

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

Inhibición de la absorción intestinal de azúcares por el ion mercuríco

por

F. Ponz, M. Lluch e I. Alemany

(Recibido para publicar el 25 de noviembre de 1957)

En trabajos anteriores hemos observado la inhibición de la absorción intestinal de glucosa por el ion céfco (4), el cúprico (6) y el uranilo (5). El efecto era intenso, consiguiéndose inhibiciones notables a partir de concentraciones de 1 a 5×10^{-4} M, que no desaparecían por repetido lavado de la mucosa con suero fisiológico, revelando una fijación de tales iones a la misma, probablemente por combinación con proteínas celulares. En el presente trabajo investigamos el efecto del ion mercuríco, cuya acción sobre la utilización de glucosa por el diafragma aislado de rata era conocida (2).

Material y métodos

Utilizamos el método de SOLS y PONZ (10) de absorciones sucesivas en asa intestinal de rata *in situ*. La longitud del asa era de unos 20 a 30 cm. y se empleaba una presión de repleción de 12 cm. de agua, con 10 c. c. de solución isotónica de azúcar a absorber y tiempos de absorción de treinta minutos. El azúcar residual se determinaba según SOMOGY (9). Los resultados se expresan en las tablas en micromoles de azúcar absorbido por centímetro de longitud del intestino en treinta minutos.

El ión mercúrico (cloruro) se adicionaba disuelto en las soluciones de azúcar a absorber.

En las experiencias de desionización se ha utilizado el nuplapon (verseno) como sal trisódica del ácido etilendiamino-tetracético.

Resultados

1. CONCENTRACIONES EFICACES

Se ha ensayado el Cl_2Hg a concentraciones de 10^{-5} M a 10^{-3} M. Se verificaba una primera absorción de solución isotónica de glucosa, otra segunda de glucosa en presencia del inhibidor, una tercera de solución de glucosa sin inhibidor, después de abundante lavado del intestino, y, por último, se hacía una cuarta absorción en presencia del inhibidor. En la tabla I se indican los resultados con expresión de las inhibiciones obtenidas en tanto por ciento en relación con la primera absorción de cada animal que se considera como normal. No se han tenido en cuenta como inhibiciones las desviaciones infe-

TABLA I
Efecto del cloruro mercúrico sobre la absorción intestinal de glucosa (5,4 %) por la rata

Peso gr.	Asa cm.	[M]	Glucosa absorbida ($\mu\text{M}/\text{cm.}$)							
			1.ª Gluc. Abs.	2.ª Gluc. + Cl ₂ Hg		3.ª Gluc.		4.ª Gluc. Cl ₂ Hg		
				Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	
170	21	10^{-3}	50	52	—	52	—	53	—	
168	22	"	45	46	—	45	—	43	—	
120	18	10^{-4}	32	33	—	35	—	35	—	
155	28	"	53	53	—	45	15	43	18	
138	21	"	44	42	—	42	—	41	—	
175	18	"	51	54	—	50	—	49	—	
135	18	"	37	38	—	36	—	34	9	
205	25	"	51	50	—	47	—	44	14	
150	20	2×10^{-4}	48	43	10	40	17	35	27	
137	16	"	37	33	11	30	19	25	32	
141	20	"	49	41	16	39	20	37	25	
152	18	5×10^{-4}	51	44	14	38	26	18	64	
135	20	"	44	33	25	23	47	15	66	
232	25	"	50	40	20	35	30	20	60	
138	19	"	37	33	11	25	32	15	59	
125	22	"	42	33	21	29	31	20	52	
137	18	"	39	35	10	24	38	15	61	
126	18	10^{-3}	42	33	21	31	26	muere		
158	21	"	62	45	27	29	53	23	62	
168	20	"	46	34	26	25	46	25	46	

riores al 7 %, que están próximas a las desviaciones normales en absorciones sucesivas de glucosa sola, sin inhibidor alguno.

Como se ve en la tabla, la inhibición por el Hg^{++} es patente a concentraciones 2×10^{-4} M, aunque ya a 10^{-4} M se ha producido inhibición en algunos animales, especialmente en la última absorción. El efecto es creciente con el tiempo, a lo largo de las absorciones sucesivas, de modo que en las terceras absorciones, que, como hemos dicho, se hacían después de abundante lavado para arrastrar bien el Hg^{++} no fijado, y dejando en el intestino solución de glucosa sin ion mercúrico, la absorción de glucosa está aún más inhibida que en las anteriores, en que el ion mercúrico acompañaba por primera vez al azúcar. Además, en las cuartas absorciones, en que el inhibidor se adicionaba al intestino por segunda vez, las inhibiciones son aún mayores.

