

Efecto de la digitonina sobre la acumulación de D-galactosa por anillos intestinales de hamster

J. Bolufer,* J. Larralde y F. Ponz

Departamento de Fisiología Animal
Universidad de Navarra
Pamplona (España)

(Recibido el 31 de agosto de 1972)

J. BOLUFER, J. LARRALDE y F. PONZ. *The Effect of Digitonin on the Accumulation of D-galactose by the Intestinal Rings of Hamster*. R. esp. Fisiol., 28, 321-326. 1972.

The effect of digitonin on the active transport of D-galactose and oxygen uptake by small rings of everted hamster intestine has been studied. The results shown that digitonin, when added to the medium of incubation at concentrations 10^{-5} to 10^{-4} M, markedly inhibits (28-73 %) the active accumulation of galactose, behaving as non-competitive inhibitor with an apparent K_i of 6.5×10^{-5} M. The drug also inhibits the oxygen uptake by the tissue in the absence of added substrate.

Inhibition of active transport of galactose by digitonin was also observed if the incubation was carried out after a preincubation of the drug.

The effects of digitonin are explained as due to inhibition of cell metabolism and to binding to constituents of the cellular membrane.

Digitonin and dicoumarol shown an accumulative effects on the active transport of galactose by intestinal rings of hamster.

Varios autores han estudiado el papel de la digitonina sobre la transferencia de Na^+ y K^+ a través de la membrana de eritrocitos (15) o la de Na^+ e H^+ por la mucosa gástrica (7).

Aun cuando desde hace tiempo (14), se supone que dentro de las sustancias anti-nutritivas inhibidoras del crecimiento animal se encuentran las saponinas entre las más importantes, hay muy pocos trabajos sobre la influencia directa de estas sustancias sobre la absorción intestinal. En nuestro laboratorio BELLO *et al.* (3), hallaron

recientemente algunas saponinas que, presentes en la dieta alimenticia de ratas en crecimiento, daban lugar a una fuerte disminución en la absorción intestinal de glucosa *in vivo*.

Con el fin de conocer mejor algunas características de esta inhibición, en el presente trabajo estudiamos *in vitro* el papel de la digitonina sobre la acumulación de la D-galactosa por intestino delgado de hamster.

Material y métodos

Se utilizaron hamsters dorados (*M. auratus*) de peso comprendido entre 80 y 110 g, sometidos a ayuno previo de 24 ho-

* Con una Beca de Iniciación a la Investigación del M.E.C.

ras antes del experimento. Los anillos de intestino evertido fueron obtenidos según la técnica de CRANE y MANDELSTAM (6). Aproximadamente 200 mg de tejido intestinal fueron homogéneamente distribuidos en erlenmeyers de 25 ml, conteniendo cada uno de ellos 4 ml de solución Krebs-Henseleit, tampón bicarbonato (11), con un pH de 7,4, en el que se habían disuelto los productos necesarios para cada experimento. En las experiencias con dicumarol el medio salino utilizado fue el descrito en otros trabajos (1).

Los erlenmeyers se mantuvieron a 37° C en un baño termostático y en ellos burbujeo carbógeno (95 % de O₂ y 5 % de CO₂) durante todo el tiempo de la incubación.

El azúcar se determinó colorimétricamente según el método de SOMOGYI (21).

El consumo de oxígeno se midió por el método directo de WARBURG (23) en atmósfera de O₂ puro, a 37° C, 80 oscilaciones por minuto y 3 cm de amplitud en cada oscilación. En estos experimentos el medio salino utilizado fue el Krebs-Henseleit, tampón fosfatos.

Los resultados de la acumulación de azúcar son expresados como concentración de esta sustancia en el contenido acuoso del tejido intestinal, considerando que éste es el 80 % del peso del tejido aproximadamente. La velocidad de penetración se expresa en μM de galactosa/100 mg de tejido húmedo/minuto.

En el caso del consumo de O₂ los resultados se expresan en μM de O₂/100 mg de tejido húmedo.

Resultados

EFFECTO DE LA DIGITONINA EN EL TRANSPORTE ACTIVO DE D-GALACTOSA.

