

TESIS DOCTORAL
MANUEL PIZARRO SANCHEZ

**INDICES DE MALNUTRICION PROTEICA Y PROTEICO-ENERGETICA
EN MUSCULO GASTROCNEMIO DE RATAS POR
DEFICIT DIETARIO DE FENILALANINA,
TIROSINA Y TRIPTOFANO**

**DIRECTORES: DR. D. JOSE LUIS REY DE VIÑAS RODRIGUEZ
DRA. D^a MARIA GONZALEZ FERNANDEZ**

**CENTRO MIXTO
INSTITUTO DE NUTRICION - DPTO. NUTRICION Y BROMATOLOGIA I
FACULTAD DE FARMACIA
C.S.I.C. - U.C.M.
1.996**

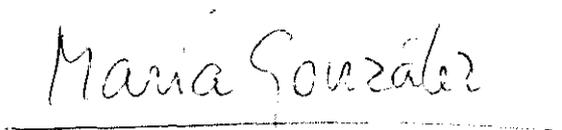
INDICES DE MALNUTRICION PROTEICA Y PROTEICO-ENERGETICA
EN MUSCULO GASTROCNEMIO DE RATAS POR DEFICIT DIETARIO
DE FENILALANINA, TIROSINA Y TRIPTOFANO

ASPIRANTE AL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA:



Fdo. MANUEL PIZARRO SANCHEZ

DIRECTORES:

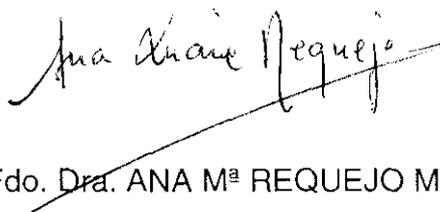


Fdo. Dra. MARIA GONZALEZ FERNANDEZ



Fdo. Dr. JOSE LUIS REY DE VIÑAS

Vº. Bº. DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO:



Fdo. Dra. ANA Mª REQUEJO MARCOS

Este trabajo pertenece al Proyecto N° PB87-0292 titulado "INDICES DE MALNUTRICION PROTEICA Y PROTEICO-ENERGETICA EN ALGUNOS ORGANOS DE RATA POR DEFICIT DIETARIO DE FENILALANINA, TIROSINA Y TRIPTOFANO" concedido por la DGICYT en el año 1.988.

A mi esposa y a mi futuro hijo/a

A mis padres

A mis hermanos

Deseo hacer patente mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de una u otra forma, me han apoyado en la realización de esta Tesis Doctoral:

En primer lugar, al director de la misma Dr. José Luis Rey de Viñas Rodríguez, por su eficaz dirección, ayuda, comprensión y apoyo incondicional en todo momento, además de haber contado siempre con su amistad.

A la Dra. Mara González-Fernández, codirectora de esta Tesis, quien me brindó la oportunidad de introducirme en el campo de la investigación, por su dedicación, confianza y amistad.

A la directora del Departamento, Dra. Ana M^a Requejo por la acogida que me brindó dentro éste.

A la Dra. Rosa Ortega, por la inestimable ayuda recibida durante toda mi estancia en el Departamento.

Al Profesor Gregorio Varela, por dedicar su esfuerzo a la investigación en el campo de la Nutrición.

A los Dres. Olga Moreiras, Fernando Ruiz, Rocío Muñoz y Angeles Carbajal; quienes hicieron posible que mi trabajo dentro del Departamento fuera muy enriquecedor.

A Laura Barrios, Centro de Cálculo del C.S.I.C., por su asesoramiento estadístico y a la Dra. Elena Vara, al contribuir de manera eficaz en la determinación de la insulina.

A mis compañeras M^a Carmen y M^a José, con quienes he compartido trabajo y amistad. A todos mis compañeros y amigos del Departamento.

A mi mujer, padres y hermanos, quienes siempre y sin reservas me han apoyado y ayudado en todos los proyectos que he iniciado en mi vida, aún en los momentos más difíciles. A mi futuro hijo/a, de quien estoy recibiendo las mayores alegrías.

Y a todos los que han compartido conmigo las situaciones más complicadas.

A todos gracias

INDICE

	Pag.
1. Objeto.	1
2. Situación Bibliográfica.	5
2.1. Aspectos generales de la adaptación a la deficiencia proteica, proteico-energética y de aminoácidos esenciales de la dieta.	6
2.1.1. Factores que modifican el balance de nitrógeno.	6
2.1.2. Adaptación metabólica a ingestas reducidas de proteínas y energía.	9
2.1.3. Deficiencia de aminoácidos esenciales en la dieta.	14
2.2. Visión general del metabolismo de aminoácidos.	19
2.3. Distribución de los aminoácidos en los compartimentos tisulares.	20
2.3.1. Proceso de absorción.	20
2.3.2. Transporte de aminoácidos a través de la membrana celular.	23
2.3.3. Distribución de los aminoácidos en los tejidos.	27
2.3.4. Influencia de la dieta sobre el nivel tisular de aminoácidos.	30
2.4. Manifestaciones de las deficiencias de aminoácidos.	31
2.4.1. Crecimiento, ingesta y composición corporal.	31
2.4.2. Cambios morfológicos.	34
2.4.3. Cambios bioquímicos.	34
2.4.4. Otros efectos.. . . .	36
2.5. Papel del músculo en el metabolismo proteico.	38
2.5.1. Aspectos generales.	38
2.5.1.1. Cambios durante el crecimiento.	40
2.5.2. Respuesta del músculo a las modificaciones en la dieta.	42
2.5.2.1. Influencia del ayuno.	42
2.5.2.2. Dietas carentes de proteínas.	46
2.5.2.3. Deficiencia moderada de proteína o energía.	47
2.5.3. Influencia de la dieta sobre los ácidos nucleicos en el músculo.	53
2.5.3.1. Acido Deoxirribonucleico (DNA).	53
2.5.3.1.1. Modificaciones debidas al crecimiento.	53
2.5.3.1.2. Modificaciones en el DNA muscular producidas por la dieta.	54
2.5.3.2. Acido Ribonucleico (RNA).	56
2.5.3.2.1. Modificaciones debidas al crecimiento.	56

	2.5.3.2.2. Modificaciones en el RNA muscular producidas por la dieta.	57
2.5.4.	Acción hormonal sobre el "turnover" proteico en el músculo.	59
2.5.4.1.	Insulina.	59
2.5.4.2.	Glucagón.	64
2.5.4.3.	Glucocorticoides.	65
2.5.4.4.	Hormonas tiroideas.	67
2.5.4.5.	Hormona del crecimiento y Somatomedina-C (IGF-1).	68
3.	Material y Métodos.	73
3.1.	Diseño experimental.	74
3.1.1	Estudio de la carencia de Fenilalanina + Tirosina + Triptófano (Phe + Tyr + Trp) en la dieta..	74
3.1.2.	Estudio de la carencia de Phe + Tyr + Trp en la dieta, con restricción energética del 50%.	75
3.1.3.	Estudio del efecto de la disminución de la ingesta por carencia de Phe + Tyr + Trp en la dieta.	75
3.2.	Desarrollo del experimento.	76
3.3.	Composición de las dietas utilizadas.	80
3.3.1.	Dieta I o control, con 10% de proteína (Caseína 9.8 g + DL-Metionina 0.2g).	80
3.3.2.	Dieta II con 10% de proteína (Aminoácidos cristalinos exentos de Phe + Tyr + Trp).	81
3.3.3.	Dieta III con 20% de proteína (Aminoácidos cristalinos exentos de Phe + Tyr + Trp), dobles cantidades de celulosa, mezcla mineral, vitamínica y aminoácidos de la dieta II, con reajuste de las cantidades de almidón y sacarosa.	83
3.3.4.	Dieta III, con 10% de proteína (Caseína 9.8 g. + DL-Metionina 0.2 g), igual a la dieta control, pero se suministra "pair fed" con respecto a la dieta II.	84
3.4.	Determinaciones analíticas.	84
3.4.1.	Toma de muestras.	84
3.4.1.1.	Orina y Heces.	84
3.4.1.2.	Sangre y músculo gastrocnemio.	85
3.4.2.	Preparación de la muestras.	85
3.4.2.1.	Determinaciones en músculo gastrocnemio.	85
	3.4.2.1.1. Determinaciones enzimáticas y de proteínas.	85

	3.4.2.1.2. Determinaciones de ácidos nucleicos	
	DNA y RNA.	86
	3.4.2.2. Determinaciones en sangre.	86
3.4.3.	Sistema cromatográfico.	86
3.4.4.	Técnicas empleadas.	88
	3.4.4.1. Balance de nitrógeno.	88
	3.4.4.2. Determinaciones en el homogenado de músculo	
	gastrocnemio.	89
	3.4.4.2.1. Proteínas solubles.	89
	3.4.4.2.2. Acido Deoxirribonucleico (DNA).	90
	3.4.4.2.3. Acido Ribonucleico (RNA).	91
	3.4.4.2.4. Deoxirribonucleasa ácida.	92
	3.4.4.2.5. Ribonucleasa ácida.	93
	3.4.4.2.6. Fosfatasa ácida.	94
	3.4.4.2.7. Fosfatasa alcalina.	95
	3.4.4.2.8. Beta-D-Glucuronidasa.	96
	3.4.4.2.9. Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT).	97
	3.4.4.2.10. Glutamato-piruvato transaminasa (GPT).	97
	3.4.4.2.11. Aminoácidos libres en músculo gastrocnemio.	98
	3.4.4.3. Determinaciones en plasma.	102
	3.4.4.3.1. Colesterol.	102
	3.4.4.3.2. Glucosa.	103
	3.4.4.3.3. Insulina.	104
	3.4.4.3.4. Aminoácidos libres en plasma.	105
	3.4.4.4. Determinaciones en glóbulos rojos.	106
	3.4.4.4.1. Aminoácidos libres.	106
	3.4.4.5. Determinaciones en orina.	107
	3.4.4.5.1. Urea.	107
	3.4.4.5.2. Creatinina.	108
	3.4.4.5.3. 3-Metilhistidina.	109
3.5.	Tratamiento estadístico.	109
4.	Resultados.	111
5.	Discusión de los resultados.	185
	5.1. Efecto de la deficiencia de Phe + Tyr + Trp y energía sobre la ingesta y	
	peso corporal.	186
	5.1.1. Ingesta.	186

5.1.2.	Peso Corporal.	188
5.2.	Balance de Nitrógeno, urea, creatina y 3-Metilhistidina en orina.	189
5.2.1.	Balance de Nitrógeno.	189
5.2.2.	Urea y creatina en orina.	191
5.2.3.	3-Metilhistidina en orina.	192
5.3.	Colesterol, glucosa, insulina y relación insulina/glucosa plasmáticos.	195
5.3.1.	Colesterol.	195
5.3.2.	Glucosa, insulina y relación insulina/glucosa.	196
5.4.	Efecto de la carencia de Phe + Tyr + Trp y energía sobre el crecimiento muscular.	198
5.4.1.	Modificaciones en el peso del músculo gastrocnemio y proteína soluble del mismo.	198
5.4.2.	Modificaciones producidas en el contenido de DNA, número de núcleos, tamaño celular, actividad enzimática, DNAsa por órgano y por mg de proteína y relación DNAsa/DNA.	200
5.4.3.	Variaciones en el RNA total, RNA/DNA, RNA/proteína y actividad RNAsa ácida.	203
5.4.4.	Efecto sobre las actividades enzimáticas lisosomales hidrolasas: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y beta-D-glucuronidasa por órgano y por mg de proteína.	206
5.4.5.	Efecto de las actividades enzimáticas de transaminasas GOT y GPT.	208
5.5	Efecto de la carencia en la dieta de Phe + Tyr + Trp y Phe + Tyr + Trp y energía sobre las concentraciones de aminoácidos libres en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio.	209
5.5.1.	Aminoácidos de cadena ramificada (AAR).	213
5.5.2.	Aminoácidos gluconeogénicos.	216
5.5.2.1.	Acido aspártico y asparragina.	217
5.5.2.2.	Acido glutámico y glutamina.	218
5.5.2.3.	Serina, glicina, treonina y alanina.	222
5.5.2.3.1.	Serina.	222
5.5.2.3.2.	Glicina.	223
5.5.2.3.3.	Treonina.	223
5.5.2.3.4.	Alanina.	224
5.5.3.	Aminoácidos aromáticos (AAA).	225
5.5.4.	Suma de aminoácidos neutros y relación AAR/AAA en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio.	227
5.5.5.	Aminoácidos básicos y azufrados.	229

5.5.6.	Aminoácidos esenciales, no esenciales, relación AAE/AANE y aminoácidos totales.	232
5.5.7.	Relaciones entre aminoácidos: Ile/AAN-Ile, Leu/AAN-Leu, Val/AAN-Val, Phe/AAN-Phe, Tyr/AAN-Tyr, Phe/Tyr, Ala/Tyr, Ala/Leu, Ala/AAR, Ser+Gli+Ala/AAR, y Gly/Val.	234
6.	Conclusiones.	237
7.	Resumen.	243
8.	Bibliografía.	245

1. OBJETO

La secuencia única y ordenada de los aminoácidos en las proteínas implica que todos ellos deben estar presentes en el lugar adecuado para que tenga lugar la síntesis proteica. Así, cualquier aminoácido, esencial o no, adquirirá una importancia excepcional cuando se reduzca su aporte. En esta situación deficitaria se verá afectada la utilización de los restantes aminoácidos en la síntesis de proteínas, produciéndose una gran variedad de efectos adversos (JABLONSKY y RAFALSKY, 1984).

Los efectos producidos por una deficiencia proteica o proteico-energética en la alimentación animal dependen esencialmente de la edad del animal, de la calidad de la proteína de la dieta y del tiempo de duración de la deficiencia (MURILLO y col., 1991; CHEREL y LE MAHO, 1991). Según hacen alusión RUDY y CASTRO (1990) por un lado, y CHEREL y LE MAHO (1991) por otro, los animales más jóvenes se ven más afectados por su historia nutricional que aquellos de edad más avanzada. Ello se ve muy bien reflejado en el crecimiento del animal y de sus órganos.

Cuando se utiliza una dieta carente de un aminoácido esencial, la pérdida de nitrógeno corporal que se observa en los animales de experimentación varía con el tipo de aminoácido omitido, alcanzando un máximo cuando la dieta carece de aminoácidos azufrados, seguida en orden decreciente por dietas carentes de valina, treonina, isoleucina, triptófano, fenilalanina y tirosina, leucina y lisina (HEGER y FRYDRYCH, 1985).

MERTZ (1972) afirma que ante una nutrición inadecuada el organismo reacciona preservando los tejidos con mayor masa metabólica, tejidos viscerales y cerebro, mientras que tejidos con bajo metabolismo, tejido muscular y piel, aún siendo más abundantes, son los que más desgaste presentan.

Los estados nutricionales pueden ser normales, o bien pueden existir enfermedades nutricionales por exceso o por defecto. En ambos casos existe una malnutrición, lo cual provoca un deterioro de los tejidos corporales, menor resistencia a la infección, alteraciones en la visión y, en ocasiones, hay un estancamiento del crecimiento en los niños (OCLOO, 1993). Los resultados de una malnutrición proteico-energética son incrementos del riesgo de infecciones agudas o crónicas.

Recientemente se ha demostrado la importancia de los aminoácidos esenciales en la dieta por ser importantes reguladores del crecimiento, influyendo directamente sobre la síntesis y degradación proteica en el músculo, e indirectamente sobre los niveles de hormonas anabólicas: insulina, IGF1 y T3 , así como sobre las concentraciones de los aminoácidos libres en los diversos

compartimentos que ha venido utilizándose como índice cualitativo de los cambios en el metabolismo proteico de cada uno de los órganos y del metabolismo proteico total.

La tasa de síntesis proteica de los diferentes tejidos animales es controlada por el suministro de aminoácidos, pero cuando éste es inadecuado los diferentes tejidos responden con una respuesta adaptativa más o menos importante. La disponibilidad de aminoácidos esenciales afecta a la síntesis proteica del músculo gastrocnemio y la carencia de alguno de ellos produce una caída o una parada de la misma dependiendo del aminoácido esencial omitido y del tejido en cuestión.

El músculo representa aproximadamente un 40-50% del peso corporal del adulto. El descenso de la tasa de síntesis en el músculo esquelético durante el ayuno se hace mayor si hay deplección proteica, y cuando se agotan las reservas de glucógeno la proteína muscular es la fuente principal de precursores para la síntesis de la glucosa que necesita el cerebro, dado que constituye la mayor reserva proteica del organismo.

Las variaciones en la concentración de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano influyen en la síntesis de catecolaminas y/o serotonina (THURMOND y col., 1990; TACKMAN y col., 1990). El aporte de dichos aminoácidos al cerebro varían con el contenido proteico y energético de la dieta.

Existen variaciones específicas en los distintos compartimentos por el importante papel que los aminoácidos juegan en ellos. Así, los aminoácidos libres y los índices aminoacídicos detectados en plasma y glóbulos rojos están de algún modo correlacionados directa o indirectamente con los aminoácidos libres del cerebro, músculo gastrocnemio e hígado.

La ingesta de aminoácidos esenciales es importante para la síntesis proteica y el crecimiento, y algunos de ellos también están implicados en la síntesis de aminas biógenas como sucede con la fenilalanina y el triptófano. El efecto de la deficiencia de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano ha sido estudiado para determinar el impacto sobre la síntesis y concentración de neurotransmisores (FERNSTRON y WURTMAN, 1971; MILLER y col., 1977). Sin embargo, se ha prestado poca atención al déficit de estos aminoácidos aromáticos en los diversos órganos en el animal adulto.

El presente estudio pretende determinar el efecto de un déficit dietario de fenilalanina, tirosina y triptófano (Phe+Tyr+Trp) y esta dieta con un déficit energético del 50% frente a una dieta control del 10% de proteína (caseína 9.8% + DL-Metionina 0.2%) durante un período

experimental de 4, 10 y 14 días, para detectar en ratas Wistar macho de 28 días de edad como animales de experimentación, los cambios que esta malnutrición proteica y proteico-energética produce sobre la ingesta alimentaria, peso corporal y del músculo gastrocnemio, balance de nitrógeno, creatinina, urea, contenido de ácidos nucleicos, actividades enzimáticas lisosomales, transaminasas, variaciones en las concentraciones de aminoácidos libres en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio y otros índices bioquímicos susceptibles de ser extrapolados en clínica humana para poder ser empleados en el reconocimiento de estados poco reconocibles de malnutrición.

2. SITUACION BIBLIOGRAFICA

2.1. ASPECTOS GENERALES DE LA ADAPTACION A LA DEFICIENCIA PROTEICA, PROTEICO-ENERGETICA Y DE AMINOACIDOS ESENCIALES EN LA DIETA

2.1.1. FACTORES QUE MODIFICAN EL BALANCE DE NITROGENO

El metabolismo proteico corporal se puede evaluar mediante el balance de nitrógeno. Este representa la diferencia entre el nitrógeno ingerido y el excretado (por orina, heces y piel). Esta diferencia puede ser positiva, si hay retención de nitrógeno, negativa, si hay pérdida de nitrógeno, o alcanzar el valor cero en un estado de equilibrio. Se estima el balance (B), por diferencia entre el nitrógeno ingerido (I) y las pérdidas que se producen por orina (U), heces (F) y piel (S) en:

$$B = I - (U + F + S)$$

El balance de nitrógeno es afectado tanto por la ingesta proteica como por la energética (MUNRO, 1964). Así, disminuye el balance de nitrógeno cuando la ingesta energética se reduce por debajo de las necesidades corporales, y aumenta cuando las calorías aumentan por encima de los requerimientos. Existe una relación directa entre la energía ingerida y el balance de nitrógeno (MUNRO, 1964). También está afectado por las hormonas anabólicas (insulina, crecimiento, testosterona), o catabólicas (corticosteroides, tiroxina). Estas hormonas actúan de una forma más efectiva sobre el metabolismo proteico muscular, debido a su gran magnitud, determinando alteraciones en el balance de nitrógeno, que puede ocultar el efecto de estas hormonas sobre el metabolismo proteico del hígado y otros tejidos (MUNRO, 1964).

Los principales compuestos nitrogenados excretados por el riñón: urea, amoníaco, ácido úrico y creatinina, responden de modo diferente a los cambios en el contenido de proteínas de la dieta. Así, en una dieta con contenido proteico normal, el 80% de la excreción urinaria se realizà en forma de urea. Este porcentaje disminuye con dietas bajas en proteínas (MUNRO y CRIM, 1980). La excreción de creatinina tiende a ser independiente de la dieta, puesto que refleja el pool de creatina del músculo cuando se administra una dieta que carece de creatina (MUNRO y CRIM, 1980).

Se produce un balance de nitrógeno negativo en ciertos estados metabólicos como acidosis, trauma, sepsis, quemaduras, diabetes severa y estados post-absortivos. Con excepción de este último, estos estados se caracterizan por una degradación proteica, principalmente en el músculo esquelético, con liberación de glutamina. Ayuno y diabetes se caracterizan por un aumento en el

plasma y tejido muscular de aminoácidos libres (VANNINI y col., 1982). La glutamina es el aminoácido más importante encontrado en plasma y en tejido muscular, y contribuye de una manera importante al balance de nitrógeno negativo. Como demostraron ASKANAZI y col. (1980), la disminución de la glutamina provoca la disminución en el músculo de los niveles de aminoácidos esenciales.

La síntesis proteica tisular es normal si hay un adecuado aporte de energía. Una restricción de energía en la dieta se asocia con un aumento del catabolismo proteico, y el animal utiliza sus reservas de proteínas para corregir la deficiencia calórica. Estudios de ROSENTHAL y ALLISON (1956) en ratas indican que, durante una restricción calórica, hay un aumento del catabolismo de las reservas proteicas y un balance de nitrógeno negativo.

YOKOGOSHI y YOSHIDA (1976) estudiaron el efecto en ratas de una dieta sin proteínas a la que añadieron metionina y treonina, observando a los 2 días que la excreción de nitrógeno en orina estaba *significativamente disminuida*; a los 7 días la excreción de nitrógeno estaba aún más reducida, demostrando que la suplementación con aminoácidos esenciales a una dieta sin proteínas *no disminuye la pérdida de nitrógeno, aunque sí mejora ligeramente el balance de nitrógeno*.

La capacidad de mantener el balance de nitrógeno dentro de un amplio rango de ingestas es el más claro ejemplo de la adaptación nutricional. La primera defensa frente a una ingesta inadecuada es mantener la masa proteica corporal. Una vez agotada la capacidad de economizar nitrógeno, el siguiente paso es una reducción en la masa magra corporal (WATERLOW, 1986).

Así, tanto en el hombre como en la rata, se observa un rápido descenso en la eliminación urinaria de nitrógeno cuando se les administra una dieta carente de proteína, alcanzando posteriormente un valor constante. GOLDEN y WATERLOW (1977), señalan en niños malnutridos un *descenso en el turnover proteico durante el déficit, que también se manifiesta en animales sometidos a dietas deficientes* (GARLICK y col., 1975).

En ratas sometidas a dietas con bajo contenido en proteínas, hay una reducción en la actividad de las enzimas del ciclo de la urea, medido en homogenados de hígado "in vitro" (SCHIMKE, 1962).

HEGER y FRYDRYCH (1985) estudiaron el balance de nitrógeno en ratas macho en crecimiento alimentadas con dietas en las cuales cada aminoácido se hace variar entre 0 y 120% de los requerimientos óptimos. El balance de nitrógeno aumenta cuando aumentan los niveles dietarios de los aminoácidos; disminuye gradualmente si el contenido de aminoácidos se reduce frente a la concentración óptima y, a nivel cero de ingesta, existe un balance de nitrógeno negativo para todos los aminoácidos excepto para la histidina. Las mayores pérdidas de nitrógeno corporal se producen con dietas carentes de aminoácidos azufrados, seguidas por dietas sin valina, treonina, isoleucina,

triptófano, aminoácidos aromáticos, leucina y lisina. La máxima utilización de aminoácidos esenciales para el crecimiento se encuentra con niveles dietarios del 30-60% de los requerimientos óptimos.

Cualquier posibilidad de economizar nitrógeno pasa por la reducción de la pérdida de nitrógeno por orina. Incluso con pequeñas ingestas proteicas, alrededor del 50% de la pérdida de nitrógeno urinario es en forma de urea (BODWELL y col., 1979). El nitrógeno se pierde también por la piel, principalmente en forma de urea; esta pérdida es menor en el caso de dietas carentes de proteínas puesto que la concentración de urea en sangre es menor. Sin embargo, las pérdidas de nitrógeno por la piel representan sólo una pequeña parte del total.

Folin detalló a comienzos de siglo (FOLIN, 1905) que la excreción de otros metabolitos que contienen nitrógeno como el ácido úrico, la creatina y los aminoácidos libres, son constantes a pesar de variar el nivel de ingesta proteica, y no hay evidencia de algún mecanismo fisiológico para regular esta fuente de pérdida de nitrógeno.

En la rata, la cantidad total de pérdida de nitrógeno corporal es de 3-5%, inicialmente proveniente del hígado y vísceras y, más tarde, del músculo y de la piel (WATERLOW y STEPHEN, 1966).

Los productos finales del metabolismo del nitrógeno son excretados por orina. La proteína procedente de la dieta o secretada por el lumen intestinal se excreta por las heces, mientras que el nitrógeno excretado por la piel es urea. La menor parte se excreta por secreciones nasales, pelo, menstruación y semen, excretándose la mayor parte por orina.

Los factores que afectan al balance de nitrógeno son los siguientes:

- a) Crecimiento. Durante este proceso el organismo retiene nitrógeno. Esta retención de nitrógeno está controlada por la hormona del crecimiento y por otras hormonas como la insulina y los andrógenos.
- b) Daño físico. Después de una lesión o una operación quirúrgica, se produce una excreción de nitrógeno superior y un balance negativo, producido por una mayor liberación de hormonas adrecorticales.
- c) Ejercicio físico. Se piensa que las personas que realizan un ejercicio físico duro necesitan gran cantidad de proteína en sus dietas. Para justificar científicamente esta afirmación es necesario probar que la actividad muscular aumente el catabolismo proteico, causando un balance de nitrógeno negativo, pero no está claramente demostrado.

- d) Flora bacteriana intestinal. Los rumiantes pueden utilizar la urea para formar aminoácidos por intervención de los microorganismos de su tracto gastrointestinal. Los animales monogástricos normalmente no utilizan la urea, pero cuando la ingesta proteica es muy baja sí pueden utilizarla. La urea difunde desde la sangre a la luz intestinal, donde las bacterias pueden utilizarla; el amoníaco producido puede servir para la síntesis de aminoácidos, bien directamente por las bacterias intestinales, bien tras la absorción en la vena porta del hígado (JACKSON, 1983).

2.1.2. ADAPTACION METABOLICA A INGESTAS REDUCIDAS DE PROTEINAS Y ENERGIA

El conjunto de los mecanismos mediante los cuales el organismo conserva su estructura y función en condiciones adversas constituye el fenómeno de la adaptación (WATERLOW y ALLEYNE, 1971). Posteriormente, WATERLOW (1986) definirá que la adaptación permite mantener las características vitales dentro de un rango aceptable.

Las bajas concentraciones de alfa₂ y beta-globulinas encontradas en el suero de niños prematuros han sido descritas por WHITEHEAD y col. (1973) en kwashiorkor severo y RAGHVAN y col. (1976), los cuales han encontrado bajos niveles de gamma-globulina sérica en esos niños, como consecuencia de una malnutrición proteico-energética intrauterina.

Se sabe que la transferrina es un índice del estado nutricional, y la concentración de esta proteína disminuye en malnutrición severa (REEDS y LADITAN, 1976).

La malnutrición proteico-energética lleva consigo una serie de respuestas adaptativas; si la malnutrición persiste, se asocia con signos y síntomas clínicos (GURNEY, 1979).

En la adaptación al déficit proteico y proteico-calórico participan mecanismos a nivel celular, hormonal y reacciones generalizadas.

Se producen cambios en la síntesis proteica a nivel ribosómico, con descensos de la misma, en hígado (WATERLOW y ALLEYNE, 1971) y músculo de ratas con deficiencia proteica. Además, se producen modificaciones en el contenido de ribosomas tisulares (PAIN y GARLICK, 1974) y disminución del crecimiento corporal.

La malnutrición proteico-calórica provoca alteraciones hormonales con movilización de la grasa del tejido adiposo. Así, los niveles de insulina plasmática, cuando disminuyen, aumentan por

contrapartida los niveles de glucocorticoides (OKITOLONDA y col., 1987). La hormona del crecimiento generalmente está aumentada, mientras que los niveles de hormona tiroidea están disminuidos. En el hombre hay evidencia de que la patología del marasmo se debe a una deficiencia proteica y energética y del kwashiorkor, a una malnutrición proteica acompañada de una ingesta de energía adecuada, pueden relacionarse con elevadas actividades secretoras de corticosteroides adrenales (WHITEHEAD y LUNN, 1979).

Tanto la administración de dietas deficientes de proteína, como de glucocorticoides, producen una reducción en la tasa de síntesis proteica y contenido de RNA en el músculo (WATERLOW y col., 1978c). Sin embargo, no está claro si la disminución de la síntesis proteica en malnutrición se ve particularmente mediada por un aumento secundario en los niveles de corticosterona.

En las fases iniciales de la deficiencia proteico-calórica hay un descenso de la actividad física, disminuyendo el metabolismo basal con descenso de la grasa corporal; luego se produce catabolismo muscular y aumento de aminoácidos, predominando la alanina (VITERI y ALVARADO, 1970). En déficit proteico también se produce adaptación celular, no sólo por las hormonas, sino por la menor disponibilidad de aminoácidos que provoca disminución de la síntesis proteica a nivel ribosomal. El resultado de ambos mecanismos de adaptación (interacción hormonal y adaptación celular) es un aumento del catabolismo proteico con una mayor disponibilidad de aminoácidos a nivel visceral. La composición del "pool" de aminoácidos libres se altera.

El crecimiento compensatorio es la capacidad de los animales, a quienes previamente se les ha restringido la ingesta, para crecer durante este período. Cuando son sometidos a realimentación, la ganancia en la proteína muscular se incrementa por encima de los valores controles (OLOWOOKERE, 1987; AUSMAN y col., 1989). Estos animales muestran un aumento, tanto de la proteína corporal como del contenido proteico muscular, debido a un cambio en el metabolismo muscular (WHEATLEY y col., 1989).

Un mecanismo importante en la adaptación al ayuno es la movilización de las reservas grasas y proteínas corporales, principalmente del músculo esquelético, para paliar los requerimientos energéticos del organismo. Se produce un aumento en la liberación de aminoácidos del músculo esquelético, con disminución de la síntesis proteica y con un marcado aumento en la degradación proteica muscular (LI y col., 1979; GOODMAN y col., 1980). Estos cambios adaptativos en el metabolismo proteico están acompañados por un bajo nivel de insulina circulante, y aumento de los glucocorticoides con incremento de la proteólisis.

El índice de masa corporal = $\text{Peso (Kg)} / \text{Superficie corporal (m)}^2$, es normal entre 19 y 25 (BRAY, 1979). KEYS y col. (1950) consideran que la muerte sobreviene cuando se ha perdido el 40% del peso corporal.

DOHERTY y col. (1989) llevaron a cabo estudios con distintos niveles de ingesta proteica y de energía dietaria en grupos de niños en proceso de recuperación tras una malnutrición severa. Observaron que, cuando la demanda metabólica de proteína excede la ingesta dietaria, se produce un mecanismo adaptativo por el cual las pérdidas de nitrógeno corporal son mínimas. Hay descenso en la producción de urea, así como de su excreción urinaria. Una gran cantidad de urea es hidrolizada en el intestino, haciendo que el nitrógeno esté disponible para procesos metabólicos.

MOTIL y col. (1981) han demostrado que la administración a personas de dietas con diferentes cantidades de energía y proteína provocan un período de adaptación. Así, si las personas son alimentadas con dietas sin proteína, dicho período de adaptación se lleva a cabo con una disminución de la síntesis proteica y de la degradación, mientras que si las personas son alimentadas con dietas ricas en proteínas aumenta la síntesis proteica y la degradación. El resultado de esta adaptación es que la degradación proteica es menor en personas que han comido dietas pobres en proteínas.

YAMAMOTO (1953) sugiere que la reducción de la actividad enzimática catabólica en ratas, como consecuencia de la falta de proteínas en la dieta, contribuye al proceso de adaptación con déficit proteico. Esta reducción de la actividad catabólica enzimática se explica por el control hormonal característico.

En relación a la adaptación a bajas ingestas proteicas, la capacidad de conseguir mantener el balance de nitrógeno es, probablemente, el ejemplo más claro de la adaptación nutricional. El organismo tiene que mantener constante la masa proteica corporal, economizando nitrógeno y reduciendo la masa corporal (WATERLOW, 1986). En niños, si la ingesta de proteínas es inadecuada, hay una disminución del crecimiento y del peso.

Un modo por el cual los animales tienden a adaptarse a cambios en la dieta es mediante la regulación de la absorción intestinal de nutrientes (KARASOV y DIAMOND, 1983).

La adaptación a ingestas bajas en energía en sujetos con baja actividad física es de 1.4 x tasa metabólica basal, datos estimados por estudios calorimétricos de la energía gastada (FAO/WHO/UNU, 1985). La tasa metabólica basal (TMB) es la energía gastada por una persona en ayuno y completamente relajada, en condiciones ambientales normales de temperatura. Se expresa en

kcal. por persona y día. En personas sanas, la TMB/Kg aumenta a medida que disminuye el peso corporal (FAO/WHO/UNU, 1985).

