

EFFECTO DE LA HIPOGLUCEMIA INSULINICA SOBRE LOS NIVELES DE LOS ACIDOS PIRUVICO, α -CETOGLUTARICO Y OXALOACETICO EN EL CEREBRO DEL RATON

Por

GUILLERMO MASSIEU H.,
ROSA MARIA CERVANTES,

y

LUZ MARIA UGALDE,
del Instituto de Biología.

Es un hecho conocido que el funcionamiento normal del tejido cerebral depende más estrechamente del suplemento adecuado de glucosa, que el de otros tejidos. La falta de este carbohidrato altera profundamente su metabolismo y aun llega a producir lesiones, como Hicks (11) comprobó para el caso de la hipoglucemia insulínica. Las alteraciones metabólicas inducidas por este tipo de hipoglucemia en el cerebro se manifiestan en disminuciones notables de los niveles de glucógeno, lactato, piruvato, fosfatos, fosfocreatina y ATP, según lo demostraron Olsen y Klein en 1947 (17). En lo que se refiere a piruvato, este efecto de la insulina contrasta con el que produce en sangre, músculo e hígado, en cuyos casos provoca aumentos en los niveles de dicho ceto-ácido (1, 4).

Los autores no encontraron datos en la literatura científica acerca del efecto de la hipoglucemia insulínica sobre la concentración en el tejido cerebral, de los ácidos α -cetoglutarico y oxaloacético, de los cuales se sabe que están estrechamente relacionados metabólicamente con el ácido glutámico y sustancias que derivan de él, tales como el ácido γ -aminobutírico (GABA) (19). La concentración de estos aminoácidos disminuye notablemente en el cerebro como consecuencia del choque insulínico, según datos de Dawson (8, 9) y de Cravioto, Massieu e Izquierdo (7). El primero de estos autores, to-

mando como base los mencionados cambios en los niveles cerebrales de aminoácidos, considera que en la situación de emergencia que está implicada en la hipoglucemia insulínica, el ácido glutámico se utiliza como sustrato oxidable, transformándose previamente a ácido α -cetoglutámico, el cual alimenta al ciclo de Krebs (8, 9). Dicha transformación se efectúa al través de transaminaciones o desaminación oxidativa del aminoácido (2). A este respecto cabe señalar que tanto Cravioto y colaboradores (7), como Dawson (9), encontraron aumento de ácido aspártico libre en el cerebro durante el coma insulínico, lo que puede deberse a una activación de la transaminasa glutámico-oxaloacética en esas condiciones. Debe recordarse que ya desde 1941 Cohen y Hekhuis (6) señalaron la primacía de esta reacción en el órgano mencionado. Otro camino metabólico lo constituye la descarboxilación del ácido glutámico a GABA (19), el cual se transamina con ácido α -cetoglutámico, produciéndose semialdehído del ácido succínico que finalmente se transforma a ácido succínico y entra en esa forma al ciclo de Krebs (20). Las observaciones mencionadas indican que en el cerebro hay reacciones que producen ácido α -cetoglutámico y otras que lo consumen. Asimismo, el ácido oxaloacético interviene activamente en otras reacciones aparte de las que le conciernen como intermediario en el ciclo del ácido cítrico.

De los hechos anteriores se deduce la importancia que puede tener el investigar cómo se afectan las concentraciones cerebrales de los ácidos α -cetoglutámico y oxaloacético, además del pirúvico, durante la hipoglucemia insulínica, ya que los resultados que se obtengan pueden ser un indicador de qué reacciones, de aquellas que ligan su metabolismo con el de los aminoácidos citados, predominan en esta condición.

En la presente comunicación se informa del resultado de experimentos realizados en ratones, en los que se compararon los niveles cerebrales de los tres ceto-ácidos mencionados, entre animales sometidos a hipoglucemia insulínica y animales testigos. Para este objeto se utilizaron tanto técnicas colorimétricas como de separación cromatográfica en papel filtro, que permitieron el análisis de pequeñas cantidades los ceto-ácidos.

PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron 190 ratones entre 20 y 30 g. de peso, procedentes de las colonias de la Escuela Nacional de Medicina y del Instituto

de Biología (U.N.A.M.), que se mantuvieron con dieta uniforme ("Purina Laboratory Chow") antes de los experimentos.

