

NIVELES DE AMINOACIDOS LIBRES EN CEREBROS DE RATAS NORMALES Y DE RATAS DURANTE HIPERGLUCEMIA ADRENALINICA

Por
GUILLERMO MASSIEU H.
del Instituto de Biología.

Se ha comprobado que en el tejido cerebral de diversos animales existen cantidades elevadas de aminoácidos libres, especialmente los ácidos glutámico, aspártico, γ -aminobutírico y glutamina (4, 8, 15, 22, 23, 24, 29, 30), en cuyo metabolismo intervienen de una manera predominante. El ácido glutámico puede aminarse, transaminarse, desaminarse o descarboxilarse en el cerebro (18, 25, 29, 30). Ultimamente se ha puesto especial énfasis en las relaciones metabólicas entre el ácido glutámico y su producto de descarboxilación, el ácido γ -aminobutírico, con el ciclo de Krebs (25).

Es evidente que el mantenimiento de los niveles normales de los aminoácidos libres del cerebro está sujeto a mecanismos complejos, en donde juegan un papel importante varios sistemas enzimáticos. Se ha demostrado que diversas condiciones pueden afectar los mencionados niveles, lo cual indica que dichas sustancias toman parte en un intenso intercambio metabólico. Así, Haber y Saidel (12) encontraron que el ácido glutámico disminuye durante las convulsiones inducidas por estricnina. Durante el coma insulínico se ha observado disminución en los niveles de ácido glutámico (8), γ -aminobutírico y glutamina, en contraste con aumento de ácido aspártico (4). Flock y colaboradores (9) encontraron incrementos hasta de seis veces en el contenido de glutamina libre del cerebro, en perros sometidos a hepatectomía total. Finalmente, Nurnberger y Gordon (21) observaron que en ratas expuestas brevemente a baja temperatura, se induce la movilización de compuestos nitrogenados de neuronas del núcleo supraóptico y en general del tejido cerebral.

Concluyen estos autores que en el cerebro existe una lábil "poza metabólica" de nitrógeno (proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos y aminoácidos) que parece estar estrechamente relacionada con el metabolismo de los carbohidratos y que además se moviliza rápidamente por influencia de ese tipo de stress y es "activada" por el sistema hipotálamo-hipófisis-adrenocortical.

No se encontraron datos en la bibliografía referentes al efecto de la adrenalina sobre la concentración de los aminoácidos libres del cerebro. Se sabe que esta hormona tiene acción depresora sobre la aminoacidemia (5, 6, 7, 16) y es posible que su influencia se extienda a otros tejidos. Este efecto de la adrenalina no parece ser mediado por la hipófisis, según trabajos del grupo de Luck (11, 17). Villano y Tretti (28) y Henneman y colaboradores (13) han demostrado, por otro lado, que la adrenalina incrementa los niveles de los ácidos del ciclo de Krebs en la sangre. No obstante, no se tienen datos sobre acciones similares de la hormona en otros tejidos.

Las observaciones anteriores, la existencia de relaciones metabólicas estrechas entre los aminoácidos y carbohidratos a través del ciclo de Krebs (25) y la influencia de la adrenalina sobre el metabolismo de estos últimos, justifican el interés de estudiar su posible intervención en la regulación de los aminoácidos libres del cerebro.

En este trabajo se informa de los resultados obtenidos al comparar los niveles de los ácidos glutámico, aspártico, γ -aminobutírico y de glutamina libres, entre cerebros de ratas normales y de ratas sometidas a diferentes dosis de adrenalina. Se espera que los datos obtenidos contribuyan al conocimiento del metabolismo de estas sustancias en el tejido cerebral.

PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron 33 ratas machos de raza Wistar,* escogidos de peso entre 150 g. y 200 g. y alimentados *ad libitum* previamente con dieta especial "Purina". Los animales se dividieron en los tres grupos siguientes: 1) "Intactos" o sea aquellos que se sacrificaron (por dislocación vertebral a nivel cervical) sin ningún tratamiento previo y se analizaron los aminoácidos libres del cerebro; 2) "Testigos", animales que se anestesiaron ligeramente con éter etílico con objeto de facilitar la obtención de una muestra inicial de sangre, por medio de corte en la cola y se inyectaron por vía subcutánea con 0.1-0.2 ml de solución fisiológica de NaCl ajustada a