Hemos ensayado el efecto sobre la absorción de galactosa. En la tabla II se observa que el Hg^{++} a concentración 5×10^{-4} M tiene una acción inhibidora del mismo orden que el comprobado para la glucosa y el comportamiento de las terceras y cuartas absorciones es también muy semejante.

TABLA II

Efecto del cloruro mercúrico sobre la absorción galactosa por el intestino de rata

Peso gr.	Asa cm.	[M]	Galactosa absorbida (μ M/cm.)							
			1.º Galac.			2.º Galac + Cl ₂ Hg		3.º Galac.		4.º Galac + Cl ₂ Hg
			Abs.	Abs.	Inhibi %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	
175	25	5×10^{-4}	40	34	14	34	14	28	30	
163	20	"	41	31	24	28	32	25	39	
185	19	"	50	40	"	36	28	32	36	
176	23	"	38	33	13	30	21	23	40	
213	21	"	41	35	14	28	32	24	41	
154	23	"	37	33	11	31	16	22	40	

2. EFECTO LOCAL

La inhibición de la absorción de azúcares por el mercurio podía ser debida a una intoxicación general del animal. Para discriminar esta posibilidad, en algunos animales se practicaron simultaneamente experiencias de absorción en dos asas contiguas de intestino. En el asa proximal se realizaron cuatro absorciones sucesivas de glucosa sin Hg^{++} ; en la distal, otras

cuatro de suero fisiológico, la segunda y cuarta de ellas conteniendo Cl_2Hg a concentración 10^{-3} M. De este modo la cantidad de Hg^{++} que pudiera absorberse y pasar a la circulación general sería prácticamente del mismo orden que el correspondiente a las absorciones en que el inhibidor acompañaba a la glucosa. Los resultados (tabla III) revelan que de este modo la penetración del Hg^{++} no afecta a la absorción de glucosa por una asa intestinal distinta. La inhibición ha de atribuirse a un efecto local del Hg^{++} sobre el mismo epitelio que absorbe el azúcar y no a una acción tóxica general.

TABLA III

Absorción intestinal de glucosa (5,4 %) en la rata, simultáneamente a la presencia de cloruro mercúrico (10^{-3} M) en asa intestinal distinta

Peso gr.	Asa cm.	Glucosa absorbida (12M/cm.)					
		1. ^a Gluc. Abs.	2. ^a Gluc. Abs. Inhib. %		3. ^a Gluc. Abs. Inhib. %		4. ^a Gluc. Abs. Inhib. %
118	21	44	46	—	44	—	47
133	16	42	43	—	42	—	44
180	20	43	45	—	43	—	46
112	22	46	45	—	44	—	40
118	23	42	40	—	44	—	44
205	16	55	60	—	59	—	61
227	24	46	45	—	46	—	47
171	22	33	34	—	31	—	29

3. LAVADO CON VERSENO

Los anteriores resultados hacían pensar en que el ion mercuríco debía ser fuertemente fijado por las proteínas de la mucosa, bien en la superficie o en el interior de la célula. En el laboratorio (1) se había ensayado el efecto de lavar el intestino con solución de suero fisiológico conteniendo verseno y no se encontró influencia apreciable sobre las sucesivas absorciones de glucosa. Resultaba interesante investigar si el verseno era capaz de separar el mercurio de sus puntos de fijación en la mucosa. Después de una absorción normal con glucosa se hacía otra absorción de glucosa en presencia de Cl_2Hg , 5×10^{-4} o 10^{-3} M. A continuación se lavaba el intestino con suero fisiológico y después varias veces con suero fisiológico conteniendo verseno (sal trisódica al 1 por 1.000). Luego se practicaban la tercera y cuarta absorciones de solución de glucosa sin el inhibidor.

Los resultados (tabla IV) muestran que el tratamiento con verseno es ineficaz para restaurar la capacidad absorbente del intestino. En las dos absorciones posteriores al lavado, las inhibiciones son de un orden semejante a las que se producían sin lavar con verseno. La presencia del ion mercúrico en la segunda absorción altera la mucosa de manera que su capacidad de transporte sigue decreciendo aún cuando se desionice la superficie celular.