El efecto inhibitor sobre el transporte activo de D-galactosa producido por la digitonina, cuando está presente en el medio de incubación, es muy claro y notablemente marcado. En efecto, concen-

Tabla I. Efecto de la digitonina sobre la acumulación de D-galactosa por anillos intestinales de hamster.

Concentración inicial de galactosa, 4 mM. Incubaciones de 20 minutos en 4 ml de Krebs-Henseleit, tampón bicarbonato. Los datos se acompañan del error estándar de la media.

N.º de exp.	Digitonina M	Concentración final de galactosa (mM)		Inhibic. %
		tejido	medio	
86	—	25,90 $\pm$ 0,40	2,66 $\pm$ 0,06	
12	10 ⁻⁵	18,53 $\pm$ 0,77	3,13 $\pm$ 0,08	28,45
14	5 $\times$ 10 ⁻⁵	10,99 $\pm$ 0,39	3,56 $\pm$ 0,05	57,56
12	10 ⁻⁴	6,89 $\pm$ 0,35	3,66 $\pm$ 0,06	73,39

traciones de digitonina de 10⁻⁴, 5 $\times$ 10⁻⁵ y 10⁻⁵ M, inhiben la acumulación de D-galactosa en el intestino delgado de hamster. Después de 20 minutos de incubación, el nivel de azúcar en el tejido es de 25,90 mM en los experimentos control, poniéndose de manifiesto una inhibición

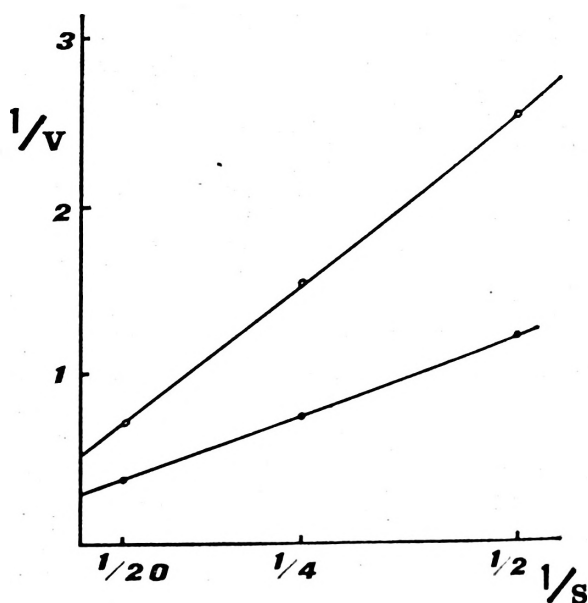


Fig. 1. Inhibición producida por la digitonina sobre el transporte activo de D-galactosa por anillos intestinales de hamster.

Tiempo de incubación 10 minutos. Los puntos para la recta de D-galactosa son la media de quince experimentos (●) y para la recta con digitonina, de seis experimentos (○). Concentración de digitonina, 5 $\times$ 10⁻⁵ M.

aproximada del 28, 57 y 73 % cuando la concentración de digitonina en el medio de incubación era de 10^{-5} , 5×10^{-5} y 10^{-4} M, respectivamente (tabla I).

El estudio cinético de esta inhibición como se deduce de la figura 1, muestra que es no competitiva, encontrándose un valor aparente para K_i de $6,5 \times 10^{-5}$ M.

EFFECTO DE LA DIGITONINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO.

En experimentos realizados en el aparato de Warburg, se observó que cuando la digitonina se añadía al medio de incubación, inhibía el consumo de oxígeno por anillos intestinales de hamster (fig. 2).

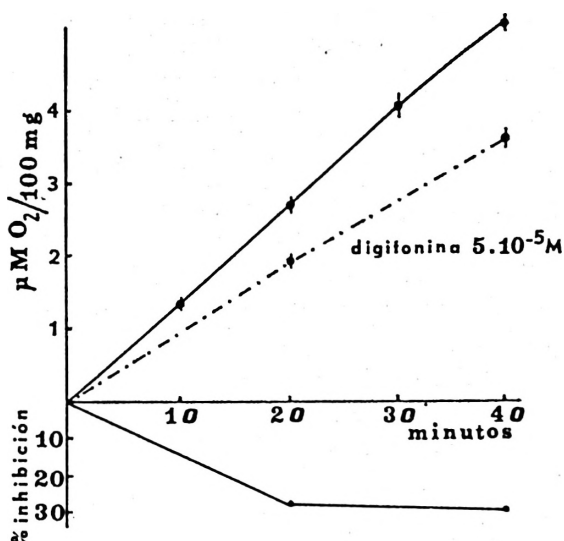


Fig. 2. Efecto de la digitonina sobre el consumo de oxígeno por anillos intestinales de hamster.

