

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA. FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

DETERMINACION DE ACIDO QUINOLINICO
EN CORTEZA RENAL DE RATA

A. SÁNCHEZ POZO, J. A. LUPIÁÑEZ y F. SÁNCHEZ-MEDINA

RESUMEN

Se describe una modificación al método descrito por McDaniel y col. (8) para la determinación de ácido quinolínico en diferentes tejidos animales. El método consiste en la extracción con ácido perclórico, adsorción selectiva sobre carbón activado y descarboxilación hasta ácido nicotínico, que se mide colorimétricamente. Con este método se han medido las concentraciones de ácido quinolínico en corteza renal tras la administración de trip-tófano a las ratas, encontrándose que ninguno de los valores es suficiente para producir una inhibición de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y por tanto de la capacidad gluconeogénica renal.

SUMMARY

We have described a method based on McDaniel's (8) for the determination of quinolinic acid in several animal tissues. The method consist in the extraction of quinolinic acid, selective adsorption on activated charcoal and decarboxylation to nicotinic acid which have been measured by colorimetric reaction. With this method we have measured the concentrations of quinolinic acid in rat renal cortex after the tryptophan injection to rat. We have found that anyone of values is enough to make an inhibition of phosphoenol pyruvate carboxykinase activity and the renal gluconeogenic capacity.

INTRODUCCION

Una de las herramientas de trabajo más usadas para el estudio de las rutas metabólicas es el empleo de inhibidores específicos de las mismas. En nuestro laboratorio se han utilizado diversos tipos de inhibidores de la gluconeogénesis hepática con el fin de conocer el posible papel que juega la capacidad gluconeogénica renal en el mantenimiento de la glucemia (1-3). En todas las situaciones metabólicas originadas tras el empleo de estos inhibidores hemos puesto de manifiesto un aumento significativo de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal, así como los mecanismos responsables de dicho incremento. Sin embargo, el empleo de inhibidores trajo consigo un profundo daño hepático, siendo éste, posiblemente, responsable en gran parte de la inhibición de la producción de glucosa en este tejido. Parecía interesante, por tanto, ensayar la producción de una inhibición de la gluconeogénesis hepática que no llevara aparejada la destrucción de tejido con el fin de esclarecer si la respuesta renal era inducida específicamente por el fallo de la capacidad hepática de producir glucosa. Para ello se ha seleccionado el inhibidor más conocido

quinolínico (4). Este compuesto inhibe específicamente a la fosfoenol-piruvato carboxicinas (E. C. 4.1.1.32) enzima clave de la gluconeogénesis (5), pero esta inhibición no es selectiva del hígado (6). Para lograr que el efecto fuera sólo hepático se pensó en la posibilidad de producirlo "in vivo", administrando triptófano a las ratas. El ácido quinolínico se forma metabólicamente a partir del triptófano en el hígado, mientras que en corteza renal no puede formarse directamente a partir del aminoácido al no existir en este tejido la enzima triptófano pirrolasa (7). No obstante, no se puede descartar del todo su formación ya que el riñón posee el resto de las enzimas implicadas en el proceso, pudiendo utilizar la cinurenina que se libera del hígado como sustrato. La idoneidad de este procedimiento de inhibición específica y selectiva de la gluconeogénesis tenía que comprobarse mediante la determinación de ácido quinolínico en riñón tras la administración de triptófano. Para cuantificar los niveles de ácido quinolínico en corteza renal tras la administración de triptófano se ha utilizado el método de McDaniel (8) el cual ha sido modificado consiguiendo una mayor sensibilidad. El presente trabajo describe la puesta a

punto de este método así como los resultados de la determinación de ácido quinolínico en las condiciones comprobadas en ninguna de estas condiciones los niveles de ácido quinolínico encontrados son suficientes para inhibir la capacidad gluconeogénica renal lo que confirma la validez de la administración de triptófano para inhibir selectivamente la gluconeogénesis hepática.

