

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

## **Inhibición de la absorción intestinal de glucosa por el ión cúprico**

por Francisco Ponz

(Recibido para publicar el 26 de septiembre de 1953)

Hemos estudiado en otros trabajos (10, 12, 18, 19, 20 y 21) el efecto de diversos inhibidores enzimáticos sobre la absorción intestinal de glucosa. En el presente continuamos nuestras investigaciones, aportando los resultados obtenidos con el sulfato cúprico. La necesidad de energía para la absorción selectiva de los azúcares ha de satisfacerse mediante procesos catabólicos y los inhibidores enzimáticos que empleamos pueden ilustrar sobre la importancia de las reacciones bloqueadas en la liberación y encauzamiento de tal energía. Por otra parte; el cobre, como otros metales pesados, puede formar complejos con las proteínas de la membrana plasmática y así influir en la permeabilidad.

### **Material y Métodos**

Se ha aplicado el método de Sols y Ponz (24) de absorciones sucesivas, en ratas de laboratorio con asas de 15 a 22 cm. de longitud, 10 c.c. de solución isotónica de glucosa a absorber, presión de repleción de 12 cm. de agua y tiempos de absorción de treinta minutos. Se mantenía la calefacción de modo que la temperatura rectal se conservaba constante para cada animal (oscilaciones no mayores de  $\pm 0,2^\circ$  C).

La glucosa se determina según costumbre, de acuerdo con una modificación de Sols (23) al método de Somogy.

El sulfato cúprico se adicionaba a las soluciones de glucosa, de

modo que quedaba en ellas a la concentración indicada en las experiencias.

Los resultados se expresan en las tablas en micromoles de glucosa absorbidos por centímetro de longitud «fisiológica» de intestino (25).

## Resultados

### 1. CONCENTRACIONES EFICACES

En cada animal se han practicado cuatro absorciones sucesivas en la misma asa de intestino. En la primera y tercera se utilizaban soluciones de glucosa al 5,4 % sin inhibidor y en la segunda y cuarta las absorciones de glucosa se hacían en presencia de sulfato cúprico a concentraciones comprendidas entre 0,00001 y 0,01 M. Después de cada absorción, se verificaba un buen lavado del asa intestinal, más especialmente después de la segunda, para arrastrar lo más posible el inhibidor residual.

En la tabla I se reúnen los resultados obtenidos. Los valores de azúcar absorbido en la segunda, tercera y cuarta absorción de cada animal se acompañan de los de la inhibición correspondiente, tomando como normal lo absorbido en la primera, no teniendo en cuenta las desviaciones inferiores al 10 %. Mientras que distintos animales difieren mucho en su capacidad de absorción, un mismo animal normal muestra marcada constancia en la absorción de azúcares durante cuatro pruebas sucesivas de media hora, con variaciones extremas no superiores por lo general al 10 %.

El sulfato cúprico empieza a resultar inhibidor a concentración 0,0001 M., en la última absorción en que, por segunda vez, está presente en el asa. Concentraciones 0,0002 M. son ya eficaces en la primera absorción en que está presente y por encima de ellas la inhibición va siendo cada vez mayor hasta llegar a valores del 100 % con las de 0,005 M. y 0,01 M.

Siempre es mayor la inhibición en la cuarta prueba de cada animal (segunda vez que se adiciona el sulfato cúprico) que en la segunda (primera vez que está presente). En la tercera absorción, después de arrastrar bien el contenido residual del asa en que estaba la sal de cobre, sigue muy marcado el efecto del ión cúprico, registrándose inhibiciones muy rara vez inferiores a la de la absorción anterior, alguna vez del mismo orden y casi siempre intermedias entre las encontradas en la segunda y cuarta absorción de glucosa, con sulfato cúprico presente.

