

NOTA ACERCA DE LOS AMINOACIDOS LIBRES Y ACTIVIDAD
DE ALGUNAS ENZIMAS DEPENDIENTES DE FOSFATO DE
PIRIDOXAL EN LA CUERDA NERVIOSA DE LA LOMBRIZ
DE TIERRA *Eisenia foetida* (Sav.).

Por

HERMINIA PASANTES O.,
RICARDO TAPIA I.

y

GUILLERMO MASSIEU H.
Departamento de Bioquímica
del Instituto de Biología.

Los tejidos de diversos organismos contienen aminoácidos libres en proporciones características. En el sistema nervioso central de los mamíferos predomina el contenido de los ácidos glutámico, aspártico, gamma-aminobutírico y el de glutamina sobre el resto de los aminoácidos (1, 6, 7, 8, 17, 20). Los estudios sobre el papel de estas sustancias en el metabolismo del tejido nervioso indican no sólo que se encuentran en un activo intercambio metabólico con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sino que es posible que tengan otras funciones específicas, como es influir en el mantenimiento de la concentración del potasio intracelular (ácido glutámico [11]), en la síntesis de la acetilcolina (13, 14) o intervenir en la transmisión nerviosa (AGAB* o su derivado, el ácido β -hidroxi- γ -aminobutírico [9, 10, 16]). Tiene interés investigar los patrones de aminoácidos libres en el tejido nervioso de organismos pertenecientes a diversos grupos, ya que estos datos pueden ser el primer paso

* Las abreviaturas que se utilizan en este trabajo son las siguientes: AGAB, ácido γ -aminobutírico; TGO, transaminasa glutámico-oxalacética; TGP, transaminasa glutámico-pirúvica; T-GAB, transaminasa γ -aminobutírico- α -cetoglutárica; FP, fosfato de piridoxal.

para establecer diferencias o semejanzas metabólicas con respecto a dichas sustancias, y en algunos casos, con respecto a su función.

No se encontraron en la literatura datos relativos al contenido de aminoácidos libres en el tejido nervioso de los Anélidos, por lo que se consideró interesante investigar este punto, así como la actividad de algunas enzimas dependientes de fosfato de piridoxal que relacionan metabólicamente a estas sustancias con el ciclo de Krebs.

Con fines comparativos, las mismas estimaciones de aminoácidos y de actividades enzimáticas que se hicieron en la cuerda nerviosa de la lombriz, se repitieron en nervio ciático de ratón, cotejándolas además con las obtenidas en este laboratorio para el caso del encéfalo de ratón (12).

El sistema nervioso central de la lombriz de tierra, representado por un grupo de ganglios dorsales fusionados, unidos por un anillo periesofágico a una cadena ventral, formada en principio por un par de ganglios segmentales conectados por fibras, obedece al tipo primitivo llamado "escaliforme", aunque existe ya una jerarquía funcional que esboza la centralización que aparecerá después en el sistema nervioso central de los invertebrados superiores y de los vertebrados.

PARTE EXPERIMENTAL

Para la determinación de aminoácidos libres se utilizaron lombrices de tierra de la especie *Eisenia foetida* (Sav.) tomadas directamente de su medio natural, y se les extrajo la cuerda ganglionar ventral hasta el collar periesofágico, la cual fue congelada inmediatamente en aire líquido. Para las determinaciones en nervio ciático se utilizaron ratones (colonia local) adultos, machos, de los cuales se obtuvieron porciones de los nervios ciáticos hasta reunir aproximadamente 100 mg., que se congelaron también en aire líquido. Los tejidos congelados se homogeneizaron (homogeneizador Potter-Elvehjem) en 1 ml. de alcohol etílico al 80%. Después de centrifugar y lavar dos veces el residuo se obtuvo el extracto alcohólico libre de proteínas, el cual se evaporó a sequedad y se reincorporó en 0.05 ml. de agua bidestilada. Los aminoácidos se separaron por cromatografía bidimensional descendente en papel filtro Whatman No. 1, usando como primer solvente fenol al 80% y como segundo solvente butanol-ácido acético-agua (4:1:1). La localización

de los aminoácidos se logró mediante el revelado con ninhidrina al 0.05% en butanol saturado con agua, y la identificación se efectuó mediante pruebas de recuperación de cantidades conocidas de algunos aminoácidos añadidos a los extractos de tejido y por comparación con cromatogramas patrón de mezclas conocidas de dichas sustancias. La cuantificación se realizó según el método de Naftalin (15). Las lecturas se efectuaron en espectrofotómetro Beckman B a 570 $m\mu$ y se compararon con las obtenidas en el caso de cromatogramas patrón de los aminoácidos estudiados.

