

Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Efecto del arsenito y del selenito sobre la absorción intestinal de glucosa

por F. Ponz

(Recibido para publicar el 9 de diciembre de 1952)

En trabajos previos hemos estudiado la acción del monoyodoacetato, florricina, fluoruro sódico, metadona (13) y del ión uranilo (12) sobre la absorción intestinal de glucosa con objeto de investigar indirectamente — por el efecto que tienen los inhibidores enzimáticos en la absorción — el metabolismo de la transferencia activa de glucosa por la mucosa intestinal.

En el presente, ensayamos la acción de los iones arsenito y selenito sobre el mismo proceso. Ambos son inhibidores de la succinodeshidrogenasa [Potter y Elvehjem (14), Stotz y Hastings (15)], como capaces de bloquear grupos —SH de la enzima (Potter, Du Bois, 1942). Por otra parte, el arsenito es inhibidor de la oxidación del piruvato (8), de la descarboxilación oxidativa (10, 22), así como de la fosforilación oxidativa (6, 9). Nos encontramos así con inhibidores de procesos importantes para la liberación y utilización de energía por la célula de la mucosa intestinal, que habrán de tener acción sobre la absorción «activa» de azúcares.

Material y métodos

Ratas de 100 a 200 g. de peso. Método de absorciones sucesivas de Sols y Ponz (20) con experiencias de treinta minutos y presión de repleción de 12 cm. de H₂O. Determinación de glucosa según modificación del método de Somogy (19). El arsenito se utilizaba como sal potásica y el selenito como sal sódica. Las concentraciones

de estos inhibidores se dan en molaridades y se obtenían disolviendo las sales a la concentración deseada en soluciones de glucosa en agua al 5,4 %. Los resultados se expresan en micromoles de azúcar absorbido por centímetro de longitud fisiológica de intestino (23).

Resultados

1. Efecto del ión arsenito

En cada rata se han realizado cuatro absorciones sucesivas en la misma asa intestinal. La concentración inicial de glucosa era en todas del 5,4 %. En la primera de ellas se investigaba la absorción normal de glucosa; en la segunda, la solución a absorber llevaba también arsenito potásico en las concentraciones que se indica; en la tercera, de nuevo glucosa sin inhibidor; y en la cuarta, otra vez glucosa con inhibidor a igual concentración que en la segunda. La concentración de arsenito variaba entre 6×10^{-2} M y 4×10^{-4} M. Como en el asa intestinal vienen a quedar unos 4 a 5 c.c., puede calcularse en 7 a 0,05 mg. de arsenito po-

T A B L A I

Efecto del arsenito potásico sobre la absorción intestinal de glucosa (5,4 %) en la rata.

Peso	Long. asa cm.	(AsO ₃ K ₃)	Glucosa absorbida (μM/cm)			
			1.ª Gluc. Abs.	2.ª Gluc. + As. Abs. Inhib. %	3.ª Gl Abs. Inhib. %	4.ª Gl. + As. Abs. Inhib. %
122	16	4×10^{-2} M	5,3	1,6 70	2,5 51	1,0 81
135	15	»	6,0	3,0 50	1,0 83	0,5 91
100	17,5	»	6,2	2,4 61	0,7 89	0,4 93
103	13,0	»	5,5	0,9 83	0,5 91	0,2 96
140	25	»	7,0	2,0 71	1,4 80	0,7 90
132	16	$2,4 \times 10^{-2}$ M	6,6	3,1 53	4,0 39	2,0 70
105	13	»	5,5	2,0 63	2,5 54	1,5 73
115	18	»	7,5	4,5 40	6,0 20	2,7 64
145	16	4×10^{-3} M	7,0	3,4 48	4,0 43	2,8 60
185	16	»	8,0	4,5 44	5,3 34	3,0 62
135	16,5	2×10^{-3} M	7,5	7,0 —	5,8 23	4,0 47
197	17,5	»	6,8	6,0 —	5,7 16	5,5 19
193	16	4×10^{-4} M	8,4	7,8 —	8,1 —	8,9 —
145	18	»	5,1	5,5 —	6,0 —	5,3 —
187	16	»	8,2	7,2 12	7,6 —	8,2 —
150	20	»	7,0	6,2 11	6,4 —	6,0 14

tásico. Según Franke y Moxon (5) la dosis letal de arsenito sódico en la rata es de unos 4,5 mg. por kilo de peso intraperitoneal. Efectivamente, las concentraciones de 6×10^{-2} M y superiores se mostraron siempre letales, bien durante la misma absorción con arsenito, bien en las sucesivas. Las $2,4 \times 10^{-2}$ M e inferiores fueron ya bien toleradas, al menos durante el tiempo de las experiencias.

