

# INFLUENCIA DE DIFERENTES ACIDOS ORGANICOS Y AMINOACIDOS SOBRE LA DETERMINACION DE SUCCINATO POR LA SUCCINATO DESHIDROGENASA DE MITOCONDRIA DE HIGADO DE RATA

Por

J. M. ARIAS DE SAAVEDRA, E. GARCIA-PEREGRIN e I. NAÑEZ DE CASTRO

## INTRODUCCION

El succinato se encuentra presente en gran parte de los materiales biológicos como metabolito de cambio del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Se han encontrado cantidades considerables de ácido succínico en diferentes tejidos vegetales, especialmente en frutos. Asimismo parece ser un producto final de la glucólisis anaerobia en bacterias (1, 2), levaduras (3), parásitos (4), moluscos (5), hígado perfundido de rata en condiciones hipóxicas (6) e incluso en suero humano a baja presión parcial de oxígeno (7).

Para la determinación enzimática de succinato en muestras biológicas se han descrito varios métodos, basados todos ellos en la utilización de la succinato deshidrogenasa como reactivo analítico. Sin embargo estos métodos adolecen de bastantes complicaciones técnicas debido principalmente a que la succinato deshidrogenasa no es una enzima comercial, ni en su forma soluble ni en su forma particulada, puesto que se inactiva irreversiblemente con suma facilidad. Por ello es necesario su extracción y preparación extemporánea. La mitocondria de hígado de rata posee una riqueza aceptable de succinato deshidrogenasa por lo que todos los ensayos se han realizado con preparaciones de mitocondrias de hígado de rata.

Entre los métodos descritos para la determinación enzimática del succínico hemos ensayado los que utilizan como reacción acoplada la reducción del violeta de p-yododinitrotetrazolio (8) o la reducción del ferricianuro (9).

Se han ensayado las posibles interferencias de diversos ácidos orgánicos y aminoácidos presentes normalmente en las muestras biológicas y se han establecido las condiciones necesarias para su eliminación.

## MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado reactivos de las firmas Light, Sigma y Merck.

Para la preparación de la suspensión de mitocondrias se han utilizado ratas Wistar de peso aproximado 150-200 g. El procedimiento seguido (8) consiste en la suspensión del hígado en cinco volúmenes de sacarosa 0.25 M previamente enfriada y su homogenización en frío en un sistema "Potter" mecánico con pistilo de vidrio. El extracto así obtenido se centrifuga a 1.000 g durante 10 min. a 4°C y posteriormente a 10.000 g durante 15 min. a la misma temperatura. El sedimento de esta última centrifugación se resuspende en 10 volúmenes de sacarosa 0.25 M y se dializa en frío frente a agua destilada a pH 7.0 durante una noche.

Para la determinación de succinato por el método de Singer y col. (9) el medio de reacción contiene: tampón fosfato 0.2 M pH 7.6, 0.75 ml; ferricianuro potásico 0.1 M, 0.10 ml; cantidades crecientes de solución de succinato sódico y agua destilada hasta completar 2.9 ml. La concentración final de succinato oscila entre 0.01 - 2.50  $\mu$ moles/ml. Una vez estabilizado el valor de la densidad óptica a 450 nm frente a un blanco sin succinato, se adiciona 0.10 ml de suspensión de mitocondrias y se observa la desaparición del ferricianuro con el tiempo.

Cuando el aceptor de electrones es el violeta de p-yodonitrotetrazolio el medio de reacción contiene (8): tampón fosfato 0.2 M pH 7.6, 0.25 ml; solución al 0.5% de cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-tetrazolio, 0.20 ml; EDTA 0.025 M, 0.10 ml; sacarosa 0.25 M, 0.10 ml; suspensión de mitocondrias, 0.10 ml; cantidades crecientes de solución de succinato sódico y agua destilada hasta completar 1 ml. La concentración final de succinato oscila entre 0.01 - 0.50  $\mu$ moles/ml. Los tubos se colocan en hielo durante 15 min. y a continuación se incuban a 37°C durante 60 min. La reacción se detiene por adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 10%. El colorante reducido (formazano) se extrae con 3 ml de acetato de etilo y se determina colorimétricamente a 490 nm.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores encontrados en la determinación de succinato empleando ferricianuro como aceptor de electrones ponen de manifiesto que el procedimiento tiene poca sensibilidad, ya que sólo se cumple la ley Lambert para elevadas concentraciones de succinato (0.25-1.00  $\mu$ moles/ml) y al cabo de 3 h. de reacción. Sin embargo, el método de Clark y Porteus (8) con violeta de p-yodonitrotetrazolio cumple la ley de Lambert, en las condiciones descritas anteriormente, entre 0.01 y 0.25  $\mu$ moles/ml de succinato. Por ello, el estudio de las interferencias en la reacción enzimática se ha llevado a cabo utilizando sólo este último método.

