

Laboratorio de Fisiología Animal  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Barcelona

## **Consumo de $O_2$ de la mucosa intestinal en función de la concentración de azúcares en el medio**

por

**J. Balasch \* y F. Ponz**

---

(Recibido para publicar el 13 de noviembre de 1963)

A pesar del gran interés que ha despertado el estudio del transporte activo de azúcares por la mucosa intestinal, son relativamente escasos los datos referentes al metabolismo de la mucosa en relación con la diversa naturaleza de los azúcares presentes en el medio.

Es de antiguo conocido el elevado consumo de  $O_2$  que presenta la mucosa intestinal. Ya Warburg (16) encontró un  $QO_2$  de 12,4 con mucosa de intestino delgado de rata en presencia de glucosa. Valores de parecido orden fueron encontrados por distintos autores (1, 5, 6, 12) con mucosa de intestino grueso de rata y conejo (12) o cobayo (1), íleon (5) o yeyuno (6) de rata, siempre en presencia de glucosa. En rata la mucosa de yeyuno tiene más alta respiración que la del íleon y colon (6).

En ausencia de glucosa (9, 11) el consumo de  $O_2$  es menor, aún cuando también hay algunas observaciones contrarias (3, 6).

Dentro de la línea de trabajo de este laboratorio sobre el problema del transporte de azúcares, era interesante conocer el consumo de  $O_2$  de la mucosa en ausencia de sustrato exterior, y sus variaciones en función de la presencia de diversos azúcares

---

\* Con una Beca de la fundación Juan March para 1962.

en el medio exterior a diversas concentraciones. Se pretendía averiguar hasta qué punto el transporte activo requiere un aumento del consumo de  $O_2$  de la mucosa, así como alguna indicación sobre las posibles fuentes de energía metabólica requerida para un transporte contra gradiente.

### Material y métodos

El consumo de  $O_2$  y la producción de  $CO_2$ , se determinaron en atmósfera de  $O_2$  por el método ordinario y por el método directo de Warburg, respectivamente (15). Los preparados de mucosa se obtenían: Ratas albinas de ambos sexos de 90 a 180 gramos de peso, eran sacrificadas por golpe en la nuca. Se tomaba un segmento de intestino delgado de unos 15 cm. a partir de 4 cm. del píloro, que se lavaba con solución Krebs-Ringer-fosfato a presión varias veces. Abierto longitudinalmente y extendido sobre un vidrio plano se separaba la mucosa mediante raspado con un portaobjetos (6). Porciones de la mucosa obtenida eran pesadas en fresco y se pasaban a los matraces de Warburg. Con alguna práctica, las distintas porciones de mucosa no diferían entre sí en más de un 15 %.

Cada matraz contenía 2 ml. de solución Krebs-Ringer-fosfato en los que se suspendía la mucosa, 0'2 ml. de KOH 10 % en el pocillo central, 0'5 ml. de solución conteniendo sustrato en el brazo lateral que se mezclaban en el momento conveniente. Se hacía pasar por los matraces  $O_2$  durante tres minutos.

La temperatura del baño era de 37° C; la agitación de 100 oscilaciones por minuto, con amplitud de 3'5 cm. Se efectuaban las lecturas de intercambio gaseoso durante los primeros sesenta minutos. Los resultados se expresan en microlitros de  $O_2$  consumidos o microlitros de  $CO_2$  desprendidos por 100 mg. de tejido húmedo en 60 minutos. La relación de este peso húmedo al peso seco era muy constante (87 %  $\pm$  0'5 de  $H_2O$ ).

Se determinó el consumo de  $O_2$  y el Cociente Respiratorio sin sustrato, y con la adición de Glucosa, Fructosa, Galactosa, Arabinosa, y 3-oxi-metilglucosa. Los cuatro últimos fueron previamente purificados de Glucosa por tratamiento con Glucosa oxidasa (7). Para la determinación de azúcar reductor, cuando ha sido necesario, se ha seguido el método de Somogyi (14).

### Resultados

CONSUMO DE OXÍGENO EN PRESENCIA DE AZÚCARES. — Se ha estudiado el consumo de oxígeno de los preparados de mucosa, en ausencia de sustrato exterior y en presencia de diversos azúcares.

Se escogieron azúcares representativos por lo que se refiere a su utilización metabólica por la mucosa y a su capacidad de ser activamente transportable. Glucosa como azúcar activamente transportable y bien metabolizable; galactosa que se transporta activamente y se metaboliza muy poco, 3-oxi-metil-glucosa que también se transporta y no se metaboliza, fructosa que no se transporta activamente, pero se metaboliza con facilidad y arabinosa que ni se transporta ni se metaboliza.