A la concentración 0,005 M., el sulfato cúprico produce fuertes irritaciones de la mucosa intestinal con desprendimientos y

T A B L A I

Aborción de glucosa (5'4 %) por el intestino delgado de rata, en presencia de sulfato de cobre en la solución a absorber

Peso g.	Long. asa (cm.)	[SO <sub>4</sub> Cu] (Molaridad)	Glucosa absorbida (μM/cm.)								
			1.ª Gluc.		2.ª Gluc. + Cu			3.ª Gluc.		4.ª Gluc. + Cu	
			Abs.	Abs.	Inhib.%	Abs.	Inhib.%	Abs.	Inhib.%	Abs.	Inhib.%
110	20	0'00001	35'5	38'0	—	39	—	35	—		
105	20	0'00005	21'6	21'1	—	—	—	23	—		
150	18	»	46'7	46'0	—	50	—	44	—		
120	16	»	42'2	40'5	—	46	—	38'5	—		
125	18	0'0001	22'3	20'6	—	19'5	12	18'3	18		
125	18	»	44'5	42'0	—	45'0	—	40'0	10		
110	17'4	»	36'5	35	—	33	—	30	18		
130	16	0'0002	28	25	11	24	14	22	21		
285	18'5	»	43'5	33	25	31'7	27	27'3	37		
190	18'5	»	41'7	29'5	34	33	21	16'7	60		
125	19	0'0005	31'2	20'0	36	19'4	38	12'2	61		
140	20	»	36'7	30'0	18	18'5	50	16'7	55		
105	18	»	28'3	19'4	31	20'0	29	17'8	37		
125	22	0'001	33'5	24'5	27	14'4	57	13'4	60		
210	20	»	44'0	33'0	25	17'8	57	13'4	70		
95	16	»	31'0	25'2	19	20'5	34	15'2	51		
90	18	»	26'1	10'0	62	7'0	73	11'0	58		
80	17	0'005	23'0	6'1	83	0'—	100	0'—	100		
95	18	»	29'0	22'0	42	12'0	59	4'5	84		
110	19	0'01	19'5	8'0	59	0'—	100	0'—	100		
100	16	»	29	15'0	49	0'—	100	0'—	100		
115	15	»	40	20'5	49	6'7	83	0'—	100		

fuerte secreción de mucinas. La 0,01 M. provoca los mismos efectos aumentados, acompañados alguna vez de hemorragias y de muy intensa descamación epitelial.

2. EFECTO LOCAL.

El efecto del cobre podía atribuirse a una acción local sobre el mismo epitelio absorbente o a una central o general por su paso a la sangre. Se practicaron algunas experiencias con el fin de discriminar estas posibilidades. En algunos animales (tabla II) se dispusieron dos asas independientes de intestino, con sus cánulas y tubuladuras propias. En el asa proximal se verificaban cuatro absorciones sucesivas con solución de glucosa al 5,4 % sin inhibidor, y en la distal, simultáneamente con las otras, también cuatro absorciones sucesivas disponiendo en la primera y tercera suero fisiológico con sulfato cúprico a diversas concentraciones. Así, la cantidad de ión cúprico absorbido que pasaría

a la circulación general sería muy aproximada a la que penetraría cuando el inhibidor acompañaba a la glucosa en la solución a absorber, mientras que el epitelio por el que se está absorbiendo la glucosa está fuera de la acción del ión cúprico, salvo el que pueda llegarle por la sangre.

TABLA 11

*Absorción intestinal de glucosa (5'4 %) en la rata simultáneamente a la presencia de sulfato cúprico en asa intestinal distinta*

Peso g.	Long asa. cm.	[SO <sub>4</sub> Cu] (Molaridad)	Glucosa absorbida (μM/cm.)						
			1.ª Gluc. Abs.	2.ª Gluc. (Cu) Abs.	Inhib. %	3.ª Gluc. Abs.	Inhib. %	4.ª Gluc. (Cu) Abs.	Inhib. %
132	27	0'005	26	24	—	22	15	21	19
140	17	0'005	36'5	33	—	35	—	31	14
105	21	0'005	28	26	—	23	18	22	21
125	18	0'001	33'5	33	—	34'5	—	34	—
107	20	0'001	37	36	—	39	—	35	—
112	17	0'001	36	36'5	—	38	—	36	—

