

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Madrid

Metabolismo de aminoácidos en tejidos vegetales desarrollados "in vitro" sobre distintos medios-agar de cultivo

por

M.^a Cascales, P. González, F. Mayor y A. Santos-Ruiz

(Recibido para publicar el 25 de mayo de 1963)

En sus estudios sobre el metabolismo de la arginina en tejidos normales y tumorales de *Helianthus tuberosus* (H.T.) cultivados *in vitro*, MOREL y DURANTON (3, 9) obtuvieron dos resultados sobresalientes: la rápida desaparición de la arginina, con incremento simultáneo de prolina e hidroxiprolina, que tiene lugar en tejidos normales, y la aparición de cantidades muy notables de 4-guanidobutirato en los tejidos tumorales correspondientes. Por otra parte, SCOTT, BURRIS y RIKER habían encontrado que el 2-oxoglutarato se acumulaba de forma totalmente imprevista en los tejidos de *crown gall* de *Helianthus annuus*, *Targetes erecta* y *Lycopersicum sculentum* (13). La posible relación existente entre estos hallazgos y el metabolismo del 4-aminobutirato (4-AB) que desde hace tiempo ocupa nuestra atención (12) sugería la conveniencia de realizar el estudio de la evolución monoapéptídica en tejidos de H.T. desarrollados en medios en los que el 4-AB constituyera la única fuente nitrogenada, utilizando como controles los fragmentos crecidos en el medio normal de nitratos y en otros medios monoapéptídicos.

En esta comunicación damos cuenta de los datos hallados, mediante cromatografía sobre papel, empleando tejidos normales de H.T. cultivados sobre distintos medios-agar, que ponen de manifiesto la perfecta utilización del 4-AB como única fuente

nitrogenada e indican los aminoácidos con los que su metabolismo se halla principalmente relacionado. Estos resultados unidos a los hallados simultáneamente con 4-AB 1-C¹⁴ (6), en la valoración cuantitativa de aminoácidos básicos en fragmentos crecidos en medio líquido y en el estudio de la actividad descarboxilante del glutamato en relación a la neoformación tisular (1), así como en los trabajos en curso sobre actividad aminotransferásica con el 2-oxoglutarato, aconsejan proseguir en esta línea de trabajo.

Material y métodos

CULTIVOS VEGETALES «IN VITRO». Los fragmentos del tubérculo de H. T., recolectado durante el período de reposo invernal, se siembran en los tubos de cultivo (16 × 2,4 cm.) sobre el medio habitual de nitratos y los medios especiales monoapéptidos. Las instalaciones, instrumental y técnicas utilizadas (5) han sido descritos con detalle por CASCALES (2). Iluminación: 8-10 horas al día. Temperatura 23-25° C. La composición de los medios de cultivo ha sido referida en una publicación anterior (1). Las muestras se toman el mismo día de la siembra, y a intervalos de 4-6 días hasta el momento de la resiembra (55-60 días). Las primeras mitosis tienen lugar alrededor del 6.º día (5) y la mayor actividad metabólica se alcanza a los 17-20 días, manteniéndose en equilibrio y decreciendo luego hasta el momento de la resiembra.

Se han realizado dos series consecutivas, de 96 tubos cada una, divididos en los cuatro medios ensayados: nitratos, arginina, arginina más 4-AB, glutamato y 4-AB. Recién recogidas, las muestras se lavan con agua destilada, se secan entre papeles de filtro y se pesan.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS. La fijación se ha realizado por ebullición en etanol absoluto (10 ml por gramo) durante cinco minutos (3). Los tejidos fijados se trituran en un mortero esmerilado en presencia del etanol que sirvió para su fijación, adicionado de 5 ml de agua. Acto seguido, se disgregan en un aparato tipo Potter-Elvehjem hasta la obtención de extractos homogéneos, y el líquido se separa por filtración en büchner. La operación se repite con alcohol de 70° y dos veces con agua destilada. Se reúnen los cuatro filtrados y se concentran hasta 1/4 de su volumen (75 ml aproximadamente) por destilación al vacío. Se añade ácido acético para que la solución quede a una concentración final de 1p/100.

SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN MONOPEPTÍDICA. El extracto anterior se pasa por columna de resina de poliestireno sulfonada (Lewatit S-100) de 20 × 1 cm en fase ácida. Se gradúa la ve-

locidad de salida a 20 gotas por minuto. Después de pasar el extracto, se lava abundantemente con agua destilada. El control de retención se realiza mediante la reacción de la ninhidrina. La elución se lleva a cabo con NH_3 1M, recogién dose, aproximadamente, 600 ml de eluato, que se concentran al vacío hasta sequedad, redisolviéndose en 2 ml de solución de ácido acético al 1 %. Las columnas se recuperan con ClH 2M, previo abundante lavado con agua destilada.

CROMATOGRAFÍA MONO Y BIDIMENSIONAL. En los dos casos se ha realizado cromatografía descendente sobre papel Whatmann n.º 1. En las monodimensionales se ha empleado el sistema butanol-ácido acético-agua (4: 1: 5). En las bidimensionales se empleó este disolvente en la primera dirección y en la segunda *m*-cresol-fenol-tampón borato pH 8,3 (4: 2: 1), previo tamponado del papel por pulverización con tampón borato pH 8,3 (7), hasta impregnación homogénea. Los cromatogramas se revelan con ninhidrina-ácido acético-colidina, según LEVY-CHUNG (7). Para la identificación de la arginina y derivados guanídicos se ha empleado el reactivo de Sakaguchi modificado (8-hidroxiquinoleína al 0,1 % en acetona + hipobromito sódico), y para la tinción de la prolina e hidroxiprolina, una solución de isatina al 0,2 % en acetona.

Los aminoácidos se identificaron frente a los patrones oportunos, y los resultados obtenidos se compararon con los hallados a tiempo cero y con las muestras correspondientes de los tejidos desarrollados en los restantes medios de cultivo.

Resultados

COMPOSICIÓN MONOPEPTÍDICA DEL TUBÉRCULO DE «HELIANTHUS TUBEROSUS». De acuerdo con los datos de MOREL y DURANTON (9), el contenido en arginina durante el período de reposo invernal es extraordinario. Por su calidad de aminoácido guanídico, la arginina representa una forma de reserva nitrogenada de gran eficacia. Su rápida utilización en el momento de la germinación o como consecuencia de la siembra *in vitro* (figura 1), demuestra la inmediata actuación de los sistemas encargados de su transformación. Por la misma razón — riqueza nitrogenada por unidad monopectídica — la glutamina y la asparagina se hallan en cantidad elevada. El ácido glutámico se encuentra también en considerable proporción.

El 4-AB existe en cantidad muy apreciable, que sugiere su participación en las etapas iniciales del desarrollo. En cambio, la alanina, que tan altos niveles alcanza en las épocas de crecimiento y proliferación, se halla en pequeña proporción en el

tubérculo en reposo. La prolina e hidroxiprolina están presentes en cantidades muy escasas en las muestras de tubérculo correspondientes a las fases inicial e intermedia del letargo, pero aparecen claramente en las que anteceden al tiempo normal de germinación. También en otros aminoácidos se aprecian claras fluctuaciones, de acuerdo con la época de recolección.

Como la alanina, la prolina e hidroxiprolina parecen ser consecuencia del metabolismo activo de la neoformación, y no elemento de engranaje en los sistemas de su puesta en marcha.

La leucina, lisina, fenilalanina, etc., se encuentran, asimismo, en cantidades apreciables.

EVOLUCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS LIBRES EN LOS TEJIDOS DE «H. TUBEROSUS» CRECIDOS EN EL MEDIO NORMAL DE NITRATOS Y EN LOS MEDIOS ESPECIALES MONOPEPTÍDICOS. Tanto en el medio habitual de nitratos como en los especiales ensayados, la arginina, aminoácido mayoritario en el momento de la siembra, se degrada rápidamente en los primeros días de cultivo. Antes de que tengan lugar las mitosis que inician el período proliferativo,

