

Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Inhibición por el uranilo del transporte de azúcares por la mucosa intestinal

por

M. Lluch y F. Ponz

(Recibido para publicar el 1 de diciembre de 1960)

En un trabajo previo (7) uno de nosotros demostró que el ion uranilo inhibía el transporte activo de glucosa por la mucosa intestinal, efecto que había sido encontrado también por MUNTZ, SINGER y BARRON en la levadura (5) y confirmado luego en nuestro laboratorio por PARÉS (6). Se interpretaba esta acción como resultado de la formación de complejos entre el uranilo y algún componente de la membrana, dado que el ion en estudio es no penetrante.

Para investigar el efecto del uranilo en relación con el mecanismo de transporte, resultaba de interés conocer el comportamiento del referido ion sobre la absorción de diferentes azúcares, así como la posibilidad de ver si era reversible la inhibición por separación del uranilo de sus lugares de unión en la membrana.

En el presente trabajo se estudia la acción del uranilo sobre la absorción intestinal de d-glucosa, d-galactosa, d-fructosa y l-arabinosa y se separa el uranilo de sus complejos en la superficie celular mediante la formación de quelatos con el ácido etilendiaminotetracético (EDTA).

Material y métodos

Se han utilizado ratas de 100 a 200 gramos de peso, a las que se practicaban absorciones sucesivas en una asa de intes-

tino *in situ* según la técnica de SOLS y PONZ (13) habitual en nuestro laboratorio. Para las hexosas se utilizaba un volumen inicial de 10 ml, con presión de repleción de 12 cm de agua y 30 minutos de duración. Las experiencias con arabinosa se han practicado según una modificación nuestra (8) a la referida técnica con volumen iniciales de 2 ml y con tiempos de absorción de 60 minutos.

Las soluciones de azúcares a absorber eran siempre de 0,3M. En cada animal se han practicado cuatro absorciones sucesivas.

El uranilo se utilizaba como nitrato, disuelto en las soluciones de azúcar a absorber. El EDTA como sal trisódica, al 1 %.

Las determinaciones de los azúcares se hacían por su poder reductor, colorimétricamente, según SOMOGY (12), frente a solución patrón de cada uno.

Los resultados se expresan en micromoles de azúcar absorbido por centímetro de longitud de intestino (14). Las inhibiciones inferiores al 10 % no se toman en consideración.

Resultados

1. INHIBICIÓN DE LA ABSORCIÓN DE AZÚCARES POR EL URANILO

Con la d-glucosa, d-galactosa y d-fructosa de las cuatro absorciones sucesivas que se practican en cada animal, las primera y tercera se hacían con solución del azúcar sin inhibidor, y la segunda y cuarta con igual solución, pero en presencia del ion uranilo a distintas concentraciones. En las tablas se expresan los resultados junto con las inhibiciones en tantos por ciento respecto de la primera absorción que se toma como normal.

En la Tabla I se reúnen los resultados de la absorción de d-glucosa a diferentes concentraciones de uranilo. La inhibición aparece ya con concentraciones de $1,5 \times 10^{-4}$ M (cuartas absorciones) y son más marcadas al aumentar la concentración del inhibidor (figura 1).

Las cuartas absorciones son más afectadas (inhibidor presente por segunda vez) que las segundas. En las terceras absorciones, sin adición de inhibidor, pero sucesivas a aquéllas en que el uranilo había estado presente, aparecen efectos inhibidores más acusados y constantes que en las inmediatamente anteriores, (2.ª absorciones). Estos efectos se presentan a pesar del abundante lavado del intestino con solución fisiológica, lo que indica que el uranilo ha formado complejos con componentes superficiales de la mucosa de los que no se separa con solución salina.