TABLA IV

Acción del cloruro mercúrico sobre la absorción de glucosa (5,4 %) por el intestino de rata. Después de la segunda absorción se desioniza la mucosa intestinal con solución de nulapon (verseno)

Peso gr.	Asa cm.	[M]	Glucosa absorbida (μ M/cm.)							
			1. ^a Gluc. Abs.	2. ^a Gluc. + Cl ₂ Hg Abs.	Inhib. % _a	3. ^a Gluc. Abs.	Inhib. % _c	4. ^a Gluc. Abs.	Inhib. % _o	
134	25	10 ⁻³	41	34	17	31	24	26	36	
182	26	"	39	27	31	14	64	9	76	
139	25	"	40	32	20	20	50	15	62	
139	25	"	44	36	9	22	50	18	59	
140	21	5 × 10 ⁻⁴	28	26	7	21	25	15	46	
175	25	"	47	41	12	29	38	15	68	
182	24	"	39	32	17	24	38	15	61	
160	18	"	31	25	19	22	29	13	58	

Se han realizado algunas experiencias del siguiente modo: Después de una absorción normal de glucosa, se practica otra de glucosa con Cl₂Hg, 5 × 10⁻⁴ M. A continuación se lava el intestino según costumbre con solución salina isotónica; el líquido de lavado arrastra Hg⁺⁺ identificándole por el precipitado que da con Cl₂Sn. Se lava repetidamente con solución salina isotónica (4 veces) para arrastrar todo el Hg⁺⁺ posible: en el 2.º, 3.º y 4.º líquido de lavado ya no se identifica Hg⁺⁺ con cloruro estannoso. Se lava ahora con verseno, dejando la solución durante unos diez minutos en el asa intestinal; el verseno ha fijado Hg⁺⁺ dando precipitado con el Cl₂Sn. Un segundo lavado semejante con verseno, da aún ligera positividad. El tercero y cuarto lavados resultan negativos. El verseno no desaloja ya más Hg⁺⁺ de la mucosa. En estas condiciones, se practican dos absorciones sucesivas de glucosa isotónica, encontrando inhibición del 30 y del 45 % respectivamente.

Terminadas las absorciones se extrae del animal el asa intestinal, se desprende la mucosa con cuidado y se lava con ClNa isotónico. Este lavado no separa Hg⁺⁺. Se incuba la mu-

cosa con verseno y en el líquido no se encuentra tampoco Hg^{++} o, acaso, trazas. Se homogeiniza la mucosa (homogeinizador tipo POTTER-ELVEHJEM, 8), se suspende el homogenado en solución de verseno y se centrifuga: en el sobrenadante se encuentra positividad Hg^{++} al Cl_2Sn . Resuspendiendo el sedimento en nueva solución de verseno, no se separa más Hg^{++} . Se lava otra vez con el sedimento del mismo modo y se digiere con 10 c. c. de NO_2H concentrado en caliente. En la solución obtenida no se señala Hg^{++} . En algún caso en que se hizo la digestión con ácido nítrico antes de homogeinizar, se encontró, en cambio, fuerte positividad.

Todo ello indica que el ion mercuríco presente en la solución de glucosa a absorber se ha fijado parcialmente a la superficie de la mucosa y otra parte ha penetrado en las células. Esta fijación de Hg^{++} es en ambos casos reversible por verseno. Para separar el ion mercuríco de la superficie celular basta uno o dos lavados del asa con solución de verseno. Para separar el Hg^{++} que ha penetrado en las células se necesita homogeneizar la mucosa previamente. La separación del ion mercuríco de sus puntos de fijación en la membrana no evita la inhibición de la absorción, debido al efecto del Hg^{++} en el interior de la célula.

Discusión

El cloruro mercuríco inhibe fuertemente la absorción intestinal de glucosa, cuando está presente en la solución a absorber. El efecto recuerda a la inhibición encontrada por el Cu^{++} (6), Ce^{++} (4) y el uranilo (5). La inhibición es progresiva, en el sentido de que el intestino que se pone en presencia del inhibidor va perdiendo capacidad absorbente con el tiempo. Y suprimiendo el Hg^{++} de la luz intestinal por lavado con suero fisiológico, sigue inhibida la absorción porque el ion mercuríco ha quedado fijado a la mucosa, y la altera de un modo progresivo. Efectivamente, en las terceras absorciones (tabla I) la inhibición es, por lo general, mayor que en las segundas.

