

## Efecto de algunos glucósidos cardiotónicos sobre el transporte activo de azúcares por intestino de hamster\*

J. Bolufer,\*\* E. Anselmi y J. Larralde

Departamento de Investigaciones Fisiológicas (C.S.I.C.)  
Laboratorio de Fisiología Animal  
Universidad de Navarra  
Pamplona (España)

(Recibido el 3 de mayo de 1973)

J. BOLUFER, E. ANSELMÍ and J. LARRALDE. *Effect of Cardioactive Steroids on Active Intestinal Sugar Transport in Hamster*. Rev. esp. Fisiol., 29, 267-272. 1973.

The effect of ouabain, convallatoxin, cymarín, digitoxin, thevetin, and lanatoside C on the accumulation of D-galactose by rings of hamster small intestine has been studied. The results shown that ouabain, convallatoxin and cymarín, when added to the medium of incubation at concentrations  $10^{-4}$  to  $10^{-3}$  M inhibits the active accumulation of galactose. The digitoxin, thevetin, and lanatoside C did not effect the active transport of this sugar in the same conditions.

The effect of ouabain on the active transport of galactose by everted sacs of hamster small intestine is greater when the glycoside is present in the serosal side that when is in the mucosal side.

The results are explained as due to differences in the polarity of cardiac steroids and to specificity of animal experimentation.

El transporte activo de azúcares por el intestino está en la gran mayoría de los casos íntimamente ligado al del sodio. Por un lado, el transporte de azúcar requiere la presencia de sodio, y por otro, la adición de azúcares estimula el transporte activo de este elemento a través del intestino (9, 20, 23).

\* Este trabajo se realizó en parte con una ayuda para el «Fomento de la Investigación en la Universidad» concedida por el M.E.C.

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

Esta reciprocidad de fenómenos se manifiesta especialmente frente a la acción de los glucósidos cardiotónicos, inhibidores de la bomba de sodio que inhiben también el transporte activo de azúcares en el intestino. En este último proceso, aparecen, no obstante, algunas diferencias características en función del glucósido ensayado (7, 12) o de la especie animal elegida (1, 8, 21).

Por eso, de acuerdo con anteriores trabajos (2, 3), se estudia en éste el efecto de una serie de glucósidos cardiotónicos todavía no ensayados, sobre el transporte

activo de galactosa por el intestino 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 horas antes del experimento.

Los preparados intestinales se han obtenido según las técnicas *in vitro* de CRANE-MANDELSTAM (6) y WILSON-WISEMAN (26). En los experimentos con la técnica de Crane las condiciones son las mismas que las descritas en un trabajo anterior (2). Cuando se utilizó la técnica de sacos invertidos de cada animal se hicieron seis sacos utilizando todas las regiones del yeyuno-íleon, y cada saco se suspendía en 10 ml de solución Krebs-Henseleit-bicarbonato (14). El azúcar se determinó colorimétricamente por el método SOMOGYI (24).

Los resultados de la acumulación de azúcar en la técnica de Crane son expresados como concentración de D-galactosa en el contenido acuoso del tejido intestinal, considerando que éste es el 80 % del peso fresco del tejido. En la técnica de Wilson la medida del transporte activo se expresa como incremento neto de galactosa ( $\mu\text{M}$ ) en el lado serosal más la galactosa acumulada en el tejido, referidos

a 100 mg de tejido fresco. Estos valores eran muy similares a los de galactosa desaparecida del medio mucosal.

Para preparar las soluciones acuosas de determinados esteroides a concentraciones elevadas fue preciso un solubilizador. Se utilizó el etanol a concentración final de 0,2 a 1 %, el cual según CHANG *et al.* (10) sólo a concentraciones del 3 % inhibe significativamente el transporte activo de galactosa.

### Resultados

*Efecto de los glucósidos polares ouabaína, convalatoxina y cimarina sobre el transporte activo de D-galactosa.* — Como se observa en la tabla I, la ouabaína inhibe la acumulación de D-galactosa por anillos de intestino delgado de hamster; sin embargo, se requieren cantidades relativamente altas del glucósido cardíaco, ya que cuando se encuentra en el medio de incubación a una concentración  $10^{-4}$  M, la inhibición producida es alrededor del 19 %.