El organismo emplea cuatro estrategias para adaptarse a una ingesta energética baja (WATERLOW, 1986):

1. Manteniendo el peso corporal bajo.
2. Reduciendo la actividad voluntariamente.
3. Reduciendo la actividad involuntariamente.
4. Mediante adaptaciones metabólicas adecuadas.

Para establecer los nuevos cambios adaptativos, el gasto energético debe estar relacionado con el peso corporal.

APFELBAUM y col. (1969) y JAMES (1981) han estudiado el efecto de la Tasa Metabólica Basal (TMB) en restricciones de ingesta y con la consiguiente pérdida de peso. Los resultados son variables pero, en general, hay una disminución inicial de la TMB en respuesta a la reducción de la ingesta energética. WATERLOW y STEPHEN (1966) han observado una pérdida de muscular en ratas con una TMB baja, mientras que en tejidos viscerales como el cerebro existe con una TMB alta que tiende a preservarlo. La adaptación más importante a ingestas bajas de energía es la reducción del peso corporal (WATERLOW, 1986).

El organismo tiende a mantener el equilibrio dinámico y calórico por mecanismos fisiológicos. Tras la ingesta de una dieta rica en energía, la mayor parte de los nutrientes forman fosfatos ricos en energía, grasa y glucógeno, y éstos descienden para obtener energía utilizable durante cortos períodos de ayuno, o bien en períodos de elevado gasto energético. En períodos de falta de energía severa o de restricción proteica, el organismo progresivamente se va adaptando hasta conseguir una "adaptación máxima", es decir, la demanda de nutrientes desciende hasta conseguir un equilibrio compatible con el nivel bajo de la disponibilidad de nutrientes. Si, en este momento, persiste la falta de nutrientes por debajo del nivel en el que el organismo puede adaptarse, sobreviene la muerte (VITERI y ALVARADO, 1970).

El cambio adaptativo más significativo es el reciclaje de aminoácidos. También ocurre (WATERLOW y ALLEYNE, 1971) que:

- Aumenta la vida media de algunas proteínas, como la albúmina, y disminuye el turnover de aminoácidos y proteínas.

- Cambia la distribución interna de proteínas (como la albúmina, la cual disminuye más en el espacio extravascular que en el intravascular).
- Disminuyen los compuestos nitrogenados, como la urea, que es utilizada como fuente de nitrógeno.
- Reducción de la masa corporal, en un principio del músculo y también de la piel, con pérdida de proteínas.
- Disminuye el consumo de oxígeno basal.

También se produce disminución de la oxidación de aminoácidos. Hay infección y anorexia, y disminución de la ingesta de alimentos. La fiebre aumenta el gasto de energía, acompañado por pérdidas de nitrógeno y cambio hacia la utilización de aminoácidos como fuente de energía. Los aminoácidos son utilizados también para la síntesis de proteínas, como gammaglobulinas o anticuerpos (BEISEL, 1975). La capacidad funcional de la hipófisis disminuye. La respuesta celular a la estimulación hormonal, así como el metabolismo hormonal, se alteran.

El individuo debe sacrificar algunas funciones y la reserva de nutrientes:

- El contenido total de potasio se reduce (FRENK y col., 1957).
- La cantidad total de hemoglobina disminuye, con lo cual desciende la demanda de oxígeno.
- Hay descenso en la producción de glóbulos rojos, lo cual provoca dilución de la sangre (VITERI y col., 1968).
- Disminuye el trabajo cardíaco, produciendo hipotensión. Para compensarla se produce taquicardia.
- Disminuye la filtración glomerular y la función tubular, con lo cual los mecanismos de acidificación están disminuidos. Antes de que esto ocurra, hay retención de sodio y aumenta la actividad antidiurética para incrementar el agua corporal total y extracelular. Sin embargo, el agua intracelular se reduce porque hay pérdida de masa corporal.
- Reducción de la capacidad física.

También ocurre:

- Disminución de la absorción intestinal, con lo cual disminuye la absorción de lípidos y de glucosa.
- Disminución de la capacidad de transporte de sustancias que se unen a proteínas en sangre.
- Disminución de la función gonadal.
- Reducción de la resistencia a la infección.
- El sistema inmunológico es afectado, incluida la inmunidad mediada por células: anticuerpos, fagocitos, complementos y lisozimas. Esto induce a estos pacientes a ser susceptibles de padecer infecciones severas.
- Disminuye la producción de jugos gástricos, pancreáticos y biliares, produciéndose alteración en las funciones de absorción.
- Diarrea, con lo cual hay malabsorción (VITERI y col., 1973).

2.1.3. DEFICIENCIA DE AMINOACIDOS ESENCIALES EN LA DIETA

La pregunta de cuáles son los aminoácidos indispensables para los humanos es muy importante para el mantenimiento de una buena nutrición en el adulto y para promover el crecimiento y el desarrollo en el niño, particularmente cuando la ingesta de proteínas está limitada o hay alguna enfermedad. La ausencia o deficiencia de aminoácidos esenciales en la dieta provoca un balance de nitrógeno negativo, pérdida de peso, anormal desarrollo en niños y jóvenes, deficiencias y síntomas clínicos. Existen una gran variedad de desórdenes clínicos, tales como anemia, edema, formación de cataratas, hipoproteinemia, cirrosis y muerte (ALBANESE, 1952).

La importancia de la proteína en la dieta se debe a ser fuente de aminoácidos. Algunos de ellos son esenciales (o indispensables), es decir, su esqueleto carbonado no es sintetizado por el organismo animal. Otros son no esenciales (o dispensables), es decir, pueden ser fabricados por el animal a partir de carbono y de nitrógeno precursores (MUNRO y CRIM, 1980).

Para el hombre, los aminoácidos esenciales son: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina; se debe señalar que cisteína y tirosina son sintetizados a partir de metionina y fenilalanina, respectivamente. Los aminoácidos no esenciales son:

alanina, arginina, ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina y serina, es decir, el organismo puede sintetizarlos a partir de precursores (MUNRO y CRIM, 1980).

Todos los aminoácidos, excepto la glicina, poseen un carbono asimétrico, es decir, existen dos isómeros ópticos activos que desvían el plano de la luz polarizada hacia la izquierda (levógiros) o hacia la derecha (dextrógiros). Sólo las formas L de estos aminoácidos isómeros pueden ser utilizados por el organismo para formar las proteínas. Existen transaminaciones que hacen que se pase de formas D a formas L, para que éstas puedan ser utilizadas (MUNRO y CRIM, 1980). La capacidad de utilizar D-aminoácidos está limitada a algunos aminoácidos que varían según las especies. El hombre sólo puede utilizar D-metionina y D-fenilalanina (MUNRO, 1969).

Los aminoácidos tienen cadena neutra, alifática o aromática. La clasificación de los aminoácidos en neutros, ácidos o básicos tiene especial importancia en el transporte a través de las membranas. En general, los aminoácidos neutros, ácidos o básicos entran en los tejidos por diferentes mecanismos de transporte.

Con respecto a los aminoácidos neutros, CHRISTENSEN (1964) describe dos tipos de mecanismos. El primero posee elevada afinidad por la alanina y por el ácido alfa-aminoisobutírico, un aminoácido sintético y no proteico. Es sensible este mecanismo a inhibidores respiratorios. El segundo mecanismo es relativamente insensible a inhibidores respiratorios y es el de los aminoácidos de cadena ramificada, intercambia aminoácidos neutros extracelulares por aminoácidos neutros intracelulares.

Finalmente, MEISTER (1973) ha propuesto un mecanismo localizado en la membrana celular y en el que se encuentra implicada la glutatiónina.

ROSE (1957) realizó estudios de balance de nitrógeno durante los años 40 y 50 en hombres voluntarios adultos y sanos que fueron alimentados con dietas deficientes en uno o más aminoácidos. Estos estudios definieron un grupo de 8 aminoácidos, de tal forma que cuando uno de esos aminoácidos fueron suprimidos de la dieta, los voluntarios rápidamente tenían un balance de nitrógeno negativo. Estos aminoácidos esenciales para mantener la salud en el adulto son: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina.

En un principio, para conocer la esencialidad o no esencialidad de los aminoácidos se realizaban estudios de balance de nitrógeno. Ahora se realizan estudios en poblaciones con diferentes aspectos clínicos y metabólicos.

Por ello, LAIDLAW y KOPPE (1987) amplían la clasificación de los aminoácidos hizo JACKSON (1983). Evaluaron la indispensabilidad de los aminoácidos individualmente según sus componentes estructurales (esqueleto carbonado y grupo amino). Sugieren que se reclasifiquen los

aminoácidos en cinco categorías basadas en la capacidad o en la incapacidad del organismo de sintetizar todo o parte de los aminoácidos, unido a posteriores revisiones de esta clasificación según la capacidad del organismo para sintetizar los aminoácidos en salud o en enfermedad:

1. Aminoácidos totalmente esenciales. Son: lisina y treonina. Sus esqueletos carbonados no pueden ser sintetizados "in vivo" y no pueden ser formados por transaminación. Se producen efectos metabólicos y nutricionales adversos si estos aminoácidos se suprimen de la dieta; *ningún precursor metabólico o producto puede ser sustituido por estos aminoácidos.*
2. Esqueleto carbonado esencial. Son: histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y valina. El esqueleto carbonado de estos aminoácidos no puede ser sintetizado por los humanos, pero pueden ser sintetizados por transaminación a partir de sus ketoácidos o hidroxiaácidos análogos. *La deficiencia en estos aminoácidos se manifiesta por un rápido balance de nitrógeno negativo.*
3. Condicionalmente esenciales. Puede reducir los requerimientos nutricionales de algunos aminoácidos esenciales; pueden ser esenciales si no se ingieren sus precursores. Son: tirosina, cisteína y, posiblemente, ornitina y citrulina.
4. Con esencialidad adquirida. Pueden ser esenciales en estados metabólicos como inmadurez o stress severo. Estas situaciones incluyen:
 - a) Inmadurez o síntesis de procesos en niños prematuros o recién nacidos (cisteína y tirosina).
 - b) Desórdenes genéticos en actividades enzimáticas (arginina, citrulina, cisteína y tirosina).
 - c) Enfermedades como fallo hepático crónico (cisteína, tirosina, arginina y citrulina).
 - d) Aminoácidos que pueden inyectarse en nutrición intravenosa (arginina y, posiblemente, citrulina).
5. No esenciales. Son: alanina, aspártico y glutámico. Su esqueleto carbonado es rápidamente sintetizado y su grupo amino es rápidamente transaminado.

Aunque hay datos de la esencialidad de la taurina en determinadas situaciones (nutrición parenteral, niños prematuros), se necesitan más estudios para caracterizar la indispensabilidad de este aminoácido.

BESSMAN (1979) sugiere que para que el desarrollo del organismo sea correcto deben mantenerse unos niveles apropiados de aminoácidos que aseguren la síntesis proteica; si la concentración de un aminoácidos en particular disminuye por debajo de un determinado nivel, la síntesis proteica también disminuye.

Cuando los humanos ingieren dietas con bajo contenido en nitrógeno, el balance de nitrógeno puede mantenerse mejor con una mezcla de aminoácidos esenciales (ANDERSON y HEINDEL, 1969).

Ratas que ingieren dietas que contienen sólo aminoácidos esenciales tienen menor peso que ratas que ingieren dietas con aminoácidos esenciales y no esenciales (HARPER, 1983). Cuando el nitrógeno no esencial es suprimido por una mezcla de aminoácidos esenciales, las ratas aumentan de peso y resulta más fácil mantener el balance de nitrógeno.

En la rata, se consideran aminoácidos esenciales: arginina, histidina, lisina, isoleucina, leucina, valina, fenilalanina, metionina, treonina y triptófano.

RABINOVITZ (1992) ha demostrado que la deficiencia de aminoácidos esenciales provoca una degradación en los mecanismos de iniciación de la cadena peptídica como resultado de una disgregación de los polirribosomas.

WARD y col. (1983) han demostrado que añadiendo un suplemento a la dieta estándar de un hospital (97 g de proteína y 1.600 kcal) de 42 g de proteína y 1.800 kcal, se incrementa la síntesis proteica corporal total y la degradación durante el período de ayuno.

Los requerimientos de proteínas son las cantidades necesarias ingeridas en la dieta para reemplazar obligatoriamente las pérdidas de nitrógeno. El total de pérdida diaria es de 54 mg. N/Kg. peso. Puede expresarse en forma de la proteína corporal que es necesario reemplazar diariamente de las fuentes de la dieta usando el factor de conversión $N \times 6.25$ para dar el peso de la proteína. El resultado final es una pérdida diaria de 0.34 g de proteína corporal /Kg de peso (MUNRO y CRIM, 1980).

El balance de nitrógeno está influenciado por la ingesta energética (INOUE y col, 1973). Así, dependiendo del valor energético de la dieta (huevo, arroz, etc.), los requerimientos mínimos de proteína varían.

Las necesidades proteicas durante los primeros seis meses de vida (GARZA y col, 1978) es de 2.4 g/Kg de peso y durante los siguientes seis meses es de 1.5 g/Kg, puesto que en el primer año de vida aumenta el peso en 7 Kg. Después disminuye a 1.1 g/Kg, necesitando el adulto 0.8 g/Kg. En la gestación se deposita 1 Kg de proteína en el feto. La madre necesita un aporte adicional de 30 g diarios.

Existen factores que influyen en los requerimientos de proteína (SCRIMSHAW y col., 1966):

- Stress: aumenta la eliminación de nitrógeno.
- Elevadas temperaturas: aumenta la eliminación de nitrógeno, y se compensa con la disminución de la excreción de nitrógeno urinario.

Los requerimientos de proteínas aumentan en un 100% durante la lactancia, de 0.4g/kg/día a 0.8 g/kg/día. Durante el embarazo, los requerimientos de proteínas aumentan un 27%, mientras el aumento de los requerimientos energéticos es de un 25% (MORRISON y NARAYANA, 1967).

En cuanto a las necesidades de proteínas y aminoácidos en enfermos, existen dos problemas: los requerimientos nutricionales durante la fase aguda y durante la recuperación. En cualquier caso, las pérdidas de proteínas en diferentes enfermedades son apreciables y es necesario reponerlas. En algunas enfermedades, la ingesta proteica está restringida, como ocurre cuando hay uremia, puesto que la capacidad de eliminar nitrógeno está disminuida. En el caso de uremia, si se administra al paciente 0.5 g. de proteína/Kg. de peso, resiste infecciones mejor que si se le administra 0.25 g. Para reducir la cantidad de nitrógeno excretado en pacientes con uremia, se les administra análogos de aminoácidos esenciales libres de nitrógeno.

La necesidad de aminoácidos esenciales, expresado como proporción del requerimiento de proteína, desciende marcadamente con la edad, desde un 54% en bebés hasta un 16% en adultos. Esto parece reflejar un cambio con la propia naturaleza de las necesidades proteicas, definidas éstas como mantenimiento (ingesta necesaria para el equilibrio de nitrógeno) + crecimiento (FAO/WHO/UNU, 1985). El descenso de los requerimientos de proteína para el crecimiento, que se hace cero en el adulto, con excepción del embarazo y la lactancia, es el responsable de la reducción del requerimiento proteico con la edad, ya que el componente de mantenimiento disminuye sólo ligeramente en la lactancia (MILLWARD y RIVERS, 1988).

Aunque en general se asume que se produce un descenso brusco en la utilización de aminoácidos esenciales cuando la ingesta excede el requerimiento óptimo, HEGER y FRYDRYCH

(1985) no han podido demostrar tal cambio constatando, de hecho, un descenso en la eficiencia de utilización de los aminoácidos casi lineal a medida que aumenta el nivel dietario de éstos desde un 60 a un 120% del requerimiento óptimo. Parece así que la cantidad de aminoácido catabolizado aumenta gradualmente antes de alcanzar un óptimo, sin cambios marcados cuando los niveles superan este punto, aunque reconocen la necesidad de más observaciones a elevados niveles de ingesta.

En el extremo opuesto, la carencia total o deficiencia de un aminoácido esencial en la dieta puede llevar a un balance de nitrógeno negativo, pérdida de peso, alteración del crecimiento en niños, deficiencias subclínicas y síntomas clínicos, los cuales pueden variar de acuerdo con el aminoácido deficiente.

Cuando se utiliza una dieta carente de un aminoácido esencial, la pérdida de nitrógeno corporal que se observa en los animales de experimentación varía con el tipo de aminoácido omitido, alcanzando un máximo cuando la dieta carece de aminoácidos azufrados, seguida en orden decreciente por dietas carentes de valina, treonina, isoleucina, triptófano, aminoácidos aromáticos, leucina y lisina (HEGER y FRYDRYCH, 1985).

La magnitud de la pérdida de nitrógeno, debida a deficiencia severa de aminoácidos, depende de la limitación de los aminoácidos endógenos, los cuales son importantes precursores de la síntesis proteica "de novo" (HEGER y FRYDRYCH, 1985). Se demuestra así que la metionina y la treonina son los dos primeros aminoácidos limitantes de origen endógeno, y que su suplementación a una dieta carente de proteína tiene un significativo efecto ahorrador de nitrógeno. En este sentido, la reducción en la secreción urinaria de nitrógeno provocada por suplementación de metionina y treonina, podría deberse a una mejora en la reutilización de los otros aminoácidos (YOKOGOSHI y YOSHIDA, 1976).

2.2. VISION GENERAL DEL METABOLISMO DE AMINOACIDOS

En los mamíferos, el catabolismo de los aminoácidos tiene lugar principalmente en el hígado. Aunque el riñón también participa, el músculo esquelético es relativamente inactivo y sólo interviene de manera esencial en la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada.

Los grupos amino comparten un finai común, al menos en los vertebrados, los cuales excretan el nitrógeno amínico en forma de urea, de amoníaco o de ácido úrico, según las especies. En

el Esquema I se resumen las vías degradativas del metabolismo de aminoácidos en hígado, músculo, riñón y cerebro.

Los esqueletos carbonados por degradación oxidativa se transforman en compuestos que pueden incorporarse al ciclo del ácido tricarboxílico.

Los grupos amino de la mayoría de los aminoácidos, se eliminan por transaminación al piruvato, al oxalacetato o al oxoglutarato para, finalmente, rendir glutamato.

En otros casos, los grupos amino se separan por desaminación oxidativa.

Los átomos de carbono se incorporan al ciclo del ácido tricarboxílico a través de cinco rutas, que implican al acetilCoA, oxoglutarato, succinato, fumarato y oxalacetato, respectivamente.

Los aminoácidos prolina, histidina, arginina, glutamina y ácido glutámico penetran por la vía del oxoglutarato. Metionina, isoleucina y valina se incorporan por la vía del succinato (esquema 1).

Cuatro átomos de carbono de la fenilalanina y de la tirosina entran en la vía del fumarato, y la asparragina y el ácido aspártico lo hacen por la vía del oxalacetato.

En los animales ureotélicos, la urea es el producto final en la excreción del nitrógeno amínico, y se forma en el hígado por el ciclo de la urea (LEHNINGER, 1972a).

2.3. DISTRIBUCION DE LOS AMINOACIDOS EN LOS COMPARTIMENTOS TISULARES

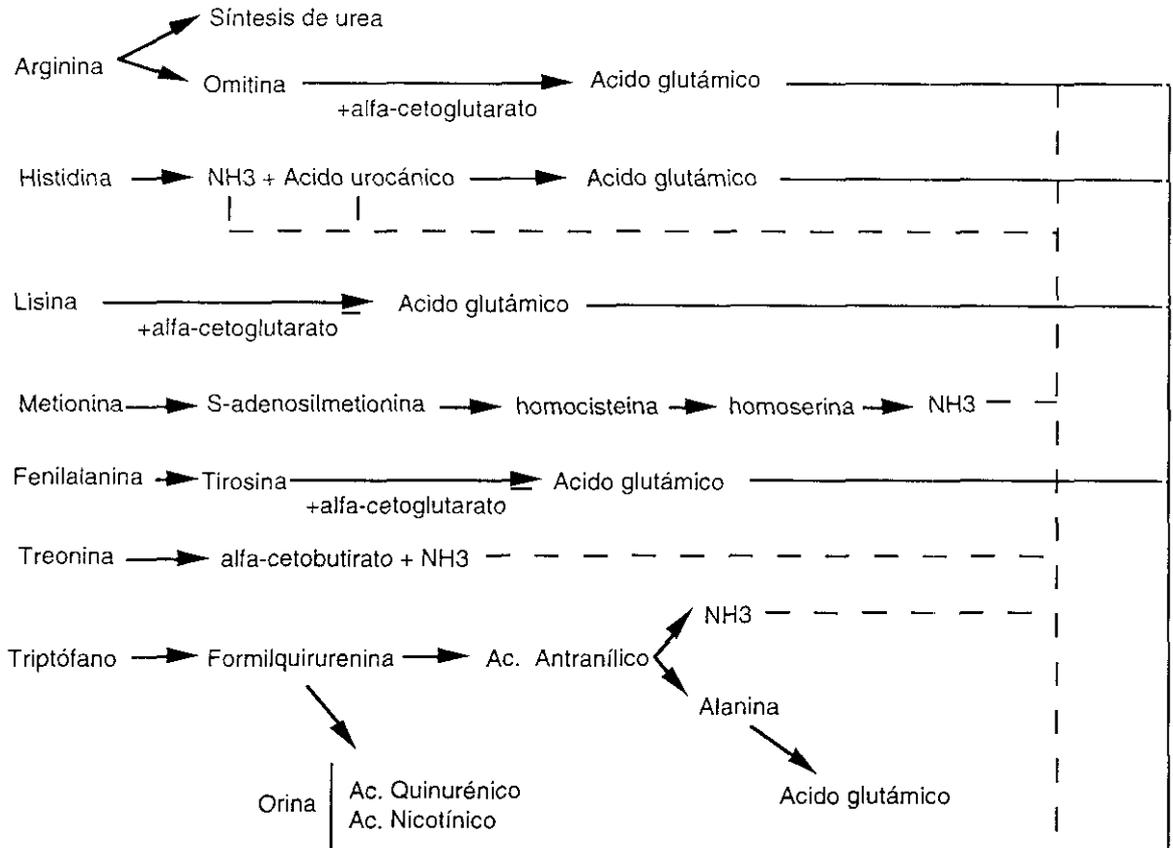
2.3.1. PROCESO DE ABSORCION

La concentración total de proteínas, como porcentaje del peso total, supone un 8.5% en niños y aumenta de 11 a 17.5% en el adulto, disminuyendo en personas ancianas. Existe un equilibrio en el estado normal entre la síntesis y la degradación proteica, favorecido en la síntesis. Se desplaza el equilibrio hacia la degradación durante el período de pérdida de proteína corporal. Tras la ingestión de comida, se almacenen proteínas en el hígado. En el período entre las comidas hay disminución de las proteínas del hígado. Estos cambios en el "pool" de proteínas son producidos por alteraciones en el balance de síntesis y degradación proteica (CLIFFORD, 1980).

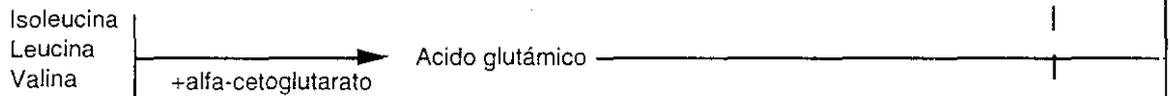
ESQUEMA 1: VIAS DEGRADATIVAS DEL METABOLISMO DE AMINOACIDOS

1. AMINOACIDOS ESENCIALES

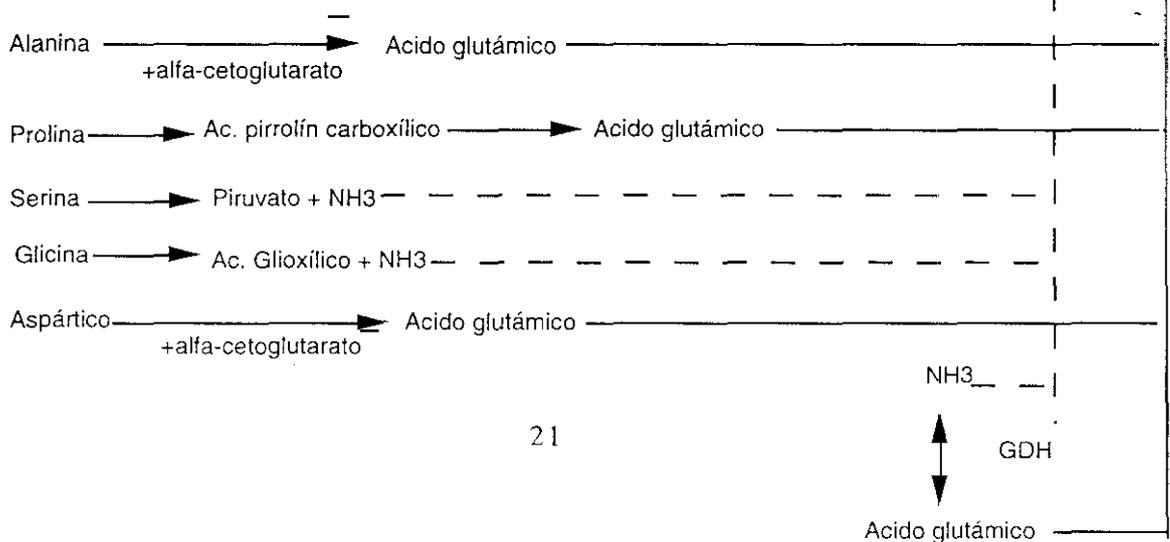
HIGADO



MUSCULO, RIÑON, CEREBRO



2. AMINOACIDOS NO ESENCIALES



La función principal de las proteínas de la dieta es el suministro de aminoácidos, elementos esenciales para la síntesis proteica. Dependiendo del contenido proteico dietario, cuando se rebasan las necesidades para mantenimiento y crecimiento, los aminoácidos en exceso son oxidados por enzimas reguladoras. Existe, pues, una fuente exógena dietaria que acompaña a una fuente endógena representada por la síntesis "de novo" de algunos de estos aminoácidos.

Las proteínas no se absorben, pero los péptidos pequeños y los aminoácidos libres por hidrólisis de las proteínas dietarias son absorbidos por el lumen del intestino delgado, pasando también a la circulación (WILSON, 1962).

La absorción de aminoácidos se realiza por procesos selectivos (ADIBI y col., 1967):

- Los aminoácidos que se absorben más rápidamente son: metionina, leucina, isoleucina y valina.
- Los ácidos aspártico y glutámico se absorben más lentamente.
- Triptófano y treonina son, de entre los esenciales, los que se absorben más lentamente.
- Los aminoácidos esenciales se absorben mejor que los no esenciales.
- Los D-aminoácidos se absorben por difusión pasiva.
- Los L-aminoácidos se absorben por transporte activo.

Los L-aminoácidos son utilizados de forma activa en humanos y en la mayoría de los animales por la estereoespecificidad de las enzimas. Se han inyectado por vía intravenosa a humanos (KIES y col., 1975) y a primates (STEGINK y col., 1980) soluciones razémicas de formas D y L; sólo las formas L se han incorporado a las proteínas.

La absorción de los aminoácidos esenciales está estimulada por bajos niveles de proteínas (KARASOV y col., 1987), estando afectada por el pH del lumen intestinal y depende de las necesidades de los aminoácidos, de su toxicidad y de los niveles dietarios de cada aminoácido (KARASOV y col., 1987).

La digestión de la proteína de la dieta comienza con el ataque de la pepsina secretada por el estómago, seguida de enzimas proteolíticas del páncreas y de la mucosa del intestino delgado, actuando los jugos gástrico, intestinal y pancreático (GITLER, 1964).

- En el jugo pancreático se distinguen las siguientes enzimas:

- * La tripsina: hidroliza la unión lisina y arginina en la cadena polipeptídica.
- * La quimiotripsina: la unión de aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr y Trp) con la cadena polipeptídica.
- * La elastasa: aminoácidos neutros.
- * Las exopeptidasas: el final de la cadena peptídica en el carboxílico terminal.
- En el jugo intestinal se hidroliza la parte final de la cadena peptídica en el nitrógeno terminal.

Los compuestos resultantes de todas estas hidrólisis son absorbidos por las células de la mucosa del intestino delgado en forma de aminoácidos libres. Estudios de SCHULTZ y CURRAN (1970) confirman que el transporte de aminoácidos a través de la mucosa es energético-dependiente y los transportadores son específicos para aminoácidos neutros, ácidos y básicos.

Como media, se secretan 70 g de proteína en el hombre por el intestino al día. Si a esto se le suman los 100 g de proteína consumidos por término medio por una persona, se tiene un total de 170 g en el lumen intestinal disponible para ser absorbidos. Como el nitrógeno fecal excretado es de aproximadamente 10 g de proteína diaria, se absorbe unos 160 g de proteína al día (MUNRO, 1969).

Las células epiteliales de la mucosa intestinal se reemplazan continuamente. La deficiencia proteica disminuye la división de las células epiteliales de la mucosa, con lo cual la absorción es menor (MUNRO y GOLDBERG, 1964). Además, se ha puesto de manifiesto que ratas alimentadas con deficiencia en proteína disminuyen la secreción de proteínas en el intestino, disminuyendo también la absorción de las mismas (TWOMBLEY y MEYER, 1961).

BEHAR (1975) puso de manifiesto que en deficiencia proteico-calórica, la mucosa intestinal disminuye su espesor, siendo similar a la encontrada en malabsorción intestinal.

2.3.2. TRANSPORTE DE AMINOACIDOS A TRAVES DE LA MEMBRANA CELULAR

Tradicionalmente, se considera que existen, al menos, tres sistemas de transporte de membrana en el intestino humano: para los aminoácidos libres básicos y para los aminoácidos libres neutros (McCARTHY y col., 1964; THIER y col., 1965; SHIH y col., 1971). Hay también transportadores

para aminoácidos individuales como metionina (HOOFT y col., 1964), triptófano (DRUMMOND y col., 1964) y prolina (GOODMAN y col., 1976).

KARASOV y col. (1986) mostraron que en el intestino de ratas existen, al menos, seis transportadores, incluidos los Na⁺-dependientes para la mayoría de los aminoácidos (neutros, básicos, ácidos o iminos), además de otros transportadores Na⁺-independientes. Se consideran los siguientes:

- Na⁺-dependiente para los aminoácidos neutros,
- Na⁺-dependiente para los aminoácidos básicos, y parte de los aminoácidos neutros,
- Na⁺-dependiente para el aminoácido imino prolina,
- Na⁺-dependiente para los aminoácidos ácidos,
- Na⁺-independiente para los aminoácidos neutros y básicos, con baja afinidad por los aminoácidos iminos o ácidos,
- Na⁺-independiente para los aminoácidos ácidos.

Prolina y aspártico tienen su propio transportador. En ingestas ricas en proteína, las cantidades de prolina y de aspártico aumentan significativamente. Los aminoácidos neutros leucina y metionina tienen un transportador para aminoácidos neutros en el intestino de ratas. La lisina tiene un transportador distinto de los transportadores para los aminoácidos neutros, pero el transportador de la lisina puede transportar la leucina y, probablemente, parte de otros aminoácidos neutros. La alanina utiliza un transportador para los aminoácidos neutros utilizado por leucina, metionina y otros aminoácidos esenciales. KARASOV y col. (1987) concluyen que todos estos transportadores son estimulados por altas ingestas de proteínas, y deprimidos por falta de nitrógeno.

Recientemente, se ha demostrado que el transporte a través de la membrana de los aminoácidos neutros en el músculo esquelético está mediado por, al menos, cuatro sistemas diferentes: sistema A, ASC, L y Nm (CHRISTENSEN, 1990; BONADONNA y col., 1993). Esta clasificación de los sistemas de transporte de aminoácidos es operacional, ya que está basada en la única cinética característica exhibida por el transporte de aminoácidos análogos no metabolizables a través de la membrana celular en los sistemas "in vitro".

Los sistemas A, ASC y Nm son sodio-dependientes y mantienen el gradiente a través de la membrana de la concentración de aminoácidos. Por contra, el sistema L no necesita sodio para operar. Todos estos sistemas muestran una especificidad parcial, pero no absoluta, sobre sus sustratos.

La mayoría de los aminoácidos son transportados por más de un sistema de transporte. Los aminoácidos transportados por el sistema de transporte A son: glicina, alanina, treonina, asparragina, serina y metionina. Tanto alanina como metionina también pueden ser transportados por los sistemas ASC y L. Así, el sistema de transporte ASC transporta alanina, serina, cisteína, aminoácidos homólogos de hasta cinco átomos de carbono y prolina, mientras que el sistema de transporte L transporta los aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada.

Puesto que el sistema A de transporte está caracterizado por una transinhibición (CHRISTENSEN, 1990), un descenso en la concentración intracelular de aminoácidos podría aliviar la inhibición del transporte interno y aumentar su eficiencia, mientras simultáneamente hay un aumento en el sustrato del sistema de transporte A.

