

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Laboratorio de Fisiología Animal
Universidad de Santiago de Compostela

Inhibición del transporte activo de glucosa por el ion litio

por

J. Bello,* P. Fernández-Otero,* E. Durán * y J. Larralde

(Recibido para publicar el 7 de mayo de 1963)

El papel que los cationes alcalinos pueden desempeñar en el mecanismo del transporte activo de los azúcares ha sido objeto de diversos trabajos, especialmente según técnicas *in vitro*, pero sin que de los resultados obtenidos se haya podido llegar a una solución concluyente.

Para que tenga lugar el transporte activo del azúcar parece necesaria la presencia de iones sodio (8, 5, 2 y 3), de los que no se conoce con certeza su mecanismo de acción y queda aún por aclarar la posibilidad de que puedan ser sustituidos por otros cationes.

En este sentido, hemos probado en un trabajo anterior (6), cómo el potasio inhibe *in vivo* la transferencia activa de la glucosa por el intestino de rata, por lo que es poco probable que pueda reemplazar al sodio en los procesos de transporte de azúcares.

El objeto del presente ha sido investigar la acción que el litio ejerce sobre el mecanismo de la absorción *in vivo* de la glucosa por el intestino delgado de rata, con el fin de conseguir una base experimental que ayude a una mejor interpretación del papel desempeñado por los cationes alcalinos en los procesos de la absorción intestinal.

Material y métodos

Se sigue la técnica de absorciones sucesivas de SOLS y PONZ (9), llevada a cabo con ratas blancas de 100 a 200 gramos

* Con una beca del Patronato de Protección Escolar.

de peso, anestesiadas con solución de etiluretano al 12 % (1 ml. por cada 100 gramos de peso). La temperatura se mantiene constante, de manera que no sufra oscilaciones superiores a + 0,3° C. La presión de repleción fue de 12 cm. de agua y las asas intestinales aisladas de 15-30 cm. de longitud fisiológica. En algunas experiencias se emplea la técnica de doble asa, que permite investigar la acción del catión a través de una asa distinta a la que se absorbe la glucosa.

Se emplean concentraciones de 40, 75 y 150 mM de glucosa, cuya determinación cuantitativa se realiza según el método fotocolorimétrico de NELSON-SOMOGY (7). El litio se ensaya, como solución de cloruro de litio, a las concentraciones de 6, 15, 30, 60, 77 y 154 miliequivalentes por litro.

Por cada animal experimentado se llevan a cabo cuatro absorciones sucesivas de 30 minutos: primera y tercera con solución de glucosa pura, segunda y cuarta con solución de glucosa y litio. Entre una y otra absorción se lava el asa intestinal con solución isotónica de cloruro sódico (0,9 %).

Resultados

Los resultados obtenidos se expresan en las tablas que siguen, donde se recogen el número de animales empleados en cada tipo de experiencias, las concentraciones de glucosa y litio presentes en el asa intestinal, las intensidades en micromoles por centímetro de las primeras absorciones (consideradas como representativas de los valores normales) y los tanto por ciento de inhibición encontrados en las siguientes absorciones compara-

TABLA I

Influencia del litio sobre la absorción intestinal de glucosa, cuando se halla presente en la misma asa intestinal. Tiempo de cada absorción: treinta minutos.

Ani- males n.º	Glucosa mM	Li ⁺ me- quiv/l.	Absorción normal μM/cm.	Tanto por ciento de inhibición		
				2.ª abs. con Li	3.ª abs. sin Li	4.ª abs. con Li
6	75	77	12,2 ± 0,5	19,0 ± 1,1	2,8 ± 0,6	21,0 ± 1,4
6	75	60	12,3 ± 0,6	15,3 ± 0,9	0,5 ± 0,6	17,0 ± 1,0
5	75	60	11,5 ± 0,3	15,0 ± 0,8	15,5 ± 0,9*	17,1 ± 1,2
6	40	60	8,9 ± 0,4	15,3 ± 1,0	1,0 ± 0,7	17,8 ± 1,0
5	40	60	9,2 ± 0,2	15,8 ± 1,1	16,0 ± 1,0*	16,5 ± 1,2
6	75	30	11,4 ± 1,0	10,3 ± 0,7	0,3 ± 0,2	13,0 ± 0,8
6	75	15	12,0 ± 0,6	5,0 ± 0,6	0,2 ± 0,5	6,3 ± 0,7
5	75	6	12,9 ± 0,5	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,3	1,2 ± 0,3

(*) con 60 mequiv/l. de Li⁺ en el asa.

das con la primera, estimada como normal. Cada uno de los datos señalados representa el valor medio de lo absorbido, o inhibido, en todas aquellas experiencias llevadas a cabo bajo condiciones experimentales idénticas. A cada valor medio acompaña su error típico correspondiente.

