

U. N. A. M.

"ALGUNOS ASPECTOS DEL METABOLISMO DE LA PROLINA EN EL CAN-
GREJO GEGARCINUS LATERALIS" .

ESTE LIBRO NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

EVA ZIMBAL WYSOCKA

México D.F.

1967



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A G R A D E C I M I E N T O S

Quiero hacer patente mi profundo agradecimiento a la -
Biol. Herminia Pasantes por su ayuda, amistad y valiosos conse--
jos que hicieron posible la elaboración de esta tesis.

Igualmente agradezco en todo lo que vale al Sr. Dr. -
Guillermo Massieu H. por sus orientaciones, y al Instituto de -
Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México por las-
facilidades y atenciones para que se completara el siguiente -
trabajo.

A MIS PADRES
CON MI ETERNA GRATITUD

A PEPE
CON TODO MI AMOR

A ETELE Y YOSELE
CON MUCHO CARINO

A MIS MAESTROS

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

A MI ESCUELA

I N T R O D U C C I O N

En una especie determinada, en una etapa particular del desarrollo, cada tejido contiene un patrón de aminoácidos libres cuyos niveles de concentración son característicos para cada tejido (27). Se pueden inclusive encontrar diferencias reproducibles en el patrón de aminoácidos libres en un mismo órgano, por ejemplo en aurícula y ventrículo de corazón de perro, en materia blanca y materia gris de cerebro de gato, en diferentes áreas de la corteza cerebral del mono, etc. (28).

La constancia relativa en la concentración de los aminoácidos en los tejidos de los animales maduros bajo una diversidad de condiciones fisiológicas, sugiere que la concentración de estas sustancias está regulada por eficientes mecanismos de regulación biológica que involucran, no solo una coordinación entre la velocidad de las vías de síntesis y de degradación sino, además, un ajuste continuo de la velocidad de entrada y salida a la célula y aún un control de los movimientos a través de las partículas subcelulares.

Los aminoácidos libres fueron descubiertos durante el estudio de la digestión de las proteínas en los mamíferos y posteriormente, con el desarrollo de técnicas especialmente adecuadas como la cromatografía en papel y en columna, fueron advertidos en los líquidos biológicos y en los tejidos de plantas y animales, tanto vertebrados como invertebrados.

Sin embargo, una revisión somera de la literatura relativa a la concentración de los aminoácidos libres en los tejidos de diversos animales, revela un dato claro e importante: los tejidos de los invertebrados contienen aminoácidos libres en concentraciones mucho mayores que los tejidos de los vertebrados. (1)-

Un ejemplo demostrativo de esta información resulta de la comparación de los niveles de aminoácidos libres en el músculo de langosta y de gato: la suma de los aminoácidos en el músculo de langosta es aproximadamente diez veces mayor que la que se encuentra en el mismo tejido en el gato (3) (32).

Esta característica no es, sin embargo, peculiar a todos los animales marinos, como pudiera pensarse. En efecto, en los invertebrados marinos la concentración del nitrógeno de alfa aminoácidos es de 210 - 370 mg. mientras que en los peces que viven en el mar es sólo de 9 - 72 mg. por cien gramos de tejido fresco (33) (34).

Sin embargo, aún dentro de los invertebrados, las formas marinas presentan niveles mayores de aminoácidos intracelulares que los animales de agua dulce, y más aún, se ha podido establecer una correlación entre la salinidad del agua ambiente y la concentración de aminoácidos en artrópodos (3), moluscos (16) y anélidos (19).

Los estudios efectuados por Duchateau, Florkin et al. (4) con animales eurialinos sugieren un probable papel de los aminoácidos en los mecanismos de control de la regulación osmótica. En efecto, experimentos efectuados por estos autores en el cangrejo Carcinus maenas demuestran una notable disminución en la concentración de los aminoácidos a medida que disminuye la salinidad del medio. Así, en el agua de mar, la concentración total de aminoácidos libres medida en tejido muscular es de 2940 mg./100 gr. de tejido húmedo. Cuando se transfiere el animal a un medio que contiene agua de mar diluida al 50%, después de una adaptación de dos semanas aproximadamente, se advierte una disminución en la concentración de los aminoácidos hasta llegar a 1700 mg./100gr. de tejido.

La disminución observada no es general ni igual en los distintos --

aminoácidos sino que se advierte que algunos modifican más profundamente sus niveles originales; en el caso de los experimentos con Carcinus maenas, los aminoácidos que experimentan cambios más notables son la alanina, la arginina, los ácidos aspártico y glutámico y la prolina.

Un estudio de las variaciones en la concentración de los aminoácidos en ostras de la misma especie (Crassostrea virginica) recolectadas de su medio natural, pero en aguas de muy diferente salinidad (19), muestra un ascenso en la concentración de aminoácidos libres presentes en el músculo aductor, proporcional al aumento en salinidad del agua; nuevamente se advierte que las modificaciones más notables están limitadas a unos cuantos aminoácidos, que en este caso fueron la prolina, la glicina y la alacina, además de la taurina.

Aunque las investigaciones sobre el posible papel osmorregulador de los aminoácidos en el tejido nervioso son mucho más escasas, los estudios encaminados a conocer la contribución de varios electrolitos al balance osmótico en el nervio periférico de Carcinus (17) indican una importante participación de los aminoácidos, especialmente el ácido aspártico y el ácido glutámico.

Desde otro punto de vista, como transmisores nerviosos a nivel sináptico, algunos aminoácidos parecen contribuir de manera importante en el tejido nervioso de vertebrados e invertebrados. El AGAB^{*}, por ejemplo, ha sido considerado como un posible transmisor en las sinapsis inhibitorias en el sistema nervioso central de los mamíferos (26) (23) (9) y se encuentra también en los ganglios nerviosos de varios invertebrados en concentraciones relativamente elevadas (11) (6) (12) (21) (22). Los efectos del AGAB sobre el sistema nervioso periférico han sido estudiados en varias especies de cangrejos (31), aunque es muy poco lo que se conoce acerca de las bases moleculares de la acción del AGAB.

* ácido gama amino butírico

Algunos otros aminoácidos tienen efectos bien demostrados sobre la transmisión sináptica en los artrópodos; la beta alanina, por ejemplo, inhibe la actividad eléctrica en la oruga de Dendrolina pini (35) y aumenta la actividad espontánea en los ganglios del cangrejo (10).

El ácido glutámico es el único compuesto con actividad excitante extraído de los nervios de la langosta (13) y presenta un efecto farmacológico sobre el receptor de estriamiento del cangrejo (5).

Los estudios sobre los niveles de aminoácidos libres efectuados en el tejido nervioso de los artrópodos (22) revelan la presencia de concentraciones elevadas de ácido aspártico, ácido glutámico y prolina (Tabla 1).

La presencia de la prolina es particularmente singular, ya que los resultados obtenidos en el análisis del patrón de aminoácidos en otros invertebrados y en los vertebrados (32), revela que este compuesto se encuentra en tan pequeña cantidad que no es perceptible en la mayoría de los casos por los métodos usuales de identificación de aminoácidos.

