

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Laboratorio de Fisiología Animal
Universidad de Santiago de Compostela
(Prof. J. Larralde)

Influencia de la florricina sobre el transporte activo de aminoácidos

por

I. Cividanes, P. Fernández-Otero* y J. Larralde

(Recibido para publicar el 2 de abril de 1960)

Desde hace tiempo se conoce la acción inhibitoria que ejerce la florricina sobre la absorción de glucosa. En 1922 NAKAZAWA (10) fue el primero en comprobar esta inhibición por el intestino delgado. Posteriormente muchos otros autores la han confirmado sobre distintos azúcares y a través de diferentes especies animales (7, 9, 16).

Contrasta el número de trabajos sobre la influencia inhibitoria de la florricina en la absorción de azúcares y de otras sustancias (3, 6, 8), frente a los escasos datos sobre la absorción de aminoácidos. No hemos encontrado en la literatura ningún trabajo sobre el efecto inhibitorio de esta sustancia en la absorción de los mismos.

Como ensayos previos de este Laboratorio habían conducido a la idea de que también la florricina podría inhibir la absorción de aminoácidos, creímos interesante estudiar su influencia sobre la absorción intestinal de glicina.

Una nota previa de este trabajo fue presentada anteriormente (4).

Material y métodos

Se utilizan ratas blancas de nuestro laboratorio, de 100 a 200 grs., con ayuno previo de veinte horas, valorando la absorción con la técnica de absorciones sucesivas de SOLS y PONZ (15), con la que soluciones puras de glicina se absorben con notable constancia a lo largo de unas seis pruebas sucesivas (5).

Anestesiados los animales con etil-uretano al 12 %, (1 ml. subcutáneo por cada 100 gr.) y previa laparotomía se aíslan asas intestinales de 20 cm. de longitud a partir del duodeno. La perfusión se llevó a cabo con una presión hidrostática de 12 cm. de agua.

Después de cada período de absorción

* Con una beca de la Comisaría de Protección Escolar.

se lavaba el contenido del asa intestinal con cloruro sódico al 0,9 %.

La glicina y los azúcares se determinaron con las técnicas colorimétricas de FRAME-RUSELL (2) y de NELSON-SOMOGY (11).

Resultados

Se ha estudiado el efecto de la florricina 10^{-3} M, concentración que inhibe fuertemente la absorción de glucosa, sobre la absorción de glicina 20, 40 y 80 mM.

En primer lugar se han efectuado experiencias de cinco absorciones sucesivas en la misma asa intestinal, la primera, segunda y cuarta con solución de glicina pura, y la tercera y la quinta con glicina más florricina.

En la tabla I, se indican los valores medios de inhibición obtenidos, con lotes de seis animales, para cada una de las concentraciones de glicina empleadas.

La florricina inhibe la absorción de glicina 20, 40, 80 mM en proporción semejante (29 %) y esta inhibición des-

TABLA I

Influencia de la florricina (F) 10^{-3} M en la absorción de glicina por intestino de rata in vivo. Períodos de absorción de 30 minutos.

Animales n.º	Glicina mM	Absorción normal μ M/cm.	Inhibición %			
			2.ª Abs. Glic.	3.ª Abs. Glic+ F	4.ª Abs. Glic.	5.ª Abs. Glic+ F
6	20	2,6 \pm 0,1	—	28,5 \pm 1,4	—	28,5 \pm 1,4
6	40	4,8 \pm 0,2	—	28,5 \pm 1,7	—	28,5 \pm 1,4
6	80	7,8 \pm 0,2	—	28,5 \pm 1,7	—	27,5 \pm 1,6

TABLA II

Influencia de la florricina (F) 10^{-3} M sobre la absorción de glucosa, galactosa y fructosa comparativamente con la glicina en la misma asa de intestino delgado de rata in vivo a concentraciones 80 mM. Períodos de 30 minutos. Resultados de grupos de 6 animales.