Para aumentar la actividad del sistema A de transporte, la insulina podría aumentar el flujo unidireccional de metionina y alanina (BONADONNA y col., 1993). Para medir la actividad del sistema A de transporte "in vivo", BONADONNA y col. (1993), infundieron insulina a siete personas sanas. Los balances de fenilalanina y tirosina cambian hacia un balance cero, mostrando que tanto la síntesis como la degradación están en equilibrio durante la hiperinsulinemia. Un balance de nitrógeno negativo de alanina, metionina, glicina, treonina y asparragina se dan también con una hiperinsulinemia. Así, BONADONNA y col. (1993) concluyen que la hiperinsulinemia estimula la actividad del sistema A de transporte de aminoácidos en el músculo esquelético humano.

El sistema de transporte de aminoácidos a través de la membrana juega un papel importante en la regulación del balance proteico en el músculo esquelético (CHRISTENSEN, 1990). Esta afirmación se sugiere por varias observaciones:

1. En estado postabsortivo, la mayoría de los aminoácidos están concentrados en el compartimento intracelular en contra de sus gradientes electroquímicos (DEL PRATO y col., 1990; CHRISTENSEN, 1990). Este fenómeno implica que la operación del sistema de transporte está realizada por un gradiente activo.
2. La insulina y otras hormonas (SHOTWELL y col., 1983) "in vitro" demuestran un aumento de la translocación de algunos aminoácidos en la célula y un incremento de la concentración intracelular de aminoácidos para estimular la síntesis proteica (MARSHALL y MONZON, 1989).

En hepatocitos se ha descrito otro sistema para la captación de glutamina, asparragina, histidina y análogos (KILBERG y col., 1980). Se denomina sistema N para indicar la presencia de nitrógeno en su cadena, y puede que sea exclusivo de los hepatocitos, puesto que no ha sido completamente caracterizado en otros tipos de células (KILBERG, 1982). Está sujeto a regulación por la

disponibilidad de aminoácidos del sistema L (SHOTWELL y col., 1982). Así mismo, en hepatocitos se han identificado dos sistemas, denominados L1 y L2 (WEISSBACH y col., 1982). El sistema L1 posee elevada actividad y baja capacidad descendiendo su actividad después de 24 horas de cultivo celular. El L2 posee las cualidades opuestas.

Por otra parte, los eritrocitos humanos poseen un sistema de transporte independiente del Na^+ , que es específico de los aminoácidos aromáticos: triptófano, fenilalanina y tirosina (ROSENBERG y col., 1980) y se ha designado como sistema T. Recientemente se ha confirmado la actividad del sistema T en hepatocitos (SALTER y col., 1986).

Para los aminoácidos catiónicos ha sido descrito, en células Ehrlich, fibroblastos humanos y otros tipos de células, el sistema Y^+ (WHITE y CHRISTENSEN, 1982). Este es independiente del Na^+ , insensible al pH, y está sujeto a transestimulación. Es escasamente detectable en hepatocitos aislados, ya que el transporte de arginina al interior de los hepatocitos es el paso limitante de su metabolismo (WHITE y CHRISTENSEN, 1982), y va a servir de barrera entre la arginina intracelular y plasmática, ya que la primera es completamente hidrolizada por la arginasa, para permitir la función del ciclo de la urea.

Cada aminoácido puede salir de la célula gracias a los mismos sistemas, aunque la intervención de éstos en el transporte puede ser diferente en la salida y en la entrada (BATTISTIN y col., 1972). La principal diferencia se piensa que reside en las afinidades de cada transportador por los aminoácidos de cada lado de la membrana, siendo mayor la K_m en un sentido (salida) que en el otro (CHRISTENSEN y HANDLOGTEN, 1968).

Aunque la saturación y la especificidad son dos de las características esenciales del transporte de aminoácidos, PARDRIDGE y JEFFERSON (1975) demuestran en hígado y BAÑOS y col. (1973) en músculo esquelético, que el transporte de un cierto número de aminoácidos no se satura a las concentraciones plasmáticas normales, de tal modo que un aumento en la concentración en plasma incrementaría el transporte y provocaría una elevación de la concentración intracelular.

Se ha sugerido que la inhibición del transporte de algún aminoácido, por un exceso en la dieta de otro con el que compite, pueda ser responsable de la toxicidad del aminoácido en exceso (HARPER y col., 1970) gracias al fenómeno de competencia.

2.3.3. DISTRIBUCION DE LOS AMINOACIDOS EN LOS TEJIDOS

La proteína consumida en la dieta es enzimáticamente hidrolizada en el tracto digestivo y pasa a la sangre en forma de aminoácidos libres. La distribución de los aminoácidos individuales entre las proteínas corporales y el "pool" de aminoácidos libres en tejidos de ratas jóvenes fué estudiado por CHRISTIANSEN (1964).

Los aminoácidos pueden sufrir tres rutas metabólicas (MUNRO, 1964):

1. Parte del "pool" de aminoácidos libres es incorporado a proteínas tisulares. A causa del catabolismo proteico tisular, estos aminoácidos vuelven al "pool" de aminoácidos libres después de un tiempo variable y después de haber estado disponibles y haberse reutilizado.
2. Parte del "pool" de aminoácidos libre sufre reacciones catabólicas. Hay pérdida del esqueleto carbonado en forma de CO₂, o depositados como glucógeno y grasa, mientras el nitrógeno es eliminado como urea.
3. Algunos aminoácidos libres son utilizados para síntesis de nuevos compuestos nitrogenados, como bases de purina, creatinina y epinefrina. Siguiendo una degradación sin retorno a productos finales. Así, las purinas son degradadas a ácido úrico, la creatina a creatinina y la epinefrina a ácido vanilmandélico. En resumen, los aminoácidos no esenciales son sintetizados en el organismo utilizando grupos aminos derivados de otros aminoácidos.

Para conocer la proporción de estos aminoácidos en los animales, DALGLEISH Y TABECHAN (1956) administraron dosis uniformes de L-tirosina, L-fenilalanina o L-triptófano marcados a ratas. Midieron la proporción de radiactividad absorbida y excretada durante las cuatro primeras horas en forma de CO₂ o reconvertidas en componentes no proteicos. 15 minutos después, del 20 al 40% de la radiactividad absorbida de los 3 aminoácidos son recuperados como compuestos ácidos solubles en el hígado y en el músculo. Considerables cantidades de compuestos radiactivos no aromáticos indican rápida ruptura de los aminoácidos. 4 horas después, del 34 al 51% de la radiactividad absorbida se unen a proteínas. Todas estas magnitudes dependen del estado nutricional del animal.

Tras la absorción, el músculo libera glutamina y alanina y, en menor cantidad, glicina, lisina, proína, treonina, histidina, leucina e isoleucina (GODBERG y CHANG, 1978b). Alanina y glutamina suponen el 50% del total de alfa-aminonitrógeno liberado por el músculo. Estos dos

aminoácidos son sintetizados en el músculo "de novo" utilizando como grupo carboxílico fragmentos de piruvato y de lactato, y como grupo amino leucina, isoleucina, valina y aspartato, liberados por el músculo (FELIG, 1975). Los aminoácidos de cadena ramificada suministran la mayor parte de los grupos amino para la producción de alanina. Las cantidades de alanina y glutamina producidas y liberadas por el músculo dependen de la concentración de amonio en el músculo. Si aumenta la concentración de amonio, aumenta la glutamina y disminuye la alanina (GOLDBER y CHANG, 1978b).

Las proteínas se degradan a péptidos intermedios y éstos a aminoácidos libres, (GODLBERG y col., 1976). Los polipéptidos largos y con puntos isoeléctricos ácidos se degradan más rápidamente que los polipéptidos pequeños y con puntos isoeléctricos básicos. Proteínas y polipéptidos anormales o incompletos y que contienen errores de síntesis o aminoácidos análogos son degradados rápidamente (GOLDBERG y CHANG, 1978).

Las concentraciones tisulares de aminoácidos libres reflejan el balance entre las tasas de oxidación, las tasas de intercambio con el plasma y el movimiento neto dentro o fuera del "pool" de proteínas. En el ayuno, la única fuente de aminoácidos libres son los que provienen de la degradación proteica. La liberación de los aminoácidos libres por la degradación proteica que ocurre en el ayuno no supone necesariamente un incremento drástico en la concentración de aminoácidos. La Km de la mayoría de las transaminasas es mucho mayor que las concentraciones de los aminoácidos libres en los tejidos, y los aminoácidos pueden ser rápidamente introducidos en la ruta metabólica (KREBS, 1972).

Existe una desproporcionada entrada en el "pool" de aminoácidos libres de la metionina y de los aminoácidos de cadena ramificada durante la degradación proteica. Esto es posible porque los aminoácidos de cadena ramificada liberados como consecuencia de la degradación proteica en tejidos y órganos como el hígado, pueden ser desaminados en el músculo, ya que la concentración de transaminasas para estos aminoácidos es elevada en el mismo (ICHIHARA y KOYAMA, 1966).

Durante la absorción, los nutrientes son canalizados por la vía oxidativa a depósitos de grasa, glucógeno y proteína tisular. Durante el ayuno, estos depósitos son movilizados y metabolizados. Cambios en la proporción de grasas, carbohidratos y proteínas se reflejan en el llamado cociente respiratorio. Así, pues, el cociente respiratorio es mayor durante el día, particularmente después de las comidas cuando la absorción de nutrientes es máxima, y menor durante la noche cuando la absorción de nutrientes es mínima (FLATT, 1978). Del mismo modo, la excreción de nitrógeno urinario sigue el mismo ritmo, relacionado con la absorción de las comidas (STEFFEE y col., 1981).

La cuantificación de la respuesta metabólica a la ingesta alimentaria se ha conseguido por medición de análisis de gases, los cuales se han realizado en la fase de post-absorción (tras una

noche de ayuno) y 2-4 horas después de haber comido. En la fase de ayuno, la energía se obtiene de la grasa, carbohidratos y proteínas; pero tras un ayuno prolongado cambian, puesto que la energía se obtiene por la oxidación de las proteínas, debido al agotamiento de hidratos de carbono y grasas.

La grasa y los carbohidratos sirven primeramente como fuentes de energía, pero las proteínas proporcionan la mayor parte de los elementos estructurales y funcionales del organismo. Durante el ayuno, el "turnover" del "pool" de aminoácidos corresponde a la degradación de alrededor de 10 g. de proteína por hora. Después de comer, se degradan 6 gramos por hora. El mantenimiento de las reservas proteicas a través del control de la síntesis proteica y la degradación y oxidación de aminoácidos durante los ciclos de comida y ayuno, es de vital importancia para la preservación de la integridad y la función tisular (McNURLAN y GARLICK, 1989).

GELFAND y BARRETT (1987) demuestran que la insulina produce un descenso de la degradación proteica y un aumento de la concentración intracelular de aminoácidos. De hecho, DEL PRATO y col. (1990), demostraron un aumento generalizado de la concentración intracelular de aminoácidos en el músculo tras una infusión de insulina sistémica.

Cada aminoácido es degradado siguiendo una secuencia especial de reacciones químicas (KAPLAN y PITOT, 1970). 7 de los 10 aminoácidos esenciales de la rata son degradados en el hígado, mientras que los aminoácidos de cadena ramificada son catabolizados en el músculo, en el riñón y en el cerebro. Los aminoácidos de cadena ramificada sufren una transaminación en el músculo y el grupo amino es transferido al piruvato y glutamato para producir respectivamente, alanina y glutamina. En el intestino, la alanina y el ácido glutámico formados pasan a través del sistema porta al hígado. Esto facilita el transporte del nitrógeno amino del hígado para la formación de urea, mientras que el carbono de la alanina es utilizado vía gluconeogénesis.

Respecto a la toxicidad, si disminuye la producción de urea hay una acumulación de amoníaco tóxico, a menos que se utilice para síntesis de aminoácidos, y éstos incrementen la síntesis proteica. Tanto en ratas (STEPHEN, 1968) como en niños (STEPHEN y WATERLOW, 1968), la disminución de la actividad del ciclo de la urea va acompañada de un aumento en la actividad de la aminoacil-tRNA-transferasa. La síntesis proteica no puede tener lugar a menos que los aminoácidos esenciales estén disponibles en cantidades adecuadas.

La toxicidad potencial y la influencia de los aminoácidos aromáticos sobre la síntesis de neurotransmisores son dos razones por las que se explica el hecho de que las concentraciones de aminoácidos en tejidos sean bajas y constantes (POGSON y col., 1986).

Los aminoácidos esenciales tienden a ser tóxicos a elevadas concentraciones, mientras que los aminoácidos no esenciales son menos tóxicos (HARPER y col., 1970). De los aminoácidos no

esenciales, los más tóxicos son prolina y aspártico, y de los aminoácidos esenciales, lisina, metionina y leucina (KARASOV y col., 1987). La glutamina, en el hombre, actúa como agente detoxificante (MEISTER, 1979).

2.3.4. INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE EL NIVEL TISULAR DE AMINOACIDOS

El suministro de aminoácidos no sólo estimula la síntesis proteica, sino que también inhibe la degradación proteica en músculo (ATWELL y col., 1977), incrementándose la oxidación de los aminoácidos durante la comida, especialmente con ingestas elevadas de proteínas (GARLICK y FERN, 1985).

El "pool" de aminoácidos libres no constituye una reserva; se agotan rápidamente si cesa la afluencia de los mismos y, además, están sometido a cambios.

Así, el hígado está expuesto a grandes fluctuaciones en la concentración de aminoácidos, aunque parece tener una gran capacidad para contrarrestarla. Al perfundir un hígado de rata con distintas concentraciones iniciales de aminoácidos, se observa que para la mayoría de éstos, la concentración final en el órgano perfundido tiende a un valor fijo (BLOXAM, 1971). Esta afirmación no es aplicable a los aminoácidos de cadena ramificada, ya que la iniciación de su catabolismo es más bien muscular.

A pesar de la acción amortiguadora del hígado, durante el día se producen fluctuaciones en la concentración de aminoácidos en sangre periférica y músculo (LUNN y col., 1976). Estos ritmos diurnos, estudiados por WURTMANN (1970), probablemente tienen su causa en la afluencia de aminoácidos procedentes de la dieta.

Otros cambios mayores y de más larga duración, se observan por la acción de dietas deficientes en proteína y energía. En este sentido, MUNRO (1970), señala que la deficiencia de proteína dietaria produce una reducción de hasta el 50% en la concentración de aminoácidos esenciales, con aumentos del mismo orden en los no esenciales.

WANNENMACHER y ALLISON (1968) observan que la concentración total de aminoácidos esenciales se eleva al aumentar la ingesta proteica con distintos niveles de caseína en: suero, hígado y músculo de ratas, excepto a niveles muy altos. Al ser mayor el aumento que se produce en la concentración de aminoácidos no esenciales, disminuye la relación aminoácidos esenciales/no esenciales.

En el caso de ayuno, los cambios son opuestos a los producidos en la deficiencia proteica. En este sentido, MUNRO (1970) observa en ratas que la concentración de aminoácidos esenciales en músculo se incrementa un 150%, mientras la de no esenciales desciende. El ayuno también induce un aumento en la concentración de aminoácidos esenciales en el músculo (MILLWARD y col., 1974a), presumiblemente por un descenso de la síntesis proteica y un aumento en la degradación.

La síntesis proteica muscular en adultos sanos no responde rápidamente a la influencia de los nutrientes ingeridos por la dieta; hasta, al menos, 10 horas después de haber comido, no hay estimulación en la síntesis proteica (McNURLAN y col., 1993). No está clara la respuesta del metabolismo proteico sobre la ingesta dietaria en el hombre adulto. Estudios llevados a cabo por RENNIE y col. (1982) y CONWAY y col. (1988) sugieren que la tasa de síntesis proteica está más aumentada tras haber comido que en ayunas. Sin embargo, otros estudios con la misma metodología muestran que no hay estimulación en la síntesis proteica con la alimentación, pero sí que hay un descenso en la degradación proteica (BRUCE y col., 1990).

Estudios en animales en crecimiento demuestran un aumento de un 43% en la tasa de síntesis proteica muscular dentro de la primera hora de haber comido (GARLICK y col., 1983). McNURLAN y col. (1993), demuestran que hay cambios en la glucosa plasmática, insulina, glucagón y cortisol dentro de la primera hora tras la ingesta.

Estudios llevados a cabo por BAILLIE y GARLICK (1991b) podrían sugerir que la síntesis proteica muscular en ratas adultas es mucho menos sensible a los cambios nutricionales que en animales en crecimiento.

2.4. MANIFESTACIONES DE LAS DEFICIENCIAS DE AMINOACIDOS

2.4.1. CRECIMIENTO, INGESTA Y COMPOSICION CORPORAL

En malnutrición proteico-energética se produce:

- Disminución de la actividad, como consecuencia de la disminución de la energía de la dieta.

- Reducción del crecimiento, como consecuencia de la reducción de la energía de la dieta y la ingesta de proteínas. En el músculo esquelético, la reserva de proteínas y de grasa disminuyen (WATERLOW, 1963). El peso corporal disminuye y la homeostasis es anormal.

El incremento de peso corporal en un niño normal es de 5-6 g/kg en los primeros 6 meses de vida, de 2-3 g/kg en los segundos 6 meses y de 0,5-0,6 g/kg en el segundo año (PASSMORE y col., 1974).

La ingesta dietaria, dentro de límites fisiológicos, proporciona la energía suficiente para satisfacer el crecimiento. No es sorprendente, por tanto, que los requerimientos dietarios de nutrientes y la eficiencia en su utilización están relacionados con la ingesta de calorías (MORRISON y NARAYANA, 1967).

El organismo es capaz de obtener energía de las reservas proteicas, si la ingesta calórica es inadecuada. Un incremento en la ingesta calórica permite una utilización más eficiente del nitrógeno dietario para la síntesis de proteína corporal y para el mantenimiento de la integridad de los tejidos (MORRISON y NARAYANA, 1967).

Cuando se omite un aminoácido esencial en la dieta, el animal responde como si se le hubiese administrado una dieta carente en todos los aminoácidos esenciales. Sin embargo, los datos que se poseen no confirman totalmente esta afirmación, de manera que cuando se administra a ratas adultas dietas sin metionina o lisina, pierden menos peso que cuando se les da una dieta sin proteínas (SAID y col., 1974a; 1974b). *Cuando se elimina la treonina de la dieta, la respuesta sí es semejante a la carencia de proteína.*

La ingesta también se ve afectada en las deficiencias de aminoácidos, según el que sea omitido. Ratas a las que no se les administra lisina mantienen ingestas relativamente satisfactorias, en comparación con los animales deficientes en isoleucina o valina (SIDRANSKI y BABA, 1960).

Cuando la dieta carece de proteína, los animales son capaces de mantener un nivel de ingesta satisfactoria en comparación con los alimentados con dietas deficientes en un único aminoácido (VELU y col., 1972).

La síntesis proteica tisular puede tener lugar si hay un adecuado aporte de energía. Una restricción energética en la dieta consumida se asocia con un aumento en el catabolismo proteico, y el animal utiliza sus reservas de proteínas para corregir la deficiencia calórica (MORRISON y NARAYANA, 1967).

La composición corporal también está influida por la dieta. Elevadas ingestas de proteínas aumenta el peso corporal comparado con ratas con bajas proteínas en su dieta (HARTSOOK y col., 1973). Ratas alimentadas con dietas con un 25% de proteína tienen menos grasa corporal que dietas isoenergéticas con un 5% de proteínas (DONALD y col., 1981).

La eficiencia en la utilización está también afectada por la composición de la dieta. HARTSOOK y HERSCHBERGER (1963) han demostrado que el crecimiento óptimo de la rata se lleva a cabo con una dieta del 40% de proteína.

TAYLOR y col. (1986) realizaron la siguiente experiencia: administraron a 90 ratas desde los días 9 a 14 del experimento, tres dietas con un 12, 24 y 40% de caseína, a la vez que dos niveles de grasa (2.26 y 13.82% de aceite de maíz "ad libitum"). Observaron que:

- sólo los cambios en el peso corporal y en el agua corporal están afectados por la dieta. La pérdida de peso corporal fué significativamente menor en ratas alimentadas con dietas bajas tanto en proteínas como en grasas,
- los cambios en la masa de la grasa corporal no estaban afectados por la dieta,
- la mayor pérdida de peso corporal se produce en ratas que ingieren las dietas con mayor cantidad de proteína,
- la mayor pérdida de agua corporal se produce en ratas que ingieren las dietas con mayor cantidad de proteína y de grasa.

La deficiencia proteica en los primeros momentos de la vida deteriora la tolerancia a la glucosa y disminuye la secreción de insulina tanto en el hombre (HADDEN, 1967) como en animales de laboratorio (OKITOLONDA y col., 1987; SWENNE y col., 1987). Siguiendo una rehabilitación nutricional, el crecimiento se reanuda, la tolerancia a la glucosa se normaliza, pero la secreción de insulina puede continuar deteriorada.

Los estudios de CRACE y col. (1991) están de acuerdo con los de OKITOLONDA y col. (1988), en los cuales durante la fase aguda de malnutrición, la secreción de insulina está más afectada por la deficiencia proteica que por la restricción energética, como también sucede en niños con kwashiorkor y marasmo (BECKER y col., 1971).

2.4.2. CAMBIOS MORFOLOGICOS

El retraso del crecimiento en niños es un signo normal en muchos países en donde no están alimentados adecuadamente. El crecimiento es relativamente bueno hasta los 4-6 meses de edad, pero hay un retraso especialmente marcado en los primeros 3-4 años de vida (DEMAEYER, 1976b).

Después de 15 días de una dieta sin proteínas, hay atrofia del pelo y un descenso en la pigmentación. La anatomía microscópica de la membrana de las mucosas de la boca también están modificadas por la falta de proteínas. En condiciones normales, el número de células jóvenes excede al número de células maduras (BRADFIELD y col., 1967).

Experiencias como las que muestran cambios histopatológicos en el páncreas exocrino de rata alimentadas "ad libitum" sin lisina (SCOTT, 1966) o alteraciones degenerativas en el músculo esquelético de ratas con deficiencia en isoleucina (SCOTT, 1956), indican que muchas de las alteraciones en el caso de dietas administradas de modo forzado se asemejan a las producidas "ad libitum", con la diferencia de que en este segundo caso se necesita un mayor período de experimentación.

2.4.3. CAMBIOS BIOQUIMICOS

La administración de manera forzada de dietas carentes de treonina (SIDRANSKI y col., 1969), arginina, leucina, isoleucina y fenilalanina (SIDRANSKI y VERNEY, 1964), provoca un aumento del glucógeno hepático, efecto que también se observa con la carencia de treonina, valina o lisina, pero no de metionina (SIDRANSKI y BABA, 1960).

Se observa también en las dietas carentes de aminoácidos administradas forzosamente, un significativo aumento en el contenido lipídico del tejido hepático (SIDRANSKI y VERNEY, 1964), lo cual se atribuye a un aumento de la movilización de ácidos grasos y descenso en el transporte de éstos, desde el hígado al plasma, así como la utilización y oxidación de los ácidos grasos hepáticos (LYMAN y col., 1964).

Por último, la administración de dietas carentes de un aminoácido esencial va acompañada, con frecuencia, de cambios profundos en el metabolismo proteico de ciertos órganos y tejidos. Así, se observa un descenso en la proteína muscular en gastrocnemio de ratas carentes de

treonina, metionina, valina, lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina o triptófano (SIDRANSKI y VERNEY, 1970), siendo especialmente marcado el descenso en la privación de isoleucina, leucina y valina.

El descenso en la síntesis proteica muscular es especialmente marcado en la deficiencia de isoleucina, mientras que aquella también se ve inhibida al administrar de manera forzada dietas carentes de treonina, fenilalanina y valina (SIDRANSKI y VERNEY, 1970).

En deficiencia proteica, los niveles de albúmina sérica disminuyen antes de que aparezcan los síntomas clínicos, incluida la reducción del crecimiento (WHITEHEAD y ALLEYNE, 1971). Hay *moderada anemia hipocrómica en asociación con moderada malnutrición proteico-energética* (DEMAEYER, 1976a). Los niveles de hemoglobina están alrededor de 10 g/100 ml de sangre. Hay deficiencia proteica, normalmente asociada con una reducida disponibilidad del hierro dietario, lo cual contribuye a la anemia.

La relación AAE/AANE en plasma aumenta en las primeras fases de la malnutrición proteica, antes de la aparición de los síntomas clínicos y del retraso en el crecimiento. Estos signos no son constantes y pueden verse modificados en presencia o asociados a deficiencia energética (WHITEHEAD y ALLEYNE, 1971).

El valor de la albúmina sérica puede considerarse como un signo de malnutrición proteica (WHITEHEAD y col., 1971). La medida de la pre-albúmina ha sido propuesta por INGENBLEEK y col. (1972) como un indicador de la deficiencia proteica.

La determinación de los aminoácidos y de la hidroxiprolina también proporcionan información acerca de la deficiencia proteica, puesto que la disminución de los aminoácidos es característica del kwashiorkor (WHITEHEAD, 1969). Cuando la hidroxiprolina está baja, es frecuente la aparición de infecciones.

ARROYAVE y WILSON (1961) han demostrado que la creatinina es más baja en niños con malnutrición. La excreción de creatinina es proporcional a la masa muscular total, y sus niveles descienden cuando hay signos de retraso en el crecimiento.

Las alteraciones morfológicas y bioquímicas en animales privados de un aminoácido *esencial son las mismas si se inducen por métodos forzados o "ad libitum"*. Sin embargo, los animales alimentados "ad libitum", sobreviven más tiempo y necesitan de un período más largo para manifestar la acumulación hepática de glucógeno y lípidos.

2.4.4. OTROS EFECTOS

La deficiencia de triptófano, fenilalanina o vitamina B₆ en ratas (SUNDAE, 1972) disminuye la respuesta de anticuerpos frente al antígeno (GERSHOFF y col., 1968).

La malnutrición altera el sistema inmunológico y provoca una disfunción en el metabolismo de las purinas (CLIFFORD, 1980). Así, GURNEY (1979) demostró que niños con malnutrición proteico-calórica son más susceptibles de padecer infecciones respiratorias y diarreas, puesto que la resistencia a la infección depende de la actividad leucocitaria, la integridad epitelial, la flora intestinal y la función endocrina, y todo esto está afectado en la deficiencia proteico-calórica.

La malnutrición proteico-calórica afecta a los linfocitos T y B (KEUSCH y col., 1983). Tiene lugar una marcada disminución de linfocitos a partir del timo y atrofia de la glándula (CHANDRA, 1983). Deficiencias en proteína y energía afectan e inhiben ambos tipos de inmunidad (RAMALINGASWAMI, 1975). SHETTY y col., (1979) demuestran que las tasas del "turnover" de inmunoglobulinas circulantes no están reducidas en la malnutrición. CHANDRA (1983) demostró que niños con malnutrición severa tienen una capacidad reducida para la producción de anticuerpos y células del sistema inmunitario.

La producción de varios componentes del complemento está disminuida en malnutrición severa (KEUSCH y col., 1983).

Las consecuencias de todas estas alteraciones en malnutrición proteico-energética severa son una gran predisposición a infecciones y a complicaciones severas que de otra manera serían enfermedades infecciosas de menor importancia (TORUN y VITERI, 1988).

Los defectos en las funciones inmunes desaparecen con la rehabilitación nutricional (CHANDRA, 1981).

La malnutrición provoca alteraciones en la conducta, no por la alteración de las estructuras físicas del cerebro, tales como el contenido total de DNA o de mielina del cerebro, sino más bien por los cambios del tipo de información que el animal adquiere de su entorno, es decir, que éste no capta suficiente información del entorno. Dependiendo de la severidad y naturaleza de la malnutrición, los animales se muestran letárgicos, apáticos o hiperactivos (SMART, 1993). También depende del aminoácido deficiente y del grado de esta deficiencia. Se describen, así, hiperexcitabilidad y espasmos musculares en ratas con dietas sin triptófano (POND y col., 1964) o

canibalismo en pollos privados de arginina (SIREN, 1963). También se modifica el aspecto, con aparición de alopecia en cobayas privadas de triptófano (REID y VON SALLMANN, 1960).

TEWS y col. (1992) demuestran que ratas adaptadas a una dieta baja o moderada en proteínas (15% caseína) tienen un comportamiento más anormal que las alimentadas con un 70% de caseína, por lo que ratas adaptadas a elevadas ingestas de proteínas presentan un comportamiento más normal.

El efecto de aminoácidos esenciales como triptófano, fenilalanina y tirosina también ha sido evaluado (MILLER y col., 1976, 1977; DURING y col., 1989; WESTERINK y DE VRIES, 1991) para determinar el impacto resultante de la síntesis y concentración de sustancias neurotransmisoras (FERNSTROM y WURTMAN, 1971; MILLER y col., 1977).

Para determinar el efecto de una dieta deficiente en algún aminoácido esencial sobre el nivel de aminas biogénicas que actúan como neurotransmisores en diferentes áreas del sistema nervioso central, VENERO y col. (1992) estudiaron las aminas biogénicas serotonina y dopamina, y sus respectivos precursores triptófano y tirosina, y sus metabolitos 5-hidroxiindolacético, fenilacético, 3-metoxitiramina y ácido homovanílico, puesto que es conocido que estos neurotransmisores están influenciados por diferentes aminoácidos, especialmente triptófano y fenilalanina, como precursores de indolaminas y catecolaminas, respectivamente. Las dos regiones seleccionadas para el estudio fueron el "corpus striatum" y la "sustancia nigra" de la rata, puesto que su contenido en neurotransmisores es elevado, permitiendo medir los cambios en sus concentraciones. En pacientes humanos con desórdenes neurológicos se han demostrado cambios en los niveles de aminas biogénicas. Así, la enfermedad de Parkinson está asociada con la degeneración de las células dopaminérgicas en la "sustancia nigra" (HIRSCH y col., 1988) y a un descenso en la concentración de dopamina en el "corpus striatum" (MARS DEN, 1982). El sistema "nigro-striatal" parece estar también implicado en otros desórdenes neurológicos. Por ejemplo, la enfermedad de Huntington está asociada con una degeneración severa y pérdida de células en el "corpus striatum", en donde las neuronas eferentes están afectadas (ENNA y col., 1977; PENNEY y YOUNG, 1982; SCHEEL-KRUGER, 1986). Así mismo, hay una degeneración de la sustancia nigra en la enfermedad de Alzheimer (MANN y col., 1982). -

En el sistema serotoninérgico, la deficiencia dietaria de triptófano afecta al metabolismo de la serotonina en ambas regiones estudiadas, siendo superior el efecto en la "sustancia nigra".

2.5. PAPEL DEL MUSCULO EN EL METABOLISMO PROTEICO

2.5.1. ASPECTOS GENERALES

El músculo estriado representa aproximadamente un 40-50% del peso corporal del adulto. Constituye el órgano de locomoción, y tiene una elevada reserva metabólica de aminoácidos (VITALE, 1979).

Tanto el corazón como el músculo esquelético tienen como principal función la producción de trabajo a través de la maquinaria contráctil. Al igual que las proteínas corporales, las proteínas musculares se renuevan de forma dinámica por continua degradación y re-síntesis (BARRETT y GELFAND, 1989).

Cortos períodos de ayuno muestran su efecto sobre la síntesis proteica en el músculo esquelético en ratas en crecimiento (BAILLIE y GARLICK, 1991a), y la magnitud de la respuesta depende de la composición de la fibra muscular, es decir, del tipo de músculo de que se trate.

ENESCO y LEBLOND (1962) observan un aumento de DNA en el músculo gastrocnemio de ratas con la edad. ENESCO y PUDDY (1964) señalan que el número de fibras musculares en ratas no aumenta en el período postnatal, pero sí el número de núcleos dentro de las fibras, y el tamaño de las mismas. MILLWARD y col. (1975) detectan un aumento con la edad en las relaciones peso/DNA y proteína/DNA en el músculo gastrocnemio de ratas macho.

El músculo esquelético es el tejido corporal más abundante (MUNRO, 1969), desempeñando un importante papel en el metabolismo general. Su principal actividad se centra en la degradación de ciertos aminoácidos, particularmente isoleucina, leucina y valina y en la síntesis de otros, alanina y glutamina (FELIG, 1975). Proporciona así sustratos para el metabolismo energético y aminoácidos para la síntesis proteica en otros tejidos.

El músculo contiene el 50% del "pool" total de aminoácidos libres. No tiene enzimas para eliminar el amoníaco producido por la desaminación de los aminoácidos (SCRIVER y ROSENBERG, 1973).

El músculo degrada: leucina, isoleucina, valina, alanina, glutámico y aspártico. Otros aminoácidos como lisina, serina, prolina, treonina, metionina, cisteína, fenilalanina, histidina, tirosina y

triptófano no son degradados por el músculo. La capacidad del músculo para degradar leucina, isoleucina y valina se incrementa en el ayuno (GOLDBERG y ODESSEY, 1972), y es el lugar principal donde se inicia la oxidación de los mismos (MUNRO y CRIM, 1980).

La degradación proteica en el músculo esquelético aumenta durante el ayuno, y tras 24-48 horas de supresión de aminoácidos (LI y GOLDBERG, 1976).

La tasa de degradación proteica en el músculo esquelético es de 0.7 g/Kg de peso corporal y día. Si la tasa de degradación proteica corporal total es de 3.8 g/Kg de peso corporal y día, entonces, la degradación proteica del músculo esquelético es de un 20% ($0.7/3.8 \times 100$) del total (BILMAZES y col., 1978).

