

## Inhibición selectiva de la gluconeogénesis hepática por administración de triptófano

A. Sánchez-Pozo, J. A. Lupiáñez, A. Corno, A. Gil y F. Sánchez-Medina

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada  
Granada

(Recibido el 9 de noviembre de 1981)

A. SANCHEZ-POZO, J. A. LUPIAÑEZ, A. CORNO, A. GIL and F. SANCHEZ-MEDINA. *Selective Inhibition of Hepatic Gluconeogenesis by Tryptophan Administration*. Rev. esp. Fisiol., 38, 215-220. 1982.

The levels of quinolinic acid in liver and kidney and the gluconeogenic capacity in these tissues were determined in rats treated with tryptophan. The administration of this aminoacid produced a high increase in the hepatic quinolinic acid concentrations in fed and 48 h. starved rats. On the contrary, only slight variations in the concentrations of renal quinolinic acid were observed. The highest value raised in these conditions was three times lower than  $K_i$  of the quinolinic acid for the phosphoenolpyruvate carboxykinase. These results suggest that tryptophan administration originates a selective inhibition of hepatic gluconeogenesis.

La administración de triptófano produce en ratas un efecto hipoglucemiante (7, 22). La disminución de los niveles de glucosa en sangre se debe fundamentalmente a la inhibición de la gluconeogénesis hepática, a nivel de la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (E.C. 4.1.1.32) (23). Los estudios realizados con hígado perfundido de rata demuestran que no sólo el triptófano, sino también los productos metabólicos derivados de su degradación, L-cinurenina, L-3 hidroxicinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico y ácido quinolínico, son capaces de inhibir la gluconeogénesis (28). Puesto que el ácido quinolínico es el más efectivo de ellos y es el único capaz de inhibir

la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, se puede considerar como el verdadero inhibidor, mientras que los otros metabolitos serían activos por su capacidad de conversión en ácido quinolínico (28).

El proceso gluconeogénico no es privativo del hígado, sino que también tiene lugar en la corteza renal (15). La gluconeogénesis renal está recibiendo últimamente la atención de numerosos investigadores desde que se ha establecido que puede contribuir al mantenimiento de la glucemia cuando la función hepática se encuentra disminuida (5, 6, 11, 14, 16, 24, 29). Actualmente tiende a considerarse como probable que el hígado protago-

nice la función gluconeogénica en condiciones fisiológicas normales. Sólo cuando la capacidad funcional del hígado se encontrara marcadamente disminuida, la síntesis de glucosa tendría lugar a gran escala en la corteza renal tras los correspondientes mecanismos de adaptación (5, 11, 14, 17, 25).

Por lo que respecta al triptófano, el hígado y la corteza renal presentan un comportamiento bien diferenciado. Las células del parénquima hepático son capaces de metabolizar este aminoácido hasta ácido quinolínico, cuya acumulación produciría la inhibición específica de la gluconeogénesis en este tejido (28). Sin embargo, esta inhibición no ocurre probablemente en la corteza renal al no existir triptófano pirrolasa (E.C. 1.13.1.12) (3), primer enzima de la ruta metabólica que transforma el triptófano en ácido quinolínico.

De acuerdo con estas consideraciones, la administración de triptófano debería producir una inhibición específica de la gluconeogénesis hepática, sin afectar a dicho proceso en la corteza renal. Siendo esto así, se dispondría de un buen modelo experimental para estudiar el comportamiento de la gluconeogénesis renal tras la inhibición de la hepática. Para comprobar la validez de esta hipótesis se han determinado los niveles celulares de ácido quinolínico en hígado y corteza renal de animales tratados con triptófano.

### Material y métodos

Se han utilizado ratas Wistar, machos, de peso comprendido entre 180-200 g, alimentados con dieta estándar. Los animales sometidos al ayuno se separaban en jaulas, privándoles del alimento pero con libre acceso al agua.

