse por arrastre de disolvente, es decir, que fuera secundario a un movimiento de agua en el mismo sentido, con lo que puede considerarse bien establecido el transporte activo transepitelial de Na^+ desde la luz mucosal al lado serosal o a la sangre.

La ouabaina inhibe este transporte de Na^+ en el intestino al igual que lo hace en otras células¹⁰² y precisamente por bloqueo del paso unidireccional hacia serosal sin afectar el movimiento opuesto y sólo cuando el glucósido se adiciona a la solución serosal¹⁹⁴.

Incremento del transporte de Na⁺ por adición de azúcares

Así como el transporte activo de azúcares por el intestino depende de la concentración de Na⁺ en el lado mucosal, se ha podido comprobar que la adición de azúcares o aminoácidos activamente transportables en el lado mucosal de un preparado de intestino delgado de rata^{42, 42, 177}, tortuga^{12, 13, 181} u otras especies provoca un aumento inmediato de la diferencia de potencial transmural y del transporte activo neto de Na⁺ hacia serosal^{20, 38, 39, 82, 84, 87, 90, 109, 114, 127, 130, 142, 159, 179, 193, 194, 196, 206, 207, 216, 224}. En ileon de conejo, Schultz y Zalusky^{193, 195-197} pudieron eliminar la posibilidad de atribuir esos efectos a influencias sobre factores distintos del transporte activo de Na⁺. Con los azúcares activamente transportables, sean o no metabolizables, y no con los demás azúcares, se produce aumento del potencial transmural, de la intensidad de la corriente de cortocircuito y del paso neto de Na⁺ contra gradiente de potencial electroquímico hacia serosal. Estos efectos no se producen por ejemplo con la fructuosa, que se metabolizable pero que no se transporta contra gradiente²²⁸.

La floridina sola no influye en el transporte activo de Na⁺, pero impide que se produzcan los cambios debidos a la adición de azúcares activamente transportables, lo que sugiere que la acción de estos azúcares sobre los movimientos de Na⁺ depende de la posibilidad de utilización del correspondiente sistema de transporte.

Relaciones cinéticas

Los aumentos de intensidad de la corriente de cortocircuito, correspondientes a aumentos de paso neto de Na⁺ a serosal, guardan cierta relación con la concentración de los azúcares adicionados, de tal modo que crecen con la concentración del azúcar según una cinética

de saturación tipo Michaelis-Menten. Los aumentos máximos dependen de la concentración de Na⁺ a que se trabaja en el medio mucosal. Hay bastante buena correlación entre los valores de las constantes de semisaturación (K_t) del sistema de transporte para los diferentes azúcares y las concentraciones de éstos que se requieren para conseguir un aumento semimáximo de la corriente de cortocircuito^{131, 195, 196}. La concentración de glucosa que produce aumento semimáximo de esta corriente es independiente de la concentración exterior de Na⁺ a que se opere¹⁹⁵. Esto hace pensar en que haya una relación estequiométrica entre la velocidad del transporte del azúcar y el aumento de velocidad del transporte activo del Na⁺.

INTERPRETACIÓN DE LAS INTERACCIONES RECÍPROCAS ENTRE TRANSPORTE ACTIVO DE AZÚCARES Y DE Na⁺

Resulta oportuno, antes de exponer posibles interpretaciones, considerar algunas características morfológicas del epitelio absorbente y llamar la atención sobre ciertos aspectos referentes a las técnicas experimentales.

Asimetría estructural de las células epiteliales

Las células epiteliales absorbentes que revisten las vellosidades del intestino delgado ofrecen una ultraestructura asimétrica^{204, 217}. Son células altas, columnares, con núcleos dispuestos basalmente. El borde en cepillo de su superficie apical presenta un gran número de microvellosidades, a manera de proyecciones digitales, lo que supone un amplio desarrollo de superficie. La membrana plasmática de esta cara apical es más gruesa que la limitante de las regiones laterales y basales. Posee también un revestimiento exterior de aspecto vellosito que parece

constituido de finos filamentos ramificados más prominentes en el ápice de cada microvellosidad con material mucopolisacárido. En el interior de la microvellosidad hay un haz de filamentos paralelos a su eje longitudinal que aparecen en su base como raicillas que se entrecruzan con las de otras microvellosidades en la región citoplasmática inmediatamente más interna que diferencia el velo terminal.

Las membranas laterales entre células pueden dejar espacios de separación más o menos amplios, con tres tipos de uniones entre sí: El complejo de unión, por fusión de las láminas externas de ambas membranas adyacentes, en el extremo luminal, que constituye un cierre eficaz entre el espacio intercelular y la luz intestinal; la unión intermedia en que las membranas están ya separadas con material amorfo entre ellas; y los desmosomas, más por debajo, que establecen un cierto número de botones de unión entre ambas células. La superficie basal de la célula, queda ya inmediata a la membrana basal, que es una hoja continua de material homogéneo por encima de la lámina propia y puede presentar expansiones citoplasmáticas que alcanzan a esta última.

El citoplasma subyacente a las microvellosidades, diferenciado en trama terminal presenta una red de filamentos finos bastante apretados, algunos microtúbulos y algunas vesículas limitadas por membranas del tipo de la de revestimiento apical de la que muy probablemente derivan por micropinocitosis.

Las células absorbentes de las bases de las vellosidades son jóvenes y menos funcionalmente diferenciadas, mientras que las próximas a sus ápices se consideran maduras.

Estas asimetrías estructurales se corresponden sin duda con asimetrías funcionales. Un factor importante a tener en cuenta es el amplio desarrollo de superficie que representan las microvellosida-

des de la región apical, que no se da en el resto de la superficie celular, aunque él solo sea muy insuficiente para explicar muchas características del transporte transepitelial¹⁸⁴.

Las propiedades de la membrana mucosal han de ser distintas de las que posea el resto de la superficie celular. Aunque los datos morfológicos son ya relevantes a este respecto, sus actuales limitaciones son insuficientes para servir de base a una interpretación correcta de los fenómenos de transporte.

Peculiaridades de las técnicas de trabajo

Una amplia revisión y discusión de las diferentes metodologías en uso para investigar la absorción intestinal ha sido hecha no hace mucho por Parsons¹⁵⁰. Hay una gran variedad de procedimientos de aplicación al hombre o a animales no anestesiados, métodos *in vivo* bajo anestesia, preparados *in vitro* de segmentos de intestino, sacos invertidos, tiras o anillos de tejido, vellosidades o aun células aisladas, cada uno con sus ventajas e inconvenientes que no pueden ser discutidos aquí. Solo diremos que las características de la preparación utilizada han de ser consideradas con atención cuando se trata de interpretar los resultados. No puede olvidarse, por ejemplo, que el análisis del transporte transepitelial depende en alto grado de que se conserve la polarización morfológica y funcional de las células absorbentes de modo que el contacto con la solución mucosal sea exclusivamente por la superficie del borde en cepillo ya que el resto de la membrana tiene como se ha dicho diferentes propiedades²⁰².

El cotransporte de azúcares y Na⁺

Para explicar la influencia facilitadora del Na⁺ en el transporte activo de azúcares y en la difusión facilitada de los mismos azúcares en anaerobiosis o en

presencia de Dinitrofenol, Crane propuso⁴⁹ que el paso de la molécula de azúcar por la membrana mucosal se haría en forma asociada a un agente portador móvil cuya molécula poseería un lugar activo específico para un grupo de azúcares y otro lugar al que se fijaría también específicamente el Na⁺. La formación del complejo ternario entre el portador (X), el Na⁺ y el azúcar (S) (Na⁺-X-S) facilitaría el transporte. La inhibición del transporte de azúcares en presencia de Na⁺ por la adición de otros cationes³⁵ se acompaña de inhibición en proporciones similares de la entrada de ²²Na en las células, lo que apoya la hipótesis del complejo ternario. Los otros cationes dificultarían la fijación del Na⁺ al portador y por tanto su penetración.

Schultz y Zalusky¹⁹⁵ admiten también que la entrada de sustrato por el borde en cepillo, que da lugar a su acumulación dentro de la célula, se hace en forma acoplada con la del Na⁺, mediante un portador común. El Na⁺ que penetra sería luego expulsado hacia el lado serosal por la bomba de Na⁺ que estaría preferente o exclusivamente localizada en la membrana serosal. La ouabaina, al inhibir esta bomba de Na⁺ impediría la salida del catión y la entrada del azúcar. En circunstancias normales, la bomba de Na⁺ para mantener constante el nivel intracelular de este catión lanzaría hacia el lado serosal el exceso de Na⁺ que entra desde el mucosal asociado al portador y al azúcar, y a este mayor bombeo se deberían los cambios eléctricos por adición del sustrato.

Algunas mediciones del movimiento del sustrato y de Na⁺ son consistentes con un coeficiente de interacción 1, es decir, que por cada molécula de azúcar pasa un ión Na⁺^{103, 195}, conforme con la hipótesis del complejo ternario. Los sistemas de transporte dependientes de Na⁺ serían en estos casos sistemas de "transporte acoplado al de Na⁺"¹⁸⁶ y los criterios cinéticos necesarios y suficien-

tes para comprobar si esto ocurre en un caso concreto son: 1) Que la disminución de la concentración exterior de Na⁺ lleve consigo una disminución del flujo unidireccional del sustrato al interior o de la velocidad inicial de su incorporación a la célula, sea por incremento de K_t (disminución de la afinidad aparente), por disminuir la velocidad máxima de entrada o por ambos factores a la vez; y 2) que la entrada de sustrato se acompañe de entrada de Na⁺, con adecuada relación estequiométrica o coeficiente de acoplamiento.

La hipótesis del gradiente iónico

Ya en 1958, aunque para otras células, había sugerido Christensen¹⁶⁶ que los gradientes catiónicos entre el interior y el exterior podrían dar lugar a movimientos a favor de gradiente que se pudieran acoplar a la entrada en la célula de determinados sustratos, quizá por unión del Na⁺ y del sustrato a un mismo portador. Esta misma idea, en forma todavía más explícita, fue luego propuesta por Crane^{47, 49, 55, 65} para explicar el transporte activo de azúcares por el intestino, y se ha ido precisando posteriormente¹⁸⁶.

