

Instituto de Fisiología  
Facultad de Medicina - Madrid  
(Director: Prof. Dr. José María Corral)

## Berilio y absorción intestinal

por A. Sols\* y W. Dierksen

(Recibido para publicar el día 5 de junio de 1951)

Recientemente ha despertado interés la enérgica acción inhibidora de los iones de berilio sobre la fosfatasa alcalina, *in vitro* (1,7,11,15,20) e *in vivo* (3,5,18). Este interés forma parte de una creciente atención a la toxicología del berilio. Aldridge, Barnes y Denz (2) han demostrado la fuerte toxicidad del berilio administrado por vía intravenosa y precisado que la muerte sobreviene por necrosis hepática. La producción de un cuadro de raquitismo por administración oral de berilio durante largos períodos (12,14,21) parecía poderse atribuir a que el berilio, precipitando los fosfatos de la dieta, impedía su absorción, ya que no se presentaba administrando fosfato de berilio con dieta normal (12) ni tampoco si los animales recibían compuestos de fósforo parenteralmente (Kay y Skill, 14), Aldridge y colab. (2) han confirmado esta hipótesis al no encontrar berilio en los tejidos (excepto trazas espectrográficamente) después de tres meses de administración continuada de berilio con la dieta, lo que atribuyen a que el berilio al precipitar los fosfatos de la dieta se hace él mismo inadsorbible.

Tanto por su acción inhibidora sobre la fosfatasa alcalina como por su capacidad de precipitar los fosfatos, nos pareció que el berilio debía interferir la absorción selectiva de azúcares seguramente condicionada por procesos de fosforilización. Hemos examinado a este respecto la influencia del berilio sobre la absorción intestinal y la fosfatasa alcalina del intestino.

Por otra parte no nos satisfacía la aparentemente bien sentada hipótesis de la no absorción del berilio por precipitación como fosfato, ya que en las experiencias antes mencionadas se administraba berilio en exceso sobre los fosfatos de la dieta y los estudios de

\* Dirección actual: Department of Biological Chemistry, Washington University Medical School, St. Louis.

Aldridge y colab. han puesto de manifiesto que es muy pequeña la dosis letal del berilio con tal que alcance el torrente circulatorio. Aunque cabría la formación de combinaciones complejas en que los fosfatos precipitasen la totalidad del berilio, nos pareció más probable que la clave estuviese en una observación simultánea de Aldridge y colab. : la gran capacidad del berilio de fijarse a las proteínas. Es decir, el obstáculo para su absorción podría ser el epitelio intestinal más que los fosfatos de la luz intestinal. Para dilucidarlo administramos berilio con una dieta prácticamente carente de fósforo.

### Material y Métodos

Se han empleado ratas blancas criadas en el laboratorio. El berilio se utilizó en estado de sulfato (B. D. H.). La dieta pobre en fósforo consistió en : clara de huevo cocida, 1,2 gr. ; manteca de vaca, 0,6 gr., y azúcar común, 4,2 gr. (fósforo calculado, 0,5 mg.).

La absorción intestinal de glucosa se investigó con el método de absorciones sucesivas de Sols y Ponz (23,24) determinándose la glucosa no absorbida con una modificación del método de Hagedorn (22). Las determinaciones de P inorgánico en luz intestinal se hicieron después de filtrar (dada la solubilidad del fosfato de berilio en los ácidos) por el método ácido molibdicocloruro estannoso (22). La fosfatasa alcalina se determinó por el método de Huggins y Talalay (13) \*, previa trituración con arena y extracción con agua saturada de cloroformo.

### Resultados

#### INFLUENCIA DEL BERILIO SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE GLUCOSA

Se ha investigado la absorción intestinal de glucosa en presencia de berilio a concentraciones  $6 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-1}$  M en ratas de 180 a 220 gr. De los resultados consignados en la tabla 1 se desprende que el sulfato de berilio inhibe parcialmente la absorción selectiva a concentraciones altas : inhibición media de 34 % a la concentración  $10^{-1}$  M y posible ligera inhibición a la de  $10^{-2}$  M. La inhibición es sólo parcialmente reversible.