La administración de triptófano se realizó por inyección intraperitoneal de una solución débilmente alcalina del aminoácido, permaneciendo los animales en

ayuno desde la inyección hasta su sacrificio.

Los niveles de ácido quinolínico se han determinado siguiendo el método descrito por MCDANIEL *et al.* (20) con algunas modificaciones que mejoraron sensiblemente el rendimiento. El método consiste en la adsorción y elución selectiva del ácido quinolínico sobre carbón activado y descarboxilación hasta ácido nicotínico y medida colorimétrica de éste.

La capacidad gluconeogénica del hígado se determinó siguiendo la técnica descrita por HEMS *et al.* (10), perfundiendo el hígado con una solución KREBS-HENSELEIT y albúmina, utilizando como sustrato lactato 10 mM. A distintos tiempos se midió la glucosa producida en el medio de perfusión.

La determinación de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal se ha realizado por el método descrito por KREBS *et al.* (15), incubando cortes de tejido en solución salina KREBS-HENSELEIT, utilizando lactato 10 mM como sustrato. Después de la incubación los cortes se desecaron y se determinó la glucosa en el medio de incubación.

La determinación de glucosa se realizó enzimáticamente por la técnica de BERGMAYER y BERNT (2), utilizando glucosa oxidasa-peroxidasa y o-dianisidina como cromógeno.

### Resultados

Los efectos *in vitro* del triptófano y ácido quinolínico sobre las capacidades gluconeogénicas en hígado y corteza renal están resumidos en las tablas I y II. El triptófano produjo una gran inhibición de la gluconeogénesis hepática incluso a la dosis de 0,05 mM (tabla I), inhibición dependiente de la dosis. Por el contrario, no se encontraron cambios en la capacidad gluconeogénica renal incluso a una concentración diez veces mayor de la que produjo casi el 100 % de inhibición en hígado (tabla II). El ácido quinolínico

Tabla I. Efectos *in vitro* del triptófano y ácido quinolínico sobre la capacidad gluconeogénica de hígado de rata.

Las perfusiones para determinar la capacidad gluconeogénica hepática se realizaron en animales sometidos a ayuno durante 48 horas antes de iniciarse el experimento. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  el error estándar. Cada valor es media de al menos 6 observaciones. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan como: \*  $p < 0,01$  y \*\*  $p < 0,001$ .

|                      | Glucosa producida<br>( $\mu\text{moles} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$<br>de tejido fresco) | Inhibición<br>% |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Controles            | 44,6 $\pm$ 4,9                                                                                          |                 |
| Triptófano (mM)      |                                                                                                         |                 |
| 0,05                 | 16,7 $\pm$ 6,2 *                                                                                        | 63 $\pm$ 14     |
| 0,1                  | 11,4 $\pm$ 4,9 *                                                                                        | 75 $\pm$ 11     |
| 0,5                  | 8,3 $\pm$ 2,6 **                                                                                        | 82 $\pm$ 6      |
| Ac. quinolínico (mM) |                                                                                                         |                 |
| 0,5                  | 40,7 $\pm$ 13,6                                                                                         | 9 $\pm$ 31      |
| 1,0                  | 30,8 $\pm$ 4,4                                                                                          | 31 $\pm$ 10     |
| 5,0                  | 8,5 $\pm$ 0,8 **                                                                                        | 81 $\pm$ 2      |

Tabla II. Efectos *in vitro* del triptófano y ácido quinolínico sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal de rata.