En primer lugar hemos estudiado la acción directa ejercida por el ion litio, a concentraciones variables de 6 a 77 miliequivalentes por litro, sobre la absorción intestinal de glucosa hipotónica (tabla I). A partir de los 15 mequiv/l. existe una reducción en la intensidad de la absorción de glucosa que tiene como resultado una inhibición sensiblemente constante en todos los períodos en el que el litio está presente y altamente significativa para una probabilidad de $P < 0,01$, calculando según la T de STUDENT correspondiente. Esta inhibición se acentúa a medida que se aumenta la concentración del ion presente en el asa, llegando a ser de 19-21 % para 77 mequiv/l.

Es interesante hacer notar cómo, dentro de ciertos límites, los efectos inhibidores del ion litio se hacen reversibles por el simple lavado de la mucosa intestinal con solución isotónica de cloruro sódico. En la tercera absorción, llevada a cabo con glucosa sola, la intensidad alcanza su valor normal y solamente para la máxima concentración de 77 mequiv/l. persiste una débil inhibición del transporte del azúcar.

La figura 1 muestra la relación encontrada entre la absorción intestinal de glucosa 75 mM y diversas concentraciones de litio.

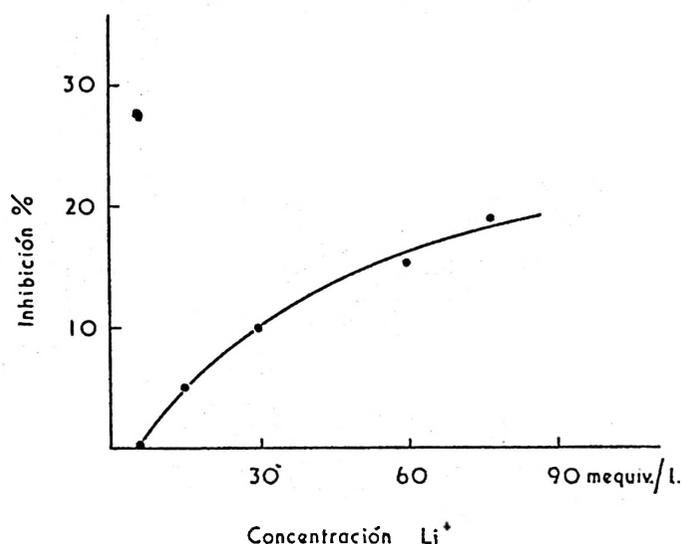


Figura 1. Influencia de la concentración de litio sobre la absorción intestinal de glucosa hipotónica.

Los valores obtenidos son prácticamente del mismo orden que los hallados, en idénticas condiciones, con el ion potasio en nuestro trabajo anterior (6).

La concentración de litio influye sobre la inhibición encontrada, pero, en cambio, la distinta molaridad de las soluciones de glucosa tiene escaso efecto sobre la misma. Así, una misma concentración de 60 mequiv/l. de litio, produce aproximadamente el mismo efecto sobre la intensidad de la absorción de distintas concentraciones de glucosa, 40 ó 75 mM.

NEUTRALIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN LÍTICA POR LOS IONES SODIO.

Otro dato interesante, a nuestro juicio, es el efecto que hallamos de cómo por la acción de una cantidad equivalente de iones sodio, desaparece el efecto ocasionado por la presencia de iones litio en la misma asa en que se absorbe la glucosa. Esta acción se pone de manifiesto con los resultados indicados en la tabla II.

TABLA II

Incrementos encontrados en la absorción intestinal de glucosa bajo la acción conjunta de los iones litio y sodio. Tiempo de absorción: treinta minutos.