Con SO<sub>4</sub>Cu 0,005 M., que producía una intensa inhibición de la absorción de glucosa si estaba presente en la solución a absorber (inhibiciones del 40 al 100 % según los casos), sólo se encuentra efecto en las 3.ª y 4.ª absorciones y de un orden bastante más bajo. Indudablemente el Cu<sup>++</sup> absorbido por el asa distal produce un efecto tóxico que afecta la absorción de glucosa por la proximal, en cierto grado. La concentración 0,001 M, en cambio, que era aún fuertemente inhibidora (del 20 al 70 %), carece de acción en asa distinta a la que absorbe glucosa, al menos durante el tiempo de nuestras experiencias. Esta ausencia de efecto a esta concentración en nuestras condiciones experimentales está de acuerdo con los estudios de Boyden, Potter y Elvehjem (1) sobre toxicidad del sulfato de cobre por vía oral.

La inhibición hallada con las concentraciones de SO<sub>4</sub>Cu de 0,001 M e inferiores ha de atribuirse estrictamente a una acción local del inhibidor sobre el epitelio absorbente.

### Discusión

Las experiencias de Jacobs y Corson (7) revelaron que los eritrocitos de la rata y de otros mamíferos se hemolizaban más lentamente ante una solución de glicerina cuando había presente en ésta muy pequeñas cantidades de cobre, lo que se atribuía a una disminución de la permeabilidad a la glicerina. El efecto se

incrementaba mucho lavando las células con suero fisiológico, debido a que se eliminan así los bicarbonatos y proteínas séricas con las que podía combinarse el cobre (Davson, 6) y se reducía con la alcalinidad del medio. Es bien conocida la gran capacidad de las proteínas para fijar cobre (por ejemplo, Klotz y Curme, 9). El  $\text{Cu}^{++}$ , como otros metales pesados, al alcanzar la superficie celular, puede combinarse con grupos iónicos superficiales y penetrar libre o unido a ellos hacia el interior de la célula, fijándose a otras sustancias proteicas, enzimáticas o no. Danielli (2) ha sugerido que esta neutralización de grupos iónicos superficiales puede dar razón de la toxicidad de los metales, porque supone una alteración de la permeabilidad, especialmente para electrolitos o sustancias no solubles en los lípidos que hay que suponer (15, 4) difunden a través de las partes polares de la membrana. Efectivamente, la toxicidad puede relacionarse con la diferencia de electronegatividad entre la de diversos iones y la del oxígeno (3, 8); el cobre y la plata muestran una desviación en el sentido de mayor acción tóxica.

Además, las sales cúpricas, como las de plomo y cinc, todas ellas agentes formadores de mercáptidos, inhiben la permeabilidad de los eritrocitos al sodio (Davson, 5), aunque no todos los agentes formadores de mercáptidos producen inhibición de la permeabilidad de los eritrocitos humanos a la glicerina (Parpart, Barron y Day, 17). Le Febre (11) atribuye el efecto a inhibición de alguna fosforilasa importante para la penetración de la glicerina por bloqueo de grupo  $-\text{SH}$ , pero no tiene base experimental para justificarlo y, por otra parte, la inhibición de la penetración del  $\text{Na}^+$  difícilmente puede comprenderse por la misma causa.

Sin embargo, la misma capacidad del  $\text{Cu}^{++}$  para fijarse a grupos iónicos o  $-\text{SH}$  de proteínas, le hace comportarse como inhibidor de un buen número de enzimas [ $\beta$ -amilasa (14), fosfatasa alcalina de intestino (13), colinacetilasa (16), miosin-ATPasa (22), y muchas más].