Cada experimento requirió la utilización de un grupo de 10 a 12 ratones, los cuales se sometieron a un ayuno previo de 12 a 16 horas. El grupo se subdividió en dos subgrupos de 5 ó 6 ratones, según el caso. A los animales de uno de estos subgrupos se les inyectó por vía subcutánea de 0.10 a 0.15 ml., según el peso del animal, de una solución de insulina conteniendo 4 U.I./ml., preparada en el momento de utilizarse a partir de insulina comercial simple (Lilly) por dilución con solución de NaCl al 0.9%. A los animales del otro sub-grupo (testigos) se les inyectó entre 0.10 y 0.15 ml. de agua destilada.

Los ratones tratados con insulina se sacrificaron por decapitación al cabo de 1 a 2 horas generalmente, en cuanto mostraron signos claros de coma hipoglucémico y en esos momentos se obtuvo una muestra de sangre, que se recogió en un tubo conteniendo oxalato de potasio y que se utilizó para la determinación de glucosa por el método semi-microquímico de Nelson (16). Paralelamente y en la misma forma se sacrificaron los ratones testigos, cuantificándose también en ellos la glucemia. Las cabezas de los animales se congelaron inmediatamente después de la decapitación dejándolas caer en una mezcla de acetona con hielo seco (a una temperatura de -70°C aproximadamente) durante 2 minutos y posteriormente, una vez limpias de acetona, se disecó el cerebro. Los cerebros de los animales de cada subgrupo se reunieron y se mantuvieron congelados con hielo seco mientras se procedía a analizar su contenido en los cetoácidos estudiados.

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO PIRÚVICO. Este ceto-ácido se estimó por dos métodos, en dos diferentes series de experimentos. En un caso se empleó la técnica colorimétrica de Bonting (3), con las modificaciones siguientes: 1) la homogeneización del tejido se realizó con ácido metafosfórico al 5% y a 0°C (en homogeneizador Potter-Elvehjem, 2.5 ml. por cada 1.5 g. de tejido); 2) se emplearon alícuotas del homogeneizado anterior conteniendo de 300 a 500 mg. de tejido fresco por cada ml., a las cuales se añadió la solución de 2, 4-dinitrofenilhidrazina (al 0.2% en HCl 2N), en lugar de las cantidades submicroquímicas que utiliza el mencionado autor; los volúmenes de los reactivos que se utilizan en la técnica original se aumentaron proporcionalmente; 3) las diversas centrifugaciones que requiere el método se realizaron a 0°C y a 7,000 r.p.m. (7 a 10 minutos) cuan-

do se separó la solución conteniendo la 2, 4-dinitrofenilhidrazona (2, 4-DFH) del ácido pirúvico en xileno y a la misma temperatura, y a 20,000 r.p.m. (10 a 15 minutos), cuando se extrajo dicho derivado del xileno a la solución de Na_2CO_3 al 10%. Solamente cuando se centrifugó a dichas velocidades y temperatura fue posible separar las mezclas emulsionadas. Para el objeto se empleó centrifuga "Spinco" del tipo preparativo.

En otra serie de experimentos se cuantificó al ácido pirúvico aislándolo como 2, 4-DFH por medio de cromatografía en papel filtro, siguiendo el procedimiento de Cavallini, Frontali y Toschi (5), en extractos de cerebro obtenidos mediante homogeneización en ácido metafosfórico al 5% y a 0°C, de los cuales se eliminaron las proteínas por centrifugación a la misma temperatura y a 15,000 r.p.m., durante 10 minutos. La separación cromatográfica se realizó por la técnica ascendente y utilizando como solvente al butanol saturado con agua.

DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO α -CETOGLUTÁRICO. Se realizó simultáneamente a la del ácido pirúvico, como se indica en los párrafos anteriores. Debido a la proximidad de los Rf de las manchas correspondientes a las 2, 4-DFH de los ácidos α -cetoglutárico y oxaloacético, se hizo necesario recromatografiarlos para obtener una mejor separación. Para este objeto los derivados mencionados se eluyeron de los cromatogramas por medio de alcohol etílico adicionado de solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.3 y se corrieron estos extractos, previa concentración, en la mezcla butanol-ácido fórmico (95:5) saturada con agua que recomiendan Magasanik y Umbarger (13), por la técnica ascendente y utilizando papel Whatman N° 1 impregnado en solución amortiguadora de fosfatos M/10 de pH 7.3, según el procedimiento de Kun y García-Hernández (12). Aunque Magasanik y Umbarger han utilizado el solvente mencionado para separar los ceto-ácidos libres se creyó conveniente ensayarlo con las 2, 4-DFH derivadas de éstos y no obstante que los resultados no fueron enteramente satisfactorios, sí permitieron deducir que en las condiciones bajo las cuales se hizo la separación cromatográfica, la cantidad de ácido oxaloacético no fue suficiente para estimarla cuantitativamente en todos los casos.

La estimación de la concentración de las 2, 4-DFH de los ácidos pirúvico y α -cetoglutárico se llevó a cabo en densitómetro Photovolt, modelo 501 A, con filtro Corning 5113, en el cual se obtuvieron gráficas de densidad óptica contra espacio recorrido, cuya superficie

es proporcional a la cantidad del compuesto en el papel. Estas superficies se cotejaron con las de cantidades conocidas de las 2, 4-DFH de los ceto-ácidos, cromatografiadas en la misma forma que en el caso de los extractos de cerebro. Las 2, 4-DFH de los ácidos pirú-

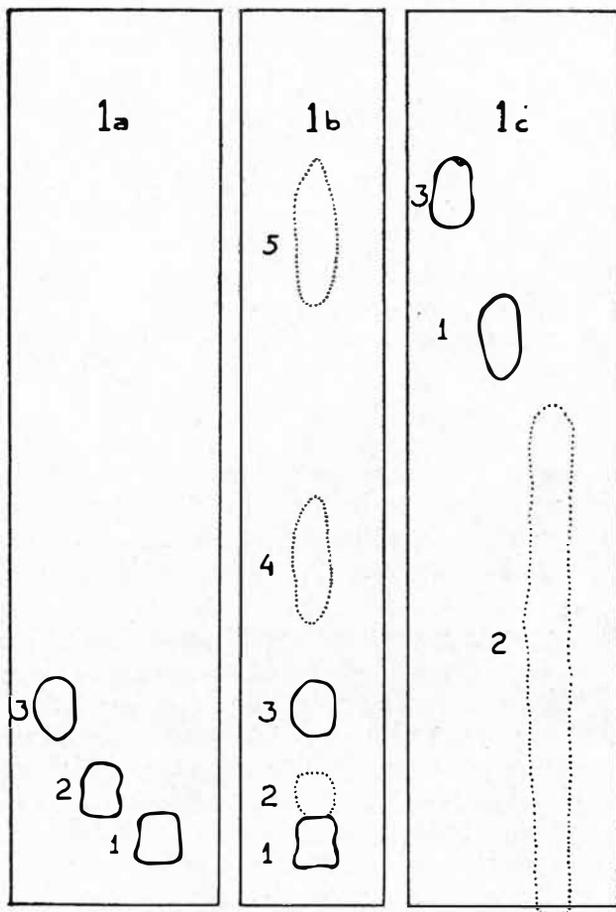


Figura 1. Esquemas de cromatogramas de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de ceto-ácidos: 1, α -ácido-cetoglutarico, 2, ácido oxaloacético, 3 y 4 ácido pirúvico y 5, no identificada. 1a, cromatograma patrón desarrollado en butanol saturado con agua; 1b, cromatograma de un extracto de cerebro, desarrollado en el mismo solvente; 1c, cromatograma patrón desarrollado en butanol-ácido fórmico saturado con agua; en este solvente los Rf de las 2, 4-DFH del ácido pirúvico y del ácido α -cetoglutarico fueron respectivamente 0.80 y 0.62.

vico, oxaloacético y α -cetoglutárico que se usaron como patrones se prepararon según el procedimiento de El Hawary y Thompson (10).

DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO OXALOACÉTICO. Este ceto-ácido se estimó tal como indica Bonting (3), transformándolo a ácido pirúvico mediante breve calentamiento del homogeneizado (1 minuto) y cuantificando este último tal como se describió antes.

