

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

Transporte activo de glucosa y papel de la florricina, floretina, fosfato de floretina, ácido floretínico, floroglucina y florina sobre el mismo

por

J. Larralde, A. Giraldez y J. Ron-Noya

(Recibido para publicar el 11 de agosto de 1961)

Desde hace tiempo se conoce la acción inhibidora que el glucósido florricina ejerce sobre la absorción o reabsorción de los monosacáridos a nivel de la mucosa del intestino o sobre el epitelio del túbulo renal. Sin embargo, es muy escaso lo que sabemos sobre el modo en que estas acciones se llevan a cabo. Hoy constituye todavía un problema no resuelto el mecanismo por el que actúa la florricina y, dada la importancia biológica del fenómeno de la permeabilidad, no es extraño que actualmente en varias escuelas y de diversos modos se intente comprender este proceso (5, 11, 13 y 17).

En trabajos anteriores ya hemos indicado algunos caracteres específicos de la molécula de florricina frente a otros inhibidores de la absorción intestinal. (3, 8, 9). En el presente, pretendemos estudiar si las propiedades fisiológicas características de la florricina residen en la integridad de su molécula o si es posible obtener un comportamiento análogo con los productos, más sencillos, resultantes de la hidrólisis ácida o alcalina del glucósido.

Material y métodos

Utilizamos ratas blancas de nuestro laboratorio con un peso aproximado de 150 a 200 gramos. Se siguió la técnica *in vivo* de SOLS y PONZ (19), que tiene la ventaja de poder comparar los efectos de una o varias sustancias problema sobre la mis-

ma asa del mismo animal, eliminando así el error de la variabilidad individual entre los diferentes animales, así como la necesidad de la medida exacta del asa intestinal.

Anestesiarnos a los animales con una inyección subcutánea de 1 ml de solución de uretano al 12 % por cada 100 gramos de peso.

La presión de repleción se mantuvo en el asa a 12 cm de agua. La temperatura de los animales a 0'3° C. La glucosa se determinó con el reactivo de NELSON-SOMOGY (12). Hay que tener en cuenta al utilizar la floroglucina que esta sustancia influye en el desarrollo del color con este reactivo, lo que obliga a efectuar las correcciones oportunas.

Hemos estudiado la acción de la florricina, floretina, fosfato de floretina, ácido floretínico, floroglucina y florina sobre la absorción intestinal *in vivo* de soluciones isotónicas de glucosa, en cuatro períodos de absorción sucesivos de 30 minutos. En el primero y tercero se absorbe una solución de glucosa sola, mientras que en el segundo y cuarto las soluciones de azúcar contienen la sustancia a estudiar.

Los productos ensayados fueron obtenidos a partir de la florricina B.D.H. El fosfato de floretina nos fue cedido amablemente por el doctor PONZ.

Resultados

1. FLORETINA

La primera de estas sustancias ensayadas fue la floretina. Su escasa solubilidad, aún a la temperatura de 38° C, no nos permitió preparar, como hubiera sido nuestro deseo, una concentración milimolar para poder comparar mejor sus efectos frente a la florricina. Empleamos soluciones saturadas de flore-

TABLA I
Absorción intestinal de glucosa (30 minutos) en solución 5,4 %, saturada de floretina (F.)

| Peso gr. | Asa cm. | Glucosa absorbida ($\mu\text{M}/\text{cm}$) | | | | | |
|----------|---------|---|--------------------|----------|----------------|--------------------|----------|
| | | 1.ª Gluc. Abs. | 2.ª Gluc. + F Abs. | Inhib. % | 3.ª Gluc. Abs. | 4.ª Gluc. + F Abs. | Inhib. % |
| 156 | 26 | 39,8 | 32,1 | 20 | 34,7 | 31,5 | 9 |
| 137 | 36 | 44,3 | 37,2 | 16 | 39,4 | 35,2 | 11 |
| 110 | 21 | 43,6 | 38,1 | 13 | 39,8 | 37,2 | 7 |
| 134 | 27 | 33,4 | 35,3 | 3 | 34,9 | 30,2 | 14 |
| 141 | 22 | 46,5 | 41,3 | 11 | 45,1 | 45,4 | — |
| 133 | 24 | 41,6 | 35,5 | 15 | 34,7 | 32,6 | 7 |

tina en glucosa isotónica. Los datos aparecen en la tabla I. En ella se aprecia una ligera inhibición que alcanza aproximadamente un 10 %, pero que no es muy significativa.