Estudios en animales han confirmado que los diferentes tejidos responden de distinta forma a la presencia o ausencia de ingesta. En las fases iniciales del ayuno en ratas, hay una importante pérdida de proteína visceral, seguida de una pérdida de tejido muscular que preservan la pérdida de proteína visceral, durante largos períodos de ayuno (WATERLOW y col., 1978b).

Si se comparan los efectos del ayuno en el intestino, hígado, huesos, piel, corazón y músculo esquelético, se observa que en todos los tejidos disminuye la síntesis proteica, pero los efectos son diferentes. En los tejidos viscerales, la tasa de síntesis es elevada frente al descenso de la misma que se produce en el músculo esquelético durante el ayuno, siendo el descenso en este órgano mayor si hay deplección proteica (SCHWENK y col., 1985).

La regulación de la proteólisis en el músculo es importante para mantener la homeostasis, para el control de la masa muscular y para el crecimiento corporal, así como en la adaptación del organismo a una gran variedad de condiciones dietarias. Dado que el músculo esquelético constituye la mayor reserva proteica del organismo, la hidrólisis de las proteínas musculares para generar aminoácidos es un paso importante en la gluconeogénesis, como sucede en ayuno y diabetes (KETTELHUT y col., 1988).

El "turnover" proteico es relativamente menor en el hígado y en tejidos viscerales y mayor en el músculo (McNURLAN y col., 1980).

Se ha observado en adultos obeso sometidos a ayuno, al agotarse las reservas de glucógeno, que la proteína muscular es la fuente principal de precursores para la síntesis de la glucosa que necesita el cerebro (WATERLOW y col., 1978c), con una pérdida inicial de 75 g. de proteína muscular por día que se reduce a 25 g/día cuando descienden las necesidades de glucosa por el mismo, al utilizar mayoritariamente los cuerpos cetónicos.

El músculo esquelético sirve también de fuente de aminoácidos para la síntesis proteica durante la reproducción. Así, durante el último trimestre de la gestación, el crecimiento fetal se produce de un modo más rápido de lo que cabría esperar por la ingesta materna (NAISMITH, 1969), lo cual conduce a la idea de que hay una fase anabólica, al principio de la gestación, durante la cual aumenta la masa muscular materna y así sirve como fuente de sustratos para el crecimiento del feto durante la última parte de la gestación (NAISMITH y MORGAN, 1976).

2.5.1.1. CAMBIOS DURANTE EL CRECIMIENTO

Durante el desarrollo, se producen cambios en la proporción de tejido muscular en el organismo de forma que, tanto en el hombre como en la rata, en el momento del nacimiento supone menos de 1/4 del peso corporal, llegando a un 40% en la madurez. Sufre también cambios en su estructura; ENESCO y LEBLOND (1962), utilizando ratas en crecimiento, dividen éste en fases con distintas características. Inicialmente se produce un crecimiento por aumento en el número de células con pequeño o ningún cambio en el tamaño celular. En este período las ratas se acercan al destete y pesan 25 g.

Le sigue una fase de menor incremento en el número de células, y aumento del tamaño celular. Esto sucede en músculo esquelético y tejido adiposo: las ratas tienen 48 días y pesan 120 g. Por último, y desde los 48 a los 160 días de vida, con un peso de hasta 400 g., músculo y tejido adiposo crecen por un aumento del tamaño celular.

Los niños prematuros, al nacer, tienen menor concentración de proteínas séricas totales comparados con niños normales, pero estos valores son similares cuando tienen un mes de edad. La baja concentración de proteínas séricas totales son debidas a las bajas concentraciones de albúmina sérica y globulinas. Cuando tienen una semana, los valores de albúmina sérica son normales, pero las globulinas continúan en baja proporción (FAUS y col., 1984).

La obtención de concentraciones normales de albúmina sérica en niños prematuros de una semana sugiere que hay una síntesis activa en el hígado y que la ingesta proteica durante esta primera semana de vida extrauterina fué adecuada para el crecimiento (FAUS y col., 1984).

Ratas en período de crecimiento sometidas a ayuno durante una noche, disminuyen la síntesis proteica. Así, cortos períodos de ayuno provocan un descenso en la síntesis proteica muscular y corporal (Mc NURLAN y GARLICK, 1989).

Así mismo se modifica el contenido de ácidos nucleicos, indicando una reducción de la actividad de síntesis proteica durante el crecimiento (DEVI y col., 1963). Disminuye la concentración de DNA al pasar el músculo de la fase de hiperplasia a la de hipertrofia. El RNA se comporta de modo similar, implicando un descenso en la intensidad de la síntesis proteica por gramo de tejido.

En ratas pequeñas con un peso de 90-110 g, la tasa de síntesis proteica en el músculo esquelético es de 15-19% diario (GARLICK y col., 1983). Como los animales crecen un 6% diario, la tasa de degradación es de un 11% al día (ASHFORD y PAIN, 1986a). Esto contrasta con observaciones en ratas viejas (300-400 g), en las cuales la tasa de crecimiento es de 2-3% al día y su síntesis proteica es de un 5-6% diario (PAIN y col., 1983).

En ratas inmediatamente después del nacimiento, hay una drástica disminución de la concentración de aminoácidos, aumento de glucagón, disminución de insulina (GIRARD y col., 1973) y un descenso en la corticosterona plasmática (MALINOWSKA y col., 1972). La disminución de los *aminoácidos plasmáticos probablemente sea debido a la competición entre la utilización de los aminoácidos para el crecimiento (síntesis proteica) y para la gluconeogénesis*. Así, la gluconeogénesis en el feto tiene muy poca actividad, mientras que aumenta rápidamente después de nacer (GIRARD y col., 1975).

La síntesis proteica muscular en ratas jóvenes es muy sensible a la ingesta, y una noche de ayuno es suficiente para provocar un descenso del 40% (GARLICK y col., 1983). Si se ingiere comida, 60 minutos son suficientes para restaurar esta tasa. Cuando la rata es adulta, el crecimiento cesa y la tasa de síntesis proteica disminuye entre un 60 y un 70% desde el nacimiento hasta el primer año de vida (GARLICK y col., 1987). Además, con el alimento, la rata adulta es capaz de consumir suficiente comida como para mantener su contenido proteico día a día.

Se sabe que durante el crecimiento se producen dos cambios esenciales en la síntesis proteica en el músculo esquelético: disminuye la concentración de ribosomas y el nivel de síntesis proteica total y se alteran las tasas relativas de síntesis de las distintas proteínas, de modo que las que tienen menor tasa degradativa muestran el mayor descenso en su tasa fraccional de síntesis (WATERLOW y col., 1978b; GARLIK y col., 1989). Como consecuencia, en cualquier situación en que se altere el crecimiento habrá una alteración en la síntesis proteica, ya sea en el proceso normal de desarrollo y envejecimiento o si se instaura mediante alteraciones nutricionales.

2.5.2. RESPUESTA DEL MUSCULO A LAS MODIFICACIONES EN LA DIETA

El crecimiento es el estado en el cual la masa muscular aumenta, y se produce cuando la síntesis proteica excede a la degradación (KETTELHUT y col., 1988). Tanto la síntesis como la degradación proteica en el músculo están reguladas por hormonas que también tienen un papel en la homeostasis energética, como la insulina y el cortisol. Una reducción en la síntesis proteica muscular durante el ayuno suministra aminoácidos al organismo. En ayuno prolongado, las calorías son proporcionadas de las reservas lipídicas; luego sigue la movilización de proteínas celulares. Bajo estas condiciones, las tasas de degradación proteica y el catabolismo de aminoácidos se reducen al máximo para preservar los aminoácidos esenciales y los constituyentes celulares; si continúa el ayuno se incrementa el catabolismo hasta agotar las reservas proteicas, sobreviniendo la muerte por inanición.

Es conocido que la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina disminuye a medida que el animal va siendo más adulto, así como también disminuye el transporte de glucosa y su utilización por el músculo (NARIMIYA y col., 1984). Se han propuesto muchos factores como son: cambios en el metabolismo del glucógeno, inactividad física, aumento del tejido adiposo y cambios en la capilaridad y composición de las fibras musculares. También puede ser debido a un descenso en el número de receptores de insulina (OLEFSKY y col., 1976) y a una disminución en el recambio de los receptores (TRISCHITTA y REAVEN, 1988).

2.5.2.1. INFLUENCIA DEL AYUNO

El hombre es capaz de sobrevivir durante el ayuno por la capacidad para conservar los depósitos de proteínas mientras que utiliza la grasa como fuente principal de energía (FELIG y col., 1969). Esta conservación de la proteína corporal se debe a un descenso en la excreción urinaria de nitrógeno, una marcada disminución de la gluconeogénesis hepática (OWEN y col., 1967a) y una adaptación del cerebro para utilizar los cuerpos cetónicos y reducir así la conversión de los escasos aminoácidos en glucosa para su oxidación (OWEN y col., 1967b).

La tasa de síntesis proteica en el músculo esquelético es muy sensible a la ingesta dietaria (WATERLOW y STEPHEN, 1966). El ayuno, en particular, provoca un inmediato descenso de la síntesis proteica, con aumento de la proteólisis y la consiguiente pérdida de proteína muscular

(MILLWARD, 1970). Estos cambios en el metabolismo proteico del músculo esquelético son muy importantes para todo el organismo (YOUNG, 1970; MILLWARD y GARLICK, 1972).

Si hay ayuno prolongado, las concentraciones de todos los aminoácidos esenciales se incrementan. Esto es más acusado en el caso de la metionina y de los aminoácidos de cadena ramificada, los cuales aumentan mientras el RNA y la síntesis proteica disminuyen (MILLWARD, 1970; GARLICK y col., 1973). Así, pues, la concentración de aminoácidos puede relacionarse directamente con la pérdida de RNA y el descenso en la síntesis proteica que tiene lugar durante el ayuno, como consecuencia de un menor nivel de insulina circulante, la cual, cuando aumenta, estimula el transporte de aminoácidos y la síntesis proteica en el músculo (FUKAGAWA y col., 1986).

Se han realizado diversos estudios en personas alimentadas y sometidas a ayuno para conocer la síntesis y degradación proteica. Para RENIE y col. (1982), la síntesis proteica disminuye un 20% durante el ayuno, incrementándose la degradación un 18% utilizando leucina marcada. Posteriormente, HOFFER y col. (1985) también observan que la tasa de síntesis proteica durante el ayuno es un 20% menor que tras la ingestión de comida.

CLAGUE y col. (1983) proporcionan a humanos diferentes dietas que varían entre 0 y 1.67 g/Kg/día. Los sujetos alimentados muestran mayores tasas de síntesis proteica que los sujetos sometidos a ayuno, especialmente aquellos que han ingerido mayores cantidades de dieta; sin embargo, observan que no se altera la degradación.

Posteriormente, McNURLAN y GARLICK (1989), someten a humanos a una infusión de leucina marcada durante 24 horas para comparar el efecto de la síntesis y la degradación después de la comida y en ayuno. Durante el ayuno, la degradación proteica aumenta y después de la comida aumenta la síntesis proteica, medida como incorporación de la leucina a la síntesis proteica.

Hasta ahora, se han mencionado estudios sobre los efectos del ayuno en la síntesis y degradación proteica en humanos. También hay autores que han estudiado estos efectos en músculo de ratas. Cuando se retira la dieta a ratas en crecimiento, hay una rápida y progresiva disminución de la síntesis proteica en el músculo (GARLICK y col., 1973; GARLICK y col., 1975). Los efectos se observan tras 12 horas de ayuno y remiten a la hora de ingerir la dieta. Durante largos períodos de ayuno, se ha demostrado que la pérdida de proteína muscular es pequeña durante los dos primeros días, pero a partir del día 4 la pérdida se hace mucho mayor, a la vez que aumenta mucho la degradación proteica (MILLWARD y col., 1975).

Experimentos llevados a cabo con músculo "in vitro" han confirmado que el ayuno o la falta de nutrientes en el medio disminuye la síntesis proteica, pero se produce simultáneamente un aumento en la degradación (LI y GOLDBERG, 1976; LI y WASSNER, 1978).

EMERY y col. (1986) observan un marcado aumento en la producción de N-metilhistidina en ratas jóvenes en ayuno en un momento (días 0-2) en que la tasa de degradación proteica en músculo esquelético permanece constante, lo cual sugiere que la N-metilhistidina extra producida en el primer momento del ayuno no se debe a un aumento de la degradación proteica en el músculo esquelético. Por tanto, se cuestiona la validez del uso de aquélla durante el ayuno como índice de degradación del músculo esquelético, desconociéndose su aplicación en otros casos.

LOWELL y col. (1986) han comprobado que en ratas en ayuno disminuye la degradación de proteínas miofibrilares. La degradación de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas aparecen reguladas por diferentes mecanismos durante el ayuno (GOODMAN y GOMEZ, 1987). El ayuno provoca un incremento en la degradación de proteínas miofibrilares (actina). En ayuno prolongado en humanos y en animales, la gluconeogénesis de las proteínas corporales disminuye gradualmente. Se ha sugerido que es debido a la disminución en la excreción urinaria de nitrógeno y de las concentraciones en sangre arterial de aminoácidos (GOODMAN y col., 1980). Lo más importante durante el ayuno es el descenso de los requerimientos de glucosa para el cerebro y la producción de cuerpos cetónicos. También han observado que en ratas obesas, durante el ayuno, hay una disminución de la excreción de nitrógeno y 3-metilhistidina.

La degradación proteica en el músculo esquelético aumenta durante el ayuno, y tras 24-48 horas de supresión de aminoácidos (LI y GOLDBERG, 1976). Así, la degradación proteica, medida por la presencia de los niveles normales de aminoácidos en plasma, disminuyen de un 50 a un 70% durante las primeras 48 horas de ayuno (MORTIMORE y POSO, 1987), al igual que disminuye la excreción de 3-metilhistidina. Sin embargo, la ingestión de alimento después del período de privación disminuye la degradación proteica rápidamente, junto con una re-síntesis de proteínas intracelulares y de otros constituyentes (LI y WASSNER, 1978). Sí parece bastante claro que el ayuno disminuye la síntesis proteica y la alimentación la aumenta. Del mismo modo, estudios "in vitro" demuestran un aumento en la degradación proteica durante el ayuno (BARRETT Y GELFAND, 1989).

El aumento de la degradación de la proteína muscular que se produce durante el ayuno se relaciona con una elevación de la proteólisis lisosomal, ya que en estas condiciones no se modifica el contenido en proteasas lisosomales de este tejido; parece que una elevación del acceso del sustrato a las enzimas de los lisosomas es el cambio más característico que se produce durante el ayuno. Sin embargo, trabajos recientes revelan que, incluso en presencia de inhibidores lisosomales, no se ve afectada la proteólisis en músculo de ratas en ayuno (HAN y col., 1988), mientras sí se ve reducida por deplección del ATP con 2, 4-dinitrofenol, lo que unido a la caracterización de una ruta proteolítica en el músculo dependiente del ATP, sugiere que la activación de este proceso es la principal responsable del aumento de la degradación proteica durante el ayuno. Sin embargo, cuando éste se prolonga, se

conserva la proteína corporal (AOKI y col., 1977), disminuyendo la degradación del músculo, incluso por debajo de los niveles observados en los animales bien nutridos.

CHANG y GOLDBERG (1978a; 1978b) muestran que, incluso durante el ayuno, todavía hay una considerable captación de glucosa por el músculo esquelético, y ésta es ampliamente liberada como alanina. La fuente de nitrógeno para esto no es sólo el catabolismo de la proteína muscular, sino también la leucina captada de la circulación y utilizada como fuente energética principal en el músculo durante el ayuno.

Sin embargo, HENRY y col. (1988) indican que no hay evidencia de que se produzca un ahorro de proteína durante el ayuno prolongado. Aunque la menor excreción de nitrógeno urinario sugiere que el catabolismo de aminoácidos está reducido, esto es secundario a un descenso general en el "turnover" metabólico, más que a un cambio en la utilización de cuerpos cetónicos y de glucosa. Sugieren así la idea comúnmente admitida de que durante el ayuno la proteína se economiza por un aumento en el uso de cuerpos cetónicos por el cerebro; esto puede ser una descripción incorrecta o, al menos incompleta, de los cambios que ocurren. La reducción en la excreción de nitrógeno que se produce en el ayuno es parte de una reducción general en el uso de estos sustratos, no un ahorro específico de la proteína corporal. No está marcada por el cerebro, sino que sigue un descenso general en la intensidad del metabolismo somático.

LOWELL y col. (1986) dividen el ayuno en tres fases: una primera en 24 horas, con aumento de la proteólisis miofibrilar, la cual desciende en el segundo período (3-5 días) para aumentar de nuevo en la fase III. Sugieren así que los cambios en la proteólisis total se deben en gran parte a cambios en la degradación de las proteínas miofibrilares, cuyo catabolismo antes del ayuno suponía un 15% del total, aumentando hasta que al final supone un 50%. Las proteínas no miofibrilares muestran una tendencia a disminuir su degradación durante las fases I y II y aumentar durante el ayuno terminal. El aumento en la proteólisis durante las fases I y III se asocia con un aumento desproporcionado en la liberación de 3-metilhistidina (degradación miofibrilar) en comparación al de tirosina (degradación proteica total).

Cortos períodos de ayuno muestran un efecto negativo sobre la síntesis proteica en el músculo esquelético en ratas en crecimiento (BAILLIE y GARLICK, 1991), y la magnitud de la respuesta *en el músculo individual depende de la composición de la fibra muscular, es decir, del tipo de músculo de que se trate.*

2.5.2.2. DIETAS CARENTES DE PROTEINAS

A ratas Wistar macho se les deja acceso a la comida únicamente entre las 9 y las 13 horas y después de 2 semanas de ser sometidas a este régimen, son sacrificadas, junto con un lote con el cual se realiza el mismo experimento, pero con dieta sin proteínas (MILLWARD y col., 1974b). Las ratas alimentadas con dietas con proteínas evitan las pérdidas de RNA inducidas por el ayuno, mientras que las ratas alimentadas con dietas libres de proteínas muestran una disminución en la concentración de los aminoácidos de cadena ramificada y de metionina.

Así, en ratas sometidas a una dieta sin proteína durante 30 días, la respuesta inicial es semejante a la que se produce en los animales en ayuno, con una reducción inmediata (primer día) de la tasa fraccional de síntesis. Durante los siguientes días, tanto la tasa de síntesis como la degradación disminuyen de modo prácticamente similar, de manera que hasta ese momento no hay pérdida de proteína muscular o bien ésta es muy pequeña. Sin embargo, a los 30 días, la progresiva reducción de la síntesis proteica conlleva una pérdida de proteína del 3% cada día, a pesar de que no se modifica el nivel de degradación de las proteínas (GARLICK y col., 1975).

KADOWAKI y col. (1989) confirman un descenso en la degradación proteica total de hasta el 49% en ratas alimentadas sin proteína respecto a los controles (20% caseína). Por el contrario, el catabolismo de la proteína miofibrilar no muestra cambios durante este período. Los resultados, sin embargo, no coinciden con los encontrados "in vivo", que señalan disminuciones de la excreción urinaria de 3-metilhistidina con una dieta carente de proteína (HAVERBERG y col., 1975). La razón de esta incongruencia no está clara, pero no se puede excluir la posibilidad de la contribución de tejidos no musculares.

La ingesta de una dieta sin proteínas suprime la degradación de las proteínas sarcoplásmicas, pero no las de los componentes miofibrilares (GOODMAN y GOMEZ, 1987).

Los cambios homeostáticos que tienen lugar en la deficiencia proteico-energética son contrarias a los producidos en ayuno o diabetes: preservar los aminoácidos y las proteínas celulares y no utilizarlas para la producción de energía, gluconeogénesis o lipogénesis (KETTELHUT y col., 1988). Cuando ratas jóvenes son alimentadas con dietas sin proteínas dejan de crecer, pero la masa del músculo esquelético y el contenido proteico están bastante bien preservados.

Cuando se someten ratas a dietas carentes de proteínas se ha observado que las tasas de degradación proteica en músculo esquelético y cardíaco, y en la excreción de 3-metilhistidina, disminuyen en un 30-40% dentro de las primeras 72 horas (TAWA y GOLDBERG, 1980). La oxidación

de los aminoácidos de cadena ramificada en el músculo disminuyen, así como el transporte de aminoácidos dentro del músculo, y se presume que ayudan a la reducción en la utilización de los aminoácidos. La síntesis "de novo" de la glutamina y la alanina en músculo también está reducida (TAWA, 1984).

Una evidencia de la disminución de la degradación proteica en ratas sometidas a dietas carentes de proteínas, es que tanto el músculo esquelético como el cardíaco tienen entre 50-70% de actividad en proteasas lisosomales (catepsina B y H) y otras hidrolasas. Otra forma de conocer que la proteólisis está reducida durante la deficiencia proteica es la reducción de la hormona T3, y de la insulina circulante (TAWA, 1984).

Cambios en la excreción de 3-metilhistidina han sido examinados en ratas jóvenes que reciben una dieta normal o dietas deficientes en proteínas y calorías (HAVERBERG y col., 1975b). La disminución de proteína en la dieta provoca una disminución rápida de 3-metilhistidina (disminución de un 20% de su valor inicial). En el caso de disminución proteico-calórica, hay aumento inicial de 3-metilhistidina, seguido de una disminución (3-metil histidina es una medida de la degradación de la proteína muscular.) El músculo responde a la disminución de la proteína con una disminución de la degradación proteica.

2.5.2.3. DEFICIENCIA MODERADA DE PROTEINA O ENERGIA

Bajas concentraciones de albúmina sérica son aceptadas generalmente como un índice de malnutrición proteico-energética (WATERLOW y WILLS, 1960).

La malnutrición proteico-energética ha sido definida por FAO y WHO (FAO/WHO/UNU, 1985) como: "Condiciones patológicas que aparecen en estados carenciales, en diferentes proporciones, de proteínas y calorías, más frecuentemente en niños y jóvenes, y asociadas normalmente con infecciones".

Dicha malnutrición proteico-calórica provoca la aparición de una serie de desórdenes clínicos:

MARASMO: Producido por una restricción continuada de energía y proteína en la dieta, así como de otros nutrientes.

KWASHIORKOR: Debido a una deficiencia cualitativa y cuantitativa en la ingesta proteica, pero en este caso la ingesta calórica es adecuada.

La mayoría de los niños presentan una mezcla de ambas. Los niños con malnutrición proteico-calórica son más susceptibles de padecer infecciones respiratorias y diarreas, puesto que la resistencia a la infección depende de la actividad leucocitaria, la integridad epitelial, la flora intestinal y la función endocrina, y esto está afectado en la deficiencia proteico-calórica (GURNEY, 1979).

Estos dos síndromes son el extremo de estos tipos de malnutrición. Entre ellos hay diferentes manifestaciones clínicas debidas a combinaciones de deficiencia proteica y energética, junto a deficiencias de minerales y vitaminas y con infecciones asociadas.

El marasmo aparece típicamente en niños menores de un año, más frecuentemente en las ciudades; el kwashiorkor es una enfermedad propia de las áreas rurales en el segundo año de vida. La malnutrición proteico-calórica es característica de los niños menores de 5 años, en las zonas donde la dieta es pobre en energía y proteínas; en los adultos esta enfermedad es mucho menos frecuente y las manifestaciones clínicas mucho menos severas (McLAREN, 1966).

Los síntomas del marasmo son: incapacidad de aprendizaje, irritabilidad alternando con apatía. Diarrea. Muchos niños están hambrientos, pero algunos son anoréxicos. Muy poca grasa subcutánea. A menudo deshidratación. El peso está muy por debajo de lo normal. El abdomen puede estar distendido con gases. Los músculos están atrofiados. La piel y las mucosas pueden estar secas y atróficas. Se pueden encontrar o no evidencias de carencias vitamínicas (GURNEY, 1979).

Como síntomas del kwashiorkor aparece: edema, incapacidad de aprendizaje, anorexia y apatía. Fracaso en el crecimiento, diarrea líquida, esplenomegalia. El edema puede aparecer distribuido por todo el cuerpo, incluso en la cara, pero generalmente está más marcado en la parte inferior de las piernas. Presentan dermatosis característica, con áreas de descamación y zonas de hipo e hiperpigmentación. La descamación puede progresar a úlceras. El pelo es escaso, fino y se arranca fácilmente. Frecuentemente aparece estomatitis y atrofia de la lengua, así como ulceración alrededor del ano. Los músculos están consumidos, por lo que muchos niños pierden la capacidad de andar. Siempre está presente algún grado de anemia (GURNEY, 1979).

La malnutrición proteico-calórica afecta a los linfocitos T y B. Deficiencias en proteína y energía afectan e inhiben ambos tipos de inmunidad (RAMALINGASWAMI, 1975); la mucosa intestinal es muy delgada, similar a la encontrada en malabsorción intestinal (BEHAR, 1975), y la estructura y función de las glándulas endocrinas están afectadas (WHITEHEAD y ALEEYNE, 1971).

HEARD y col. (1977) describen los efectos de tratamientos que inducen, en ratas jóvenes, cambios bioquímicos que se asocian con el kwashiorkor y marasmo en el hombre, como son las dietas del 3.5% de proteína administradas "ad libitum" y del 10% en cantidades restringidas. Los niveles de síntesis proteica se redujeron en ambos casos, afectándose más en el caso de los animales

deficientes en energía. A pesar de ello, la ganancia de proteína que se observa permite intuir una reducción aún mayor en la tasa fraccional de degradación proteica.

Hay pérdida de apetito, aumentan las necesidades de nutrientes y esto hace que aumenten las necesidades de energía. Existe reducción de la absorción de nutrientes que cursan con diarrea y hay aumento del metabolismo, con lo cual se pierde nitrógeno por orina (WHITEHEAD y ALLEYNE, 1971).

CLUGSTON y GARLICK (1982) estudiaron los efectos de dietas bajas en energía en sujetos obesos. Se midió la síntesis proteica después de 3 días de tomar una dieta normal, y también después de someterlos 3 semanas a una dieta baja en energía. Cuando la dieta baja en energía contiene proteína hay un pequeño descenso en la síntesis proteica, pero cuando la dieta no contiene proteínas el descenso en la síntesis es mayor.

La síntesis proteica tisular puede tener lugar si hay un adecuado aporte de energía. Una restricción de energía en la dieta se asocia con un aumento en el catabolismo proteico, y el animal utiliza sus reservas de proteínas para corregir la deficiencia calórica. Estudios de ROSENTHAL y ALLISON (1956) en ratas indican que durante una restricción calórica hay un aumento del catabolismo de las reservas proteicas y un balance de nitrógeno negativo. Si la restricción no es muy severa, la rápida pérdida inicial de nitrógeno corporal va disminuyendo, los animales se adaptan a la reducida ingesta calórica y reducen su actividad catabólica, tendiendo hacia un equilibrio de nitrógeno. Si la restricción calórica es severa, las reservas de grasa y proteína se agotan y el catabolismo se incrementa de nuevo, pudiendo llevar a la muerte.

HAVERBERG y col., (1975a) describen una reducción en la eliminación de 3-metilhistidina por unidad de peso corporal en ratas alimentadas con una dieta baja en proteína, siendo el descenso mayor que el observado por desarrollo en controles bien alimentados. Hay, por consiguiente, una disminución progresiva en el turnover de las proteínas contráctiles durante la deplección proteica, que también se pone de manifiesto en niños malnutridos (NARASINGA RAO, 1985).

Los efectos de una restricción calórica sobre la proteólisis muscular, en contraste con el hígado, aumentan durante las primeras 24-48 horas (MORTIMORE y POSO, 1987).

YAMAGUCHI y KANDATSU (1967) indican pérdidas similares de las dos fracciones principales de la proteína muscular intracelular sarcoplásmica y miofibrilar en músculos de ratas deficientes en proteína.

En resumen, la respuesta general del músculo a deficiencias dietarias, bien de energía, bien de proteínas, es una reducción de la tasa de síntesis proteica. Se trata de una respuesta rápida,

que se pone de manifiesto después de un sólo día de la deficiencia dietaria. Esta reducción en la síntesis va acompañada, al menos en las etapas iniciales, de un descenso en la tasa de degradación, aunque se desconoce cómo se lleva a cabo.

Malnutrición proteico-calórica y función endocrina (MUNRO, 1977):

HORMONA	Kwashiorkor	Marasmo
	DEF.PROTEICA	DEF.PROT-CALORICA
Del crecimiento	Elevada	Elevada a veces
Somatomedina	Reducida	----
Insulina	Reducida	Normal
Cortisol	No cambia	Elevada a menudo
TSH (Est. Tiroides)	No cambia	Muy reducida
Tiroxina	Reducida	Normal o elevada

Niños con malnutrición proteico-calórica presentan como mecanismo de supervivencia una disminución del crecimiento, menor altura y peso con disminución de la maduración ósea.

Los cambios bioquímicos que se producen en ellos son:

- Baja excreción de urea.
- Disminución de los aminoácidos de cadena ramificada (WHITEHEAD, 1969).
- Aminoácidos libres anormales.
- Disminución en la excreción de hidroxiprolina en orina.
- Disminución de transferrina y albúmina (McFARLANE, 1969).
- Si el peso disminuye, se manifiesta por un descenso en el índice creatinina/altura.

Los efectos bioquímicos de la malnutrición proteico-calórica severa en niños son los siguientes:

- Balance proteico negativo. Contenido total de nitrógeno reducido (WATERLOW y WILLS, 1960).

- El hígado pierde rápidamente fracciones de proteínas, mientras que la pérdida de proteínas del músculo ocurre progresivamente (GARROW y col., 1965).
- El riñón, cerebro y órganos endocrinos retienen sus proteínas más eficazmente.
- En el músculo hay una baja proporción de proteínas/DNA, lo cual indica pérdida de proteína intracelular.
- La concentración de proteínas totales se reducen, principalmente debido a la disminución de la concentración de albúmina y beta-globulinas. La fracción de gamma-globulina aumenta.
- La concentración de nitrógeno ureico en sangre disminuye, así como su excreción por orina. Por tanto, desciende el catabolismo proteico y también la síntesis proteica (PICOU y PHILLIPS, 1972).
- La excreción de creatinina por orina disminuye (ARROYAVE y WILSON, 1961) a consecuencia de la reducción del tejido muscular y pérdida de masa corporal.
- Los aminoácidos en plasma se modifican, observándose una baja concentración de valina, leucina e isoleucina, así como de tirosina (HOLTZ y col., 1963).
- La relación AAE/AANE disminuye.
- La fracción Tyr/Phe disminuye debido a la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa.
- La concentración de hemoglobina varía alrededor de 8 a 10 g./100 ml. por dilución de la sangre.
- Los glóbulos rojos son normocíticos y normocrómicos.
- Hay megaloblastosis como consecuencia de deficiencia de folato.
- Si hay infección, se produce leucocitosis.
- Se produce leucopenia y trombocitopenia, indicando generalmente la presencia de septicemia gram-negativa.
- La mayoría de los sujetos no están anémicos, pero fisiológicamente están adaptados a la disminución de la demanda de oxígeno.
- La excreción de aminoácidos por orina es anormal.

- Se han detectado metabolitos anormales como etanolamina y ácido beta-aminoisobutírico; esto sugiere un defecto en la transmetilación.
- Pérdida de histidina, seguido de excreción de ácido urocánico.

Los cambios en el metabolismo de carbohidratos son:

- La glucosa en sangre es normal.
- Hay tendencia a la hipoglicemia.
- El metabolismo de la glucosa no es normal, ya que los tests de tolerancia a la glucosa dan una curva atípica de diabetes, y la secreción de insulina es baja.
- Hay glucogenolisis y glucolisis.
- Se presenta un deterioro de las enzimas que intervienen en la oxidación de la glucosa, ciclo de Krebs y conversión de galactosa a glucosa (JAMES y COORE, 1970).

Cambios en el metabolismo de lípidos:

- Se presenta esteatorrea.
- Malabsorción de lípidos.
- Bajos niveles de fracciones lipídicas en plasma, aminoácidos neutros, colesterol, vitaminas A y E y fosfolípidos. Esto sugiere cambios en proteínas plasmáticas específicas y en la estructura lípido-proteína para el transporte en sangre (SMITH y col., 1973).

Cambios en las vitaminas:

- Hay bajas concentraciones de tiamina, riboflavina, vitamina C y folatos.
- Los niveles en suero de la vitamina B₁₂ están aumentados. Esto sugiere que aunque disminuyen las proteínas, la demanda tisular de proteínas también disminuye.
- Los niveles séricos de vitaminas A y E son menores por el defecto en su absorción (OLSON, 1975).

Cambios en el agua y los electrolitos:

- Los niveles séricos de sodio son normales o bajos.
- Los niveles séricos de potasio y magnesio no están disminuidos, excepto cuando existe diarrea y vómitos. En este caso, hay hipokaliemia acompañada por una pérdida de potasio de tejidos como el músculo y el cerebro.
- La acidosis es normal, con descenso en los mecanismos de acidificación renal (NICHOLS y col., 1974).
- El agua corporal total puede aumentar al 80% del peso corporal, cuando lo normal es 60% (GARROW y col., 1965). Los valores más elevados aparecen en marasmo, cuando la grasa corporal se ha reducido extraordinariamente. El aumento más importante se debe al agua extracelular, pero las células están sobrehidratadas. Esto puede complicarse por la diarrea aguda o crónica, conduciendo a la deshidratación.

Cambios en las enzimas:

- Las enzimas amilasa, pseudocolinesterasa y fosfatasa alcalina están disminuidas en plasma. Esta disminución refleja la deplección de estas enzimas en los tejidos y en los órganos.
- Las transaminasas aumentan en plasma (McLEAN, 1966).