Los resultados se expresan como medias  $\pm$  el error estándar. Cada valor es media de al menos 4 observaciones. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan \*  $p < 0,001$ .

|                      | Glucosa producida<br>( $\mu\text{moles} \times \text{hora}^{-1} \times \text{g}^{-1}$<br>de tejido seco) |                      |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|                      | Alimentadas                                                                                              | Ayunadas<br>48 horas |
| Controles            | 79,3 $\pm$ 2,5                                                                                           | 167,8 $\pm$ 7,0      |
| Triptófano (mM)      |                                                                                                          |                      |
| 1,0                  | 71,4 $\pm$ 7,9                                                                                           | 171,1 $\pm$ 13,4     |
| 5,0                  | 61,8 $\pm$ 7,7                                                                                           | 125,8 $\pm$ 21,8     |
| Ac. quinolínico (mM) |                                                                                                          |                      |
| 0,5                  | 30,9 $\pm$ 2,7 *                                                                                         | 115,8 $\pm$ 5,1 *    |
| 1,0                  | 32,5 $\pm$ 3,1 *                                                                                         | 91,0 $\pm$ 4,1 *     |
| 5,0                  | 14,0 $\pm$ 1,5 *                                                                                         | 71,2 $\pm$ 3,5 *     |

Tabla III. Capacidad gluconeogénica de hígado y corteza renal de rata, tras la inyección de triptófano.

Los animales fueron inyectados con una dosis de triptófano de 0,5 g/kg de peso del animal, sacrificándose a las 2 horas 30 minutos de iniciado el experimento. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  el error estándar, con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan: \*  $p < 0,01$  y \*\*  $p < 0,001$ .

|               | Glucosa producida<br>( $\mu\text{moles} \times \text{hora}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de tejido) |                      |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|               | Alimentadas                                                                                      | Ayunadas<br>48 horas |
| Hígado        |                                                                                                  |                      |
| Control       | —                                                                                                | 45 $\pm$ 5 (11)      |
| Triptófano    | —                                                                                                | 1 $\pm$ 0 (4) **     |
| Corteza renal |                                                                                                  |                      |
| Control       | 114 $\pm$ 5 (5)                                                                                  | 166 $\pm$ 11 (5)     |
| Triptófano    | 152 $\pm$ 4 (7) **                                                                               | 212 $\pm$ 5 (7) *    |

inhibió las capacidades gluconeogénicas en hígado y corteza renal en valores que oscilaron entre el 31 % y el 82 %, dependiendo de los diferentes órganos y estados nutricionales.

Las figuras 1 y 2 muestran la evolución de los niveles de ácido quinolínico en hígado y corteza renal de ratas alimentadas y sometidas a ayuno, en las horas siguientes al tratamiento con triptófano (0,5 g  $\times$  kg<sup>-1</sup> de peso del animal). En ambos estados nutricionales los niveles de ácido quinolínico hepático se incrementaron considerablemente, obteniendo a las 2 horas y media el máximo aumento, 30 veces superior a los valores controles. En riñón estos valores sufrieron ligeras variaciones.

Los efectos *in vivo* del triptófano sobre la capacidad gluconeogénica en hígado y en corteza renal se resumen en la tabla III. La administración de triptófano incrementó significativamente la producción de glucosa por la corteza renal. El incremen-

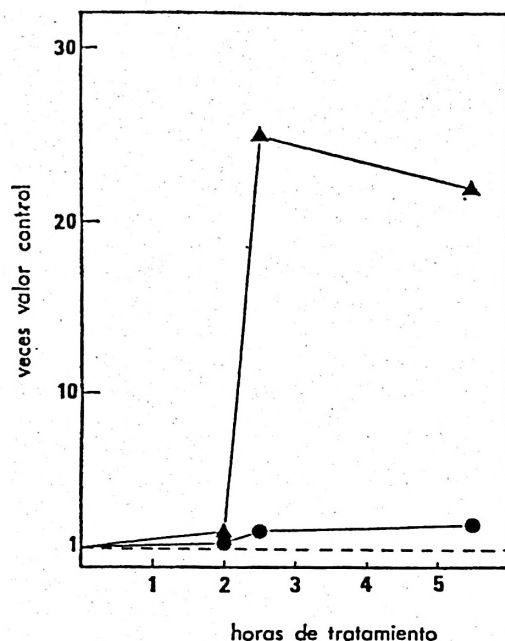


Fig. 1. Evolución a lo largo del tiempo de las concentraciones de ácido quinolínico tras la administración de triptófano (0,5 g/kg de peso del animal) en hígado (▲) y riñón (●) de ratas alimentadas.