Las actividades de TGO y TGP se estimaron por el procedimiento de Awapara y Seale (2) con ligeras modificaciones, y consistió en la medición de la cantidad de ácido glutámico producido en un sistema que contenía ácido aspártico o alanina respectivamente (5.0 micromolas en 0.1 ml.), ácido α -cetoglutarico (5.0 micromolas en 0.1 ml.), 0.1 ml. de homogeneizado de cuerda nerviosa de lombriz o nervio ciático de ratón obtenido en homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (1:25 P/V en amortiguador de fosfatos a 0°C, pH 7.6) y 0.4 ml. de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.6.

La mezcla se incubó durante una hora a 37°C y la reacción se detuvo con 2.5 ml. de alcohol etílico absoluto. La estimación del ácido glutámico producido se realizó por cromatografía unidimensional descendente (fenol al 80%) de alícuotas de los extractos alcohólicos obtenidos, según el método de Naftalin (15).

La actividad de la T-GAB se midió por la cantidad de ácido glutámico producido en un sistema que contenía AGAB (6.0 micromolas en 0.1 ml.), ácido α -cetoglutarico (6.0 micromolas en 0.1 ml.), 0.1 ml. de homogeneizado (Potter-Elvehjem) de cuerda nerviosa de lombriz o ciático de ratón (1:25 P/V en amortiguador de boratos a 0°C, pH 8.2) y 0.4 ml. de amortiguador 0.05 M de boratos de pH 8.2. Este procedimiento es una adaptación a homogeneizados de tejidos (19) basada a su vez en las condiciones generales establecidas por Bessman *et al.* (4) y Roberts y Breggoff (18). Después de una hora de incubación a 37°C, la reacción se detuvo con 2.5 ml. de alcohol etílico absoluto; la estimación del ácido glutámico se realizó a partir de alícuotas de los extractos alcohólicos por cromatografía unidimensional descendente (fenol al 80%) y las lecturas se efectuaron por densitometría siguiendo la técnica de Block y Weiss (5).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos se expresan en las Tablas 1 y 2, en donde se comparan con los datos correspondientes a nervio ciático y encéfalo de ratón.

En lo que se refiere a las concentraciones de los aminoácidos libres analizados en la cuerda nerviosa de *Eisenia foetida* puede observarse que fueron sensiblemente menores a las que existen en encéfalo de ratón y mayores a las que se observaron en el ciático (Tabla 1). El ácido glutámico y la alanina se encontraron en una proporción elevada. En lo que respecta al AGAB cuya significación en el sistema nervioso central de algunas especies de vertebrados parece ser de mucha importancia (3, 10, 16), no pudo estimarse cuantitativamente con el método y la cantidad de tejido utilizado, pero las pruebas de recuperación en cromatogramas bidimensionales indicaron que sí se encuentra este aminoácido en la cuerda nerviosa de la lombriz, aunque en muy poca cantidad en relación con los demás aminoácidos estudiados (Figs. 1a. y 1b).

En relación con las actividades de las transaminasas dependientes de fosfato de piridoxal (Tabla 2), se advierte claramente que la de TGO predominó mientras que la de TGP fue casi nula. Esto parece indicar que entre los mecanismos por los cuales el ácido glutámico se metaboliza hacia el ciclo de Krebs interviene la TGO y no la TGP. En cuanto a la T-GAB, se observó que en la cuerda nerviosa de la lombriz existe una considerable actividad, aunque esto no necesariamente implica la presencia de una apreciable cantidad de AGAB en el tejido, ya que se sabe que en el hígado hay una actividad notable de esta enzima, y este órgano prácticamente no contiene AGAB (18).

El estudio que se presenta debe considerarse como explorativo en lo que respecta a *Eisenia foetida* (Sav), ya que no se pudieron obtener los animales en las condiciones más adecuadas, como son uniformidad en lo que se refiere a la edad y otras características. Para estudios similares es de desearse obtener los ejemplares de colonias controladas.

Los escasos datos que se consignan en la literatura en este aspecto de la bioquímica del sistema nervioso de los invertebrados, no permiten concluir nada definitivo; sólo el estudio comparado de los resultados obtenidos con animales de diferente nivel evolutivo

TABLA I

AMINOACIDOS LIBRES DE LA CUERDA NERVIOSA DE LA LOMBRIZ DE TIERRA, NERVIÓ CIÁTICO Y ENCÉFALO DE RATÓN
(PROMEDIO \pm ERROR "STANDARD")

	mg. del aminoácido por 100 g. de tejido húmedo		
	Cuerda nerviosa de la lombriz de tierra	Nervio ciático de ratón	Encéfalo de ratón (12)
Acido aspártico	(6) Trazas	(11) 2.77 \pm 0.172	(27) 50.4 \pm 1.43
Acido glutámico	(6) 31.50 \pm 4.660	(15) 11.50 \pm 0.378	(27) 186.5 \pm 2.41
Glutamina	(5) 4.49 \pm 0.616	(12) 3.21 \pm 0.161	(27) 54.4 \pm 1.64
Alanina	(4) 13.89 \pm 1.340	(11) 1.56 \pm 0.152	(27) 1.4 \pm 0.11
Serina + Cistina	(6) 6.84 \pm 1.630	(10) 3.86 \pm 0.327	

Entre paréntesis se señala el número de muestras utilizadas en cada caso.