RESULTADOS

Los resultados se consignan en la Figura 1 y en las tablas I y II. La primera incluye esquemas de cromatogramas con soluciones patrón de las 2, 4-DFH de los ácidos pirúvico, α -cetoglutárico y oxaloacético, desarrollados tanto en butanol saturado con agua como en la mezcla butanol-ácido fórmico saturada con agua (1a y 1c) y un esquema de un cromatograma de los mismos compuestos aislados del cerebro, que muestra además otra mancha no identificada (1b).

Aunque en el sistema butanol-ácido fórmico, la 2, 4-DFH del ácido oxaloacético se quedó en parte en el origen del cromatograma y en parte emigró y no mostró por lo tanto un R_f definido, fue sin embargo adecuado para diferenciar a este ceto-ácido del α -cetoglutárico. No obstante, la cuantificación del primero se realizó por el procedimiento de Bonting, con el cual se obtuvieron resultados más reproducibles.

En la separación cromatográfica de ceto-ácidos en los extractos de cerebro se observaron cinco manchas, correspondientes a otras tantas 2,4-DFH, de las cuales, como se ha dicho, se identificaron las de los ácidos pirúvico, oxaloacético (no siempre) y α -cetoglutárico, cuyos R_f fueron respectivamente 0.37 (isómero del ácido pirúvico), 0.22 (ácido pirúvico), 0.12 (ácido oxaloacético) y 0.07 (ácido α -cetoglutárico) y apareció otra cuyo R_f fue 0.70. Es un hecho comprobado que el ácido pirúvico exhibe dos manchas cuando se analiza por el procedimiento cromatográfico de Cavallini y sus colaboradores o sus variantes (10, 14). Juzgando por su posición, es probable que la mancha 5 (Figura 1b) corresponda al ceto-ácido desconocido que McArdle (14) ha encontrado en sangre, orina y líquido cefaloraquídeo (R_f 0.75 en butanol-etanol 0.5 NH_3 : 0.5 N, 7:1:2). Esta sustancia se encontró sólo en trazas y no se puso especial empeño en caracterizarla, por caer fuera del propósito principal de este trabajo.

TABLA I

NIVELES* DE LOS ACIDOS PIRUVICO Y OXALOACETICO EN LOS CEREBROS DE LOS ANIMALES TESTIGO Y DE LOS TRATADOS CON INSULINA, DETERMINADOS POR EL METODO DE BONTING (3).

GRUPO	TESTIGOS			TRATADOS CON INSULINA		
	Acido pirúvico μg./g.	Acido oxalacético μg./g.	Glucemia promedio mg./100 ml.	Acido pirúvico μg./g.	Acido oxalacético μg./g.	Glucemia promedio mg./100 ml.
1	6.35	—	87.3	3.06	—	22.0
2	7.60	—	—	2.69	—	15.0
3	4.29	—	90.0	1.63	—	13.7
4	4.25	1.34	101.0	1.51	<0.25	15.0
5	4.13	1.66	109.0	1.65	0.79	20.0
6	6.45	1.69	99.0	2.00	0.62	10.2
7	5.17	1.90	109.3	2.12	<0.25	12.6
8	5.40	1.93	—	2.69	0.90	9.5
9	4.88	1.55	89.0	1.65	0.45	11.0
Promedio	5.39	1.68	96.8	2.11	0.69**	14.33
Desviación standard	1.193	0.221	8.66	0.570	0.195	4.28
P				<0.001	<0.001	<0.001

* Los valores se expresan en microgramos por gramo de materia húmeda.

** Se excluyeron del promedio los valores de los grupos 4 y 7.

En las Tablas I y II se pueden observar los resultados de las estimaciones de los ácidos pirúvico y oxaloacético en una serie de experimentos y de los ácidos pirúvico y α-cetoglutarico en otra serie, así como las glucemias promedio en cada grupo de animales en el momento de sacrificarlos. En ellas se consignan también las desviaciones "standard" de los promedios en cada caso y el valor de P, como medida del valor estadístico de las cifras encontradas. Al examinar dichos datos se observa que en los cerebros de los animales tratados con insulina, los niveles correspondientes a los tres ceto-ácidos estudiados fueron de 40 a 60% menores que los encontrados en cerebros de los animales testigos. Debe hacerse notar que también se observaron disminuciones de la misma magnitud en las concentraciones del ceto-ácido correspondiente a la mancha 5.