Cada uno de estos azúcares fue ensayado a distintas concentraciones. Los efectos de la presencia de azúcar se expresan como incrementos del consumo de oxígeno en tanto por ciento del consumo de oxígeno de la misma mucosa en ausencia de sustrato. Para ello distintas porciones de una misma mucosa eran incubados en ausencia o presencia del azúcar. En las tablas se da el valor medio de estos incrementos junto con su desviación media simple.

TABLA I

*Incrementos del consumo de  $O_2$  de mucosa intestinal de rata con distintas concentraciones de glucosa en el medio. Krebs-Ringer-Fosfato.*

| Concentración de glucosa en mM. | Número de preparados | Incrementos del consumo de $O_2$ en % respecto del control sin glucosa. |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 22,22                           | 5                    | 96,7 $\pm$ 3,4                                                          |
| 11,11                           | 6                    | 87,5 $\pm$ 2,5                                                          |
| 5,55                            | 5                    | 91,7 $\pm$ 0,7                                                          |
| 2,77                            | 31                   | 91,1 $\pm$ 11,08                                                        |
| 1,38                            | 12                   | 64,0 $\pm$ 9,18                                                         |
| 0,69                            | 11                   | 48,2 $\pm$ 3,52                                                         |
| 0,34                            | 6                    | 33,3 $\pm$ 3,3                                                          |
| 0,17                            | 6                    | 10,8 $\pm$ 2,2                                                          |

La mucosa intestinal de rata presenta, en ausencia de sustrato exterior, un abundante consumo de oxígeno. Se observa una amplia variabilidad según los animales (entre 4,4 y 8,8  $QO_2$ ), pero los diferentes fragmentos de una misma mucosa son coincidentes. Pese a esta variabilidad individual, los incrementos de consumo de oxígeno observados por la adición de un determinado azúcar, son relativamente constantes al referirlos al consumo de oxígeno sin adición de sustrato.

*Glucosa.* — Se ensayó a concentración entre 0,17 y 22,22 mM. Los resultados se reúnen en la Tabla I. La presencia de glucosa provoca un aumento de consumo de oxígeno que se hace mayor al aumentar la concentración de glucosa exterior, hasta que se hace prácticamente constante e independiente de la concentración

exterior del azúcar. La saturación del proceso se observa a partir de glucosa 2,77 mM. La exaltación del consumo de oxígeno se presenta ya con concentraciones muy pequeñas del azúcar, siendo ya medible con glucosa 0,17 mM.

*Fructosa.* — Con este azúcar se obtuvo también un aumento del consumo de oxígeno que sigue una marcha similar a la descrita para la glucosa, con la diferencia de que los incrementos obtenidos son menores para una misma concentración del azúcar, y que la saturación del proceso se alcanza a niveles de consumo de oxígeno notablemente más bajos (Tabla II).

TABLA II

*Incrementos del consumo de  $O_2$  de mucosa intestinal de rata con distintas concentraciones de fructosa en el medio. Krebs-Ringer-fosfato.*

| Concentración de fructosa en mM. | Número de preparados | Incrementos del consumo de $O_2$ en % respecto del basal. |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------|
| 22,22                            | 6                    | $48,0 \pm 8,0$                                            |
| 11,11                            | 6                    | $48,4 \pm 1,0$                                            |
| 5,55                             | 6                    | $48,6 \pm 0,05$                                           |
| 2,77                             | 6                    | $32,1 \pm 0,1$                                            |
| 1,38                             | 6                    | $7,8 \pm 1,4$                                             |

*Galactosa, 3-oximetilglucosa, arabinosa.* — Con estos tres azúcares no se observan incrementos de consumo de oxígeno estadísticamente significativos ni incluso con concentraciones muy altas (44,44 mM). En algunas experiencias iniciales se habían

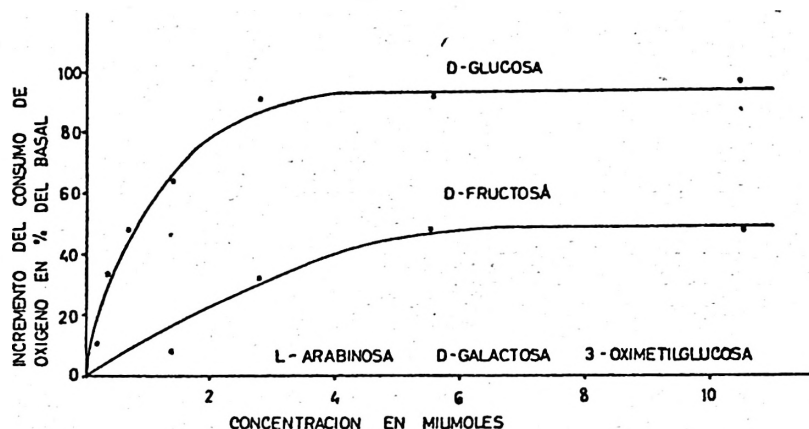


FIG. 1. Incrementos del consumo de oxígeno de mucosa intestinal de rata, provocados por distintas concentraciones de azúcares en el medio.