Cuando los experimentos se realizaron con la técnica de Wilson-Wiseman, el efecto producido por la ouabaína depende de que esta sustancia se encuentre en el medio serosal o en el mucosal. La tabla II presenta los resultados obtenidos y se observa que la ouabaína produce una clara inhibición del transporte activo de

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

Los anillos fueron incubados durante 20 minutos en 4 ml de Krebs-Henseleit, tampón bicarbonato, conteniendo D-galactosa 4 mM. Los resultados se expresan como concentración (mM) en el agua del tejido al final de la incubación (suponiendo un contenido de agua en el tejido del 80 %). Entre paréntesis se indica el número de datos. Los resultados se acompañan del error standard de la media.

Ouabaína [M]	Concentración final de galactosa		Inhibición %	t de Student
	Tejido	Medio		
— (20)	24,77 ± 1,02	2,84 ± 0,11	—	—
10 <sup>-4</sup> (28)	19,53 ± 0,60	3,05 ± 0,13	19,19	3,93
5 × 10 <sup>-4</sup> (14)	18,22 ± 0,75	3,20 ± 0,15	23,36	5,20
10 <sup>-3</sup> (12)	17,63 ± 1,03	3,25 ± 0,09	27,06	4,95

Tabla II. Efecto de la ouabaina sobre el transporte activo de D-galactosa por sacos intestinales invertidos de hamster.

Los sacos fueron incubados durante 30 ó 60 minutos en 10 ml de Krebs-Henseleit tampón bicarbonato, conteniendo D-galactosa 4 mM en el líquido mucosal y serosal. Los resultados se expresan como  $\mu\text{M}$  galactosa transportados por 100 mg de tejido fresco, y se acompañan del error standard de la media. La ouabaina se disolvió en el medio mucosal, en el serosal o en ambos medios, según se indica. Entre paréntesis se expresa el número de experimentos.

Ouabaina $10^{-3}$ M		$\mu\text{M}$ galactosa 100 mg tejido	Inhibición %
Tiempo de incubación: 60 min.			
—	(11)	$6,88 \pm 0,68$	
Mucosal	(10)	$3,48 \pm 0,51$	49,41
Serosal	(7)	$2,49 \pm 0,29$	63,80
Mucosal y serosal	(6)	$2,23 \pm 0,51$	67,58
Tiempo de incubación: 30 min.			
—	(10)	$4,47 \pm 0,42$	
Mucosal	(14)	$3,56 \pm 0,34$	20,35
Serosal	(19)	$1,86 \pm 0,13$	58,38
Mucosal y serosal	(5)	$1,73 \pm 0,90$	61,29

D-galactosa que es bastante más alta cuando inicialmente se encuentra en el medio serosal. Las diferencias según donde se encuentre inicialmente la ouabaina son mucho más acusadas en las incubaciones de 30 minutos que en las de 60 minutos.

Los resultados obtenidos cuando la convalatoxina y cimarina se encuentran en el medio de incubación, se expresan en la tabla III. Se observa que la convalatoxina produce una inhibición significativa de la acumulación de D-galactosa a las concentraciones de  $10^{-4}$  y  $5 \times 10^{-4}$  M mientras que la cimarina sólo tiene un efecto significativo a concentración  $5 \times 10^{-4}$  M.

*Efecto de la digitoxina, tevetina y lanatósido C sobre la acumulación de D-galactosa.* — Los resultados obtenidos cuando se disuelven en el medio de incubación estos glucósidos a distintas concentraciones, vienen expresados en la tabla IV. Se observa que incluso a concentraciones de  $5 \times 10^{-4}$  M no producen inhibiciones significativas.

Tabla III. Efecto de la convalatoxina y cimarina sobre la acumulación de D-galactosa por anillos intestinales de hamster.

Los anillos fueron incubados durante 20 minutos en 4 ml de Krebs-Henseleit, tampón bicarbonato, con una concentración inicial de D-galactosa 4 mM. En algunos experimentos se utilizó el etanol para solubilizar los glicósidos. Los resultados se expresan como concentración final (mM), en el agua del tejido y en el medio de incubación y se acompañan del error standard de la media. Entre paréntesis se indica el número de experimentos.

Glucósido añadido M		Concentración final de galactosa		Inhibición %	t de Student
		Tejido	Medio		
—	(20)	$24,17 \pm 1,02$	$2,65 \pm 0,12$	—	—
—	(9)*	$23,97 \pm 1,20$	$2,80 \pm 0,10$	—	—
Convalatoxina					
$10^{-4}$	(10)	$20,56 \pm 1,16$	$2,79 \pm 0,09$	14,93	2,22
$5 \times 10^{-4}$	(9)*	$17,81 \pm 0,78$	$3,05 \pm 0,12$	25,74	4,30
Cimarina					
$10^{-4}$	(7)	$23,75 \pm 1,23$	$2,84 \pm 0,15$	1,73	n.s.**
$5 \times 10^{-4}$	(6)	$20,57 \pm 1,11$	$2,98 \pm 0,13$	14,84	2,38

\* Se utilizó como solubilizador el etanol con una concentración final del 0,8 por ciento.