Animales n.º	Glucosa mM	mequiv/l		Absorción normal $\mu\text{M}/\text{cm}$.	Tanto por ciento de incremento		
		Li ⁺	Na ⁺		2.ª abs. con Li + Na	3.ª abs.	4.ª abs. con Li + Na
4	40	77	77	8,5 ± 0,6	1,8 ± 0,4	0,0	2,0 ± 0,3
5	75	60	60	12,4 ± 1,2	2,2 ± 0,5	0,0	2,4 ± 0,5
5	40	60	60	8,9 ± 0,1	2,6 ± 0,5	0,0	2,8 ± 0,4
4	40	30	30	8,6 ± 0,4	3,8 ± 0,4	0,0	4,1 ± 0,5

Como se ve las inhibiciones producidas por el litio, a concentraciones de 30, 60 y 77 miliequivalentes por litro, no sólo se anulan, sino que incluso se obtiene un efecto contrario, al añadir idéntica cantidad de sodio, hasta el punto de alcanzarse un pequeño incremento con respecto a la absorción normal, tanto mayor cuanto menor es la concentración de litio presente.

Los incrementos hallados son de gran interés, pues, aunque pequeños, descartan la posibilidad de atribuir las inhibiciones encontradas a variaciones osmóticas, motivadas por la adición de una concentración dada de ion alcalino.

Si el litio es francamente inhibidor, y el sodio neutraliza sus efectos, la inhibición deberá aparecer más claramente, cuando entre varias absorciones sustituyamos el líquido habitual del lavado — solución de cloruro sódico — por otra correspondiente de cloruro de litio. En efecto, cuando la acción del lavado intes-

tinal con cloruro de litio va unida a la presencia del catión en la misma solución de glucosa que se ha de absorber, se tiene como consecuencia un fuerte incremento del efecto inhibitor estimado. En la tercera absorción desaparece la normalidad con respecto a la primera, ya que se mantiene una inhibición que va de un 17 a un 25 %, y existe una mayor inhibición, acentuada hasta alcanzar valores de un 47 % en el cuarto período, como se observa en los resultados expresados en la tabla III.

TABLA III

Inhibiciones encontradas en la absorción intestinal de glucosa bajo la acción de los iones litio presentes en el asa y cuando se lava la mucosa con solución isotónica de CLi. Tiempo de absorción: treinta minutos.

Animales n.º	Glucosa mM	Li+ mequiv/l.	Absorción normal $\mu\text{M}/\text{cm}$.	Tanto por ciento de inhibición		
				2.ª abs. con Li en asa	3.ª abs. sin Li en asa	4.ª abs. con Li en asa
8	150	60	21,0 \pm 1,1	18,8 \pm 1,0	37,4 \pm 2,2	20,5 \pm 1,2
6	75	60	11,8 \pm 0,8	16,5 \pm 0,9	37,1 \pm 2,0	18,5 \pm 1,0
5	75	60	11,4 \pm 0,9	15,8 \pm 1,1	36,9 \pm 2,3	25,0 \pm 1,9*
6	40	60	8,5 \pm 0,4	16,7 \pm 1,3	33,4 \pm 2,1	17,3 \pm 1,4
5	40	60	7,9 \pm 0,1	16,0 \pm 1,0	47,0 \pm 2,3	25,8 \pm 2,1*

(*) con 60 mequiv/l. de Li⁺ en el asa.

Estos resultados nos hicieron pensar en la posibilidad de que la acción inhibitora del litio podría manifestarse por la simple acción del lavado entre varias absorciones de glucosa pura. Y, efectivamente, al sustituir el líquido habitual de lavado — solución isotónica de cloruro sódico — por otra solución isotónica de cloruro de litio, aparece, según se aprecia en la tabla IV, un efecto inhibitor de un 16 %, que se mantiene ligeramente constante en todos los períodos sucesivos de absorción.

TABLA IV

Inhibiciones encontradas en la absorción intestinal de glucosa cuando entre dos absorciones se lava la mucosa del asa con solución isotónica de CLi. Tiempo de absorción: treinta minutos.