encontrado ligeros aumentos con 3-metilglucosa y galactosa que eran debidos a impurezas de glucosa, a pesar de la buena calidad de los preparados comerciales. Después de purificar con glucosa-oxidasa dejaron de presentarse.

En la figura 1 se reúnen los resultados obtenidos con los cinco azúcares ensayados.

TABLA III

*Incremento del consumo de O<sub>2</sub> de mucosa intestinal de rata por adición de succinato. Medio: Krebs-Ringer-fosfato. Con o sin azúcar.*

| Concentración de succinato (mM) | Número de preparados | Medio                         | Incrementos del consumo de O <sub>2</sub> en % respecto del control sin succinato. |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 7,4                             | 11                   | K.R.F.                        | 47,6 ± 2,2                                                                         |
| 7,4                             | 6                    | K.R.F.<br>+ glucosa 5,55 mM   | 36,8 ± 2,8                                                                         |
| 7,4                             | 6                    | K.R.F.<br>+ fructosa 11,11 mM | 45,1 ± 5,1                                                                         |

*Succinato.* — En vistas a una mejor interpretación de la saturación de consumo de oxígeno observada a partir de ciertos niveles de concentración de azúcar en el medio, se dispusieron experimentos con succinato. Este sustrato es bien utilizado por la mucosa. En la Tabla III puede verse que la adición de succinato 7,4 mM al medio provoca un aumento del consumo de oxígeno próximo al 50 %. Si la adición se hace a un medio con concentración saturante de glucosa o fructosa, se observa también un claro aumento del consumo de oxígeno, lo que indica, desde luego, que la oxigenación de las células no era el factor limitante.

*Cociente respiratorio.* — El cociente respiratorio de mucosa de rata normal, sin ayuno previo y sin adición de sustrato exterior, resultó ser de 0,82 (9 animales,  $\sigma = \pm 0,02$ ). Si los animales estaban en ayuno previo de 24-36 horas, el C. R. era de 0,73 (12 animales,  $\sigma = 0,03$ ).

Los cocientes respiratorios de fragmentos de una misma mucosa de ratas en ayuno previo aumentaban notablemente en presencia de glucosa o fructosa. Los incrementos observados fueron de un 25-30 % con ambos azúcares.

Por el contrario la adición de galactosa o 3-oximetilglucosa al medio no produjo cambios significativos del C. R.

### Discusión

Un análisis estadístico de la sensibilidad del método utilizado reveló que sólo pueden considerarse significativas las diferencias de consumo de oxígeno entre distintas porciones de una misma mucosa superiores al 7 %.

Los valores de  $QO_2$  obtenidos en presencia de azúcares bien metabolizables han sido en diferentes animales entre 8,6 y 17,2 y están dentro del orden de magnitud que ha sido referido en condiciones similares por diversos autores (1, 5, 12, 16). En ausencia de azúcares en el medio, los  $QO_2$  han sido entre 4,4 y 8,8 que también son parecidos a los que se dan en las escasas referencias encontradas (9).

El incremento de consumo de oxígeno observado en presencia de glucosa y fructosa ha de atribuirse a una estimulación del metabolismo consecutivo a su entrada en las células, al ser estos mismos azúcares bien metabolizados por la mucosa. Los aumentos observados son muy patentes y reiterados, por lo que algunas observaciones (4, 6) contrarias han de ser revisadas.

Como la arabinosa no es metabolizable ni activamente transportable, era de esperar, como hemos comprobado, que no produjera aumentos del consumo de oxígeno.

El resultado también negativo con la 3-oximetilglucosa tiene más interés. En efecto, este azúcar no metabolizable es activamente transportable. Los resultados con concentraciones entre 11,11 y 44,44 mM, reflejan que este azúcar puede ser acumulado en las células sin variación apreciable del consumo de oxígeno. La energía requerida para el transporte activo debe obtenerse del metabolismo celular sin necesidad de que el consumo de oxígeno aumente al menos dentro de los límites de error de nuestros experimentos (7 %).