A la vista de los primeros resultados se decidió examinar el P inorgánico presente en el contenido intestinal al final de los experimentos de absorción, dado que la disminución de la absorción de glucosa podía depender de precipitación del P inorgánico

\* Damos las gracias a los Laboratorios PAUL-LEVIS por el fenolfaleofosfato sódico, amablemente enviado a uno de nosotros (A. S.)

(16,22). Los resultados, también consignados en la tabla 1, fueron muy variables, pero en ningún caso desapareció el P inorgánico. Como control se hicieron dos experimentos con cerio

TABLA I  
Influencia del berilio sobre la absorción intestinal de glucosa  
Glucosa 5, 4 %; experimentos de 30 minutos

RATA	Asa intestinal cm.	Experimentos	Berilio	Cerio	Glucosa absorbida mg/cm	P inorgánico $\gamma$ /cm.
1	40	1			4,70	
		2	$6 \times 10^{-3}$ M		4,10	
		3	$6 \times 10^{-5}$ M		4,40	
		4			2,30	
		5			3,50	
2	47	1			5,00	
		2	$10^{-2}$ M		4,80	
		3	$10^{-1}$ M		2,55	
		4			3,75	
3	45	1			4,35	
		2	$10^{-2}$ M		3,85	
		3	$10^{-1}$ M		3,55	
		4			3,35	
4	37	1			4,27	4,1
		2	$10^{-1}$ M		3,24	15,0
		3		$10^{-2}$ M	2,81	trazas
5	41	1			perdida	3,3
		2	$10^{-1}$ M		3,97	7,2
		3		$10^{-2}$ M	3,58	trazas
6	50	1			5,20	5,0
		2	$10^{-2}$ M		5,60	4,7
		3	$10^{-1}$ M		3,90	2,0
7	47	1			6,23	2,5
		2	$10^{-2}$ M		6,70	1,2
		3	$10^{-1}$ M		3,55	1,9
Medias		{	sin Be		$4,96 \pm 0,28$	
			con Be $10^{-1}$ M		$3,29 \pm 0,25$	
			Diferencia	$1,67 \pm 0,37$		

( $\text{Cl}_2\text{Ce}$ ,  $10^{-2}$  M); en ambos desapareció el P inorgánico y la absorción de glucosa fué menor que en presencia de berilio  $10^{-1}$  M, si bien tampoco fué completa la inhibición de la absorción selectiva (22).

La fosfatasa alcalina se determinó después de las experiencias de absorción en las asas que habían estado sometidas al berilio (yeyuno) y en el íleon. Los resultados se resumen en la tabla 2, junto con los de otras experiencias. En comparación con ratas normales la fosfatasa alcalina del yeyuno apareció considerablemente disminuída (inhibición media 74 %).

TABLA II  
*Belirio y fosfatasa alcalina del intestino in vivo*  
Unidades Huqqins y Talalay por g. de tejido fresco

	N.º de casos	Fosfatasa alcalina		
		Yeyuno	% normal	Íleon
Normales . . . . .	3	455±15	100	264±62
Después de la absorción de glucosa con Be 0-1 M durante 30', en yeyuno . . . . .	4	120±33	26	212±54
Después de 3-8 días de dieta con Be . . . . .	4	497±21	109	
Contróles de la dieta . . . . .	2	550±20	121	
Media ratas dieta, sin y con Be . . . . .	6	515±16	113	

En cambio no hubo diferencias valorables entre los íleon de ambos grupos. Este efecto del berilio puede apreciarse dentro de cada grupo, ya que en los normales la relación yeyuno/íleon fué 1,72 (López Navarro, 17) y en los sometidos al berilio 0,57.

En dos experiencias complementarias se aisló por ligaduras la primera mitad del yeyuno y se introdujo en ella 1 cc de solución de glucosa al 5,4 % con sulfato de berilio  $10^{-1}$  M. A los 30 minutos se lavó abundantemente y se determinó la actividad fosfatásica de este segmento del yeyuno y del segmento siguiente no tratado; las inhibiciones encontradas fueron 80 y 73 %. La adición de sulfato de magnesio hasta concentración de  $10^{-3}$  M en la mezcla hidrolizante (con 1 mg. de intestino fresco por cc.) no modificó sensiblemente los resultados. Pero la adición de sulfato de manganeso hasta concentración  $5 \times 10^{-3}$  M en el segundo caso redujo la inhibición de 73 a 20 %.