En diversos microorganismos y en tejidos de mamíferos (36) (29) se ha podido demostrar que las relaciones metabólicas de la prolina se efectúan de acuerdo con el esquema de la Fig. 1 .

Las enzimas que catalizan los distintos pasos han sido purificadas por Strecker (30) y demostradas igualmente en algunos microorganismos (37).

En vista del interés que puede representar la presencia de prolina en cantidades considerables en el sistema nervioso de un grupo característico y en cierta medida evolucionado como es el de los artrópodos, se procedió, en el presente trabajo, a analizar la velocidad de los caminos de síntesis y degradación de la prolina, medida como la velocidad de interconversión de la prolina y el ácido glutámico, como un primer paso para tratar de averiguar el posible-

papel que este aminoácido puede desempeñar en el sistema nervioso de los animales estudiados.

Un estudio similar será efectuado simultáneamente en el tejido muscular y en el hepatopáncreas de los mismos animales con el fin de conocer las peculiaridades que pueda presentar el metabolismo de la proína en el tejido nervioso.

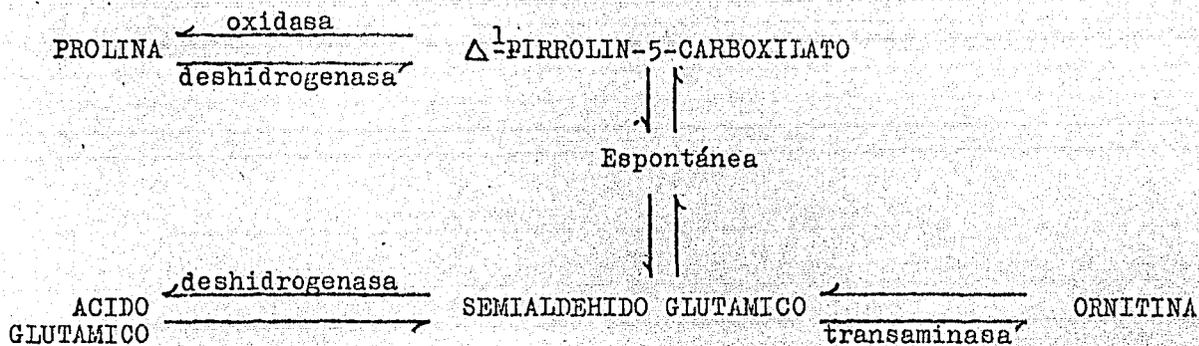


Fig. 1. Esquema de las relaciones metabólicas de la prolina y el ácido glutámico (Según Meister).

Tabla 1. Concentración de aminoácidos libres en el tejido nervioso de tres especies de artrópodos.*

Aminoácido (mg/100 g de tejido)	Cangrejo (<u>Gecarcinus</u> <u>lateralis</u>)	Alacrán (<u>Centruroides</u> <u>limpidus</u>)	Insecto (<u>Lethocerus</u> <u>angustipes</u>)
Aspártico	448.0 \pm 11.6 (16)	85.0 \pm 3.53 (7)	79.5 \pm 2.28 (7)
Glutámico	145.0 \pm 2.5 (16)	115.5 \pm 7.68 (7)	69.9 \pm 5.56 (7)
Glutamina	104.3 \pm 7.1 (16)	65.0 \pm 8.35 (7)	48.0 \pm 2.25 (7)
AGAB	32.2 \pm 2.4 (16)	30.0 \pm 2.67 (7)	33.9 \pm 3.15 (7)
Alanina	65.9 \pm 1.2 (16)	22.6 \pm 1.74 (7)	28.0 \pm 2.95 (7)
Serina + Glicina	65.8 \pm 2.9 (16)	6.7 \pm 0.88 (7)	16.1 \pm 2.98 (7)
Lisina	73.3 \pm 3.1 (16)	29.5 \pm 1.82 (7)	61.4 \pm 7.68 (7)
Prolina	313.0 \pm 8.3 (16)	105.0 \pm 9.98 (7)	74.9 \pm 8.75 (7)

* Promedios \pm error "standard"
Entre paréntesis, el número de determinaciones en cada caso.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

En este trabajo se utilizaron cangrejos de la especie Gecarcinus —lateralis capturados en su medio natural —en los arbustos cercanos a las playas de Veracruz— y mantenidos durante varias semanas en el laboratorio con una alimentación y una temperatura adecuadas, sin que hayan experimentado alteraciones aparentes en su estado general y en su comportamiento.

Los animales fueron sacrificados levantando el caparazón dorsal y —la disección de los tejidos se hizo en todos los casos lo más rápidamente posible congelándolos en hielo seco—acetona o manteniéndolos a 0° C para los experimentos "in vivo" o "in vitro" respectivamente.

Para los estudios efectuados en el tejido nervioso se llevó a cabo —la disección del ganglio subesofágico, cortando las conexiones nerviosas y los vasos, y extrayéndolo de la fosa ventral del endoesqueleto donde se encuentra alojado. El tejido muscular fue disecado de la pinza del primer par de apéndices torácicos y para las determinaciones en el hepatopáncreas se obtuvieron —fragmentos de aproximadamente 60 mg. disecados indistintamente del conjunto de los tubos que constituyen la glándula.

Los animales utilizados en los experimentos "In vivo" se seleccionaron aquellos cuyas medidas oscilaban entre 3.3 - 4.0 cm. de largo y de 3.7 — 4.8 cm. de ancho.

EXPERIMENTOS "IN VIVO".

Los animales fueron inyectados directamente en el seno pericárdico— a través de un pequeño orificio practicado en el caparazón, justamente arriba de la zona cardíaca. Por esta vía se les administraron 2 μC de prolina U-C¹⁴— —New England Nuclear Corp., con actividad específica de .047 mCi/mM — y de 2 a 5 μC de ácido glutámico 3,4-C¹⁴ —Calbiochem, con actividad específica de —

3.1 mc/mg en un volumen de 50 μ l.

Después de la inyección, los animales se mantuvieron aislados y bajo observación y fueron sacrificados al cabo de 6, 18 y 24 horas.

Los tejidos, una vez disecados, se congelaron inmediatamente en hielo seco-acetona y se homogeneizaron en homogeneizadores tipo Fottler - Elvehjem (25), en 2 ml. de alcohol etílico al 80% P/V, procediendo posteriormente al aislamiento y la cuantificación de los aminoácidos libres.

EXPERIMENTOS "IN VITRO".

Para los experimentos "in vitro" se disecaron aproximadamente 60 mg. de hígado, 50 de músculo y el ganglio nervioso completo y fueron mantenidos a 0° C hasta su homogeneización en 0.5 ml. de buffer de fosfatos a pH 7.4 15 molar.

El tejido homogeneizado se incubó con aproximadamente 1 μ c del aminoácido radioactivo durante 30, 60 y 90 minutos a 30° C. Transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con 2 ml. de alcohol absoluto (reactivo analítico) y se procedió a la extracción y análisis de los aminoácidos libres.