MATERIAL Y METODOS

Se ha experimentado en ratas machos de la raza Wistar de peso comprendido entre 150-200 g. El triptófano procedía de Sigma Chem. (USA) lo mismo que el ácido quinolínico y el carbón activado (NoritA-). En la preparación de reactivos generales se han empleado productos Merck. Las filtraciones se realizaron sobre papel Whatman núm. 1. La homogenización se realizó en una disgregadora Sorvall-omni-mixer. Para llevar los extractos acuosos a sequedad se utilizó un rotavapor Buchi acoplado a una bomba de vacío. La descarboxilación se llevó a cabo en autoclave. La determinación de ácido quinolínico se realizó de acuerdo con la técnica de McDaniel con las modificaciones descritas en el capítulo siguiente. El tejido se homogeniza en ácido perclórico al 6 por 100 en un "potter" mecánico y se centrifuga. El sobrenadante se decanta a un frasco y el precipitado se homogeniza de nuevo como

lizan y el perclorato potásico formado se elimina por centrifugación. El sobrenadante claro se agita durante una hora con carbón activado, con el fin de adsorber el ácido quinolínico, y se filtra. El residuo de carbón se agita en hidróxido amónico durante una hora y se filtra, el filtrado se guarda en un frasco. El residuo de carbón se agita de nuevo con hidróxido amónico y se vuelve a filtrar reuniéndose al final los dos filtrados, que se llevan a sequedad. El extracto seco se mantiene en acético glacial en un autoclave a 110° durante tres horas formándose ácido nicotínico a partir del quinolínico. Se toma 1 ml de la suspensión una vez fría, se añaden 3 ml de tampón Tris-ClH 1 M pH 7,4 y se completa a 10 ml con agua destilada. A 1 ml de la solución anterior se le adicionan 1,5 ml de etanol absoluto, 0,5 ml de bromuro de cianógeno al 4 por 100 e inmediatamente 0,5 ml de o-toluidina

al 1 por 100. Se agita la mezcla y se mide su absorción a 450 nm a los 30 minutos exactamente medidos desde la adición de la o-toluidina. El esquema del método así como el posible mecanismo de la reacción coloreada se representan en las figuras 1 y 2.

