

La somatostatina no modifica la captación de 3-oximetilglucosa y leucina por enterocitos de rata

C. A. Crespo*, J. Martínez-Sapiña y M. C. Taboada

Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia
15706 Santiago de Compostela (España)

(Recibido el 13 de octubre de 1987)

C. A. CRESPO, J. MARTINEZ-SAPIÑA and M. C. TABOADA. *Somatostatin does not Modify 3-Oxymethylglucose and Leucine Uptake by Rat Enterocytes*. Rev. esp. Fisiol., 44 (3), 1988.

The effects of somatostatin on 3-oxymethylglucose (3-OMG) and leucine uptake by rat enterocytes were examined. Somatostatin did not decrease the 3-OMG enterocyte uptake. When the 3-OMG active transport was inhibited by phloridzin, Somatostatin presented no significant modifications. Somatostatin showed a slight decrease in 3-OMG release through the basolateral membrane, when such a release was inhibited with theophylline. Somatostatin did not modify the intestinal leucine uptake or its inhibition by methionine.

Key words: Somatostatin, Glucose uptake, Leucine uptake, Enterocytes.

La somatostatina se aisló por primera vez a partir de extractos hipotalámicos (3), aunque la cantidad en el páncreas y en el tracto gastrointestinal es superior a la existente en el sistema nervioso central (2), lo que parece indicar su importancia en las funciones gastrointestinales, de las que cabe destacar su posible papel en la regulación de la absorción de nutrientes.

La absorción intestinal es un fenómeno complejo que depende de numerosos factores, por lo que las posibles modificaciones producidas por diferentes sustancias pueden ser debidas a un efecto directo sobre la membrana celular o a un efecto indirecto sobre la motilidad intestinal, flujo

sanguíneo, actividades enzimáticas y secreciones hormonales, que pueden modificar las condiciones de transporte a nivel de membranas.

La hipótesis de nuestro trabajo reside en que al existir células que poseen inmunoreactividad *somatostatin-like* en el tracto gastrointestinal (12), y al poseer la somatostatina una posible actividad reguladora de la absorción de nutrientes, pueda modular directamente la captación de azúcares y aminoácidos por células intestinales aisladas. Por ello, y basándonos en trabajos realizados en enterocitos de pollo (16), se estudia el efecto directo de la somatostatina sobre el transporte de 3-oximetilglucosa (3-OMG) y leucina en enterocitos aislados de rata.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Material y Métodos

Aislamiento de enterocitos.— Se utilizan ratas Wistar, machos y hembras, de unos 150-200 g, con ayuno de 24 h y sacrificadas por decapitación sin anestesia previa. La suspensión celular se obtiene según el método de MITJAVILA *et al.* (11), con algunas modificaciones.

Como medio de incubación se utiliza un Krebs-Ringer fosfato (KRF) de composición, en mM: NaCl: 127,3; MgSO₄ · 7 H₂O: 1,3; KH₂PO₄: 1,3; Na₂HPO₄ · 2 H₂O: 5,1; KHCO₃: 9,8, al que se añade BSA al 1 % y hialuronidasa (300 U/ml). Se burbujea con una mezcla de O₂: CO₂ (95:5 v/v) y se ajusta el pH a 7,35-7,4 con HCl 5N.

Los sacos intestinales se incuban en KRF con BSA y hialuronidasa a 37 °C, en un volumen de 50 ml con agitación orbital (150 ciclos/min) durante 12 min. Transcurrido el tiempo de incubación se agita bien el medio con los sacos intestinales para mejorar la extracción de las células y, a continuación, la suspensión obtenida se centrifuga a 4 °C (1.060 xg, 5 min). El sedimento obtenido se resuspende en KRF con BSA (KRFB) y se lava dos veces por centrifugación sucesiva en las condiciones descritas.

Como test de viabilidad celular se utiliza la exclusión de azul tripano (10), siendo ésta de un 98 % en cada experimento.

Incubación y captación de sustratos.— Alícuotas con un contenido prefijado y constante de enterocitos (10⁵ células), se incuban en medio KRFB a 37 °C, con agitación orbital (50 ciclos/min), en un volumen final de 3 ml (7), seguido de la adición del tratamiento correspondiente.

La captación de 3-OMG y leucina se detiene trasvasando alícuotas de 200 µl del incubado a tubos de centrifuga inmersos en hielo, que contienen KRFB (volumen final 2 ml), y se centrifugan a 4 °C (4.000 xg, 2 min). El sedimento se resuspende en KRFB y se lava dos veces por centrifu-

gación sucesiva en las condiciones descritas. El último sedimento obtenido se trata con 200 µl de HClO₄ al 5 % y se centrifuga a 4 °C (4.000 xg, 10 min). Del sobrenadante se vierten 100 µl en líquido de centelleo (2 partes de toluol; 1 parte de triton X-100 y 5 g/l de PPO), y la cantidad de 3-OMG y leucina captada se mide en un contador de centelleo líquido (Beckman LS-3801).