#### ADMINISTRACION DEL BERILLO POR VIA ORAL CON DIETA CARENTE DE FOSFORO

Se utilizaron seis ratas jóvenes de 110 a 130 gr. Cuatro ratas recibieron diariamente 10 mg. de berilio en estado de sulfato con

6 gr. de la dieta antes descrita (fósforo = 0,5 mg.). Las otras sirvieron de control de la dieta. Agua *ad libitum*.

Todos los animales perdieron peso progresivamente, la pérdida alcanzó de 15 a 20 gramos en los tratados durante ocho días.

A los 3, 7 y 8 días de comenzada la dieta experimental, se investigó la capacidad de absorción intestinal de glucosa y a continuación el contenido de fosfatasa alcalina del yeyuno. Las absorciones se consignan en la tabla 3. No hay diferencia significativa entre las tratadas con berilio y las controles. Los valores de absor-

TABLE III  
Absorción intestinal de glucosa en ratas tras la administración oral de berilio  
Experimentos de 30 minutos. Glucosa 5,4 %

Rota	Dieta experimental días		Asa intestinal cm.	Glucosa absorbida mg / cm
	Be	Controles		
11	3	3	44	4,05
12			46	3,35
13	7		44	3,90
14	7	8	48	3,45
15	8		45	4,60
16			29	3,95
Medias		{	tratadas con berilio	4,00±0,24
			controles	3,65±0,95
			Diferencia	0,35±0,98

ción son normales en comparación con ratas con la alimentación usual en el Instituto.

La fosfatasa alcalina del yeyuno (tabla 2) apareció ligeramente disminuída en las ratas tratadas con berilio en comparación con las controles. No pudiéndose comparar con datos de normalidad por no haber en la literatura referencias sobre fosfatasa de intestino determinada con fenolftaleínfosfato, procedimos a determinarla en tres ratas con alimentación normal. Resultó que las ratas con dieta experimental (sin berilio y aun con él) tenían valores superiores a lo normal.

### Discusión

De los dos mecanismos por los que cabía esperar que el berilio afectase la absorción selectiva de glucosa, sólo uno ha sido confirmado por la experiencia: inhibición considerable de la fosfatasa

alcalina del intestino. Aunque debe hacerse la salvedad de que dicha inhibición pudiese ser un artificio al preparar los homogeneizados por residuos de berilio retenidos a nivel de las vellosidades, pero esta posibilidad se hace muy remota, dado que en algunos de los casos después de la experiencia de absorción con berilio se hizo otra con glucosa sola que debería haber arrastrado cualquier resto de berilio en la luz intestinal. Estos mismos experimentos, al mostrar recuperación parcial de la capacidad de absorción, hacen pensar que la inhibición de la fosfatasa alcalina, si bien es un probable factor de la disminución de la absorción, no debe ser el único.

La falta de reactivación por el Mg confirma los resultados de Grier y colab. (11) y Dubois y colab. (7). El resultado positivo de Aldridge (1) se obtuvo con una relación Mg/Be de 40.000/1 que seguramente distó mucho de poderse alcanzar en nuestro caso. En cambio, la considerable reactivación por Mn junto con los resultados de Dubois y colab., parece confirmar que la disminución de actividad de la fosfatasa alcalina del intestino delgado después de la absorción de soluciones de berilio es realmente una inhibición por este metal.

El otro presunto mecanismo, la precipitación de P inorgánico queda descontado por los resultados. Kay y Skill (14) fundamentaban la precipitación del fosfato de berilio en el intestino por su insolubilidad en medios medianamente ácidos, incluso a pH 4. Las soluciones de sulfato de berilio 10-1M empleadas tenían aproximadamente este pH. Pero la insolubilidad en medio ácido no alcanza a tanto. Añadiendo el berilio a soluciones amortiguadoras de fosfatos hemos encontrado que la formación de precipitado de fosfato de berilio sólo es completa a pH 6,0, siendo parcial a pH 5,6 y no presentándose a pH 5,4. Administrado con la dieta la precipitación del fosfato de berilio debería pues comenzar hacia el final del duodeno.