2. FOSFATO DE FLORETINA

Puesto que la floretina presenta el inconveniente de su insolubilidad, acudimos al fosfato de floretina, compuesto más soluble, y con el que LEFEVRE (10) ha estudiado la entrada y salida de glucosa en los glóbulos rojos humanos, y LAMBRECHTS (6) su influencia sobre la actividad de las fosfatasa intestinales y renales.

Los resultados se recogen en la tabla II. Como esperábamos, se evidencia un efecto inhibitor en los procesos de la absorción selectiva, pues la cantidad de glucosa absorbida cae en más de un 30 % en presencia del fosfato de floretina 0,001 M.

TABLA II

Absorción intestinal de glucosa (5,4 %, 30 minutos) frente a fosfato de floretina. (F.F.)

| Peso gr. | Asa cm. | [F.F.] | Glucosa absorbida ($\mu\text{M}/\text{cm}$) | | | | | |
|----------|---------|--------------------|---|------------------|----------|-----------|------------------|----------|
| | | | 1.ª Gluc. | 2.ª Gluc. + F.F. | | 3.ª Gluc. | 4.ª Gluc. + F.F. | |
| | | | Abs. | Abs. | Inhib. % | Abs. | Abs. | Inhib. % |
| 121 | 25 | 1×10^{-3} | 50,8 | 27,3 | 47 | 33,9 | 22,2 | 35 |
| 115 | 25 | 1×10^{-3} | 35,9 | 27,5 | 24 | 32,6 | 26,1 | 2 |
| 125 | 26 | 1×10^{-3} | 44,3 | 31,3 | 30 | 37,0 | 28,7 | 30 |
| 116 | 26 | 1×10^{-3} | 35,7 | 21,5 | 40 | 32,3 | 21,3 | 32 |
| 106 | 25 | 1×10^{-3} | 40,4 | 21,9 | 46 | 36,8 | 20,6 | 44 |
| 118 | 25 | 1×10^{-3} | 31,9 | 17,9 | 44 | 27,3 | 19,0 | 31 |
| 149 | 27 | 1×10^{-3} | 36,4 | 23,3 | 39 | 33,2 | 21,3 | 36 |
| 115 | 18 | 1×10^{-3} | 40,0 | 25,8 | 36 | 38,5 | 21,5 | 44 |
| 150 | 19 | 1×10^{-3} | 35,6 | 20,7 | 42 | 30,9 | 22,5 | 30 |
| 134 | 26 | 1×10^{-3} | 38,9 | 19,1 | 51 | 40,0 | 18,3 | 54 |
| 110 | 24 | 4×10^{-4} | 40,6 | 32,3 | 20 | 36,2 | 33,4 | 8 |
| 119 | 20 | 4×10^{-4} | 27,1 | 25,4 | 6 | 30,7 | 32,4 | — |
| 115 | 23 | 4×10^{-4} | 37,5 | 28,9 | 23 | 34,2 | 28,9 | 16 |
| 114 | 25 | 4×10^{-4} | 40,8 | 35,2 | 14 | 43,2 | 35,2 | 19 |
| 123 | 18 | 4×10^{-4} | 45,2 | 47,1 | — | 48,6 | 37,2 | 25 |
| 118 | 25 | 4×10^{-4} | 36,6 | 32,4 | 12 | 39,0 | 32,1 | 18 |
| 122 | 18 | 2×10^{-2} | 44,6 | 44,9 | — | 42,8 | 39,1 | 9 |
| 122 | 19 | 2×10^{-2} | 45,1 | 38,5 | 15 | 40,4 | 39,0 | 4 |
| 121 | 20 | 2×10^{-2} | 39,3 | 36,0 | 9 | 37,6 | 41,5 | — |
| 124 | 19 | 2×10^{-2} | 50,2 | 47,8 | 5 | 41,1 | 35,9 | 13 |
| 145 | 19 | 2×10^{-2} | 43,2 | 42,3 | 2 | 49,3 | 41,1 | 17 |
| 126 | 19 | 2×10^{-2} | 46,4 | 32,9 | — | 42,3 | 43,8 | — |