De acuerdo con esta hipótesis, para que pueda haber acumulación intracelular de un sustrato —azúcares, aminoácidos, etc.— contra gradiente de concentración, es esencial que exista un gradiente de potencial electroquímico de uno o más cationes entre uno y otro lado de la membrana y que haya algún sistema de transferir la energía de este último al movimiento del sustrato contra gradiente. Gracias a la bomba de Na⁺, las células mantienen gradientes iónicos muy notables con nivel más bajo de Na⁺ y más alto de K⁺ en el interior que en el medio extracelular. La energía consumida por esa bomba de Na⁺, transformada en los gradientes iónicos generados, supone un potencial energético a

disposición de las células para dar entrada a determinados sustratos contra su propio gradiente. Para que esto último pueda ocurrir, basta que el movimiento de los sustratos en ambos sentidos a través de la membrana se influya convenientemente por la concentración del ión.

El proceso inmediatamente dependiente de la energía metabólica, según estas concepciones, es el bombeo de Na^+ , único al que propiamente se le puede designar transporte activo, o, en la denominación propuesta por Stein²¹² y Smyth²⁰⁸ transporte activo "primario". La acumulación de azúcares no requiere directamente energía metabólica, sino que la utiliza indirectamente, vía la energía potencial almacenada en forma de gradiente de Na^+ , del que es enteramente dependiente; en la misma terminología, constituiría un transporte activo "secundario", por "acoplamiento al gradiente iónico"⁵¹.

La transferencia de energía entre el sistema de transporte activo primario y el secundario puede comprenderse en conformidad con los datos reveladores del cotransporte de azúcares y Na^+ : el movimiento "cuesta abajo" del Na^+ hacia el interior de la célula facilita la entrada simultánea del sustrato asociado en el mismo complejo ternario $\text{Na}^+\text{-X-S}$. Aunque la membrana mucosal sea funcionalmente simétrica, permitiendo el movimiento del complejo ternario en ambas direcciones, la asimetría que representa el gradiente de Na^+ hace que en la cara externa de la membrana la concentración del complejo $\text{Na}^+\text{-X-S}$ sea mayor que en su cara interna donde la tendencia a la disociación será más alta. Si la unión del portador con el Na^+ aumenta la afinidad de éste para el azúcar o la velocidad de su traslocación a través de la membrana o ambos factores a la vez, se producirá la entrada neta del azúcar y su acumulación contra gradiente hasta alcanzar el estado estacionario, con una diferencia de concentración que depen-

derá del gradiente del Na^+ , de las características del azúcar en sus relaciones con el sistema de transporte y de cómo se modifiquen éstas por influencia del Na^+ . Así se explica que permaneciendo constante el gradiente de Na^+ , el gradiente del azúcar en el estado estacionario difiera según la naturaleza del sustrato. La cinética del proceso de transporte, según el factor o factores que se influyan por el Na^+ , presentará características distintas^{110, 111}.

Si la hipótesis del gradiente es válida, toda acción que impida el funcionamiento de la bomba de Na^+ , como la adición de glucósidos cardíacos, inhibirá el transporte activo del azúcar por disminución o desaparición del gradiente de Na^+ . De otra parte, si por cualquier procedimiento se consigue invertir el sentido del gradiente iónico, la hipótesis exige que se invierta también la dirección del paso neto de azúcar contra su propio gradiente.

Efectos de la inhibición del bombeo de Na^+ . La ouabaina y otros glucósidos cardíacos, como ya se ha dicho, inhiben la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , el bombeo de Na^+ y también el transporte activo de azúcares, en apoyo de la hipótesis del gradiente de Na^+ .

Este efecto, no obstante, puede explicarse no sólo porque disminuya o desaparezca el gradiente de Na^+ , sino también porque el sistema ATPasa, directamente inhibido, esté implicado en un transporte activo primario de azúcar al que acoplaría energía. Los resultados experimentales en favor de la primera posibilidad, y por tanto de la hipótesis del gradiente, son abundantes. El sistema de transporte de azúcares dependiente de Na^+ e inhibible por la floricina está situado en el borde en cepillo, mientras que la ouabaina actúa en la membrana serosal, que es donde parece estar situada la bomba de Na^+ al menos en forma preferente. Con aminoácidos se ha podido demostrar

que la inhibición del transporte activo por la ouabaina se debe más que a una disminución del flujo de entrada del sustrato, al aumento del flujo contrario de salida por la misma membrana mucosal, conforme era de esperar por la disminución o anulación del gradiente de Na⁺ ^{70, 88, 108, 188}. Datos obtenidos en ileón de conejo ¹⁸⁸ revelan que en efecto, el Na⁺ intracelular se equilibra con el extracelular al cabo de algún tiempo de la adición de ouabaina en el lado serosal. Esto explica también que el efecto de la ouabaina sobre el transporte de no electrolitos requiera cierto tiempo para manifestarse.

El ácido etacrínico, otro inhibidor de la ATPasa dependiente de Na⁺ y K⁺ ⁷⁷, inhibe el transporte activo de Na⁺ y el de azúcares o de aminoácidos por sacos invertidos de intestino de hamster ³² a la vez que reduce los gradientes transmembrana de Na⁺ y K⁺ ⁶⁹.

La acción de múltiples inhibidores metabólicos sobre el transporte activo de azúcares ^{46, 155} se puede explicar por inhibición primaria del bombeo de Na⁺, que tendría como consecuencia, la inhibición indirecta de aquél. Con algunos de estos inhibidores se ha comprobado que no afectan al movimiento unidireccional de entrada de alanina (ileón de conejo), pero que la entrada neta cesa por aumento de la salida del sustrato debido a la mayor concentración intracelular de Na⁺ ⁷⁰.

Cuando en lugar de Na⁺ hay otros iones en el medio mucosal, cambia enteramente el gradiente de Na⁺ y también su nivel intracelular ⁵⁷, lo que impide la acumulación del azúcar.

Salida de sustrato dependiente de Na⁺. Hay mucha información que acredita que el flujo unidireccional de entrada de azúcar u otro sustrato adecuado a la célula por el borde en cepillo es dependiente de la concentración de Na⁺ en el medio exterior. Pero para avalar la hi-

pótesis del gradiente importa demostrar además que el flujo unidireccional de salida por la misma membrana depende también de la concentración de Na⁺ intracelular y que está acoplado a la salida de Na⁺.

Los estudios de la cinética de salida de sustrato son no obstante menos seguros que los referentes a la cinética de entrada, en especial por la dificultad de conocer las actividades reales del sustrato y del Na⁺ en el interior de la célula o, mejor aún, junto a la membrana. La célula está compartimentada, algunos orgánulos celulares son capaces de acumular sustancias, parte del sustrato o aún más del Na⁺ puede estar en forma combinada y así no contribuir a la actividad del ión, etc. Diversas observaciones dan fundamento para pensar así ^{44, 136, 231}.

Algunos trabajos, a pesar de ello, son bastante demostrativos. Velloidades intestinales de hamster aisladas ⁴⁸ pueden llegar a equilibrarse por incubación en condiciones anaerobias o en presencia de Dinitrocresol, con un medio con Na⁺ 120 mM y cierta concentración de un azúcar. Si luego se transfieren a un medio con la misma concentración de azúcar pero sin Na⁺, se produce salida de Na⁺ a favor de gradiente hacia el medio, a la vez que sale el azúcar contra gradiente. En ileón de conejo ¹⁰⁸ se ha podido ver que la salida de alanina por la membrana mucosal sigue una cinética de saturación dependiente de la concentración intracelular del Na⁺. Esta última puede hacerse cambiar a voluntad por preincubación con ouabaina o con CN⁻. Según sea la concentración del Na⁺ en el medio de incubación se dispondrá de gradientes de Na⁺ transmembrana en uno u otro sentido. El movimiento neto del aminoácido se hace siempre en el mismo sentido del gradiente de Na⁺. De otra parte, si mucosa cuyas células han sido cargadas con Na⁺ 140 mM y alanina 40 mM por intoxicación con ouabaina, se incuba con un medio con N⁺

140 mM pero sin alanina, se produce un salida de alanina a favor de gradiente que se acompaña de salida de Na^+ contragradiente, gracias al acoplamiento del transporte de ambas sustancias.

Cooperación del gradiente de K^+ . En las células epiteliales, como en las otras, simultáneamente al gradiente de Na^+ en un sentido, se da otro de K^+ en sentido opuesto. La completa ausencia de K^+ parece deprimir en algunos casos^{30, 167} la acumulación de azúcares; y concentraciones exteriores por encima de los 10 a 15 mM inhiben también esa acumulación. Esta inhibición se ha explicado por competencia con el Na^+ respecto del portador^{53, 146}, a efectos inespecíficos sobre membrana^{67, 187, 188}, a influencias sobre la ATPasa y la bomba de Na^+ ²¹⁸, etc. También se ha sugerido que el gradiente de K^+ está de algún modo acoplado con el sistema de transporte de azúcar de forma que si disminuye —por descenso del nivel intracelular o por aumento del extracelular— se frene el peso neto de azúcar en sentido contrario al gradiente.

Influencia de los azúcares en el transporte de Na^+ y en el potencial transmural. En principio la bomba de Na^+ puede estar distribuida por toda la superficie de las células epiteliales; pero los efectos de la ouabaina, como se ha dicho, sugieren una localización muy preferente en el polo basal¹⁸⁴. Su actividad es indispensable para mantener los gradientes iónicos de Na^+ y de K^+ y, conservar el nivel de Na^+ intracelular suficientemente bajo. Algunas observaciones recientes en otros tejidos sugieren la posibilidad de que el bombeo de Na^+ sea realizado por dos sistemas distintos, con diferente sensibilidad a la ouabaina y al ácido etacrínico, uno de ellos poco o nada electrogénico y el otro electrogénico¹⁶⁹. Al adicionar azúcares al medio mucosal, se produce entrada neta y acumulación de azúcar en las células a la vez que entra Na^+ a favor de

su gradiente de difusión, asociados ambos procesos gracias a la formación del complejo ternario. Esta mayor entrada de Na^+ , que tendería a reducir el gradiente se compensa por un mayor bombeo de Na^+ hacia serosal. El paso neto transepitelial de Na^+ hacia serosal aumenta y con ello también el potencial transmural y la intensidad de la corriente de cortocircuito.