EXTRACCION Y ANALISIS DE LOS AMINOACIDOS LIBRES.

Las proteínas precipitadas por el alcohol etílico se separaron del extracto acuoso por centrifugación a 3000 rpm. durante 10 min. La totalidad del extracto conteniendo los aminoácidos libres se evaporó a sequedad con aire caliente y se reincorporó en la cantidad adecuada de agua para obtener una concentración de aproximadamente 50 veces.

La separación de los aminoácidos se hizo por cromatografía bidimensional en papel filtro Whatman No. 1 (23 x 28 cm.) utilizando como primer solvente fenol al 80% y segundo solvente butanol-ácido acético-agua (4:1:1). El fenol que se utilizó fue el reactivo químicamente puro previamente redestilado junto-

con polvo de Zinc. Después de haber corrido las muestras en fenol, el exceso de éste se eliminó por aereación a temperatura ordinaria entre 24 y 36 horas y el mismo procedimiento se siguió una vez que corrieron en el segundo solvente.

La localización de los aminoácidos en el cromatograma se hizo mediante la aplicación de una solución de ninhidrina al 0.05% en butanol saturado con agua y comparando las posiciones de estas sustancias por medio de su Rf con las que se encontraron en cromatogramas patrón.

La cuantificación de los aminoácidos en el cromatograma se realizó siguiendo en lo general la técnica de Naftalin (20) con ligeras modificaciones.

En este procedimiento se recortó la zona en donde se encontró el aminoácido que se deseaba estimar, con el margen adecuado, se redujo a fragmentos pequeños y se intensificó el color por medio de una solución concentrada de ninhidrina al 5%. El compuesto colorido se extrajo con solución de acetona al 75%, la yéndose finalmente a 500 m μ y la prolina a 440 m μ en espectrofotómetro Zeiss --
FMQ II.

Los valores obtenidos se compararon con los de la curva patrón. La descripción detallada del método es la siguiente:

- 1.- Revelar el cromatograma mediante solución débil de ninhidrina a 0.05% en butanol saturado con agua, calentando a 80° C durante 5 minutos.
- 2.- Recortar la zona ocupada por el aminoácido con el margen conveniente.
- 3.- Reducir a fragmentos pequeños el papel filtro, pasarlos a un tubo de ensaye y agregar 0.03 ml. de una solución de ninhidrina al 5% en butanol saturado con buffer de fosfatos 0.1 M de pH 7.0.
- 4.- Calentar en baño de agua 5 minutos a 55° C y posteriormente 2 minutos más a 83° C.
- 5.- Dejar enfriar 5 a 10 minutos y agregar la cantidad conveniente de aco--

tona al 75% (3 ml.); agitar varias veces hasta que se haya extraído todo el compuesto colorido.

6.- Leer en espectrofotómetro a 570 m μ .

Los valores de densidad óptica encontrados se comparan con los obtenidos en curva patrón de los aminoácidos. Estas curvas se desarrollaron en papel tratado de la misma manera que en el caso de las muestras. Con cada lote de éstas se introdujo una curva patrón de cada aminoácido.

DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD.

A.- Para la determinación de la radioactividad de cada aminoácido, se procedió como sigue:

- 1.- Se revelaron los cromatogramas de los extractos de tejido en la forma ya descrita.
- 2.- Se recortaron las zonas correspondientes a los aminoácidos y se fragmentaron en pedazos pequeños que se pasaron a tubos de ensaye.
- 3.- Se añadió a los tubos 2 ml. de acetona al 90% acidificada con ácido clorhídrico en 2 porciones de 2 ml. y se incubó a 45° C durante 30 minutos cada vez.
- 4.- Los extractos acetónicos fueron pasados cuantitativamente a planchetas de aluminio y evaporados con ayuda de una lámpara de rayos infrarrojos.
- 5.- La radioactividad se midió en un contador de radioactividad de flujo continuo sin ventana, modelo 151 A de la Nuclear Chicago.

B.- Para la determinación de la radioactividad incorporada a proteínas se procedió de la siguiente manera:

- 1.- El precipitado que se formó al agregar el alcohol etílico fue lavado con ácido tricloroacético frío y centrifugado a 3000 rpm. por 10 minutos
- 2.- Se descartó el sobrenadante y el residuo se lavó con alcohol-éter.
- 3.- Posteriormente se incubó 2 veces durante 15 minutos con ácido tricloro-

cótico al 5% en un baño a ebullición.

- 4.- El precipitado obtenido nuevamente por centrifugación se lavó 2 veces con alcohol y 2 veces con éter y se trasladó cuantitativamente a un disco de papel filtro distribuyéndose de una manera uniforme sobre la superficie del mismo.
- 5.- El disco de papel filtro se colocó sobre una plancheta de aluminio y en un contador de radioactividad se midió la misma.
- 6.- El contenido de proteína en el precipitado fue determinado según el método de Lowry (18).

RESULTADOS

EXPERIMENTOS SIN VITOP.

1.- Incorporación de radioactividad procedente del ácido glutámico ^{14}C a los aminoácidos libres extraídos de los tejidos del cangrejo

La distribución de la radioactividad en los aminoácidos libres de los tejidos del cangrejo, se observa en las Tablas 2 y 4. En general, la incorporación de radioactividad a los aminoácidos libres es mayor en el ganglio nervioso y considerablemente menor en el músculo. En el ganglio nervioso la radioactividad se encuentra localizada fundamentalmente en el ACAB, indicando una actividad importante de la DAG³.

La incorporación a la alanina es mayor en el músculo que en los otros tejidos y la glutamina se encuentra marcada de una manera similar en los tres tejidos estudiados. El ácido aspártico incorpora aproximadamente la misma radioactividad en el hígado y en el ganglio nervioso; en el músculo — sin embargo, la concentración de este aminoácido es tan baja que no se aprecia la mancha correspondiente en los cromatogramas. Por lo que se refiere a la prolina, la incorporación de radioactividad procedente del ácido glutámico es sensiblemente igual en los tres tejidos estudiados y corresponde aproximadamente al 0.2% de la radioactividad del extracto acuoso (Tabla 4).

2.- Incorporación de radioactividad procedente de la prolina ^{14}C a los aminoácidos libres extraídos de los tejidos del cangrejo

Las Tablas 3 y 5 indican la incorporación de radioactividad procedente de prolina ^{14}C a los aminoácidos libres del ganglio nervioso, hepato páncreas y músculo del cangrejo.

La diferencia fundamental en la distribución de la radioactividad ³descarboxilasa del ácido glutámico.

en los tejidos estudiados se refiere a la velocidad de incorporación en el ácido glutámico. En la Tabla 5 se observa que en el ganglio nervioso, del 4 al 9% de la radioactividad total del extracto acuoso se incorpora al ácido glutámico en el curso de los 90 minutos de incubación, mientras que este porcentaje es de solo 0.75 a 0.88% en el hepatopáncreas, y en el músculo de 0.62 a 1.56%.