2.5.3. INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LOS ACIDOS NUCLEICOS EN EL MUSCULO

2.5.3.1. ACIDO DEOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

2.5.3.1.1. *Modificaciones debidas al crecimiento*

Se considera el crecimiento muscular por el aumento del tamaño y el número de unidades de DNA. Se ha estudiado la falta de crecimiento en ratas malnutridas, administrándoles una dieta adecuada en proteína, pero con restricción energética. Se observa que en estas condiciones disminuye el contenido de DNA en el músculo, sin que se altere la relación proteína/DNA. Esto ha sugerido que la formación de nuevos núcleos es más sensible a la restricción energética que el depósito de proteínas. La acumulación de DNA en músculo también es sensible al contenido proteico de la dieta (CHEEK y HILL, 1970).

ENESCO y LEBLOND (1962) observan un aumento del DNA en el músculo gastrocnemio de ratas con la edad. ENESCO y PUDDY (1964) indican que el número de fibras musculares en ratas no aumenta en el período postnatal, pero sí el número de núcleos dentro de las fibras, así como el tamaño de las mismas con la edad.

Posteriormente, MILLWARD y col. (1975) señalan un aumento en mg de peso, contenido proteico y de las fracciones peso/DNA, proteína/DNA en músculo gastrocnemio de ratas macho con la edad.

Durante el crecimiento muscular hay un incremento en el contenido de los ácidos nucleicos DNA y RNA, así como de las cantidades de proteínas acumuladas por unidad de ácido nucleico. Existe consenso en cuanto a que el crecimiento del músculo se produce por crecimiento de la fibra, tanto en grosor como en longitud, más que del número de fibras (BURLEIGH, 1974).

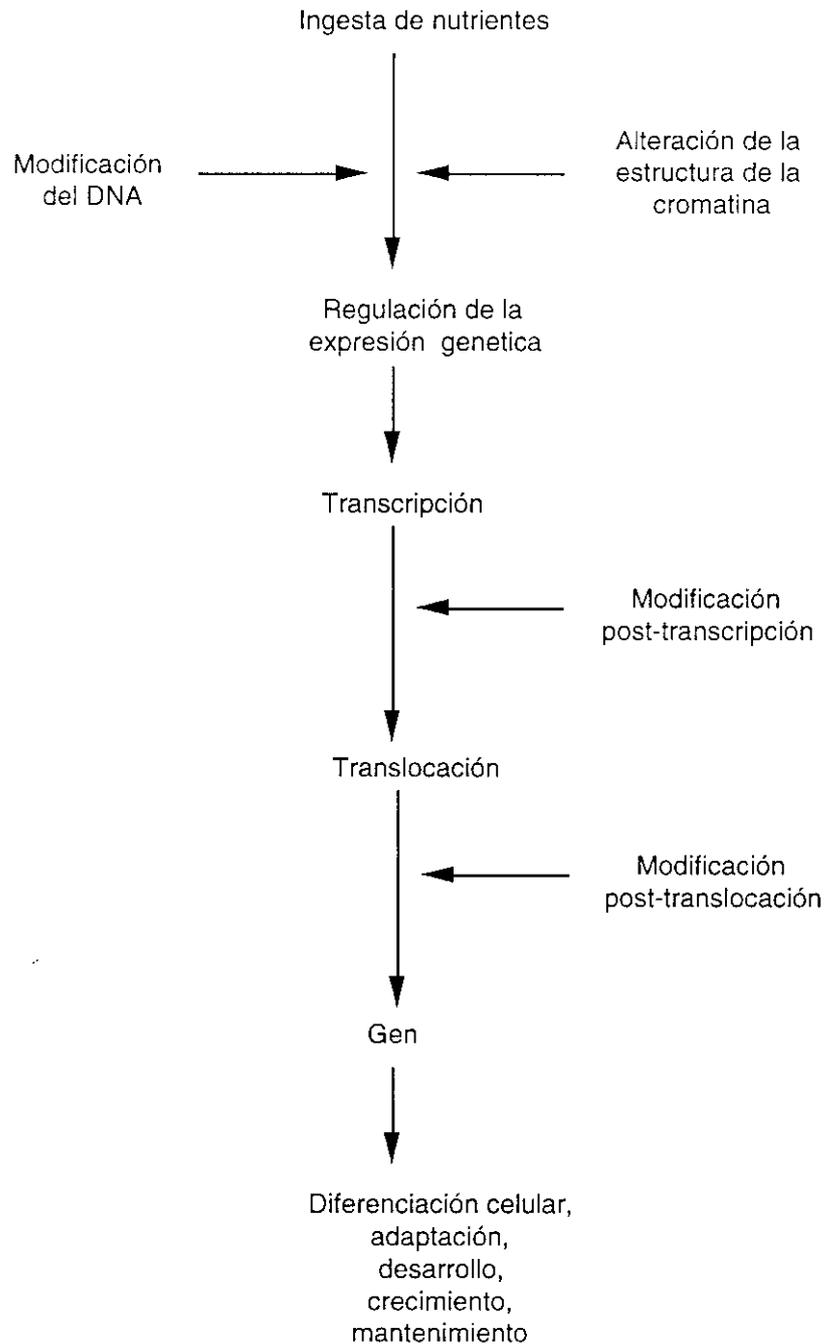
2.5.3.1.2. *Modificaciones en el DNA muscular producidos por la dieta*

Los procesos biológicos importantes como la diferenciación celular, el desarrollo, el crecimiento y la adaptación metabólica dependen de la expresión genética. La dieta puede afectar a la regulación de la expresión genética en los siguientes niveles (CASTRO, 1987), tal y como se muestra en el esquema 2.

MUNRO y col. (1953) examinaron el efecto de las variaciones de la ingesta energética sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos. La adición de grasa o carbohidratos a una dieta deficiente en energía da como resultado un aumento en el RNA total. NARAYANA y MORRISOS (1965) observaron que la restricción calórica afecta a la concentración de RNA, pero no al DNA en músculo de ratas que recibían 1 g. de caseína diariamente. UMANA (1965) comprobó que en ratas en ayuno hay un aumento en el contenido de DNA en hígado.

Varios estudios han descrito el efecto de la malnutrición sobre el crecimiento del músculo esquelético de ratas. Cuando existe malnutrición durante el período de crecimiento, el resultado es una disminución en la tasa de síntesis de DNA (HOWARTH, 1972). En el músculo de ratas jóvenes alimentadas con una dieta baja en calorías y proteínas, HILL y col. (1970) encontraron una marcada reducción tanto en el contenido de DNA como de la fracción proteína/DNA (tamaño celular). Contrariamente, cuando a los animales se les restringe las calorías en la dieta con un contenido proteico adecuado, afecta menos a la reducción del crecimiento muscular y al número de núcleos. En estos animales, la fracción proteína/DNA (tamaño celular) es normal o incluso está ligeramente aumentada. Así, HILL y col. (1970) postulan que la reducción de la ingesta calórica puede afectar a la replicación del

DNA, pero la reducción de calorías y proteínas tiene efectos más serios en la síntesis intracelular de proteínas.



Esquema 2.

HOWARTH (1972) muestra que la acumulación total de DNA en el músculo gastrocnemio está directamente relacionada con el contenido proteico de la dieta. Una dieta libre de

proteínas provoca una reducción de la fracción proteína/DNA (tamaño celular). Estos datos fueron confirmados más tarde por NANYELUGO (1976).

2.5.3.2. ACIDO RIBONUCLEICO (RNA)

2.5.3.2.1. *Modificaciones debidas al crecimiento*

Según MILLWARD y col. (1975), la cantidad de proteína y de RNA aumenta en la misma proporción según aumenta el crecimiento.

En la relación entre la síntesis proteica y la concentración de RNA se consideran dos componentes: en primer lugar la capacidad para realizar la síntesis proteica, indicada por la relación RNA/proteína, y en segundo lugar la medida en que se utiliza dicha capacidad, señalada por la tasa de síntesis proteica por unidad de RNA o actividad del RNA.

A ratas Wistar macho se les deja acceso a la comida únicamente entre las 9 y las 13 horas y después de 2 semanas de someterse a este régimen, son sacrificadas. Además, hay un lote con el cual se realiza el mismo experimento, pero con dieta sin proteínas (MILLWARD y col., 1974b). Después del ayuno hay un aumento en la síntesis proteica muscular. Esto es debido a que los cambios en la concentración de RNA en el músculo esquelético son factores importantes en los cambios en la síntesis proteica muscular (GARLICK y col., 1973). Los cambios en la concentración del RNA son como consecuencia de alteraciones en la síntesis y en la degradación. MUNRO (1968) ha sugerido que el incremento del RNA muscular después del ayuno es provocado por la protección del RNA ribosómico para la formación de polisomas con actividad ribonucleasa reducida. Como resultado, la tasa de degradación disminuye y la cantidad de RNA aumenta.

La tasa de síntesis por unidad de RNA es semejante en varios tejidos, con excepción del cerebro, en donde el control de la síntesis es función del contenido de RNA asociado al núcleo celular del tejido. El valor medio para hígado, músculo esquelético, corazón y riñón es de 15.4 g de proteína sintetizada por gramo de RNA por día, concluyendo que el contenido de RNA de un tejido o la relación RNA/proteína es un buen indicador de la tasa de síntesis proteica en él, según hipótesis de CASPERSON (1950). Incluso se puede afirmar que, puesto que la mayor parte del RNA tisular es ribosomal, el número de ribosomas por célula y la actividad de estos ribosomas en el proceso translacional refleja un índice de la capacidad ribosomal; dicho índice se obtiene de la relación RNA/proteína y de la actividad ribosomal de la síntesis por unidad de RNA.

Durante el crecimiento postnatal apenas varía la actividad del RNA, de modo que sólo podrán producirse cambios en la síntesis proteica por unidad de DNA, si varía la relación RNA/DNA.

En este sentido, MOON y KIRKSEY (1973) señalan incrementos en la relación RNA/DNA en hígado, músculo y cerebro de rata durante unas pocas semanas de vida postnatal.

Estudios que incluyen el crecimiento hasta 550 g. de peso corporal (DEVI y col., 1963) indican que no se producen cambios en la relación RNA/DNA en hígado y músculo, aunque sí un ligero descenso en el cerebro. Parece que la cantidad de RNA por célula permanece relativamente constante en estos tejidos, mientras el peso corporal aumenta más de 10 veces.

No hay acuerdo acerca de si el ejercicio varía el "turnover proteico". RENNIE y col. (1982) han demostrado que la incorporación de ^{14}C -tirosina dentro de la proteína muscular se reduce después de un ejercicio intenso "in vivo". Sin embargo, DAVIS y col. (1985) sugieren que el ejercicio no tiene efecto sobre la síntesis proteica en tejido muscular aislado. KASPEREK y col. (1980) demuestran que el ejercicio provoca un descenso significativo del nivel de proteína hepática, y sugieren que el cambio en la proteína hepática debe tener un papel importante en el metabolismo proteico inducido por el ejercicio. Más recientemente, HAYASE y YOKOGOSHI (1992) examinaron las tasas de síntesis proteica en el hígado y en el intestino delgado "in vivo", tras la administración de altas dosis de 3H-fenilalanina. Cuando las ratas fueron sometidas a ejercicio durante 7 días, la síntesis proteica disminuyó en el hígado y en el intestino delgado, como consecuencia de una disminución en la actividad del RNA. También determinaron las tasas de síntesis proteica, concentración y actividad de RNA en músculos gastrocnemio y soleus después de 7 días de ejercicio. En este experimento, el peso del músculo, las tasas de síntesis proteica y la concentración y actividad de RNA no se alteraron.

2.5.3.2.2. Modificaciones en el RNA muscular producidas por la dieta

El suministro de aminoácidos provoca cambios en la actividad RNA polimerasa (HENDERSON, 1970), en la síntesis de componentes de los ribosomas (FRANCE- FERNANDEZ y POGO, 1971), y en la síntesis de RNA y maduración (VAUGHAN, 1972). También influye en la degradación del RNA ribosómico, en el "pool" de nucleótidos de purina y en la reutilización de la purina. Cuando se produce la entrada de aminoácidos hay agregación de monosomas a polisomas en el hígado. Esto provoca un incremento de la síntesis proteica y acumulación de RNA que es incorporado en monosomas y polisomas. Hay aumento en la síntesis "de novo" de purinas medido por la incorporación de glicina marcada con ^{14}C en el RNA dentro del "pool" de nucleótidos de purina. Si la rata está alimentada con una dieta deficiente en proteínas, los polisomas se disgregan, hay una acumulación de subunidades y el RNA disminuye más que la incorporación de monosomas y polisomas

(CLIFFORD y col., 1972). Estos estudios coinciden con los de REEM y FRIEND (1969), quienes demostraron que cuando el proceso de absorción se ha completado, o cuando la rata es alimentada con dietas carentes de proteínas, los polisomas se disgregan, con acúmulo de subunidades.

La agregación de ribosomas en polisomas se deteriora si el triptófano (FLECK y col., 1965; WUNNER y col., 1966) la treonina o la isoleucina (IP y HARPER., 1973; PRONCZUK y col., 1970) se suprimen de la dieta. Estudios en células cultivadas en un medio sin valina, histidina o metionina muestran que la disgregación de polisomas está asociada a una marcada reducción en las tasas de síntesis proteica, de la elongación de la cadena peptídica e incluso de la iniciación de la cadena peptídica a través de la acción inhibitoria como consecuencia de la acumulación de tRNA (CLIFFORD, 1980).

Se admite que el RNA ribosomal se encuentra en una proporción del 80% del contenido total. Además, se ha demostrado que las concentraciones de rRNA cambian paralelamente con el RNA total del músculo, en respuesta a la deficiencia proteica en la dieta (YOUNG, 1974). Se puede asumir, por tanto, que los cambios en la concentración de RNA total muscular reflejan alteraciones en la concentración de ribosomas.

Cuando se mide el contenido de RNA en músculo de ratas sometidas a ayuno se ha demostrado que existen dos fases: una rápida con caída de la síntesis por ribosoma y otra con pérdida total de ribosomas (MILLWARD y col., 1973; WATERLOW y col., 1978a). MUNRO y col. (1953) examinaron el efecto de las variaciones de ingesta energética sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos. La adición de grasa o carbohidratos a una dieta deficiente en energía da como resultado un aumento en el RNA total. NARAYANA y MORRISON (1965) observaron que la restricción calórica afecta a la concentración de RNA, pero no al de DNA en el músculo de ratas que recibían 1 g. de caseína diariamente.

El mecanismo de la pérdida de RNA del músculo en ratas en ayuno ha sido investigado por HIRSCH e HIATT (1966), apuntando que es debido al aumento en la degradación de RNA. ENWONWU y col. (1971) sugieren en estas circunstancias que el incremento en la degradación coincide con un menor incremento en la síntesis muscular del RNA ribosómico.

La elongación de la cadena polipeptídica puede reducirse si se limita el aporte de aminoácidos esenciales, y esto produce alteraciones en la distribución de polisomas en el mensajero.

Como consecuencia de la falta de aminoácidos se producen cambios que incluyen la modificación de los constituyentes de los aminoácidos antes de la formación de la cadena peptídica (hidroxilación de los residuos de prolina del colágeno) y después de la formación de la cadena peptídica (metilación de los residuos de histidina de la actina y miosina, y la adición de carbohidratos como

glicoproteínas). La protrombina es otra proteína que sufre estos mismos cambios (GOSWAMI y MUNRO, 1962; STENFLO y GANROT, 1972).

MILLWARD y col. (1974a) señalan la existencia de una relación directa entre la concentración muscular de RNA y la insulina plasmática, pero menor correlación entre la concentración muscular de RNA y la de aminoácidos esenciales intracelulares, después de someter a ratas jóvenes durante dos semanas a consumir una dieta cada 4 horas.

Los cambios en la tasa de síntesis proteica muscular están asociados con cambios en el contenido muscular de RNA. En una drástica reducción de proteínas, la disminución de la capacidad de la síntesis proteica es cuantitativamente más importante que la disminución en la eficiencia (MILLWARD y col., 1973). Cuando se añaden cantidades de insulina y de aminoácidos libres, se producen en el músculo la agregación de subunidades en polirribosomas y aumenta la síntesis proteica (MORGAN y col., 1971).

ZHRINGER y col. (1985) demostraron una reducción del 20-25% del contenido total de RNA (principalmente ribosomal) y mRNA en el corazón y en el miocardio de ratas después de 72 horas de ayuno.

2.5.4. ACCION HORMONAL SOBRE EL "TURNOVER" PROTEICO EN EL MUSCULO

2.5.4.1. INSULINA

MILLWARD y col. (1974a) señalan que los cambios de RNA en el músculo expresados como RNA/DNA son paralelos a los cambios de la insulina plasmática. Tanto los aminoácidos (MUNRO, 1968) como la insulina (JEFFERSON y col., 1972) afectan la agregación de los ribosomas. En el ayuno, las concentraciones de aminoácidos no esenciales son mayores que las encontradas durante el período de ingesta de comida, mientras que la concentración de RNA disminuye. Esto indica que la acción directa de la insulina sobre los ribosomas es más importante que el efecto como transportador de aminoácidos.

Los cambios paralelos en la insulina y en la concentración del RNA pueden reflejar el papel que la insulina tiene en la síntesis de RNA. WOOL (1963) ha demostrado el efecto estimulador de la insulina en la síntesis de ácidos nucleicos, pero otros no han podido demostrar algún efecto "in vitro" (MANCHESTER, 1970).

La insulina tiene un efecto estimulador de la síntesis proteica y un potente efecto inhibitorio en la degradación proteica en corazón de ratas, así como la capacidad de disminuir la tasa de degradación proteica ribosomal (ASHFORD y PAIN, 1986a; ASHFORD y PAIN, 1986b).

La insulina estimula la utilización de la glucosa, suprime la producción de glucosa endógena e inhibe la lipólisis. También tiene un papel importante en la regulación del metabolismo proteico por la supresión de la proteólisis y la estimulación de la síntesis proteica (JENSEN y col., 1988).

La insulina tiene, entre sus acciones, la regulación de la captación de glucosa y aminoácidos por el músculo, estimulando el sistema de transporte A, sobre el cual ejerce un efecto inhibitorio de su degradación y estimulador de su síntesis, actuando a nivel post-transcripcional (GUIDOTTI y col., 1974). Se ve así favorecida por la acumulación en el músculo únicamente de los aminoácidos transportados por este sistema (aminoácidos de cadena lateral corta, polar o lineal) (MANCHESTER, 1970).

Cuando los niveles de insulina están bajos, se produce una degradación de la proteína muscular y liberación de aminoácidos a los tejidos (GOLDBERG y CHANG, 1978b). Bajo estas condiciones, el balance proteico en músculo es el mayor determinante de la gluconeogénesis hepática.

La insulina ejerce cuatro acciones:

1. Estimula el transporte de aminoácidos dentro de los tejidos por activación del sistema de transporte sodio-dependiente (NARAHARA y HOLLOSZY, 1974).
2. Aumenta la síntesis proteica promoviendo la iniciación y la translocación (FULKS y col., 1975).
3. También inhibe la degradación proteica (FULKS y col., 1975). La capacidad de la insulina para disminuir la proteólisis es demostrable, incluso cuando la glucosa no está presente en el medio. La glucosa por sí sola es capaz de inhibir la degradación proteica en músculos aislados sin afectar la síntesis proteica (FULKS y col., 1975). Sin embargo, las elevaciones de la insulina y de la glucosa en plasma tras la ingesta de alimento promueven la acumulación de aminoácidos en el músculo, ya que la insulina es fundamental para el crecimiento normal del músculo. En músculo esquelético y cardíaco, la insulina inhibe la degradación proteica y disminuye la fragilidad lisosomal sin alterar el contenido total de enzimas lisosomales en este tejido (RANNELS y col., 1975).

4. La insulina estimula la síntesis de proteínas miofibrilares, ya que durante un crecimiento rápido hay acumulación de proteínas miofibrilares, y en ayuno disminuye su síntesis (BATES y col., 1983). Hay disminución en la producción de 3-metilhistidina por la falta de insulina en ratas perfundidas (SMITH y SUGDEN, 1986) y en ratas diabéticas (GOODMAN, 1987).

Tanto ROBERT y col. (1982) como FUKAGAWA y col. (1985), estimulan la secreción de insulina mediante la administración de glucosa a sujetos tanto en ayuno como alimentados. El descenso en la degradación proteica que acompaña el comienzo de la alimentación es mediado por el aumento de la insulina plasmática. Cuando se administra insulina a sujetos en ayunas hay disminución, tanto de la síntesis proteica como en la oxidación de los aminoácidos; en sujetos alimentados sucede lo contrario.

PAIN y col. (1983) observan que al tercer día de retirar la insulina a ratas diabéticas se produce una pérdida de proteína del músculo esquelético. La síntesis proteica muscular en ratas diabéticas sometidas a ayuno es capaz de responder a la administración de comida incluso con bajos niveles de insulina, aunque la respuesta es mucho mayor si se administra insulina, pero incluso sin administrar comida, lo cual demuestra que la insulina aumenta la síntesis proteica.

En músculos de ratas incubados, la adición de insulina al medio provoca un incremento en la síntesis proteica y un descenso en la degradación (STIREWALT y LOW, 1983). GELFAND y BARRETT (1987) inyectan insulina por vía intravenosa a ratas, observando que la síntesis proteica no se altera durante los primeros 10 minutos tras la infusión, pero entre los 10 y 60 minutos se produce un incremento importante. Este cambio, sin embargo, sólo fué observado a elevadas concentraciones de esta hormona. Por otra parte, PREEDY y GARLICK (1986) consideran que la insulina no es responsable únicamente de la estimulación de la síntesis proteica muscular tras la ingestión de comida, sino que debe existir otro factor adicional presente durante la comida que incremente la sensibilidad de esta hormona.

Más recientemente, investigaciones con técnicas de isótopos radiactivos han demostrado que la acción de la insulina es la inhibición de la proteólisis (FREXES-STEED y col., 1990; BENNETT y col., 1990). La hiperinsulinemia fisiológica disminuye la degradación proteica, tanto a nivel del organismo (FREXES-STEED y col., 1990; BENNETT y col., 1990) como del músculo esquelético (FRYBURG y col., 1991; TESSARI y col., 1991). También la insulina aumenta la síntesis proteica "in vitro" (KIMBALL y JEFFERSON, 1988), lo cual ha sido difícil demostrar "in vivo" (FREXES-STEED y col., 1990; BENNETT y col., 1990). Existe una controversia, puesto que en estudios "in vitro" se ha establecido que la insulina es el mayor estímulo para la síntesis proteica en varias preparaciones de tejidos (KIMBALL y JEFFERSON, 1988). Por el contrario, en otros estudios, con una hiperinsulinemia,

se produce una marcada supresión de la síntesis proteica (CASTELLINO y col., 1987; FLAKOLL y col., 1989; FREXES-STEED y col., 1990).

Algo que se ha considerado como muy claro en toda la bibliografía es que tanto "in vivo" como "in vitro", la concentración de insulina y de aminoácidos está fuértemente influenciada por el metabolismo proteico (McNURLAN y GARLICK, 1989).

La inyección de insulina al nacer provoca hipoglicemia, supresión de los niveles de algunos aminoácidos e inhibición de la conversión de 14C-substratos en glucosa. La inyección de glucosa al nacer provoca un aumento de la glicemia e insulina en plasma, la supresión de la mayoría de los aminoácidos y la conversión de 14C-substratos en glucosa (GIRARD y col., 1976). La administración de insulina a ratas recién nacidas frente a ratas control provoca un descenso en los aminoácidos asparragina, glutámico, citrulina, alanina, lisina y arginina (GIRARD y col., 1976).

La insulina tiene un papel predominante intrauterino en el crecimiento. La continua provisión de glucosa desde la circulación materna, la hace innecesaria para que el hígado produzca glucosa por glucogenolisis o gluconeogénesis. Sin embargo, al nacer, ocurren una serie de cambios para activar rápidamente los mecanismos para la producción de glucosa hepática; parece probable que sea debido a la disminución de insulina y al aumento del glucagón en el momento de nacer (GIRARD y col., 1973).

Tras la inyección de insulina a ratas fetales, hay una disminución en los niveles de aminoácidos de cadena ramificada, mediado por la insulina, vía estimulación de la síntesis proteica en el músculo de los fetos (GIRARD y col., 1976).

Se ha demostrado "in vivo" que la tasa de síntesis proteica está disminuida tanto en corazón como en músculo esquelético de ratas diabéticas y pueden volver a sus valores normales si se administra insulina (ASHFORD y PAIN, 1986b). De igual forma, la reducción en la tasa de síntesis proteica es parcialmente reversible con insulina (GARLICK y col., 1983).

La diabetes insulín-dependiente (Tipo 1) se caracteriza por una pérdida de proteína corporal y por el papel de la insulina en el control del metabolismo proteico (FORKER y col., 1951). Los pacientes con diabetes tipo 1 presentan degradación proteica y oxidación de los aminoácidos, que se incrementa durante la retirada de la insulina, pero la síntesis proteica no es diferente de los sujetos normales. Cuando se administra la insulina las tasas de degradación proteica y de oxidación de aminoácidos vuelven a sus valores normales (UMPLEBY y col., 1986). NAIR y col. (1987) también observan un aumento en la degradación proteica y en la oxidación de los aminoácidos en este tipo de diabetes, pero al administrar insulina todos estos datos vuelven a sus valores normales.

La diabetes tipo 1 está caracterizada por una resistencia a la insulina con respecto al metabolismo de la glucosa (SIMONSON y col., 1985; TREVISAN y col., 1986). Más recientemente, INCHIOSTRO y col. (1992), han demostrado que pacientes con diabetes insulín-dependiente presentan una resistencia a la insulina con respecto a la capacidad de inhibir la proteólisis endógena.

Sin embargo, cuando se mide en pacientes con diabetes no insulín-dependiente (Tipo 2) el "turnover" proteico durante episodios de pobre control de glicemia, si después de una semana de tratamiento con insulina no mejoran (ALBERTSE y col., 1979), la resistencia a la insulina no está influida por el metabolismo proteico.

OLIVER y col. (1977) demostraron que hay una pérdida de sensibilidad en los islotes pancreáticos como consecuencia del ayuno. RAO (1988) señala que la malnutrición en ratas provoca un descenso en la respuesta secretora de las células beta del páncreas.

ESCRIVA y col. (1992) demuestran que en ratas con restricción en la ingesta, un descenso de la secreción de insulina puede ser debido a cambios en la ultraestructura de las células beta del páncreas (WEINKOWE y col., 1977) o a un aumento en la concentración de somatostatina que YOUNOSZAI y DIXIT (1980) encontraron en ratas con deficiencia proteica. Con la técnica de "euglicemic-hyperinsulinemic clamp" utilizada por ESCRIVA y col. (1992), la producción de glucosa disminuyó a la mitad en las ratas control, pero permanece alta en las ratas privadas de proteína. Estos resultados demuestran que hay una resistencia de insulina hepático-dependiente en ratas con malnutrición. La vía metabólica que contribuye a la producción de glucosa es diferente; probablemente, en las ratas control se produce principalmente glucogenólisis, mientras que en las ratas privadas de proteína se produce principalmente gluconeogénesis, y se debe tener en cuenta que la gluconeogénesis es menos sensible a la inhibición de la insulina que la glucogenólisis (CHIASSON y col., 1976).

BAILLIE y GARLICK (1992) señalan una respuesta diferente en las tasas de síntesis proteica en diferentes músculos de la rata adulta durante el mismo período de restricción alimentaria. Igualmente sucede con la administración de insulina. Así, el músculo "soleus" es el menos afectado tanto a la privación de comida como a la administración de insulina, mientras que el "tensor fascia latae" muestra el mayor aumento de síntesis proteica por la estimulación con insulina.

Se ha descubierto en el suero polipéptidos que tienen acciones similares a la insulina con respecto al metabolismo de la glucosa, pero que no se reconocen con anticuerpos anti-insulina. Estos factores se llamaron inicialmente "no supresores de la actividad de la insulina", pero se ha demostrado más tarde que corresponden a polipéptidos con actividad de promover el crecimiento de células en cultivo. Se han identificado dos factores diferentes: IGF-I e IGF-II (ZAPT y col., 1981). El factor

IGF-I corresponde a la Somatomedina-C, con acciones de hormona del crecimiento (D'ERCOLE y col., 1984). La insulina y el factor IGF-I estimulan la síntesis proteica, teniendo un efecto aditivo. También se ha observado que el factor IGF-I, al igual que la insulina, incrementa preferencialmente la síntesis de proteína miofibrilar. El factor IGF-II es conocido también por su actividad de multiplicación-estimulación. Se ha sugerido que tiene un papel importante en el crecimiento fetal y neonatal, puesto que aumenta mucho más sus niveles en suero de ratas fetales que en el suero materno, y desciende varios días después del nacimiento (ADAMS y col., 1983). Tanto IGF-I como IGF-II reducen la degradación proteica en un 20-30% en músculo de ratas (KETTELHUT y col., 1988).

La administración del IGF-I provoca un descenso significativo de la concentración de glucosa, probablemente debido a la interacción del IGF-I libre con los receptores de insulina (GULER y col., 1987).

2.5.4.2. GLUCAGON

El glucagón es un potente activador de la glucogenolisis y gluconeogénesis y es capaz de incrementar la producción endógena de glucosa en minutos, aunque el efecto es transitorio (DEVLIN y HORTON, 1988).

La acción del glucagón sobre el metabolismo de los aminoácidos es:

- Incrementar el transporte de membrana de los mismos.
- Disminuir la síntesis proteica e incrementar el catabolismo.
- Aumentar la conversión de aminoácidos en glucosa (MARLISS y col., 1972).

Algunas de las acciones conocidas del glucagón son opuestas a las de la insulina, y su concentración en el plasma se incrementa durante el ayuno (CAHILL, 1976). El efecto del glucagón se ha medido en individuos a los que se les ha inyectado somatostatina, la cual impide la liberación de insulina. Dentro de las 2 horas siguientes a la infusión de glucagón, hay un aumento en la degradación proteica y en la oxidación de la leucina. Esto está relacionado con el incremento en la degradación de proteínas del hígado. El glucagón también tiene efectos sobre el músculo, puesto que altas concentraciones de esta hormona inhiben la síntesis proteica muscular tanto "in vitro" como "in vivo" (PREEDY y GARLICK, 1985).

El glucagón es un potente inductor de la macroautofagia en el hígado y de la degradación proteica (WOODSIDE y col., 1974; SCHWORER y MORTIMORE, 1979).

La inyección de glucagón en ratas fetales provoca un aumento de la glucosa en sangre, así como de la insulina, y una disminución de los niveles en sangre de la mayoría de los aminoácidos (GIRARD y col., 1976), mientras que en ratas recién nacidas no hay efecto; esto es debido a que en ratas recién nacidas los niveles endógenos de glucagón en plasma ejercen un efecto máximo sobre los aminoácidos del plasma y al añadir glucagón, no se observa el efecto.

Cuando se inyecta glucagón a ratas recién nacidas frente a ratas control aumentan los niveles de taurina, mientras que disminuyen los de tirosina y arginina (GIRARD y col., 1976). También aumenta la capacidad de convertir el lactato en glucosa, provocando una generalizada y marcada hiperaminoacidemia (GIRARD y col., 1976) y aumentando la capacidad de convertir el lactato, la alanina y la serina en glucosa.

2.5.4.3. GLUCOCORTICOIDES

La ritmicidad liberadora de los corticoides, principalmente del cortisol, puede variar o verse interrumpida por diferentes situaciones fisiológicas como "stress" físico y fisiológico mediada, generalmente, por el Sistema Nervioso Central. En estos casos, la liberación del cortisol aumenta. Cabe incluir en este proceso traumas severos como cirugía, hipoglucemia, fiebre, quemaduras, calor, radiaciones, hipotensión, deshidratación y ejercicio intenso o moderado (SCHULTE y col., 1985).

Los glucocorticoides reciben este nombre por sus propiedades reguladoras de los niveles de glucosa en sangre. Influyen en el catabolismo de hidratos de carbono, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, pero su papel principal es actuar como protectores frente a la privación de glucosa (DE MOOR y col., 1980).

Al medir la síntesis y la degradación proteica en sujetos normales a los cuales se les ha infundido hidrocortisona, se observa que la degradación proteica se incrementa cuando aumenta la concentración de cortisol en el plasma. Al mismo tiempo, la síntesis "de novo" de alanina está aumentada, la cual favorece la gluconeogénesis (GOLDBERG y GOLDSPINK, 1975). Esto sugiere que el cortisol interviene en la regulación del metabolismo proteico.

Los glucocorticoides ejercen una acción opuesta a la insulina en el metabolismo proteico, disminuyendo el contenido de proteínas de la carcasa y aumentando la del hígado (MUNRO, 1964). Su efecto global es la supresión del crecimiento y el desgaste muscular. Durante el ayuno o la deficiencia proteica se elevan las concentraciones sanguíneas de glucocorticoides, mientras que las concentraciones de insulina disminuyen. Al actuar ambas hormonas sobre el músculo de forma antagonica, la relación de sus concentraciones es un importante determinante del predominio de los

procesos anabólicos o catabólicos. Parece que se detiene el crecimiento muscular cuando la razón es mayor de 6, y cuando es 21 o mayor hay pérdida de proteína.