Como se puede observar en la fig. 1, la suspensión de mitocondrias preparada como se ha especificado anteriormente puede conservarse durante varios días a  $-20^{\circ}\text{C}$  sin pérdida apreciable de su actividad.

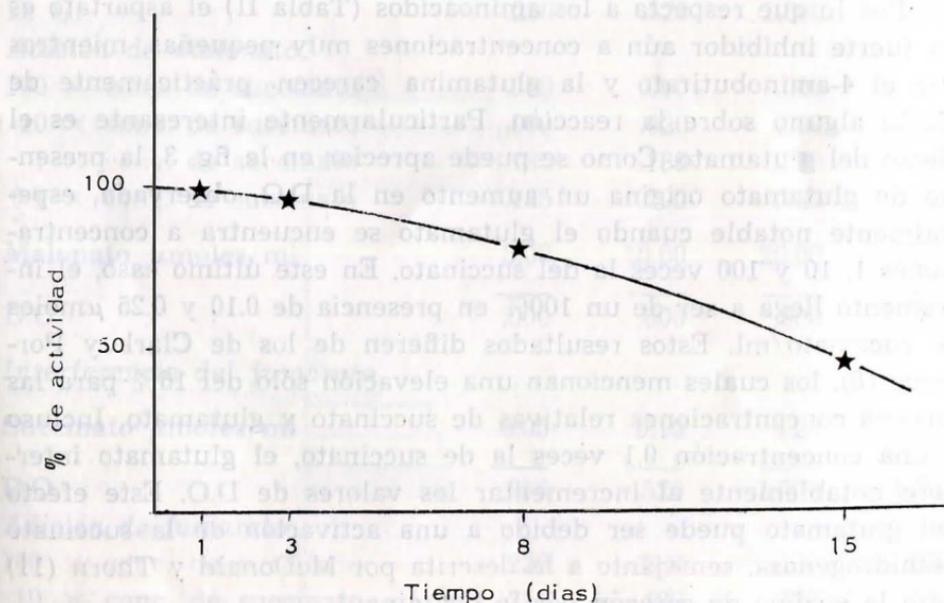


FIG. 1.- Conservación de la actividad succinato deshidrogenasa en la suspensión de mitocondrias mantenida a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Por otra parte se ha estudiado la posible interferencia sobre el sistema de determinación enzimática de diferentes ácidos orgánicos y aminoácidos ensayados a altas concentraciones en ausencia de succinato. Asimismo se ha ensayado el efecto de las mismas sustancias a concentraciones 100, 10, 1 y 0.1 veces la concentración de succinato presente en el medio de determinación. Entre los ácidos orgánicos hemos ensayado el oxalacético, málico, fumárico y malónico todos ellos en forma de sales sódicas; entre los aminoácidos, el aspartato, glutamato, 4-aminobutirato y glutamina. Como las suspensiones de mitocondrias no presentan la misma actividad en todos los casos, ha sido necesario preparar una curva patrón con concentraciones conocidas de succinato para cada ensayo.

Como era de esperar, el oxalacetato y el malonato, aún a concentraciones 10 veces menores que la concentración de succinato, se comportan como potentes inhibidores (Tabla I). El fumarato muestra un claro efecto inhibitor solamente a concentraciones elevadas, superiores a  $2.5 \mu\text{moles/ml}$  en el medio de reacción. Un efecto semejante aunque más acusado presenta el malato (Fig. 2).