En el ganglio nervioso hay también un alto porcentaje de radioactividad en el AGAB (3.15 a 3.65%) que indica nuevamente la importancia de la vía glutámico-AGAB en el tejido nervioso de estos animales.

Por lo que se refiere a los otros aminoácidos, se observa mayor incorporación de radioactividad en el ácido aspártico del ganglio nervioso; mientras que glutamina y alanina muestran una incorporación similar en los tres tejidos.

EXPERIMENTOS "IN VIVO".

1.- Animales inyectados con ácido glutámico 3,4-C¹⁴

La incorporación de radioactividad en prolina, procedente de ácido glutámico 3,4-C¹⁴, muestra un patrón de distribución diferente en los tres tejidos estudiados en el curso de los distintos tiempos transcurridos después de la inyección del aminoácido radioactivo (Tabla 6). Mientras que en el hepatopáncreas la radioactividad aparece en la prolina desde 6 horas después de la inyección y con el transcurso del tiempo se observa una disminución de la marca, en el músculo no aparece radioactividad sino hasta transcurridas 18 horas de la inyección y en el ganglio nervioso hasta 24 horas después.

Por otra parte, los niveles de glutámico radioactivo muestran un movimiento paralelo, aumentando su concentración en el ganglio nervioso con el

curso del tiempo, mientras que en el hepatopáncreas el valor máximo se encuentra a las 6 horas de la inyección y posteriormente disminuye. Esta correlación no se aprecia tan claramente en el tejido muscular.

2.- Animales inyectados con prolina U-C¹⁴

Los resultados de la incorporación de la radioactividad de prolina U-C¹⁴ a los aminoácidos libres de los tejidos del cangrejo, se muestran en la Tabla 7.

Hasta 24 horas después de la inyección de la prolina los únicos aminoácidos en los que se observa radioactividad son el ácido glutámico y el AGAB en el ganglio nervioso, y el ácido glutámico en el hepatopáncreas y en el músculo.

La aparición de la marca en el ácido glutámico se observa en primer lugar en el ganglio nervioso 18 horas después de la inyección y hasta que han transcurrido 24 horas aparece marcado el glutámico en el hígado y en el músculo. En este tiempo hay también radioactividad en el AGAB del ganglio nervioso.

INCORPORACION A PROTEINAS DE LA RADIOACTIVIDAD PROCEDENTE DE PROLINA U-C¹⁴

La incorporación de prolina U-C¹⁴ a las proteínas del ganglio nervioso, hepatopáncreas y músculo de cangrejo "in vitro" se observa en la Fig. 3.

La velocidad de incorporación de la prolina a proteínas en el ganglio nervioso es aproximadamente 2 veces mayor que en el hepatopáncreas y 5 veces mayor que en el hepatopáncreas y cinco veces mayor que en el músculo a los 30 minutos de incubación, y esta proporción se mantiene a los 60 y 90 minutos de incubación, aunque la incorporación aumenta en los tres tejidos con el transcurso del tiempo.

"In vivo" la incorporación de prolina marcada a proteínas después de 6, 18 y 24 horas es bastante apreciable, tal como puede apreciarse en la Fig. 4. En

estas condiciones, la incorporación a las proteínas del ganglio nervioso es también mayor que en el hepatopáncreas y que en el músculo pero la diferencia no es tan considerable como la que se observa en los experimentos "in vitro". En los tres tejidos la incorporación de radioactividad a las proteínas se puede observar ya en los animales sacrificados 6 horas después de la inyección de la prolina.

Tabla 2. Distribución de la radioactividad procedente de prolina U- 14 C en algunos aminoácidos libres del ganglio nervioso, hepatopáncreas y músculo del cangrejo, a los 30, 60 y 90 minutos de incubación. (cpm/ μ g)*

	Ganglio nervioso		
	30 min.	60 min.	90 min.
Aspártico	1170 \pm 107 (4)	746 \pm 75 (4)	1485 \pm 97 (4)
Glutámico	24366 \pm 1855 (4)	34600 \pm 1555 (4)	40200 \pm 240 (4)
Glutamina	3070 \pm 280 (4)	2405 \pm 610 (4)	4265 \pm 385 (4)
Alanina	839 \pm 227 (4)	3420 \pm 321 (4)	6450 \pm 306 (4)
AGAB	93000 \pm 8300 (4)	71200 \pm 6950 (4)	62625 \pm 5670 (4)

	Hepatopáncreas		
	30 min.	60 min.	90 min.
Aspártico	698 \pm 72 (4)	698 \pm 65 (3)	878 \pm 86 (4)
Glutámico	2295 \pm 248 (4)	2800 \pm 270 (4)	5415 \pm 88 (4)
Glutamina	1068 \pm 103 (4)	502 \pm 42 (3)	3240 \pm 318 (3)
Alanina	703 \pm 70 (3)	1113 \pm 106 (3)	1502 \pm 64 (4)

	Músculo		
	30 min.	60 min.	90 min.
Glutámico	4106 \pm 11 (4)	4833 \pm 430 (4)	5316 \pm 635 (4)
Glutamina	144 \pm 14 (4)	383 \pm 29 (4)	328 \pm 32 (3)
Alanina	536 \pm 36 (4)	614 \pm 63 (4)	899 \pm 78 (4)

*Promedios + error "standard"

Entre paréntesis el número de muestras en cada grupo.

Tabla 3. Distribución de la radioactividad procedente del ácido glutámico-3,4-Cl₄ en algunos aminoácidos libres del ganglio nervioso, hepatopáncreas y músculo del cangrejo, a los 30, 60 y 90 minutos de incubación (cpm/ μ M).^a

Ganglio nervioso			
	30 min	60 min.	90 min.
Aspártico	2976 \pm 296 (3)	3533 \pm 241 (3)	4980 \pm 243 (3)
Glutamina	3306 \pm 209 (3)	4160 \pm 349 (3)	4386 \pm 142 (3)
Alanina	6150 \pm 290 (3)	8733 \pm 410 (3)	15866 \pm 1560 (3)
Prolina	2293 \pm 230 (3)	1840 \pm 168 (3)	1803 \pm 161 (3)
AGAB	77833 \pm 7100 (3)	184333 \pm 6350 (3)	116166 \pm 6560 (3)

Hepatopáncreas			
	30 min.	60 min.	90 min.
Aspártico	6573 \pm 126 (3)	7060 \pm 1060 (3)	9063 \pm 638 (3)
Glutamina	3163 \pm 308 (3)	3326 \pm 277 (3)	5200 \pm 178 (3)
Alanina	1913 \pm 149 (3)	4666 \pm 89 (3)	5436 \pm 208 (3)
Prolina	784 \pm 39 (3)	659 \pm 61 (3)	1015 \pm 43 (3)

Músculo			
	30 min.	60 min.	90 min.
Glutamina	269 \pm 5 (3)	485 \pm 55 (3)	1473 \pm 145 (3)
Alanina	917 \pm 64 (3)	1436 \pm 129 (3)	2413 \pm 167 (3)
Prolina	175 \pm 16 (3)	312 \pm 8 (3)	589 \pm 59 (3)

^aPromedios + error "standard"

Entre paréntesis el número de muestras en cada grupo.