Los puntos son la media de veinte experimentos y se acompañan del error estándar. En la parte inferior se expresa el porcentaje de inhibición respecto del control.

Las medidas en los matraces controles se hicieron a los 10, 20, 30 y 40 minutos y en los matraces con digitonina 5×10^{-5} M disuelta en el medio a los 20 y 40 minutos. Los valores de consumo de oxígeno obtenidos son menores, encontrando una

Tabla II. Efecto de la preincubación (20 minutos) en un medio con digitonina sobre la acumulación de D-galactosa por anillos intestinales de hamster.

Concentración inicial de galactosa, 4 mM. Incubaciones de 20 minutos en 4 ml de Krebs-Henseleit, tampón bicarbonato. Los datos se acompañan del error estándar de la media. Entre paréntesis, número de experimentos.

Digitonina M	Concentración final de galactosa		Inhibición %
	tejido	medio	
— (10)	$18,50 \pm 0,92$	$3,05 \pm 0,12$	—
10^{-4} (15)	$7,23 \pm 0,65$	$3,55 \pm 0,10$	60,90

inhibición del 27 % a los 20 minutos y del 29 % a los 40 minutos, respecto de los controles.

EFFECTO DE LA PREINCUBACIÓN EN UN MEDIO SALINO CON DIGITONINA.

Cuando se someten los anillos intestinales de hamster a una preincubación de 20 minutos sin azúcar y con digitonina 10^{-4} M, seguida de una incubación con galactosa 4 mM y sin digitonina, se observa una marcada disminución en el nivel alcanzado por el azúcar en el tejido (tabla II). Esta inhibición producida por la preincubación es del orden del 61 % frente al 73 % obtenido cuando los anillos intestinales se incuban directamente con galactosa y digitonina.

EFFECTO CONJUNTO DEL DICUMAROL Y DIGITONINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE D-GALACTOSA POR ANILLOS INTESTINALES DE HAMSTER.

En trabajos anteriores (1, 4, 17), al estudiar el efecto del dicumarol sobre la absorción intestinal de azúcares se vio que inhibía la acumulación de azúcares activamente transportados por asas aisladas de intestino, siendo esta inhibición de tipo no competitivo (4). Del mismo modo, la preincubación en dicumarol también afectaba el posterior transporte de glucosa

Tabla III. Efecto conjunto del dicumarol y la digitonina sobre el transporte activo de D-galactosa.

Concentración inicial de galactosa, 4 mM. Tiempo de incubación, 20 minutos en 4 ml de medio de incubación. Entre paréntesis, número de experimentos. Los datos se acompañan del error estándar de la media.

Concentración 10^{-5} M		Concentración final de galactosa (mM)		Inhibic. %
		tejido	medio	
—	(86)	$25,90 \pm 0,40$	$2,66 \pm 0,06$	—
dic.	(12)	$15,47 \pm 0,79$	$3,18 \pm 0,10$	40,27
dig.	(12)	$18,53 \pm 0,77$	$3,13 \pm 0,08$	28,45
dic.+dig.	(10)	$10,99 \pm 0,63$	$3,60 \pm 0,06$	57,56

y galactosa. Por otra parte, esta sustancia inhibía el consumo de oxígeno.

Dado que los efectos del dicumarol eran parecidos a los producidos por la digitonina, nos pareció interesante estudiar el efecto conjunto de estas dos sustancias sobre el transporte activo.

