

Influencia de algunas cumarinas sobre la absorción intestinal de galactosa *in vivo*

M.^a J. Ruano,* J. Bolufer, J. Larralde y M. Lluch

Departamento de Fisiología Animal
Universidad de Navarra
Pamplona (España)

(Recibido el 3 de enero de 1975)

M.^a J. RUANO, J. BOLUFER and J. LARRALDE. *Effect of Various Coumarins on the Intestinal Absorption of Galactose in vivo*. Rev. esp. Fisiol., 31, 105-108. 1975.

The effect of various coumarins on the active transport of galactose by small intestine in chick and rat was studied, using the *in vivo* technique of successive absorptions.

A 10^{-4} M concentration of the different coumarins inhibits the absorption of galactose in the chick. This effect persists in successive absorptions without coumarin.

In rat, inhibition of galactose active transport by coumarins was observed at 10^{-3} M concentration.

Trabajos llevados a cabo en este laboratorio han demostrado que el dicumarol inhibe el transporte activo de galactosa por intestino de rata tanto *in vivo* (12) como *in vitro* (1). Un efecto semejante se ha encontrado al utilizar intestino de hamster (5) y diafragma de rata (15).

Dado el interés farmacológico que presentan las sustancias de tipo cumarínico debido a sus acciones bactericidas (6, 9), estrogénicas (2, 3), vasodilatadoras (4), anticoagulantes (11), etc., en el presente trabajo se estudia la influencia de algunas cumarinas distintas del dicumarol, sobre el transporte activo de galactosa *in vivo* por intestino de rata y pollo.

Material y métodos

Se han utilizado pollos broilers (*Gallus domesticus*) de edad comprendida entre los 20 y 30 días y ratas blancas Wistar de 150-200 g de peso. Todos los animales antes de ser utilizados han sido sometidos a un período de ayuno de 24 horas.

Se ha empleado la técnica de SOLS y PONZ (19) aplicada al pollo recientemente por RUANO *et al.* (17). En cada animal se han llevado a cabo cuatro absorciones sucesivas de 10 minutos cada una en los experimentos realizados con pollos y de 20 minutos en los realizados con ratas. Las asas intestinales elegidas procedían de la parte central del intestino delgado y su longitud ha oscilado entre los 15 y 25 centímetros (21). Como solución salina se

* Becaria del Plan de Formación de Personal Investigador del M.E.C.

ha empleado ClNa al 9 ‰ y en ella se disolvía la galactosa hasta alcanzar una concentración de 2,77 mM.

Las cumarinas utilizadas han sido las siguientes: cumarina, 4-hidroxycumarina, cumarina-3-carboxilo y acenocumarol. Todas ellas han requerido un solubilizador antes de ser incorporadas a la solución de galactosa. Para el acenocumarol se ha utilizado NaOH al 1 % y para las tres restantes alcohol etílico a una concentración final de 0,01 a 1 %, el cual, según CHANG *et al.* (7), sólo a concentraciones del 3 % o mayores inhibe significativamente la absorción intestinal.

Los resultados se expresan en micromoles de galactosa absorbidos por centímetro de intestino.

El azúcar se ha determinado colorimétricamente según el método de SOMOGYI (20).

Resultados

1. *Efecto de algunas cumarinas en pollo.* Los resultados se recogen en la figura 1 y vienen expresados en micromoles de galactosa por centímetro de intestino en 10 minutos. De los cuatro períodos sucesivos de absorción llevados a cabo en cada animal, el primero y tercero se han realizado sin cumarina, estando ésta adicionada a una concentración 10^{-4} M a la solución de galactosa 2,77 mM únicamente en los períodos segundo y cuarto. Puede observarse la acción inhibidora de todas las cumarinas al ser colocadas en el asa intestinal durante el segundo período de absorción. Este efecto se mantiene durante el tercer período a pesar del intenso lavado del asa llevado a cabo con cloruro sódico al 9 ‰, lo cual sugiere la posible fijación de la cumarina al epitelio intestinal de forma persistente. Los grados de inhibición alcanzados en la cuarta absorción son del orden del 42, 32, 16 y 72 % para la cumarina, 4-hidroxycumarina, cumarina-3-carboxilo y acenocumarol, respectivamente.