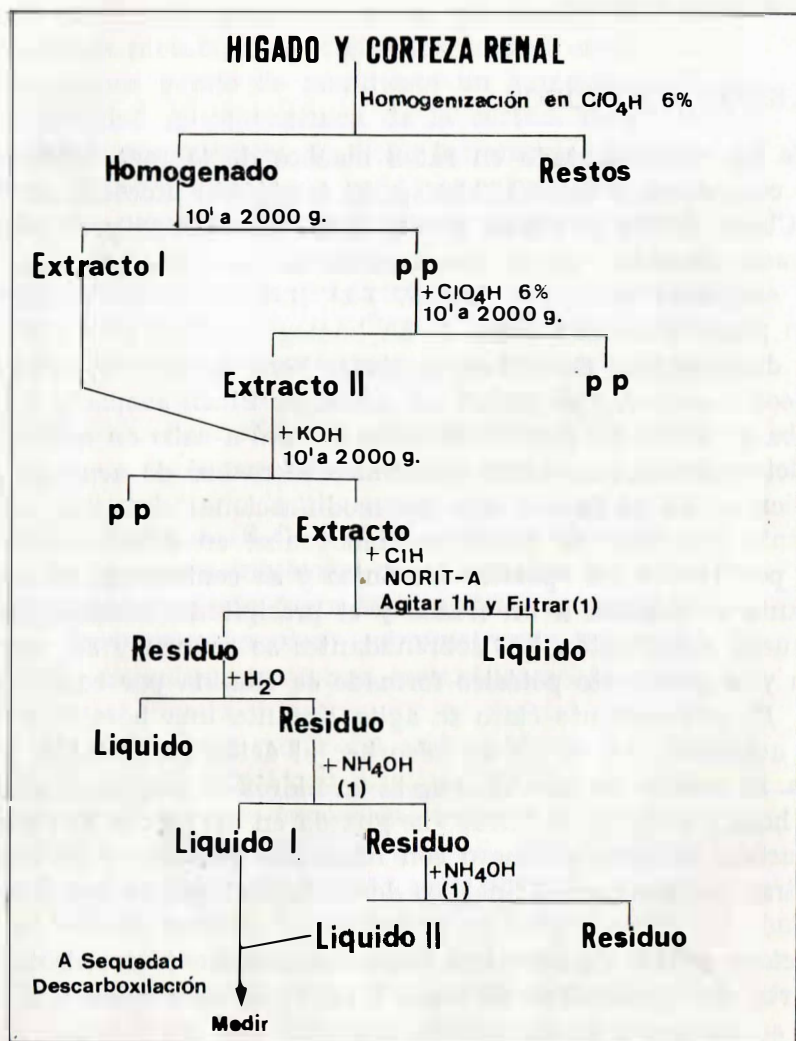


Figura 1.—Esquema general del proceso de obtención de ácido quinolínico.

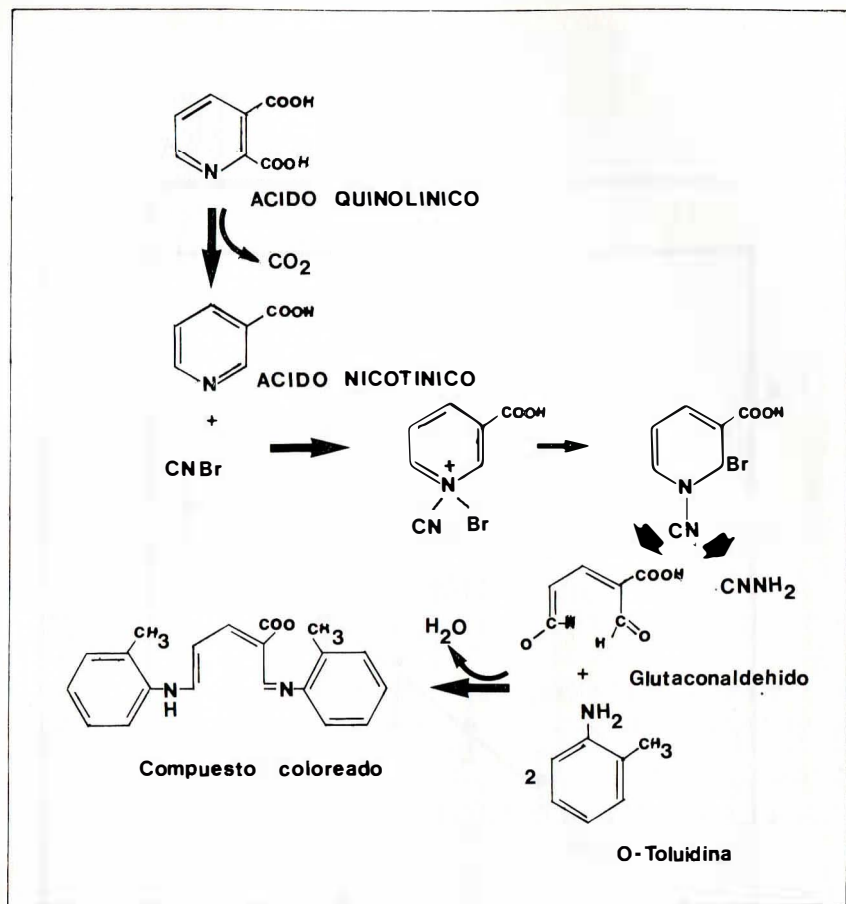


Figura 2.—Posible mecanismo de la reacción colorimétrica de medida de ácido quinolínico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Puesta a punto del método de determinación de ácido quinolínico.—Se ha comprobado la linealidad de la reacción colorimétrica, de medida de ácido nicotínico en el margen de concentraciones ensayado tal y como muestra la figura 3. Asimismo se han estudiado las condiciones óptimas de la medida (figuras 4 y 5), habiéndose encontrado que el valor del pH es crítico en el desa-