TABLA I

Efecto del nitrato de uranilo sobre la absorción intestinal de d-glucosa (0,3 M)

Peso gr	Asa cm	[UO ₂ "]	Glucosa absorbida (μM/cm)							
			1.ª Gluc. Abs.	2.ª Gluc.+UO ₂ ="		3.ª Gluc.		4.ª Gluc.+UO ₂ ="		
				Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	
115	17	10 ⁻⁴	47	48	—	49	—	50	—	
137	18	»	59	62	—	57	—	60	—	
195	19	»	63	65	—	66	—	66	—	
160	22	1,5 × 10 ⁻⁴	52	50	—	48	—	47	—	
125	17	»	46	40	13	42	—	38	16	
150	17	»	49	49	—	43	12	43	12	
130	16	»	52	47	—	44	15	44	15	
135	13	»	56	55	—	56	—	56	—	
115	17	»	50	50	—	47	—	47	—	
158	14	»	74	67	10	69	—	66	11	
185	22	2 × 10 ⁻⁴	50	44	12	43	14	32	36	
197	17	»	57	44	22	38	34	32	43	
140	17	»	57	55	—	49	14	27	52	
130	17	»	62	57	—	52	16	47	24	
103	19	»	33	33	—	23	30	17	47	
187	19	»	34	33	—	25	26	19	44	
137	14	5 × 10 ⁻⁴	55	42	24	37	32	18	67	
140	21	»	57	50	12	29	49	18	68	
120	13	»	74	55	25	41	44	29	60	
175	16	»	55	48	13	42	24	28	49	

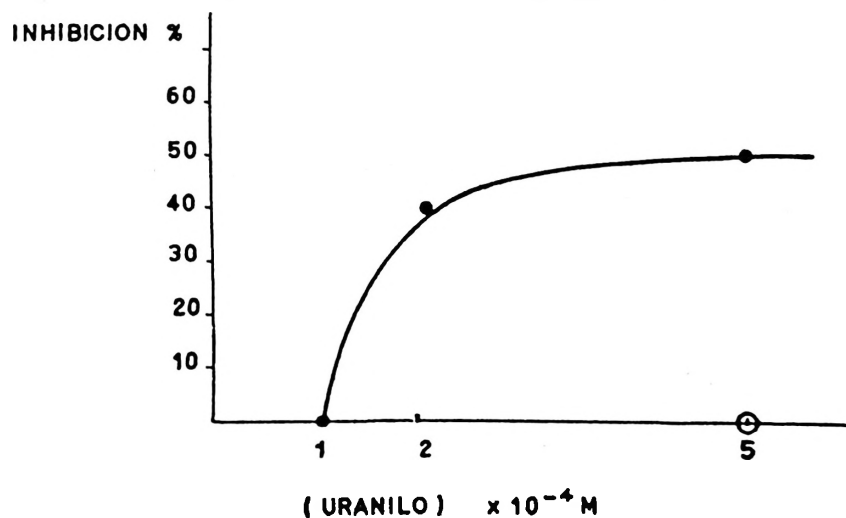


Figura 1.— Inhibición de la absorción intestinal de glucosa por el ion uranilo

- uranilo presente
- después tratamiento con EDTA

Los efectos sobre la absorción de d-galactosa se pueden ver en la Tabla II. Se ha utilizado solamente uranilo a concentración 5×10^{-4} M, que producían fuertes inhibiciones de absorción de glucosa. El uranilo se muestra también eficaz inhibidor de la absorción intestinal de d-galactosa, e incluso parece actuar con mayor intensidad. Su comportamiento respecto de las distintas absorciones sucesivas es semejante al referido para la glucosa:

TABLA II

Efecto del nitrato de uranilo (5×10^{-4} M) sobre la absorción intestinal de d-galactosa (0,3 M)

Peso gr	Asa cm	Galactosa absorbida (μ M/cm)							
		1.ª Galac. Abs.	2.ª Galac. + UO_2^{2+}		3.ª Galac.		4.ª Galac. + UO_2^{2+}		
			Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	
202	18	57	21	63	41	28	14	75	
138	23	45	34	25	31	31	13	71	
102	18	42	26	38	26	38	8	80	
133	24	43	29	33	21	51	15	65	
120	18	55	36	36	45	20	16	71	

Con la d-fructosa (Tabla III) el uranilo 5×10^{-4} M no tiene efecto. A concentración doble, 10^{-3} M, sin embargo, produce también inhibición, aún cuando de menor intensidad que la que se consigue a concentración 5×10^{-4} M sobre la absorción de glucosa.