La tabla 1 expresa los resultados obtenidos, figurando junto con el valor absoluto de la absorción por centímetro de asa, el tanto por ciento de inhibición que se encuentra en las segunda, tercera y cuarta absorciones respecto de la primera absorción que se toma como normal. Las inhibiciones inferiores al 10 % no se consideran.

El arsenito a concentraciones 4×10^{-2} M e inferiores en la solución de glucosa no perturba en absoluto la determinación de glucosa, según procedemos.

Las concentraciones 4×10^{-2} M producen fuertes inhibiciones (del 50 al 80 %), que persiguen o aumentan en la tercera absorción de glucosa sin arsenito y que son máximas en la cuarta absorción, de nuevo con arsenito. Algunas de las ratas murieron poco después de terminar la cuarta absorción, revelando una fuerte intoxicación que puede ser causa de las más altas (90-96 %) inhibiciones encontradas en la cuarta absorción. Al disminuir la concentración de arsenito, las ratas lo toleran ya bien, y las inhibiciones son cada vez más bajas. Con $2,4 \times 10^{-2}$ M la inhibición media en las tres absorciones sucesivas es del 52, 38 y 69 %, respectivamente. Con 4×10^{-3} M disminuye algo más el efecto (46, 39 y 61 % respectivamente). A concentraciones 2×10^{-3} M es dudoso el efecto de la primera absorción con arsenito, siendo todavía claro en la última (33 %). Con la concentración 4×10^{-4} M ya no se revela efecto alguno.

En las terceras absorciones, con glucosa sola, consecutivas a una anterior en presencia de arsenito, se sigue observando inhibición, lo que manifiesta que el efecto es poco reversible.

2. Efecto del ión selenito

Se ha procedido como en las experiencias con el arsenito, estando presente el selenito en las absorciones segunda y cuarta. Las concentraciones del selenito sódico eran entre 4×10^{-2} M y 2×10^{-5} M. Las cantidades presentes en el asa intestinal a concentración 10^{-3} e inferiores están muy por bajo de la dosis letal [Smith, Stohlman, Lillie (18)] y, efectivamente, se toleraron por los animales sin ninguna alteración aparente. La concentración 4×10^{-2} M era letal y la de 10^{-2} M se mostró también tóxica y produjo en algún caso la muerte de la rata.

La presencia de selenito a la máxima concentración utilizada, no perturba la determinación de glucosa.

En la tabla II se reúnen los resultados de las experiencias, incluyendo, como en la tabla I, los valores de inhibición relativos.

El selenito inhibe la absorción en grado semejante al arsenito. Concentraciones 10^{-2} M producen inhibiciones del 32 al 70 % en las absorciones en que está presente el selenito, ejerciendo parecida influencia sobre la tercera absorción con glucosa sola, subsiguiente a la segunda que se había hecho con el inhibidor. En cambio, las

TABLA II

Efecto del selenita sódico sobre la absorción intestinal de glucosa (5'4 %) en la rata

Peso (g.)	Long. asa (cm)	[SeO ₃ Na ₂]	Glucosa absorbida μ M/cm.			
			1.ª Gluc. Abs.	2.ª Gluc.+Sel. Abs. Inhib.%	3.ª Gluc. Abs. Inhib.%	4.ª Gluc.+Sel. Abs. Inhib.%
99	21	10^{-2} M	6,5	3,6 45	3,3 49	2,1 68
105	17	»	7,6	5,2 32	4,8 37	3,1 59
95	20	»	5,5	2,6 53	2,0 63	1,5 73
98	26	4×10^{-3} M	7,5	4,2 44	7,2 —	4,2 44
98	21	10^{-3} M	6,3	4,9 25	6,2 —	4,2 30
135	24	»	7,1	5,4 24	6,8 —	4,5 36
111	23	»	4,9	4,4 11	4,9 —	3,4 30
137	22	10^{-4} M	4,7	4,0 15	4,7 —	3,9 17
122	29	»	6,5	5,6 14	6,4 —	5,3 18,5
130	22	»	5,0	4,4 12	4,9 —	4,5 10
137	25	2×10^{-5} M	4,5	4,5 —	4,5 —	4,4 —
136	19	»	5,7	5,5 —	5,8 —	5,6 —
134	23	»	4,8	4,8 —	5,0 —	4,8 —

4×10^{-3} M e inferiores ejercen inhibiciones fácilmente reversibles. Este comportamiento es constante en todas las experiencias y señala una notable diferencia entre la inhibición con arsenito, persistente, difícilmente reversible, y la del selenito que es fácilmente reversible por el lavado que sigue a cada absorción.