En estos últimos años se han obtenido medidas de los potenciales transmembrana mucosal y serosal. El interior de la célula es negativo respecto a las soluciones mucosal y serosal como ocurre en muchas otras células, aunque en el epitelio del intestino delgado los potenciales transmembrana son bastante más débiles. El potencial transmural es la suma algebraica del potencial transmembrana mucosal y el de signo opuesto en la membrana serosal, siendo este último algo mayor en valor absoluto que el primero, dado que el lado serosal aparece usualmente positivo frente al mucosal. En ileón de conejo el potencial transmucosal es de unos 30 a 40 mV¹⁷¹ pero hay bastantes diferencias según las especies o incluso la región del intestino delgado. El aumento del potencial transmucosal por adición de azúcar al medio mucosal puede en teoría explicarse por cambios en el potencial transmembrana mucosal, en el serosal o en ambos a la vez. En ileón de conejo¹⁷¹ y en sapo²²⁵ se ha observado que se hace menor la negatividad intracelular y esta disminución del potencial transmucosal con poca o ninguna variación del transserosal basta para justificar el aumento del potencial transmural. En cambio, en intestino delgado de tortuga^{101, 230} y en yeyuno de rata^{21, 132}, no varía el potencial transmucosal, mientras que aumenta el potencial transserosal. En el primer caso, el proceso de entrada de azúcar y Na^+ por la membrana mucosal es electrogénico disminuyendo la polarización de esa membrana. En el segundo, el mecanismo elec-

trogénico se sitúa en la actividad de la bomba de Na⁺ en serosal, estimulada por la entrada de sustrato con Na⁺, aumento que no se produce si se ha adicionado ouabaina; la entrada de sustrato y Na⁺ por el mucosal sería poco o nada electrogénico si por la misma membrana sale K⁺ en intercambio con el Na⁺. En yeyuno de rata, los potenciales de membrana en mucosal y serosal parecen depender en gran parte de potenciales de difusión de Na⁺ y K⁺; para la membrana mucosal se ha estimado²² que la permeabilidad para el K⁺ es un poco mayor que para el Na⁺^{1, 26/1}. Sobre los potenciales de difusión a nivel de la membrana serosal se añadiría el potencial generado por la bomba de Na⁺.

En los últimos años se ha revelado que los potenciales eléctricos del epitelio están influidos por flujos de iones monovalentes, debidos especialmente a difusión del Na⁺ a través de los espacios libres entre células, que determinan un corto circuito entre mucosal y serosal^{99, 172, 185, 226}.

Hay también algunos datos acerca de las concentraciones iónicas intracelulares, aunque su validez está sometida a diversas limitaciones. En epitelio de ileón de conejo por ejemplo, cuando en el medio hay Na⁺ 140 mM y K⁺ 15 mM, los niveles dentro de las células eran de 50 y 140 mM respectivamente^{35, 36, 188, 189}.

La acumulación de azúcar intracelular mantenida durante cierto tiempo parece producirse sin aumento del nivel intracelular de Na⁺^{11, 129}, lo que parece indicar que si la entrada del sustrato se hace por cotransporte con Na⁺ es muy eficaz el bombeo adicional del Na⁺ que va entrando.

La hipótesis del gradiente de Na⁺ para explicar el transporte activo de azúcares y de otros sustratos dependientes de Na⁺ permite así comprender las variaciones de potencial eléctrico que se producen al adicionar sustrato al lado mucosal: o la

entrada de Na⁺ asociado al azúcar en el complejo ternario con el portador es electrogénica y disminuye el potencial de membrana mucosal, o se estimula la actividad de la bomba de Na⁺ con aumento del potencial transserosal. En ambos casos habrá aumento de la diferencia de potencial transmural.

Dificultades para la hipótesis del gradiente iónico

Valoración energética de la hipótesis. Hay general coincidencia en que la energía que representa el gradiente de potencial electroquímico de Na⁺ puede de algún modo permitir el paso de azúcares contra gradiente. Pero hay serias discrepancias respecto a que sea suficiente esa energía para explicar las acumulaciones efectivas de sustrato que revelan los experimentos. En una discusión reciente de este tema, Schafer¹⁷⁸ a la vista de resultados en diferentes preparaciones estima que en algunos casos el gradiente de Na⁺ es suficiente; en otros resulta necesario acudir además a la energía del gradiente del K⁺ en sentido opuesto; hay por último referencias en que toda la energía de los gradientes iónicos de Na⁺ y K⁺ adicionados resulta insuficiente y sugieren la utilización directa de energía metabólica para explicar una parte al menos del transporte activo del no electrolito.

Falta sin embargo más información para garantizar la corrección de estas evaluaciones. En particular, hay mucha ignorancia sobre las reales actividades intracelulares de los iones y sustratos a nivel de la cara interna de las membranas.

Los valores que se utilizan suelen calcularse suponiendo que el total del ión o sustrato intracelular esté libre y uniformemente distribuido en el agua celular lo que es una simplificación excesiva^{45, 152, 203}. Puede comprenderse que errores en los cálculos de la actividad iónica intracelular pueden afectar mucho a los

cálculos de energía disponible. Se precisan medidas más directas y seguras de la actividad iónica en el lado interno de la membrana, quizá mediante el empleo de microelectrodos específicos u otros métodos.

Transporte de monosacáridos liberados en la membrana desde disacáridos. Se ha indicado ya que las disacaridasas ligadas al borde en cepillo liberan monosacáridos que pueden utilizar el sistema de transporte dependiente de Na^+ . Datos recientes llevan a pensar que una parte al menos de estos monosacáridos recién liberados atraviesa la membrana gracias a sistemas de transporte distintos muy estrechamente relacionados con las correspondientes enzimas, que no son accesibles a los mismos monosacáridos libres en solución⁵². Entre actividades enzimáticas y sistemas de transporte parece haber relaciones espaciales y funcionales muy íntimas. Crane introdujo el concepto de superficie digestiva-absorbente para expresar esa vinculación. La glucosa liberada a partir de sacarosa gracias a la sacarasa se transporta en presencia de altas concentraciones de glucosa oxidasa en mucosa mejor que la liberada desde glucosa-1-fosfato por hidrólisis con la fosfatasa alcalina. Como ambas enzimas están asociadas a la membrana del borde en cepillo parece como si el portador estuviera mucho más vinculado a la sacarasa que a la fosfatasa¹³⁸. La glucosa oxidasa se adiciona para eliminar lo más posible a la glucosa libre que pudiera pasar a la solución mucosa aun cuando difícilmente suele encontrarse glucosa en jugo intestinal *in vivo* o en el lado mucosal *in vitro* en experimentos de absorción de sacarosa^{106, 138, 151}.

La absorción de glucosa derivada de la sacarosa, a moderada velocidad de hidrólisis, no interfiere el transporte activo de 6-desoxi-D-glucosa. En condiciones de transporte de glucosa libre a la velocidad máxima de saturación, la adición de sacarosa o algunos otros disacáridos lleva

a un notable aumento de la velocidad de acumulación de glucosa. Estos resultados⁴⁰ sugieren fuertemente que además del sistema de transporte bien conocido para monosacáridos libres, debe haber otro independiente para el transporte de glucosa procedente de la hidrólisis de disacáridos. Este sistema adicional se influye poco o nada por el Na^+ ¹⁶¹. La adición de sacarosa 15 mM al medio mucosal provoca un aumento del potencial transmural menor que el que se produce con glucosa 15 mM, pero este último es igual al que se observa por adición simultánea de sacarosa y glucosa, lo que está de acuerdo con que la acumulación adicional de glucosa procedente de la sacarosa que se da en estas últimas condiciones no se acompaña de un movimiento correspondiente de Na^+ . Se considera que al hidrolizarse el disacárido en la membrana, parte de la glucosa que aparece utiliza el sistema de transporte vinculado a la enzima que es independiente de Na^+ y otra parte se transporta por el sistema más común que es dependiente del Na^+ . Semenza²¹⁴ ha aislado de intestino delgado de conejo una glucoproteína con dos subunidades, una con actividad sacarasa-maltasa y otra con actividad isomaltasa-maltasa-oligo-1,6- α -glucosidasa. La incorporación de la primera de estas subunidades a membranas lipídicas artificiales da lugar a un notable incremento de la permeabilidad a los monosacáridos resultantes de la hidrólisis de sacarosa, sugiriendo que dicha proteína con actividades enzimáticas sea también el agente portador.

Acumulación por células epiteliales aisladas. Kimmich^{119, 120}, con preparados de células epiteliales aisladas de intestino delgado de pollo, ha visto que la acumulación de D-galactosa y 3-O-metil-glucosa es dependiente de Na^+ con similares características a las observadas con otras técnicas con tejido intestinal intacto. Si se preincubaban las células en frío (0° C) con Na^+ y galactosa, se cargan por equi-

libración consiguiendo determinadas concentraciones intracelulares. Si se pasan luego a medios con bajo nivel de Na⁺ y con galactosa, el gradiente de Na⁺ estará invertido, más alto dentro que fuera, condición en que de ser válida la hipótesis del gradiente de Na⁺ debería salir azúcar contra gradiente; sin embargo no es así. Puede salir Na⁺ a favor de gradiente, aun en presencia de ouabaina para impedir la bomba de Na⁺, pero la galactosa no sólo no sale sino que entra contra gradiente. La entrada de azúcar contra gradiente se observa también cuando tanto el gradiente de Na⁺ como el de K⁺ están invertidos. En condiciones de ausencia de K⁺ intracelular, la falta o inversión del gradiente de K⁺ no influye en la acumulación de azúcar en presencia de Na⁺ ¹²². Kimmich supone que estos iones influyen en el transporte por su acción sobre la ATPasa dependiente de Na⁺ y K⁺ que proporcionaría energía tanto a la bomba de Na⁺ como a los sistemas de transporte activo de azúcares o de otros sustratos.