TABLA III

Efecto del nitrato de uranilo sobre la absorción intestinal de d-fructosa (0,3 M)

Peso gr	Asa cm	[UO_2^{2+}]	Fructosa absorbida (μ M/cm)							
			1.ª Fruct. Abs.	2.ª Fruct. + UO_2^{2+}		3.ª Fruct.		4.ª Fruct. + UO_2^{2+}		
				Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	
185	21	5×10^{-4}	57	55	—	59	—	60	—	
142	18	»	43	43	—	45	—	41	—	
160	23	»	40	40	—	41	—	44	—	
150	20	»	20	20	—	20	—	22	—	
145	18	»	21	21	—	22	—	22	—	
135	19	»	24	24	—	24	—	26	—	
140	18	»	21	21	—	23	—	23	—	
135	15	10^{-3}	48	37	23	47	—	36	25	
125	16	»	31	24	22	37	—	18	42	
125	18	»	38	24	36	26	31	23	39	

En los experimentos con l-arabinosa, las dos primeras absorciones sucesivas se realizaban en ausencia de inhibidor, la tercera con uranilo y la cuarta de nuevo sin inhibidor. Con este azúcar se toma como absorción normal la correspondiente a la segunda absorción (4 y 8). En la Tabla IV puede verse que las concentraciones 5×10^{-4} M y 10^{-3} M de uranilo, carecen de efecto sobre la absorción intestinal de arabinosa.

TABLA IV

Acción del nitrato de uranilo sobre la absorción intestinal de l-arabinosa ($0,3$ M)

Peso gr	Asa cm	[UO ₂] ²⁺	Arabinosa absorbida (μ M/cm)					
			1.ª Arab. Abs.	2.ª Arab. Abs.	3.ª Arab.+UO ₂ Abs.	Inhib. %	4.ª Arab. Abs.	Inhib. %
108	9	5×10^{-4}	17	11	10	12	9	23
127	10	»	18	13	15	—	15	—
148	10	»	21	7	6	21	6	21
145	11	»	32	27	27	—	28	—
118	10	»	34	24	25	—	25	—
195	8	»	15	8	8	—	8	—
175	12	»	17	9	9	—	9	—
205	9	»	16	10	9	—	9	—
175	10	»	20	8	8	—	8	—
123	10	10^{-3}	17	10	10	—	9	—
110	9	»	19	11	11	—	10	—
115	11	»	20	13	12	—	11	—
125	12	»	17	9	9	—	10	—

En algunos animales se han utilizado simultáneamente dos porciones de intestino. En una de ellas se verificaban cuatro absorciones sucesivas de solución $0,3$ M de d-glucosa, mientras que en la otra se disponía simultáneamente a la primera y tercera absorción, solución de ClNa $0,9$ % y durante la segunda y cuarta, solución de nitrato de uranilo 5×10^{-4} M. La presencia de uranilo en asa intestinal distinta a la que absorbe glucosa no ejerce influencia alguna sobre la absorción del azúcar (Tabla V). Esto, como era de esperar por su escasa o nula penetración, excluye la posibilidad de que el uranilo produzca sus efectos previo paso a la circulación general e indica que su acción es local sobre la misma mucosa absorbente.

TABLA V

Absorción intestinal de d-glucosa (0,3 M) en la rata, simultáneamente a la presencia de Nitrato de Uranilo (5×10^{-4} M) en asa intestinal distinta.

Peso gr	Asa cm	Glucosa absorbida (μ M/cm)							
		1.ª Gluc.		2.ª Gluc.		3.ª Gluc.		4.ª Gluc.	
		Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %	Abs.	Inhib. %
134	19	47	—	45	—	50	—	48	—
115	21	43	—	45	—	47	—	41	—
125	20	49	—	52	—	50	—	47	—

2. REVERSIBILIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN POR EL URANILO MEDIANTE EL EDTA

Dada la muy escasa o nula penetrabilidad del ion uranilo en las células (10), se intentó separarlo de sus complejos en la membrana por la acción quelante del EDTA.