Absorciones	Absorción μ M/cm.	Inhibición %
1. Glucosa	15,6 \pm 0,4	
2. Glicina	7,7 \pm 0,2	
3. Glicina + F	5,6 \pm 0,2	27,0 \pm 1,7
4. Glucosa	15,6 \pm 0,3	
5. Glucosa + F	7,0 \pm 0,6	55,0 \pm 4,0
1. Glucosa	15,7 \pm 0,3	
2. Glicina	7,8 \pm 0,3	
3. Glicina + F	5,6 \pm 0,1	27,3 \pm 2,1
4. Galactosa	17,9 \pm 0,6	
5. Galactosa + F	6,9 \pm 0,5	62,6 \pm 2,5
1. Glucosa	16,3 \pm 0,3	
2. Glicina	8,0 \pm 0,2	
3. Glicina + F	6,0 \pm 0,2	26,3 \pm 1,4
4. Fructosa	7,2 \pm 0,2	
5. Fructosa + F	5,5 \pm 0,2	23,7 \pm 2,0

aparece por simple lavado del asa intestinal (ver cuartas absorciones). Esta fácil reversibilidad de la inhibición por florricina fue observada ya hace años por PONZ y LARRALDE (14), respecto de la absorción de glucosa.

Nos pareció de interés comprobar en un mismo animal y en iguales condiciones experimentales, los efectos de la florricina sobre la absorción de glicina y sobre la de azúcares, inhibición esta última mucho más investigada.

La primera absorción se realizó siempre con solución pura del azúcar 80 mM, la segunda con solución pura de glicina 80 mM, la tercera con glicina y florricina, la cuarta de nuevo con solución pura de azúcar y en la última, con azúcar y florricina.

Como puede observarse (Tabla II), la florricina 10^{-3} M inhibe la absorción de glicina, glucosa, galactosa y fructosa, con máxima inhibición frente a la galactosa, igual o algo inferior para la glucosa, mínima frente a la fructosa, y siendo la inhibición de la absorción de glicina aproximadamente un 50 % de la encontrada para la glucosa.

Estudiamos, finalmente, la inhibición florricínica frente a mezclas equimoleculares de 20, 40 y 80 mM de glucosa y glicina.

Para poder valorar la influencia de la florricina sobre la mezcla de estas sustancias, se analizó en la primera absorción los micromoles absorbidos de glucosa pura, en la segunda los de glicina también pura. En la tercera y quinta

TABLA III

Influencia de la florricina (F) 10^{-3} M en la absorción intestinal in vivo de mezclas de glucosa y glicina a idéntica concentración. Periodos de absorción de 30 minutos.

Animales n.º	Absorciones	Absorción μ M/cm.		Inhibición %	
		Glucosa	Glicina	Glucosa	Glicina
4	20 mM				
	1. Glucosa	5,5 ± 0,2	—		
	2. Glicina	—	2,6 ± 0,7		
	3. Glucosa + Glicina	4,9 ± 0,4	2,4 ± 0,3		
	4. Glucosa + Glicina + F	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1	88,7 ± 3,0	29,5 ± 2,0
	5. Glucosa + Glicina	4,9 ± 0,1	2,4 ± 0,3		
5	40 mM				
	1. Glucosa	10,5 ± 0,4	—		
	2. Glicina	—	5,3 ± 0,3		
	3. Glucosa + Glicina	8,8 ± 0,4	4,5 ± 0,2		
	4. Glucosa + Glicina + F	1,0 ± 0,2	2,8 ± 0,1	91,2 ± 1,7	36,0 ± 1,9
	5. Glucosa + Glicina	8,7 ± 0,4	4,3 ± 0,2		
4	80 mM				
	1. Glucosa	14,8 ± 0,4	—		
	2. Glicina	—	7,5 ± 0,3		
	3. Glucosa + Glicina	11,5 ± 0,3	5,9 ± 0,2		
	4. Glucosa + Glicina + F	2,5 ± 0,2	3,9 ± 0,2	78,5 ± 1,6	33,5 ± 1,7
	5. Glucosa + Glicina	11,2 ± 0,3	5,8 ± 0,2		
	6. Glucosa + Glicina + F	2,4 ± 0,3	3,9 ± 0,2	79,8 ± 2,1	33,5 ± 1,5

obtuvimos el valor de la absorción de estas sustancias a igual concentración anterior, pero colocadas simultáneamente en el asa. En la cuarta y sexta, la misma mezcla anterior pero con florricina.