En nuestras experiencias se demuestra que el ión  $\text{Cu}^{++}$  inhibe la absorción intestinal de glucosa, por un efecto local sobre el epitelio absorbente, dado que concentraciones 0,001 M e inferiores, eficaces cuando están presentes en la solución a absorber, carecen de acción si están en otra porción del intestino, a pesar de que puede pasar a la sangre en proporción muy parecida a cuando acompaña a las soluciones de glucosa.

Después de haber estado presente el  $\text{Cu}^{++}$  en la luz intestinal, la mucosa afectada queda con una capacidad de absorción muy disminuída: las terceras absorciones en que se investiga la absorción de glucosa sin cobre, después de una absorción con inhibidor presente, muestran que el lavado abundante del asa no restaura

la capacidad absorbente del epitelio; antes al contrario, se observa por lo general una absorción todavía más baja que en la anterior en que estaba presente el ión  $\text{Cu}^{++}$ . Atribuimos el hecho a que el  $\text{Cu}^{++}$  forma complejos estables con las proteínas, no reversibles por el lavado, tanto en la superficie, como en el interior de las células; precisamente la lenta penetración del  $\text{Cu}^{++}$ , justificaría que el efecto durante la primera parte de la absorción con dicho ión en la solución no fuera tan manifiesto como al final en que se habría alcanzado un máximo de bloqueo de grupos proteicos superficiales e internos de la célula. La absorción siguiente, al no eliminarse por lavado este bloqueo, quedaría más fuertemente inhibida que la misma en que la fijación de  $\text{Cu}^{++}$  ha ido teniendo lugar. En cambio, las cuartas absorciones, con  $\text{Cu}^{++}$  de nuevo, revelan más fuerte inhibición todavía, dado que aumentará el  $\text{Cu}$  fijado.

En cuanto al modo de acción del ión  $\text{Cu}^{++}$ , puede referirse a inhibición de enzimas implicadas en la absorción en el interior y en la superficie celular, así como a disminución de la permeabilidad a la glucosa por su combinación con proteínas de la membrana plasmática.

### Resumen

Se ha investigado el efecto del ión  $\text{Cu}^{++}$  ( $\text{SO}_4\text{Cu}$ ) sobre la absorción intestinal de glucosa por la rata, mediante la técnica de Sols y Ponz de absorciones sucesivas, con tiempo de absorción de treinta minutos. El  $\text{Cu}^{++}$  presente en la misma solución de glucosa (5,4 %) a absorber, inhibe la absorción a partir de concentraciones 0,0001 M. Concentraciones 0,0002 M inhiben del 10 al 30 % y al repetir otra absorción con igual concentración de  $\text{Cu}^{++}$  se duplican aproximadamente los efectos.  $\text{Cu}^{++}$  a 0,005 M inhibe del 40 al 80 % y por segunda vez, del 80 al 100 %.

El efecto del  $\text{Cu}^{++}$  persiste en absorciones en que el inhibidor no acompaña a la solución de glucosa, pero que siguen, después de abundante lavado del asa intestinal, a una absorción previa con  $\text{Cu}^{++}$ .

La presencia de  $\text{Cu}^{++}$  a concentraciones 0,001 M e inferiores, en un asa intestinal distinta a aquélla en que se está absorbiendo glucosa, no influye en la absorción de esta substancia. Se deduce que el  $\text{Cu}^{++}$  a estas concentraciones inhibe la absorción de glucosa precisamente por un efecto local sobre el epitelio absorbente y no por el efecto tóxico general.

Se atribuye la inhibición a la capacidad de fijación del  $\text{Cu}^{++}$  por grupos iónicos o  $-\text{SH}$  de proteínas superficiales o del interior de las células de la mucosa, importantes para la absorción por pertenecer a enzimas implicadas en los procesos de selectividad o por alterar las condiciones de permeabilidad de la membrana.