Estos resultados en células aisladas han sido no obstante criticados porque con ellas se pierde la polaridad celular que subsiste en otras preparaciones, con importantes consecuencias cinéticas. El medio está en contacto con la célula por toda su superficie, la provista de microvellosidades y la desprovista, lo que es sin duda un serio factor de complejidad dadas sus distintas propiedades funcionales ²⁰².

También se han visto muy pocas diferencias entre la acumulación de D-xilosa en presencia de Na⁺ o de Li⁺ ¹⁹⁰.

El sistema de transporte de fructuosa. Numerosos estudios han mostrado que la D-fructuosa se absorbe rápidamente por el intestino en diversas especies ^{16, 229, 230}, aunque a menor velocidad que la D-glucosa o D-galactosa. Nunca se había revelado transporte activo de fructosa. En ileón de conejo se ha podido medir el flujo unidireccional de entrada de

fructosa en tiempos de 1 minuto o menos que no dan lugar a su transformación metabólica en las células ¹⁹⁰ y se ha visto que esta entrada es una función saturable con la concentración, sigue la cinética de Michaelis con K_T algo alta (18 mM), no se aprecia competencia por adición de glucosa, y se inhibe un poco por L-sorbosa. En ausencia de Na⁺ o por adición de floricina no hay inhibición. La entrada de fructosa parece así estar facilitada por un sistema de transporte, bastante específico para dicho azúcar, distinto del que utilizan la glucosa y otros azúcares, independiente del Na⁺ y no sensible a la floricina.

De otra parte, en ratas, en determinadas condiciones experimentales, Gracey y al. ^{104, 105} han informado que la fructosa podía acumularse contra gradiente mediante un sistema de transporte dependiente de energía y de Na⁺, con K_T baja (0,9 mM), no afectado por la floricina 10⁻⁴ M, inhibible por la sorbosa pero muy poco inhibido por D-glucosa u otros azúcares de su grupo, que parece por tanto distinto del sistema de transporte que utilizan estos últimos.

La situación es así conflictiva respecto de la dependencia del Na⁺, quizás por ser especies animales distintas.

La dependencia del Na⁺ in vivo. Förster ^{91, 93-95} en animales hechos hiperglucémicos por administración de glucosa endovenosa hasta niveles del orden de 70 mM (12,6 g/l) ha estudiado *in vivo* la absorción intestinal de glucosa a concentración próxima a 30 mM, que está dentro del margen de la K_T para experimentos *in vivo*. En estas condiciones pudieron observar absorción contra gradiente, que no se influía por la sustitución del Na⁺ en luz; en ausencia de Na⁺ en el medio de perfusión se segrega Na⁺ hasta niveles de 10-20 meq/l, inferiores al que supone haya en las células, por lo que considera que la entrada del azúcar se hace en tal caso no a favor sino en contra del gradiente de

Na⁺. Si la perfusión se hacía con solución de solo glucosa 27,8 mM, hiposmótica, se producía salida neta de azúcar y de Na⁺ hacia la luz del intestino, llegando a quedar el catión a niveles de 40-50 meq/l similares a las intracelulares. Para el transporte activo de glucosa en esos experimentos la presión osmótica en la luz del intestino parece más importante que la concentración de Na⁺. Resultados similares han sido obtenidos *in vitro*, con preparados en los que se conserva la circulación sanguínea del intestino^{92, 93}.

Estos experimentos *in vivo* se han hecho no obstante en condiciones poco fisiológicas, con hiperglucemias elevadísimas que pueden provocar las más diversas reacciones del organismo.

En ileón humano *in vivo*¹⁷⁵ la absorción de glucosa en presencia de 50 meq Na/l se satura con concentraciones del orden de 85 mM y presenta una K_T próxima a 15 mM. La absorción del azúcar desde soluciones de concentración inferior a la de la sangre y con 140 meq de Na⁺ difiere poco de la que se observa sin Na⁺ (sustituido por manitol). En diabéticos con glucosa plasmática 20-30 mM, la perfusión de soluciones de glucosa 15 mM tampoco se modificaba significativamente por la supresión de Na⁺. En rata, también *in vivo*, con períodos de absorción de 50 minutos y con manitol o ClK como sustituyentes, no encontraron diferencias entre el azúcar absorbido en presencia de 75 meq de Na⁺/l y en ausencia del ión, alcanzándose en este último caso niveles de unos 10 meq/l por salida hacia la luz.

Todos estos resultados *in vivo* son difícilmente conciliables con la clara dependencia que pudimos demostrar en rata entre la absorción de galactosa¹³³ o de glucosa 2,77 mM¹⁵⁷ y la concentración de Na⁺ en la luz del intestino, sustituido este ión por sorbitol o manitol. Quizás la explicación pueda estar en que *in vivo* la cinética de la absorción es mucho más

compleja y difícil de formular, influyendo mucho en el signo de los resultados las condiciones experimentales, la concentración del azúcar, el tiempo de absorción, el sustituyente empleado, etc. Nuevos experimentos en rata con diferentes sustituyentes del Na⁺ y con glucosa 2,77 mM, aproximadamente mitad del nivel glucémico, han vuelto a mostrar la dependencia del Na⁺, si bien el grado de inhibición por falta de Na⁺ depende de la naturaleza del sustituyente y aumenta según la serie Tris <K⁺ <Li⁺ ≤ manitol¹⁵⁸. Haciendo períodos sucesivos de absorción se pudo observar que después de una absorción de 20 minutos en ausencia de Na⁺, al volver en el siguiente período a Na⁺ 154 mM se mejora la capacidad de absorción sin que se recupere el valor normal^{63, 157} dependiendo mucho esta recuperación del sustituyente del Na⁺ que se ha utilizado. La recuperación se alcanza progresivamente y es mejor cuando se ha utilizado Tris que con K⁺, Li⁺ o manitol¹⁵⁸. Se deduce que además del efecto producido por la ausencia de Na⁺, la naturaleza del sustituyente empleado en su lugar influye también de algún modo en el transporte activo del azúcar.

En todo caso parece cierto que *in vivo* la dependencia del Na⁺ es menos aparente que en los experimentos *in vitro*. La explicación de que *in vivo* hay secreción de Na⁺ a la luz que puede compensar la ausencia de Na⁺ en el líquido de perfusión en intestino de perro⁸⁹ no parece aplicable a la rata¹⁵⁷. Otros motivos podrían ser la diferente motilidad, oxigenación, disposición de las vellosidades, capa protectora glicoproteica, etc. No hay por ahora bastante fundamento para la sugerencia de Förster⁹¹ de que haya un proceso de transporte de azúcares, único importante *in vivo*, con K_T unas diez veces mayores que el estudiado *in vitro*. También requiere confirmación el dato de que *in vivo*, durante la absorción intestinal de glucosa (rata) la con-

centración intracelular sea inferior a la del suero sanguíneo⁸⁵.

Interferencia de efectos metabólicos provocados por la ausencia de Na⁺. Diversas observaciones y entre ellas la que se acaba de referir de limitada reversibilidad de la absorción de azúcares *in vivo* después de un período de absorción en ausencia de Na⁺^{133, 154, 157}, hacía pensar en que el metabolismo del tejido quedara alterado por incubación o perfusión sin Na⁺. Pudo comprobarse que el consumo de O₂ por mucosa o tiras de yeyuno en ausencia de sustrato exterior metabolizable disminuye al reemplazar progresivamente el Na⁺ por manitol o Li⁺, siendo siempre algo mayor la inhibición por manitol que por Li⁺¹⁴. La ausencia de Na⁺ conduce a que se extinga el consumo de O₂ a las 3 ó 4 horas. Después de 30 minutos en ausencia de Na⁺, la respiración del tejido en medios con niveles normales de Na⁺ sigue algo disminuida²¹¹. La adición de glucosa o fructosa al medio sin Na⁺ estimula el consumo de O₂ del tejido pero en grado mucho menor que cuando hay Na⁺. La ouabaina a concentraciones altas sólo inhibe el consumo de O₂ si hay Na⁺ en el medio, haya o no azúcar metabolizable, y la máxima inhibición observada es muy inferior a la que se obtiene sustituyendo el Na⁺ por manitol. Todos estos resultados muestran muy claramente que la supresión de Na⁺ inhibe el consumo de oxígeno no solo por el cese del bombeo de Na⁺ o por disminuir la disponibilidad de sustrato exterior, sino que también induce a perturbaciones duraderas del metabolismo del tejido²¹¹. Esta última conclusión quedó avalada por experimentos practicados después de preincubación de tiras o anillos de yeyuno de rata en ausencia de Na⁺, sustituido por manitol, durante una hora. El consumo de O₂ posterior en medio con Na⁺ seguía disminuido y si había glucosa exterior, se observaba inhibición del consumo de O₂ y de la utilización de

glucosa, con aumento de la relación de lactato producido a glucosa metabolizada¹¹⁸.

Estos efectos metabólicos provocados por la sustitución del Na⁺ han de ser tenidos en cuenta al considerar los resultados sobre la dependencia del Na⁺ del transporte de no electrolitos, en especial, si el sustituyente es manitol y si los experimentos son de cierta duración. No pretenden invalidar la hipótesis del gradiente de Na⁺, en muchos casos avalada por la medida de flujos unidireccionales de sustrato en tiempos muy cortos, sino insistir en los múltiples factores que entran en juego en las diversas situaciones experimentales y llamar la atención a diferencias que pueden observarse según los sustituyentes que se utilicen en lugar de Na⁺. Algunos experimentos en que se estudia el transporte de azúcares en función de diferencias de Na⁺ intracelular provocadas por preincubación en medio sin Na⁺^{164, 201} están muy probablemente afectados por alteraciones metabólicas.

LA INTERACCIÓN DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE AZÚCARES CON EL IÓN Na⁺ A NIVEL MOLECULAR

La mayoría de los investigadores suponen que el sistema de transporte intestinal de azúcares más común, dependiente del Na⁺, está constituido por un portador situado en la membrana, que puede desplazarse en ambas direcciones a través de la barrera a la difusión. Las moléculas de portador (x), en número limitado por unidad de área de membrana, deben poseer un lugar al que pueden fijarse la glucosa, galactosa u otros azúcares y derivados análogos (S) que comparten el mismo sistema de transporte, y otro lugar distinto para el Na⁺. La fijación del Na⁺, antes o después de la unión con el azúcar, implica probablemente cambios conformacionales en la

molécula del portador que facilitan la formación del complejo ternario Na-X-S o lo estabilizan, o permiten su translocación a través de la membrana.