TABLA 2

ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS DEPENDIENTES DE FOSFATO DE PIRIDOXAL EN CUERDA NERVIOSA DE LA LOMBRIZ DE TIERRA, NERVO CIÁTICO Y ENCÉFALO DE RATÓN
(PROMEDIO \pm ERROR "STANDARD")

Actividad enzimática	micromolas de ácido glutámico producidas por 100 mg. de tejido húmedo				
	Cuerda nerviosa de la lombriz de tierra	Nervo ciático de ratón	Encéfalo de ratón*		
TGO	Sin FP	(6) 21.70 \pm 4.310	(6) 13.30 \pm 1.400	(3) 20.90 \pm 3.520	(8) 24.99 \pm 0.99
	con FP	(6) 21.20 \pm 2.450	(6) 13.30 \pm 1.170	(3) 21.30 \pm 2.400	
	sin FP	(6) Trazas	(6) 2.38 \pm 0.938	(3) 3.77 \pm 0.003	
TGP	con FP	(6) Trazas	(6) 2.66 \pm 1.410	(3) 3.98 \pm 0.001	
	sin FP	(7) 2.27 \pm 0.328	(6) 0.16 \pm 0.089	(7) 2.65 \pm 0.013	
F-GAB	con FP	(7) 3.45 \pm 0.620	(6) 0.16 \pm 0.083	(7) 2.19 \pm 0.031	

Entre paréntesis se señala el número de muestras utilizadas en cada caso.

* Datos obtenidos por Massieu, Tapia y Ortega (en prensa).

podrá dar una visión más clara del significado de las semejanzas y diferencias observadas. Es el propósito de los autores proseguir con esta línea futura de investigación.

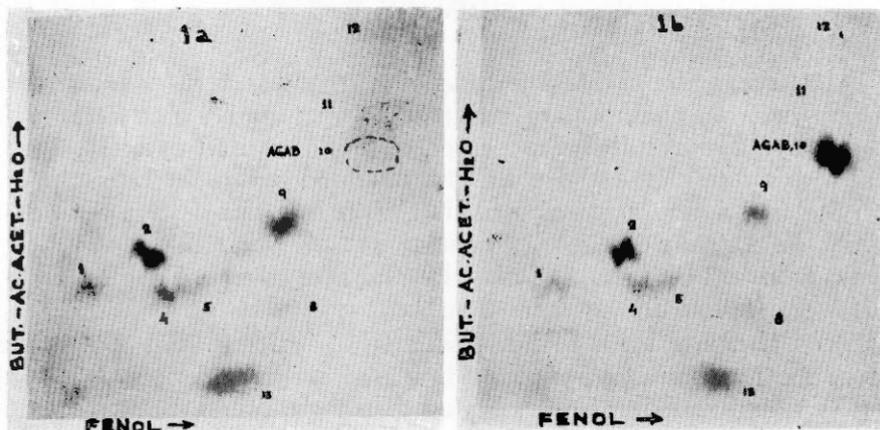


Fig. 1. *1a*: Cromatograma de los aminoácidos libres de cuerda nerviosa de lombriz de tierra. *1b*: Cromatograma del mismo extracto adicionado de ácido gamma-amino-butírico. Técnica bidimensional descendente (ver el texto). 1, ácido aspártico; 2, ácido glutámico; 3, cistina; 4, serina; 5, glicina; 8, glutamina; 9, alanina; 10, ácido gamma-amino butírico; 11, valina y/o metionina; 12, leucina y/o isoleucina; 13, lisina.

RESUMEN

Se investigó por cromatografía cuantitativa en papel, la composición en algunos aminoácidos libres de la cuerda nerviosa de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* (Sav.). Con fines comparativos se analizó también el patrón de aminoácidos libres del nervio ciático y del encéfalo de ratón.

En las mismas estructuras se estimaron las actividades de las transaminasas glutámico-oxaloacética (TGO), glutámico-pirúvica (TGP) y γ -amino butírico- α -cetoglutarica (T-GAB).

Los niveles de ácido glutámico, alanina, serina+glicina y glutamina predominaron sobre las del resto de los aminoácidos en la cuerda nerviosa de la lombriz. Dichas concentraciones fueron inferiores a las que se han encontrado en encéfalo de ratón, excepto en el caso de alanina y semejantes a las de nervio ciático.