Animales n.º	Glucosa mM	Absorción normal $\mu\text{M}/\text{cm}$.	Tanto por ciento de inhibición		
			2.ª abs. tras lavado con Li	3.ª abs. tras lavado con Li	4.ª abs. tras lavado con Li
6	150	22,1 \pm 1,0	16,5 \pm 1,0	17,3 \pm 1,3	17,6 \pm 1,2
6	75	12,0 \pm 0,7	15,2 \pm 1,0	17,0 \pm 1,1	17,8 \pm 1,0
6	40	8,9 \pm 0,1	16,0 \pm 1,5	16,6 \pm 1,0	17,1 \pm 1,5

Una vez demostrada la influencia del litio sobre la absorción de glucosa y su neutralización por el sodio, pensamos que este efecto podría deberse a una acción local sobre la mucosa o ser consecuencia de una intoxicación más amplia.

Con el fin de establecer si la acción inhibitoria del litio se debe a un efecto tóxico general, llevamos a cabo experiencias en las que el ion alcalino se coloca en distinta asa que la glucosa, una vez realizada la primera absorción hasta el final de la cuarta. Los resultados obtenidos (tabla V) indican la existencia

TABLA V

Absorción intestinal de glucosa 75 mM bajo la acción del ion litio colocado en asa distinta. Tiempo de absorción: treinta minutos.

Animales n.º	Li ⁺ mequiv/l.	Absorción normal μ M/cm.	Tanto por ciento de inhibición		
			2.ª abs.	3.ª abs.	4.ª abs.
6	154	8,7 \pm 0,8	11,0 \pm 1,2	17,3 \pm 1,6	24,2 \pm 1,5
6	77	9,0 \pm 1,3	3,0 \pm 0,6	5,5 \pm 1,1	7,8 \pm 1,3
3	77*	7,7 \pm 0,3	0-0	0-0	0-0
5	60	8,4 \pm 0,3	0,6 \pm 0,4	0,5 \pm 0,4	1,0 \pm 0,6
4	30	9,1 \pm 0,5	0-0	0-0	0-0

(*) con 77 mequiv/l. de Na en el asa distinta.

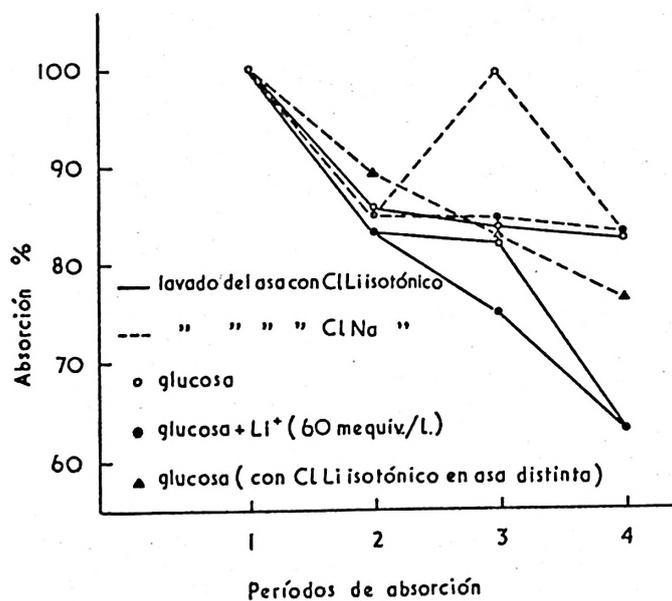


Figura 2. Representación de la acción inhibitoria del litio, sobre la absorción de glucosa, reversibilidad de sus efectos y neutralización de los mismos por el ClNa.

de una inhibición, estimable únicamente cuando la concentración de litio es extraordinariamente fuerte: 154 mequiv/l. Para la concentración, ya elevada, de 77 mequiv/l. la inhibición no llega al 8 % en el cuarto período, no obstante la acción persistente del ion.

Como vemos, el sodio a concentraciones equimoleculares impide también la acción inhibidora de 77 mequiv/l. de litio cuando se colocan ambos en asa distinta a la que se absorbe la glucosa.

En resumen la acción de los iones litio sobre la absorción de glucosa 75 mM se representa en la figura 2, donde cabe apreciar un doble tipo de influencia que se corresponde con dos modos distintos de estar presente los iones en el asa intestinal: De una parte, la acción momentánea ejercida por simple lavado de la mucosa con solución isotónica (fuerte concentración), da lugar a una inhibición en la segunda absorción, aunque sea de glucosa pura, que permanece constante, o decae muy lentamente, en las restantes. De otra, la acción persistente sobre la mucosa, por la continua presencia de los iones en el asa, ocasiona una inhibición que se intensifica de un modo progresivo en las demás absorciones.

