

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

Acción del cianuro y la azida sobre la absorción intestinal de glucosa

por **Francisco Ponz**

(Recibido para publicar el 14 de diciembre de 1953)

Continuando el estudio del efecto de inhibidores enzimáticos sobre la absorción intestinal de glucosa en la rata (7, 11, 12, 13, 14, 15) en el presente trabajo se investiga la acción de la azida sódica y el cianuro. Son conocidos inhibidores de la respiración celular y la utilización de energía para fosforilaciones, con lo que había que esperar que al reducir el catabolismo disminuyera la capacidad de la célula para cualquier forma de actividad que requiera energía y, por tanto, para la transferencia activa de glucosa.

Material y métodos

Se han seguido las técnicas habituales en nuestros trabajos. Ratas blancas de 100 a 200 g. técnica de Sols y Ponz (17), de absorciones sucesivas en una misma asa de intestino, 10 c.c. de solución de glucosa (5'4 %) a absorber, presión de repleción del asa de 12 cm. de agua y tiempos de absorción de 30 minutos. Temperatura ambiente de 26 a 32° conservando constante ($\pm 0'2^{\circ}$ C) la temperatura rectal.

La determinación de glucosa absorbida se practicaba por el método de Somogy, según modificación de Sols (16).

El cianuro y la azida quedaban disueltos en las mismas soluciones de glucosa a absorber, a las concentraciones que en cada caso se expresan.

Los resultados vienen dados en las tablas en micromoles de glucosa absorbida por centímetro de longitud «fisiológica» de intestino (20).

Resultados

I. Azida sódica

1. — CONCENTRACIONES DE AZIDA EFICACES.

Se ha utilizado cada animal para practicar, en la misma asa de intestino, cuatro absorciones sucesivas. En la primera y tercera absorciones se introducía solución de glucosa al 5'4 % sin

TABLA I

Absorción de glucosa (5'4 %) por el intestino delgado de rata, en presencia de la azida sódica en la solución a absorber.

Peso g.	Long. asa cm.	[Azida] (Mol.)	Glucosa absorbida (μ M/cm.)						
			1.ª Gluc. Abs.	2.ª Gluc. + N ₃ Na Abs.	Inhib. %	3.ª Glucosa Abs.	Inhib. %	4.ª Gluc. + N ₃ Na Abs.	Inhib. %
100	16	0'001	28	28	—	29	—	27	—
107	17	0'002	47	45	—	48	—	49	—
95	15	0'002	37	37	—	38	—	40	—
97	16	0'005	40	25	37'5	21	47	15	62
96	16	0'005	32	21	34	20	37	15	53
100	18	0'0075	35	23	34	17	51	9'5	73
92	20	0'0075	43	30	30	23	46'5	18	58
100	18'5	0'01	42	16	62	18	57	10	76
95	19	0'01	29	16	45	10	65	7	76
110	16	0'015	41	23	44	16	61	12	71
93	18	0'02	44	25	43	20	54	+	—

inhibidor; en la segunda y cuarta, en cambio, la solución de glucosa a absorber contenía azida sódica a concentraciones variables desde 0'001 M a 0'02 M. Entre una absorción y la siguiente, se verificaba un buen lavado del asa intestinal, con suero fisiológico, que era particularmente abundante después de la absorción para poder arrastrar un máximo de azida residual.

Los resultados de once ratas se reúnen en la tabla I. En ella se indican también las inhibiciones de absorción provocadas en las 2.ª, 3.ª y 4.ª absorciones, refiriendo las cantidades de azúcar absorbido al valor de la primera absorción que se toma como normal.

Las inhibiciones inferiores al 10 % no se tienen en consideración y no se incluyen en la tabla.

La azida sódica resulta eficaz a concentración 0'005 M, aumentando la inhibición con la concentración. Las 0'015 M y superiores, son letales casi siempre, produciéndose la muerte de la rata durante la 4.^a absorción o poco después de terminar ésta.