Hasta el momento no se ha identificado el posible portador de la membrana del borde en cepillo, aunque se ha avanzado mucho en la obtención del correspondiente material membranoso y en el aislamiento de proteínas que muestran propiedades interesantes en relación con posibles funciones de transporte^{81, 86, 137, 200}. La subunidad protéica con actividad disacaridasa aislada por Semenza²¹⁴ implicada muy probablemente en el sistema de transporte de glucosa derivada de hidrólisis de disacárido, tiene propiedades distintas de las requeridas para el transporte de azúcares libres dependiente de Na⁺.

Los cambios conformacionales de la molécula portadora inducidos por el Na⁺ deben de ser del tipo de los que se dan en el fenómeno de modificación o alosterismo enzimático^{3, 49-51, 96, 116, 140, 183, 198}, modificando la afinidad del portador para el sustrato azúcar, o haciendo posible o más fácil la traslocación del complejo ternario a través de la membrana. En este último sentido habla el hecho de que la floricina^{9, 213} y la L-fucosa⁴¹ se muestren inhibidores competitivos enérgicos de la entrada de azúcar, con notable afinidad por tanto por el lugar de fijación y no son en cambio capaces de entrar en las células en proporción detectable, como si al unirse al portador se obtuviera una conformación molecular incapaz de transporte.

En el caso del transporte de aminoácidos por el borde en cepillo del ileon de conejo, algunos resultados sugieren que el Na⁺ podría establecer interacción con algún grupo carboxilo del portador y también se han analizado diversos factores de la molécula del sustrato que influyen en su interacción con el sistema de transporte^{97, 99, 141, 183, 186, 192}.

Para el sistema de transporte de glucosa y análogos, Barnett y al.¹⁶⁻¹⁹ han revisado los requisitos mínimos estructurales para su transporte activo a partir de los establecidos por Crane⁴⁶ y Wilson²²⁸ sugiriendo que la molécula de sustrato en forma piranósica con conformación en silla debe quedar fijada al lugar específico de la proteína portadora mediante varios enlaces de hidrógeno a nivel de los carbonos 1, 3, 4 y 6 y de un enlace covalente entre el OH del carbono 2 y muy probablemente un grupo carboxilo de la proteína, siendo mucho más importante por este motivo para la especificidad del proceso el hidroxilo en C-2 que los demás. La influencia del Na⁺ podría explicarse por algún cambio conformacional que facilitara la formación del enlace covalente en C-2. Este último puede establecerse y disociarse sin perder ni intercambiar la molécula de azúcar el átomo de oxígeno del C-2, tal como parece exigido por antiguas observaciones⁵⁴.

Algunos casos de malabsorción de glucosa y galactosa, debidos a defecto genético del correspondiente sistema de transporte, abren nuevos caminos para la identificación del portador¹⁸⁰.

INTERACCIONES RECÍPROCAS ENTRE DISTINTOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DEPENDIENTES DEL Na⁺

Buen número de investigaciones revelan que algunos azúcares activamente transportables producen inhibiciones del transporte activo de aminoácidos por el intestino y también que algunos aminoácidos inhiben el transporte activo de azúcares^{46, 186}. Estas interacciones se dan en general entre sustratos que utilizan sistemas de transporte dependientes del Na⁺, aunque algunos resultados no respondan adecuadamente a esta afirmación. Estas inhibiciones recíprocas se han observado con distintas especies animales y en dife-

rentes condiciones experimentales, presentando propiedades poco definidas que se prestan a diversas interpretaciones. Hay general acuerdo en que dadas las diferencias entre ambos grupos de sustratos no puede pensarse en competencia por un mismo lugar de fijación al portador, sino en alguna otra causa.

Algunos motivos de discrepancia pueden atribuirse¹⁹⁹ a diferencias de especie animal, a las implicaciones energéticas de que los sustratos sean o no metabolizables por la mucosa, a influencias del flujo de agua inducido por algunos sustratos, al tipo de preparación empleada, etc.

Para interpretar las interacciones se han propuesto diversas hipótesis: El grupo de Smyth^{33, 76, 148, 176, 209} ha sugerido que el transporte activo de azúcares y el de aminoácidos compiten por una misma fuente de energía, con lo que si los sustratos no son muy fácilmente metabolizables el transporte activo de un grupo disminuye la energía disponible para el otro. También piensa así Kimmich¹²³.

Otra hipótesis, de conformidad con la del gradiente iónico, lo explica por el hecho de que la entrada de Na⁺ por cotransporte con un sustrato estimula el flujo de salida del sustrato del otro grupo^{71, 162}. La ouabaina o diversos inhibidores metabólicos, que hacen disminuir el gradiente iónico, hacen desaparecer estas inhibiciones recíprocas⁹⁸.

Por último, se ha sugerido un efecto recíproco del tipo de la inhibición alostérica entre los dos grupos de sustratos por estar dispuestos los lugares de fijación para unos y otros y para el Na⁺ en un mismo portador polifuncional^{3-8, 170}.

Para cualquiera de esas hipótesis hay datos experimentales a favor y otros en contra^{186, 199}. Se han de tener mucho más en cuenta las diferentes condiciones de trabajo de unos y otros resultados. No obstante, la hipótesis relacionada con el

gradiente iónico quizás resulta más probable. Se ha de tener en cuenta que la limitación de energía metabólica afecta al bombeo de Na⁺ y por tanto al gradiente iónico, con lo que la inhibición de un transporte activo por otro podría explicarse por no poder expulsar a suficiente ritmo todo el Na⁺ que entra. Además, las circunstancias locales de la región del borde en cepillo hacen posible que el Na⁺ que entra con un sustrato no difunda fácilmente por todo el cuerpo celular sino que alcance en la región de las microvellosidades concentraciones que aumentan el flujo de salida de cualquier sustrato^{199, 201}, factor que puede determinar atenuaciones del gradiente de Na⁺ y K⁺ a través de la membrana de las microvellosidades mucho mayores de lo que se piensa.

Algunos experimentos sobre este tipo de interacciones en yeyuno de rata *in vitro* reflejan que esta preparación tiene menos posibilidades de disponer de energía a partir de fuentes endógenas que las que ofrecen preparaciones de intestino delgado de otros animales^{83, 84}. A esta misma limitación se han atribuido algunas faltas de correlación entre el transporte neto de Na⁺ por adición de azúcares no metabolizables y el aumento del potencial transmucosal²¹⁶ ya que el bombeo adicional de Na⁺ correspondiente a la mayor entrada de catión por cotransporte con el azúcar requiere energía. No obstante, la actividad electrogénica en el intestino es compleja²³ y requiere mejor información.

LA HIPÓTESIS DE TRANSDUCCIÓN DE ENERGÍA, COMÚN A VARIOS SISTEMAS DE TRANSPORTE, MEDIADO POR EL SISTEMA ATPasa ACTIVADO POR Na⁺ Y K⁺

Muy recientemente Kimmich¹²¹ ha propuesto una hipótesis como alternativa a la hipótesis del gradiente iónico. Hace uso de los nuevos conocimientos^{100, 160}

acerca del sistema ATPasa activada por Na^+ y K^+ que, como hemos dicho, se encuentra en el material membranoso del borde en cepillo, sistema que sería capaz de realizar la transducción de energía metabólica en servicio de los sistemas de transporte activo de iones, azúcares, amino ácidos, etc., en la membrana mucosal.

Esta enzima E puede fosforilarse en presencia de Na^+ intracelular con consumo de ATP, dando lugar a dos productos intermediarios $\text{E}_1\text{-P}$ y $\text{E}_2\text{-P}$, que se descargan en presencia de K^+ extracelular¹⁰⁰. La energía contenida en $\text{E}_2\text{-P}$ sería acoplada a diversos componentes de la membrana que se utilizarían para el transporte activo específico de acumulación de K^+ , de azúcar, de aminoácidos etc. A la vez, algunos de estos sistemas de transporte pueden estar influidos directamente por el Na^+ como parece evidente en el caso de los azúcares y aminoácidos. La asimetría funcional determinante del transporte activo requiere la energización directa desde $\text{E}_2\text{-P}$ y tanto este proceso como el ión Na^+ pueden afectar a la movilidad del complejo ternario, o a la afinidad por el sustrato.

Según esta hipótesis, la dependencia del Na^+ deriva de que este catión es imprescindible para que se formen $\text{E}_1\text{-P}$ y $\text{E}_2\text{-P}$. La inhibición por el K^+ se explica porque descarga $\text{E}_2\text{-P}$ y resta así energía para el transporte de azúcares. Las interacciones inhibitorias entre los sistemas de transporte de azúcares y aminoácidos serían debidas a que ambos compiten por la utilización de $\text{E}_2\text{-P}$, efecto que dependerá del estado energético del tejido. Como el mismo sistema es responsable del establecimiento de gradientes iónicos y del transporte de no electrolitos, se comprende que haya normalmente correlación entre ellos, pero sin que el último dependa directamente de tales gradientes. El transporte de azúcar puede llevar consigo entrada de Na^+

e interferir con la disponibilidad de energía para el bombeo de Na^+ por el borde en cepillo, lo que aumentará el potencial transmural. La inhibición por ouabaina y por otros inhibidores del transporte de Na^+ se ejercería sobre el sistema ATPasa disminuyendo las existencias de $\text{E}_2\text{-P}$ y con ello la energía para el transporte de no electrolitos; para soslayar la dificultad de que la ouabaina solo es eficaz en el lado serosal, supone que entre en la célula y llegue a la membrana mucosal por su cara interna¹²⁸.

La hipótesis tiene aspectos atrayentes, pero plantea asimismo buen número de interrogantes que requieren mayor base experimental.

CONCLUSIÓN

No hay duda de que el sistema de transporte de monosacáridos libres es *in vitro* e *in vivo* dependiente del Na^+ , aun cuando en las condiciones más fisiológicas *in vivo* la dependencia es menos aparente, entre otras cosas porque siempre hay aporte de Na^+ endógeno y cierto paso de este catión a la luz del intestino que impide su falta absoluta.