El lavado, en cambio, con solución de cloruro sódico entre dos absorciones hace reversible la inhibición cuando a continuación se trata sólo de glucosa pura, o la mantiene constante a pesar de que las absorciones siguientes se desarrollan bajo la acción persistente de los iones litio, durante todo el tiempo que dura cada período de absorción.

Es de notar el paralelismo existente entre el efecto obtenido mediante lavado del asa con solución isotónica de litio sobre absorciones de glucosa pura y el conseguido mediante la acción persistente de una concentración de 60 mequiv/l. alternada con lavados con cloruro sódico.

Discusión

La posibilidad de que el sodio pueda, o no, ser sustituido por el litio en su papel dentro del mecanismo del transporte activo no queda del todo claro a la vista de los resultados contradictorios obtenidos por los distintos autores. ZERAHN (10), indica que el litio puede llegar a inhibir el mecanismo del efecto-bomba del sodio, importante para la acumulación del azúcar dentro de las células tisulares. CSAKY (4), encuentra que al sustituir el ion sodio por el litio en preparaciones *in vitro*, se obtiene una inhibición reversible del transporte de la glucosa a través del intestino aislado de rata. Por el contrario, CLARK-

SON y ROTHSTEIN (1), establecen que la sustitución del sodio por el litio inhibe la transferencia de fluidos, pero acelera enormemente el transporte *in vitro* de la glucosa.

La absorción *in vivo* de la glucosa por el intestino delgado de rata se presenta, según los resultados obtenidos en nuestras experiencias, como un proceso notablemente influido por la presencia de los iones litio. A partir de la concentración de 15 mequiv/l. aparece un efecto inhibitorio, que se hace más intenso a medida que aumenta la concentración del catión. Concentraciones más bajas no ejercen ninguna influencia sobre la absorción y en ningún caso se ha encontrado una actividad de la intensidad de la misma, como ocurre en las experiencias *in vitro* de CLARKSON y ROTHSTEIN para 15 mM por litro de litio.

La inhibición producida por los iones litio en experiencias *in vivo* no parece diferir de la encontrada por CSAKY *in vitro*, en cuanto que se hace reversible por simple lavado de la mucosa intestinal con cloruro sódico.

Bajo nuestras condiciones experimentales no es posible atribuir el origen de la inhibición a una interferencia por el litio del mecanismo del efecto bomba del sodio, puesto que la presencia de este catión, en una cantidad equivalente a la del litio, neutraliza por completo la acción inhibitoria del mismo. Esta acción del sodio está de acuerdo con su claro efecto activador de la absorción de glucosa, según las experiencias de CSAKY (4), CLARKSON (1) y CRANE (3) con técnicas *in vitro* y que nosotros corroboramos con la técnica *in vivo* de absorciones sucesivas (6).

El lavado con solución isotónica de CLi (en vez de CNa) entre dos absorciones de glucosa pura, exenta de iones, o también absorciones de glucosa con iones litio, lavando el asa con cloruro sódico, tienen como consecuencia una inhibición que se mantiene prácticamente constante en todas las absorciones. Cuando la acción de fuertes concentraciones, como puede ser una solución isotónica, es persistente a lo largo de todos los períodos experimentales resulta un efecto inhibitorio, que aumenta progresivamente con el tiempo de acción, manifestado también en las acciones a través de asa distinta, propio de una acción tóxica sobre la fisiología general. La intensidad de la inhibición depende, pues, de la concentración del catión y de su forma de actuar.

Por consiguiente, la inhibición producida por la presencia de iones litio en la misma asa intestinal donde la glucosa es absorbida *in vivo* por la rata, puede, al parecer, atribuirse a una acción local de tales iones o a una acción tóxica general, dependiendo una u otra de las condiciones experimentales. Este doble aspecto ofrecido por la acción de los iones litio sobre la absorción de la glucosa es paralelo al encontrado por nosotros para el potasio, aunque de menor intensidad en lo referente a la ac-

ción tóxica a través de asa distinta y a la inhibición local dependiente de la concentración del catión presente. Igual que el potasio, parece poco probable que el litio pueda desempeñar un papel semejante al sodio en el mecanismo de la absorción *in vivo* de la glucosa.