En la tabla III se observa, al comparar los resultados de la tercera absorción con los de la primera y segunda, la existencia de una inhibición recíproca en la absorción simultánea de glucosa o glicina en la misma asa, puesto que desciende la absorción de monosacárido y la del aminoácido, respecto a los valores normales de la absorción de esta sustancia aisladamente.

Por otra parte, la adición de florricina a la mezcla parece que da lugar a una inhibición mayor en comparación a su acción aislada, alcanzando ahora cifras máximas. Así si a la concentración de 80 mM de glucosa encontramos una inhibición media de un 55 %, en la tabla II, ahora pasamos a una inhibición de un 78,5 % en estas últimas condiciones. Del mismo modo la inhibición de glucosa 40 mM alcanza ahora un 91,2 %, y también la inhibición de glucosa 20 mM pasa ahora a un 88,7 %.

También la inhibición de glicina se incrementa aunque en menor proporción.

Los resultados con florricina 10^{-5} M, indican que a esta concentración el glucósido no influye en la absorción de glicina.

Discusión

Ha sido muy grande la eficacia del estudio de la inhibición florricínica sobre la absorción de azúcares por el intestino, para el conocimiento de importantes aspectos en la absorción de monosacáridos.

De aquí el interés que actualmente se concede a la utilización de la florricina en la interpretación del modo de acción de los inhibidores primarios (17), en las investigaciones sobre el propio mecanismo de la inhibición (1), o en la formulación de la llamada teoría de la topografía

funcional en la absorción de glucosa por el intestino (13).

Era, pues, interesante investigar su comportamiento frente a la absorción de glicina, aminoácido de muy claro transporte activo y, por consiguiente, capaz de ser modificado por inhibidores específicos.

Nuestros resultados indican una inhibición en el transporte activo de glicina frente a la florricina 10^{-3} M.

Hace años WILSON (18) halló un aumento de un 37 % en la absorción de glicina y de un 34 % en la alanina en animales previamente inyectados con 50 mM de florricina en suspensión oleosa.

Nuestros datos no confirman esos resultados aunque dada la técnica utilizada en esa ocasión —la de CORI— no podemos compararlos con nuestras experiencias.

Hay que tener en cuenta, que la absorción de glicina según nuestros mismos datos viene a ser un 50 % menor que la de la glucosa en igualdad de condiciones experimentales. Junto a esta menor absorción también la inhibición relativa es mucho más pequeña, ya que si con la glucosa alcanza valores de un 70 % aisladamente, con la glicina esta inhibición es aproximadamente de un 25 %.

Para SMYTH y colaboradores (12) la florricina a concentración de 10^{-3} M es capaz de inhibir no sólo el mecanismo del transporte activo de la glucosa sino también los sistemas enzimáticos suministradores de energía para este transporte.

No es de extrañar, por consiguiente, que si a esta concentración la florricina ejerce una acción sobre el metabolismo endocelular, dicha acción se traduzca también en la inhibición del transporte activo del aminoácido.

Por otra parte, parece ser que no es una inhibición inespecífica, ya que del mismo modo que ocurre frente a la glucosa (14) la inhibición es fácilmente reversible. Tanto en un caso como en otro, basta lavar simplemente la mucosa con solución isotónica de cloruro sódico para

restaurar la normalidad en la absorción siguiente.

Si la inhibición florricínica es del mismo tipo para la absorción de glucosa o de glicina aunque con distinta intensidad, también la cinética de la absorción es muy paralela para ambas sustancias como hemos probado en un trabajo anterior.