La tercera absorción, que sigue inmediatamente a la que tenía azida, aunque después de intenso lavado, queda siempre igual o más fuertemente inhibida. El efecto de la azida es así persistente y no reversible al lavado, al contrario de lo que ocurre con la florricina (Ponz y Larralde, 15).

Al volver a estar presente la azida (cuartas absorciones), la inhibición aumenta notablemente.

Las concentraciones subletales, e incluso las letales antes de producir la muerte de los animales, no inhiben más allá de un 75 %.

2. — EFECTO LOCAL DE LA AZIDA.

Era posible que la inhibición por la azida se debiera a la intoxicación general del animal, consecutiva a su paso a la sangre.

TABLA II

Absorción de glucosa (5'4 %) en la rata simultáneamente a la presencia de azida sódica en asa intestinal distinta.

Peso g.	Long. asa cm.	[Azida] (Mol.)	Glucosa absorbida (μM/cm.)							
			1. ^a Gluc. Abs.		2. ^a Gluc. (N ₃ Na)		3. ^a Gluc.		4. ^a Gluc. (N ₃ Na)	
			Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %
130	15	0'01	34	32	—	—	31	—	—	—
130	15	0'01	48	50	—	—	48	—	45	—
125	18	0'01	38	39	—	—	41	—	36	—
125	16	0'01	27	29	—	—	29	—	29	—
115	19	0'005	37	35	—	—	38	—	36	—
95	18'5	0'005	40	41	—	—	38	—	36	—
85	15'5	0'005	34	32	—	—	35	—	34	—
95	17'4	0'005	31	34	—	—	33	—	33	—
115	15'5	0'005	29	31	—	—	28	—	30	—

Para descartar tal posibilidad se ensayó el efecto que pudiera ejercer sobre la absorción de glucosa, la presencia de la azida en asa intestinal distinta a algunas concentraciones subletales.

Se disponían dos asas intestinales contiguas, pero independientes. En la proximal se realizaban cuatro absorciones sucesivas de glucosa, todas ellas libres de inhibidor y simultáneamente, en la distal, otras cuatro absorciones sucesivas con suero fisiológico solamente (1.^a y 3.^a abs.) o azida sódica a la concentración deseada en suero fisiológico (2.^a y 4.^a abs.). Puede admitirse que la cantidad de azida que pasa el torrente circulatorio en estas condiciones, es aproximadamente, la misma que cuando estaba con la solución de glucosa a absorber.

Como se ve en la tabla II, que reúne los resultados con nueve ratas, las concentraciones de azida 0'005 M y 0'01 M en un asa intestinal, toleradas por los animales, no modifican apreciablemente la absorción de glucosa por asa intestinal distinta. Estas mismas concentraciones provocaban inhibiciones muy notables si acompañaban a la glucosa. Esto permite deducir que la inhibición de la absorción intestinal provocada por la azida se ejerce localmente, en el epitelio absorbente.

II. Cianuro

1. — CONCENTRACIONES EFICACES.

Las experiencias se han llevado a cabo del mismo modo que con la azida. El cianuro se utilizaba como sal sódica o potásica y las concentraciones eran desde 0.00002 M a 0'02 M. Se producía la muerte de casi todos los animales con cianuro 0'015 M y superiores.

En la tabla III se recogen los resultados de 17 ratas. No se observa influencia alguna por debajo de cianuro 0'0075 M. Aun a esta concentración y a la de 0'01 M, aunque hay casos de inhibiciones notables se dan otros en que no parece tener influencia. Las concentraciones eficaces son, pues, muy próximas a la letalidad, siendo difícil discriminar si la absorción queda inhibida por la anoxia histotóxica del epitelio o por la intoxicación general del animal.

2. — EFECTO DEL CIANURO EN ASA INTESTINAL DISTINTA DE LA ABSORBENTE.

Hemos hecho también experiencias con dos asas de intestino, como con la azida. Por una de ellas se absorbía glucosa y por la otra, durante la 2.^a y 4.^a absorciones de glucosa, cianuro sódico 0'007 M en suero fisiológico.