Tabla 4. Distribución porcentual de la radioactividad del ácido glutámico $3, 4\text{-}^{14}\text{C}$ en algunos aminoácidos libres extraídos del tejido nervioso del hepatopáncreas y músculo del cangrejo después de 30, 60 y 90 minutos de incubación

Ganglio Nervioso			
	30 min.	60 min.	90 min.
Aspártico	0.24	0.22	0.23
Glutámico	86.50	85.00	83.00
Glutamina	0.04	0.04	0.05
Alanina	0.10	0.11	0.12
Prolina	0.19	0.22	0.22
AGAB	3.97	5.16	5.41

Hepatopáncreas			
	30 min.	60 min.	90 min.
Aspártico	0.27	0.18	0.32
Glutámico	86.50	83.50	85.60
Glutamina	0.08	0.14	0.17
Alanina	0.16	0.20	0.23
Prolina	0.13	0.13	0.20

Músculo			
	30 min.	60 min.	90 min.
Glutámico	91.50	88.60	87.50
Glutamina	0.14	0.15	0.29
Alanina	0.33	0.40	0.51
Prolina	0.13	0.19	0.21

Tabla 5. Distribución porcentual de la radioactividad de la prolina U- 14 en algunos aminoácidos libres extraídos del tejido nervioso del hepatopáncreas y músculo del cangrejo después de 30, 60 y 90 minutos de incubación.

Ganglio nervioso			
	30 min.	60 min.	90 min.
Soluble cpm/100mg. de tej.	595 000	539 000	550 000
Aspártico	0.51	0.46	0.80
Glutámico	4.24	9.15	9.25
Glutamina	0.28	0.32	0.27
Alanina	0.01	0.53	0.92
Prolina	88.00	84.50	85.50
AGAB	3.65	3.51	3.15
Hepatopáncreas			
	30 min.	60 min.	90 min.
Soluble cpm/100mg. de tej.	277 000	269 000	263 600
Aspártico	0.16	0.09	0.28
Glutámico	0.88	0.75	0.78
Glutamina	0.46	0.08	0.70
Alanina	1.20	0.95	0.79
Prolina	84.50	83.70	83.00
Músculo			
	30 min.	60 min.	90 min.
Soluble cpm/100mg. de tej.	89 400	91 300	90 500
Glutámico	0.62	0.65	1.56
Glutamina	0.23	0.46	0.74
Alanina	0.15	2.60	2.64
Prolina	95.00	93.00	87.50

Tabla 6. Incorporación de radioactividad (cpm/100mg de tejido) en los aminoácidos libres del tejido nervioso, hepatopáncreas y músculo del cangrejo después de 6, 18 y 24 horas de la inyección de prolina-U-014. *

Ganglio nervioso			
	6 horas	18 horas	24 horas
Prolina	2126 ± 116 (3)	4290 ± 350 (3)	5726 ± 394 (3)
Glutámico	0 (3)	306 ± 27 (3)	751 ± 11.3 (3)
AGAB	0 (3)	0 ± (3)	250 ± 9.1 (3)

Hepatopáncreas			
	6 horas	18 horas	24 horas
Prolina	1386 ± 138 (3)	1463 ± 13.1 (3)	2693 ± 90.5 (3)
Glutámico	0 (3)	0 (3)	364 ± 31.3 (3)

Músculo			
	6 horas	18 horas	24 horas
Prolina	1278 ± 18.6 (3)	2370 ± 63.1 (3)	5340 ± 457 (3)
Glutámico	0 (3)	0 (3)	123 ± 14.2 (3)

* Promedios + error "standard"

Entre paréntesis el número de animales en cada grupo

Tabla 7. Incorporación de radioactividad (cpm/100 mg de tejido) en la prolina del tejido nervioso, hepatopáncreas y músculo del cangrejo, después de 6, 18 y 24 horas de la inyección de ácido glutámico-3,4- C^{14} . *

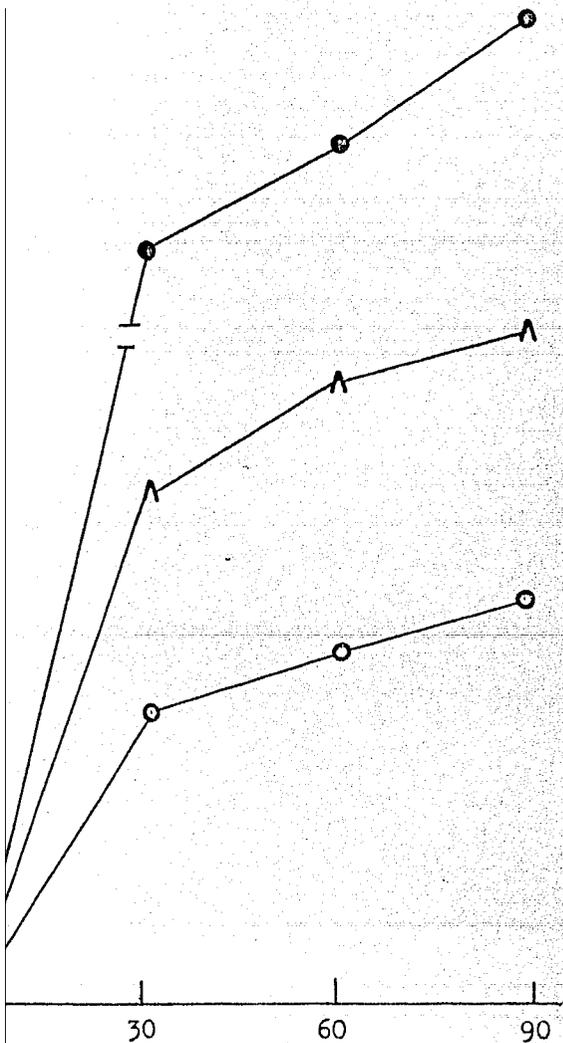
Ganglio nervioso			
	6 horas	18 horas	24 horas
Glutámico	493 \pm 63 (3)	329 \pm 16 (3)	1030 \pm 105 (3)
Prolina	0 (6)	0 (3)	178 \pm 16 (3)

Hepatopáncreas			
	6 horas	18 horas	24 horas
Glutámico	966 \pm 109 (3)	133 \pm 19 (3)	98 \pm 2.3 (3)
Prolina	112 \pm 18 (4)	89 \pm 16 (3)	20 \pm 3.1 (3)