Finalmente, es de hacerse notar que las cifras promedio de ácido pirúvico cerebral que se obtuvieron por los métodos de Bonting y Cavallini y colaboradores respectivamente, difieren entre sí en un

TABLA II

NIVELES* DE LOS ACIDOS PIRUVICO Y α -CETOGLUTARICO EN LOS CEREBROS DE LOS ANIMALES TESTIGO Y DE LOS TRATADOS CON INSULINA, DETERMINADOS POR EL METODO DE SEPARACION CROMATOGRAFICA EN PAPEL FILTRO DE CAVALLINI Y COLABORADORES (5).

GRUPO	TESTIGOS			TRATADOS CON INSULINA		
	Acido pirúvico $\mu\text{g./g.}$	Acido α -ceto-glutárico $\mu\text{g./g.}$	Glucemia promedio mg./100 ml.	Acido pirúvico $\mu\text{g./g.}$	Acido α -ceto-glutárico $\mu\text{g./g.}$	Glucemia promedio mg./100 ml.
1	7.88	2.49	85.0	2.25	1.35	15.0
2	6.35	1.65	95.0	2.80	1.00	14.5
3	8.29	2.81	76.0	3.55	1.69	14.5
4	8.01	3.08	98.0	3.71	1.85	19.5
5	4.89	1.97	65.0	2.31	1.41	14.4
6	5.47	2.18	90.0	1.85	0.81	14.5
7	5.36	2.15	88.0	2.09	0.94	28.0
8	5.93	2.22	86.0	2.21	1.64	23.0
Promedio	6.52	2.30	84.75	2.59	1.34	17.92
Desviación standard	1.344	0.506	10.80	0.690	0.383	5.08
P				<0.001	<0.005	<0.001

* Los valores se expresan en microgramos por gramo de materia húmeda.

18% aproximadamente. Creemos que los datos obtenidos por el método cromatográfico son los más correctos, ya que se acercan más a los consignados por otros autores. No obstante, no se hizo la comparación directa con éstos por referirse a otras especies o a zonas cerebrales localizadas (corteza generalmente).

DISCUSIÓN

El hecho de que los niveles de los ácidos pirúvico, α -cetoglutárico y oxaloacético sean menores en los cerebros de los animales sometidos a hipoglucemia insulínica, al compararlos con los observados en los de los testigos, indica que en estas condiciones la actividad del ciclo de Krebs está disminuida. Esta respuesta parece lógica, ya que la sustancia principal alimentadora del ciclo, el ácido pirúvico, se consume al máximo durante la condición de emergencia que

implica dicha hipoglucemia. Sin embargo, al tratar de relacionar estas observaciones sobre ceto-ácidos con los cambios que sufren algunos aminoácidos en condiciones experimentales similares, surgen aparentemente discrepancias. Se ha mencionado antes que durante la hipoglucemia insulínica se reducen en el cerebro las concentraciones de los ácidos glutámico y γ -aminobutírico y aumenta la del ácido aspártico (7, 8, 9); el nivel de glutamina no parece ser afectado bajo esas circunstancias (8). Basándose en los hechos anteriores, Dawson (8, 9) considera que en condiciones de emergencia, como lo son las derivadas de la hipoglucemia insulínica, el tejido cerebral utiliza al ácido glutámico como sustrato oxidable y por esa razón disminuye su concentración. La utilización de este aminoácido deberá ser al través de alguno de los caminos metabólicos que lo convierten en un intermediario del ciclo del ácido cítrico; de éstos los más probables en el cerebro son los siguientes: 1) desaminación oxidativa, que lo transforma en ácido α -cetoglutárico (18, 22); 2) transaminación con ácido oxaloacético, que produce ácido α -cetoglutárico y ácido aspártico y que según Cohen y Hekhuis (6) es una de las reacciones más activas de este tipo en ese órgano; 3) descarboxilación a ácido γ -aminobutírico y posterior transaminación de este aminoácido con el ácido α -cetoglutárico, reacción en la que se regenera el propio ácido glutámico y se origina semialdehído del ácido succínico que finalmente se convierte en ácido succínico (20), y 4) transaminación con ácido pirúvico, reacción en donde los productos son alanina y ácido α -cetoglutárico (6).