Es muy probable que una parte de la glucosa liberada de la membrana por hidrólisis de disacáridos se haga por un sistema de transporte no dependiente del Na^+ .

La relación del Na^+ al sistema de transporte de azúcares parece implicar cotransporte de Na^+ y azúcar mediante la formación de un complejo ternario con un portador en la membrana del borde en cepillo, que influye en los potenciales eléctricos del epitelio.

Hay muchos argumentos y datos experimentales en favor de que el transporte activo de azúcares sea indirecto, dependiente de los gradientes iónicos transmembrana conseguidos por el bombeo de Na^+ y K^+ (hipótesis del gradiente). Es-

tos gradientes pueden influir en la afinidad del portador por el sustrato, en la velocidad de translocación o en ambos factores a la vez, determinando el transporte activo del azúcar en el mismo sentido que el gradiente de Na⁺ y en sentido opuesto al del K⁺. No obstante hay también datos que no parecen compatibles con estas ideas, tanto por insuficiencia energética de los gradientes de potencial electroquímico de los iones, como por algunos comportamientos cinéticos contrarios a la hipótesis. Se precisa más información experimental, en particular sobre las actividades reales de iones y sustratos a uno y otro lado de la membrana celular, para decidir su vali-

dez. De otra parte, la ausencia de Na⁺ en experimentos de cierta duración afecta al metabolismo del tejido y el efecto de la supresión del Na⁺ viene complicado por no ser indiferente la naturaleza del sustituyente que se utilice.

Aun cuando buena parte de la energía que hace posible la acumulación de azúcar parece derivarse de los gradientes iónicos conseguidos por la bomba de Na⁺, por el momento no puede descartarse la posibilidad de un acoplamiento directo de energía al transporte activo de azúcares, quizá con participación de la ATPasa de la membrana mucosa, a su vez influida por las concentraciones catiónicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALVARADO, F. *Experientia*, 20: 1, 1964.
2. ALVARADO, F. *Biochim. Biophys. Acta*, 109: 478, 1965.
3. ALVARADO, F. *Science*, 151: 1010, 1966.
4. ALVARADO, F. *Nature*, 219: 276, 1968.
5. ALVARADO, F. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 23: 824, 1970.
6. ALVARADO, F. *Bol. Soc. esp. Hist. Nat.*, 68: 33, 1970.
7. ALVARADO, F. En "Intestinal Transport of Electrolytes, Amino Acids and Sugars" (W. Mc. D. ARMSTRONG & A.S. NUNN), Thomas Co., Springfield, Ill., 1970, p. 281.
8. ALVARADO, F. En "Na-linked Transport of Organic Solutes" (E. HEINZ, Ed.) Springer-Verlag, Berlín, 1972, p. 147.
9. ALVARADO, F. y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 93: 116, 1964.
10. ANNEGERS, J. H. *Proc. Soc. exp'l. Biol. Med.*, 116: 933, 1964.
11. ARMSTRONG, W. Mc. D., D. L. MUSSELMAN y H. C. REITZUG. *Am. J. Physiol.*, 219: 1023, 1970.
12. BAILLIEN, M. y E. SCHOFFENIELS. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 70: 140, 1962.
13. BAILLIEN, M. y E. SCHOFFENIELS. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 71: 286, 1963.
14. BALASCH, J., A. STAMPA y F. PONZ. *Rev. esp. Fisiol.*, 21: 65, 1965.
15. BARBER, A., F. PONZ y R. JORDANA. *XI Jornad. Bioquim. Lat.*, 1973 (a 27).
16. BARNETT, J. E. G., W. T. S. JARVIS y K. A. MUNDAY. *Biochem. J.*, 109: 61, 1968.
17. BARNETT, J. E. G. y K. A. MUNDAY. En "Transport Across the Intestine. A Glaxo Symposium" (W. L. BURLAND y P. SAMUEL, Ed. s.), Churchill Livingstone, Londres, 1972, p. 111.
18. BARNETT, J. E. G., A. RALPH y K. A. MUNDAY. *Biochem. J.*, 114: 569, 1969.
19. BARNETT, J. E. G., A. RALPH y K. A. MUNDAY. *Biochem. J.*, 118: 843, 1970.
20. BARRY, R. J. C., S. DIKSTEIN, J. MATTHEWS, D. H. SMYTH y E. M. WRIGHT. *J. Physiol.*, 171: 316, 1964.
21. BARRY, R. J. C. y J. EGGENTON. *J. Physiol.*, 227: 201, 1972.
22. BARRY, R. J. C. y J. EGGENTON. *J. Physiol.*, 227: 217, 1972.
23. BARRY, R. J. C., J. EGGENTON y D. H. SMYTH. *J. Physiol.*, 204: 299, 1969.
24. BARRY, R. J. C., J. MATTHEWS, D. H. SMYTH y E. M. WRIGHT. *J. Physiol.*, 161: 17, 1962.
25. BARRY, R. J. C., D. H. SMYTH y J. F. UDE. *Life Sci.*, 8: 131, 1969.
26. BERG, G. G. y B. CHAPMAN. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 65: 361, 1965.
27. BERG, G. G. y J. SZEKERCZES. *J. Cell Physiol.*, 67: 487, 1966.
28. BIHLER, I. *Biochim. Biophys. Acta*, 183: 169, 1969.
29. BIHLER, I. y S. ADAMIC. *Biochim. Biophys. Acta*, 135: 466, 1967.

30. BIHLER, I. y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 59: 78, 1962.
31. BIHLER, I., K. A. HAWKINS y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 59: 94, 1962.
32. BINDER, H. J., L. A. KATZ, R. P. SPENCER y H. M. SPIRO. *J. Clin. Invest.*, 45: 1854, 1966.
33. BINGHAM, J. K., H. NEWEY y D. H. SMYTH. *Biochim. Biophys. Acta*, 130: 281, 1966.
34. BOSACKOVÁ, J. y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 102: 423, 1965.
35. BOSACKOVÁ, J. y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 102: 436, 1965.
36. BROWN, M. M. y D. S. PARSONS. *Biochim. Biophys. Acta*, 59: 249, 1962.
37. BUDOLFSEN, S. E. *Acta Physiol. Scand.*, 32: 148, 1954.
38. CAPRARO, V., A. BIANCHI y C. LIPPE. *Experientia*, 19: 1, 1963.
39. CAPRARO, V., A. BIANCHI y C. LIPPE. *Arch. Sci. Biol.*, 47: 238, 1963.
40. CASPARY, W. F. En "Na-linked Transport of Organic Solutes" (E. HEINZ, Ed.) Springer-Verlag, Berlín, 1972, p. 99.
41. CASPARY, W. F., N. R. STEVENSON y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 193: 168, 1969.
42. CLARKSON, T. W., A. C. CROSS y S. TOOLE. *Nature*, 191: 501, 1961.
43. COHEN, L. L. y K. G. HUANG. *Am. J. Physiol.*, 206: 647, 1964.
44. COPE, F. W. *J. Gen. Physiol.*, 50: 1353, 1967.
45. COPE, F. W. *Biophys. J.*, 10: 843, 1970.
46. CRANE, R. K. *Physiol. Revs.*, 40: 789, 1960.
47. CRANE, R. K. *Fed. Proc.*, 21: 891, 1962.
48. CRANE, R. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17: 481, 1964.
49. CRANE, R. K. *Fed. Proc.*, 24: 1000, 1965.
50. CRANE, R. K. En "Intracellular Transport" (K. B. WARREN, Ed.), Academic, N. York, 1966, p. 71.
51. CRANE, R. K. En "Handbook of Physiology" Sect. 6: Alimentary Canal. Vol. III, p. 1323. *Amer. Physiol. Soc.*, Washington, 1968.
52. CRANE, R. K. En "Biochemische und Klinische Aspekte der Zuckerresorption" (K. ROMMEL, Ed.), F. K. Schattner Verlag, Stuttgart, 1970, p. 75.
53. CRANE, R. K., G. FORSTNER y A. EICHHOLZ. *Biochim. Biophys. Acta*, 109: 467, 1965.
54. CRANE, R. K. y S. M. KRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 31: 397, 1959.
55. CRANE, R. K., D. MILLER y I. BIHLER. En "Membrane Transport and Metabolism" (A. KLEINZELLER y A. KOTYK, Eds.), Academic Press, New York, 1961, p. 439.
56. CSAKY, T. Z. *Am. J. Physiol.*, 201: 999, 1961.
57. CSAKY, T. Z. *Fed. Proc.*, 22: 3, 1963.
58. CSAKY, T. Z. *Biochim. Biophys. Acta*, 74: 160, 1963.
59. CSAKY, T. Z. y Y. HARA. *Am. J. Physiol.*, 209: 467, 1965.
60. CSAKY, T. Z., H. G. HARTZOG, III. y G. W. FERNALD. *Am. J. Physiol.*, 200: 459, 1961.
61. CSAKY, T. Z. y B. M. RIGOR. *Life Sci.*, 3: 931, 1964.
62. CSAKY, T. Z. y M. THALE. *J. Physiol.*, 151: 59, 1960.
63. CSAKY, T. Z. y L. ZOLLICOFFER. *J. Physiol.*, 198: 1056, 1960.
64. CURRAN, P. F. *J. Gen. Physiol.*, 43: 1137, 1960.
65. CURRAN, P. F. *Fed. Proc.*, 24: 993, 1965.
66. CURRAN, P. F. y S. G. SCHULTZ. En "Handbook of Physiology" Sect. 6: Alimentary Canal, Vol. III, p. 1217. *Amer. Physiol. Soc.*, Washington, 1968.
67. CURRAN, P. F., S. G. SCHULTZ, R. A. CHEZ y R. E. FUISZ. *J. Gen. Physiol.*, 50: 1261, 1967.
68. CURRAN, P. F. y A. K. SOLOMON. *J. Gen. Physiol.*, 41: 143, 1957.
69. CHEZ, R. A., E. O. HORGER y S. G. SCHULTZ. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 168: 1, 1969.
70. CHEZ, R. A., R. R. PALMER, S. G. SCHULTZ y P. F. CURRAN. *J. Gen. Physiol.*, 50: 2357, 1967.
71. CHEZ, R. A., S. G. SCHULTZ y P. F. CURRAN. *Science*, 153: 1012, 1966.
72. CHRISTENSEN, H. N. *Advan. Protein Chem.*, 15: 239, 1960.
73. CHRISTENSEN, H. N. y T. R. RIGGS. *J. Biol. Chem.*, 194: 57, 1952.
74. CHRISTENSEN, H. N., T. R. RIGGS, H. FISCHER y I. M. PALATINE. *J. Biol. Chem.*, 198: 1, 1952.
75. CHRISTENSEN, H. N., T. R. RIGGS y N. E. RAY. *J. Biol. Chem.*, 194: 41, 1952.
76. DIEDRICH, D. F. y L. ANDERSON. *Biochim. Biophys. Acta*, 45: 490, 1960.
77. DUGGAN, D. E. y R. M. NOLL. *Arch. Biochem. Biophys.*, 109: 388, 1965.
78. EDDY, A. A. *Biochem. J.*, 108: 489, 1968.
79. EDDY, A. A., M. F. MULCAHY y P. J. THOMSON. *Biochem. J.*, 103: 863, 1967.
80. EICHHOLZ, A., CRANE, R. K. *Fed. Proc.*, 25: 656, 1966.
81. EICHHOLZ, A., K. E. HOWELL y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 193: 179, 1969.