* Adquiridos en los Laboratorios Biocontrol, S. A., México, D. F.

pH 3; estos animales se sacrificaron en la misma forma que los anteriores, a las 1¾-2 horas, obteniéndose en ese momento una segunda muestra de sangre; 3) Animales inyectados con adrenalina, de los cuales se obtuvo asimismo una muestra inicial de sangre, como se ha descrito en el caso anterior y posteriormente se inyectaron por vía subcutánea con diversas dosis de la hormona (0.25, 0.40 y 1.0 mg/Kg.) formando así varios subgrupos; estos animales se sacrificaron asimismo entre las 1¾ y las 2 horas siguientes, momento en el que se obtuvo la segunda muestra de sangre. No se sometió a ayuno previo a ninguno de los animales utilizados.

La solución de adrenalina se preparó inmediatamente antes de cada experimento, por disolución de la cantidad adecuada de la base libre (Merck) en solución diluída de HCl, de manera que su pH fuese aproximadamente de 3. El volumen inyectado no fue en ningún caso mayor de 0.2 ml.

Una vez sacrificados los animales, se disecó el cerebro y se pesó y homogeneizó en alcohol etílico al 80% (en homogeneizador tipo Potter-Elvehjem). Se procuró invertir en la operación no más de 5 minutos, desde la disección del cerebro hasta su homogeneización. Para obtener el extracto acuoso, desproteinizado y conteniendo los aminoácidos libres, se aplicó el procedimiento de Awapara (1), que implica tratamiento de los extractos alcohólicos por medio del cloroformo, que al mismo tiempo elimina los lípidos.

Análisis de los ácidos glutámico, aspártico, γ -aminobutírico y de glutamina. La separación de los aminoácidos en muestras de extractos libres de proteínas se hizo por triplicado, utilizando cromatografía en papel filtro (Whatman N^o 1), por la técnica bidimensional descendente. Como solventes se utilizaron fenol al 80% y la mezcla butanol-ácido acético-agua (4:1:1), como en el caso de trabajos anteriores (4). Su cuantificación se llevó a cabo siguiendo la técnica de Naftalin (19), por elución e intensificación posterior del color desarrollado con ninhidrina. Las lecturas se hicieron en fotocolorímetro Evelyn a 600m μ . Con cada lote de muestras se introdujeron soluciones tipo de los aminoácidos las cuales se aplicaron a papel Whatman N^o 1 tratado previamente por el sistema fenol-butanol-ácido acético-agua y a continuación se siguió para ellos el procedimiento de Naftalin, con el objeto de obtener las curvas patrón correspondientes. En todos los casos se utilizaron micropipetas "Misco" de 10 λ para aplicar las muestras sobre el papel. Las curvas patrón se hicieron de 0 a 30 microgramos en los casos del ácido aspártico, del ácido γ -aminobutírico y de glutamina y de 0 a 45 en el

del ácido glutámico. Para conocer el error aproximado del procedimiento de Naftalin en nuestras manos, se llevaron a cabo pruebas de recuperación de cantidades conocidas de los aminoácidos estudiados, añadidas a los extractos de cerebro.

Análisis de la glucosa. Se llevó a cabo en submuestras de sangre oxalatada de 0.1 ml., por la modificación de Nelson (20) al método de Somogy.

Nitrógeno amínico de aminoácidos totales. Se estimó en los extractos de cerebro desproteinizados, por el procedimiento de Frame, Russell y Wilhelmi (10).