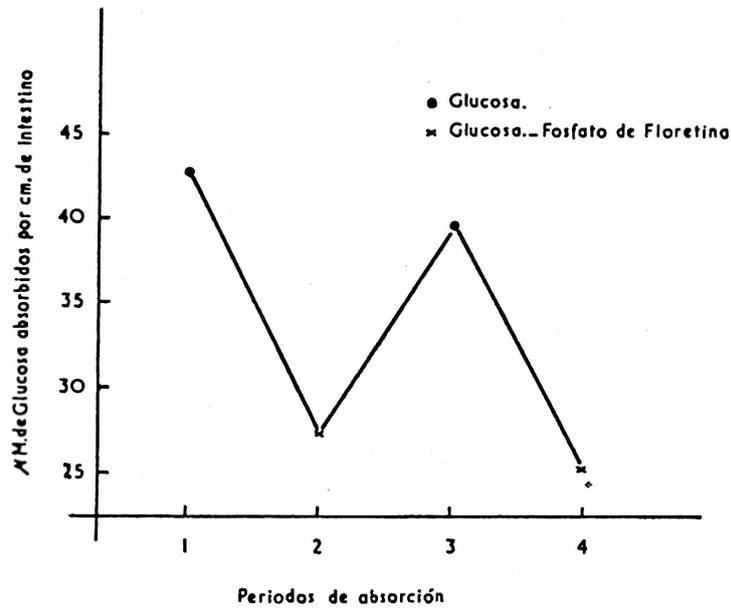


Fig. 1. — Influencia del fosfato de florretina 0.001 M sobre la absorción de glucosa isotónica por el intestino de rata. Absorciones de 30 minutos.

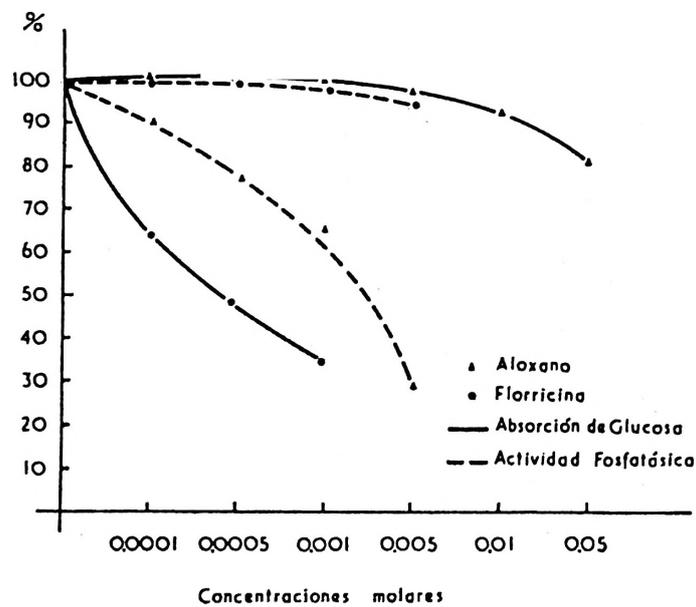


Fig. 2. — Gráfica de la influencia de la florricina y aloxano sobre la actividad fosfatásica intestinal y la absorción de glucosa isotónica por el intestino de rata.

Un carácter notable que encontramos en el fosfato de floretina es la reversibilidad de sus efectos, es decir, que, como ocurre con la florricina, la inhibición desaparece prácticamente por simple lavado del asa. En la figura 1 mostramos la representación gráfica de este fenómeno.

3. ACIDO FLORETÍNICO.

Los datos respecto a la acción del ácido floretínico (M/1000 y M/500) aparecen en la tabla III. No se observó ningún efecto inhibitor en la absorción intestinal de azúcar, ni anomalía alguna en la fisiología de los animales.