TABLA III

Absorción de glucosa (5,4 %) por el intestino delgado de rata, en presencia de cianuro (sódico o potásico) en la solución a absorber.

Peso g.	Long. asa cm.	[Inhibidor] (Molaridad)	Glucosa absorbida							
			1.ª Gluc. Abs.		2.ª Gluc. + CN		3.ª Gluc.		4.ª Gluc. + CN	
					Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %
		[CN Na]								
135	20	0'00002	34'4	36	—	33	—	38	—	
150	16	0'0002	50'0	47	—	49	—	51	—	
125	21	0'0008	37'0	38	—	41	—	40	—	
195	21'5	0'002	43	44	—	43	—	45	—	
180	19	0'01	39	36	—	38	—	40	—	
135	21	0'01	35	19'4	40	14	54	16	49	
130	14	0'01	28	29	—	26	—	27	—	
120	18	0'01	42	41	—	42	—	33	21	
		[CNK]								
141	27	0'0075	41	35	14	42	—	37	—	
130	20	0'0075	36	28	22	33	—	30	16	
108	21	0'0075	47	51	—	45	—	50	—	
175	20	0'0075	37	20	46	14	62	14	62	
83	25	0'0075	40	41	—	26	35	25	37	
128	20	0'0075	29	31	—	29	—	30	—	
117	20	0'0075	34	27	20'5	27	20'5	26	23'5	
132	16	0'0015	26	26	—	28	—	—	—	
135	29	0'0015	41	38	—	41	—	40	—	

La tabla IV, revela que el cianuro absorbido por asa distinta de la que absorbe glucosa, tiene un efecto parecido al que ejerce estando en la misma asa intestinal. La inhibición no depende así de la presencia del cianuro en el epitelio absorbente. Para que el cianuro inhiba la absorción de glucosa, se han de alcanzar concentraciones marcadamente tóxicas para el animal que afectan la absorción por su paso a la sangre.

TABLA IV

Absorción de glucosa (5,4 %) en la rata simultáneamente a la presencia de cianuro sódico en asa intestinal distinta.

Peso g.	Long. [asa cm.	[CN ₂ Na] Molaridad	Glucosa absorbida μ M/cm.							
			1.ª Gluc.		2.ª Gluc. [CN Na]		3. Gluc.		4.ª Gluc. (CN Na)	
			Abs.	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	
215	14'5	0'007	58	48	18	32	45	25	55	
190	19	0'007	70	60	14	55	21'5	49	30	
150	16	0'007	47	37	21	20	57	17	64	
185	20	0'007	41	38	—	42	—	39	—	

Discusión

El efecto de la azida es preferentemente local, con independencia de la toxicidad del producto, al menos, a concentraciones no superiores a 0'01 M. Las máximas inhibiciones conseguidas son del 75 % (cuartas absorciones) no pudiendo pasarse de este valor porque se precisarían concentraciones de azida que tendrían acción letal.

Después de una absorción de glucosa con azida, la absorción sigue inhibida, aun después de lavar abundantemente el contenido del asa intestinal. La azida debe bloquear poco reversiblemente enzimas relacionadas directa o indirectamente con la transferencia de glucosa.

Esta fijación de azida por el epitelio se revela también porque en las cuartas absorciones en que por segunda vez se deja en el intestino la solución de glucosa con el inhibidor, la absorción es mucho más baja que en la segunda. Hay una adición de efectos y el bloqueo de la transferencia activa de glucosa es mayor.

El modo de acción de la azida ha de referirse a la inhibición de procesos enzimáticos. Son numerosas las enzimas inhibidas por la azida, tanto en procesos aerobios como anaerobios.

Aparte de su acción sobre la citocromooxidasa (3 y 4) Loomis y Lipman (8) han demostrado inhibiciones sobre la fosforilación en particulado renal; se dificulta la esterificación anaerobia del fosfato inorgánico [Spiegelman y colaboradores (19)]. Se han señalado diversos procesos de síntesis en la levadura inhibidos por la azida (1, 3, 18, 19, 22) explicados porque este inhibidor impide la generación de enlaces fosfóricos ricos en energía, necesarios para tales procesos.