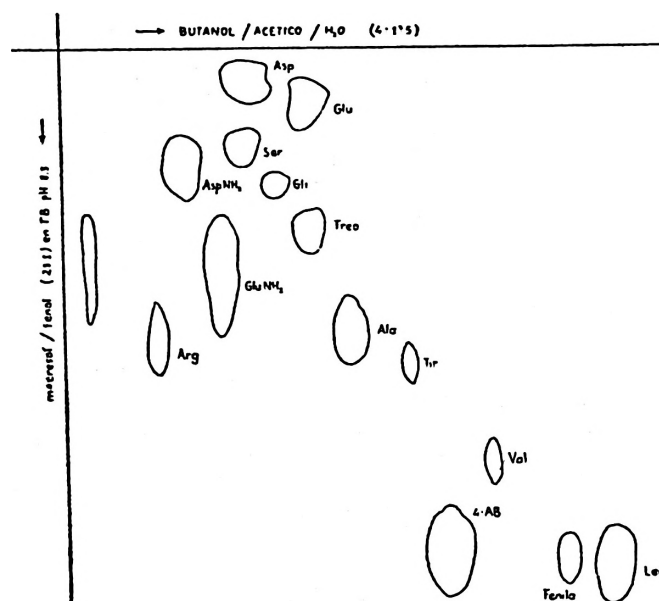


FIG. 1. (Ver fig. 3)

la arginina decrece bruscamente manteniéndose en concentraciones relativamente bajas durante la fase de mayor actividad celular. Cuando se añade como fuente nitrogenada, las muestras correspondientes a los siete y catorce días de cultivo exhiben,

especialmente, una concentración mayor que la hallada en muestras análogas de los otros medios. También son mayores sus niveles finales.

Los ácidos glutámico y aspártico se mantienen en todas las muestras en niveles altos, debiendo destacarse los de los tejidos desarrollados en medio glutamato a los 4 días de cultivo. En los tejidos crecidos en medios con 4-AB, la concentración de ambos monopéptidos se halla aumentada. La asparagina se encuentra en proporción elevada en todos los ensayos efectuados.

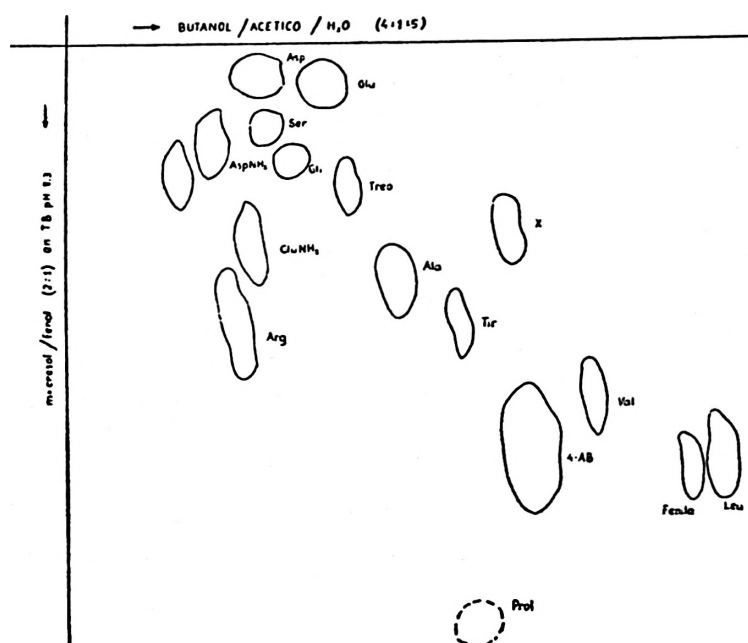


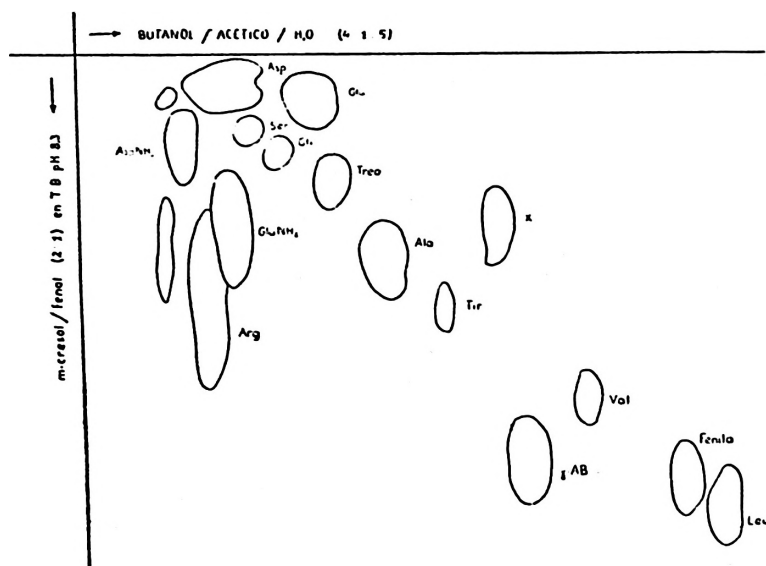
FIG. 2. (Ver fig. 3)