Los resultados se expresan en la tabla III y en la figura 3 e indican que el

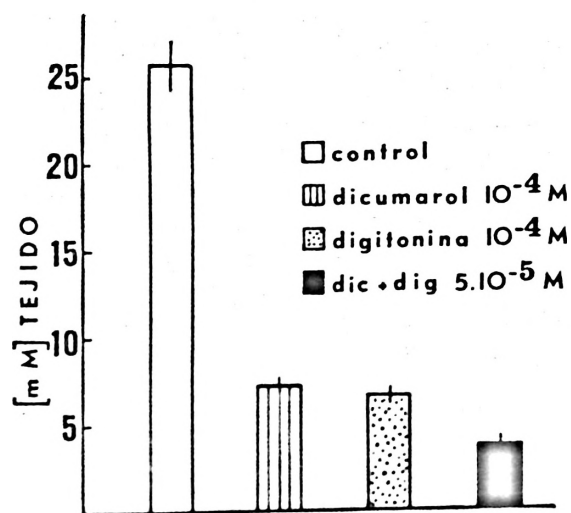


Fig. 3. Efecto conjunto del dicumarol y la digitonina sobre la acumulación de D-galactosa por anillos intestinales de hamster.

Tiempo de incubación, 20 minutos, Concentraciones: digitonina, 10^{-4} M, dicumarol, 10^{-4} M, digitonina + dicumarol, 5×10^{-5} M para cada uno de ellos.

efecto producido por estas dos sustancias a concentraciones de 5×10^{-5} y 10^{-5} M, es mayor que el producido por cada una de ellas a la misma concentración y por separado.

Discusión

La digitonina, cuando está presente en el medio de incubación, inhibe significativamente la acumulación de D-galactosa por anillos intestinales de hamster. Esta inhibición es del 28 % al 73 % a concentraciones de 10^{-5} y 10^{-4} M, respectivamente.

El estudio cinético de esta inhibición revela que es de tipo no competitivo, ya que varía la V_{max} y K_m del proceso.

Cuando se someten anillos intestinales a una preincubación en un medio con digitonina, el tejido intestinal se hace incapaz de realizar normalmente el transporte activo en una incubación posterior, observándose una inhibición respecto de los controles del 60 % aproximadamente.

En los experimentos para medir el consumo de oxígeno, la digitonina provoca una inhibición del 27 % y 29 % a los 20 y 40 minutos, respectivamente. Como estas determinaciones fueron hechas en ausencia de un sustrato exógeno metabolizable, estos resultados indican que la digitonina penetra en las células y altera su metabolismo. Esto explicaría el porqué una simple preincubación con digitonina afecta la capacidad de acumulación de galactosa por el tejido.

Varios trabajos (15, 16) indican que la digitonina afecta los flujos de sodio y potasio a través de la membrana de eritrocitos y los de sodio e hidrógeno a través de mucosa gástrica (7). Este efecto podría deberse al hecho de que la digitonina inhibe la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , lo que de acuerdo con la teoría de CRANE (5), podría explicar la inhibición provocada por la digitonina. RUMMEL (15) observó que una concentración de digitonina que no tiene acción hemolítica inhibe el

transporte de Na^+ y K^+ en contra de gradiente en eritrocitos humanos, necesitando concentraciones 10 ó 15 veces mayores para obtener esta inhibición en eritrocitos de rata. Por otro lado, GROBECKER (16), encontró que la digitonina inhibe el transporte de Na^+ y K^+ en eritrocitos humanos, de rata y de cobaya. Esta inhibición es paralela a la inhibición de la ATPasa.

Para SIMONOVA (12) la digitonina a bajas concentraciones activa la ATPasa en membranas de eritrocitos, mientras que a altas concentraciones provoca una fuerte inactivación. También REPKE (19), indica que la digitonina aumenta la actividad ATPásica en membranas celulares de miocardio de cobaya.

En la interpretación de nuestros resultados, aun cuando la digitonina inhiba la ATPasa de la mucosa intestinal, hay que tener en cuenta los datos de ROBINSON (20), según los cuales la inhibición del sistema ATPásico no lleva consigo la inhibición del transporte activo de azúcares por la mucosa intestinal.

Se ha visto que la digitonina altera las mitocondrias (9, 18, 22) provocando tumefacción e incluso separación de la membrana externa, de la membrana interna y matriz mitocondrial. Esta acción provoca la inhibición de ciertos sistemas enzimáticos, como el NADH citocromo-c-reductasa, succinato oxidasa, succinato citocromo-c-reductasa y NADH oxidasa en preparaciones de músculo cardíaco (8, 10). En el hígado de rata (9) se observa que la digitonina inhibe la actividad NADH citocromo-c-reductasa, mientras que se mantienen la fosforilación oxidativa y el cambio Pi-ATP .