82. ESPOSITO, G., A. FAELLI y V. CAPRARO. *Experientia*, 20: 1, 1964.
83. ESPOSITO, G., A. FAELLI y V. CAPRARO. *Experientia*, 20: 122, 1964.
84. ESPOSITO, G., A. FAELLI y V. CAPRARO. *Arch. Sci. Biol.*, 48: 341, 1964.
85. ESPOSITO, G., A. FAELLI y V. CAPRARO. *Experientia*, 28: 1182, 1972.
86. FAUST, R. G., M. G. LEADBETTER, R. K. PLENGE y A. J. McCASLIN. *J. Gen. Physiol.*, 52: 482, 1968.
87. FIELD, M., D. FROMM y I. McCOLL. *Am. J. Physiol.*, 220: 1388, 1971.
88. FIELD, M., S. G. SCHULTZ y P. F. CURRAN. *Biochim. Biophys. Acta*, 135: 236, 1967.
89. FLESHER, B. y R. A. NELSON. *Gut*, 11: 240, 1970.
90. FORDTRAN, J. S., F. C. RECTOR, JR. y N. W. CARTER. *J. Clin. Invest.*, 47: 884, 1968.
91. FÖRSTER, H. En "Na-linked Transport of Organic Solutes" (E. HEINZ, Ed.), Springer-Verlag, Berlín, 1972, p. 134.
92. FÖRSTER, H. y I. HOOS. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 351: 1302, 1970.
93. FÖRSTER, H. y I. HOOS. *Ist. Europ. Biophysics Cong.*, E. VIII/30, 1971.
94. FÖRSTER, H., W. KAISER y H. MEHNERT. *Klin. Wschr.*, 43: 844, 1965.
95. FÖRSTER, H. y B. MENZEL. *Z. Ernährungswiss.*, 11: 10, 1972.
96. FRIEDEN, C. *J. Biol. Chem.*, 239: 3522, 1965.
97. FRIZZELL, R. A. y S. G. SCHULTZ. *J. Gen. Physiol.*, 56: 462, 1970.
98. FRIZZELL, R. A. y S. G. SCHULTZ. *Biochim. Biophys. Acta*, 233: 485, 1971.
99. FRIZZELL, R. A. y S. G. SCHULTZ. *J. Gen. Physiol.*, 57: 318, 1972.
100. FUJITA, M., H. MATSUI, K. NAGANO y M. NAGANO. *Biochim. Biophys. Acta*, 233: 404, 1971.
101. GILLES-BAILLIEN, M. y E. SCHOFFENIELS. *Arch. Internat. Physiol. Biochem.*, 73: 355, 1965.
102. GLYNN, I. M. *Pharmacol. Rev.*, 16: 381, 1964.
103. GOLDNER, A. M., S. G. SCHULTZ y P. F. CURRAN. *J. Gen. Physiol.*, 53: 362, 1969.
104. GRACEY, M., V. BURKE y A. OSHIN. *Biochim. Biophys. Acta*, 266: 397, 1972.
105. GRACEY, M., V. BURKE y A. OSHIN. En "Transport Across the Intestine. A Glaxo Symposium" (W. L. BURLAND y P. SAMUEL, Eds.), Churchill Livingstone, Londres, 1972, p. 99.
106. GRAY, G. M. y F. J. INGELFINGER. *J. Clin. Invest.*, 45: 388, 1965.
107. GREEN, K., B. SESHADRI y A. J. MATTY. *Nature*, 196: 1322, 1962.
108. HAJJAR, J. J., A. S. LAMONT y P. F. CURRAN. *J. Gen. Physiol.*, 55: 277, 1970.
109. HEATON, J. W., JR. y C. F. CODE. *Am. J. Physiol.*, 216: 749, 1969.
110. HEINZ, E. En "Na-linked Transport of Organic Solutes" (E. HEINZ, Ed.), Springer-Verlag, Berlín, 1972, p. 15.
111. HEINZ, E., P. GECK y W. WILBRAND. *Biochim. Biophys. Acta*, 255: 442, 1972.
112. HENDLEY, E. y D. H. SMYTH. *J. Physiol.*, 139: 27, 1957.
113. HÖBER, R. En "Physikalische Chemie der Zellen und der Gewebe", Leipzig, 1906.
114. HOLDSWORTH, C. D. y A. M. DAWSON. *Clin. Sci.*, 27: 371, 1964.
115. INGRAHAM, R. C. y M. B. VISSCHER. *Am. J. Physiol.*, 121: 771, 1938.
116. JARDETZKY, O. *Science*, 211: 969, 1966.
117. JORDANA, R. y C. IGEA. *Rev. esp. Fisiol.*, 27: 155, 1971.
118. JORDANA, R. y F. PONZ. *Rev. esp. Fisiol.*, 25: 225, 1969.
119. KIMMICH, G. A. *Biochem.*, 9: 3669, 1970.
120. KIMMICH, G. A. En "Na-linked Transport of Organic Solutes" (E. HEINZ, Ed.), Springer-Verlag, Berlín, 1972, p. 116.
121. KIMMICH, G. A. *Biochim. Biophys. Acta*, 300: 31, 1973.
122. KIMMICH, G. A. y J. RANGLES. *J. Membrane Biol.* (in press).
123. KIMMICH, G. A. y J. RANGLES. *J. Membrane Biol.* (in press).
124. KLEINZELLER, A., J. KOLINSKA y I. BENES. *Biochem. J.*, 104: 843, 1967.
125. KLEINZELLER, A. y A. KOTYK. *Biochim. Biophys. Acta*, 54: 367, 1961.
126. LARRALDE, J., J. BELLO y P. FERNÁNDEZ-OTERO. *Rev. esp. Fisiol.*, 18: 127, 1962.
127. LAUTERBACH, F. *Biochim. Biophys. Acta*, 135: 256, 1967.
128. LAUTERBACH, F. *Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem.*, 323: 7, 1972.
129. LEE, C. O., W. MC. D. ARMSTRONG. *Science*, 175: 1261, 1972.
130. LEVISON, R. A. y H. P. SCHEDL. *Am. J. Physiol.*, 211: 939, 1966.
131. LYON, I. y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 112: 278, 1966.
132. LYON, I. y H. E. SHEERIN. *Biochim. Biophys. Acta*, 249: 1, 1971.
133. LLUCH, M. y F. PONZ. *Rev. esp. Fisiol.*, 19: 187, 1963.
134. LLUCH, M. y F. PONZ. *Rev. esp. Fisiol.*, 20: 185, 1964.
135. MCHARDY, G. J. R. y D. S. PARSONS. *Quart. J. Exptl. Physiol.*, 42: 33, 1957.
136. McLAUGHLIN, S. G. A. y J. A. M. HINKE. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 44: 837, 1966.