En condiciones normales el equilibrio de las reacciones 1 y 2 parece favorecer la síntesis del ácido glutámico o sea el consumo de ácido α -cetoglutárico (6, 18). En el camino metabólico 3 se encuentra una situación aparentemente contradictoria entre utilización de ácido α -cetoglutárico y regeneración de ácido glutámico. La reacción 4 no parece ser muy activa en el cerebro (6).

La disminución del ácido α -cetoglutárico durante la hipoglucemia insulínica parece indicar que en el balance entre las reacciones que producen este ceto-ácido y las que lo consumen, predominan estas últimas. Este hecho no invalidaría la hipótesis de que el aumento de ácido aspártico cerebral durante este tipo de hipoglucemia pueda deberse a una mayor actividad de la transaminasa glutámico-oxaloacética, lo que además contribuiría a explicar en parte la disminución del ácido oxaloacético.

Si como parece ser el caso, la fuente principal de ácido glutá-

mico cerebral es el ácido α -cetoglutárico, al través de la metabolización de la glucosa (2) y mediante la aminación reductiva (18, 22), podría pensarse también que lo que sucede en el cerebro en hipoglucemia insulínica es fundamentalmente una disminución en la síntesis de dicho aminoácido, ya que el ceto-ácido mencionado se está utilizando al máximo en el ciclo de Krebs. Considerando los hechos desde este ángulo, puede explicarse también en forma plausible la disminución de GABA, como fenómeno paralelo, pero no así el alza en el nivel de ácido aspártico.

Dentro de las consideraciones anteriores no se tomó en cuenta la posibilidad de que la glutamina sea una fuente de ácido glutámico cerebral, al través de su desamidación, lo que modificaría algunas de las hipótesis anteriores. Meister (15) considera la glutamina como la forma transportable de ácido glutámico, ya que se sabe que puede atravesar la barrera hemato-encefálica (21), a diferencia de este aminoácido. Sin embargo, en realidad se desconoce la verdadera importancia de la glutamina como fuente de ácido glutámico en el cerebro (22).

El esquema general de las alteraciones en el cerebro durante la hipoglucemia insulínica es todavía muy incompleto, especialmente en lo que se refiere a las relaciones entre el metabolismo del ácido glutámico y sustancias que de él derivan, con los metabolitos del ciclo de Krebs. Para una mejor comprensión de los cambios que sufran dichas relaciones por la aplicación de insulina se requiere mayor acopio de datos, por ejemplo la medición de las actividades de algunas enzimas durante la hipoglucemia, tales como la deshidrogenasa del ácido glutámico, su descarboxilasa, y las diversas transaminasas que se han mencionado anteriormente, en comparación con las actividades normales. Otros datos que pueden ser importantes son la medición de los números de recambio ("turnover number") de la glucosa, de los ácidos glutámico, γ -aminobutírico y aspártico y de los ceto-ácidos aquí estudiados, en cerebros de animales en hipoglucemia insulínica, lo que se tendría que realizar mediante las técnicas de introducción al organismo de tales sustancias marcadas con isótopos.

RESUMEN

Se compararon los niveles cerebrales de los ácidos pirúvico, α -cetoglutárico y oxaloacético, entre ratones sometidos a hipoglucemia insulínica y ratones normales. Para la estimación de la con-

centración de los ceto-ácidos se emplearon la separación cromatográfica en papel filtro (ácidos pirúvico y α -cetoglutárico) y un procedimiento colorimétrico (ácidos pirúvico y oxaloacético).

En los cerebros de los animales tratados con insulina se encontraron niveles de los ácidos pirúvico, α -cetoglutárico y oxaloacético 60, 40 y 60% menores respectivamente, que los observados en los cerebros de los testigos.

SUMMARY

The effect of insulin hypoglycaemia on the brain levels of pyruvic acid, oxalacetic acid and α -Ketoglutaric acid was studied in fasted mice. The estimations of these keto acids in brain were carried out both by quantitative paper chromatography (pyruvic and α -Ketoglutaric acids) and by a colorimetric technique (pyruvic and oxalacetic acids).