La galactosa es un azúcar activamente transportable por el intestino y hay algunas referencias (3, 8, 17) de su utilización por la mucosa. Con los preparados de galactosa previamente purificados con glucosa-oxidasa y concentraciones de hasta 44,44 mM no se ha revelado un aumento medible del consumo de oxígeno, lo que hace pensar en que la oxidación de galactosa por la mucosa intestinal debe hacerse en todo caso en muy pequeña proporción.

Con los dos azúcares claramente utilizables por la mucosa (glucosa y fructosa) el incremento de consumo de oxígeno se hace mayor al aumentar la concentración de azúcar en el medio exterior hasta alcanzar valores máximos que no se modifican ya aunque aumente mucho la concentración de azúcar exterior. La saturación aparece con la glucosa a partir de concentraciones 2,77 mM y supone un incremento del 100 % en el consumo de

oxígeno respecto del que presenta la mucosa en ausencia de sustrato. Con la fructosa la saturación se alcanza a partir de concentración 5,55 mM en el medio, y el aumento máximo es más bajo que con glucosa, próximo al 50 %.

En el supuesto de que el aumento de consumo de oxígeno en presencia de azúcar metabolizable fuera exclusivamente debido a oxidación total del azúcar exterior puede evaluarse en unos 68 microgramos de glucosa o unos 35 de fructosa la cantidad de azúcar oxidado en 60 minutos. Con las concentraciones mínimas en que se observa saturación del consumo de oxígeno, puede estimarse que con glucosa presente (2,77 mM) en 60 minutos se oxidaría aproximadamente un 5 % del total presente, y con fructosa (5,55 mM) el azúcar consumido sería un 1,2 % aproximadamente del adicionado.

Los mayores aumentos de consumo de oxígeno que se observan con glucosa, respecto de los producidos con fructosa por debajo de los niveles de saturación, pueden explicarse dado que la glucosa alcanza niveles de acumulación endocelular altos gracias a que es activamente transportable, mientras que la fructosa entra en las células más lentamente y no se acumula.

La saturación del consumo de oxígeno, a concentraciones altas de azúcar exterior, no puede atribuirse a que la presión de oxígeno en la célula sea el factor limitante, puesto que los dos azúcares saturan el proceso a distinto nivel, y de otra parte los experimentos con succinato revelan que una mucosa, con un consumo máximo de oxígeno por suficiente adición de glucosa o fructosa, es capaz de consumir más oxígeno por ulterior adición de succinato. Estos últimos experimentos muestran además que el sistema citocromo-citocromo oxidasa tampoco estaba saturado.

El hecho de que el consumo de oxígeno permanezca constante aun con concentraciones de azúcar relativamente bajas, que varían casi de 1 a 10, permite desechar también la posibilidad de que el nivel endocelular de azúcar sea el factor responsable de la saturación, lo que también está de acuerdo con diversos estudios cinéticos (2, 3, 10) en anillos intestinales de hamster, la consecuencia que parece deducirse es que la saturación del consumo de oxígeno se debe a un paso metabólico limitante en la utilización oxidativa de los azúcares.

Más difícil resulta explicar las diferencias observadas en los niveles de saturación del consumo de oxígeno según esté presente glucosa o fructosa.

Preparados de hexoquinasa de mucosa forforilan bien a la glucosa y a la fructosa, con una relación de 1,8 en las velocidades máximas, a favor de la fructosa (13). Si la hexoquinasa fuese factor limitante habría de esperarse que se consumiera

más oxígeno con fructosa que con glucosa. Quizá puedan explicarse nuestros resultados porque en la oxidación de la glucosa interviniera además de la vía de Embden-Meyerhof la vía de pentosa fosfato de Warburg-Dickens.

Las determinaciones de C. R. revelan que la presencia de glucosa y fructosa, azúcares bien metabolizables, lo desplazan de modo muy manifiesto hacia la unidad. Las observaciones contrarias de DICKENS y WEIL-MALHERBE quizás se deban a que en nuestro caso los preparados de mucosa se ensayaban después de tiempos muy cortos de sacrificar el animal y las medidas eran en los primeros 60 minutos mientras que las de ellos correspondían a 150 minutos, tiempo en que las condiciones respiratorias van progresivamente empeorando.

Por el contrario el C. R. no cambia apreciablemente en presencia de galactosa y 3-metilglucosa. Como con estos dos azúcares hay transporte activo, debe deducirse que la célula puede obtener la energía necesaria para el transporte de las fuentes normales celulares. Con mucosas de ratas en ayuno el transporte se verifica con cocientes respiratorios bajos, es decir derivando su energía preferentemente de lípidos.