TABLA III

Absorción intestinal de glucosa (5,4 %, 30 minutos) en presencia de ácido floretínico. (A.F.)

| Peso gr. | Asa cm. | [A.F.] | Glucosa absorbida (μ M/cm) | | | |
|----------|---------|--------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| | | | 1. ^a Gluc. Abs. | 2. ^a Gluc. + A.F. Abs. | 3. ^a Gluc. Abs. | 4. ^a Gluc. + A.F. Abs. |
| 178 | 25 | 1×10^{-3} | 30,4 | 25,5 | 30,4 | 33,0 |
| 110 | 25 | 1×10^{-3} | 32,1 | 38,4 | 39,0 | 34,8 |
| 155 | 32 | 1×10^{-3} | 41,6 | 40,8 | 45,7 | 44,9 |
| 130 | 20 | 1×10^{-3} | 58,7 | 54,5 | 58,0 | 57,3 |
| 133 | 21 | 1×10^{-3} | 57,2 | 55,7 | 50,2 | 52,5 |
| 152 | 25 | 1×10^{-3} | 41,7 | 47,2 | 42,3 | 45,4 |
| 131 | 25 | 1×10^{-3} | 50,3 | 50,6 | 52,3 | 56,6 |
| 130 | 16 | 1×10^{-3} | 40,5 | 42,6 | 44,0 | 43,1 |
| 130 | 26 | 1×10^{-3} | 47,2 | 45,1 | 50,2 | 49,6 |
| 165 | 22 | 1×10^{-3} | 60,4 | 56,1 | 60,4 | 52,4 |
| 120 | 25 | 1×10^{-3} | 32,1 | 33,0 | 32,8 | 33,0 |
| 100 | 23 | 1×10^{-3} | 53,0 | 56,4 | 48,8 | 46,6 |
| 138 | 30 | 1×10^{-3} | 39,2 | 40,3 | 38,8 | 38,6 |
| 155 | 28 | 1×10^{-3} | 38,6 | 42,1 | 36,4 | 36,6 |
| 122 | 30 | 2×10^{-3} | 44,4 | 46,2 | 50,5 | 49,5 |
| 139 | 24 | 2×10^{-3} | 51,9 | 46,8 | 50,3 | 49,7 |
| 125 | 22 | 2×10^{-3} | 36,0 | 38,5 | 39,0 | 32,2 |
| 135 | 23 | 2×10^{-3} | 32,7 | 33,7 | 40,9 | 35,6 |
| 135 | 20 | 2×10^{-3} | 31,5 | 37,1 | 38,5 | 40,4 |
| 154 | 20 | 2×10^{-3} | 52,9 | 49,0 | 45,1 | 51,7 |

4. FLOROGLUCINA Y FLORINA.

Después del estudio del ácido floretínico y de la floretina pasamos a ensayar la floroglucina. Como se ve en la tabla IV a la concentración M/500 ya hay una inhibición apreciable, pero este efecto y otros que encontramos a mayores concentraciones

ensayadas pueden atribuirse a una acción irritante sobre la mucosa intestinal.

Finalmente hemos ensayado sobre cinco animales la acción de la florina, sin que pudiera apreciarse ningún efecto inhibitor.

TABLA IV

Absorción intestinal de glucosa (5,4 %, 30 minutos) en presencia de floroglucina. (F)

| Peso gr. | Asa cm. | [F.] | Glucosa absorbida (μ M/cm) | | | | | |
|----------|---------|--------------------|---------------------------------|--------------------|----------|----------------|--------------------|----------|
| | | | 1.ª Gluc. Abs. | 2.ª Gluc. + F Abs. | Inhib. % | 3.ª Gluc. Abs. | 4.ª Gluc. + F Abs. | Inhib. % |
| 140 | 32 | 1×10^{-3} | 34,2 | 30,9 | 10 | 32,3 | 28,0 | 14 |
| 120 | 32 | 1×10^{-3} | 28,7 | 43,7 | 15 | 33,7 | 22,1 | 35 |
| 125 | 34 | 1×10^{-3} | 47,4 | 45,3 | 10 | 40,0 | 37,3 | 7 |
| 140 | 23 | 1×10^{-3} | 50,6 | 24,5 | 11 | 49,4 | 45,7 | 8 |
| 165 | 21 | 2×10^{-3} | 50,1 | 47,5 | 5 | 44,0 | 32,7 | 26 |
| 120 | 28 | 2×10^{-3} | 39,6 | 36,0 | 10 | 36,0 | 27,3 | 25 |
| 160 | 34 | 2×10^{-3} | 36,2 | 34,4 | 5 | 37,5 | 34,1 | 10 |
| 100 | 41 | 2×10^{-3} | 25,9 | 22,4 | 11 | 25,2 | 24,5 | 2 |