TABLA I

PORCIENTO DE RECUPERACION DE AMINOACIDOS AL AÑADIR CANTIDADES CONOCIDAS A EXTRACTOS DESPROTEINIZADOS DE CEREBRO

Aminoácido	Contenido por 0.1 ml mcg.	Añadido por 0.1 ml mcg.	Total teórico mcg.	Encontrado mcg.	Por ciento de recuperación
<i>Acido glutámico:</i>					
Muestra 9	35.40	40.0	75.40	71.80	94.7
„ 10	38.00	40.0	78.00	77.20	99.0
„ 12	46.40	53.0	99.40	98.00	98.5
„ 13	40.00	60.0	100.00	94.80	94.8
<i>Glutamina:</i>					
Muestra 9	13.20	10.0	23.20	21.05	91.0
„ 10	13.30	10.0	23.30	20.25	87.0
„ 11	17.70	10.0	27.70	24.90	90.0
„ 12	17.80	10.0	27.80	27.55	99.4
<i>Acido aspártico:</i>					
Muestra 9	5.75	10.0	15.75	14.75	93.7
„ 10	7.00	10.0	17.00	16.40	96.5
„ 12	9.00	10.0	19.00	18.17	96.5
„ 13	7.93	10.0	17.93	17.00	94.6
<i>Acido γ-aminobutírico</i>					
Muestra 9	3.90	5.0	8.90	9.00	101.0
„ 10	4.25	5.0	9.25	9.10	98.4
„ 12	5.60	5.0	10.60	11.17	104.5
„ 13	3.55	5.0	8.55	8.10	94.7

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de las pruebas de recuperación se consignan en la tabla I. En ella se puede observar que en los casos de los ácidos glutámico, aspártico y γ -aminobutírico, el error aproximado fluctuó entre 1.0 y 6.3%, tendiendo a ser 5.0%. En el caso de glutamina la variación fue entre 1.0 y 13.0%.

Los niveles de glucosa hemática y de aminoácidos libres en cerebro, en los diferentes grupos, se consignan en la tabla II. Se puede observar en primer término que en los animales tratados con adrenalina se indujeron hiperglucemias de 100% o más. Este hecho está de acuerdo con lo encontrado por Spirtos y colaboradores (27), en el sentido de que la hiperglucemia adrenalínica en la rata, es más notable cuando el animal no está en ayunas y ha estado alimentada *ad libitum* previamente; con dosis de 0.2 mg./Kg. inyectadas subcutáneamente, observaron un máximo entre los 90 y 120 minutos siguientes a la inyección. Como era de esperarse, en los testigos no se observó prácticamente ningún cambio en la glucemia.

En la misma tabla II se puede notar que no se encontró prácticamente ninguna diferencia entre los contenidos de nitrógeno amínico de aminoácidos totales de los cerebros de los diferentes grupos.

Se puede apreciar que la concentración de los cuatro aminoácidos libres analizados fue algo menor en los cerebros de los animales del grupo testigo que en los del grupo que se denominó "intactos", pero las diferencias son, estadísticamente, poco significantes. Al comparar los niveles de los ácidos glutámico, aspártico, γ -aminobutírico y de glutamina, entre los cerebros de los testigos y de los tratados con adrenalina, no se encuentran diferencias estadísticamente significantes. En el caso del ácido aspártico, en el subgrupo tratado con 0.25 mg./Kg. de adrenalina, se encontró una concentración de 23.3 ± 2.8 mg. % comparada con 30.1 ± 4.6 mg. % en el grupo testigo, pero esta diferencia es poco significativa y además los grupos tratados con dosis mayores presentaron niveles del aminoácido cercanos a los de este grupo.

Se piensa que las diferencias que se observaron entre los distintos grupos de ratas, en lo que a aminoácidos libres se refiere, se pueden más bien atribuir al error de las técnicas empleadas y a variaciones propias de los animales. Es decir, de acuerdo con las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, durante la hiperglucemia adrenalínica no parece que tengan lugar cambios en

TABLA II

NIVELES DE AMINOACIDOS LIBRES* EN LOS CEREBROS DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE RATAS, SE CONSIGNAN ADEMÁS LAS GLUCEMIAS CORRESPONDIENTES. A CONTINUACION DE CADA CIFRA SE ANOTA LA DESVIACION STANDARD

GRUPO	INTACTOS	TESTIGOS	INYECTADOS CON ADRENALINA, mg./kg.		
			0.25	0.40	1.0
Número de animales	7	8	5	5	8
Glucemia inicial, mg. por 100 ml.	---	105.2 ± 2.8	104.2 ± 5.0	103.7 ± 9.2	103.3 ± 6.4
Glucemia a las 2 horas siguientes, mg. por 100 ml.	---	100.0 ± 7.1	198.3 ± 7.0	243.2 ± 47.5	220.0 ± 23.6
Nitrógeno amínico de aminoácidos libres en el cerebro.	51.5 ± 4.5	52.8 ± 2.8	52.6 ± 3.0	---	53.2 ± 6.2
Acido glutámico	172.7 ± 12.4	152.6 ± 12.2	159.1 ± 17.6	175.1 ± 23.4	166.1 ± 9.6
Acido aspártico	34.4 ± 3.6	30.1 ± 4.6	23.3 ± 2.8	33.6 ± 5.5	30.6 ± 2.7
Acido γ-aminobutírico	21.6 ± 3.9	17.4 ± 2.2	16.1 ± 2.1	20.1 ± 4.1	16.7 ± 1.4
Glutamina	63.0 ± 5.2	57.5 ± 10.4	59.6 ± 10.9	56.4 ± 3.8	53.9 ± 4.7