Por lo que respecta a los aminoácidos (Tabla II) el aspartato es un fuerte inhibidor aún a concentraciones muy pequeñas, mientras que el 4-aminobutirato y la glutamina carecen prácticamente de efecto alguno sobre la reacción. Particularmente interesante es el efecto del glutamato. Como se puede apreciar en la fig. 3, la presencia de glutamato origina un aumento en la D.O. observada, especialmente notable cuando el glutamato se encuentra a concentraciones 1, 10 y 100 veces la del succinato. En este último caso, el incremento llega a ser de un 100% en presencia de 0.10 y  $0.25 \mu\text{moles}$  de succinato/ml. Estos resultados difieren de los de Clark y Porteous (8), los cuales mencionan una elevación sólo del 16% para las mismas concentraciones relativas de succinato y glutamato. Incluso a una concentración 0.1 veces la de succinato, el glutamato interfiere notablemente al incrementar los valores de D.O. Este efecto del glutamato puede ser debido a una activación de la succinato deshidrogenasa, semejante a la descrita por McDonald y Thorn (11) para la enzima de corazón por la histidina.

La interferencia debida a la presencia de glutamato debe subsanarse mediante el paso de las muestras a ensayar por columnas catiónicas que retengan los aminoácidos. Los ácidos orgánicos que interfieren fuertemente (oxalacetato y malonato) no se suelen encon-

TABLA I

EFFECTO DEL OXALACETATO, MALONATO Y FUMARATO SOBRE LA DETERMINACION DE SUCCINATO POR LA SUCCINATO DESHIDROGENASA

*Interferencia del oxalacetato*

Succinato $\mu$ moles/ml	0.05	0.10	0.20	0.25
D. O.	.125	.240	.540	.780
<i>Adición de oxalacetato</i>				
100 $\times$ conc. de succinato	.010	.000	.010	.040
10 $\times$ conc. de succinato	.000	.000	.020	.000
1 $\times$ conc. de succinato	.020	.000	.000	.000
0.1 $\times$ conc. de succinato	.120	.200	.235	.190
Oxalacetato $\mu$ moles/ml	5.00	10.00	20.00	25.00
D. O.	.000	.015	.010	.000

*Interferencia del malonato*

Succinato $\mu$ moles/ml	0.05	0.10	0.20	0.25
D. O.	.250	.520	1.000	1.300
<i>Adición de malonato</i>				
100 $\times$ conc. de succinato	.000	.000	.000	.000
10 $\times$ conc. de succinato	.000	.020	.000	.000
1 $\times$ conc. de succinato	.135	.180	.290	.355
0.1 $\times$ conc. de succinato	.135	.290	.720	.700
Malonato $\mu$ moles/ml	5.00	10.00	20.00	25.00
D.O.	.000	.000	.000	.000

*Interferencia del fumarato*

Succinato $\mu$ moles/ml	0.05	0.10	0.20	0.25
D.O.	.250	.520	1.000	1.300
<i>Adición de fumarato</i>				
100 $\times$ conc. de succinato	.220	.280	.160	.095
10 $\times$ conc. de succinato	.210	.420	.820	.550
1 $\times$ conc. de succinato	.210	.460	.900	.950
Fumarato $\mu$ moles/ml	5.00	10.00	20.00	25.00
D.O.	.010	.010	.010	.010