Discusión

Recientemente CRANE (2), indicaba cuatro posibles modos por los que podría actuar la florricina y sobre los que descartaría su acción inhibitora en la absorción: a) La absorción se retardaría como consecuencia de una inhibición de enzimas y sistemas enzimáticos que requieren o son estimulados por los adenin-nucleótidos. b) Pudieran también interpretarse sus efectos como secundarios sobre las fosfatasas intestinales. c) Por la inhibición de la mutarrotasa, y d) Por una acción específica y directa sobre la entrada de los azúcares en la célula.

Son conocidas las experiencias sobre la influencia de los adenin-nucleótidos en diversas inhibiciones florricínicas y cómo, en estos casos, la inhibición es reversible por adición del adenin-nucleótido apropiado.

También se ha indicado (1,18), de acuerdo con la teoría de la fosforilación de los azúcares, que la acción de la florricina sería el resultado de una inhibición previa de la actividad fosfatásica intestinal. Frente a esta hipótesis, señala CRANE, como ya hace años nosotros (15) habíamos encontrado, el que la florricina, a concentraciones a las que inhibe fuertemente la absorción selectiva, influye muy poco sobre la actividad de las fosfatasas alcalinas del intestino. Además, hemos

podido comprobar experimentalmente (7) que, por el contrario, la aloxana a concentraciones a las que inhibe fuertemente la actividad fosfatásica del intestino, apenas ejerce efecto ninguno sobre la velocidad de absorción intestinal de la glucosa. Datos que resumimos en la fig. 2.

Estos resultados, confirmados después por SMYTH y colaboradores, en experiencias sobre intestino de rata *in vivo* (4), junto con otras aportaciones de SOLS (20) sobre la falta de correspondencia entre la velocidad de fosforilación de un azúcar y su velocidad de absorción intestinal, exigen reconsiderar la teoría de las fosforilaciones y, por tanto, el papel que la florricina ejercería a través de estos procesos.

En su cuarto modo de actuar, CRANE admite la acción directa de la florricina para inhibir la entrada de los monosacáridos.

En apoyo de esta teoría cita también anteriores trabajos nuestros en las que ya habíamos indicado la especificidad de la acción florricínica, entre otras cosas basada en lo pasajero de su acción, pues basta un simple lavado del asa para restaurar la normalidad funcional, lo que no es reproducible por ninguno de los otros inhibidores conocidos (16).

Siguiendo, pues, el estudio de esta inhibición, en el presente trabajo se afirma la acción específica de la molécula completa del glucósido frente a los productos de las sustancias afines de su degradación. Así, la floretina, que para LEFEVRE (10) es capaz de inhibir la entrada de glucosa en los glóbulos rojos más intensamente que la florricina e inhibe a las fosfatasas intestinales (6), aparece en nuestros protocolos como capaz de inhibir la absorción selectiva de glucosa, pero bastante más débilmente que la florricina, aún cuando persista en ella la típica propiedad de la reversibilidad de sus efectos.

Con la floroglucina hay una inhibición, pero al estudiar la acción de sustancias ácidas hay que tener en cuenta el efecto del pH sobre la absorción selectiva (14). También hay que tener presente los efectos secundarios más generales. Es interesante la falta de acción del ácido floretínico y de la florina.

Resumen

Se estudió la acción de los productos derivados de la hidrólisis ácida o alcalina de la florricina: floretina, ácido floretínico, floroglucina y florina, junto con el fosfato de floretina, sobre la absorción intestinal de glucosa al 5,4 % en la rata.