* Las cifras de aminoácidos expresan el contenido en mg. por 100 g. de tejido fresco.

la concentración de los aminoácidos libres estudiados en el cerebro o si los hay son más bien pequeños. No se puede excluir la posibilidad, sin embargo, de que ocurran modificaciones en las diferentes zonas cerebrales. No se debe olvidar que Roberts y colaboradores (24) encontraron que los niveles de ácido γ -aminobutírico son más altos en la materia gris que en la blanca. Pueden tener lugar cambios en las concentraciones relativas de este aminoácido que no se reflejen en las cifras totales.

Toda vez que la barrera sangre-cerebro es permeable a la glucosa (14), con toda probabilidad a la hiperglucemia adrenalínica corresponde una elevación del nivel de glucosa en el tejido cerebral. Con base en los experimentos presentados aquí, se tiene que admitir que ese aumento no influye de una manera directa en las concentraciones de los aminoácidos que se estudiaron. De la misma manera, la disminución en la utilización periférica de la glucosa, por efecto de la adrenalina (2, 3, 26), no parece influenciar notablemente los niveles de tales sustancias en el cerebro, o bien, se puede pensar que los sistemas enzimáticos en donde toman parte como sustratos se ajustan en el sentido de mantener más o menos constantes dichos niveles.

En virtud de la importancia que tiene el ácido glutámico y sus productos de transformación en el metabolismo del tejido cerebral, nos proponemos llevar a cabo mayor número de experimentos sobre condiciones que puedan modificar sus niveles o la actividad de los sistemas enzimáticos en donde intervienen. Se espera tener datos en un futuro próximo en relación con este plan de trabajo.

RESUMEN

Se llevó a cabo el análisis de nitrógeno amínico de aminoácidos totales, de los ácidos glutámico, aspártico, γ -aminobutírico y de glutamina libres, en cerebros de ratas normales y de ratas sometidas a hiperglucemia adrenalínica, alimentadas *ad libitum* antes del experimento.

No se encontraron diferencias estadísticamente significantes en los niveles de los aminoácidos libres, al comparar los animales sin tratar, con los tratados con adrenalina.

SUMMARY

Brain extracts of non fasted rats subjected to adrenalin treatment showed, as compared with those from normal animals, no