Las concentraciones inferiores van siendo menos eficaces produciendo inhibiciones medias de 44 % (4×10^{-3} M), 20 % (10^{-3} M), 14 % (10^{-4} M) en la primera absorción con selenito y muy poco más altas en la segunda vez que está presente tal inhibidor. A concentración 2×10^{-5} M, es ya ineficaz, absorbiéndose lo mismo en las cuatro absorciones, en presencia o ausencia del selenito.

Discusión

La absorción intestinal queda claramente inhibida por el arsenito y el selenito. Este último era letal a concentraciones más débiles que el arsenito.

Los procesos sensibles al arsenito, que, en el estado actual de nuestros conocimientos, pueden considerarse más importantes, en relación con la absorción selectiva, son algunas deshidrogenaciones por deshidrogenasas con sulfhidrilo, la descarboxilación oxidativa y la fosforilación oxidativa.

Krebs (8) había demostrado que el arsenito podía inhibir la oxidación del piruvato y Pickett y Clifton (11) lo confirmaron respecto de la glucosa y ácido pirúvico. Potter y Elvehjem (14) pudieron establecer que el arsenito y selenito inhibían la deshidrogenasa succínica, lo que debe hacerse interfiriendo con grupos —SH de la enzima (15). Efectivamente, el arsenito puede formar tioarsenitos de estabilidad variable (3) y la levadura es capaz de fijar arsenito durante la fermentación (4) que puede quedar bloqueando a los grupos —SH de las proteínas como tioarsenitos.

La descarboxilación oxidativa es también sensible al arsenito, como han precisado Stumpf, Zarudnaya y Green (1947) para la α -cetoglutaricooxidasa y la pirúvicooxidasa. Frente a esta última, encuentran inhibición del 75 % a concentración 3.3×10^{-3} M.

Por último, trabajos más recientes de Friedkin y Lehninger y Lehninger (6,9) muestran que también la fosforilación oxidativa es inhibida por el arsenito, en experiencias en que la fosforilación se acopla con la oxidación de difosfopiridinnucleótido reducido.

Estos tres procesos enzimáticos están intercalados en la fase aerobia de la glucólisis animal y, por tanto, podría pensarse en que si la absorción intestinal de glucosa está inhibida por el arsenito, la glucólisis aerobia debe ser importante para que la absorción se dé normalmente. Las concentraciones de arsenito eficaces sobre los referidos procesos enzimáticos son del mismo orden que aquellos que inhiben la absorción. Sin embargo, si el efecto fuese debido al bloqueo de grupos —SH, podría afectar también a otras enzimas con sulfhidrilo (Barron y Singer), entre las que se encuentran algunas de la fase anaerobia.

La inhibición de la absorción por el arsenito no es reversible por el lavado del asa, lo que habla en favor de que dicho ión forma complejos relativamente estables con los constituyentes celulares.

La fosfatasa alcalina intestinal es inhibida por el arseniato (17, 24). Pero el arsenito sódico a concentraciones inferiores a 0,0025 M no parece tener efecto (7). La analogía de efectos que se ha encontrado sobre muchas enzimas entre arsenatos y arsenitos se debe, principalmente, a su acción común sobre los grupos —SH y no debe ser éste el caso frente a las fosfatasa.

Por lo que respecta al selenito, Rensselaer, Potter y Elvehjem (16) encontraron que podía inhibir la fermentación hasta un 80 %, con efecto más débil que el arsenito. Potter y Elvehjem (14) y Stotz (21) precisaron que inhibía la deshidrogenasa succínica y Bergstermann (2) ha demostrado que también se inhibe la triosa-fosfato deshidrogenasa a concentración 0,05 %. Si, como se admite generalmente, el selenito actúa sobre enzimas con grupos sulfhidrilos, puede suponerse inhiba a otras muchas, de modo inespecífico. Es interesante, sin embargo, que el selenito tenga una acción muy fácilmente reversible. El lavado abundante del asa es suficiente para que en la siguiente absorción, ya en ausencia del selenito, no se aprecie ninguna inhibición. La fijación del selenito debe ser mucho más reversible que la del arsenito. El distinto comportamiento encontrado con las concentraciones más fuertes de selenito, de 10^{-2} M, puede atribuirse al estado de intoxicación grave producido.