Pero esta acidez de las soluciones del sulfato de berilio, suficiente para evitar la precipitación del P inorgánico puede haber contribuido a la disminución en la absorción de glucosa. Aunque según Laszt (16) la absorción de glucosa disuelta en agua o soluciones amortiguadoras de pH 4 es la misma y nosotros lo hemos comprobado a pH 4,3, Ponz y Larralde (19) han encontrado con soluciones tamponadas a pH 4,3 una inhibición de 33 % con respecto a las tamponadas a pH 7,0. La discrepancia es más aparente que real, ya que en las experiencias de Ponz y Larralde se empleaban soluciones tamponadas y en las de Laszt y nuestras, una sin tamponar con una tamponada. Aunque no podemos entrar aquí en una discusión sobre la influencia de la acidez en la absorción, puede concluirse que en nuestras experiencias la acidez de las soluciones de sulfato de berilio pudo contribuir a la disminución en la absorción de glucosa.

En cuanto a la falta de toxicidad del berilio por vía bucal, nos parece que queda demostrado que no depende de su precipitación al estado de fosfato. Sino que el exceso de berilio sobre el fósforo es absorbido por alguna otra razón. Creemos debe ser similar a la que resta toxicidad al berilio por vía subcutánea en las experiencias de Aldridge y colab. (2), es decir, fijación a las proteínas del epitelio intestinal. No se opone a ello el escaso efecto sobre la fosfatasa del yeyuno encontrado en estas experiencias, ya que además de ser aquí relativamente mucho menor la dosis de berilio, la fijación pudo comenzar en estómago y duodeno y con proteínas alimenticias no digeridas y mucina segregada. Por lo demás el hecho de que se haya encontrado alguna inhibición parece indicar que algo de berilio penetró en las células del epitelio. Y en cierta cantidad, ya que para la inhibición de fosfatasas no aisladas hacen falta concentraciones relativamente altas de berilio (en cultivos de tejidos  $10^{-4}$  M (5)). Como por el contrario es muy pequeña la dosis letal del berilio ingresado en el torrente circulatorio parece que puede concluirse que el berilio penetra en el epitelio intestinal pero no pasa de él.

La dieta empleada para suprimir casi completamente el fósforo era carente en otras cosas, lo que no tenía importancia dada la breve duración de los experimentos.

El aumento de fosfatasa alcalina en el intestino delgado ocasionado por esta dieta fué motivado probablemente por la elevada proporción de grasa (10 %) en la misma. En efecto, las experiencias de Gould (10) habían mostrado que en la rata las dietas ricas en grasa aumentaban la fosfatasa alcalina en el plasma, lo que ha sido encontrado también por otros (5, 9). Por otra parte se ha visto que el ayuno la disminuye (6). Y por último se ha demostrado que el principal origen de la fosfatasa alcalina del plasma en la rata es el intestino (8). Parece, pues, corroborarse la hipótesis sugerida por Gould de que el aumento de grasa en la dieta aumenta la del plasma por aumentar la del intestino.

### Resumen

La absorción intestinal de glucosa en la rata disminuyó un 34 % en presencia de sulfato de berilio  $10^{-4}$  M. En estas condiciones no hay precipitación de P inorgánico en la luz intestinal debido a la acidez de las soluciones de sulfato de berilio. La fosfatasa alcalina de los homogeneizados de los segmentos de intestino donde se realizaron las experiencias de absorción con berilio apareció inhibida cerca del 80 %. La inhibición no fué afectada por incubación con  $Mg^{++}10^{-3}$  M, mientras hubo considerable reactivación por incubación con  $Mn^{++}5 \times 10^{-3}$  M.

Ratas que recibieron diariamente 10 mg. de Be con una dieta con sólo 0,5 mg. de P hasta durante una semana no mostraron síntomas de intoxicación ni anormalidad en la capacidad de absorción intestinal de glucosa. La fosfatasa alcalina del intestino apareció ligeramente disminuída con respecto

a las controles, si bien aumentada con respecto a las ratas alimentadas normalmente. El aumento de la fosfatasa del intestino ocasionado por la dieta experimental utilizada se atribuye a su alto porcentaje de grasa (10 %).