Figura III

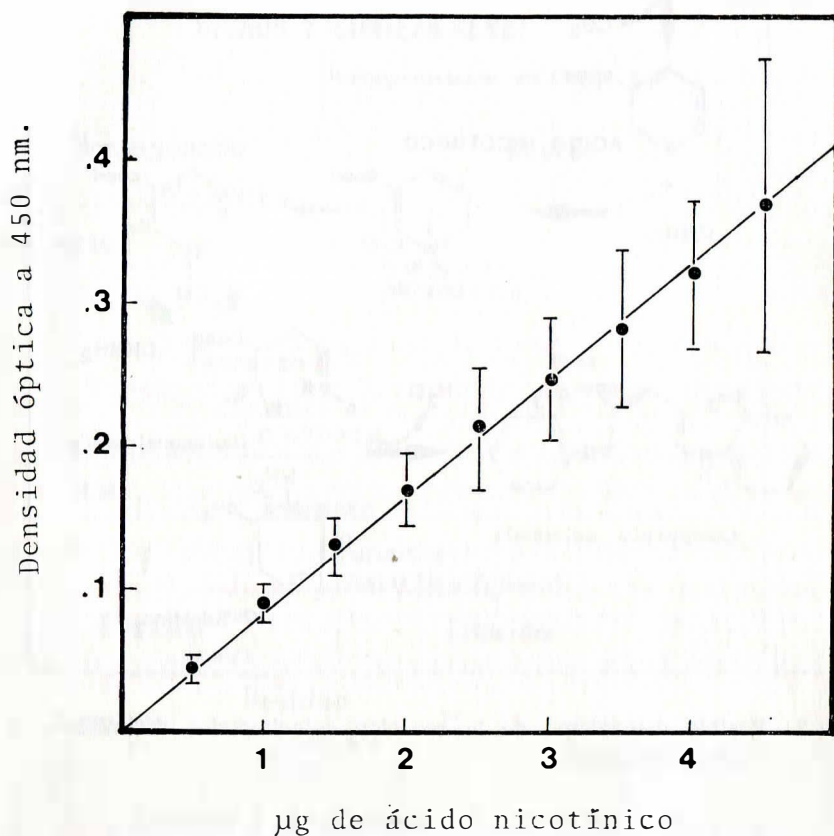


Figura 3.—Proporcionalidad en la reacción colorimétrica del ácido nicotínico con CNBr y o-toluidina. Los resultados expresados son media de al menos 6 experiencias. Las barras verticales representan el error estándar de la media.