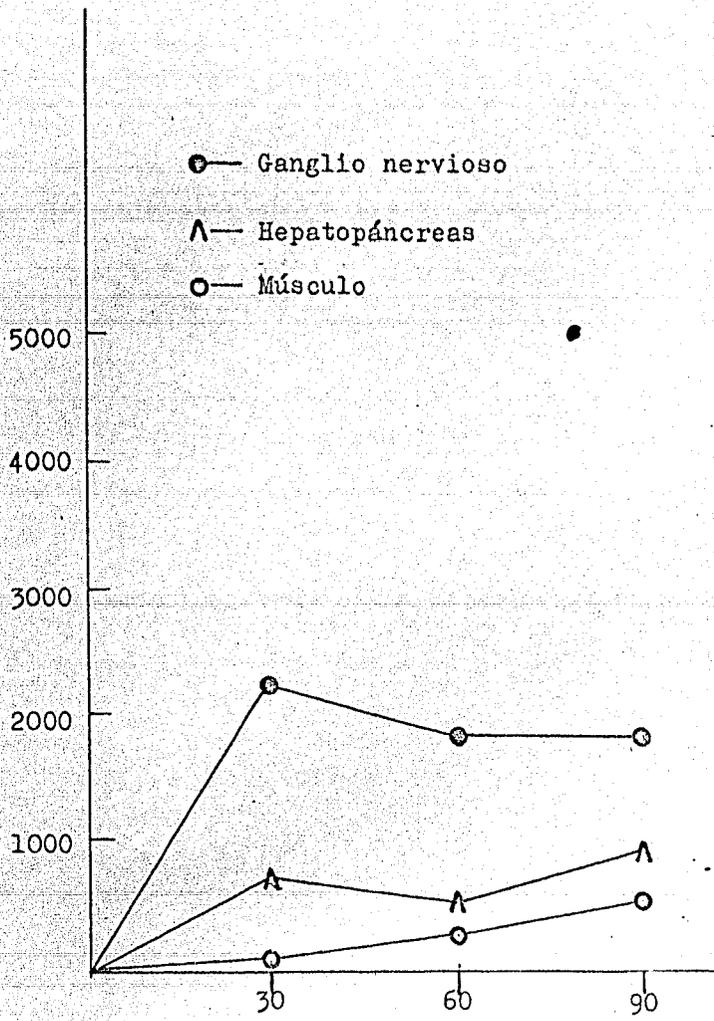
Músculo			
	6 horas	18 horas	24 horas
Glutámico	298 \pm 30.6 (3)	339 \pm 36 (3)	148 \pm 7.2 (3)
Prolina	0 (3)	42.6 \pm 4 (3)	100 \pm 6.7 (3)

*Promedios \pm error "standard"

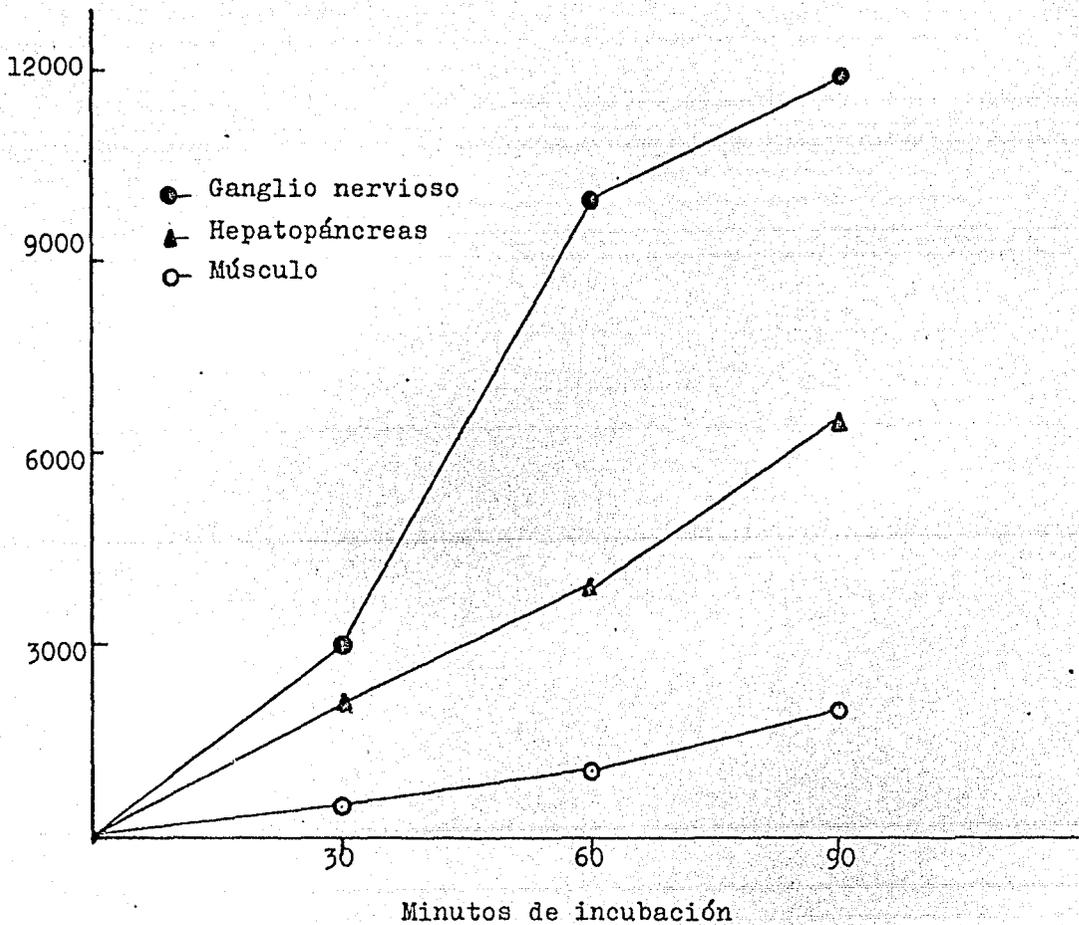
Entre paréntesis el número de animales en cada grupo.