Para ello, después de una absorción de azúcar con uranilo presente, se verificaban tres lavados sucesivos con solución de EDTA al 1 %. En cada uno de ellos la solución de EDTA quedaba durante diez minutos en el interior del asa intestinal. A continuación se lavaba varias veces con suero fisiológico y se practicaban dos nuevas absorciones sucesivas.

En la Tabla VI y fig. 1 se puede apreciar que la inhibición con uranilo 5×10^{-4} M es totalmente suprimida por el tratamiento con EDTA.

TABLA VI

Inhibición de la absorción intestinal de d-glucosa por el uranilo (5×10^{-4} M) y su reversibilización por EDTA.

Peso gr	Asa cm	Glucosa absorbida (μ M/cm)							
		1.ª Gluc. Abs.	2.ª Gluc. + UO ₂ Abs.	Inhib. %	Tratamiento con EDTA	3.ª Gluc. Abs.	Inhib. %	4.ª Gluc. Abs.	Inhib. %
167	23	36	30	16		35	—	37	—
143	29	34	27	20		33	—	37	—
108	21	36	28	22		36	—	34	—
153	20	43	35	18		42	—	40	—

TABLA VII

Inhibición de la absorción intestinal de d-fructosa por el uranilo (10^{-3} M) y su reversibilización por EDTA.

Peso gr	Asa cm	Fructosa absorbida (μ M/cm)							
		1.ª Fruct. Abs.	2.ª Fruct.+UO ₃ Abs.	Inhib. %	Tratamiento con EDTA	3.ª Fruct. Abs.	Inhib. %	4.ª Fruct. Abs.	Inhib. %
157	19	27	20	25		25	—	24	10
217	20	23	18	21		20	10	20	10
137	20	20	16	20		19	—	21	—
145	18	26	20	23		24	—	23	10
150	17	22	18	18		21	—	21	—

En el caso de la absorción intestinal de d-fructosa, con concentraciones de 10^{-3} M de uranilo (Tabla VII), se consigue también que desaparezca prácticamente el efecto inhibitor, aunque en algún caso subsiste una débil disminución de la absorción.

Discusión

El uranilo es un eficaz inhibidor de la absorción intestinal de glucosa y galactosa, que son azúcares rápidamente absorbidos gracias a los mecanismos de transporte. La absorción de fructosa, azúcar que se transporta a proporción menor y muy probablemente mediante su conversión a glucosa en la mucosa (2), resulta mucho menos afectada por el uranilo. La arabinosa, que no se transporta activamente (15), se absorbe con total independencia de la presencia del ion uranilo. Parece así que la inhibición por el uranilo está en relación con la capacidad de la mucosa para el transporte activo de azúcares, y no debe considerarse atribuible a un efecto inespecífico sobre los componentes de la membrana.

Es bien conocida la capacidad de formación de complejos entre el uranilo y muy diversos compuestos. En la levadura se ha atribuido la inhibición de la utilización de la glucosa a su combinación con las proteínas de la membrana (1), o con polifosfatos (11). Previamente hemos sugerido que en la mucosa intestinal pudiera deberse a la formación de complejos con el ATP de la membrana (7), pero falta base experimental para ello. En otros casos, como en la inhibición de la invertasa en la superficie celular de la levadura, el efecto se ha atribuido a una combinación del uranilo con grupos carboxilo (3).

En todo caso, las combinaciones del uranilo en la membrana son estables al lavado con suero fisiológico, como lo evidencian las terceras absorciones. En las Tablas I y II se ve con claridad que en estas absorciones sin uranilo, pero que siguen a una en la que el referido ion ha estado presente, se sigue manifestando la inhibición en igual o incluso mayor grado, aún cuando entre ambas absorciones haya mediado un abundante lavado del intestino con ClNa al 0,9 %. Los casos en que la inhibición es aún mayor en estas condiciones pueden explicarse porque la formación de complejos entre el uranilo y los componentes respectivos de la membrana no debe ser instantánea sino lenta y así no se alcanza la máxima inhibición hasta que se lleva cierto tiempo de absorción.