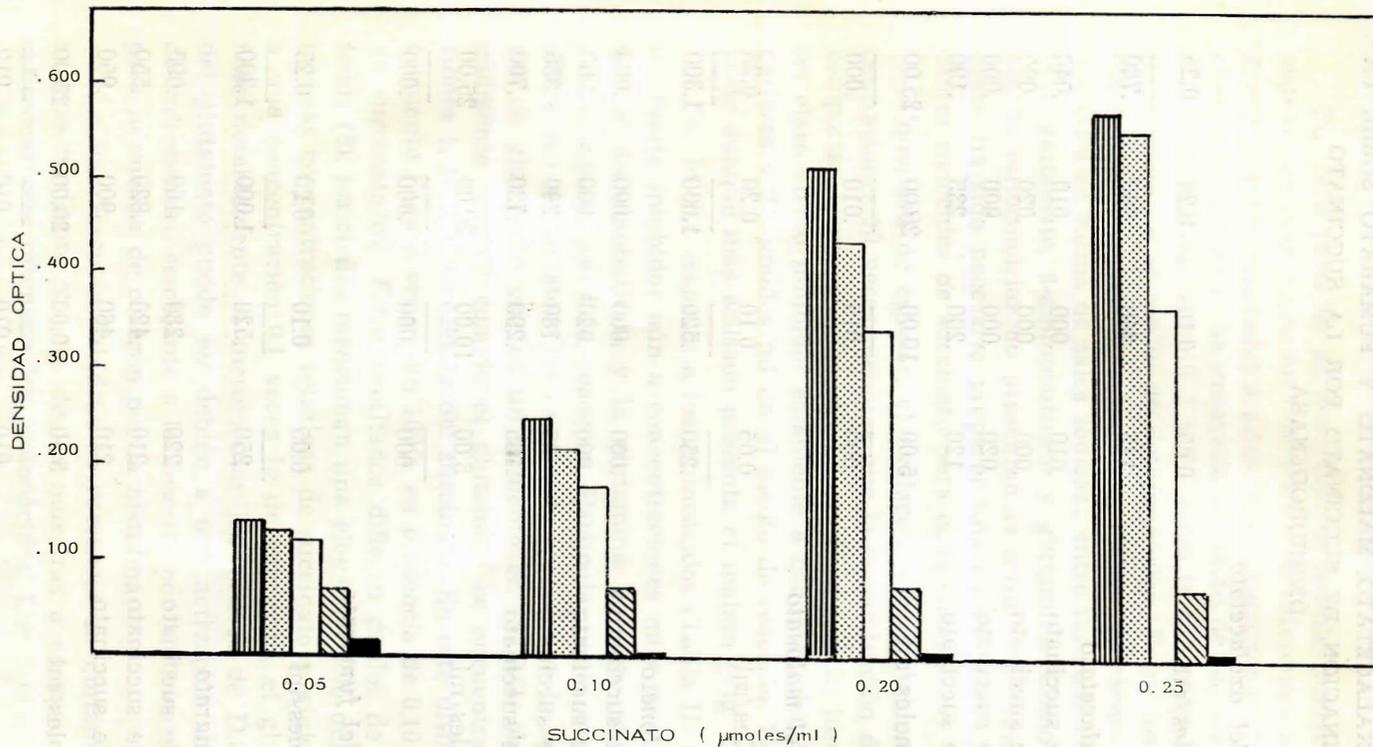


FIG. 2.- Efecto de la adición al medio de incubación de cantidades crecientes de malato.

|||| : sin malato;    ···· : ↓ malato (0.1 x succinato);  
 □ : ↓ malato (1xsuccinato);    ▨ : ↓ malato (10xsuccinato);  
 ■ : ↓ malato (100xsuccinato).

TABLA II

EFEECTO DEL ASPARTATO, 4-AMINOBUTIRATO Y GLUTAMINA SOBRE  
LA DETERMINACION DE SUCCINATO POR LA SUCCINATO  
DESHIDROGENASA

*Interferencia del aspartato*

Succinato $\mu$ moles/ml	0.05	0.10	0.20	0.25
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
D.O.	.080	.120	.240	.340
<i>Adición de aspartato</i>				
100 $\times$ conc. de succinato	.040	.030	.035	0.40
10 $\times$ conc. de succinato	.020	.030	.030	.030
1 $\times$ conc. de succinato	.045	.050	.045	.040
0.1 $\times$ conc. de succinato	.030	.100	.140	.140
Asparto $\mu$ moles/ml	5.00	10.00	20.00	25.00
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
D.O.	.010	.020	.070	.030

*Interferencia del 4-aminobutirato (4-AB)*

Succinato $\mu$ moles/ml	0.05	0.10	0.20	0.25
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
D.O.	.150	.320	.680	.780
<i>Adición de 4-AB</i>				
100 $\times$ conc. de succinato	.135	.320	.700	.900
10 $\times$ conc. de succinato	.130	.340	.700	.780
1 $\times$ conc. de succinato	.135	.290	.680	.850
0.1 $\times$ conc. de succinato	.135	.320	.680	.880
4-AB $\mu$ moles/ml	5.00	10.00	20.00	25.00
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
D.O.	.020	.020	.020	.020