Las absorciones de glucosa simultáneas a administración de Cl_2Hg por asa intestinal distinta, no dejan lugar a duda sobre que el efecto es local, en la misma mucosa absorbente, descartando la posibilidad de una inhibición por intoxicación general del animal. La cantidad de ion mercuríco que puede pasar a la circulación general no influye apreciablemente sobre la absorción del azúcar, al menos durante el tiempo de duración de nuestras experiencias.

El efecto inhibitor del ion mercúrico sobre la penetración de glucosa ha sido referido por LEFÉVRE (3) en eritrocitos. El sistema era extremadamente sensible al Hg^{++} , observando marcadas inhibiciones con Cl_2Hg 10^{-6} M. Con *p*-cloromercuri-benzoato, conocido inhibidor sulfhídrico, hay también inhibición a concentraciones 2×10^{-6} M y superiores. Estas inhibiciones eran prevenidas o hechas reversibles por cisteína. WILDEBRANDT (11) confirmó estos resultados.

También se demostró, más recientemente, la inhibición de la utilización de la glucosa por el diafragma de rata. DEMIS (2) observó que el ion mercúrico (2×10^{-4} M) inhibía muy rápidamente el consumo de glucosa en condiciones aerobias y en proporción mucho menor el consumo de oxígeno. El efecto sobre la utilización de glucosa era reversibilizado por BAL, cisteína y albúmina de huevo, lo que no ocurría con el efecto sobre la respiración. Deducía de aquí que el ion mercúrico inhibía el transporte de glucosa a través de la membrana por un efecto en la superficie y que para inhibir la respiración se precisaba dar tiempo a la lenta penetración de suficiente Hg^{++} en la célula. Efectivamente, una misma concentración de Hg^{++} era mucho más eficaz sobre la respiración de homogenados que en células intactas. La célula muscular, ante el Hg^{++} , primero lo fija superficialmente y luego va penetrando.

En nuestro caso, la inhibición por el ion mercúrico es menos intensa que en los eritrocitos y en diafragma de rata. Y, de otra parte, parece ser debida a un efecto endocelular. Esto último lo apoyan varios hechos. En primer lugar, el efecto va aumentando con el tiempo aun cuando se haya retirado la solución de Cl_2Hg de la luz del intestino, lo que habla en favor de una alteración progresiva de la capacidad de transporte de la célula, poco explicable por la fijación del ion mercúrico en la superficie, que es un proceso relativamente rápido y que no puede aumentar al retirarlo de la solución. En segundo término, la desionización con verseno — agente que no penetra en la célula —, aunque desaloja al Hg^{++} de sus puntos de aplicación en la membrana, no mejora nada la absorción ulterior de glucosa. Por último, el ion mercúrico ha penetrado en buena parte en la célula, como lo prueba el que el verseno puede fijarlo una vez homogeneizada la mucosa. No puede pensarse en que el Hg^{++} quede retenido en la superficie celular en combinación no reversible por el verseno, ya que una digestión nítrica posterior de la mucosa no permite separar otra fracción. La sensibilidad del reactivo (Cl_2Sn) sin permitir una absoluta garantía en estas afirmaciones, es lo suficiente como para que sean fundadamente admitidas.

Hemos visto que en el caso del uranilo (7) el comportamiento era diferente, ya que la inhibición producida era bastante bien reversibilizada por el verseno, de acuerdo con su carácter de inhibidor no penetrante.

El efecto del ion mercuríco debe ejercerse por un bloqueo del metabolismo celular, con inhibición del consumo de oxígeno. Son demasiado numerosas las enzimas inhibidas por el Hg^{++} a estas concentraciones, para que intentemos discutir su lugar preferente de acción. En todo caso, esta alteración metabólica va produciendo una progresiva intoxicación de las células de la mucosa que perturba de modo creciente e irreversible el acoplamiento energético imprescindible para el transporte activo de azúcares.

Es interesante, a este respecto, que la absorción de galactosa se inhiba por el ion mercuríco de un modo muy semejante a la glucosa, en tanto que algunas experiencias realizadas con fructosa, no incluídas en los resultados, no parecen afectarse, o al menos no se ve en ellos clara inhibición. Ello estaría de acuerdo con el hecho de que la glucosa y galactosa que son transportadas a velocidad aproximadamente doble de la fructosa, son más sensibles a cualquier acción que perturbe el proceso de absorción selectiva.