Al quedar bloqueado el metabolismo del epitelio por la azida, tanto en lo que se refiere a la utilización del O_2 como a las fosforilaciones que permiten la utilización de la energía catabólica, se comprende quede inhibida la absorción intestinal de glucosa que precisa de esa energía para la transferencia activa. Las concentraciones de azida eficaces, 0'005 M, parecen ser más propias de una inhibición de la utilización de O_2 que de procesos anaerobios. Se pone así de manifiesto que el metabolismo oxidativo es de gran importancia para la absorción de glucosa por el intestino, indudablemente porque proporciona mucha más energía que el anaerobio.

El cianuro ofrece el hecho sorprendente de no afectar la absorción intestinal a concentraciones que no produzcan serias alteraciones tóxicas generales. Sólo se encuentra inhibición a partir de la concentración 0'0075 M, pero esta cantidad de cianuro produce también parecida inhibición al absorberse por asa intestinal

distinta de la que absorbe glucosa y, además, es próxima a la concentración letal.

Le Fevre no había encontrado tampoco inhibición de la absorción de glucosa por los eritrocitos ni a concentración 0'01 M (5).

Son numerosas las enzimas inhibidas por el cianuro, casi todas ellas en relación con la utilización del O_2 en aerobiosis, y especialmente la citocromooxidasa.

La ausencia de inhibición a concentraciones 0'002 M que inhiben la citocromooxidasa parecería indicar, contra lo deducido de las experiencias con la azida sódica, que la utilización de O_2 no desempeña ningún papel en la transferencia activa de glucosa. El cianuro podría inhibir la absorción por su efecto sobre la fase anaerobia, pero como Meyerhof y Kaplan (9) demostraron la enzima más sensible al cianuro de las que intervienen en la fermentación alcohólica no es la aldolasa, que no se afecta ni a concentración 0'1 M, sino la alcohol deshidrogenasa que no se da en los tejidos animales. No tendría así nada de extraño que tampoco se inhiba la absorción por el cianuro por su efecto sobre la aldolasa, ya que por su gran toxicidad no se puede alcanzar la concentración eficaz sobre este enzima.

Los resultados con cianuro no deben interpretarse como demostración de la no participación de los procesos aerobios al servicio de la transferencia activa. Los resultados con la azida, la inhibición por el malonato y otros inhibidores de la fase oxibiótica Escribano (2) y la gran importancia del aporte de O_2 a los tejidos en la absorción de glucosa Lluch (6) son suficientemente demostrativos de lo contrario. Más bien creemos que, de acuerdo con las antiguas observaciones de Perrier (10) y Violle (21), la glucosa ejerce una notable acción antidota sobre el cianuro, tanto «in vitro» como «in vivo», comportándose como uno de sus mejores antitóxicos. El CNH con las aldosas, forma cianhidrinas. Y, por otra parte, la gran difusibilidad del cianuro permite pensar en que antes de alcanzar en el interior del epitelio una concentración eficaz sobre la citocromooxidasa, pueda llegar por vía sanguínea a los centros nerviosos, provocando alteraciones que impiden distinguir los efectos locales de los generales.

Resumen

Se estudia en ratas, mediante la técnica de Sols y Ponz de absorciones sucesivas, el efecto de la azida sódica y el cianuro sobre la absorción intestinal de glucosa. Los inhibidores se adicionaban a las soluciones de glucosa (5,4 %) a absorber, o se disolvían en suero fisiológico cuando se administraban por tracto intestinal distinto al que absorbía glucosa.