Los valores controles fueron: hígado 1,9 y riñón 1,7  $\mu\text{g/g}$  de tejido fresco y los correspondientes al tratamiento con triptófano se expresan como múltiplo de los controles, tomando a éstos como la unidad. Cada valor se obtuvo reuniendo los órganos correspondientes a 4 animales.

to fue del 34 % en ratas alimentadas y 28 % en ratas ayunadas 48 horas. En estas condiciones el triptófano produjo una inhibición casi completa de la capacidad gluconeogénica hepática en ratas sometidas a ayuno 48 horas.

### Discusión

De acuerdo con los datos aparecidos en la literatura, la adición de triptófano y ácido quinolínico produjo una profunda inhibición de la capacidad gluconeogénica

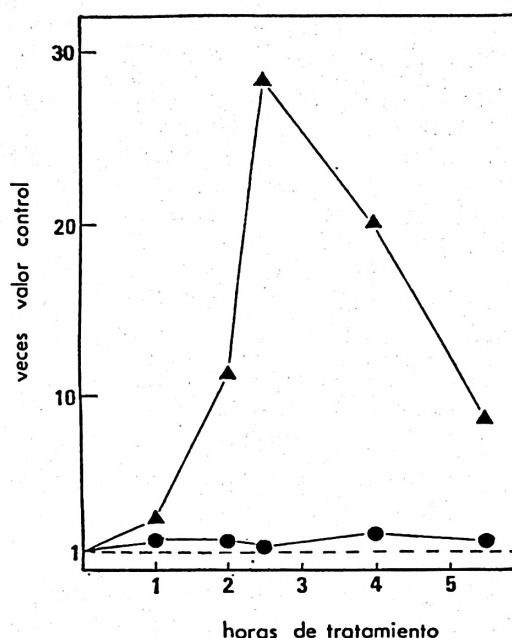


Fig. 2. Evolución a lo largo del tiempo de las concentraciones de ácido quinolínico tras la administración de triptófano (0,5 g/kg de peso del animal) en hígado (▲) y riñón (●) de ratas ayunadas durante las 48 horas anteriores al tratamiento.

La expresión de los resultados se presenta en la figura 1, siendo los valores controles: hígado 2,6 y riñón 1,9  $\mu\text{g/g}$  de tejido fresco.

ca hepática. Conviene destacar que para producir semejantes porcentajes de inhibición se necesitan concentraciones menores de L-triptófano que de ácido quinolínico. Para producir una inhibición del 81 % es necesaria una concentración del aminoácido de 0,5 mM, mientras que para causar el mismo porcentaje de inhibición se necesita una concentración de ácido quinolínico diez veces mayor (5 mM) (tablas I y II). Esta diferencia en el comportamiento de los dos compuestos es debida a la diferente permeabilidad celular existente entre ambas sustancias. HAGINO *et al.* demuestran que el ácido quinolínico difícilmente atraviesa la membrana celular

e indican que existe un gradiente de este compuesto entre el medio de perfusión y el hígado, del orden de 10 a 1 (8).

Confirmando los datos de ENDOU *et al.* (4), la adición de L-triptófano a la corteza renal, en nuestras condiciones experimentales, no produjo inhibición del proceso gluconeogénico en este tejido (tabla II), presumiblemente por la incapacidad renal para transformar este aminoácido en ácido quinolínico (3). En cambio, la adición de ácido quinolínico es capaz de inhibir la capacidad gluconeogénica de la corteza renal, tanto en ratas alimentadas como en ayunadas 48 horas (tabla II), debido a su probada capacidad de inhibición sobre la actividad fosfoenolpiruvato carboxicinasas presente tanto en hígado como en riñón (19, 23, 28).