La mayoría del trabajo experimental indica que los glucocorticoides ejercen su efecto metabólico sobre la proteína muscular a través de la supresión de la síntesis proteica, más que por un aumento de la degradación de la proteína (ODEDRA y col., 1983). De este modo, estas hormonas inhiben la síntesis proteica muscular, probablemente a nivel de la traducción.

Otros trabajos señalan que los esteroides adrenales actúan de varias formas para favorecer la liberación de aminoácidos por el músculo. Disminuyen la concentración de aminoácidos en el músculo y disminuyen también tanto la síntesis de DNA como de proteínas, probablemente a nivel de la translocación (McGRATH y GOLDSPINK, 1982).

Durante el ayuno, los corticosteroides tienen un importante papel en aumentar la degradación proteica, y su respuesta es de vital importancia para el mantenimiento de la glucosa en sangre (GOLDBERG y col., 1980).

Además de suprimir la síntesis proteica, los glucocorticoides también inhiben la síntesis de DNA, por el cese inmediato del aumento normal de DNA hepático y muscular en ratas en crecimiento tratadas con la hormona. En este sentido, GOLDBERG y GOLDSPINK (1975) demuestran que la *incorporación de timidina al DNA en varios tejidos está marcadamente suprimida por el tratamiento con cortisol.*

MILLWARD y col. (1983) han sugerido que el rápido aumento de la síntesis proteica dentro de la primera hora en ratas en ayuno es debido a la disminución plasmática de corticosterona más que a un aumento de la insulina. Sin embargo, en músculo esquelético incubado "in vitro", la adición al medio de esteroides disminuye la síntesis proteica e incrementa la degradación después de 3-4 horas, no después de 1 hora (McGRATH y GOLDSPINK, 1982).

La inyección de cortisol al nacer provoca una marcada y generalizada hiperaminoacidemia, aumento de la glucosa en sangre y de la insulina plasmática, una estimulación en la secreción de glucagón y la conversión de ^{14}C -substratos en glucosa (GIRARD y col., 1976).

La administración de corticosteroides a ratas recién nacidas produce un aumento drástico de los niveles de aminoácidos en plasma, probablemente por el resultado de un aumento en la degradación proteica (YOUNG, 1970). La hiperglicemia observada después de la administración de corticosteroides a ratas recién nacidas es debida al aumento en la gluconeogénesis en respuesta a la estimulación de la secreción de glucagón. La gluconeogénesis es debida a un aumento en la

producción de lactato y de aminoácidos a alanina por transaminación con el piruvato y a la conversión de todos estos substratos a glucosa en el hígado.

En cualquier caso, es evidente que la acción de este tipo de hormonas sobre la proteólisis depende del estado nutricional. Así, mientras en animales bien alimentados, el factor principal es la pérdida de proteína muscular con un descenso de la síntesis proteica (preferentemente la miofibrilar), sin elevarse necesariamente la degradación (McGRATH y GOLDSPIK, 1982), durante el ayuno los glucocorticoides desempeñan un papel esencial estimulando el catabolismo de la proteína muscular, respuesta esencial en el mantenimiento de la glucosa sanguínea (GOLDBERG y col., 1980). La explicación a la diferente acción de los glucocorticoides sobre la proteólisis en el estado normal o de ayuno, parece estar en la influencia que ejerce la insulina sobre la respuesta del músculo a los esteroides, viéndose implicada en este proceso la activación de una ruta no lisosomal dependiente del ATP.

2.5.4.4. HORMONAS TIROIDEAS

FLAIM y col. (1978a) indican que una reducción de la hormona tiroidea es la responsable del descenso de la degradación proteica en músculo. Igual descenso en la proteólisis tiene lugar en ratas a las cuales se extirpa el tiroides, y cuyo tratamiento con tiroxina (T₄) o triyodotironina (T₃) incrementa la degradación proteica hasta niveles normales (GRIFFIN y GOLDBERG, 1977).

Estudios llevados a cabo por GRIFFIN y GOLDBERG (1977) demuestran que niveles fisiológicos de hormonas tiroideas inducen el crecimiento en ratas sin tiroides puesto que estimulan la síntesis proteica en músculo más que la degradación. Altos niveles de estas hormonas parecen ser los responsables de la pérdida muscular por incremento de la degradación proteica más que de la síntesis.

FLAIM y col., (1978b) realizaron un tratamiento con T₃, observando que aumenta la síntesis proteica muscular con aproximadamente igual tasa que la de la hormona del crecimiento. Sin embargo, en ratas sin hipófisis tratadas con hormona del crecimiento, el crecimiento es más efectivo que si se tratan con T₃ o T₄, probablemente porque la hormona del crecimiento aumenta la síntesis proteica sin aumentar la degradación.

La síntesis proteica muscular es estimulada por la hormona tiroidea (TISCHLER, 1981). En el hombre, la excreción de 3-metilhistidina está aumentada por la hormona tiroidea (BURMAN y col., 1979).

La T₃ también influye en la tasa de síntesis proteica mediante la regulación de la producción de ribosomas (MILLWARD y col., 1986). Solamente cuando la hormona está presente en cantidades relativamente grandes es cuando predominan sus efectos catabólicos. Así, el descenso plasmático de T₃ libre en ratas con deficiencia proteica severa (COX y col., 1984) podría mediar el descenso tanto en la síntesis como en la degradación proteica en dichos animales (MILLWARD y col., 1975; GARLICK y col., 1975). Sin embargo, no está claro cómo la inducción de cambios paralelos en la síntesis y degradación proteica por la T₃, pueden influir en el balance proteico neto (JEPSON y col., 1988).

JEPSON y col. (1988), así mismo observan que la hormona T₃ estimula la concentración muscular de RNA, coincidiendo con trabajos previos que muestran pérdida de RNA muscular después de tiroidectomía (FLAIM y col., 1978b), y se producen antes de cualquier descenso de la ingesta o de la insulina (BROWN y col., 1981).

En la rata existe una relación lineal entre la degradación proteica y el control de la actividad de las proteinasas lisosomales. Los efectos catabólicos de la T₃ están reducidos cuando hay falta de proteínas en la dieta (BURINI y col., 1981).

2.5.4.5. HORMONA DEL CRECIMIENTO Y SOMATOMEDINA-C (IGF-1)

La hormona del crecimiento es segregada por las células acidófilas de la adenohipófisis y está influida por la secreción de dos factores liberados por las neuronas hipotalámicas ventromediales: las células neurotróficas, que liberan el factor de la hormona del crecimiento, y las hormonas secretoras de somatostatina, que inhiben su secreción.

La concentración plasmática de la hormona del crecimiento en el adulto en el estado basal es de 2 a 3 ng/ml, pero varía dependiendo de la edad, sexo, actividad física, "stress" y factores metabólicos.

FLAIM y col., (1978a) observaron que al extirpar la hipófisis a ratas, éstas disminuyen el crecimiento, incluido el del músculo esquelético, y que tanto la síntesis proteica como el contenido de RNA estaban por debajo de sus niveles normales. Cuando estas ratas son tratadas con hormona del crecimiento, el crecimiento y la síntesis proteica aumentan.

La hormona del crecimiento favorece la síntesis proteica en todo el organismo, pero el efecto sobre la proteólisis es pequeño, tanto en el estado post-absortivo como durante la ingesta. Además, la hormona del crecimiento estimula la síntesis proteica en el músculo esquelético. Elevadas

dosis de hormona del crecimiento con prednisona previene los efectos catabólicos de la prednisona sola.

Tras 12 días de administración diaria de la hormona del crecimiento a corderos en crecimiento, se ha demostrado que ésta estimula el turnover proteico, siendo el incremento en la síntesis superior al incremento en la degradación (PELL y BATES, 1987). Estudios llevados a cabo por CROMPTON y LOMAX (1989) muestran estos mismos efectos en músculo de corderos. Cuando PELL y col. (1989) administran la hormona del crecimiento a corderos, se obtiene un aumento en las concentraciones de "insulin-like growth factor-1" (IGF-1) en plasma, así como un aumento en el peso corporal y en el peso del hígado.

La hormona del crecimiento, en presencia o ausencia de elevadas dosis de prednisona en voluntarios sanos, no tiene efecto en la absorción de leucina marcada (HORBER y HAYMOND, 1990). Bajo condiciones de alimentación y de ayuno, la hormona del crecimiento estimula la síntesis proteica, pero no tiene efectos sobre la proteólisis.

La hormona del crecimiento ejerce también su acción en la regulación de la síntesis de DNA en el músculo (CHEEK y HILL, 1970). Se observa déficit en el DNA muscular en ratas hipofisectomizadas en el destete. La inyección de hormona del crecimiento promueve la acumulación de DNA, mientras el efecto de la insulina es mucho menos marcado (CHEEK y GRAYSTONE, 1969).

LEE y col. (1974) observaron que el tamaño celular (proteína/DNA) desciende por tratamiento con la hormona del crecimiento. Estos autores sugieren que la hormona del crecimiento estimula la replicación del DNA.

La hormona del crecimiento ejerce muchos de sus efectos no directamente, sino a través de la acción de las somatomedinas, cuyos efectos son semejantes a los de la insulina (HALL y LUFT, 1974). En kwashiorkor y muchos casos de marasmo, la concentración plasmática en ayuno de la hormona del crecimiento es alta, y desciende durante la recuperación. Las somatomedinas evolucionan *de modo opuesto, con una concentración baja en malnutrición y aumento durante la recuperación* (WATERLOW y col., 1978 c). Quizá, en malnutrición, la hormona del crecimiento es incapaz de inducir la síntesis de somatomedinas, de modo que por un proceso de "feed-back" hay un aumento en la producción de la hormona que es inefectivo.

Durante la primera semana de administración de la hormona del crecimiento, los pacientes presentan un balance de nitrógeno positivo (CLEMMONS y col., 1987). Sin embargo, durante las semanas 2 y 3, su balance de nitrógeno fué estadísticamente menos negativo que el inducido por la restricción calórica solamente (0.5 g/día frente a 2.4 g/día). Así, la hormona del

crecimiento es capaz de atenuar la tasa de pérdida de nitrógeno significativamente en sujetos con una modesta restricción calórica.

Para conocer si el efecto de la hormona del crecimiento, sobre el balance de nitrógeno depende de la ingesta calórica, a individuos sanos se les restringió la ingesta calórica. La hormona del crecimiento fué capaz de aumentar la retención de nitrógeno en comparación con sujetos que habían ingerido una dieta control durante aproximadamente 4 semanas (SNYDER y col., 1988). Esto permite concluir que la hormona del crecimiento puede ser utilizada sólo como un agente anti-catabólico.

En estudios de la hormona del crecimiento sobre pacientes en post-operatorio que reciben una significativa restricción calórica, la administración de hormona del crecimiento provoca una marcada mejora en la síntesis proteica (WARD y col., 1987), así como en el balance de nitrógeno (ZEIGLER y col., 1988). Sin embargo, pacientes con una sepsis bacteriana que reciben hormona del crecimiento no mejoran la síntesis de IGF-I ni el balance de nitrógeno (DAHN y col., 1988).

Uno de los aspectos más importantes de la hormona del crecimiento en el crecimiento y desarrollo normal, es su estimulación en el anabolismo proteico a expensas del aumento de grasa. Esto tiene importancia para aplicaciones médicas: la hormona del crecimiento inhibe la degradación muscular que acompaña a múltiples enfermedades y promueve la conversión de nutrientes dentro de los tejidos. La administración de hormona del crecimiento aumenta la síntesis proteica (PELL y BATES, 1987) y se asocia con un aumento en la concentración de IGF-I circulante (HARPER y col., 1987).

Estudios "in vitro" han demostrado que se requiere tanto la acción de la hormona del crecimiento como del IGF-I para un crecimiento y desarrollo normal en muchos tejidos, como el óseo. El efecto de un tratamiento combinado entre la hormona del crecimiento y la IGF-I es aditivo. La hormona del crecimiento tiene un pequeño efecto sobre el aumento de peso en ratas (BATES y HOLDER, 1988).

Tanto la hormona del crecimiento como la IGF-I estimula la síntesis proteica muscular entre un 45 y un 109%. Los mecanismos por los que actúan son similares: estimulación de la cantidad total (presumiblemente ribosomal) de RNA y aumento en la eficiencia del RNA en términos de la cantidad de proteína sintetizada por unidad de tiempo. Este análisis indica que todos estos efectos son aditivos. La similitud de respuesta entre hormona del crecimiento e IGF-I implica que la hormona del crecimiento podría actuar vía IGF-I en músculo (PELL y BATES, 1992). Tanto la hormona del crecimiento como el IGF-I tienen diferente acción, implicando que podrían tener diferentes modos de actuación. Una acción sinérgica de la hormona del crecimiento y de IGF-I se ha demostrado "in vitro" (LINDAHL y col., 1987), pero no ha sido confirmado "in vivo" (SKOTTNER y col., 1987).

El mecanismo por el cual la hormona del crecimiento interviene en la síntesis proteica es mediante la generación de IGF-I (FRYBURG y col., 1991). En humanos a los cuales se les ha infundido IGF-I en dosis suficientes como para provocar hipoglicemia, la proteolisis en todo el organismo disminuye, no aumentando la síntesis proteica. Estos resultados sugieren que IGF-I, bajo condiciones experimentales, pueden afectar al metabolismo proteico vía receptor de insulina.

El IGF-I es transportado por el plasma por una gran variedad de complejas proteínas (BP). La IGF-BP3 es la más abundante en el plasma y actúa como reservorio de IGF-I en la sangre. Un 50% en la disminución de IGF-BP3 se observa en individuos tratados con hormona del crecimiento (HAYMOND y col., 1992).

Los IGF's intervienen mediando los efectos anabólicos de la hormona del crecimiento en la síntesis proteica del músculo esquelético. Administrando hormona del crecimiento a voluntarios sanos a los cuales se les ha sometido a una restricción calórica, mejoran el balance de nitrógeno. Tanto el IGF-I como la hormona del crecimiento aumentan la masa muscular (CLEMMONS y UNDERWOOD, 1992).

Cuando existe restricción energética, la biosíntesis del IGF-I en respuesta a la secreción endógena de hormona del crecimiento está atenuada (CLEMMONS y UNDERWOOD, 1992). La restricción tanto de proteína como de energía es el causante de la reducción en un 66% de la ingesta proteica en ratas, o la restricción a 11 kcal/kg en humanos severamente debilita la respuesta de IGF-I a la hormona del crecimiento (MOATS-STAMINOCIDOSTS y col., 1984). Por el contrario, la restricción a 24 kcal/kg no atenúa la capacidad de la GH de generar IGF-I en voluntarios sanos.

Los efectos de la hormona del crecimiento se producen a través de la generación del IGF-I; así, elevadas dosis de hormona del crecimiento produce hipoglicemia y descenso de la proteolisis, sugiriendo que predomina el efecto del IGF-I (HAYMOND y col., 1992).

Elevadas dosis de glucocorticoides utilizados en el tratamiento de enfermedades provocan la pérdida de proteína corporal, pudiendo llegar a ser severa en algunos pacientes (HORBER y col., 1986). Por otro lado, el tratamiento con hormona del crecimiento humana provoca un aumento de la síntesis proteica y el crecimiento en niños, reduciendo las pérdidas de nitrógeno en gran variedad de procesos catabólicos (CLEMMONS y col., 1987).

El ayuno provoca secreción de la hormona del crecimiento en el hombre, y se ha considerado como hormona del ayuno, por aumentar la movilización y la utilización de las grasas. Puede influir en los niveles basales de ácidos grasos y en la respuesta de la insulina a la glucosa, pero gran parte de la adaptación metabólica al ayuno parece depender de la menor secreción de insulina y de la relación Insulina/STH en plasma más que de los valores absolutos de la hormona del crecimiento.

Como conclusión, la administración de hormona del crecimiento a elevadas dosis puede prevenir los efectos catabólicos de los corticosteroides en humanos. La administración simultánea de cantidades farmacológicas de hormona del crecimiento y esteroides provoca resistencia a la insulina e hiperglicemia, particularmente durante la absorción de la ingesta, a pesar del aumento de la concentración de IGF-I en el plasma (HAYMOND y col., 1992).

3.MATERIAL Y METODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1.1. ESTUDIO DE LA CARENCIA DE FENILALANINA + TIROSINA + TRIPTOFANO (PHE+TYR+TRP) EN LA DIETA

Los animales de experimentación se distribuyen según los siguientes lotes:

LOTE I. DIETA CONTROL

Formado por 17 ratas Wistar macho con un peso inicial aproximado de 87 ± 6.7 g, a las cuales se le administró una dieta control balanceada con un 10% de proteína (caseína 9.8 % + DL-metionina 0.2 %). El experimento se desarrolló durante 14 días, los cuales se inician después de transcurridos tres días de adaptación a la dieta control, sacrificando las ratas los días 4 (seis animales), 10 (seis animales) y 14 (cinco animales) del experimento. Tanto el control de peso como de ingesta se llevó a cabo diariamente y la recogida de orina y heces cada 3 días. El día del sacrificio, entre las 9 y las 12 horas, se recogió la sangre previa anestesia con pentobarbital sódico a razón de 30 mg/Kg de peso, por canulación de la carótida y se extirparon ambos músculos gastrocnemios, los cuales se pesan congelados en nitrógeno líquido (-130°C) y se guardan para su posterior análisis.

LOTE II. DIETA CARENTE EN FENILALANINA+TIROSINA+TRIPTOFANO (Phe+Try+Trp)

Constituido por 17 ratas Wistar macho con un peso inicial de 87 ± 6.7 g al que se le suministró la dieta II carente de aminoácidos aromáticos Phe+Tyr+Trp 10% de proteína (aminoácidos cristalinos con ausencia de Phe+Tyr+Trp). El experimento tiene una duración de 14 días después de transcurridos tres días en los cuales los animales se adaptan a la dieta control. Los animales fueron sacrificados los mismos días que el lote anterior, y la toma de muestras se obtuvo de igual forma.

3.1.2. ESTUDIO DE LA CARENCIA DE PHE+TYR+TRP EN LA DIETA CON RESTRICCIÓN ENERGÉTICA DEL 50%

LOTE I. DIETA CONTROL

Formado por 17 ratas Wistar macho con un peso inicial aproximado de 87 ± 6.7 g, a las cuales se le administró una dieta control balanceada con un 10% de proteína (caseína 9.8% + DL-metionina 0.2 %). El experimento se desarrolló durante 14 días, los cuales se inician después de transcurridos tres días de adaptación a la dieta control, sacrificando las ratas los días 4 (seis animales), 10 (seis animales) y 14 (cinco animales) del experimento. Tanto el control de peso como de ingesta se llevó a cabo diariamente y la recogida de orina y heces cada 3 días. El día del sacrificio se recogió la sangre de la carótida, previa anestesia con pentobarbital sódico a razón de 30 mg/Kg de peso, y se extirparon ambos músculos gastrocnemios; se introducen en nitrógeno líquido (-130°C), se pesan y guardan para su posterior análisis.

LOTE III. DIETA CARENTE EN PHE+TYR+TRP Y CON LA MITAD DE ENERGÍA QUE LA DIETA II

Grupo formado por 11 ratas Wistar macho, con un peso inicial de 87 ± 6.7 g, al que se le suministró la dieta III carente de aminoácidos aromáticos Phe+Try+Trp (20% de proteína), constituida por aminoácidos cristalinos carentes de Phe+Try+Trp con reajuste del resto de los nutrientes para que dicha dieta, al ser suministrada "pair fed" con respecto a la dieta II con la mitad de lo ingerido en este caso (por diseño experimental), aporte aproximadamente la mitad de la energía que la dieta II y el resto de los nutrientes aminoácidos, vitaminas y minerales están en concentración igual a la dieta II. La toma de muestras se obtuvo de igual forma y los animales fueron sacrificados los días 4 y 10, respectivamente. A partir del día 12 la viabilidad de los animales era muy escasa.

3.1.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA INGESTA POR CARENCIA DE PHE+TYR+TRP EN LA DIETA

LOTE II. DIETA CARENTE EN FENILALANINA+TIROSINA+TRIPTOFANO (Phe+Try+Trp)

Constituido por 17 ratas Wistar macho con un peso inicial de 87 ± 6.7 g al que se le suministró la dieta II carente de aminoácidos aromáticos Phe+Tyr+Trp con el 10% de proteína substituida por aminoácidos cristalinos con ausencia de Phe+Tyr+Trp. El experimento tuvo una

duración de 14 días después de transcurridos tres días de adaptación de los animales a la dieta control. Los animales fueron sacrificados los mismos días que el lote control, y la toma de muestras se obtuvo de igual forma.

LOTE IV. DIETA CONTROL ADMINISTRADA "PAIR FED" AL LOTE II.

Constituido por 18 ratas Wistar macho con un peso inicial de 87 ± 6.7 g al que se le suministró una dieta control balanceada del 10% de proteína (caseína 9.8 % + DL-metionina 0.2 %), igual a la dieta control y administrada "pair fed" respecto al lote II.

El experimento tiene una duración de 14 días, los cuales se inician después de transcurridos tres días de adaptación a la dieta control. El sacrificio de los animales se realiza en los días 4 (seis animales), 10 (seis animales) y 14 (cinco animales) del experimento. La toma de muestras se llevó a cabo del mismo modo que en los lotes anteriores.

3.2. DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

Se utilizan 72 ratas macho de la raza Wistar, procedentes del animalario del Departamento de Nutrición y Bromatología I de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Se trata de ratas macho en período de crecimiento a las que, después del destete, se alimenta con dietas stock de laboratorio, hasta alcanzar un peso aproximado de $87 + 6.7$ g. A continuación, los animales se distribuyen en jaulas individuales de metabolismo. A partir de este momento, y después de tres días de adaptación durante los cuales se les administra la dieta control y agua "ad libitum", se inicia el período experimental.

Los animales son distribuidos en 4 lotes, recibiendo dietas de distinta composición según se expuso en el diseño experimental. Las dietas I y II se administran "ad libitum" y la dieta III a la par y con la mitad de la ingesta del segundo lote.

La dieta III tiene una composición semejante a la dieta II, pero ajustada de modo que al ser administrada a la mitad de la ingesta de la dieta II, por diseño experimental, proporcione la mitad de energía, pero la misma cantidad del resto de los nutrientes. De este modo se retrasa un día el desarrollo del experimento del lote III con respecto a los lotes I y II.

La dieta IV tiene la misma composición que la dieta control y es administrada "pair fed" respecto al lote II.

Durante los 14 días del período experimental, se mantienen los animales a una temperatura ambiental constante de 23°C, humedad adecuada (50%) y ciclos luz-oscuridad de 12 horas.

El agua se suministra "ad libitum" y diariamente se determinan la ingesta y el peso corporal, mientras que la orina y las heces se recogen cada tres días, coincidiendo con el día señalado para el sacrificio.

Ante los signos de deterioro que empiezan a manifestar los animales del lote III, llegando incluso a la muerte de los mismos el día 14, se inicia un período de realimentación a partir del día 14 hasta el día 20 en que son sacrificadas. Los resultados de este proceso, al carecerse de un número suficiente de individuos, se posponen para un estudio posterior.

En el presente estudio, previa anestesia con pentobarbital sódico (30mg/kg de peso), se extrae la sangre mediante canulación de la arteria carótida y se sacrifican los animales los días 4, 10 y 14 entre las 9 y las 12 horas, extrayéndoles ambos músculos gastrocnemios, los cuales se pesan congelados en nitrógeno líquido (-130°C).

Se estudian los siguientes parámetros:

En el ANIMAL:

- Ingesta
- Peso corporal
- Balance de Nitrógeno.

En PLASMA:

- Colesterol
- Insulina
- Glucosa
- Relación insulina/glucosa
- Aminoácidos libres .

En GLOBULOS ROJOS:

- Aminoácidos libres.

En ORINA:

- Urea
- Creatinina
- 3-metilhistidina.

En MUSCULO GASTROCNEMIO:

- Peso del músculo gastrocnemio
- Peso relativo del músculo gastrocnemio
- Proteínas solubles
- Índices de crecimiento: contenido total de DNA y RNA, las relaciones correspondientes proteína /DNA, RNA/proteína y RNA/DNA, número de núcleos y tamaño celular.
- Actividades enzimáticas ácidas DNAsa, RNAsa, relaciones DNAsa/DNA, RNAsa/RNA, RNAsa/DNA, fosfatasas ácida y alcalina, beta-D-glucuronidasa, GOT y GPT.
- Aminoácidos libres.

Los aminoácidos libres y agrupados considerados en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio son:

- Aminoácidos de cadena ramificada (AAR): Ile, Leu y Val.
- Suma de aminoácidos de cadena ramificada: Ile + Leu + Val.
- Aminoácidos gluconeogénicos: Asp, Glu, Aspⁿ, Gluⁿ, Ser, Gly, Thr y Ala.
- Aminoácidos aromáticos (AAA): Phe, Tyr.
- Aminoácidos básicos (AAB): Arg, His.
- Aminoácidos azufrados: Met, Tau.
- Suma de aminoácidos esenciales (AAE): Arg + His + Ile + Leu + Val + Thr + Phe + Met + Lys.
- Suma de aminoácidos no esenciales (AANE): Ala + Asp + Glu + Gluⁿ + Gly + Ser + Tyr.
- Aminoácidos totales (AAT): AAE + AANE.
- Aminoácidos neutros (AAN): AAR + AAA.
- Suma de aminoácidos aromáticos (AAA): Tyr + Phe.

Relaciones entre aminoácidos:

- AAR/AAA
- AAE/AANE
- Isoleucina/AAN-Ile
- Leucina/AAN-Leu
- Valina /AAN-Leu
- Fenilalanina/AAN-Phe
- Tirosina/AAN-Tyr
- Fenilalanina/Tirosina
- Alanina/Tirosina
- Alanina/Leucina
- Alanina/AAR
- Ser+Gly+Ala/AAR
- Glicina/Valina.

Tradicionalmente, el crecimiento del cuerpo total o de los órganos individuales ha sido medido como ganancia de peso únicamente (DUNN y col., 1947). El descubrimiento del DNA ha hecho posible calcular el número de núcleos diploides en varios órganos de la rata, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de núcleos (millones)} = \frac{\text{DNA total órgano (mg)} \times 10^3}{6.2}$$

donde 6.2 es la cantidad de DNA, en número de núcleos diploides de la rata (ENESCO, 1957). Esta fórmula fué utilizada para representar el número de células. Determinaron el tamaño celular dividiendo el peso total del órgano por el número de núcleos:

$$\text{Tamaño celular} = \frac{\text{Peso total órgano (g)} \times 10^3}{\text{N}^\circ \text{ de núcleos (millones)}}$$

Esta medida no tiene en consideración la contribución hecha por varios componentes celulares y no celulares. El DNA se encuentra localizado casi completamente dentro del núcleo y la cantidad de DNA es constante dentro del núcleo diploide de varias especies (THOMSON y col., 1953).

3.3. COMPOSICION DE LAS DIETAS UTILIZADAS

3.3.1. DIETA I O CONTROL, CON 10% DE PROTEINA (CASEINA 9.8 g + DL-METIONINA 0.2 g)

Ingredientes (a)	g/kg dieta (s.s.s.)
Almidón	200.00
Sacarosa	534.60
Celulosa	55.40
Aceite de oliva	50.00
Mezcla mineral (b)	50.00
Mezcla vitamínica (b)	10.00
Caseína	98.00
Metionina	2.00

(a) Según HEGER y FRYDRYCH (1985).

(b) Según ASSOCIATION OF OFICIAL AGRICULTURAL CHEMIST (1970).

La composición de la mezcla mineral es la siguiente:

Ingredientes	g/kg de mezcla mineral
ClNa	139.300
IK	0.790
PO ₄ H ₂ K	389.000
SO ₄ Mg anhidro	57.300
CO ₃ Ca	381.400
SO ₄ Fe.7H ₂ O	27.000
SO ₄ Mn.H ₂ O	4.010
SO ₄ Zn.7H ₂ O	0.548
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0.477
Cl ₂ CO.6H ₂ O	0.023

La mezcla vitamínica está formada por:

Ingredientes	mg de dieta
Vitamina A	6.88
Vitamina D	0.05
Vitamina E	1000
Menadiona	5
Colina	2000
P-aminobenzoico	100
Inositol	100
Niacina (Ac.nicotínico)	40
D-Pantotenato cálcico	40
Riboflavina	8
Tiamina ClH	0.5
Piridoxina ClH	5
Acido fólico	2
Biotina	0.4
Vitamina B ₁₂	0.03
Almidón	c.s.p. 10 g
Kcal/kg de dieta (a) (s.s.s.)	3.710

(a) Según COATES (1976).

3.3.2. DIETA II CON 10 % DE PROTEINA (AMINOACIDOS CRISTALINOS EXENTOS DE PHE+TYR+TRP)

Ingredientes (a)	g/kg dieta (s.s.s.)
Almidón	200.00
Sacarosa	534.60
Celulosa	50.00
Aceite de oliva	50.00
Mezcla mineral (b)	50.00
Mezcla vitamínica (b)	10.00
Aminoácidos totales(c)	105.40

(a) Según HEGER y FRYDRYCH (1985).

(b) Según ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMIST (1970).

(c) Según NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

La composición de las mezclas mineral y vitamínica es igual que la anteriormente detallada para la dieta I.

La mezcla de aminoácidos esenciales se compone de:

Ingredientes	g/kg dieta
Clorhidrato de Arginina	7.3
L-Histidina	3.0
L-Isoleucina	5.0
Clorhidrato de L-Lisina	8.7
L- Treonina	5.0
L-Valina	6.0
L-Metionina	4.0
L-Cisteína	2.0
L-Leucina	7.5

La mezcla de aminoácidos no esenciales se compone de:

Ingredientes	g/kg dieta
L-Alanina	6.033
L-Asparragina	7.890
L-Glutamina	2.228
L-Acido aspártico	6.033
L-Acido glutámico	2.231
L-Glicina	24.598
L-Prolina	1.764
L-Serina	6.033
Kcal/kg de dieta (s.s.s)	3.710

3.3.3. DIETA III CON 20% DE PROTEINA (AMINOACIDOS CRISTALINOS EXENTOS DE PHE+TYR+TRP), DOBLES CANTIDADES DE CELULOSA, MEZCLA MINERAL, VITAMINICA Y AMINOACIDOS QUE LA DIETA II, CON REAJUSTE DE LAS CANTIDADES DE ALMIDON Y SACAROSA

Ingredientes (a)	g/kg dieta (s.s.s.)
Almidón	346.36
Sacarosa	172.84
Celulosa	100.00
Aceite de oliva	50.00
Mezcla mineral (b)	100.00
Mezcla vitamínica (b)	20.00
Mezcla aminoácidos(c)	210.80
Kcal/kg de dieta (s.s.s)	3.521

(a) Según HEGER y FRYDRYCH (1985).

(b) Según ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMIST (1970).

(c) Según NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

Las mezclas mineral y vitamínica son iguales a las anteriormente citadas, pero teniendo en cuenta que la cantidad de cada uno de los componentes debe ser el doble a la allí descrita.

La mezcla de aminoácidos es igual a la detallada para la dieta II, pero con doble cantidad de cada uno de los aminoácidos.

El control de la composición de las dietas se realiza por medio de las técnicas de rutina, determinando nitrógeno total (por el método de Kjeldahl), grasa (por el método de Soxhlet), humedad y cenizas.

3.3.4. DIETA IV, CON 10% DE PROTEINA (CASEINA 9.8 g + DL-METIONINA 0.2 g), IGUAL A LA DIETA CONTROL, PERO SE SUMINISTRA "PAIR FED" CON RESPECTO A LA DIETA II

La finalidad de esta dieta es distinguir los efectos de la disminución de la ingesta de la falta de aminoácidos aromáticos.

Ingredientes (a)	g/kg dieta (s.s.s.)
Almidón	200.00
Sacarosa	534.60
Celulosa	55.40
Aceite de oliva	50.00
Mezcla mineral (b)	50.00
Mezcla vitamínica (b)	10.00
Caseína	98.00
Metionina	2.00

(a) Según HEGER y FRYDRYCH (1985).

(b) Según ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMIST (1970); la composición de las mezclas mineral y vitamínica es igual a las anteriormente citadas.

3.4. DETERMINACIONES ANALITICAS

3.4.1. TOMA DE MUESTRAS

3.4.1.1. ORINA Y HECES

La recogida de orina y heces de tres días consecutivos se realiza en jaulas individuales de metabolismo.

La orina es recogida en cápsulas "ad hoc" que contienen 5 ml de una solución de timol al 5% en isoproterenol y 10 ml de agua destilada; se lleva a matraces aforados de 250 ml y,

seguidamente se enrasa con agua destilada que contiene 1% de timol (p/v). Se toma una alícuota y se conserva a -20°C, hasta posterior análisis.

Así mismo, las heces de tres días se mantienen a -20°C envueltas con papel de aluminio, para evitar su desecación.

3.4.1.2. SANGRE Y MUSCULO GASTROCNEMIO

Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 30 mg de pentobarbital sódico / kg de peso corporal. La solución anestésica contiene:

Pentobarbital	30 mg
Propilenglicol	200 mg
Etanol	100 mg
Agua destilada	c.s.p. 1000 ml

La sangre se obtiene mediante canulación de la arteria carótida y es recogida en tubos de hematocrito y de hemodiálisis heparinizados (4 mg de heparina/ml de sangre). Los tubos se centrifugan a 550 g durante 15 minutos, separando de esta manera el plasma de los eritrocitos y otros elementos formes.