statistically significant differences regarding the glutamic acid, aspartic acid, γ -amino butyric acid and glutamine levels.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AWAPARA, J., 1948. Application of paper chromatography to the estimation of free amino acids in tissues, *Arch. Biochem.*, 19: 172.
2. COHEN, J. A., 1949. Effect of adrenaline on the utilization of glucose, *Biochem. et Biophys. Acta*, 3: 231.
3. CORI, C. F., R. E. FISHER y G. T. CORI, 1935. The effect of adrenaline on arterial and venous plasma sugar and blood flow in dogs and cats, *Am. J. Physiol.*, 94: 53.
4. CRAVIOTO, R. O., G. MASSIEU y J. J. IZQUIERDO, 1951. Free amino acids in rat brain during insulin shock, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 78: 856.
5. CRISMON, C. A., R. V. HANVEY y J. M. LUCK, 1940. The effects of epinephrine, potassium, pentobarbital and insulin on the concentration of amino acid nitrogen in the blood of fasting dogs, *Am. J. Physiol.*, 130: 171.
6. DAVIS, B. L. JR. y VAN WINKLE JR., 1934. The effect of insulin and epinephrine on the amino acid content of the blood of adrenalectomized rabbits, *J. Biol. Chem.*, 104: 207.
7. DAVIS, B. L. JR. y J. M. LUCK, 1936. The effect of acetyl choline and other constituents of the adrenal gland upon blood sugar and amino acids, *Am. J. Physiol.*, 117: 542.
8. DAWSON, R. M. C., 1950. Glutamine and glutamic acid contents of the rat brain during insulin hypoglycemia, *Biochem. J.*, 47: 386.
9. FLOOK, E. V., M. A. BLOK, J. H. GRINDLAY, F. C. MANN y J. L. BOLLMAN, 1953. Changes in free amino acids of brain and muscle after total hepatectomy, *J. Biol. Chem.*, 200: 529.
10. FRAME, E. G., J. A. RUSSELL y A. E. WILHELMY, 1943. The colorimetric estimation of amino nitrogen in blood, *J. Biol. Chem.*, 149: 255.
11. GRIFFIN, A. C., J. M. LUCK, V. KULAKOFF y M. MILLS, 1954. Further observations on the endocrine regulation of blood amino acids, *J. Biol. Chem.*, 209: 387.
12. HABER, C. y L. SAIDEL, 1948. Glutamic acid in neural activity, *Federation Proc.*, 7: 47.
13. HENNEMAN, D. H., D. M. ALTSCHULE, R. M. GONCZ y P. DAVIS, 1955. Carbohydrate metabolism in brain disease. V. Effect of epinephrine on intermediary carbohydrate metabolism in schizophrenic and manic-depressive psychoses, *Arch. Internal Med.*, 95: 594.
14. KLEIN, J. R., R. HURWITZ y N. S. OLSEN, 1946. Distribution of intravenously injected fructose and glucose between blood and brain, *J. Biol. Chem.*, 164: 509.
15. KREBS, H. A., L. V. EGGLESTON y R. HEMS, 1949. Distribution of glutamine and glutamic acid in animal tissues, *Biochem. J.*, 44: 159.
16. LUCK, J. M. y S. W. MORSE, 1933. The effects of insulin and adrenalin on the amino acid content of blood, *Biochem. J.*, 27: 1648.
17. LUCK, J. M., A. C. GRIFFIN, G. BOER y M. WILSON, 1954. On the endocrine regulation of blood amino acid content, *J. Biol. Chem.*, 206: 767.
18. MC ILWAIN, H., 1955. Biochemistry and the central nervous system, pág. 105, J. and A. Churchill, Ltd., London.
19. NAFTALIN, L., 1948. Quantitative chromatographic estimation of α -amino acids, *Nature*, 171: 763.
20. NELSON, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, 153: 375.
21. NURNBERGER, J. I. y M. W. GORDON, 1956. Effect of brief stress on the ribonucleic acids and the labile nitrogen pool of brain and liver in the rat; En "Progress in Neurobiology: I, Neurochemistry", pag. 122, Editores: S. R. Korey y J. I. Nurnberger, Hoeber-Harper, New York.
22. ROBERTS, E. y S. FRANKEL, 1950. γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid, *J. Biol. Chem.*, 187: 55.

23. ROBERTS, E., S. FRANKEL y P. J. HARMAN, 1950. Amino acids of nervous tissue, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 74: 383.
24. ROBERTS, E., P. J. HARMAN y S. FRANKEL, 1951. γ -Aminobutyric acid content and glutamic acid decarboxylase activity in developing mouse brain, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 78: 799.
25. ROBERTS, E., M. ROTHESTEIN y C. F. BAXTER, 1958. Some metabolic studies of γ -aminobutyric acid, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 97: 796.
26. SOMOGY, M., 1950. Studies of arteriovenous differences in blood sugar. V. Effect of epinephrine on the rate of glucose assimilation, *J. Biol. Chem.*, 186: 513.
27. SPIRTOS, B. N., R. G. STUELKE y N. S. HALMI, 1957. Effects of epinephrine on carbohydrate metabolism in underfed and ad libitum fed rats, *Am. J. Physiol.*, 190: 239.
28. VILLANO, F. y C. TRITTO, 1951. Azione dell'adrenaline sul metabolismo di alcuni acidi del ciclo citrico nel soggetti normali, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 27: 55.
29. WAELSCH, H., 1951. Glutamic acid and cerebral function, *Advances in Protein Chemistry*, 6: 299, Academic Press Inc., New York.
30. WAELSCH, H., 1955. Metabolism of glutamic acid and glutaminc; En: *Neurochemistry*, pag. 173, Ch. Thomas, Pub., Springfield, Ill.