La inyección de triptófano provocó un fuerte incremento en las concentraciones hepáticas de ácido quinolínico (cerca de treinta veces los valores controles a las dos horas y media de la inyección). En ratas sometidas a ayuno los valores descendieron muy rápidamente tras este máximo, mientras que el descenso fue mucho menos intenso en las ratas alimentadas. Ello podría estar ligado a una mayor actividad durante el ayuno de las enzimas implicadas en la metabolización de ácido quinolínico (figs. 1 y 2). Al contrario que en el hígado, las concentraciones de ácido quinolínico en la corteza renal se incrementaron muy ligeramente tras la administración de triptófano (figs. 1 y 2). Como no existe triptófano pirrolasa en el riñón (3), la producción de esta pequeña cantidad de ácido quinolínico debe estar ligada al metabolismo de la cinurenina procedente del hígado. Es interesante destacar que ninguno de los valores encontrados en riñón es suficientemente alto para producir inhibición de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas, ya que el más alto ( $1,6 \times 10^{-4}$ ) no alcanza la tercera parte de la  $K_i$  ( $5,0 \times 10^{-4}$ ) determinada por MCDANIEL *et al.* para dicha enzima (21). Por tanto, se puede concluir que la admi-

nistración de triptófano no inhibe a la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal ni directamente ni a través de su conversión en ácido quinolínico y que se trata, por consiguiente, de un tratamiento que inhibe selectivamente la gluconeogénesis hepática sin afectar a la renal, de acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo.

El aumento de la capacidad gluconeogénica renal que se observó tras la administración de triptófano (tabla III) puede interpretarse como el resultado de la inducción de la gluconeogénesis en este órgano a consecuencia del fallo en la gluconeogénesis hepática, tal como ocurre en otras situaciones semejantes (5, 6, 17). En este caso, la inhibición tiene la ventaja de ser más específica del proceso gluconeogénico, sin que se afecten, presumiblemente otros procesos metabólicos hepáticos, como ocurre tras el empleo de galactosamina (12, 13), ácido 5 metoxi-2-indol carboxílico (1, 9) o tetracloruro de carbono (18, 26, 27). Parece, por tanto, que la administración de triptófano es un medio específico y selectivo de inhibir la gluconeogénesis hepática y que puede ser utilizado en el estudio de la adaptación metabólica de la corteza renal a esta inhibición.

### Resumen

Se han determinado las concentraciones de ácido quinolínico y la capacidad gluconeogénica de hígado y corteza renal de ratas tratadas con triptófano. La administración de triptófano provoca un fuerte incremento en las concentraciones hepáticas de ácido quinolínico tanto en ratas alimentadas como en las sometidas a un ayuno de 48 horas. Contrariamente, las concentraciones de ácido quinolínico en la corteza renal sufren sólo ligeras variaciones, siendo el valor más alto alcanzado tres veces menor que el de la  $K_i$  del ácido quinolínico, para la fosfoenolpiruvato carboxicinasas. Estos resultados sugieren la existencia de una inhibición selectiva de la gluconeogénesis hepática tras la administración de triptófano.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Loli Franco la ayuda prestada en la preparación del manuscrito.