Finalmente, es interesante hacer constar la exaltación del poder inhibitor de la glucosa frente a una mezcla de glicina y glucosa como la que aparece en la tabla III.

Hemos investigado también la acción sobre la absorción de glicina de otros glucósidos como arbutina, amígdalina, esculina, etc. Su acción no es tan marcada como la de la florricina.

Resumen

Se ha estudiado *in vivo*, con la técnica de absorciones sucesivas de SOLS y PONZ, la influencia de la florricina 10^{-3} M sobre la absorción intestinal de glicina 20, 40 y 80 mM, en ratas. Se ha encontrado una inhibición del 28 %. El efecto de la florricina desaparece por lavado y renovación de la solución a absorber.

La inhibición de la absorción de glicina es aproximadamente mitad de la que el glucósido ejerce sobre la absorción de glucosa o galactosa y similar a la que aparece con fructosa.

Si soluciones equimoleculares de glicina y glucosa se absorben simultáneamente, hay una mutua inhibición de la absorción y además la florricina provoca mayores inhibiciones relativas. La florricina a 10^{-5} M no tiene influencia sobre la absorción intestinal de glicina.

Summary

The influence of phlorizin on the active transport of aminoacids

With the SOLS and PONZ technique of successive absorptions, a study *in vivo* has been made of the influence of phlorizin 10^{-3} M, on the intestinal absorption of glycine 20, 40 and 80 mM, in rats. An inhibition of 28 % has been found. The effect of the phlorizin disappears through washing and renewal of

the solution to be absorbed. Phlorizin 10^{-5} M does not inhibit the glycine absorption.

The inhibition of the absorption of glycine is approximately half that which the glucoside exercises on the absorption of glucose or galactose, and similar to that which appears with fructose.

If equimolecular solutions of glycine and glucose are absorbed simultaneously there is a mutual inhibition of the absorption and, moreover, the phlorizin provokes greater relative inhibitions.

Bibliografía

- (1) ALVARADO, F. and R. K. CRANE: *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 170, 1962.
- (2) FRAME-RUSSELL: *J. Biol. Chem.*, **149**, 255, 1945.
- (3) JERVIS, E. L., M. F. SHEFF and D. H. SMYTH: *J. Physiol.*, **131**, 16P-17P, 1955.
- (4) LARRALDE, J., I. CIVIDANES y J. BELLO: *VII Jornadas Bioquímicas Latinas Génova*, P. 48, 1963.
- (5) LARRALDE, J., I. CIVIDANES y J. BELLO: *R. esp. Fisiol.*, **19**, 139, 1963.
- (6) LARRALDE, J., A. GIRÁLDEZ y P. RONNOYA: *R. esp. Fisiol.*, **17**, 193-201, 1961.
- (7) LARRALDE, J. y A. GIRÁLDEZ: *R. esp. Fisiol.*, **16**, 79-90, 1960.
- (8) LOTSPEIC, W. D.: *Harvey Lect.*, series **56**, 63-91, 1961.
- (9) LUNDGAARD, E.: *Biochem. Z.*, **264**, 221-223, 1933.
- (10) NAKAZAWA, F.: *J. Exp. Med. Tohoku*, **3**, 288-294, 1922.
- (11) NELSON, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375, 1944.
- (12) NEWBY, H., B. J. PARSONS and D. H. SMYTH: *J. Physiol.*, **148**, 83-92, 1959.
- (13) NEWBY, H., P. A. SANFORD and D. H. SMYTH: *J. Physiol.*, **168**, 423-434, 1963.
- (14) PONZ, F. y J. LARRALDE: *R. esp. Fisiol.*, **8**, 71, 1952.
- (15) SOLS, A. y F. PONZ: *R. esp. Fisiol.*, **3**, 207, 1947.
- (16) WERTHEIMER, E.: *Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, **233**, 514-528, 1933.
- (17) WILBRANDT, W. and T. ROSENBERG: *Pharmacological Reviews*, V. 13, n.º 2, 1961.
- (18) WILSON, R. H.: *J. Biol. Chem.*, **97**, 497, 1932.