### Resumen

Preparados de mucosa de yeyuno de rata, en atmósfera de oxígeno, presentan valores de  $QO_2$  entre 4,4 y 8,8 según los animales.

La adición de glucosa o fructosa al medio provoca un notable aumento del consumo de oxígeno creciente con la concentración de azúcar que alcanza incrementos máximos de cerca de un 100 % con la glucosa y de cerca de un 50 % con fructosa. Con galactosa, arabinosa y 3-oximetilglucosa, no hay variaciones significativas de consumo de oxígeno. La saturación en el consumo de oxígeno que se observa con glucosa y fructosa a partir de ciertas concentraciones se atribuye a algún factor metabólico limitante y no a limitación en la entrada de azúcar.

El C.R. de la mucosa aumenta también en presencia de glucosa o fructosa, y no se modifica significativamente con los otros azúcares.

El transporte activo de azúcares no requiere un incremento de consumo de oxígeno de la mucosa, o éste no es superior al 7 % (límite de sensibilidad del método usado), y la energía para dicho transporte puede derivarse de las fuentes normalmente utilizadas por la célula, incluso con cocientes respiratorios próximos a 0,7.

### Summary

Consumption of  $O_2$  of the intestinal mucosa in function of the concentration of sugars in the medium

Preparations of mucosa of rat jejunum, in an oxygen atmosphere (Krebs-Ringer-phosphate, Warburg-method) present values of  $QO_2$  between 4.4 and 8.8, according to the animals.

The addition of glucose or fructose to the medium between 0.17 mM and 22.22 mM gives rise to a marked increase in the oxygen uptake growing at the beginning with the concentration of sugar but reaching maximums starting from 2.77 mM (glucose) and 5.55 mM (fructose). With glucose the maximum increase is approximately 95 %, while with fructose it is about 50 %.

With galactose, arabinose and 3-oxymethyl-glucose there are no significant variations in the oxygen uptake. The addition of succinate to the medium, through concentrations of sugar corresponding to saturation of the oxygen consumption, is accompanied by new increases in this consumption. The saturation is attributed to some limiting metabolic factor and not to limitation in the entry of the sugar.

The respiratory quotients also increase in the presence of glucose or fructose and are not significantly modified with the other sugars.

The active transport of sugars does not require an increase in oxygen uptake of the mucosa, or at least such an increase is not higher than 7 % (sensitivity limit of the method used), and the energy for the said transport can be derived from the sources which can normally be used by the cell, even with respiratory quotients near 0.7.

### Bibliografía

- (1) BUMM, APPEL, FEHRENBACH.: *Hoppe-Seyl. Z.*, 223, 207, 1934.
- (2) CRANE, R. K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 477, 1960.
- (3) CRANE, R. K. and MANDELSTAM, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 460-76, 1960.
- (4) CRANE, R. K. and MANDELSTAM, P.: *Fed Proc.*, 18, 208, 1959.
- (5) DICKENS, F. and SIMMER.: *Biochem. J.*, 24, 1301, 1930.
- (6) DICKENS, F. and WEIL-MAHERBE, H.: *Biochem. J.*, 35, 7-15, 1941.
- (7) KEILIN and HARTREE: *Biochem. J.*, 39, 293, 1945.
- (8) LANDAU, B. R. and WILSON, T. H.: *J. Biol. Chem.*, 234, 749, 1959.
- (9) LELOIR, L. F. and MUÑOZ, J. M.: *Biochem. J.*, 82, 2257, 1938.
- (10) MCDUGALL-LITTE and CRANE, R. K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 483, 1960.
- (11) ROSE, R. L. and ARCHDEACON, J. N.: *Trans. of the Kentucky Acad. of Sciences*, 14 (1), 17-19, 1953.
- (12) ROSENTHAL, O. and LASNITZKI, A.: *Biochem. Zeit.*, 196, 340, 1928.
- (13) SOLS, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 19, 144, 1956.
- (14) SOLS, A.: *R. esp. Fisiol.*, 5, 149, 1949.
- (15) UMBREIT, BURRIS, STANFFER: «*Manometric techniques*». Burgess publishing, C. O.
- (16) WARBURG, O., POSENER, K. and NEGELEIN, E.: *Biochem. Zeit.*, 152, 309, 1924.
- (17) WILSON, T. H. and VICENT, T. N.: *J. Biol. Chem.*, 216, 851, 1955.