\*\* n.s. = no significativo.

Tabla IV. Efecto de la digitoxina, tevetina y lanatósido C sobre la acumulación de D-galactosa, por anillos intestinales de hamster.

Los anillos fueron incubados durante 20 minutos en 4 ml de Krebs-Henseleit, tampón bicarbonato, con una concentración inicial de D-galactosa 4 mM. En algunos experimentos se utilizó el etanol para solubilizar los glucósidos. Los resultados se expresan como concentración final en el agua del tejido y en el medio de incubación y se acompañan del error standard de la media. Entre paréntesis, el número de experimentos.

Glucósido M	Solubilizador etanol %	Concentración final de galactosa, mM		Inhibición %	
		Tejido	Medio		
Control	(20)	—	24,17 ± 1,02	2,80 ± 0,09	
	(7)	0,20	23,80 ± 0,84	2,75 ± 0,12	
	(9)	0,80	23,97 ± 1,20	2,90 ± 0,14	
Digitoxina	10 <sup>-4</sup> (20)	0,20	21,80 ± 0,55	2,94 ± 0,07	8,96 n.s.*
	10 <sup>-4</sup> (6)	0,60	21,83 ± 0,76	2,92 ± 0,13	8,93 n.s.
	5 × 10 <sup>-4</sup> (6)	0,80	21,62 ± 0,68	2,94 ± 0,11	9,81 n.s.
Tevetina	10 <sup>-4</sup> (6)	0,80	23,44 ± 0,66	2,76 ± 0,10	
	5 × 10 <sup>-4</sup> (6)	1	22,85 ± 1,03	2,87 ± 0,15	4,68 n.s.
Lanatósido C	10 <sup>-4</sup> (6)	0,80	25,82 ± 0,25	2,83 ± 0,10	
	5 × 10 <sup>-4</sup> (3)	1	24,58 ± 0,58	2,81 ± 0,12	

\* n.s. = no significativo.

### Discusión

Los resultados muestran que la ouabaína inhibe la acumulación de galactosa por el intestino de hamster. Estos resultados difieren en parte de los encontrados por DETTMER *et al.* para quienes la ouabaína no inhibe la acumulación intracelular de galactosa en mucosa intestinal de hamster (11).

La sensibilidad del sistema de transporte de azúcares a la ouabaína resulta ser en hamster mayor que la encontrada en rata (19) y ratón (21) y menor que en rana (8), conejo (1) y cobayo (12).

De la tabla II se desprende que la acción inhibitoria de la ouabaína es mayor cuando se encuentra en el lado serosal del intestino, hecho comprobado en rana (8) y rata (19). Este dato es interesante teniendo en cuenta que, como indica NADAL *et al.* (18), la ouabaína situada en el lado mucosal del intestino de rata pasa hacia el serosal con relativa facilidad, lo que se producirá más en períodos de 60 minu-

tos que en los de 30, mientras que la permeabilidad en sentido contrario es nula o muy reducida. Recientemente, CASIDY (5) ha comprobado, mediante técnicas autorradiográficas, que en el intestino de hamster la ouabaína, cuando se encuentra en el lado serosal, aparece en gran proporción en el tejido intestinal, cosa que no ocurre cuando se encuentra en el lado mucosal. Esto podría explicar que la inhibición producida sea mayor cuando el glucósido se encuentra en el medio serosal.

Otros autores, FORTH *et al.*, en cobayo hallan que glucósidos como la digitoxina y la proescilaridina son más activos inhibidores cuando se hallan presentes en el lado mucosal (12).

Respecto a los demás glucósidos ensayados es de notar el hecho de que en condiciones similares sólo los glucósidos polares provoquen una inhibición significativa sobre el transporte activo de galactosa. Una explicación posible sería que los glucósidos cardiotónicos no polares

no tuviesen una acción inhibitoria sobre la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  del intestino; sin embargo, varios trabajos (17, 21) indican que la digitoxina inhibe este sistema enzimático en varios tejidos y distintos animales incluso en mayor proporción que la ouabaína (17).

Por otra parte, ROBINSON (21) encontró diferencias en la sensibilidad hacia los esteroides cardiotónicos del sistema ATPásico dependiente de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  y del sistema de transporte activo de azúcares y aminoácidos, sugiriendo otro sistema enzimático no sensible a estos glucósidos, que influiría en la salida del  $\text{Na}^+$  de las células epiteliales del intestino. La existencia de dos bombas de  $\text{Na}^+$  diferentes en algunos tipos de células fue indicada por WHITTEMBURY (25) y recientemente por ROBINSON en riñón de perro (22).