Resumen

Se estudia la acción del litio sobre la absorción *in vivo* de la glucosa por el intestino de rata siguiendo la técnica de SOLS y PONZ de absorciones sucesivas. Se encuentra una inhibición estadísticamente significativa a partir de 15 meq/l. de Li^+ , cuya intensidad varía con la concentración del catión.

La inhibición se hace reversible por el lavado con ClNa y no aparece en presencia de una cantidad equivalente de iones sodio.

El lavado con ClLi da lugar a una inhibición constante y la acción persistente de los iones litio sobre la mucosa tiene como consecuencia un efecto inhibitor, que aumenta progresivamente con el tiempo de acción.

Sólo concentraciones muy fuertes, como la isotónica, originan inhibiciones estimables de la absorción de glucosa colocada en asa distinta.

La intensidad de la inhibición parece depender de la concentración del catión y de la forma de llevar a cabo su acción.

Summary

Inhibition, by the lithium ion, of the active transport of glucose

A study has been made of the effect of the lithium ion on the absorption of glucose by the rat small intestine *in vivo* using the SOLS and PONZ technique. The concentrations employed were of 40, 75 and 150 mM of glucose and 6, 15, 30, 60 and 77 meq./l. of lithium (chloride). On each animal four successive absorptions, of thirty minutes each, were carried out: the 1st and 3rd with a solution of glucose, and the 2nd. and 4th. with the solution of glucose containing the lithium ion. The results are expressed as mean variation values of so much per cent with respect to the first absorption, which is considered as the norm in each experiment (table I). With 15 meq./l. of lithium ion, an inhibition appears which is practically constant and statistically significant. Smaller concentrations exercise no influence on the absorption and in no circumstance does activation appear in conformance with *in vitro* experiments of CLARKSON and ROTHSTEIN. Between 15 and 60 meq./l., the inhibition seems to depend on the concentration and is reversible by washing of the intestinal loop with an isotonic solution of ClNa .

No inhibition is produced by the lithium ion in the presence of an equivalent quantity of sodium ions (table II).

Much larger concentrations of Li^+ (154 meq./l.), used as washing solutions instead of isotonic ClNa , cause a constant inhibition in all the periods of absorption. If besides washing with isotonic ClLi , there is Li^+ (60 meq./l.) in the glucose solution, it originates an inhibition which increases progressively in the successive absorptions (table III). If the lithium ion is found in a different loop from that which absorbs the glucose (table V), there is clear inhibition only above 77 meq./l.

The results obtained suggest the possibility of attributing the inhibition of the absorption of glucose to a local action of the lithium ions or to a general toxic action, one and the other depending on the experimental conditions. It seems very unlikely that the lithium can play a role similar to that of sodium in the mechanism of the *in vivo* absorption of the glucose.

Bibliografía

- (1) CLARKSON, T. H. and A. ROTHSTEIN: *Am. J. Physiol.*, **199**, 898, 1960.
- (2) CRANE, R. K. and P. MANDELSTAM: *Biochem. Biophys. Acta*, **45**, 460, 1960.
- (3) CRANE, R. K., D. MILLER and I. BIHLER: *Membrane Transport and Metabolism*, Czechoslovak, Academy of Science Press, Praga, p. 439, 1961.
- (4) CSAKY, T. Z.: *Fed. Proc.*, **19**, 128, 1960.
- (5) CSAKY, T. Z. and M. THALE: *J. Physiol.* (London), **151**, 59, 1960.
- (6) LARRALDE, J., J. BELLO y P. FERNÁNDEZ-OTERO: *R. esp. Fisiol.*, **18**, 127, 1962.
- (7) NELSON, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375, 1944.
- (8) RIKLIS, E. and J. H. QUASTEL: *Can. J. Biochem. and Physiol.*, **36**, 347, 1958.
- (9) SOLS, A. y F. PONZ: *R. esp. Fisiol.*, **2**, 283, 1954.
- (10) ZERAHN, K.: *Acta Physiol. Scand.*, **33**, 347, 1955.