137. MALATTHI, P. y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 173: 245, 1969.
138. MILLER, D. y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 52: 281, 1961.
139. MILLER, D. y R. K. CRANE. *Biochim. Biophys. Acta*, 52: 293, 1961.
140. MONOD, J., J. R. WYMAN y J. P. CHANGUEUX. *J. Mol. Biol.*, 12: 88, 1965.
141. MUNCK, B. C. En "Transport Across the Intestine. A Glaxo Symposium". (W. L. BURLAND y P. SAMUEL, Eds.), Churchill Livingstone, Londres, 1972, p. 169.
142. MUNCK, B. G. *J. Physiol.*, 223: 699, 1972.
143. MUNCK, B. G. y S. G. SCHULTZ. *J. Gen. Physiol.*, 53: 157, 1969.
144. NADAL, J. *Publ. Centro Pir. Biol. Exper.*, 2: 201, 1968.
145. NADAL, J., J. PROUS y F. PONZ. *Rev. esp. Fisiol.*, 23: 241, 1967.
146. NATHANS, D., D. F. TAPLEY y J. E. ROSS. *Biochim. Biophys. Acta*, 41: 271, 1960.
147. NEWY, H., P. A. SANFORD y D. H. SMYTH. *J. Physiol.*, 168: 423, 1953.
148. NEWY, H. y D. H. SMYTH. *Nature*, 202: 400, 1964.
149. OLSEN, W. A. y F. J. INGELFINGER. *J. Clin. Invest.*, 47: 1133, 1968.
150. PARSONS, D. S. En "Handbook of Physiology", Sect. 6, Alimentary Canal. Vol. III, p. 1177. Amer. Physiol. Soc., Washington, 1968.
151. PARSONS, D. S. y J. S. PRITCHARD. *J. Physiol.*, 212: 299, 1971.
152. PIETRZY, K. C. y E. HEINZ. En "Na-linked transport of organic solutes" (E. HEINZ, Ed.), Springer-Verlag, Berlín, 1972, p. 84.
153. PONZ, F. *VI Jorn. Bioquim. Lat.*, Geneva, 1961.
154. PONZ, F. *Arq. Portug. Bioquim.*, 7: 93, 1963-64.
155. PONZ, F. *Mem. Real Acad. C. y Art. Barcelona*, 37: 109, 1965.
156. PONZ, F. y J. LARRALDE. *Rev. esp. Fisiol.*, 8: 71, 1952.
157. PONZ, F. y M. LLUCH. *Rev. esp. Fisiol.*, 20: 179, 1964.
158. PONZ, F. y M. LLUCH. *Rev. esp. Fisiol.*, 27: 369, 1971.
159. QUAY, J. F. y W. MC D. ARMSSTRONG. *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, 131: 46, 1969.
160. QUIGLEY, J. P. y G. S. GOTTERER. *Biochim. Biophys. Acta*, 255: 107, 1972.
161. RAMASWAMY, K., P. MALATHI y R. K. CRANE. *Fed. Proc.*, 30: 538 (abstr.), 1971.
162. READ, C. P. *Biol. Bull.*, 133: 630, 1967.
163. REID, E. W. *J. Physiol.*, 28: 241, 1902.
164. REISER, S. y P. A. CHRISTIANSEN. *Proc. Soc. exptl. Biol. & Med.*, 140: 362, 1972.
165. RIBÓ, J. M.^a y F. PONZ. *Rev. esp. Fisiol.*, 25: 257, 1969.
166. RIGGS, T. R., L. M. WALKER y H. N. CHRISTENSEN. *J. Biol. Chem.*, 233: 1497, 1958.
167. RIKLIS, E. y J. H. QUASTEL. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 36: 347, 1958.
168. ROBINSON, J. W. L. *J. Physiol.*, 206: 41, 1970.
169. ROBINSON, J. W. L. En "Na-linked Transport of Organic Solutes" (E. HEINZ, Ed.) Springer-Verlag, Berlín, 1972, p. 140.
170. ROBINSON, J. W. L. y F. ALVARADO. *Pflügers Arch.*, 326: 48, 1971.
171. ROSE, R. C. y S. G. SCHULTZ. *Biochim. Biophys. Acta*, 211: 376, 1970.
172. ROSE, R. C. y S. G. SCHULTZ. *J. Gen. Physiol.*, 59: 639, 1971.
173. RUEDAS, G. y C. WEISS. *Arch. Ges. Physiol.*, 298: 12, 1967.
174. RUMMEL, W. y H. F. STUPP. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 240: 79, 1960.
175. SALTZMAN, D. A., F. C. RECTON, Jr. y J. S. FORDTRAN. *J. Clin. Invest.*, 51: 876, 1972.
176. SAUNDERS, S. J. y K. J. ISSELBACHER. *Nature*, 205: 700, 1965.
177. SCHACHTER, D. y J. S. BRITTEN. *Fed. Proc.*, 20: 137, 1961.
178. SCHAFFER, J. A. En "Na-linked Transport of Organic Solutes" (E. HEINZ, Ed.), Springer-Verlag, Berlín, 1972, p. 68.
179. SCHEDL, H. P. y J. A. CLIFTON. *Nature*, 199: 1264, 1963.
180. SCHNEIDER, A. J., W. B. KINTER y C. E. STIRLING. *New Eng. J. Med.*, 274: 305, 1966.
181. SCHOFFENIELS, E. "Cellular aspects of Membrane Permeability". Pergamon Press, Oxford, 1967.
182. SCHULTZ, S. G. En "Biological Membranes" (R. M. DOWDEN, Ed.) J. & A. Churchill Ltd., London, 1969, p. 59.
183. SCHULTZ, S. G. En "The molecular basis of membrane function" (Ed. D. C. TOSTESTON), Englewood Cliffs, N. J., 1969, Prentice Hall, p. 401.
184. SCHULTZ, S. G. y P. F. CURRAN. En "Handbook of Physiology". Sect. 6, Alimentary Canal, Vol. III, pp. 1245. Amer. Physiol. Soc., Washington, 1968.
185. SCHULTZ, S. G. *J. Gen. Physiol.*, 59: 794, 1972.
186. SCHULTZ, S. G. y P. F. CURRAN. *Physiol. Rev.*, 50: 637, 1970.
187. SCHULTZ, S. G., P. F. CURRAN, R. A. CHEZ y R. E. FUISZ. *J. Gen. Physiol.*, 50: 1241, 1967.
188. SCHULTZ, S. G., R. E. FUISZ y P. F.

- CURRAN, J. *Gen. Physiol.*, 49: 849, 1966.
189. SCHULTZ, S. G., R. E. FUISZ y P. F. CURRAN. *J. Gen. Physiol.*, 53: 362, 1966.
190. SCHULTZ, S. G. y C. K. STRECKER. *Biochim. Biophys. Acta*, 211: 586, 1970.
191. SCHULTZ, S. G. y L. YU-TU. *Biochim. Biophys. Acta*, 196: 351, 1970.
192. SCHULTZ, S. G., L. YU-TU, O. O. ALVAREZ y P. F. CURRAN. *J. Gen. Physiol.*, 56: 621, 1970.
193. SCHULTZ, S. G. y R. ZALUSKY. *Biochim. Biophys. Acta*, 71: 503, 1963.
194. SCHULTZ, S. G. y R. ZALUSKY. *J. Gen. Physiol.*, 47: 567, 1964.
195. SCHULTZ, S. G. y R. ZALUSKY. *J. Gen. Physiol.*, 47: 1043, 1964.
196. SCHULTZ, S. G. y R. ZALUSKY. *Nature*, 204: 292, 1965.
197. SCHULTZ, S. G., R. ZALUSKY y A. E. GASS, Jr. *J. Gen. Physiol.*, 48: 375, 1964.
198. SEMENZA, G. *J. Theoret. Biol.*, 15: 145, 1967.
199. SEMENZA, G. En "Na-linked Transport of Organic Solutes" (Ed. E. HEINZ). Springer-Verlag, Berlín, 1972, p. 158.
200. SEMENZA, G. *FEBS Symposium*, 20: 117, 1970.
201. SEMENZA, G. *Biochim. Biophys. Acta*, 241: 637, 1971.
202. SEMENZA, G. En "Transport Across the Intestine. A Glaxo Symposium". (Ed. W. L. BURLAND & P. D. SAMUEL), Churchill Livingstone, London, 1972, p. 78.
203. SIEBERT, G., H. LANFENDORF, R. HANNOVER, D. NITZ-LITZOW, B. C. PRESSMAN y C. MOORE. *Z. Phys. Chem.*, 343: 101, 1965.
204. SJÖSTRAND, F. S. *J. Ultrastruct. Res.*, 8: 517, 1963.
205. SKOU, J. C. *Physiol. Rev.*, 45: 596, 1965.
206. SLADEN, G. E. y A. M. DAWSON. *Clin. Sci.*, 36: 49, 1969.
207. SMITH, M. W. *J. Physiol.*, 182: 559, 1966.
208. SMYTH, D. H. *Gut*, 10: 2, 1969.
209. SMYTH, D. H. En "Intestinal Transfer of Electrolytes, Amino Acids and Sugars" (Ed. W. Mc. D. ARMSTRONG & A. S. NUNN, Jr.). C. C. Thomas, Springfield, Ill. 1970.
210. SOLS, A. y F. PONZ. *Rev. esp. Fisiol.*, 3: 207, 1947.
211. STAMPA, A. y F. PONZ. *Rev. esp. Fisiol.*, 25: 69, 1969.
212. STEIN, W. D. "The Movement of Molecules Across Cell Membranes". Academic Press, New York, 1967, p. 177.
213. STIRLING, C. E. *J. Cell Biol.*, 35: 605, 1967.
214. STORELLI, C., H. VÖGELI y G. SEMEZA. *FEBS Letters*, 24: 287, 1972.
215. TAYLOR, C. B. *Biochim. Biophys. Acta*, 60: 437, 1962.
216. TAYLOR, A. E., E. M. WRIGTH, S. G. SCHULTZ y P. F. CURRAN. *Am. J. Physiol.*, 214: 836, 1968.
217. TRIER, J. S. En "Handbook of Physiology" Sect. 6, Alimentary Canal, Vol. III, p. 1125. Amer. Physiol. Soc., Washington, 1968.
218. USSING, H. H., P. FRUHOFFER, J. H. THAYSEN y N. A. THORN. En "The Alkali Metal Ions in Biology". Springer-Verlag, Berlín, 1960, p. 59.
219. USSING, H. H. y K. ZERAHN. *Acta Physiol. Scand.*, 23: 110, 1951.
220. VISSCHER, M. B., E. S. FETCHER, Jr., C. W. CARR, H. P. GREGOR, S. BUSHEY y D. E. BARKER. *Am. J. Physiol.*, 142: 550, 1944.
221. VISSCHER, M. B., R. H. VARCO, C. W. CARR y R. B. DEAN. *Am. J. Physiol.*, 141: 488, 1944.
222. VOGEL, G., F. LAUTERBACH y W. KROGER. *Arch. Ges. Physiol.*, 283: 151, 1965.
223. VOGEL, G., U. TERVOOREN y I. STOECKERT. *Arch. Ges. Physiol.*, 288: 359, 1966.
224. WASSERMAN, R. H. En "Gastrointestinal Radiation Injury" (Ed. M. F. SULLIVAN). Excerpta Medica Found., Amsterdam, 1968, p. 177.
225. WHITE, J. F. y W. Mc. D. ARMSTRONG. *Abstr. 14'h. Ann. Mtg. Biophys. Soc.*, Baltimore, 1970, p. 36a.
226. WHITE, J. F. y W. Mc. D. ARMSTRONG. *Am. J. Physiol.*, 221: 194, 1971.
227. WILBRANDT, W. y L. LASZT. *Biochem. Ztsch.*, 259: 398, 1933.
228. WILSON, T. H. "Intestinal Absorption", Saunders, Philadelphia, 1962.
229. WISEMAN, G. "Absorption from the Intestine". Academic Press, Londres, 1964.
230. WRIGHT, E. M. *J. Physiol.*, 185: 486, 1966.
231. ZADUNAISKY, J. A., J. F. GENNARO, Jr., N. BASHIRELAHI y M. HILTON. *J. Gen. Physiol.*, 51: 290s., 1968.