Otra causa podría ser el propio mecanismo de absorción de estos glucósidos. LAUTERBACH (16) postula un mecanismo de transporte con cinética de saturación para los polares, mientras los no polares se absorberían por simple difusión. Sin embargo, para otros autores (4, 11 y 13) el mecanismo de transporte sería similar para todos ellos y sin cinética de saturación, siendo la digitoxina el de mayor difusión (11). Aunque en este trabajo no se ha estudiado el transporte de estos glucósidos por el intestino, los resultados sugieren, de acuerdo con Lauterbach, una diferencia en sus respectivas absorciones que de alguna manera influirán sobre los glucósidos no polares, dificultando su acceso al sistema ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  del intestino de hamster.

### Resumen

Se estudia el efecto de la ouabaína, convallatoxina, cimarina, tevetina, digitoxina y lanatósido C sobre el transporte activo de D-galactosa por preparados intestinales de hamster. Los resultados muestran que la ouabaína produce una inhibición mayor cuando se encuentra inicialmente en el medio serosal del intestino.

La acumulación activa de D-galactosa es inhibida significativamente por la ouabaína, convallatoxina y cimarina, mientras que la digitoxina, tevetina y lanatósido C no producen ningún efecto en las mismas condiciones.

Se discuten los resultados de acuerdo con la polaridad de los distintos glucósidos cardiotónicos empleados y la especificidad del animal de experimentación.

### Bibliografía

1. BINDER, H. J., BOYER, M., SPIRO, H. M. y SPENCER, R. P.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **18**, 83, 1966.
2. BOLUFER, J., LARRALDE, J. y PONZ, F.: *Plügers Arch-Eur. J. Physiol.*, **338**, 159, 1973.
3. BOLUFER, J., LARRALDE, J. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **28**, 321, 1972.
4. CALDWELL, J. H., MARTIN, J. F., DUTTA, S. P. y GREENBERGER, N. J.: *Amer. J. Physiol.*, **217**, 1747, 1969.
5. CASSIDY, M. M.: *Cytobiology*, **5**, 301, 1972.
6. CRANE, R. K. y MANDELSTAM, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 460, 1960.
7. CSAKY, T. Z.: *Biochim. Biophys. Acta*, **74**, 160, 1963.
8. CSAKY, T. Z. y HARA, Y.: *Amer. J. Physiol.*, **209**, 467, 1965.
9. CSAKY, T. Z. y THALE, M. J.: *J. Physiol.*, **151**, 59, 1960.
10. CHANG, I., LEWIS, J. y GLAZKE, A. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 1000, 1967.
11. DETTMER, D., MULLER, F. y KUHFUHL, E.: *Acta Biol. Med. German.*, **18**, 555, 1967.
12. FORTH, W. y ROMMEL, W.: *Helv. Physiol. Pharmac. Acta*, **25**, 8, 1967.
13. GREENBERGER, N. J., MAC DERMOTT, R. P., MARTIN, J. F. y DUTTA, S.: *J. Pharm. Exp. Ther.*, **167**, 265, 1969.
14. KREBS, H. A. y HENSELEIT, Z.: *Fisiol. Chem. Hoppe. Sylers.*, **210**, 23, 1932.
15. LAUTERBACH, F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 273, 1967.
16. LAUTERBACH, F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 146, 1968.
17. LEOPOLD, G., FURUKAWA, E., FORTH, W. y RUMMEL, W.: *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1109, 1971.
18. NADAL, J., PROUS, J. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **23**, 241, 1967.

19. NEWEX, H., SANDFORD, P. A. y SMYTH, D. H.: *J. Physiol.*, **194**, 237, 1968.
20. RIKLIS, E. y QUASTLE, J. H.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **36**, 347, 1958.
21. ROBINSON, J. W. L.: *J. Physiol.*, **206**, 41, 1970.
22. ROBINSON, J. W. L.: *Comp. gen. Pharmacol.*, **3**, 145, 1972.
23. SCHULTZ, S. C. y ZALUSKY, R.: *J. gen. Physiol.*, **47**, 567, 1964.
24. SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **96**, 19, 1952.
25. WHITTEMBURY, G. y FISHMAN, J.: *Plügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **307**, 138, 1969.
26. WILSON, T. H. y WISEMAN, G.: *J. Physiol.*, **123**, 116, 1954.