### Summary

The effect of ion  $\text{Cu}^{++}$  ( $\text{SO}_4\text{Cu}$ ) on the intestinal absorption of glucose in the rat has been investigated by means of Sols and Ponz technique of successive absorptions, with an absorption period of 30 minutes.  $\text{Cu}^{++}$ , pre-

sent in the same solution of glucose to be absorbed (5'4 %) inhibits absorption from concentrations 0'0001 M onwards. Concentrations 0'0002 M inhibit from 10 to 30 % and on repetition of another absorption with an equal concentration of Cu<sup>++</sup>, the effect are approximately doubled. Cu<sup>++</sup> at 0'005 M inhibits from 40 to 80 % and on the second time, from 80 to 100 %.

The effect of Cu<sup>++</sup> persists in absorptions in which the inhibitor does not accompany the glucose solution, but which follow a previous absorption with Cu<sup>++</sup>, after a thorough washing of the intestinal loop.

The presence of Cu<sup>++</sup> at concentrations of 0'001 M and inferior concentrations, in an intestinal loop distinct to that in which glucose is being absorbed, has no influence on the absorption of this substance. It is inferred that Cu<sup>++</sup>, at these concentrations, inhibits the absorption of glucose precisely through the local effect upon the absorbent epithelium and not through a general toxic effect.

Inhibition is attributed to the capacity of fixing C<sup>++</sup> by ionic or —SH groups of superficial proteins or of the interior of mucosa, important for absorption on account of belonging to enzymes implicated in the process of selectivity or by altering the conditions of permeability of the membrane

### Bibliografía

1. BOYDEN, POTTER y ELVEHJEM : *Jour. Nutrition.* **15**, 397. 1938.
2. DANIELLI, J. F. : *J. exptl. Biol.* **20**, 167. 1944.
3. DANIELLI, J. F. y DAVIES, J. T. : *Adv. Enzymology.* **11**, 35. 1951.
4. DAVIES, J. T. : *Phys. and Colloid. Chem.* **54**, 185. 1950
5. DAVSON, H. : *The permeability of Natural Membranes*, Cambridge and New Work, p. 254. 1943.
6. DAVSON, H. : *Id.*, pp. 94-95. 1943.
7. JACOBS y CORSON : *Biol. Bull.* **67**, 325. 1934.
8. JONES, J. R. E. : *J. exptl. Biol.* **16**, 425, 1940 ; **17**, 408. 1940.
9. KLOTZ, I. M. y CURME, H. G. : *Am. Chem. Soc.* **70**, 939. 1948.
10. LARRALDE, J. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **6**, 169. 1950.
11. LE FEVRE, P. G. : *Jour. gen. Physiol.* **31**, 505. 1948.
12. LLUCH, M. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **9**, 135. 1950.
13. LÓPEZ-NAVARRO, J. : *R. esp. Fisiol.* **2**, 211. 1946.
14. MEYER, K. H., FISCHER, E. H. y PIGUET, A. : *Helv. Chim. Acta.* **34** 316. 1951.
15. MONNE, L. : *Adv. in Enzymology.* 8, p. 1, Interscience, New York, 1948.
16. NACHMANSOHN, D. y MACHADO, A. L. : *J. Neurophysiol.* **6**, 397. 1943.
17. PARPART, A. K., BARRON, E. S. G. y DAY, T. : *Biol. Bull.* **93**, 199. 1947.
18. PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **8**, 217. 1952.
19. PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **8**, 261. 1952.
20. PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **9**, 37. 1953.
21. PONZ, F. y LARRALDE, J. : *R. esp. Fisiol.* **8**, 71. 1952.
22. SINGER, T. P. y BARRON, E. S. G. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Méd.* **56**, 120. 1944.
23. SOLS, A. : *R. esp. Fisiol.* **5**, 149. 1949.
24. SOLS, A. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **3**, 207. 1947.
25. VIDAL-SIVILLA, S., SOLS, A. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.* **6**, 195. 1950.