*Interferencia de la glutamina*

Succinato $\mu$ moles/ml	0.05	0.10	0.20	0.25
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
D.O.	.030	.110	.200	.470
<i>Adición de glutamina</i>				
100 $\times$ conc. de succinato	.040	.120	.230	.590
10 $\times$ conc. de succinato	.040	.115	.220	.550
1 $\times$ conc. de succinato	.040	.115	.200	.500
0.1 $\times$ conc. de succinato	.035	.115	.200	.480
Glutamina $\mu$ moles/ml	5.00	10.00	20.00	25.00
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
D.O.	.025	.020	.020.	.020

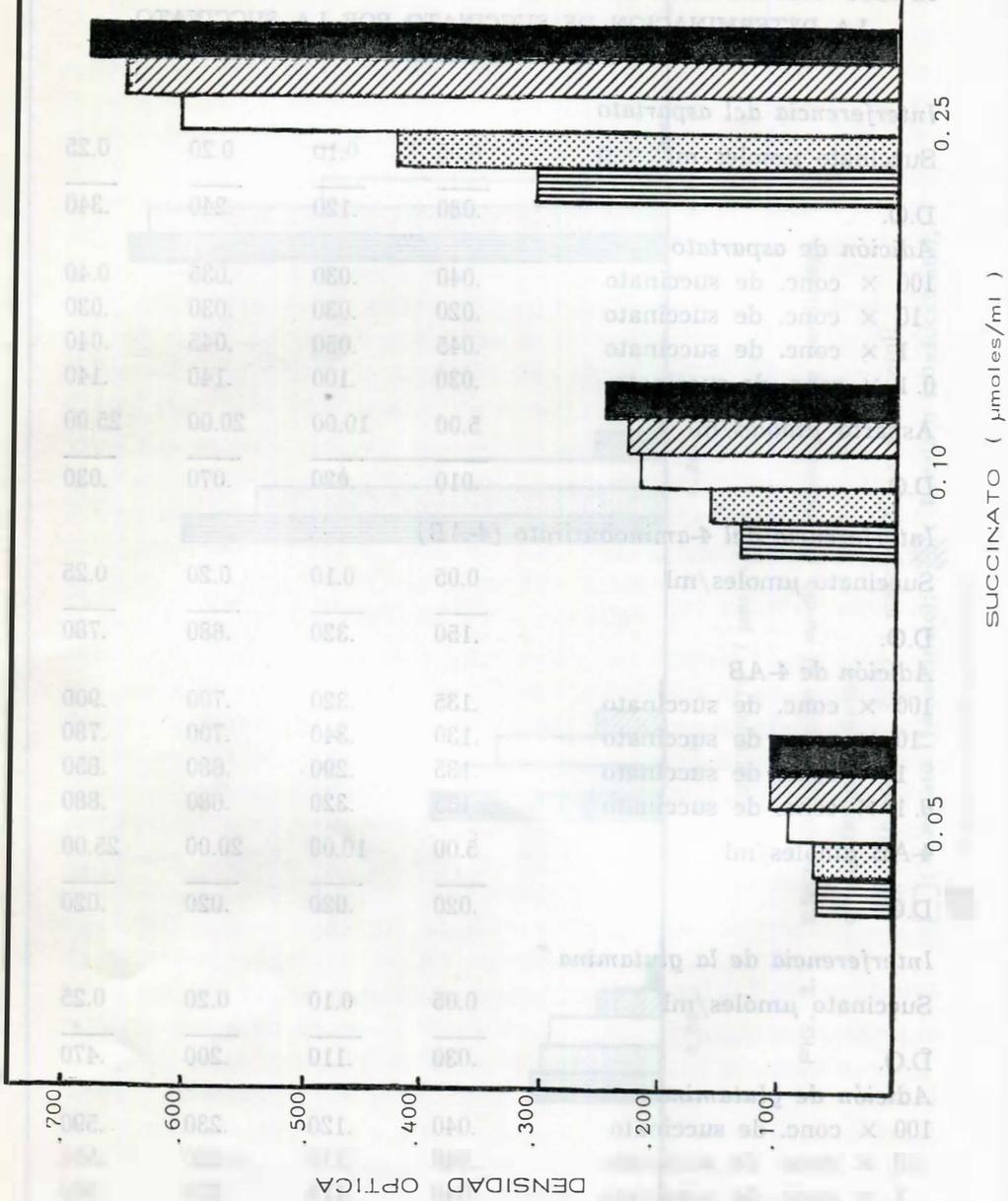


FIG. 3.- Efecto de la adición al medio de incubación de cantidades crecientes de glutamato.  
 |||||: sin glutamato; ▤: + glutamato (0.1xsuccinato);  
 □: + glutamato (1xsuccinato); ▨: + glutamato (10xsuccinato)  
 ■: + glutamato (100xsuccinato).