Figura IV

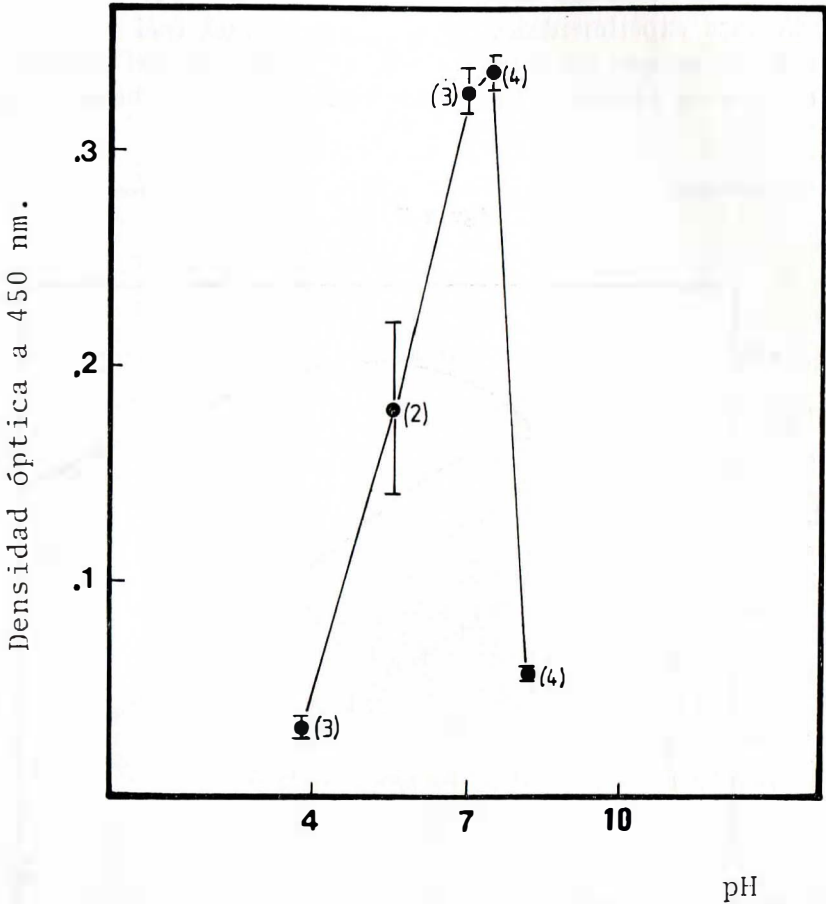


Figura 4.—Efecto del pH sobre el desarrollo de la reacción colorimétrica de medida de ácido nicotínico. Alícuotas de una solución de 4 $\mu\text{g/ml}$ de ácido nicotínico en acético glacial se neutralizan con NaOH a diferentes valores de pH, haciéndose reaccionar con CNBr y o-toluidina. Se representa la media de los resultados obtenidos afectada de su error estándar de la media (barras verticales). El número de experiencias se indica entre paréntesis.

rollo del color, descendiendo muy rápidamente la sensibilidad al alejarse del valor óptimo de 7,4. La reacción es más sensible a la temperatura ambiente que a la de 30° C que señala McDaniel. La transformación de ácido quinolínico en nicotínico ha resultado ser en todos los casos superior al 70 por 100 en nuestras condiciones experimentales, lo que supone una casi total transformación, ya que teóricamente sólo el 74 por 100 del quinolínico se obtiene en forma de nicotínico tras la descarboxilación (figu-

Figura V

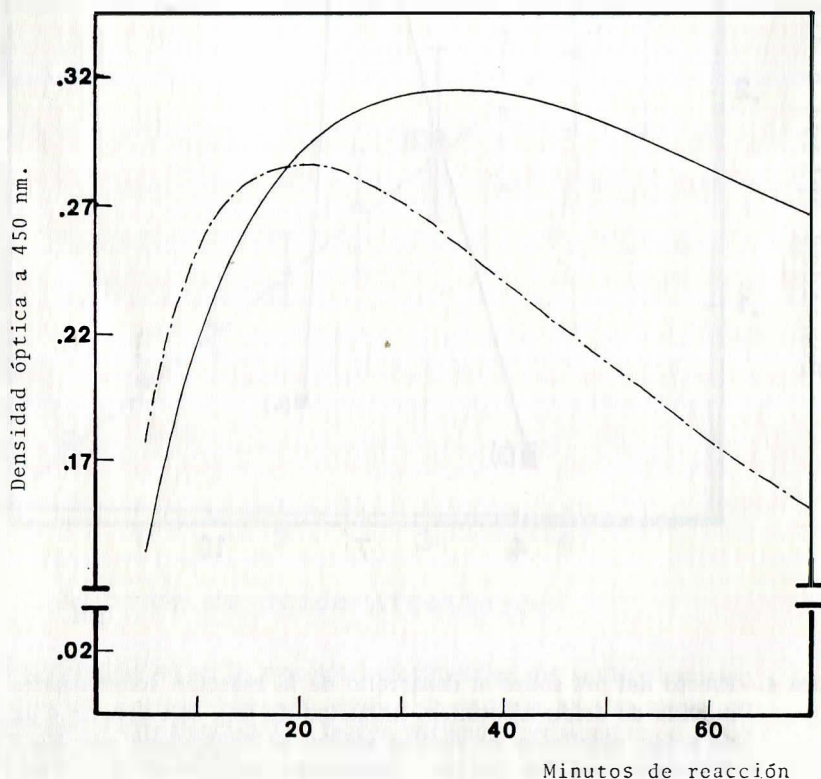


Figura 5.—Influencia de la temperatura sobre la reacción colorimétrica de medida de ácido nicotínico. Se representa la evolución de la cantidad de producto coloreado a lo largo del tiempo. Siendo — temperatura ambiente (20-25° C) y -.- a 30° C.