La glutamina, en cambio, disminuye habitualmente — a veces después de una pasajera elevación inicial, que es considerable en el caso de la arginina como única fuente nitrogenada — en las etapas de neoformación tisular, alcanzando en la zona de equilibrio valores superiores a los iniciales. Es muy notable el incremento observado en las muestras finales de los tejidos crecidos en medio de 4-AB.

En general, el 4-AB aumenta discretamente su proporción de acuerdo con la mayor actividad metabólica, regresando posteriormente a los niveles iniciales. Cuando se utiliza como única fuente nitrogenada y, en menor grado, en mezcla con la argi-

nina, se acumula en las primeras etapas (figuras 1 y 2). Posteriormente se metaboliza totalmente (figura 3). En el caso de constituir el único aporte nitrogenado, el regreso a las concentraciones normales coincide con el incremento de arginina y glutamina y, en menor proporción, del ácido aspártico y su amida. En los fragmentos crecidos en medio glutamato, la concentración de 4-AB se halla ligeramente aumentada en relación a los medios de nitratos y arginina.

La alanina, que se halla al principio en escasa proporción,

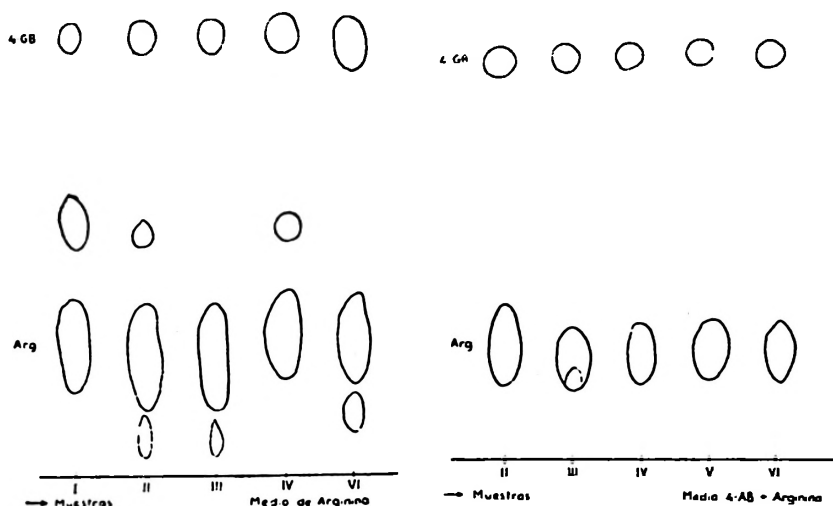


FIGURAS 1, 2 y 3. Cromatogramas correspondientes a las muestras recogidas a los 4, 7 y 40 días de cultivo de los tejidos de *Helianthus* en medio de 4-aminobutirato, donde se aprecia el incremento inicial de su concentración, que se reduce ulteriormente a los niveles normales. A los 60 días el acúmulo de arginina es todavía más notable que el que se observa en la figura 3. La rápida desaparición de la arginina se refleja en la muestra del día 4.º.

aumenta intensamente durante el período de vida celular más activa. Su rápido incremento inicial es especialmente notable en las muestras del medio de glutamato. Con la arginina y los aminoácidos dicarboxílicos y sus amidas, la alanina representa, sin duda, un papel de importancia en el metabolismo mono-peptídico de los tejidos de *H. tuberosus* cultivados *in vitro*.

La glicocola, serina y treonina son metabolitos constantes,

pero de fluctuación escasa, en todas las pruebas realizadas. La leucina, valina, fenilalanina y tirosina — esta última en menor grado — con componentes habituales de los tejidos ensayados.