trar a concentraciones apreciables en las muestras. Trabajando con las precauciones mencionadas, nosotros hemos obtenido rendimientos del 95-100% con muestras a las que previamente se había añadido una concentración conocida de succinato para su determinación.

## RESUMEN

Se ha estudiado la determinación enzimática de succinato en muestras biológicas mediante la succinato deshidrogenasa de mitocondria de hígado de rata. La enzima conserva su actividad a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante varios días. Se han utilizado como reacciones acopladas la reducción de violeta de p-yodonitrotetrazolio y la reducción del ferricianuro. En este último caso la reacción tiene poca sensibilidad ya que sólo cumple la ley de Lambert a elevadas concentraciones de succinato.

Se ha estudiado el efecto de los ácidos oxalacético, málico, fumarico y malónico solos o en presencia de succinato, variando las proporciones relativas de ambos (0.1, 1, 10 y 100 veces la concentración de succinato). Todos ellos presentan un carácter inhibitor por lo que interfieren en la determinación enzimática del succinato.

Por otra parte se ha ensayado el efecto de los aminoácidos aspártico, glutámico, 4-aminobutírico y glutamina en las mismas condiciones. Sólo el glutámico ejerce un marcado efecto activador de la reacción, pudiendo llegar hasta un 100% de incremento de los valores de D.O. observada. De los demás aminoácidos ensayados, el aspártico es un fuerte inhibidor, mientras que los restantes prácticamente no influyen. Por ello creemos imprescindible la separación previa de los aminoácidos presentes en la muestra a valorar para evitar interferencias en el sistema de determinación.

## SUMMARY

Succinate from biological samples have been enzymatically determined by rat liver succinate dehydrogenase. The enzyme is active for 6-8 days kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Colorimetric determination of ferricyanide or p-iodonitrotetrazolium violet has been used. The sensitivity of the first method is lesser than the second.

Oxalacetic, malic, fumaric and malonic acids have been tested as interfering reaction, as well as the aminoacids aspartic, glutamic, 4-aminobutyric and glutamine. Glutamic acid shows a clear activator effect, even at 0.1 fold succinate concentration. Therefore the aminoacids presents in the biological samples must be eliminated before succinate determination.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—KREBS, H. A.: En "*Essays in Biochemistry*". Ed. by P. N. Campbell and F. Dickens. Academic Press, London 1972, Vol. 8, p. 1.
- 2.—KLEINZELLER, A.: *Biochem. J.*, 35 (1941) 495.
- 3.—CONWAY, E. J. and BRADY, T. G.: *Biochem. J.*, 47 (1950) 360.
- 4.—PICHARD, R. K., *Nature*, 228 (1970) 684.
- 5.—WEGENE, B. A., BARNITT, A. E. and HAMMEN, C. S.: *Life Sci.*, 8 (1969) 335.
- 6.—WILSON, M. A. and CASCARANO, J., *Biochim. Biophys. Acta*, 216 (1970) 54.
- 7.—ILES, R. A., BARNETT, D., STRUNIN, L., STRUNIN, J. M., SIMPSON, D. R. and COHEN, R. D.: *Clin. Sci.*, 42 (1972) 35.
- 8.—CLARK, B. and PORTEOUS, J. W.: *Biochem. J.*, 93 (1964) 21c.
- 9.—SINGER, *Analysis*". Ed. by H. U. Bergmeyer. Academic Press. London 1965, p. 340.
- 10.—SINGER, T. P. and KEARNEY, E. B.: En "*The Enzymes*". Ed. by P. D. Boyer, H Lardy and K. Myrback. 2 ed. Academic Press, New York 1963. Vol. 7, p. 383.
- 11.—MACDONALD-GIBSON, R. G. and THORN, M. B.: *Biochem. J.*, 114 (1969) 775

## SUMMARY