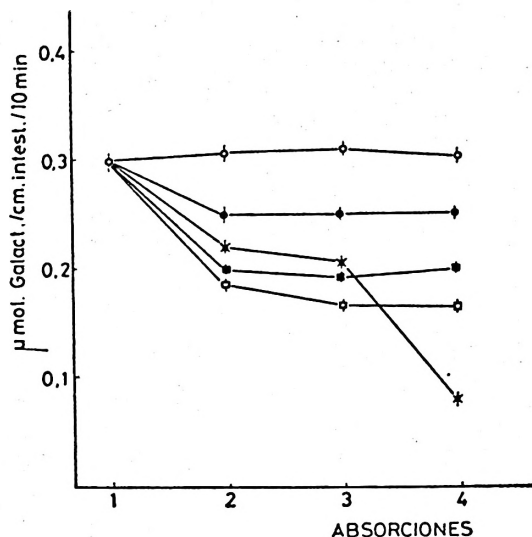


Fig. 1. Influencia de la cumarina (□), 4-hidroxycumarina (■), cumarina-3-carboxilo (●) y acenocumarol (×) sobre el transporte activo de galactosa 2,77 mM in vivo por intestino de pollo (control ○).

Absorciones sucesivas de 10 minutos. Azúcar en solución isotónica de ClNa. Cumarinas 10^{-4} M en segunda y cuarta absorciones. Los datos se acompañan del error estándar. Cada punto indica el valor medio de 12 experimentos.

En el caso de este último, la inhibición está aumentada considerablemente en el cuarto período con respecto al segundo.

2. *Influencia de las cumarinas en rata.* La acción inhibidora de las cumarinas ensayadas sobre la absorción de galactosa 2,77 mM, empleando la rata como animal de experimentación, es clara cuando se trabaja a una concentración de cumarina de 10^{-3} M.

Los porcentajes de inhibición son mayores a lo largo de las distintas absorciones en el caso del acenocumarol y de la cumarina (tabla I).

En el cuarto período dicho efecto alcanza un valor del 53, 44, 18 y 60 % para la cumarina, 4-hidroxycumarina, cumarina-3-carboxilo y acenocumarol, respectivamente. A la concentración de 10^{-4} M,

Tabla 1. *Influencia de cumarinas sobre la absorción de galactosa 2,77 mM por Intestino delgado de rata in vivo.*

Absorciones sucesivas de 20 minutos. Azúcar en solución isotónica de ClNa. Cumarinas 10^{-3} M en segunda y cuarta absorciones. Los valores medios se acompañan del error estándar. N.S. no significativo.

Cumarina	N.º de animales	Absorciones (μ mol gal/cm Intestino)			
		1.ª	2.ª	3.ª	4.ª
—	10	$0,35 \pm 0,04$	$0,37 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,04$
Cumarina	12	$0,36 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,01$
			$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,001$
4-Hidroxycumarina	12	$0,34 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,03$
			N.S.	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Cumarina-3-carboxilo	14	$0,39 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$
			N.S.	$p < 0,01$	$p < 0,02$
Acenocumarol	10	$0,38 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,03$
			$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

las sustancias estudiadas no han presentado ningún efecto.

En un lote de 12 ratas se ha estudiado la absorción de galactosa preparando dos asas intestinales contiguas, y colocando en la primera de ellas una solución de galactosa 2,77 mM durante las cuatro absorciones sucesivas y en la segunda suero fisiológico (en los períodos primero y tercero) al que se le añadía cumarina 10^{-3} M en los períodos restantes.

La cantidad de galactosa absorbida en el asa primera fue normal y constante durante los cuatro períodos de absorción en estas condiciones de trabajo, no influyendo, por tanto, la presencia de cumarina existente en el asa contigua.

Discusión

De todas las cumarinas, la única estudiada desde el punto de vista de nuestro trabajo ha sido el dicumarol (1, 5, 12, 13, 15). En los resultados anteriores queda patente que la absorción intestinal de galactosa, a partir de una solución 2,77 mM, se inhibe parcialmente por varias sustancias de tipo cumarínico.

Es conocido que el transporte activo puede ser inhibido de dos maneras dife-

rentes: o por efecto directo sobre el proceso mismo de transporte, o por un efecto generalizado sobre la permeabilidad. El hecho de que la acción persista a pesar del intenso lavado llevado a cabo con suero fisiológico en las asas intestinales, con objeto de eliminar los posibles restos de cumarina existentes, sugiere que no existe una inhibición específica a nivel del sistema de transporte de la galactosa, ya que no se precisa la colocación simultánea de azúcar e inhibidor en el asa para observar el efecto.

Por otro lado, los datos obtenidos al preparar dos asas intestinales indican que estas sustancias ejercen su acción sólo a nivel local, no teniendo ningún efecto general, puesto que la absorción de azúcar no queda modificada si la cumarina se coloca en asa distinta a la que contiene la disolución de galactosa a absorber.