La azida sódica 0'005 M inhibe un 35 % y la 0'01 M inhibe aproximadamente un 50 %. Si después de una absorción con azida se lava bien el

asa intestinal y se practica otra absorción de glucosa sin azida, continúa la inhibición. Si por segunda vez se absorbe glucosa con azida, la inhibición aumenta mucho (con 0'01 M, 75 %). Las mismas concentraciones de azida en suero fisiológico, absorbidas por asa intestinal, distinta a la que absorbe glucosa, no afectan la absorción de este azúcar.

Se concluye que la azida inhibe la absorción de glucosa por un efecto local sobre el metabolismo oxidativo del epitelio.

El cianuro no ejerce inhibición hasta concentraciones próximas a la letalidad, que también inhiben la absorción cuando se absorben por asa intestinal distinta a la de glucosa. Se interpreta el hecho por la gran toxicidad y difusibilidad del cianuro, que produciría efectos tóxicos generales antes de que afecte localmente al epitelio y por la acción antitóxica de la glucosa sobre el cianuro.

Summary

A study is carried out in rats by means of Sols and Ponz's technique of the effect of sodium azide and cyanid on the intestinal absorption of glucose. The inhibiting substances were added to the solutions of glucose (5,4 %) to be absorbed, or were dissolved in physiological serum when administered by an intestinal tract different to that absorbing glucose.

Sodium azide 0,005 M inhibits 35 % and 0,01 M inhibits approximately 50 %. If after and absorption with azide the intestinal loop is well washed and another absorption of glucose without azide is practiced inhibition continues. If glucose with azide is absorbed for the second time, inhibition greatly increases (with 0,01M, 75 %).

The same concentrations of azide in physiological serum, absorbed by the intestinal loop, different to that absorbing glucose, do not affect the absorption of this sugar.

The conclusion is arrived at, that azide inhibits glucose absorption by a local effect on the oxidative metabolism of the epithelium.

Cyanid does not perform inhibition until concentrations near lethality, which former also inhibit absorption when absorbed by and intestinal loop different to that of glucose. The author explains the fact by the great toxicity and diffusibility of cyanid, which would produce general toxic effects before affecting the epithelium locally and by the antitoxic effect of glucose upon cyanid.

Bibliografía

1. BROCKMANN, M. C. y STIER, T. J. B. : *J. cell. Comp. Physiol.*, **29** : 159, 1947.
2. ESCRIBANO, J. Tesis doctoral en preparación.
3. HORECKER, B. L. y STANNARD, J. N. : *J. Biol. Chem.*, **172** : 594, 1948.
4. KEILIN, D. : *Proc. Roy. Soc. London*, **B151** : 165, 1936.
5. LE FEVRE, P. G. : *J. gen. Physiol.*, **31** : 505, 1948.
6. LLUCH, M. Tesis doctoral en preparación.
7. LLUCH, M. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **9** : 135, 1953.
8. LOOMIS, W. F. y LIPMANN, F. : *J. biol. Chem.*, **179** : 503, 1949.
9. MEYERHOF, O. y KAPLAN, A. : *Arch. Biochem. & Biophys.*, **37** : 375, 1952.

10. PERRIER. Thèse doct. Pharm. París, 1921.
11. PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **8**: 217, 1952.
12. PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **8**: 261, 1952.
13. PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **9**: 37, 1953.
14. PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **9**: 205, 1953.
15. PONZ, F. y LARRALDE, J. : *R. esp. Fisiol.*, **8**: 71, 1952.
16. SOLS, A. : *R. esp. Fisiol.*, **5**: 149, 1949.
17. SOLS, A. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **3**: 207, 1953.
18. SPIEGELMAN, S., KAMEN, M. D., y DUNN, R. : *Federation Proc.*, **5**: 100, 1946.
19. SPIEGELMAN, S., KAMEN, M. D., y SUSSMAN, M. : *Arch. Biochem.*, **18**: 409, 1948.
20. VIDAL-SIVILLA, S., SOLS, A., y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **6**: 195, 1950.
21. VIOLLE : *Comp. Rend. Acad. Méd.*, **95**: n.º 26, 1944.
22. WINZLER, R. J. : *Science*, **99**: 327, 1944.