ra 6). Por lo que se refiere a la extracción y purificación a partir del tejido, el rendimiento obtenido se muestra en la Tabla 1. Entre las razones de este bajo rendimiento está la limitada solubilidad del quinolínico en ácido perclórico (sólo se extrae el 70 por 100). También el uso del carbón activado es un factor

Figura VI'

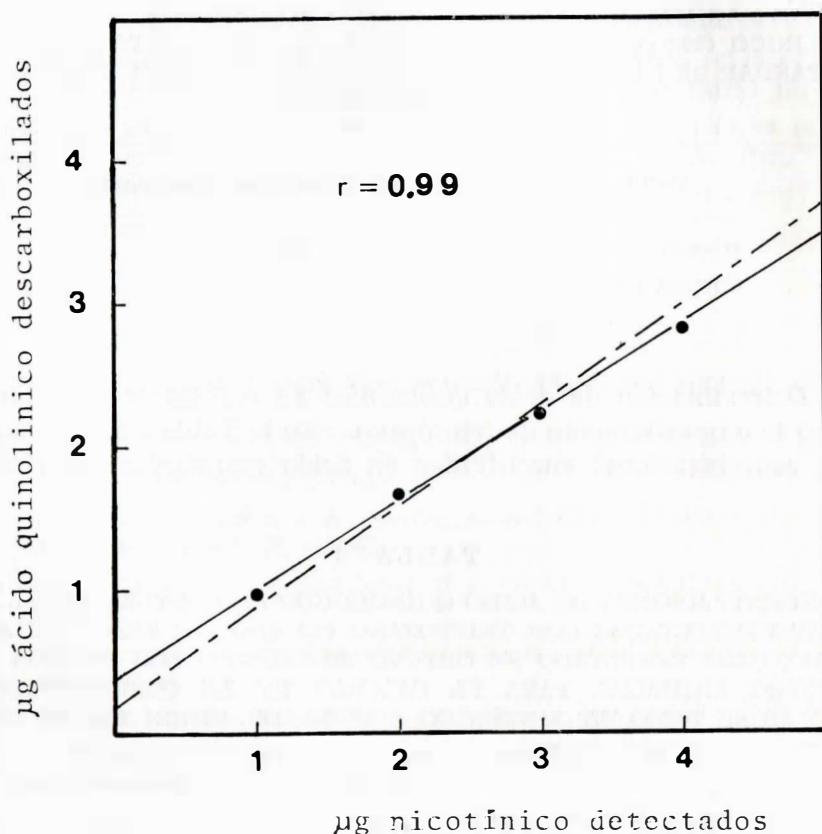


Figura 6.—Rendimiento en la descarboxilación de diferentes cantidades de ácido quinolínico en acético glacial a 110° C durante 3 horas. Siendo --- rendimiento teórico del proceso y — rendimiento obtenido. Los resultados se ajustan a la ecuación $y = 0,612x + 0,375$, siendo r el coeficiente de correlación entre ambas rectas.

limitante, ya que sólo el 86 por 100 del quinolínico se recoge tras la adsorción y elución. Aun con estas limitaciones el método resulta suficientemente sensible para nuestra hipótesis de trabajo, consiguiéndose detectar hasta 45 μg de ácido quinolínico.

TABLA 1

RENDIMIENTO GLOBAL DE EXTRACCION Y MEDIDA DE ACIDO QUINOLINICO DE HIGADO Y CORTEZA RENAL DE RATA. CADA RESULTADO SE OBTUVO REUNIENDO LOS CORRESPONDIENTES ORGANOS DE CUATRO ANIMALES Y AÑADIENDO A LOS HOMOGENADOS ACIDO QUINOLINICO (200 $\mu\text{g}/\text{g}$ TEJIDO FRESCO). EL \pm REPRESENTA EL ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA. ENTRE PARENTESIS SE INDICA EL NUMERO DE EXPERIENCIAS

| <i>Tejido estudiado</i> | <i>% Quinolínico recuperado</i> |
|-------------------------|---------------------------------|
| Hígado | 41,2 \pm 4,6 (4) |
| Corteza renal | 32,6 \pm 2,2 (4) |