The brains of the mice subjected to insulin hypoglycaemia showed, as compared with those from normal animals, smaller amounts of pyruvic acid, oxalacetic acid and α -Ketoglutaric acid.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 ADEZATI, L. G. y G. GHIGLIOTTI, 1952, Pyruvate metabolism. I. Effect of insulin *in vivo* and *in vitro*. *Arch. "E. Maragliano", patol. e clin.*, 7: 855; *C. A.*, 47: 8215 h (1953).
- 2 BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI y F. FOCHIARI, 1955-56, Fate of uniformly labelled ^{14}C glucose in brain slices, *Proc. Roy. Soc. London, S. B.*, 144: 22.
- 3 BONTING, S. L., 1955, Colorimetric determination of pyruvic acid and other α -keto acids in submicrogram quantities, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 58, 100.
- 4 BUEDING, E., J. F. FAZEKAS, H. HERRLICH y H. E. HIMWICH, 1943, Effect of insulin on pyruvic acid formation in depancreatized dogs, *J. Biol. Chem.*, 148, 97.
- 5 CAVALLINI, D., N. FRONTALI y G. TOSCHI, 1949, Determination of keto-acids by partition chromatography on filter paper, *Nature*, 163, 568.
- 6 COHEN, P. P., y G. L. HEKHUIS, 1941, Rate of transamination in normal tissues, *J. Biol. Chem.*, 140: 711.
- 7 CRAVIOTO, R. O., G. H. MASSIEU y J. J. IZQUIERDO, 1951, Free amino acids in rat brain during insulin shock, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 78: 856.
- 8 DAWSON, R. M. C., 1950, Glutamine and glutamic acid contents of the rat brain during insulin hypoglycaemia, *Biochem. J.*, 47, 386.

- 9 DAWSON, R. M. C., 1953, Cerebral amino acids in fluoroacetate poisoned, anesthetized and hypoglycaemic rats, *Biochim. et Biophys. Acta*, 11: 548.
- 10 EL HAWARY, M. F. S. y R. H. S. THOMPSON, 1953, Separation and estimation of blood keto acids by paper chromatography, *Biochem. J.*, 53: 340.
- 11 HICKS, S. P., 1950, Brain metabolism *in vivo*. I. The distribution of lesions caused by cyanide poisoning, insulin hypoglycemia, asphyxia in nitrogen and fluoroacetate poisoning, *Arch. Path.*, 49: 111.
- 12 KUN, E. y M. GARCÍA HERNÁNDEZ, 1957, Identification and quantitative determination of keto acids by paper chromatography, *Biochim. et Biophys. Acta*, 23, 181.
- 13 MACASANIK, B. y H. E. UMBARGER, 1950, The separation and identification of keto acids by filter paper chromatography. *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2308.
- 14 McARDLE, B., 1957, The quantitative estimation of pyruvic and α -oxoglutaric acids by paper chromatography in blood, urine and cerebrospinal fluid, *Biochem. J.*, 66: 144.
- 15 MEISTER, A., 1956, Metabolism of glutamine, *Physiol. Rev.* 36, 103.
- 16 NELSON, N., 1944, A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, 153, 375.
- 17 OLSEN, N. S. y R. J. KLEIN, 1947, Effect of insulin on brain glucose, glycogen, lactate and phosphates, *Arch. Biochem.*, 13: 343.
- 18 OLSON, J. A. y C. B. ANFINSEN, 1953, Kinetic and equilibrium studies on crystalline L-glutamic acid dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, 202, 841.
- 19 ROBERTS, E. y S. FRANKEL, 1950, γ -aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid, *J. Biol. Chem.*, 187: 55.
- 20 ROBERTS, E., M. ROTHSTEIN y C. F. BANTER, 1958, Some metabolic studies of γ -aminobutyric acid, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 97: 796.
- 21 SCHWERIN, P., S. P. BESSMAN y H. WAELSH, 1950, The uptake of glutamic acid and glutamine by brain and other tissues of the rat and mouse, *J. Biol. Chem.*, 184: 37.
- 22 TOWER, D. B., 1958, Glutamic acid metabolism in the mammalian nervous system. IVth International Congress of Biochemistry, Vienna, September, 1958, Symposium No. III.

NOTA. Los autores desean expresar su agradecimiento a la Fundación Rockefeller por la ayuda recibida en equipo utilizado para la realización de este trabajo.