Las actividades de TGO y T-GAB en la cuerda nerviosa de la lombriz fueron comparables a las que se han encontrado en el encéfalo

de ratón. La actividad de TGP no fue medible con las técnicas que se emplearon.

SUMMARY

The free amino acid pattern of the earthworm *Eisenia foetida* (Sav.) nervous chain was investigated by quantitative paper chromatography. The results were compared with similar data obtained in mice sciatic nerve and with data obtained before by the authors on the free amino acids composition of mice brain tissue. The activities of glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and γ -aminobutyric acid transaminase (GABA-T) were studied in the same tissues.

Free glutamic acid, alanine, serine plus glycine, and glutamine were the predominant amino acids in the earthworm nervous chain (ENC), and their levels were higher than those found in mice sciatic nerve. The concentrations of the free glutamic acid, aspartic acid and glutamine of the ENC were lower than those found in the mice brain.

ENC and mice brain showed similar GOT and GABA-T activities. ENC exhibited very low activity of GPT.

NOTA.—Los autores agradecen la ayuda del Dr. Enrique Rioja Lo Bianco en la clasificación de la lombriz de tierra estudiada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AWAPARA, J., LANDUA, A. J., FUERST, R. and SEALE, B. Free γ -aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.*, 187:35 (1950).
2. AWAPARA, J. and SEALE, B. Distribution of transaminases in rat organs. *J. Biol. Chem.*, 194:497 (1952).
3. BAXTER, C. F. and ROBERTS, E. γ -aminobutyric acid and cerebral metabolism. En: *The Neurochemistry of the Nucleotides and amino acids*. Ed. John Wiley & Sons, New York, p. 127 (1960).
4. BESSMAN, S. P., ROSSEN, J. and LAYNE, E. C. γ -aminobutyric acid-glutamic acid transamination in brain. *J. Biol. Chem.*, 201:385 (1953).
5. BLOCK, J. R. and WEISS, K. W. *Amino Acid Handbook*. Ed. Charles C. Thomas, Springfield, Ill., p. 76 (1956).
6. CRAVIOTO, R. O., MASSIEU, H. G. and IZQUIERDO, J. J. Free amino acids in rat brain during insulin shock. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 78:856 (1951).
7. DAWSON, R. M. C. Studies on the glutamine and glutamic acid content of the rat brain during insulin hypoglycaemia. *Biochem. J.*, 47:386 (1950).

8. DAWSON, R. M. C. Cerebral amino acids in fluoroacetate poisoned anaesthetized and hypoglycaemic rats. *Biochem. Biophys. Acta*, 11:548 (1953).
9. HAYASHI, T. En: *Inhibition of the Nervous System and γ -aminobutyric acid*. Ed. E. Roberts. Pergamon Press, Oxford, p. 238 (1960).
10. IWAMA, K. and JASPER, H. H. The action of γ -aminobutyric acid upon cortical electrical activity in the cat. *J. Physiol.* 138:365 (1957).
11. KREBS, A. H. and EGGLESTON, V. J. An effect of L-glutamate on the loss of potassium ions by brain slices suspended in a saline medium. *Biochem. J.* 44:2 VII (1949).
12. MASSIEU, G. H., TAPIA, I. R. and ORTEGA, B. G. Free amino acids in brain of mice treated with l-glutamic acid- γ -hydrazide. *Biochem. Pharmacol.* 11:976 (1962).
13. NACHMANSOHN, H. D., JOHN, H. M. and WAELSCH, H. Effect of glutamic acid on the formation of the acetylcholine. *J. Biol. Chem.* 150:485 (1943).
14. NACHMANSOHN, D. and JOHN, H. M. Studies on choline acetylase. I.—Effect of amino acids on the dialyzed enzyme. Inhibition by α -keto acids. *J. Biol. Chem.* 158:157 (1945).
15. NAFTALIN, N. A. Cuantitative chromatographic estimation of amino acids. *Nature* 161:763 (1948).
16. PURPURA, D. F., GIRADO, M. and GRUNDFEST, H. Selective blockade of excitatory synapses in the cat brain by γ -aminobutyric acid. *Science*. 125:1200 (1957).
17. ROBERTS, E. and FRANKEL, S. γ -aminobutyric acid in brain: its formation of glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 187:55 (1950).
18. ROBERTS, E. and BREGOFF, H. M. Transamination of γ -aminobutyric acid and β -alanine in brain and liver. *J. Biol. Chem.* 201:393 (1953).
19. TUENA, M., MASSIEU, H. G., ORTEGA, B. G. y PASANTES, H. Observaciones preliminares acerca del efecto de la nialamida sobre la actividad de algunas enzimas que dependen de fosfato de piridoxal. *An. Inst. Biol. Mex.* 32:21 (1962).
20. WAELSCH, H. Glutamic acid and cerebral function. *Advances in protein chemistry.* 6:301 (1951).