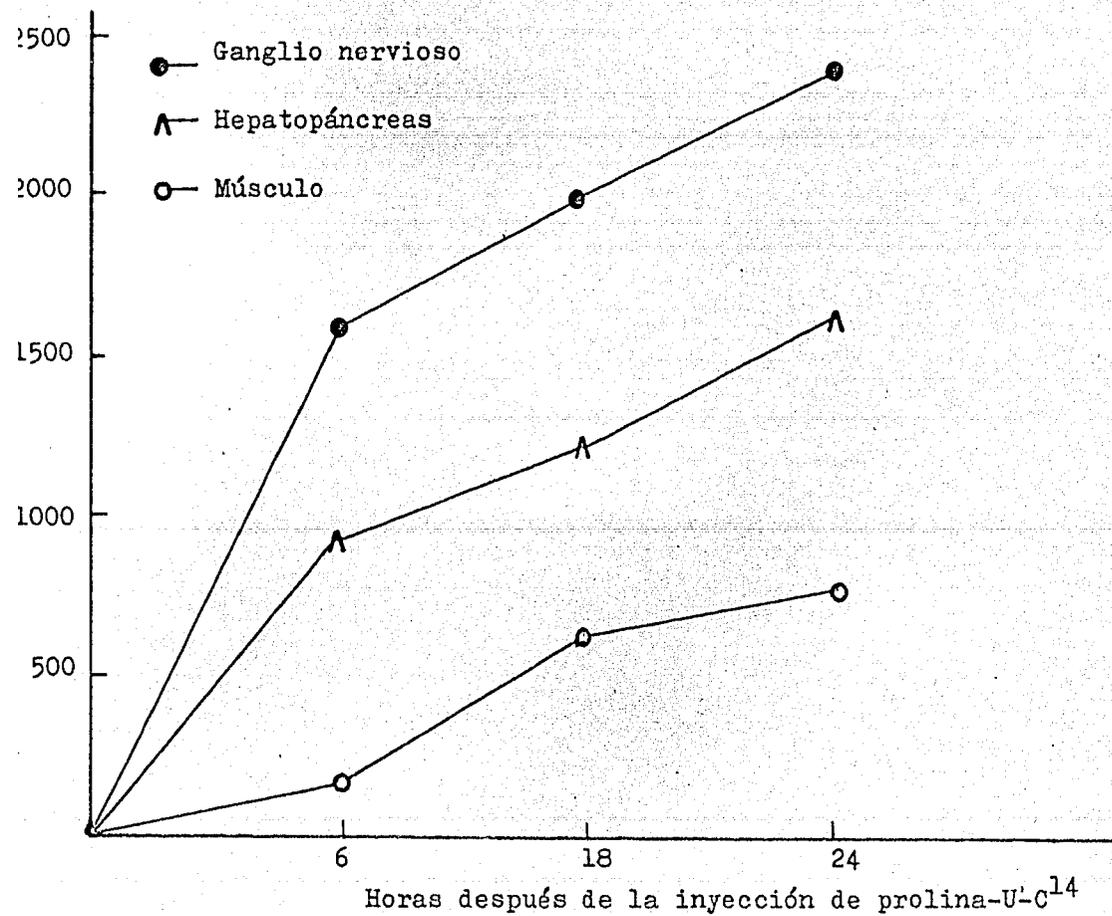
Incorporación de radioactividad procedente de prolina-U/C14, al ácido glutámico en los tejidos del cangrejo a los 30, 60 y 90 minutos de incubación.



Incorporación de radioactividad procedente de ácido glutámico-3,4-C14, a la prolina en los tejidos del cangrejo, a los 30, 60 y 90 minutos de incubación.



5. 3. Incorporación de radioactividad procedente de prolina U-Cl4, a las proteínas de los tejidos del cangrejo, después de 30, 60 y 90 minutos de incubación.



4. Incorporación de radioactividad a las proteínas de los tejidos del cangrejo después de 6, 18 y 24 horas de la inyección con prolina- $U-^{14}C$.

D I S C U S I O N .

Los resultados de este trabajo permiten confirmar que el esquema metabólico de las relaciones entre la prolina y el ácido glutámico descrito en los mamíferos y en algunos microorganismos (36) (29) (30), se encuentra presente en los tejidos estudiados.

Sin embargo, el equilibrio de las reacciones de interconversión glutámico-prolina tiene algunas características particulares, especialmente en el tejido nervioso en donde se observa un desplazamiento muy marcado en el sentido de la formación de ácido glutámico a partir de prolina. Aunque esta característica se observa también en el músculo y el hepatopáncreas, es en el tejido nervioso en donde es más aparente. En efecto, la conversión de prolina a ácido glutámico medida por la radioactividad procedente de prolina $U-C^{14}$ llega a ser hasta 40 veces mayor (Fig. 2) que la reacción inversa.

Estos resultados unidos a las observaciones de Ray (24) y Bursell (2) sugieren que la prolina puede ser oxidada rápidamente a ácido glutámico y en esta forma constituir una especie de reserva energética que ayude en caso necesario, a través de esta vía, a mantener constantes los niveles de otros aminoácidos tales como aspártico, alanina y AGAB. En el trabajo de Ray (24) sobre el metabolismo de los aminoácidos en la cuerda nerviosa de Periplaneta americana, el bloqueo de la glucólisis anaeróbica con yodoacetato el cual inhibe la deshidrogenasa del gliceraldehido 3 fosfato no provoca un cambio notable en el nivel de alanina, como sería de esperarse por la deficiencia de ácido pirúvico, pero causa una disminución notable en la poza de prolina. Esto puede sugerir que la prolina ha sido oxidada para proporcionar energía en sustitución del piruvato y de esta manera ayudar al mantenimiento del nivel normal de alanina.

Por otro lado, en presencia de fluoroacetato que produce una inhibición de la deshidrogenasa isocítrica, provoca igualmente una disminución considerable en los niveles de prolina en la cuerda nerviosa de cucaracha, mientras que la concentración de aspártico, glutámico, glutamina y AGAB permanece prácticamente constante.

El mantenimiento de los niveles de los aminoácidos dicarboxílicos en el tejido nervioso es particularmente importante en estos animales, ya que se ha demostrado en el nervio periférico de Carcinus (17) que los electrolitos que participan más activamente en el balance osmótico son los cationes inorgánicos monovalentes, pero el grupo que les sigue muy de cerca en importancia es el -- constituido por los aminoácidos glutámico y aspártico.

Por otra parte existe evidencia experimental de que hay una regulación en la concentración y velocidad de recambio de los aminoácidos intracelulares -- en la cuerda nerviosa de Homarus, en respuesta a los cambios en la composición catiónica de los tejidos producida por estimulación eléctrica o por tratamiento con sulfato de veratrina (7).

Los estudios de Bursell (2) sobre los cambios en los aminoácidos efectuados durante el vuelo en la mosca tse - tse, sugieren que algunos de estos compuestos, tales como el glutámico y la alanina, y de manera muy importante la -- prolina, pueden ser utilizados como sustratos oxidables durante el vuelo en estos animales.

La incorporación de radioactividad en la prolina después de la inyección de ácido glutámico marcado, muy posterior en el tejido nervioso que en los otros tejidos estudiados, parece indicar que existe una diferencia importante -- en la velocidad de difusión de este aminoácido. Aunque en los mamíferos se ha demostrado la existencia de una barrera hematoencefálica (14) (8), se conoce --

muy poco acerca de este efecto en animales situados en otro nivel en la escala zoológica. De hecho, existe un solo trabajo efectuado por Lajtha y Mela (15) en el cerebro de la carpa (Cyprinus carpio) pero no se han llevado a cabo estudios en este sentido en los invertebrados.

El hecho de que las características del sistema de barrera hematoencefálica en el cerebro de la carpa sean más parecidas a las del ratón recién nacido que a las del adulto, sugiere que este fenómeno puede estar relacionado en alguna forma con la evolución del sistema nervioso.