Los músculos gastrocnemios son extirpados, e inmediatamente se ultracongelan en un vaso Dewar que contiene nitrógeno líquido a una temperatura de -130°C, pesándolos a continuación.

3.4.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

3.4.2.1. DETERMINACIONES EN MUSCULO GASTROCNEMIO

3.4.2.1.1. Determinaciones enzimáticas y de proteínas

Se pesa una alícuota de tejido y se suspende en una solución tampón de ClNa 0,1 M y CO₃HNa 0,005 M en una proporción del 20% (p/v) pH=7,4 a 0°C. A continuación se homogeniza con un aparato ultraturax a 20.000 r.p.m. bajo hielo durante 14 segundos. El homogenado se centrifuga a 550 g durante 15 minutos en refrigeración a 4°C para evita

inactivaciones enzimáticas. Se separa el sobrenadante y en él se realizan las determinaciones enzimáticas.

3.4.2.1.2. Determinación de ácidos nucleicos DNA y RNA

Una alícuota de músculo gastrocnemio se somete a una serie de lavados para precipitar las proteínas. En primer lugar, se tratan con 2 ml de ácido tricloroacético al 20%; a continuación, la mezcla se centrifuga a 200 g durante 3 minutos. Se decanta y al precipitado se le añaden 5 ml de etanol absoluto; se vuelve a centrifugar, se decanta y al precipitado se le añaden otros 5 ml de etanol absoluto; se vuelve a centrifugar a 200 g durante 3 minutos. Al precipitado se le añaden 2 ml de tricloroacético al 10%. Se lleva a un baño a 100°C durante 5 minutos, sumergiéndolo a continuación en hielo para su enfriamiento, y se vuelve a centrifugar a 200 g durante 3 minutos. El sobrenadante se recoge y se utiliza para la determinación de DNA y RNA. La determinación de DNA se realiza siguiendo el método de Burton y la de RNA según el método de Dische, como se describe posteriormente.

3.4.2.2. DETERMINACIONES EN SANGRE

La sangre se centrifuga a 550 g durante 15 minutos, separando así el plasma de los glóbulos rojos.

El plasma se utiliza para la determinación de aminoácidos libres, tratándose con metanol (0.1 ml de plasma en 2 ml de metanol), que precipita las proteínas del plasma y los aminoácidos se extraen en el alcohol. Se centrifuga a 700 g durante 10 minutos y se conserva el sobrenadante a -20°C para hacer las determinaciones de aminoácidos libres.

Lo mismo se hace con los glóbulos rojos previa sonicación para hemolizarlos. En el sobrenadante se determinan los aminoácidos libres.

3.4.3. SISTEMA CROMATOGRÁFICO

El sistema cromatográfico (H.P.L.C.) consta de los siguientes elementos:

- 1 *Depósito de disolventes:* Se emplean dos botellas de plástico de 5 litros de capacidad, donde están los disolventes A y B, que constituyen la fase móvil del sistema.

2. *Bombas de alta presión:* Se utilizan dos bombas de la casa Waters modelo 6.000 A, cuya estructura electrónica está descrita en los manuales de instrucciones correspondientes. Son bombas hidráulicas que impulsan el disolvente a presión y flujo constantes y están reguladas por un gradiente lineal.
3. *Inyector automático:* El modelo empleado es el Wisp 710 B de la casa Waters. La descripción de su mecánica y estructura electrónica están descritas en los manuales de instrucciones correspondientes.

Consta de un manómetro, que regula la presión del sistema a 30 P.S.I., con objeto de captar un volumen adecuado de solución estándar, muestras y solución derivatizante. Estos volúmenes son inyectados al principio de la columna mediante una jeringa regulada automáticamente. También se compone de un sistema portador de muestras, autorregulado con 96 viales.

4. *Columna:* Se utiliza el modelo R 1.362 Hypersil ODS 5 micras de acero inoxidable, con unas dimensiones de 15x0.4 cm, cuya misión es separar los distintos componentes de la muestra de aminoácidos según el coeficiente de partición entre el hidrocarburo de la columna y la mezcla de diluyentes.
5. *Detector:* Es un espectrofluorímetro, que mide la fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con la mezcla de orto-ftalaldehído y 2-mercaptoetanol. Transmite automáticamente a la aguja inscriptora una señal proporcional a la concentración de dichos aminoácidos.

El detector de fluorescencia consta de dos partes:

- a) Unidad electrónica: Detector de Fluorescencia, modelo 420 E de la casa Waters.
- b) Unidad celular: Detector de Fluorescencia, modelo 420 C de la casa Waters.

El conjunto está formado por los siguientes elementos: fuente de luz, filtros, células de flujo, fotodetector, amplificador, lector y suministrador de energía.

La detección de fluorescencia es una técnica cualitativa y cuantitativa en la cual se utilizan sustancias fluorescentes. Esa fluorescencia se consigue por derivatización con la mezcla OPA y 2-mercaptoetanol.

6. *Procesador de datos:* El modelo utilizado es el "Data Module" de la casa Waters. Lleva un registrador termoelectrónico, que inscribe las señales emitidas por el detector, traducidas electrónicamente y amplificadas. Dichas señales son inscritas en forma de picos cuyas áreas son proporcionales a la cantidad de aminoácido presente en la muestra. Estas áreas son calculadas mediante un integrador automático que, mediante un procesador matemático, cuantifica las áreas de los picos de los aminoácidos objeto de estudio.
7. *Controlador programable:* Todos los aparatos descritos están conectados al sistema controlador programable, modelo 721 de Waters, que es un microprocesador capaz de controlar las funciones del cromatógrafo líquido de alta resolución (Sistema H.P.L.C.).

Empleamos el Software BASELINE, Chromatography Workstation BASELINE 810. Waters (1987 Millipore Corporation). USA.

3.4.4. TECNICAS EMPLEADAS

3.4.4.1. BALANCE DE NITROGENO

Se utiliza el método de KJELDAHL (ASSOCIATION OF OFICIAL AGRICULTURAL CHEMIST, 1970).

La riqueza en proteínas de una muestra (dieta, orina, heces, músculo gastrocnemio) se determina mediante la valoración del nitrógeno total multiplicándolo por el factor 6.25. Para ello el material biológico se digiere por calor con ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador (SO_4K_2 y HgO). El Nitrógeno en forma de grupos $-\text{NH}_3$ pasa a sulfato amónico.

La solución amónica se descompone con una solución concentrada de NaOH en ebullición en destilador Buchi, recogiendo el amoníaco que destila sobre una solución indicadora que contiene ácido bórico, rojo de metilo y verde de bromocresol, valorándolo posteriormente con ácido clorhídrico 0.01 N.

La solución indicadora está compuesta por:

Ingredientes	Solución parcial	Solución final
Acido bórico	2%	50,00 ml
Rojo de metilo	0.1% en etanol 96°	2.00 ml
Verde de bromocresol	0.2% en etanol 96°	1.50 ml
Agua destilada		c.s.p. 100 ml

A partir de los datos del contenido de Nitrógeno se calcula el contenido proteico multiplicando los gramos de Nitrógeno por el factor 6.25, expresándose en mg/día.

3.4.4.2. DETERMINACIONES EN EL HOMOGENADO DE MUSCULO GASTROCNEMIO

3.4.4.2.1. Proteínas Solubles

Se utiliza el método colorimétrico de Lowry (LOWRY y col., 1951).

Fundamento:

Mediante el tratamiento de los sobrenadantes de los homogenados con solución alcalina de tartrato de cobre, se forman complejos cúprico-aminoacídicos con las proteínas solubles.

La adición del reactivo de Folin-Ciocalteau (ácido fosfomolibdotúngstico), produce una coloración azul intensa, a consecuencia de la reducción del molibdato a óxido de molibdeno, por acción de los complejos cúprico-aminoacídicos.

La intensidad de coloración producida es proporcional a la concentración de proteínas solubles de la muestra.

Técnica:

A 0.1 ml del sobrenadante del homogenado diluído al 1/10 (v/v), se añaden 5 ml de reactivo cupro-alkalino (CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0.1 N y SO_4Cu al 0.5 % en tartrato sódico-potásico al 1%).

A los 20 minutos se adicionan 0.5 ml de reactivo fenol.

La lectura se lleva a cabo a los 30 minutos a 750 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva de calibración realizada con solución patrón de albúmina con una concentración de 1 mg/ml.

Los datos se expresan en mg de proteína/peso total del órgano.

3.4.4.2.2. Acido Deoxirribonucleico (DNA)

El método seguido es el método de Burton (BURTON, 1956).

Fundamento:

Al añadir difenilamina al DNA se origina una coloración azul como consecuencia de la reacción de la deoxiribosa del ácido nucleico, presentando una absorbancia proporcional a la cantidad de DNA.

Técnica:

Del sobrenadante obtenido, según se explicó en la preparación de las muestras para la determinación de ácidos nucleicos, se toma una alícuota y se mezcla con 2.5 volúmenes del reactivo de difenilamina. Se mantiene a 100°C durante 10 minutos, se enfría y se mide el color desarrollado a 600 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva patrón constituida con diferentes concentraciones de DNA tipo 1, la solución estándar de DNA tiene una concentración de 0.5 mg de DNA/1 ml.

La cantidad de DNA se expresa en mg por peso total del órgano.

3.4.4.2.3. Acido Ribonucleico (RNA)

El método utilizado es el de Dische (DISCHE, 1930).

Fundamento:

Se basa en la adición al RNA de orcinol y cloruro férrico. Se valora así la pentosa ribosa existente en el ácido nucleico.

Técnica:

Del sobrenadante obtenido tras el tratamiento con tricloroacético y metanol, en el cual hemos precipitado las proteínas, se toma una alícuota y se le añade Cl_3Fe al 0.01% (p/v) en CIH concentrado y el reactivo de orcinol al 10% en etanol.

Después de llevarlo a 100°C durante 45 minutos, se enfría y se mide la absorbancia del color desarrollado a 670 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva patrón de RNA, la solución estándar de RNA tipo 1 tiene una concentración de 1 mg/1ml.

La cantidad de RNA se expresa en mg por peso total del órgano.

3.4.4.2.4. Deoxirribonucleasa ácida (Deoxirribonucleato 3'Nucleotido Hidrolasa E.C.3.1.4.6.;DNAsa)

Se utiliza el método de McDonald modificado (McDONALD, 1955).

Fundamento:

El enzima DNAsa ácida es una endonucleasa que actúa sobre todas las uniones de tipo b, es decir, hidroliza las uniones 5'-OH de las pentosas y el grupo fosfato de los polinucleótidos.

Su acción sobre las cadenas de ácido deoxirribonucleico produce oligonucleótidos cuya extinción se puede medir por espectrofotometría a 260 nm y a 25°C. Las lecturas son proporcionales a la cantidad de oligonucleótido y éste a la actividad enzimática de las muestras.

Técnica:

Se prepara una solución tampón de acetato sódico 0.1M pH=5. Se obtiene mezclando 70.5 volúmenes de acetato sódico 0.1M y 29.5 volúmenes de ácido acético 0.1 M. Después se prepara una solución de SO_4Mg 2M.

El sustrato de ácido deoxirribonucleico se prepara al 0,05% (p/v). Para ello se pesan 50 mg de DNA tipo 1 (Sigma) y se mezclan con 10 ml de la solución de acetato sódico 0.1M pH=5. Una vez disuelto se añade la solución de SO_4Mg 2M, completando con agua destilada hasta 100 ml.

Se prepara ahora una solución de acetato de uranilo al 0.25% (p/v) en una solución de ácido perclórico 2.5% (p/v).

Es necesaria una suspensión enzimática de deoxirribonucleasa ácida tipo 1 de páncreas bovino cristalizado (Sigma) 3 UK/ml disuelta en solución salina bicarbonatada (solución stock de ClNa 0.15M y CO_3HNa 0.005M pH= 7.4). Con ella se construye la curva de calibración en presencia de la solución sustrato de DNA.

La reacción entre la solución sustrato de DNA y el homogenado problema, junto con Cl_2Mn 0.01 M, se realiza a 37°C durante 90 minutos. Esta reacción se detiene con adición de 0.5 ml de acetato de uranilo al 0.25% en ácido perclórico; a continuación se agitan las muestras y se

conservan durante 30 minutos en hielo picado. Seguidamente las muestras se centrifugan a 3.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante, tras su decantación, se lee a 260 nm frente al blanco.

Cálculos:

Esta lectura se lleva a una curva de calibración realizada con una solución patrón de DNAsa ácida.

Tanto las extinciones de la curva de calibración como las de los problemas, corresponden a la media de 2 determinaciones.

Los resultados se obtienen multiplicando por los factores de dilución correspondientes y se expresan en U.K. por órgano y por mg de proteína.

UK= Unidad Kunitz: Actividad enzimática que produce un incremento de la densidad óptica de 0.001 a 260 nm. a pH=5.0, a una temperatura de 25°C, utilizando sustrato DNA (Mg⁺⁺ concentración = 4.2 mM).

3.4.4.2.5. Ribonucleasa ácida (Ribonucleato Piridín-nucleótido 2'transferasa ciclizante E.C.2.7.7.16; RNAsa)

El método utilizado es el de Lazzari y col. modificado (LAZZARY y col., 1970).

Fundamento:

El enzima RNAsa es una endonucleasa que separa las uniones en 5' de los pirimidín nucleótidos. Su acción sobre las cadenas de ácido ribonucleico produce oligonucleótidos, cuya extinción se puede medir por espectrofotometría a 260 nm.

Las lecturas son proporcionales a la cantidad de oligonucleótidos, y ésta a la actividad enzimática de las muestras ensayadas.

Técnica:

Para un volumen de 1 ml se mezclan 0.5 ml de la solución de sustrato de RNA al 1% (p/v), en solución tampón de acetato sódico 0.1 M a pH=5 con 0.25 ml del sobrenadante del

homogenado, y se completa el volumen con tampón acetato 0.1 M. La reacción se lleva a cabo a 37°C durante 60 minutos.

El RNA no digerido se precipita con 1 ml de acetato de uranilo al 0.25% (p/v), en perclórico al 60%. La mezcla se mantiene en nevera durante 14 horas. Posteriormente se centrifuga a 7.000 r.p.m. durante 20 minutos.

Todas las muestras y estándares se diluyen 1/10 con solución stock y se determina la absorbancia de los oligoelementos liberados por espectrofotometría a 260 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva de calibración construída con una solución patrón de ribonucleasa A cristalizada (Sigma) con 0.05-0.005 unidades Kunitz por tubo.

La actividad específica del enzima se expresa en Unidades Internacionales en relación al órgano total, y en mUI en relación a los mg de proteína.

3.4.4.2.6. Fosfatasa ácida. (Ortofostórico monoéster fosfohidrolasa E.C.3.1.3.2.)

El método utilizado es el de Bessey y col. modificado (BESSEY y col., 1946).

Fundamento:

El sustrato del enzima, para-nitrofenilfosfato, es desdoblado por la acción de la fosfatasa ácida presente en la muestra a fosfato + paranitrofenol, compuesto coloreado, en medio ácido. La intensidad del color amarillo, obtenido por la liberación del para-nitrofenol es proporcional a la concentración de fosfatasa ácida.

Técnica:

Se añade a la muestra problema, diluida previamente 1/10 con solución salina bicarbonatada, un volumen de una solución de para-nitrofenilfosfato 5.5. uM en tampón citrato 50 mM a pH=4.8, incubándose a 37°C durante 30 minutos.

Cálculos:

La actividad enzimática específica se expresa en microunidades de para-nitrofenol liberado por minuto, después de la adición de NaOH 0.02 M.

La absorbancia de este producto se determina a 405 nm. Los resultados se llevan a una curva de calibración, construida con para-nitrofenol a diferentes concentraciones.

La actividad específica del enzima se expresa en UI/órgano total y en UI/mg de proteína.

3.4.4.2.7. Fosfatasa alcalina. (Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa E.C.3.1.3.1.)

El método utilizado es el de Bessey y col. modificado (BESSEY y col., 1946).

Fundamento:

Se basa en la utilización como sustrato del para-nitrofenil fosfato. La fosfatasa alcalina hidroliza el sustrato en medio alcalino y, al separarse el grupo fosfato, se mide colorimétricamente el para-nitrofenol liberado, cuyo color es proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina.

Técnica:

Se añade a la muestra a ensayar, diluida previamente 1/10 con solución salina bicarbonatada, un volumen de para-nitrofenil fosfato 5.5 micromolar en tampón glicina 50 mM a pH=10.5. El ensayo se realiza a una temperatura de 37°C durante 30 minutos.

Cálculos:

La actividad enzimática específica se expresa en micromoles de para-nitrofenol liberado por minuto, después de la adición de NaOH 0.02 M.

La actividad específica del enzima se expresa en UI/órgano total y en UI/mg de proteína.

**3.4.4.2.8. *Beta-D-Glucuronidasa*(*Beta-DGlucurónido glucuronohidrolasa*
E.C.3.2.1.3.1.)**

El método utilizado es el de Bergmeyer modificado (BERGMEYER, 1963).

Fundamento:

El enzima Beta-D-Glucuronidasa actúa sobre el sustrato 4-nitrofenil-beta-D-glucurónido, desdoblándolo en ácido glucurónico y para-nitrofenol. Este último se determina por colorimetría a pH básico.

El aumento de para-nitrofenol formado por unidad de tiempo indica la actividad de la Beta-D-Glucuronidasa.

Técnica:

Se añade a la muestra 0.8 ml de acetato buffer 0.2M a pH=3,8 y con 0,1 ml de ácido 4-nitrofenil-glucopiranosido 0.1 M disuelto en agua destilada, manteniéndolo a 38°C durante 30 minutos. A continuación se trata la mezcla con 1 ml de NaOH 1 N. La absorbancia se lee a 405 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva de calibración, construida con diferentes concentraciones de solución enzimática.

La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 micromol de sustrato por minuto.

La actividad específica del enzima se expresa en Unidades Internacionales o en mUnidades/minuto en relación a órgano total y mg de proteína.

3.4.4.2.9. Glutamato-oxalacetato-transaminasa (L-Aspartato: 2-oxo-glutarato aminotransferasa E.C.2.6.1.1.; GOT)

El método empleado es el de REITMAN y FRANKEL (1957).

Fundamento:

El enzima actúa sobre un sustrato de L-ceto-glutarato y L-aspartato y da lugar por *transaminación* a la formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato, en medio alcalino, forma hidrazonas con la dinitro-fenil-hidrazina, desarrollando una coloración proporcional a la actividad enzimática.

Técnica:

A 1 ml de solución que contiene 0.1 mmol de L-aspartato, 2 μ mol de L-cetoglutarato y 0.1 mmol de tampón fosfato a pH=7.4 se añade 0.2 ml de sobrenadante (diluído a 1/10) y se incuba en baño durante 1 hora a 37°C.

Se mide la absorbancia que se produce después de añadir 1 μ mol de 2,4-dinitrofenil hidrazina, mantener la muestra a temperatura ambiente durante 20 minutos y añadir NaOH 0.4 N, utilizando una longitud de onda de 546 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva de calibración construída con el sustrato correspondiente.

La actividad específica del enzima se expresa en UI por órgano total y por mg de proteína.

3.4.4.2.10. Glutamato-piruvato-transaminasa (L-alanina:2-oxo-glutarato aminotransferasa E.C.2.6.1.2.; GPT)

El método utilizado es el de REITMAN y FRANKEL (1957).

Fundamento:

El enzima actúa sobre un sustrato de alfa-cetoglutarato y D-L-alanina, formando glutamato y piruvato por transaminación.

En medio básico, el piruvato forma hidrazonas con la dinitrofenil-hidrazina, desarrollando un color proporcional a la actividad enzimática.

Técnica:

A 0.2 ml de la muestra problema (diluída 1/10) se añade 1 ml de una solución que contiene 0.2 mmol de D-L-alanina, 2 μ mol de alfa-cetoglutarato y 0.1 mmol de fosfato ph=7.4. La mezcla se incuba a 37°C durante 30 minutos.

A continuación se añade 1 μ mol de 2,4- dinitrofenilhidrazina, se mantiene a temperatura ambiente durante 20 minutos y se añade NaOH 0.4 M. Finalmente, se mide la absorbancia a 546 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva de calibración construída con el sustrato correspondiente.

La actividad específica del enzima se expresa en UI por órgano total o en UI por mg de proteína.

3.4.4.2.11. Aminoácidos libres en músculo gastrocnemio

Se determina por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (H.P.L.C.) según JONES y col. (1981).

Fundamento:

Los aminoácidos reaccionan con ortoftalaldehído en presencia de 2-mercaptoetanol, dando lugar a un compuesto que es isoindol tiosustituido, el cual es altamente fluorescente y detectable por las técnicas analíticas usuales.

Técnica:

Una alícuota de músculo gastrocnemio se trata en la proporción de 1 g con 50 ml de tricloroacético al 10% (p/v). Se homogenizan en un potter con pistón de teflón, con el fin de extraer los aminoácidos libres. Se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos y el sobrenadante se evapora a sequedad al vacío a 40°C; el extracto se conserva en congelador a -20°C para analizar los aminoácidos libres disolviéndolo en una solución de borato buffer 0.4 M pH=9.5. Una alícuota se procesa con la solución derivantizante para ser analizada en el cromatógrafo líquido (H.P.L.C.), de igual forma como se ha realizado la determinación de los aminoácidos libres en plasma y glóbulos rojos.

Reactivos y estandar de aminoácidos:

ELUYENTES:

Los eluyentes empleados para crear gradiente son las soluciones A y B.

Solución A: Formada por una mezcla de acetato sódico 0.05 M (pH=5.9), metanol (H.P.L.C.) y tetrahidrofurano (A.R.) en las proporciones de 800:190:10 (v:v:v), respectivamente.

Solución B: Formada por una mezcla de acetato sódico 0.05 M (pH=5.9) y metanol (H.P.L.C.) en la proporción de 200:800 (v:v), respectivamente.

Ambas soluciones se filtran a vacío a través de filtros Millipore de celulosa, tipo HULP, con poro de 0.45 micrómetros. Seguidamente se sonicán durante 10-15 minutos con el fin de eliminar las burbujas de aire que impiden el correcto funcionamiento de las bombas para crear el gradiente adecuado.

PREPARACION DE LA SOLUCION DERIVATIZANTE ORTOPTALALDEHIDO/2-MERCAPTOETANOL:

Se disuelven 25 mg de ortoptalaldehído (O.P.A.) en 0.63 ml de metanol absoluto (H.P.L.C.), añadiendo 25 µl de 2-mercaptoetanol y 5.6 ml de Borato sódico 0.4M (pH=9.5).

Para la conservación de esta mezcla se le hace fluir nitrógeno gaseoso mediante una pipeta Pasteur durante 10 minutos, para desalojar el oxígeno y conservarla en atmósfera inerte, dejándola reposar 24 horas antes de usarla. Cada dos días se añaden 5 μl de 2-mercaptoetanol para mantener el reactivo en forma reducida.

Para evitar contaminaciones y oxidaciones se prepara de nuevo cada siete días.

SOLUCION ESTANDAR DE AMINOACIDOS Y ESTANDAR INTERNO:

La solución estandar se prepara con 22 aminoácidos, a una concentración de 6.4 pmol/ μl cada uno de ellos. Se disuelven en una mezcla metanol:agua (v:v). Algunos aminoácidos, como la tirosina, se disuelven muy mal y es necesario disolverlos previamente por sonicación.

El estandar interno elegido es el ácido alfa-aminobutírico. Este se prepara a una concentración de 8 pmol/ μl .

Estas dos soluciones se conservan a -20°C .

SOLUCIONES COADYUVANTES:

Intensifican la fluorescencia y estabilidad de los aminoácidos derivatizados.

Se prepara una solución de dodecil sulfato sódico (S.D.S.) al 2% en borato sódico 0.4M pH=9.5, y una solución de Brij-35 al 2% en borato sódico 0.4M pH=9.5, que tiene la propiedad de resaltar la fluorescencia de determinados aminoácidos, cuya reacción de derivatización es baja.

La respuesta fluorescente de lisina e hidroxilisina y su estabilidad mejora con la adición de S.D.S. al 4% en borato sódico.

Se añade el surfactante Brij-35 para intensificar la fluorescencia de la lisina (JONES y col., 1981).

PROCESO DE DERIVATIZACION:

A 8 ml de la solución estandar de aminoácidos (10 pmol/ μl) se añade 1.25 ml de Sodio Dodecil Sulfato al 2% en borato sódico 0.4M a pH=9.5; 1.25 ml de Brij-35 al 2% en borato

sódico 0.4 M a pH= 9.5; 1 ml de la solución de alfa-aminobutírico, estándar interno (100 pmol/ml). Se agita la mezcla y se agrega 1 ml de Fosfato sódico 0.1 M pH=4.

Por otra parte se prepara la muestra problema. Para ello se mezclan previamente 5 ml de Dodecil Sulfato Sódico al 2% en Borato Sódico 0.4 M pH=9.5, 5 ml de Brij-35 al 2% en borato sódico 0.4 M pH=9.5 y 4 ml de la solución estándar interno A-ABA (100pmol/ml). Se agita y se añaden 4 ml de fosfato sódico 0.1 M pH=4.

De esta mezcla se toman 0.45 ml, a los que se agregan 0.8 ml de la mezcla estándar de aminoácidos, previamente preparada. Por ser el analizador de aminoácidos automático, inyecta 20 μ l del estándar de aminoácidos y 20 μ l de la solución derivatizante mediante una jeringa. Ambos volúmenes son dirigidos a la precolumna donde, al mezclarse, se derivatizan los aminoácidos, que son transportados a través de la columna cromatográfica Si-C18, pudiendo ser eluidos según su afinidad por ésta.

La misma operación se desarrolla con cada una de las muestras problema, obteniendo así los aminoacidogramas correspondientes, en los que son calculados los diferentes aminoácidos por integración de las áreas correspondientes a cada pico. Esta integración se lleva a cabo mediante el estándar interno, añadido a los problemas.

Después de 55 minutos de desarrollo se obtiene un aminoacidograma en el que cada pico corresponde a un aminoácido. Estos tienen un tiempo de retención constante tanto en la solución estándar de aminoácidos como en la solución problema.

Los aminoácidos del problema se cuantifican mediante la metodología del estándar interno.

METODO DEL ESTANDAR INTERNO:

Previamente a su aplicación es necesaria la calibración de la muestra estándar. Para ello se inyecta la solución estándar de aminoácidos y una vez desarrollado el aminoacidograma, cuyos aminoácidos tienen un tiempo de retención característico, implícitamente el integrador calcula las áreas de todos los picos y el factor de respuesta de cada aminoácido dividiendo la cantidad de aminoácido por el área correspondiente.

Se realiza el cálculo de los factores de respuesta (FR) de cada uno de los aminoácidos del estándar mediante la fórmula:

$$\text{Factor de respuesta} = \frac{\text{Cantidad del aminoácido en el estándar}}{\text{Area del aminoácido en el estándar}}$$

Esta solución de aminoácidos lleva un aminoácido que no se debe encontrar en el problema y que se añade al mismo para que se puedan corregir las pequeñas variaciones de volumen de la muestra estándar y problema al ser inyectados, mediante una fórmula que se aplica una vez desarrollado el aminograma del problema. Nosotros hemos utilizado el ácido alfa-aminobutírico como estándar interno.

Las concentraciones de los aminoácidos de la muestra, representadas por sus áreas, en forma de pico, se calculan multiplicando el área obtenida por su factor de respuesta en el estándar, y dividiéndolo por el área del estándar interno en el problema y por el factor de respuesta del estándar interno en la solución estándar.

$$C^* (\text{pmol}) = \frac{\text{FR del aa en estándar} \times \text{área del aa en problema}}{\text{FR del alfa-ABA en estándar} \times \text{área alfa-ABA en problema}}$$

C* = concentración.

Los resultados se expresan en $\mu\text{mol/l}$ de plasma, mediante la multiplicación por los factores apropiados, o por gramo de órgano.

3.4.4.3. DETERMINACIONES EN PLASMA

3.4.4.3.1. *Colesterol*

El método utilizado es el de ROSCHLAU y col. (1975) y TRINDER (1969b).

Fundamento:

El colesterol liberado de sus ésteres por la enzima colesterol-esterasa es oxidado liberando agua oxigenada, la cual reacciona con la 4-aminofenazona en presencia de fenol, dando lugar a la aparición de color (p-benzoquinona-monoimino-fenazona).

Técnica:

0.01 ml de plasma son tratados con 4 ml de reactivo colesterol, constituido por la mezcla de tres soluciones que contienen: la primera, fenol y metanol en tampón fosfato a pH=7.7; la segunda, 4-aminofenazona, metanol e hidroxipolietoxidodecano en tampón fosfato y la tercera, una mezcla de las tres enzimas que catalizan las reacciones anteriormente citadas.

Se incuba a 28°C durante una hora y se realiza la lectura en espectrofotómetro a 500 nm de longitud de onda.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva patrón realizada con distintas concentraciones de colesterol.

La concentración plasmática de colesterol se expresa en mg/100 ml de plasma.

3.4.4.3.2. Glucosa

Se emplea el método de TRINDER (1969a).

Fundamento:

La glucosa en presencia de O₂ y H₂O se oxida mediante la enzima glucosa oxidasa, formando agua oxigenada, que origina un compuesto coloreado al reaccionar con la 4-aminofenazona y fenol.

Técnica:

Se trata 0,02 ml de plasma con 2 ml de solución reactiva, compuesta por:

Tampón.tris-fosfato	180 mmol/l
Fenol	11 mmol/l
3-4-Diclorofenol	2.1 mmol/l
Eter poliglicólico de alcoh. graso	0.24 %
4-Aminofenazona	0.8 mmol/l
Peroxidasa	0.9 U/ml
Glucosaoxidasa	15 U/ml

La lectura se realiza a 510 nm después de incubación a 25°C durante 30-90 minutos.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva patrón realizada con una solución patrón de glucosa, tomando como blanco la solución reactiva.

Los resultados se expresan en mmol/l de plasma.

3.4.4.3.3. Insulina

Se utiliza el método radioinmunológico descrito por YALOW y BERGSON (1956; 1960), con marcaje según HUNTER y GREENWOOD (1962).

Fundamento:

La insulina de la muestra, fría, reacciona competitivamente frente a una cantidad constante de insulina marcada con ¹²⁵I para combinarse con un anticuerpo específico para ambas.

La combinación de la insulina marcada con el anticuerpo se determina midiendo la reactividad de la fracción de insulina libre, no combinada con el anticuerpo. Este parámetro está influido por la concentración de insulina fría.

Cálculos:

La fórmula aplicada, descrita en el método, es la siguiente:

$$C^*/I^* = C/I = B/F$$

C^* = Concentración de la hormona marcada ligada al anticuerpo.

I^* = Concentración de la hormona marcada libre.

C = Concentración de la hormona no marcada ligada al anticuerpo.

I = Concentración de la hormona no marcada libre.

Los cocientes B/F (entre la hormona ligada y libre) para la hormona marcada y para la hormona no marcada han de ser siempre iguales. Además, el cociente C^*/I^* disminuye al aumentar la concentración de insulina fría (I_0) porque disminuye C^* y aumenta I^* , ya que $C^* + I^* = I_0 = \text{cte}$, donde I_0 es la concentración total de insulina ^{125}I , que es una constante de radioinmunoensayo.

Se utiliza la relación existente entre la radioactividad (CPM) en la fracción de hormona libre (I^*) o combinada al anticuerpo (C^*) y la cantidad total de insulina fría para calcular la concentración de ésta última en las muestras.

Cálculos:

Se realiza una curva estandar con diluciones conocidas de insulina de rata (Novo Research Institute), que se harán reaccionar con el anticuerpo en presencia de una cantidad constante de insulina marcada.

Con esta curva se calcula la relación entre la insulina marcada ligada al anticuerpo C^* y la insulina fría total de las muestras I_0 . Los resultados se expresan en $\mu\text{UI/ml}$ de plasma.

3.4.4.3.4. Aminoácidos libres en plasma

Se determina por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (H.P.L.C.) según JONES y col. (1981).

Fundamento:

Los aminoácidos reaccionan con ortoftalaldehído en presencia de 2-mercaptoetanol, dando lugar a un compuesto que es isoindol tiosustituido, el cual es altamente fluorescente y detectable por las técnicas analíticas usuales.

Técnica:

La sangre arterial recogida previamente en tubos de vidrio heparinizados es centrifugada a 700 G durante 10 minutos. Se separa así el plasma de los glóbulos rojos, conservándose ambos en el congelador a -20°C para su posterior análisis.

Las proteínas se precipitan del plasma con metanol del 100% en la proporción de 0.1 ml de plasma y 2 ml de metanol. Esta mezcla se centrifuga a 700 G durante 10 minutos y del sobrenadante se toma una parte alícuota y se trata con borato 0.4 M (PH = 9.5) y solución reactiva hasta completar un volumen de 1.25 ml, de los cuales se toman 20 µl para inyectar en el cromatógrafo, los cuales se procesan con la solución derivatizante y así podremos determinar los aminoácidos libres.

Cálculos:

Se realizan de igual forma que la expuesta en el caso de la determinación en músculo gastrocnemio.

Los resultados se expresan en µmol/l de plasma, mediante la multiplicación por los factores apropiados.

3.4.4.4. DETERMINACIONES EN GLOBULOS ROJOS

3.4.4.4.1. Aminoácidos libres

Se determina por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (H.P.L.C.) según JONES y col. (1981).