Cualesquiera que sean los grupos eficaces de la membrana con los que forma complejo el uranilo, pueden ser liberados de este ion mediante la acción quelante del EDTA. Basta en efecto poner en presencia de la membrana durante un tiempo adecuado una solución de EDTA al 1 % para que se consiga dejar a la mucosa con su capacidad normal de absorción de los azúcares activamente transportados.

Resumen

Se investiga en ratas por el método de absorciones sucesivas el efecto del uranilo sobre la absorción de diversos azúcares. La absorción de glucosa y galactosa se inhibe muy apreciablemente con uranilo 5×10^{-4} M. La de fructosa requiere concentraciones dobles y aún así es más débil. No hay efecto (10^{-3} M) sobre la absorción de arabinosa. La inhibición se atribuye a la formación de complejos entre el uranilo y grupos químicos de la membrana y desaparece por la acción quelante del EDTA.

Summary

Uranyl inhibition of the sugar transport by the intestinal mucosa

Sugar absorption in rats is studied by the SOLS and PONZ's method. Four successive absorption in an intestinal loop *in vivo* are performed in each animal. With hexoses, in the first and third absorptions sugar solutions had no uranyl and in the second and fourth ones they were with uranyl present. With l-arabinose, uranyl only was present in the third absorption, because the absorption rate becomes regular from the second one.

D-Glucose and D-galactose absorption is notably inhibited with uranyl 5×10^{-4} M (Tables I and II). Inhibition of D-fruc-

tose absorption requires 10^{-3} M concentration and is very much lower than upon the other hexoses (Table III). Uranyl has no effect (10^{-3} M) on the L-arabinose absorption.

Uranyl inhibition seems also related to the active transport mechanism, and it is selective.

Uranyl forms complexes with components of the membrane involved in the sugar transport. The binding reaction must be not instantaneous. These complexes are stables against physiologic saline solutions, but are solved by EDTA. Effectively, EDTA treatment completely reversibilizes uranyl inhibition, through its quelating action.

Bibliografía

- (1) BARRON, E. S. G., MUNTZ, J. A., and GASVODA, B.: *J. Gen. Physiol.*, **32**, 163, 1948.
- (2) DARLINGTON, A., and QUASTEL, J. H.: *Archiv. Biochem.*, **43**, 194, 1953.
- (3) DEMIS, J., ROTHSTEIN, A., and MEIER, R.: *Archiv. Biochem. and Biophys.*, **48**, 55, 1954.
- (4) LARRALDE, J., y GIRÁLDEZ, A.: *R. esp. Fisiol.*, **13**, 153, 1957.
- (5) MUNTZ, J. A., SINGER, T. P., and GUZMÁN BARRÓN, E. S.: *The effect of Uranium on the metabolism of yeast and bacteria*, MDDC, n.º 759 (U.S.A.E.C.).
- (6) PARÉS, R.: *R. esp. Fisiol.*, **12**, 73, 1956.
- (7) PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, **8**, 217, 1952.
- (8) PONZ, F., y LLUCH, M.: *R. esp. Fisiol.*, **16**, 321, 1960.
- (9) ROTHSTEIN, A., FRENKEL, A., and LARRABEE, C.: *J. cell. comp. Physiol.*, **37**, 261, 1948.
- (10) ROTHSTEIN, A., and LARRABEE, C.: *J. cell. comp. Physiol.*, **32**, 247, 1948.
- (11) ROTHSTEIN, A., and MEIER, J.: *J. cell. comp. Physiol.*, **38**, 245, 1951.
- (12) SOLS, A.: *R. esp. Fisiol.*, **5**, 149, 1949.
- (13) SOLS, A., and PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, **3**, 207, 1947.
- (14) VIDAL-SIVILLÀ, S., SOLS, A., y PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, **6**, 195, 1950.
- (15) WILSON, T. H., and LANDAU, B. R.: *Amer. J. Physiol.*, **198**, 99, 1960.