El contenido proteico se determina por el método de Lowry usando BSA como estándar (9).

Reactivos.— Hialuronidasa, somatostatina, floridzina, metionina y albúmina de suero bovino fracción V (BSA), fueron de Sigma. El 2,5-difeniloxazol (PPO) de Köch-Ligh. La L-(U-¹⁴C)-leucina y la D-(U-¹⁴C)-3-oximetilglucosa (3-OMG) de Amersham. La teofilina de B.D.H. Folin-Ciocalteu, triton X-100, toluol y demás reactivos fueron de Merck.

Cálculos estadísticos.— Los resultados se expresan en nmoles de sustrato/mg de proteína, como media ± SEM y el número de determinaciones individuales (n). El análisis de la diferencia significativa entre medias se realiza mediante el test t-Student para datos desapareados (15).

Resultados

Los resultados indican que la somatostatina no modifica la captación de 3-O-metilglucosa en enterocitos de rata en períodos de incubación de 2 y 4 min, aunque se observa un descenso no significativo entre 6 y 10 min. La inhibición competitiva del transporte activo Na⁺-dependiente de 3-OMG por floridzina alcanza valores incluso superiores al 75 % a los 10 min y, no se observa modificación en presencia de somatostatina (fig. 1).

La acumulación de 3-OMG en presencia de teofilina aumenta un 60 % a los 2

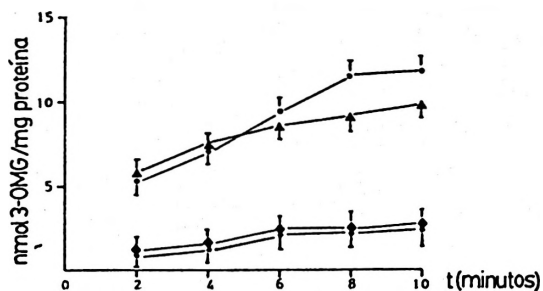


Fig. 1. Efecto de la somatostatina 3×10^{-7} M en presencia (*) y ausencia de flordizina 0,2 mM (▲), sobre la captación por células intestinales de 3-OMG 2 mM en presencia (◆) y ausencia de flordizina 0,2 mM (●).

Los valores obtenidos se representan como media $\pm$ SEM para $n = 5$.

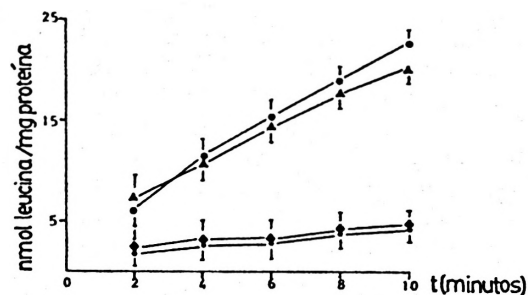


Fig. 3. Efecto de la somatostatina 3×10^{-7} M en presencia (*) y en ausencia de metionina 60 mM (▲), sobre la captación por enterocitos de rata de leucina 2 mM en presencia (◆) y en ausencia de metionina 2 mM (●).

Los valores obtenidos se representan como media $\pm$ SEM para $n = 5$.

min y más del 100 % a los 10 min de incubación. En presencia de somatostatina disminuye la captación de 3-OMG hasta valores similares a los hallados en ausencia de teofilina (figura 2).

En cuanto a la captación de leucina, los valores obtenidos con y sin somatostatina, no presentan variaciones significativas. La presencia de metionina, reduce la acumulación de leucina en un 80 % a los 10 min, presentando el mismo perfil en presencia de somatostatina (figura 3).

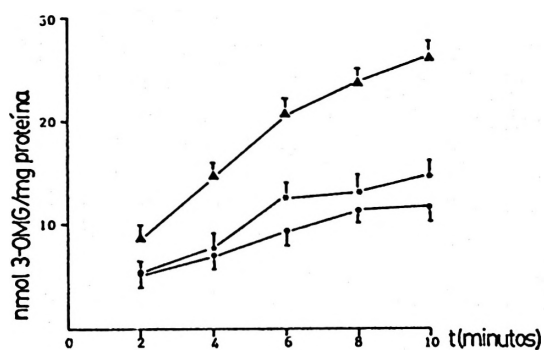


Fig. 2. Efecto de la somatostatina 3×10^{-7} M en presencia de teofilina 10 mM (*) sobre la acumulación de 3-OMG 2 mM en presencia (▲) y en ausencia (●) de teofilina 10 mM en enterocitos de rata. Los valores obtenidos se representan como media $\pm$ SEM para $n = 5$.