Determinación de ácido quinolínico en corteza renal de rata tras la administración de triptófano.—En la Tabla 2 se muestran las concentraciones encontradas en ácido quinolínico en la cor-

TABLA 2

CONCENTRACIONES DE ACIDO QUINOLINICO EN CORTEZA RENAL DE RATAS INYECTADAS CON TRIPTOFANO (0,5 g/Kg DE PESO DEL ANIMAL). CADA RESULTADO SE OBTUVO REUNIENDO LOS TEJIDOS DE CUATRO ANIMALES. PARA EL CALCULO DE LA CONCENTRACION MOLAR SE TOMO EL CONTENIDO ACUOSO DEL RIÑÓN EN UN 82,7 %

| | <i>Alimentadas</i> | <i>Sometidas ayuno</i> |
|----------------------------|----------------------|------------------------|
| Controles | 5,6 $\times 10^{-5}$ | 7,9 $\times 10^{-5}$ |
| Triptófano 1 h. | — | 1,4 $\times 10^{-4}$ |
| Triptófano 2 h. | 7,6 $\times 10^{-5}$ | 1,3 $\times 10^{-4}$ |
| Triptófano 2 h. 30' | 1,1 $\times 10^{-4}$ | 9,9 $\times 10^{-5}$ |
| Triptófano 4 h. | — | 1,6 $\times 10^{-4}$ |
| Triptófano 5 h. 30' | 1,3 $\times 10^{-4}$ | 1,3 $\times 10^{-4}$ |

teza renal. Básicamente el estado nutricional de los animales influye poco en los resultados obtenidos. Tanto en ratas alimentadas como en las sometidas a 24 horas de ayuno, la administración de triptófano a la dosis necesaria para inhibir significativamente la capacidad gluconeogénica del hígado (9) provoca un ligero incremento en la concentración de ácido quinolínico en la corteza renal, que como ya se indicó puede estar ligado al metabolismo de la cinurenina producida por el hígado. La ausencia de triptófano pirrolasa en la corteza renal justifica, sin embargo, que la producción de quinolínico no sea superior en este tejido. Ninguno de los valores encontrados, tanto en ratas controles como tras la administración de triptófano, se acerca al valor de la k_1 para la enzima fosfoenol-piruvato carboxicinas (9) por tanto no son suficientes para producir inhibición del enzima. Por ello se puede establecer que la administración de triptófano en nuestras condiciones experimentales no altera la capacidad gluconeogénica de la corteza renal.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—GARCÍA RUIZ, J. P.; MORENO, F.; SÁNCHEZ-MEDINA, F., and MAYOR, F. (1973): *FEBS Lett.*, 34, 113-116.
- 2.—LUPIÁÑEZ, J. A.; FAUS, M. J.; MUÑOZ-CLARES, R., and SÁNCHEZ-MEDINA, F. (1976): *FEBS Lett.*, 61, 277-281.
- 3.—FAUS, M. J.; LUPIÁÑEZ, J. A.; VARGAS, A., and SÁNCHEZ-MEDINA, F. (1978): *Biochem. Journal*, 174, 461-467.
- 4.—RAY, P. D.; FOSTER, O., and LARDY, H. A. (1966): *J. Biol. Chem.*, 241, 3904-3908.
- 5.—MCDANIEL, H.; REDDY, W., and BOSHELL, B. (1972): *Biochem. Biophys. Acta*, 276, 543-550.
- 6.—ENDOU, H.; REUTER, E., and WEBER, H. (1975): *J. Arch. Pharmacol.*, 287, 297.
- 7.—DE CASTRO, F. T.; BROWN, R. R., and PRICE, J. M. (1957): *J. Biol. Chem.*, 228, 777-784.
- 8.—MCDANIEL, H. G.; REDDY, W. J., and BOSHELL, B. R. (1972): *Anal. Biochem.*, 49, 373-378.
- 9.—MCDANIEL, H. G.; BOSHELL, B. R., and REDDY, W. J. (1973): *Diabetes*, 22, 713-718.
- 10.—SKELTON, H. (1927): *Arch. Int. Med.*, 40, 140.