Se encuentra una inhibición escasa de un 10 % por la floretina, de un 37 por el fosfato de floretina (0,001 M) y de un 13 % por la floroglucina.

No existe inhibición por el ácido floretínico ni por la florina.

La acción del fosfato de floretina M/5000 y M/2500 es análoga a la de la florricina en cuanto a la reversibilidad de sus efectos. En cambio, es de menor intensidad, ya que frente a la florricina que inhibe un 65 % a la concentración M/1000, el fosfato de floretina a la misma concentración lo hace sólo en un 37 %.

* * *

Agradecemos vivamente la ayuda económica prestada por el Banco de La Coruña para la realización de este trabajo.

Summary

The influence of phlorizin and its derivatives on the intestinal absorption of glucose

The object of study, using the Sols and Ponz technique of successive absorptions, is the action of the products derived from the acid, or alkaline hydrolysis of phlorizin — phloretin, phloretic acid, phloroglucinol and phlorin — together with phloretin phosphate, on the absorption of glucose (5.4 %) by the intestine of the rat.

Only a slight inhibition (10 %) is found of the intestinal absorption of glucose by phloretin (saturated solution), while with phloretin phosphate (0.001 M) the inhibition is more intense (38 %). Finally, phloroglucinol at an equal concentration produces an inhibition of only 13 %.

Inhibition of the intestinal absorption of glucose has not been found with phloretic acid or phlorin.

The action of the phloretin phosphate is analogous to that of phlorizin with respect to the reversibility of its effects (third absorptions). On the other hand, it is of lesser intensity since, while with phlorizin 0.001 M the inhibition reaches 65 %, phloretin phosphate in the same concentration produces an inhibition of only 37 %.

The possible mode of action of phlorizin and its derivatives on the glucose transport by the intestine is questionable.

Bibliografía

- (1) BECK, L.: *J. Biol. Chem.*, **143**, 403, 1942.
- (2) CRANE, R. K.: *Physiol. Rev.*, **40**, 789, 1960.
- (3) GIRALDEZ, A. y LARRALDE, J.: *R. esp. Fisiol.*, **16**, 79, 1960.
- (4) JERVIS, E. L., JOHNSON, F. R., SHEFF, M. F. y SMYTH, D. H.: *J. Physiol.*, **134**, 673, 1956.
- (5) KRANE, S. M. y CRANE, R. K.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 211, 1959.
- (6) LAMBRECHTS, A.: *Comp. rend. Soc. Biol.*, **123**, 311, 1936.

- (7) LARRALDE, J. y GIRALDEZ, A.: *Actas Soc. esp. C. Fisiol.*, **215**, 1955.
- (8) LARRALDE, J. y GIRALDEZ, A.: *R. esp. Fisiol.*, **13**, 253, 1957.
- (9) LARRALDE, J. y GIRALDEZ, A.: *R. esp. Fisiol.*, **14**, 31, 1958.
- (10) LEFEVRE, P. G.: *Sym. Soc. exptl. Biol.*, **8**, 118, 1954.
- (11) LOPTS, W. O. y WORON, K. S.: *Am. J. Physiol.*, **195**, 331, 1958.
- (12) NELSON, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375, 1944.
- (13) NEYEV, H. B., PARSONS, B. J. y SMYTH, D. H.: *J. Physiol.*, **148**, 83, 1959.
- (14) PONZ, F. y LARRALDE, J.: *Nature (London)*, **168**, 912, 1951.
- (15) PONZ, F. y LARRALDE, J.: *R. esp. Fisiol.*, **8**, 71, 1952.
- (16) PONZ, F. y LLUCH, M.: *R. esp. Fisiol.*, **11**, 267, 1955.
- (17) QUASTEL, J. H.: *Am. J. Chim. Nutrit.*, **8**, 137, 1960.
- (18) SHAPIRO, B.: *Biochem. J.*, **41**, 151, 1947.
- (19) SOLS, A. y PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, **3**, 207, 1947.
- (20) SOLS, A.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **19**, 144, 1956.