Es posible igualmente, que existan algunas diferencias en cuanto a la disponibilidad de las pozas de ácido glutámico hacia una u otra reacción en los tejidos y que esta compartimentalización pueda explicar las diferencias en la aparición de prolina marcada en los experimentos "in vivo".

Por otra parte, la aparición de radioactividad en el ácido glutámico después de la inyección de prolina marcada es más rápida en el tejido nervioso que en los otros tejidos estudiados. Esto está de acuerdo con lo que se observó "in vitro" en relación con la velocidad de las reacciones de interconversión glutámico - prolina.

Finalmente, las observaciones acerca de la incorporación de radioactividad a proteínas "in vitro" e "in vivo" procedente de prolina $U-C^{14}$, mucho más rápida en el ganglio nervioso que en los otros tejidos, es igualmente un reflejo de la distinta velocidad de transformación de la prolina en ácido glutámico -y por esta vía a otros aminoácidos que son incorporados a proteínas- en el tejido nervioso.

R E S U M E N .

Con el fin de conocer la velocidad relativa de los caminos de síntesis y degradación de la prolina, se estudió la incorporación de radioactividad del ácido glutámico 3,4-C¹⁴ a la poza metabólica de este aminoácido y la velocidad de incorporación de prolina U-C¹⁴ a los aminoácidos libres y a las proteínas del tejido nervioso, hepatopáncreas y músculo del cangrejo Ge-
carcinus lateralis.

En los experimentos "in vitro" se observó que la velocidad de incorporación de radioactividad del ácido glutámico a prolina fue del mismo orden en los tres tejidos estudiados.

La velocidad de incorporación de la prolina radioactiva a la poza del ácido glutámico fue mayor que la reacción inversa en los tejidos examinados, pero esta diferencia fue particularmente notable en el caso del ganglio nervioso, en donde llegó a ser hasta cuarenta veces mayor.

Los experimentos "in vivo" sugieren la existencia de un patrón de distribución diferente del ácido glutámico en los distintos órganos del cangrejo, ya que la penetración al hepatopáncreas es más rápida que la difusión al músculo y al ganglio nervioso.

La velocidad de incorporación de radioactividad de prolina U-C¹⁴ "in vivo" mostró características similares a las observadas "in vitro".

La incorporación de radioactividad procedente de prolina a las proteínas de los tres tejidos estudiados fue mayor en el ganglio nervioso, probablemente como una consecuencia de la conversión más rápida de la prolina en ácido glutámico que se observa en este tejido.

REFERENCIAS

- 1.- Awapara, J. (1962) En: Amino Acid Pools; Ed. E. Holden; Elsevier Publ. Co., Amsterdam; p.158.
- 2.- Bursell, E. (1966) Comp. Biochem. Physiol.; 19; 809;
- 3.- Camien, M. N., Sorlet, H., G. Duchateau and M. Florkin; (1951); J. Biol. Chem.; 193; 881.
- 4.- Duchateau, G., M. Florkin and Ch. Jeuniaux; (1952) Arch. int. physiol. et biochem.; 60; 124.
- 5.- Elliot, K. H. and E. Florey (1956) J. Neurochem; 1; 181.
- 6.- Frontali, N. (1964) En: Comparative Neurochemistry; Ed. Richter; Pergamon Press, Oxford; p. 185.
- 7.- Gilles, R. and E. Schoffeniels (1964) Biochim. Biophys. Acta; 82; 525.
- 8.- Guroof, G. and Udenfriend, S. (1962) J. Biol. Chem.; 237; 803.
- 9.- Hayashi, T. (1960) En: Inhibition in the Nervous System and Gamma-aminobutyric Acid; Ed. E. Roberts; Pergamon Press; Oxford; p. 515.
- 10.- Hichar, J. K. (1960) Nature, London; 188; 1117.
- 11.- Kerkut, G. H. & G. A. Cottrell (1962) Comp. Biochem. Physiol; 5; 227.
- 12.- Kravitz, E. A., Potter, D. D. and Gelder, U. M. (1962) Nature, London; 194; 382.
- 13.- Kravitz, E. A., S. W. Kuffler, D.D. Potter and U. M. Gelder Van (1963) J. Neurophysiol.; 26; 729.
- 14.- Lajtha, A. and Toth, J. (1961) J. Neurochem; 8; 216.
- 15.- Lajtha, A, S. Lahiri and J. Yoth (1963) J. Neurochem; 10; 765.
- 16.- Lange, R. (1963) Comp. Biochem Physiol; 10; 173.
- 17.- Lewis, P. R. (1952) Biochem J. 52; 330.
- 18.- Lowry A. (1953) J. Biol. Chem; 193; 265.
- 19.- Lynch, M. P. and L. Wood (1966) Comp. Biochem Physiol; 19; 783.
- 20.- Naftalin, L. (1948); Nature; 161; 763.
- 21.- Pasantes, H., R. Tapia I. y G. H. Massieu (1962) Ann. Inst. Biol. Univ. Mex; 33; 25.
- 22.- Pasantes H., R. I. Tapia, B.G. Ortega and G. H. Massieu (1965); Comp. Biochem. Physiol.; 16; 523.

- 23.- Furpura, D. M. , M. Girado and H. Grundfest (1957) Science; 125; 1200.
- 24.- Ray, J. W. (1965) In: The Physiology of the Insect Central Nervous System; Eds. J. F. Treherne and J. W. L. Beament; Academic Press, London and New York.
- 25.- Roberts, E. (1950) J. Biol. Chem; 187; 55.
- 26.- Roberts, E. (1960) In: Inhibition in the Nervous System and Gamma-Aminobutyric Acid; Ed. E. Roberts; Pergamon Press, Oxford; p.144.
- 27.- Roberts, E. and D. G. Simonsen (1962) In: Amino Acid Pools; Ed. J. T. Holden; Elsevier Publ. Co. Amsterdam; p. 224.
- 28.- Roberts, E. (1964) In: Comparative Neurochemistry; Ed. D. Richter; Pergamon Press; Oxford; p. 167.
- 29.- Stetten, M. R. and R. Schoenheimer. (1944) J. Biol. Chem.; 153; 113.
- 30.- Strecker, H. J. (1960) J. Biol. Chem; 235; 3218.
- 31.- Takeuchi, A. and Takeuchi V. (1965) J. Physiol.; 177; 225.
- 32.- Tallan, H. H., S. Moore and W. H. Stein (1956) J. Biol. Chem.; 211; 927.
- 33.- Velankar N. K. and T. K. Gouindan (1957) Current Sci. (India); 26; 285.
- 34.- Velankar N. K. and T. K. Gouindan (1958) Proc. Indian Acad. Sci. B.; 47; 20.
- 35.- Vereshchagin, S. M., I. A. Sytinsky and N. P. Tyschenko (1960); J. Insect. Physiol.; 6; 21.
- 36.- Vogel H. J. and B. D. Davis (1952) J. Am. Chem. Soc.; 74; 109.
- 37.- Vogel, H. J. and D. M. Bonner (1954) Proc. Natl. and Sci. U. S. A. 40; 688.