No es fácil referir el efecto del arsenito o selenito a un proceso enzimático determinado. Su común acción sobre enzimas con grupos —SH permite sugerir que sea a causa de este efecto como inhiba a la absorción selectiva, pero no pueden excluirse otras posibilidades. La inhibición de la absorción selectiva puede, por otra parte, deberse a que resulte afectado un proceso directamente relacionado con la absorción selectiva, o a que se produzca una inhibición inespecífica del metabolismo de las células de la mucosa que entorpezca indirectamente el proceso íntimo de la selectividad.

Resumen

Se investiga en ratas, por el método de absorciones sucesivas de Sols y Ponz, el efecto del arsenito y del selenito sobre la absorción intestinal de glucosa. Se obtienen inhibiciones del 60 al 80 % con arsenito potásico 4×10^{-2} M, no teniendo ya efecto el 4×10^{-4} M. El selenito sódico inhibe también la absorción en parecida proporción, acaso algo más intensamente. La concentración umbral de letalidad era más baja que la del arsenito. La inhibición por selenito es fácilmente reversible por lavado, mientras que la del arsenito no lo es. Se discute el punto de ataque de ambos iones, sugiriendo se deba a su conocido efecto común sobre enzimas con grupos sulfhidrilo, si bien no se excluyen otras posibilidades.

Summary

The effect of arsenite and selenite ions on the intestinal absorption of glucose in the rat by Sols and Ponz's method of successive absorptions is investigated. The inhibitors were dissolved in the solutions to be absorbed. Potassium arsenite inhibits from 60 to 80 per cent at concentrations of $4 \cdot 10^{-2}$ M. Inhibition by selenite is reversible by washing the intestinal loop whilst this is not the case with arsenite. The point of attack of either ion is discussed, it being suggested that inhibition of enzymes with sulphhydrylic groups is involved without excluding other possibilities.

Bibliografía

- (1) BARRON, E. S. G. y SINGER, T. P. : *J. Biol. Chem.* **157**, 221-40, 241-53, 1945.
- (2) BERGSTERMANN, H. : *Biochem. Z.* **319**, 439, 1949.
- (3) COHEN, A., KING, H., STRANGWAYS, W.I. : *J. Chem. Soc.*, **3,043**, 1931
- (4) DIEMAIR, W. y SCHULKE, O. : *Chem. Zentr.* **1**, 1.442, 1942.
- (5) FRANKE y MOXON : *Jour. Pharmacol.* **58**, 454, 1936 ; 61, 89, 1937.
- (6) FRIEDKIN, M. y LEHNINGER, A. L. : *J. Biol. Chem.* **178**, 611, 1949.
- (7) KLEIN, W. : *Z. physiol. Chem.* **218**, 164, 1933.
- (8) KREBS, H. H. : *Z. physiol. Chem.* **217**, 215, 1933.
- (9) LEHNINGER, A. L. : *J. Biol. Chem.* **179**, 625, 1949.
- (10) OCHOA, S. : *Ann. New York Acad. Sc.* **47**, 835, 1947.
- (11) PICKETT, M. J. y CLIFTON, C. E. : *J. cell. Comp. Physiol.* **22**, 147, 1943.
- (12) PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **8**, 217, 1952.
- (13) PONZ, F. y LARRALDE, J. : *R. esp. Fisiol.* **8**, 71, 1952.
- (14) POTTER, V. R. y ELVEHJEM, C. A. : *J. Biol. Chem.* **117**, 341, 1937.
- (15) POTTER, V. R. y DUBOIS, K. P. : *J. Gen. Physiol.* **26**, 391, 1942.
- (16) RENSSLAER, POTTER y ELVEHJEM : *Biochem. J.* **30**, 189, 1936.
- (17) ROCHE, J. y NGUYEN-VAN-THOAI : *Bull. Soc. Chim. Biol.* **25**, 1.365, 1943.
- (18) SMITH, STOHLMAN y LILLE : *Jour. Pharmacol.* **60**, 449, 1937.
- (19) SOLS, A. : *R. esp. Fisiol.* **5**, 149, 1949
- (20) SOLS A. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **8**, 207, 1947.
- (21) STOTZ, E. y HASTINGS, A. B. : *J. Biol. Chem.* **118**, 479, 1937.
- (22) STUMPF, P. K., ZARUDNAYA, K. y GREEN, D. E. : *J. Biol. Chem.* **167**, 817, 1947.
- (23) VIDAL-SIVILLA, S., SOLS, A. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **6**, 195, 1950.
- (24) ZITTLE, CH. A., WELLS, L. A. y BATT, WM. G. : *Arch. Biochem.* **13**, 395, 1947.