FIGURAS 4 y 5. Cromatogramas monodimensionales de los tejidos desarrollados en medios de arginina (4, 8, 12, 21 y 35 días de cultivo) y arginina + 4-aminobutirato (4, 14, 21, 28 y 35 días) revelados mediante la técnica de Sakaguchi. En ambos casos se aprecia la presencia de 4-guanidobutirato.

Coincidiendo con el detallado estudio de DURANTON sobre este particular (3), la prolina e hidroxiprolina muestran valores considerables, especialmente en las muestras correspondientes a los 4 y 7 días de los tejidos cultivados en medio de arginina. También en el medio de glutamato sus niveles son apreciablemente mayores que los habituales.

Un compuesto no identificado — compuesto X — se manifiesta claramente, a partir de la tercera muestra, en los cromatogramas de tejidos desarrollados en medios especiales. Su concentración es especialmente significativa en los procedentes de medios con 4-AB (figuras 2 y 3).

En los fragmentos cultivados en medios suplementados con arginina, así como en algunas muestras del tubérculo y del medio nitrato hemos identificado la presencia de 4-guanidobutirato (figura 4), aminoácido que parece hallarse en relación estrecha con la arginina, pero no con el 4-AB, como sugería la posibilidad de una reacción de transamidinación (11), ya que su concentración, progresivamente mayor en los tejidos desarrollados en medio arginina, no se afecta sensiblemente en los fragmentos

procedentes del medio de arginina más 4-AB, tal como puede apreciarse en la figura 5.

En el tejido tumoral de *Helianthus*, que hemos analizado como introducción a su estudio más detallado, destaca, en relación al sistema que nos interesa, la alta concentración de ácido glutámico, como se ve en la figura 7. El 4-AB se halla presente, asimismo, en notable proporción.

Discusión

Los resultados hallados parecen estar totalmente de acuerdo con el principal metabolismo de los aminoácidos directamente relacionados con el ciclo de Krebs. En efecto, los aminoácidos dicarboxílicos y sus amidas constituyen, junto con la alanina, los mon péptidos de metabolismo más activo. El ocaso proliferativo va acompañado de una disminución apreciable en las transformaciones, restableciéndose una situación de reserva, que recuerda a la que posee el tubérculo en el momento de la siembra.

En el caso de la suplementación de 4-AB como única fuente nitrogenada y, con intensidad mucho menor, en el de su adición junto con la arginina, se observa la «sorpresa metabólica» de los sistemas encargados de su normal transformación, que se refleja en el acúmulo inicial de este compuesto. Sin embargo, estos sistemas son capaces de proceder a su total asimilación, hasta el punto de que en la época de equilibrio desciende a los niveles normales. Da la impresión de tratarse de una sustancia de aporte regular, dosificado por la enzima que la produce a partir del glutamato. En los tejidos cultivados en medio líquido el acúmulo es sensiblemente inferior.

Los resultados hallados en nuestro laboratorio con 4-AB 1-C¹⁴ (6) confirman los datos cromatográficos, y la estrecha relación entre el 4-AB y el ciclo cítrico. Los trabajos de STEWARD y colaboradores (14, 15), que han aportado gran número de datos de interés para el conocimiento del metabolismo monoapéptido

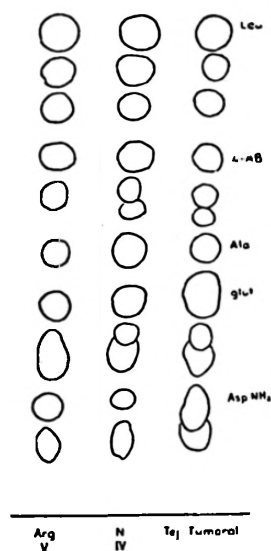


FIG. 6. Cromatograma del tejido tumoral de *Helianthus*, donde se observa la alta concentración de glutamato en relación a las muestras de tejido normal crecido en medio de nitratos y de arginina.

en tejidos vegetales cultivados *in vitro*, coinciden en la relación existente entre el 4-AB y el glutámico y glutamina.