Más bien parecería indicar la persistencia citada que las cumarinas tienen posibilidad de penetrar en las células epiteliales o, al menos, de adherirse irreversiblemente a la membrana. Por otra parte, se conoce que el dicumarol presenta la propiedad de unirse a las proteínas plasmáticas (10) y hepáticas (8).

A favor de esta interpretación están los resultados obtenidos cuando se preincuba

in vitro intestino de pollo con este tipo de sustancias, ya que el grado de inhibición alcanzado es mayor después de una preincubación con cumarina, que si se coloca directamente azúcar y cumarina en el medio de incubación en contacto con la mucosa intestinal (16).

De todas las cumarinas ensayadas, sólo el acenocumarol presenta un efecto acumulativo a lo largo del tiempo de modo semejante a como lo hace el dicumarol (12). Del resto de las cumarinas la menos eficaz en estas condiciones de trabajo parece ser la cumarina-3-carboxilo. Asimismo es notable la mayor sensibilidad que presenta el intestino de pollo respecto al de la rata frente al problema que se estudia. En esta última especie, sólo se logra una inhibición eficaz a partir de una concentración de 10^{-3} M, lo que muestra una vez más la influencia de la especie animal ensayada, hecho encontrado con relativa frecuencia al estudiar los distintos efectos producidos por sustancias biológicamente activas (14, 18).

Agradecimiento

A la Srta. M.^a Luz Muro, Ayudante Técnico de Laboratorio, expresamos nuestro agradecimiento por la colaboración prestada en la realización práctica de este trabajo.

Resumen

Se estudia el efecto de varias cumarinas sobre el transporte activo de galactosa por intestino delgado de pollo y rata utilizando la técnica de absorciones sucesivas. Los resultados muestran que todas las cumarinas ensayadas —cumarina, 4-hidroxycumarina, cumarina-3-carboxilo y acenocumarol— inhiben la absorción de galactosa en pollo cuando están presentes a una concentración de 10^{-4} M, siendo este efecto persistente a lo largo del tiempo.

En rata, la acción inhibitoria de las cumarinas sólo se observa cuando se utilizan a partir

de una concentración de 10^{-3} M. En las dos especies estudiadas el acenocumarol presenta el mayor efecto.

Bibliografía

1. ANSELM, E., JORDANA, R. y LARRALDE, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **26**, 325-330, 1970.
2. BICKOFF, E. M., BOOTH, A. N., LYMAN, R. L. y LIVINGSTON, A. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3969, 1958.
3. BICKOFF, E. M., LYMAN, R. L., LIVINGSTON, A. L. y BOOTH, A. N.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 262, 1960.
4. BLAKE, T. M., WOOD, E. G. y NEEL, R. G.: *Am. J. Med. Sci.*, **243**, 598, 1962.
5. BOLUFER, J., LARRALDE, J. y PONZ, F.: *Plügers Arch.*, **338**, 159-167, 1973.
6. BRODERSON, R. y KJAER, A.: *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **2**, 109, 1945.
7. CHANG, T., LEWIS, J. y GLAZKE, A. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 1000-1007, 1967.
8. CHIAGNELL, C. F.: *Molec. Pharmacol.*, **6**, 1-12, 1970.
9. GOTH, A.: *Science*, **101**, 383, 1945.
10. KALOW, W.: *Biochem. Pharmacol.*, **8**, 111, 1961.
11. LIPPINCOTT, J. B.: En «New and Nonofficial Drugs», Filadelfia, 1963, p. 618.
12. PONZ, F. y LLUCH, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **24**, 203-206, 1968.
13. RASMUSSEN, H., WALDORF, A., DZIEWIATKIWSK, D. D. y DELUCA, H. F.: *Biochem. Biophys. Acta*, **75**, 250, 1963.
14. ROBINSON, J. W. L.: *J. Physiol.*, **206**, 41, 1970.
15. RODRÍGUEZ-CANDELA, J. L. y SALINAS, M.: *Proc. VIIth I.D.F. Congress*, Estocolmo, 1967.
16. RUANO, M. J.: Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. España.
17. RUANO, M. J., LARRALDE, J. y LLUCH, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **30**, 283-287, 1974.
18. RULL, S. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **30**, 183-190, 1974.
19. SOLS, A. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **3**, 207-211, 1947.
20. SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-24, 1952.
21. VIDAL-SIVILLA, S., SOLS, A. y PONZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **6**, 195-205, 1950.