### Summary

The absorption of glucose from the intestine of the rat was diminished in the presence of  $10^{-1}$  M beryllium sulphate; the average decrease found was 34 per cent. Under the conditions used there is no precipitation of inorganic phosphorus intestinal contents because the  $10^{-1}$  M beryllium sulphate solutions are more acid than the pH 5,6 at which beryllium phosphate precipitation has been found to begin. Alkaline phosphatase activity of the homogenates of the intestinal segments in which experiments of absorption with beryllium were performed appeared to be inhibited nearly 80 per cent. No significant reactivation was obtained by incubation with  $10^{-3}$  M magnesium sulphate, but a considerable one was obtained by incubation with  $5 \times 10^{-3}$  M manganese sulphate.

10 mg. of beryllium (as the sulphate) in a diet containing only about 0.5 mg. P was administered daily to rats for periods up to one week. No symptoms of intoxication were appreciated. Neither did any abnormality in the ability of the intestine for glucose absorption appear. Jejunal alkaline phosphatase appeared slightly diminished with respect to the controls, but increased with respect to normal fed animals. The increase in alkaline phosphatase of the small intestine of rats by the experimental diet must be due to its high proportion of fat (10 %).

### Bibliografía

- (1) ALDRIDGE, W. N.: *Nature*, 165, 772. 1950.
- (2) ALDRIDGE, W. N., BARNES, J. M., y DENZ, F. A.: *Brit. J. Exp. Path.*, 30, 375. 1949.
- (3) ALDRIDGE, W. N., BARNES, J. M., y DENZ, F. A.: *Brit. J. Exp. Path.*, 31, 473. 1950.
- (4) CANTOR, M. M., WIGHT, P. A., y TUBA, J.: *Trans. Royal Soc. Canada*, 42 III, 51. 1948. TUBA, J., y SHAW, R. K.: *Canadian J. Res.*, 28, 41. 1950.
- (5) CHÉVREMONT, M., y FIRKET, H.: *Nature*, 167, 772. 1951.
- (6) DALGAARD, J. B.: *Acta Physiol. Scand.*, 13, 310. 1947.
- (7) DUBOIS, K. P., COCHRAN, K. W., y MAZUR, M.: *Science*, 110, 420. 1949.
- (8) FLOCK, E. V., y BOLLMANN, J. L.: *J. Biol. Chem.*, 175, 439. 1948.
- (9) GORRA, G.: *Acta científica venezolana*, 1, 21. 1950.
- (10) GOULD, B. S.: *Arch. Biochem.*, 4, 175. 1944.
- (11) GRIER, R., HOOD, M. B., y HOAGLAND, M. B.: *J. Biol. Chem.*, 180, 289. 1949.
- (12) GUYATT, B. L., KAY, H. D., y BRANION, H. D.: *J. Nutrition*, 6, 313. 1933.
- (13) HUGGINS, Ch. y TALALAY, P.: *J. Biol. Chem.*, 159, 399. 1945.
- (14) KAY, H. D., y SKILL, D. I.: *Biochem. J.*, 28, 1222. 1934.
- (15) KLEMPERER, F. W., MILLER, J. M., y HILL, J. C.: *J. Biol. Chem.*, 180, 281. 1949.
- (16) LASZT, L.: *Schweiz. Med. Wschr.*, 193. 1942.
- (17) POLICARD, A., y FULLERINGER, A.: *C. R. Soc. Biol.*, 143, 1411. 1949.

- (19) PONZ, F. y LARRALDE, J.: *R. esp. Fisiol.*, 6, 255, 1950.
- (20) ROCHE, J., NGUYEN VAN THOAI y LOEVY, J.: *C. R. Soc. Biol.*, 144, 638. 1950.
- (21) SOBEL, A. E., GOLDFARB, A. R. y KRAMER, B.: *J. Biol. Chem.*, 108, 395. 1935.
- (22) SOLS, A. y PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, 2, 283. 1946.
- (23) SOLS, A. y PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, 3, 207. 1947.
- (24) VIDAL-SIVILLA, S., SOLS, A. y PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, 6, 195. 1950.