El 4-guanidobutirato se halla en menor proporción en los tejidos crecidos en medio de 4-AB + arginina que en los de arginina como única fuente nitrogenada. Por tanto, el metabolismo del 4-AB no parece hallarse directamente relacionado con el de la arginina en los tejidos normales de *Helianthus*. Sin embargo, por la extraordinaria concentración de 4-guanidobutirato en tejido tumoral (9) y la posibilidad de su formación por transaminación, en un ciclo que excluyera la actuación de la arginasa, debe investigarse la posibilidad de que las circunstancias anormales que concurren en los tejidos de *crown gall* estrechen las conexiones metabólicas entre estos monopéptidos, de relación únicamente indirecta, al parecer, en condiciones normales.

La alta riqueza en glutamato de los tejidos tumorales de H. T. coincide con la hallada por EBERTS y colaboradores (4) en tejidos de *crown gall* de girasol. La presencia del 4-AB en cantidades considerables, destacada ya por LIORET (8), y el hallazgo de una notable actividad descarboxilante del glutamato en estos tejidos (1), están de acuerdo con su perfecto crecimiento sobre medio de 4-AB (10), aconsejando la investigación comparativa en los mismos.

Summary

Free amino acid evolution in plant tissues grown *in vitro* on different agar-culture media

We have studied the amino acid evolution in the normal tissues of *Helianthus tuberosus* tuber grown *in vitro* on agar-media with nitrates, arginine, 4-aminobutyrate (4-AB), arginine + 4-AB or glutamate as nitrogen sources.

The free amino acid composition of tissues grown in 4-AB has been specially considered. When this amino acid is the only available and, in a lesser extent, when it is added together with arginine, a remarkable increase of its amount is found in the first samples (figures 1 and 2), but it is further completely metabolized (figure 3). This results are in agreement with those obtained in the study of 4-AB 1-C¹⁴ metabolism of *H. tuberosus* tissues grown in liquid medium.

Simultaneously with 4-AB regression to normal levels, the amounts of arginine, glutamine and aspartic acid are particularly increased.

Alanine is present in small amounts in the tuber and in the first sample (four days) of the tissues grown in the different culture media. However, during the highest rate metabolism

period rapidly reaches a prominent place among the free amino acids largely found. Its increase is noteworthy in the tissues grown in glutamate. Together with arginine —tuber nitrogen reserve in the rest season— and the dicarboxylic amino acids and its amides, alanine evidently plays an important role in the metabolic processes of *H. tuberosus* tissular neoformation.

According to the results of MOREL and DURANTON (9), proline and hydroxyproline appears to be closely related to the metabolism of arginine.

In the tissues grown in arginine, appreciable quantities of 4-guanidobutyrate had been found (figures 4 and 5). This amino acid is also present in some samples of tuber and tissues grown *in vitro* in the others assayed media.

The obtained results show that 4-AB can serve perfectly as the only nitrogen supply and represent an additional evidence of its direct connection with the Krebs cycle.

Bibliografía

- (1) BERNAL, A. y col.: *Rev. esp. Fisiol.* (en prensa).
- (2) CASCALES, M.: *Tesis' Doctoral. Facultad de Farmacia*. Madrid. 1961.
- (3) DURANTON, H.: *Thèse Faculté des Sciences*, serie A, n.º 3255, París, 1959.
- (4) EBERTS, F. S. y col.: *Plant Physiol.*, **29**, 1, 1954.
- (5) GAUTHERET, R. J.: «*La culture des tissus vegetaux*». Masson et Cie. París, 1959.
- (6) GONZÁLEZ, P. y col.: *An. Real Acad. Farm.* (en prensa)
- (7) LEVY, H. R. y CHUNG, S.: *Anal. Chem.*, **28**, 3, 1953.
- (8) LIORET, C.: *Thèse Faculté des Sciences*, serie A, n.º 3542, París, 1960.
- (9) MOREL, G. y DURANTON, H.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 2155, 1959.
- (10) NITSCH, J. P. y NITSCH, C.: *Am. J. Botany*, **44**, 555, 1957.
- (11) PISANO, J. J. y col.: *Nature*, **180**, 1125, 1957.
- (12) SANTOS-RUIZ, A. y MAYOR, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **16**, 65, 1960.
- (13) SCOTT, R. W. y col.: *Plant. Physiol.*, **30**, 355, 1955.
- (14) STEWARD, F. C. y col.: *Nature*, **178**, 734 y 789, 1956.
- (15) STEWARD, F. C. y col.: *J. Exper. Botany*, **9**, 11, 1958.