Discusión

En el hombre se ha comprobado que la somatostatina reduce significativamente el transporte intestinal de aminoácidos como lisina y glicina así como el de fructosa, explicando este fenómeno como consecuencia de una reducción de la superficie mucosal (8).

Los resultados presentados en la captación de 3-OMG 2 mM en presencia y en ausencia de somatostatina, muestran un perfil semejante, aunque en incubaciones con el tetradecapéptido a tiempos de 6, 8 y 10 minutos la captación disminuye ligeramente, sin significación.

Con flordizina 0,2 mM, la entrada del monosacárido en los enterocitos se realiza únicamente por difusión, ya que el transporte activo se encuentra inhibido por el glucósido (1, 14). La existencia de resultados similares en presencia y en ausencia de somatostatina, sugieren que ésta no actúa sobre el componente de difusión.

La mayor acumulación de 3-OMG obtenida en presencia de teofilina coincide con los resultados de varios autores (6, 13), quienes atribuyen al glucósido un papel inhibitorio de la permeabilidad a azúcares a través de la membrana serosal de

enterocitos de rata. En presencia de somatostatina se reduce la acumulación por efecto de la teofilina, sugiriendo que pueda actuar permeabilizando la membrana basolateral, contrarrestando así el efecto inhibidor de la teofilina.

La falta de efecto de la somatostatina sobre el transporte de leucina coincide con los resultados por DAUMIERE y HENQUIN (4), en estudios con ratas hembras a las que se administra la hormona mediante infusión en la vena yugular. Además, en estudios realizados en individuos sanos se observa que la somatostatina disminuye el nivel en plasma de muchos aminoácidos, después de una comida proteica y retrasa la aparición del pico de leucina en sangre tras su ingestión sin inhibir su absorción (15).

Se sugiere que la somatostatina no ejerce un efecto directo sobre el transporte de 3-OMG y de leucina en células epiteliales de intestino delgado de rata, aunque parece actuar sobre la salida de 3-OMG a través de la membrana basolateral.

Resumen

Se estudia el efecto de la somatostatina sobre la captación de 3-oximetilglucosa y de leucina en enterocitos de rata. La presencia de somatostatina no disminuye la captación de 3-oximetilglucosa por los enterocitos de rata. Cuando el transporte activo se inhibe con flordizina, el péptido no presenta efecto significativo en la captación del monosacárido. La somatostatina presenta un débil descenso en la liberación de 3-oximetilglucosa a través de la membrana basolateral, cuando esta liberación está inhibida por teofilina. La somatostatina no modifica la captación intestinal de leucina ni tampoco su inhibición por metionina.

Palabras clave: Somatostatina, Captación de glucosa, Captación de leucina, Enterocitos.

Bibliografía

1. Alvarado, F. y Crane, R.K.: *Biochem. Biophys. Acta*, 56, 170, 1962.
2. Arimura, A., Sato, H., Dupont, A., Nirhi, N. y Schally, A.: *Fed. Proc.*, 34, 273-276, 1975.
3. Brazeau, P., Vale, W., Burgue, R., Ling, N., Rivier, J. y Guillemin, R.: *Science*, 197, 78, 1973.
4. Daumiere, C. y Henquin, J. C.: *Gut*, 23, 140-145, 1982.
5. Hokfelt, T., Efendic, S., Hellerstrom, C., Joansson, O., Luft, R. y Arimura, A.: *Acta Endocrinol.*, 80, 1-41, 1975.
6. Holman, G. D. y Naftalin, R. J.: *Biochem. Biophys. Acta*, 406, 386-401, 1975.
7. Kimmich, G. A.: *Biochemistry*, 33, 3.669-3.677, 1970.
8. Krejs, G. J.: *Diabetes*, 33, 548-551, 1984.
9. Lowry, O. H., Rosenbourg, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
10. Mishell, B. B. y Shyiigi, S. M.: En «Selected Methods in Cellular Immunology», W. H. Freeman and Co., Folkestone, 1980, pp. 16-17.
11. Mitjavila, N. T., Mitjavila, S. y Derache, R.: *Gastroenterology*, 2, 273, 1982.
12. Orci, L., Baetens, D., Dubois, M. P. y Rufenner, C.: *Horm. Met. Res.*, 7, 400-402, 1975.
13. Randles, J. y Kimmich, G. A.: *Am. J. Physiol.*, 234, C64-C72, 1978.
14. Semenza, G.: *7th Int. Congr. Clin. Chem.*, Genova/Evian, 1969. Vol. 4, pp. 3-22.
15. Sokal, R. R. y Rohlf, F. J.: *Biometry*. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1975.
16. Taboada, C., Abalde, M., Iglesias, C., Rebollo, E. y Fernández-Otero, M. P.: *I.R.C.S. Med. Sci.*, 12, 498-499, 1984.