Estas acciones sobre el metabolismo justificarían las inhibiciones del consumo de oxígeno producidas por esta sustancia en nuestras condiciones experimentales. Por otra parte, la digitonina es capaz de reaccionar con el colesterol, tocoferol, lípidos y otras sustancias integrantes de las membranas celulares (2, 8, 13) formando

complejos insolubles, lo que explicaría el porqué una simple preincubación con esta sustancia afectan la posterior acumulación de galactosa por el epitelio intestinal.

Los resultados obtenidos en los experimentos con digitonina y dicumarol juntos en el medio de incubación, indican que hay un efecto sinérgico de estas dos sustancias sobre el transporte activo. Esta sinergia parece que es aditiva de tipo fisiológico, actuando las dos sustancias sobre lugares distintos o favoreciendo alguna de ellas la absorción de la otra.

Resumen

Se estudia el efecto de la digitonina sobre el transporte activo de D-galactosa y consumo de oxígeno por anillos de intestino delgado de hamster. Los resultados muestran que la digitonina inhibe la acumulación activa de galactosa actuando como un inhibidor no competitivo con una K_i aparente de $6,5 \times 10^{-5}$ M. También inhibe el consumo de oxígeno del tejido intestinal en ausencia de sustrato exógeno.

La inhibición en el transporte activo, producida por la digitonina, se observó también cuando el tejido se preincubó con esta sustancia.

Estos efectos podrían deberse a la inhibición del metabolismo celular producido por esta sustancia o a la unión de la digitonina con componentes de las membranas celulares.

El efecto conjunto de la digitonina y el dicumarol sobre el transporte activo de galactosa es mayor que el producido por cada uno de ellos a la misma concentración.

Bibliografía

1. ANSELM, E., JORDANA, R. y LARRALDE, J.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 325, 1970.
2. BADOIN, J.: *C. R. Acad. Sci. Paris., Ser. D.*, **266**, 2007, 1968.
3. BELLO, J., CASTELLO, J. A. y LARRALDE, J.: *Rev. Nutr. Animal*, **4**, 215, 1969.
4. BOUFER, J., LARRALDE, J. y PONZ, F.: *Pflug. Arch. Europ. J. Physiol.* (en prensa).
5. CRANE, R. K.: *Fed. Proc.*, **24**, 5, 1000, 1965.
6. CRANE, R. K. y MANDELSTAM, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 460, 1960.

7. DAVENPORT, H. W.: *Gastroenterology*, 59, 505, 1970.
8. DETWILER, T. C., GARRET, R. H. y NASON, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 9, 1966.
9. HOPPEL, CH. y COOPER, C.: *Biochem. J.*, 107, 367, 1968.
10. KANINGA, Z., GARDOS, A. y JAKUBIAK, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 9, 1966.
11. KREBS, H. A. y HENSELEIT, Z.: *Fisiol. Chem. Hoppe. Sylaers.*, 210, 23, 1932.
12. MIRCEVOVA, L. y SIMONOVA, A.: *Collection Czech. Chem. Commun.*, 31, 4145, 1966.
13. NASON, A., GARRETT, R. H., NAIR, P. P., VASINGTON, F. D. y DETWILER, T. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14, 220, 1964.
14. PETERSON, D. W.: *Poultry Science*, 29, 775, 1950.
15. PFLEGER, K., RUMMEL, W., SEIFEN, E. y BOLDOUF, J.: *Med. Exptl.*, 5, 473, 1961.
16. PIECHOWSKI, U., GROBECKER, H. y GREEF, K.: *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 346, 43, 1963.
17. PONZ, F. y LLUCH, M.: *R. esp. Fisiol.*, 24, 203, 1968.
18. PURVIS, J. L.: *Exptl. Cell. Research*, 16, 98, 1969.
19. REPKE, K.: *Conf. Hung. Therap. Invest. Pharmacol.*, 2, 300, 1964.
20. ROBINSON, J. W. L.: *J. Physiol.*, 206, 41, 1970.
21. SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, 96, 19, 1952.
22. TROJAN, L. E. y JOHNSON, R. M.: *J. Nutr.*, 94, 369, 1968.
23. WARBURG, O.: *Biochem. Zeitsch.*, 142, 51, 1924.