Resumen

Se estudia con la técnica de SOLS y PONZ de absorciones sucesivas, la acción del ion mercuríco sobre la absorción de glucosa y galactosa por el intestino de rata. La inhibición de la absorción de glucosa por el ion mercuríco se presenta desde concentraciones de 2×10^{-4} . El efecto es creciente con el tiempo, de modo que las terceras absorciones sin el inhibidor, el intestino absorbe menos glucosa. La acción inhibidora del cloruro mercuríco sobre la absorción de galactosa por el intestino de rata es, aproximadamente del mismo orden, que para la glucosa. El efecto es local sobre la mucosa, no teniendo efecto su presencia en asa intestinal distinta de aquella por la que se absorbe el azúcar. La desionización del intestino con verseno es ineficaz para restaurar la capacidad absorbente del intestino inhibida por el ion mercuríco. Se discute el efecto del ion mercuríco, y se supone que su acción debe ejercerse por un bloqueo del metabolismo celular, con inhibición del consumo de oxígeno.

Summary

Inhibition of intestinal absorption of sugars by mercuric ion

The effects of mercuric ion on intestinal absorption of sugars in the rat is studied. The method followed is that of successive absorptions of SOLS and PONZ (10) in loops of intestine of 20 to 30 cm. length «in situ». Sugar was given in isotonic solution and each absorption was of thirty minutes.

The sugar absorbed is expressed in the tables in micromols per centimetre intestine. Mercuric ion (Cl_2Hg) was dissolved in the sugar solution.

In table I are seen the results of addition of mercuric ion (10^{-5} to 10^{-3} M). A first absorption was done glucose, the second with glucose and Hg^{++} , a third, after abundant washing of the intestine, with glucose only, and lastly a fourth with glucose and inhibitor. Inhibiting effect is evident from 2×10^{-4} M. At this concentration 10-15 % is inhibited (2nd absorption), 17-20 % (3rd absorption) and 25 to 30 % (4th absorption). Inhibition increases with the concentration and rises with successive absorptions.

The absorption of galactose (Table II) is inhibited as that of glucose.

The absorption of Hg^{++} from an intestinal loop other than that from which glucose is absorbed (Table III), does not affect the absorption of sugar, thus excluding the possibility that the inhibition is due to a central toxic effect.

The effect of Hg^{++} is not modified if the mucous membrane is deionized after the second absorption by washing with versene (trisodic salt).

Versene solution, after washing, actually fixed Hg^{++} (a positive reaction to SnCl_2). If the deionized mucous membrane is carefully separated and washed with isotonic solution of NaCl no Hg^{++} is given off, fresh washing with versene still gives no Hg^{++} . If it is then homogenised, versene separates all the endocellular mercury. Later, digestion with NO_3H does not displace any more Hg^{++} .

Mercuric ion appears to exercise inhibition on the absorption of sugars by an intracellular effect. At least, separation of the Hg^{++} fixed on the cell surface does not improve absorption. Alteration of cell metabolism provoked by the mercuric ion is progressive and thus explains the growth in inhibition with time, as the energy necessary for active transport is made increasingly difficult.

Bibliografía

- (1) ALEMANY, I.: Trabajos de Tesis Doctoral, en curso, no publicados 1957.
- (2) DEMIS, D. J.: University of Rochester, Atomic Energy Project Report UR-297, 1953.
- (3) LEPEYRE, P. G.: *J. Gen. Physiol.*, 31, 505, 1948.
- (4) LLUCH, M., y PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, 9, 135, 1953.
- (5) PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, 8, 217, 1952

- (6) PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **9**, 205, 1953.
- (7) PONZ, F., PARÉS, R. y LLUCH, M. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XXXIX, Suppl. n.º II, 55 1957.
- (8) POTTER, V. R., y ELVEHJEM, C. A. : *J. Biol. Chem.*, **114**, 495, 1936.
- (9) SOLS, A. : *R. esp. Fisicl.*, **5**, 149, 1949.
- (10) SOLS, A., y PONZ, F. : *R. esp Fisiol.*, **3**, 207, 1947.
- (11) WILDEBRANDT, W. : *Arch. exptl. Path. Pharmacol.*, **219**, 9, 1950.