### Bibliografía

1. BAUMANN, N. y HILL, C. J.: *Biochemistry*, 7, 1322-1327, 1968.
2. BERGMAYER, H. U. y BERNT, E.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmayer, H. U., ed.). Academic Press, Nueva York, 1965, pp. 123-130.
3. DE CASTRO, F. T. BROWN, R. R. y PRICE, J. M.: *J. Biol. Chem.*, 228, 777-788, 1957.
4. ENDOU, H., REUTER, E. y WEBER, H.: *J. Arch. Pharmacol.*, 287, 297-306, 1975.
5. FAUS, M. J., LUPIÁÑEZ, J. A., VARGAS, A. y SÁNCHEZ-MEDINA, F.: *Biochem. J.*, 174, 461-467, 1978.
6. GARCÍA-RUIZ, J. P., MORENO, F., SÁNCHEZ-MEDINA, F. y MAYOR, F.: *FEBS Lett.*, 34, 113-116, 1973.
7. GULLINO, P., WINITZ, M., BIRBAUM, S. M., CORNFELD, J., OTEY, M. C. y GREENSTEIN, A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 58, 252-258, 1955.
8. HAGINO, Y., LAN, S. Y., NGAND, C. Y. y HENDERSON, L. M.: *J. Biol. Chem.*, 243, 4980-4986, 1968.
9. HANSON, R. L., RAY, P. D., WALTER, P. y LARDY, H. A.: *J. Biol. Chem.*, 244, 4351-4359, 1969.
10. HEMS, R., ROSS, B. D., BERRY, M. M. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, 101, 284-292, 1966.
11. KATZ, N., BRINKMANN, A. y JUNGERMANN, K.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 360, 51-57, 1979.
12. KEPPLER, D., LESCH, R., REUTER, W. y DECKER, K.: *Exptl. Mol. Pathol.*, 9, 279-290, 1968.
13. KEPPLER, D. y DECKER, K.: *European J. Biochem.*, 10, 219-225, 1969.
14. KIDA, K., NAKAJO, S., KAMIYA, F., TOYAMA, I., NISHIO, P. y NAKAGAWA, H.: *J. Clin. Inves.*, 62, 721-726, 1978.
15. KREBS, H. A., BENNETT, D. A. H., DEGASQUET, P., GASCOYNE, T. y YOSHIDA, T.: *Biochem. J.*, 86, 22-27, 1963.
16. LUPIÁÑEZ, J. A., DILEEPAN, K. N. y WAGLE, S. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89, 735-742, 1979.
17. LUPIÁÑEZ, J. A., FAUS, M. J., MUÑOZ-CLARES, R. y SÁNCHEZ-MEDINA, F.: *FEBS Lett.*, 61, 277-281, 1976.
18. MAGUS, R. D. y FOUTS, J. R.: *Mol. Pharmacol.*, 4, 18-30, 1968.
19. MCDANIEL, H. G., BOSHELL, B. R. y REDDY, W. J.: *Diabetes*, 23, 713-718, 1973.
20. MCDANIEL, H. G., REDDY, W. J. y BOSHELL, B. R.: *Anal. Biochem.*, 49, 373-378, 1972.
21. MCDANIEL, H. G., REDDY, W. J. y BOSHELL, B. R.: *Biochem. Biophys. Acta*, 276, 543-550, 1972.
22. MIRSKY, A., PERISUTTI, G. y JINKS, R.: *Endocrinology*, 60, 318-327, 1957.
23. RAY, P. D., FOSTER, O. y LARDY, H. A.: *J. Biol. Chem.*, 241, 3904-3908, 1966.
24. RONGSTAND, R. y KATZ, J.: *J. Biol. Chem.*, 19, 6047-6054, 1972.
25. SÁNCHEZ-MEDINA, F., GARCÍA-RUIZ, J. P., LUPIÁÑEZ, J. A., FAUS, M. J. y HORTELANO, P.: En «Biochemical Nephrology» (Guder W. G. y Schmidt, V., eds.). Huber, Berna, 1978, pp. 310-317.
26. SMUCKLER, E. A., ISERI, O. A. y BENDITT, E. P.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 5, 270-275, 1961.
27. SMUCKLER, E. A. y BENDITT, E. P.: *Biochemistry*, 4, 671-679, 1965.
28. VENEZIALE, C. M., WALTER, P., KNEER, N. y LARDY, H. A.: *Biochemistry*, 6, 2129-2138, 1967.
29. WAGLE, S. R., GASKINS, R. K., JACOBY, A. y ASHMORE, J.: *Life Sci.*, 5, 655-663, 1966.