Fundamento:

Los aminoácidos reaccionan con ortoftaldehído en presencia de 2-mercaptoetanol, dando lugar a un compuesto que es isoindol tiosustituido, el cual es altamente fluorescente y detectable por las técnicas analíticas usuales.

Técnica:

La sangre arterial recogida en tubos de vidrio heparinizados, se centrifuga a 700 G durante 10 minutos. Se separa así el plasma de los glóbulos rojos, conservándose ambos en el congelador a -20°C para su posterior análisis.

Los glóbulos rojos se mezclan en las mismas proporciones que el plasma con metanol y se someten a sonicación para romper las membranas de los mismos; se centrifugan a 700 g y se mezclan alícuotas del sobrenadante con borato y solución reactiva, tomándose de la mezcla obtenida una alícuota, la cual se procesa con la solución derivatizante para ser analizadas en el cromatógrafo líquido (H.P.L.C.)

Cálculos:

Se realizan de igual forma que lo expuesto en el caso de la determinación en plasma.

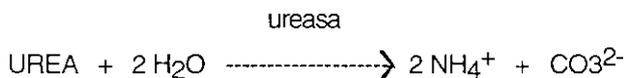
Los resultados en glóbulos rojos se expresan en $\mu\text{mol/l}$.

3.4.4.5. DETERMINACIONES EN ORINA

3.4.4.5.1. Urea

Se utiliza el método de hidrólisis por la ureasa que constituye la reacción de Berthelot (FAWCETT y SCOTT, 1960).

Principio:



Fundamento:

La ureasa actúa sobre la urea formándose carbonato de amonio. Los iones de amonio reaccionan con fenol e hipoclorito, formando un complejo coloreado.

Técnica:

0.1 ml de la dilución de orina se llevan a 5 ml con agua destilada. Se toman 0.2 ml y se tratan con 0.05 ml de solución tampón ureasa (tampón fosfato 50 mmol/l y ureasa (> 10 U/ml) y se incuban en baño a 37°C durante 10 minutos.

Se añaden entonces 2.5 ml de solución fenol (fenol 0.106 mmol/l y nitroprusiato sódico 0.17 mmol/l) y 2.5 ml de solución de hipoclorito sódico (11 mM y NaOH 0.125 N); se introducen inmediatamente en baño a 37°C durante 15 minutos.

Se miden las extinciones de las pruebas y de los estándares en fotocolorímetro a 550 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a la curva patrón de urea y se expresan en mg/día.

3.4.4.5.2. Creatinina

Se utiliza el método de JAFFE con desproteinización modificado según POPPER (1937) y SEELING y WUEST (1969).

Fundamento:

La creatinina forma, en solución alcalina, un complejo coloreado con picrato.

Técnica:

Se tratan 0.5 ml de la solución de orina con 0.5 ml de ácido tricloroacético 1.2 M y 1 ml de una solución formada por ácido pícrico (35 mmol/ml) y NaOH (0.32 mol/l).

Después de incubar a 25°C durante 20 minutos, se realiza la lectura en el espectrofotómetro a 520 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva patrón de creatinina, expresándose en mg/día.

3.4.4.5.3. 3-Metilhistidina

En las muestras de orina recogidas durante el proceso experimental se cuantifica la 3-metilhistidina, calentando la orina con un volumen igual de HCl 12 N durante 2 horas a 110°C con la finalidad de transformar la N-acetil-3-metilhistidina, metabolito que aparece en la orina, en 3-metilhistidina, previa evaporación de una parte alícuota y disolución en una mezcla de metanol puro/agua destilada (v:v). Se valora por H.P.L.C., de igual modo que el resto de los aminoácidos.

3.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO

El estudio estadístico de los datos se llevó a cabo, en primer lugar, analizando la distribución de las distintas variables de la muestra.

Se observó que, a pesar del reducido tamaño de los grupos de análisis, cada una de las variables en el conjunto de la muestra seguía una distribución próxima a lo normal, por lo cual optamos por la realización de pruebas paramétricas, asumiendo la normalidad en los grupos.

En el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se emplearon dos análisis independientes (ANOVA de una vía en cada caso) que se han realizado de la manera siguiente:

1. Para cada día del experimento ANOVA realizada para comparar dietas.
2. Para cada lote del experimento ANOVA realizada para comparar días.

Confirmados estos modelos por el Test de pares de Turkey entre los días o entre las dietas en cada ocasión.

Se ha realizado de este modo por la imposibilidad de hacer un ANOVA de dos vías (Días x Dietas) por encontrarse la tabla de efectos incompleta al morir los animales alimentados con la dieta III el día 14 del experimento.

Empleamos el Test de Turkey-Cramer ajustado por defecto, ya que hay diferente número de animales bajo el tratamiento dietario correspondiente y no hay una continuidad temporal (día 4, día 10 y día 14).

El grado de significación entre diferentes dietas y diferentes días se ha establecido en el 5%, es decir, no se consideró significativo cuando $P > 0.05$.

La codificación de los datos se realizó en el Centro de Estadística del C.S.I.C., mediante el programa BMDP Statistical Software, Inc. 1440 Sepulveda Blvd., Los Angeles, CA. USA. Digital Equipment Corporation VAX/VMS Version V5.5-2.

4. RESULTADOS

TABLA 1

**INGESTA (g/día), PESO CORPORAL (g)
Y BALANCE DE NITROGENO (mg/día)**

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
INGESTA			
Control	15.07±0.51 ^a	13.90±1.22 ^a	16.12±1.01 ^a
Lote II	7.12±0.26 ^b	5.35±0.58 ^b	7.49±0.77 ^b
Lote III	3.56±0.13 ^{b,a}	2.76±0.35 ^b	-----

Lote II	7.12±0.26 ^b	5.35±0.58 ^b	7.49±0.77 ^b
Lote IV	7.14±0.31 ^b	5.45±0.48 ^b	7.50±0.6 ^b
PESO CORPORAL			
Control	105.41±0.88 ^{a,1}	133.73±4.41 ^{a,2}	158.63±7.84 ^{a,2,1}
Lote II	89.86±0.68 ^{b,1}	81.62±2.04 ^{b,1}	81.95±1.84 ^{b,1}
Lote III	90.13±4.10 ^{b,1}	73.37±3.44 ^{b,2}	-----

Lote II	89.86±0.68 ^{b,1}	81.62±2.04 ^{b,1}	81.95±1.84 ^{b,1}
Lote IV	99.93±2.74 ^{a,1}	93.94±1.19 ^{a,1}	95.63±1.99 ^{a,1}
BALANCE DE NITROGENO			
Control	159.92±8.39 ^a	141.74±8.90 ^a	160.03±4.16 ^a
Lote II	50.86±5.83 ^{b,1}	-43.68±5.18 ^{b,2}	18.53±3.62 ^{b,2,1}
Lote III	34.52±6.08 ^{b,1}	-11.18±0.98 ^{b,a,2}	-----

Lote II	50.86±5.83 ^{b,1}	-43.68±5.18 ^{b,2}	18.53±3.62 ^{b,2,1}
Lote IV	39.96±5.09 ^{b,1}	16.10±2.73 ^{b,a,2}	18.57±1.60 ^{b,2}

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas (P≤0.05) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas (P≤0.05) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 2

UREA (mg/día), CREATININA (mg/día)
Y 3-METIL HISTIDINA EN ORINA (mg/día)

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
UREA EN ORINA			
Control	28.41± 4.29 ^{a,1}	44.00± 3.01 ^{a,1}	65.30±3.58 ^{a,2}
Lote II	114.14± 4.67 ^{b,1}	159.65±15.8 ^{b,2}	166.63±9.46 ^{b,2}
Lote III	181.58±11.8 ^{b,a,1}	130.10± 0.69 ^{b,2}	-----

Lote II	114.14± 4.67 ^{b,1}	159.65±15.8 ^{b,2}	166.63±9.46 ^{b,2}
Lote IV	57.60± 6.43 ^{a,1}	81.25± 4.26 ^{b,a,1}	132.19±7.38 ^{b,a,2}
CREATININA EN ORINA			
Control	1.45±0.18 ¹	2.85±0.2 ^{a,2}	3.28±0.41 ^{a,2}
Lote II	1.71±0.20	2.37±0.15 ^a	2.12±0.18 ^b
Lote III	1.61±0.16	1.15±0.05 ^b	-----

Lote II	1.71±0.20	2.37±0.15 ^a	2.12±0.18 ^b
Lote IV	1.88±0.15	1.88±0.20 ^{b,a}	1.86±0.15 ^b
3-METIL HISTIDINA EN ORINA			
Control	3.37±0.36 ¹	1.03±0.05 ^{a,2}	2.68±0.25 ^{a,1}
Lote II	3.56±0.28	2.92±0.28 ^b	2.88±0.16 ^a
Lote III	3.48±0.40 ¹	0.63±0.12 ^{a,2}	-----

Lote II	3.56±0.28	2.92±0.28 ^b	2.88±0.16 ^a
Lote IV	2.94±0.80 ¹	4.71±0.69 ^{b,a,2}	0.71±0.19 ^{b,2,1}

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas (P<0.05) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas (P<0.05) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 3

COLESTEROL (mg/100ml), INSULINA (μUI/ml), GLUCOSA (mmol/l) Y RELACION INSULINA/GLUCOSA EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
COLESTEROL			
Control	168.20±11.84 ^a	174.67±15.12 ^a	171.33± 4.94 ^a
Lote II	95.55± 6.96 ^{b,1}	137.90± 8.12 ^{a,2}	115.75± 6.02 ^{b,1,2}
Lote III	64.18± 6.73 ^{b,1}	98.18± 8.61 ^{b,a,2}	-----

Lote II	95.55±6.96 ^{b,1}	137.90± 8.12 ^{a,2}	115.75± 6.02 ^{b,1,2}
Lote IV	92.30±7.01 ^{b,1}	157.34±11.92 ^{a,2}	127.93±12.43 ^{b,1,2}
INSULINA			
Control	15.19±2.89 ^a	18.79±3.66 ^a	27.05±4.80 ^a
Lote II	4.56±0.58 ^b	4.35±0.64 ^b	4.46±0.67 ^b
Lote III	4.14±0.45 ^b	3.36±0.66 ^b	-----

Lote II	4.56±0.58 ^b	4.35±0.64 ^b	4.46±0.67 ^b
Lote IV	6.55±1.32 ^b	4.85±1.58 ^b	5.43±1.05 ^b
GLUCOSA			
Control	7.49±0.78	7.53±0.35 ^a	8.71±0.83 ^a
Lote II	7.37±1.64	6.14±0.58 ^a	6.31±0.18 ^b
Lote III	6.92±0.19 ¹	2.27±0.39 ^{b,2}	-----

Lote II	7.37±1.64	6.14±0.58 ^a	6.31±0.18 ^b
Lote IV	7.68±0.23	6.95±0.54 ^a	6.17±0.40 ^b
INSULINA/GLUCOSA			
Control	2.28±0.64 ^a	2.59±0.61 ^a	3.33±0.84 ^a
Lote II	0.64±0.10 ^b	0.71±0.10 ^b	0.70±0.10 ^b
Lote III	0.61±0.08 ^{b,1}	1.78±0.64 ^{a,b,2}	-----

Lote II	0.64±0.10 ^b	0.71±0.10 ^b	0.70±0.10 ^b
Lote IV	0.84±0.15 ^b	0.70±0.21 ^b	0.86±0.15 ^b

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 4

PARAMETROS PONDERALES Y PROTEINAS SOLUBLES
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
PESO DEL MUSCULO GASTROCNEMIO (g)			
Control	0.57±0.03 ¹	0.80±0.05 ^{a,2}	0.90±0.05 ^{a,2}
Lote II	0.50±0.02	0.50±0.02 ^b	0.48±0.03 ^b
Lote III	0.51±0.04	0.42±0.04 ^b	-----

Lote II	0.50±0.02	0.50±0.02 ^b	0.48±0.03 ^b
Lote IV	0.58±0.02	0.60±0.02 ^b	0.63±0.02 ^{b,a}
PESO RELATIVO DEL MUSCULO GASTROCNEMIO (peso del músculo gastrocnemio x 100/peso del animal)			
Control	0.54±0.01	0.60±0.01	0.57±0.02
Lote II	0.56±0.01	0.61±0.02	0.59±0.02
Lote III	0.57±0.01	0.58±0.02	-----

Lote II	0.56±0.01	0.61±0.02	0.59±0.02
Lote IV	0.58±0.01	0.64±0.01	0.66±0.02
PROTEINAS SOLUBLES (mg/músculo gastrocnemio)			
Control	26.52±1.46 ^{a,1}	14.53±1.22 ^{a,2}	20.44±2.06 ^{a,1,2}
Lote II	8.35±0.71 ^b	7.93±1.56 ^b	9.62±1.08 ^b
Lote III	10.64±1.48 ^b	8.96±0.40 ^b	-----

Lote II	8.35±0.71 ^b	7.93±1.56 ^b	9.62±1.08 ^b
Lote IV	12.73±1.82 ^b	10.21±1.45 ^{a,b}	9.83±0.68 ^b

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 5

DNA, TAMAÑO CELULAR Y NUMERO DE NUCLEOS
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
DNA (mg/órgano)			
Control	0.63±0.15	0.66±0.06 ^a	0.67±0.05
Lote II	0.47±0.10	0.72±0.11 ^a	0.43±0.11
Lote III	0.31±0.03	0.40±0.10 ^a	-----

Lote II	0.47±0.10	0.72±0.11 ^a	0.43±0.11
Lote IV	0.55±0.08	0.31±0.04 ^b	0.47±0.10
NUMERO DE NUCLEOS (1) (millones)			
Control	100.44±24.4	106.52± 9.3 ^a	108.26± 8.5
Lote II	75.91±15.7	116.06±17.9 ^a	69.56±17.6
Lote III	50.20± 4.6	75.89±12.9 ^a	-----

Lote II	75.91±15.7	116.06±17.9 ^a	69.56±17.6
Lote IV	88.82±13.1	50.43± 7.1 ^b	87.17±10.2
TAMAÑO CELULAR (2) (ng)			
Control	7.27±1.70	7.58±0.55 ^a	8.37±0.50
Lote II	7.79±1.23	4.86±0.73 ^a	8.05±1.26
Lote III	11.20±1.31 ¹	5.73±1.10 ^{a,2}	-----

Lote II	7.79±1.23	4.86±0.73 ^a	8.05±1.26
Lote IV	7.16±0.98 ¹	12.98±2.02 ^{b,2}	7.83±1.14 ^{1,2}

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) (DNA x 1000)/6.2

(2) (Peso músculo gastrocnemio/N° núcleos) x 1000

TABLA 6

ACTIVIDAD DNASA ACIDA (UI) EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
DNAsa/ORGANO			
Control	11.16±1.15 ^{a,1}	20.35±2.51 ¹	28.04±4.37 ^{2,1}
Lote II	13.75±1.14 ^{a,1}	11.36±1.32 ¹	21.27±4.31 ^{1,2}
Lote III	14.47±2.36 ^a	11.70±2.27	-----

Lote II	13.75±1.14 ^{a,1}	11.36±1.32 ¹	21.27±4.31 ^{1,2}
Lote IV	19.07±1.34 ^{b,a}	22.16±5.95	21.76±2.76
DNAsa/mg PROTEINA			
Control	0.44±0.07 ^{a,1}	1.45±0.19 ^{a,1}	1.56±0.36 ^{a,1}
Lote II	1.62±0.15 ^{b,1}	1.84±0.52 ^{a,1}	3.32±0.01 ^{a,2}
Lote III	1.43±0.15 ^{b,1}	1.27±0.22 ^{a,1}	-----

Lote II	1.62±0.15 ^{b,1}	1.84±0.52 ^{a,1}	3.32±0.01 ^{a,2}
Lote IV	1.61±0.17 ^{b,1}	2.41±0.55 ^{a,1}	2.19±0.21 ^{a,1}
DNAsa/DNA			
Control	24.85±4.35	31.34±2.55 ^a	44.13±8.08
Lote II	34.57±5.57 ¹	17.22±3.20 ^{a,1}	56.98±6.08 ^{1,2}
Lote III	52.03±9.60	24.68±6.33 ^a	-----

Lote II	34.57±5.57 ¹	17.22±3.20 ^{a,1}	56.98±6.08 ^{1,2}
Lote IV	38.97±7.08	75.51±9.61 ^{a,b}	45.87±9.54

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas (P≤0.05) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas (P≤0.05) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 7

RNA, RNA/PROTEINA Y RNA/DNA EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
RNA (mg/órgano)			
Control	6.63±0.41 ^a	6.37±0.55 ^a	8.07±0.43 ^a
Lote II	4.27±0.45 ^b	4.07±0.41 ^b	3.92±0.91 ^b
Lote III	4.47±0.53 ^b	2.97±0.54 ^b	-----

Lote II	4.27±0.45 ^b	4.07±0.41 ^b	3.92±0.91 ^b
Lote IV	5.76±0.64 ^{a,b}	6.75±0.65 ^a	6.43±0.66 ^{a,b}
RNA/PROTEINA			
Control	0.25±0.01 ¹	0.45±0.05 ²	0.43±0.04 ^{1,2}
Lote II	0.53±0.08	0.74±0.21	0.55±0.31
Lote III	0.45±0.04	0.33±0.05	-----

Lote II	0.53±0.08	0.74±0.21	0.55±0.31
Lote IV	0.50±0.11	0.77±0.17	0.70±0.08
RNA/DNA			
Control	13.73±3.24	9.97±0.84 ^a	12.17±0.54 ^a
Lote II	10.52±1.75	6.15±0.84 ^a	9.56±1.35 ^a
Lote III	15.25±1.47 ¹	6.15±1.54 ^{a,2}	-----

Lote II	10.52±1.75	6.15±0.84 ^a	9.56±1.35
Lote IV	10.55±1.97 ¹	23.78±1.85 ^{b,1}	12.36±1.10 ²

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 8

ACTIVIDAD RNAsa ACIDA (UI) EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
RNAsa/ORGANO			
Control	1.38±0.31 ¹	2.07±0.69 ¹	4.70±0.46 ^{a,2,1}
Lote II	2.80±0.38	1.93±0.26	1.36±0.35 ^b
Lote III	2.43±0.42	1.26±0.26	-----

Lote II	2.80±0.38	1.93±0.26	1.36±0.35 ^b
Lote IV	1.73±0.25 ¹	3.25±0.32 ²	4.53±0.42 ^{a,2}
RNAsa/mg PROTEINA			
Control	0.52±0.10 ^{a,1}	0.16±0.07 ²	0.24±0.04 ^{a,2}
Lote II	0.31±0.04 ^b	0.29±0.07	0.17±0.07 ^a
Lote III	0.29±0.08 ^{a,b}	0.14±0.03	-----

Lote II	0.31±0.04 ^b	0.29±0.07	0.17±0.07 ^a
Lote IV	0.15±0.04 ^{a,b,1}	0.37±0.08 ¹	0.48±0.06 ^{b,2,1}
RNAsa/RNA			
Control	0.20±0.04 ^a	0.36±0.14	0.58±0.06 ^a
Lote II	0.67±0.08 ^b	0.49±0.07	0.37±0.05 ^a
Lote III	0.57±0.12 ^b	0.43±0.09	-----

Lote II	0.67±0.08 ^b	0.49±0.07	0.37±0.05 ^a
Lote IV	0.40±0.07 ^{a,b,1}	0.49±0.03 ¹	0.73±0.09 ^{a,b,2,1}
RNAsa/DNA			
Control	3.21±1.18 ^a	3.23±1.07 ^a	7.08±0.72 ^a
Lote II	7.33±1.83 ^a	3.30±0.79 ^a	2.74±0.29 ^a
Lote III	8.91±1.10 ^{b,a,1}	2.29±0.38 ^{a,2}	-----

Lote II	7.33±1.83 ^a	3.30±0.79 ^a	2.74±0.29 ^a
Lote IV	3.24±0.42 ^{a,1}	11.56±1.71 ^{b,2}	9.32±1.85 ^{a,b,2}

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas (P≤0.05) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas (P≤0.05) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 9

ACTIVIDADES FOSFATASA ACIDA (UI) Y FOSFATASA ALCALINA (UI)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
FOSFATASA ACIDA/ORGANO			
Control	0.283±0.05	0.233±0.03 ^a	0.249±0.07
Lote II	0.079±0.01	0.097±0.01 ^b	0.080±0.01
Lote III	0.093±0.01	0.091±0.01 ^b	-----

Lote II	0.079±0.01	0.097±0.01 ^b	0.080±0.01
Lote IV	0.119±0.02	0.117±0.02 ^{a,b}	0.117±0.01
FOSFATASA ACIDA/mg PROTEINA			
Control	0.011±0.01	0.016±0.01	0.012±0.01
Lote II	0.010±0.01	0.013±0.01	0.009±0.01
Lote III	0.011±0.01	0.010±0.01	-----

Lote II	0.010±0.01	0.013±0.01	0.009±0.01
Lote IV	0.011±0.01	0.011±0.01	0.012±0.01
FOSFATASA ALCALINA/ORGANO			
Control	0.062±0.01 ^a	0.072±0.01 ^a	0.050±0.01 ^a
Lote II	0.030±0.01 ^{b,1}	0.056±0.01 ^{a,2}	0.030±0.01 ^{a,1}
Lote III	0.036±0.01 ^{a,b}	0.029±0.01 ^b	-----

Lote II	0.030±0.01 ^{b,1}	0.056±0.01 ^{a,2}	0.030±0.01 ^{a,1}
Lote IV	0.043±0.01 ^{a,b}	0.045±0.01 ^{b,a}	0.027±0.01 ^{b,a}
FOSFATASA ALCALINA/mg PROTEINA			
Control	0.002±0.01 ¹	0.005±0.01 ²	0.002±0.01 ¹
Lote II	0.004±0.01 ¹	0.008±0.01 ¹	0.003±0.01 ^{1,2}
Lote III	0.004±0.01	0.003±0.01	-----

Lote II	0.004±0.01 ¹	0.008±0.01 ¹	0.003±0.01 ^{1,2}
Lote IV	0.003±0.01 ¹	0.005±0.01 ¹	0.003±0.01 ^{1,2}

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 10

ACTIVIDAD BETA-D-GLUCURONIDASA (UI) EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
BETA GLUCURONIDASA/ORGANO			
Control	0.072±0.01 ^a	0.088±0.01 ^a	0.092±0.01 ^a
Lote II	0.065±0.01 ^{a,1}	0.045±0.01 ^{b,2}	0.048±0.01 ^{b,2}
Lote III	0.045±0.01 ^{b,a}	0.053±0.01 ^b	-----

Lote II	0.065±0.01 ^{a,1}	0.045±0.01 ^{b,2}	0.048±0.01 ^{b,2}
Lote IV	0.067±0.01 ^a	0.072±0.01 ^{a,b}	0.068±0.01 ^a
BETA GLUCURONIDASA/mg PROTEINA			
Control	0.003±0.001 ^{a,1}	0.006±0.002 ²	0.005±0.002 ^{1,2}
Lote II	0.008±0.002 ^b	0.007±0.002	0.006±0.001
Lote III	0.004±0.001 ^{a,b}	0.006±0.001	-----

Lote II	0.008±0.002 ^b	0.007±0.002	0.006±0.001
Lote IV	0.006±0.003 ^{a,b}	0.007±0.001	0.007±0.002

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 11

ACTIVIDADES GOT (UI), GOT/PROTEINA, GPT Y GPT/PROTEINA
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
GOT/ORGANO			
Control	10.74±0.55 ^a	8.73±0.78 ^a	11.34±0.80 ^a
Lote II	5.93±0.97 ^b	3.37±0.62 ^b	5.23±1.42 ^b
Lote III	6.38±0.27 ^b	7.32±0.74 ^a	-----

Lote II	5.93±0.97 ^b	3.37±0.62 ^b	5.23±1.42 ^b
Lote IV	9.14±0.61 ^a	8.22±0.66 ^a	7.20±0.58 ^b
GOT/mg PROTEINA			
Control	0.42±0.04	0.62±0.08 ^a	0.66±0.08
Lote II	0.70±0.13 ¹	0.46±0.06 ^{a,1}	0.85±0.05 ^{1,2}
Lote III	0.66±0.11	0.79±0.08 ^a	-----

Lote II	0.70±0.13 ¹	0.46±0.06 ^{a,1}	0.85±0.05 ^{1,2}
Lote IV	0.79±0.12	0.92±0.17 ^{a,b}	0.74±0.05
GPT/ORGANO			
Control	0.80±0.09 ^a	0.84±0.18 ^a	0.70±0.24 ^a
Lote II	0.21±0.03 ^{b,1}	0.36±0.02 ^{b,2}	0.29±0.06 ^{b,1,2}
Lote III	0.50±0.15 ^{a,b}	0.25±0.08 ^b	-----

Lote II	0.21±0.03 ^{b,1}	0.36±0.02 ^{b,2}	0.29±0.06 ^{b,1,2}
Lote IV	0.71±0.13 ^a	0.58±0.06 ^b	0.39±0.08 ^b
GPT/mg PROTEINA			
Control	0.031±0.01	0.058±0.01	0.031±0.01
Lote II	0.026±0.01	0.057±0.01	0.029±0.01
Lote III	0.042±0.01	0.027±0.01	-----

Lote II	0.026±0.01	0.057±0.01	0.029±0.01
Lote IV	0.065±0.02	0.061±0.01	0.036±0.01

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 12

AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ISOLEUCINA			
Control	29.66 \pm 5.26 ^{a,1}	81.65 \pm 8.7 ^{a,1}	154.65 \pm 32.3 ^{a,2}
Lote II	28.55 \pm 2.96 ^{a,1}	66.77 \pm 6.7 ^{a,1}	85.86 \pm 26.2 ^{a,2,1}
Lote III	65.12 \pm 8.81 ^{b,1}	158.03 \pm 13.4 ^{b,2}	-----

Lote II	28.55 \pm 2.96 ^{a,1}	66.77 \pm 6.7 ^{a,1}	85.86 \pm 26.2 ^{a,2,1}
Lote IV	98.39 \pm 8.19 ^{b,1}	140.10 \pm 20.4 ^{b,1}	88.04 \pm 8.2 ^{a,1,2}
LEUCINA			
Control	212.63 \pm 27.3 ^{a,1}	142.30 \pm 12.9 ^{a,1}	234.72 \pm 10.1 ^{a,1,2}
Lote II	172.73 \pm 14.7 ^a	113.61 \pm 6.3 ^a	180.41 \pm 25.3 ^a
Lote III	95.57 \pm 13.8 ^{b,1}	309.59 \pm 12.3 ^{b,2}	-----

Lote II	172.73 \pm 14.7 ^a	113.61 \pm 6.3 ^a	180.41 \pm 25.3 ^a
Lote IV	129.37 \pm 14.9 ^{b,a,1}	224.62 \pm 32.6 ^{b,2}	134.09 \pm 11.0 ^{b,a,1}
VALINA			
Control	180.69 \pm 18.3 ^a	148.42 \pm 15.6 ^a	186.10 \pm 21.9
Lote II	128.25 \pm 12.3 ^a	144.47 \pm 11.1 ^a	205.21 \pm 35.8
Lote III	154.84 \pm 15.6 ^{a,1}	413.03 \pm 28.5 ^{b,2}	-----

Lote II	128.25 \pm 12.3 ^a	144.47 \pm 11.1 ^a	205.21 \pm 35.8
Lote IV	238.68 \pm 20.4 ^{a,b}	311.90 \pm 43.2 ^b	209.18 \pm 16.5
AAR (1)			
Control	422.98 \pm 43.5 ¹	372.38 \pm 33.0 ^{a,1}	575.48 \pm 56.1 ^{a,1,2}
Lote II	329.53 \pm 26.1	324.86 \pm 21.6 ^a	471.50 \pm 85.9
Lote III	315.53 \pm 37.8 ¹	880.66 \pm 41.7 ^{b,2}	-----

Lote II	329.53 \pm 26.1	324.85 \pm 21.6 ^a	471.50 \pm 85.9
Lote IV	466.44 \pm 42.5 ¹	676.61 \pm 90.9 ^{b,1}	427.30 \pm 34.2 ^{1,2}

AAR = Ile + Leu + Val.

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 13a

AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ASPARTICO			
Control	134.38±31.6 ^{a,1}	121.42±14.5	208.96±34.9
Lote II	61.69±10.1 ^{a,1}	98.22± 7.2 ¹	146.40±16.2 ²
Lote III	73.34± 6.7 ^{a,1}	110.08± 6.9 ²	-----

Lote II	61.69±10.1 ^{a,1}	98.22± 7.2 ²	146.40±16.2 ²
Lote IV	239.30±33.9 ^{b,1}	137.87±32.0 ¹	111.86±17.6 ^{2,1}
GLUTAMICO			
Control	310.83±35.8 ^{a,1}	257.81±18.8 ¹	483.70±23.7 ^{a,2}
Lote II	170.33±13.4 ^{b,1}	185.67±11.9 ¹	249.09±24.3 ^{b,2,1}
Lote III	201.68±13.3 ^{a,b}	153.46±13.8	-----

Lote II	170.33±13.4 ^{b,1}	185.67±11.9 ¹	249.09±24.3 ^{b,2,1}
Lote IV	258.81±49.4 ^{a,b}	249.93±48.4	284.92±54.7 ^b
ASPARRAGINA			
Control	82.25±16.2 ^{a,1}	93.36± 8.1 ¹	168.58±17.0 ^{a,2}
Lote II	52.52± 5.6 ^{a,1}	71.07± 3.6 ¹	132.09±16.9 ^{a,2}
Lote III	51.10± 6.7 ^a	68.12± 6.6	-----

Lote II	52.52± 5.6 ^{a,1}	71.07± 3.6 ¹	132.09±16.9 ^{a,2}
Lote IV	106.92± 9.2 ^{a,b,1}	108.41±18.3 ¹	54.11± 8.5 ^{b,2}
SERINA			
Control	358.71±23.9 ^{a,1}	311.36±16.9 ^{a,1}	495.11±30.9 ^{a,2}
Lote II	652.16±59.1 ^{b,1}	1200.48±74.3 ^{b,2}	1427.69±84.4 ^{b,2}
Lote III	445.87±34.1 ^{a,1}	273.43±29.9 ^{a,2}	-----

Lote II	652.16±59.1 ^b	1200.48±74.3 ^{b,2}	1427.69±84.4 ^{b,2}
Lote IV	538.81±54.0 ^{a,b}	460.67±71.1 ^{a,b,1}	359.76±55.7 ^{a,1}

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 13b

AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
GLUTAMINA			
Control	1145.10 \pm 88.8 ^{a,1}	1510.22 \pm 96.8 ^{a,1}	1841.91 \pm 90.7 ^{a,2,1}
Lote II	950.80 \pm 57.9 ^a	1175.53 \pm 80.4 ^a	1106.43 \pm 91.7 ^b
Lote III	800.90 \pm 25.9 ^a	567.71 \pm 96.4 ^b	-----

Lote II	950.80 \pm 57.9 ^a	1175.53 \pm 80.4 ^a	1106.43 \pm 91.7 ^b
Lote IV	2099.32 \pm 84.0 ^{b,1}	1176.23 \pm 94.1 ^{a,2}	797.08 \pm 57.1 ^{b,2}
GLICINA			
Control	421.01 \pm 30.3 ^a	290.58 \pm 51.5 ^a	325.16 \pm 27.4 ^{a,1}
Lote II	1206.97 \pm 97.4 ^b	1038.65 \pm 86.3 ^b	912.40 \pm 92.6 ^b
Lote III	1458.06 \pm 97.9 ^{b,1}	350.26 \pm 47.9 ^{a,2}	-----

Lote II	1206.97 \pm 97.4 ^b	1038.65 \pm 86.3 ^b	912.40 \pm 92.6 ^b
Lote IV	931.99 \pm 79.6 ^a	661.51 \pm 95.0 ^c	703.97 \pm 58.5 ^b
TREONINA			
Control	282.93 \pm 39.4 ^{a,1}	204.24 \pm 21.9 ^{a,1}	416.29 \pm 59.1 ^{a,1,2}
Lote II	798.97 \pm 96.4 ^b	1086.90 \pm 86.4 ^b	1205.96 \pm 82.0 ^{b,1}
Lote III	534.06 \pm 59.3 ^{a,b}	378.96 \pm 37.9 ^a	-----

Lote II	798.97 \pm 96.4 ^b	1086.90 \pm 86.4 ^b	1205.96 \pm 82.0 ^{b,1}
Lote IV	455.21 \pm 32.9 ^{a,b}	551.30 \pm 57.7 ^a	449.22 \pm 57.1 ^a
ALANINA			
Control	237.76 \pm 4.1 ^{a,1}	717.70 \pm 69.3 ^{a,2}	215.26 \pm 22.8 ^{a,1}
Lote II	418.51 \pm 41.4 ^{b,1}	522.41 \pm 43.7 ^{a,1}	708.24 \pm 62.0 ^{b,2,1}
Lote III	402.26 \pm 26.0 ^b	329.50 \pm 35.1 ^{b,a}	-----

Lote II	418.51 \pm 41.4 ^{b,1}	522.41 \pm 43.7 ^{a,1}	708.24 \pm 62.0 ^{b,2,1}
Lote IV	822.62 \pm 46.3 ^{b,a,1}	388.60 \pm 79.9 ^{b,a,2}	345.28 \pm 50.8 ^{a,2}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 14

AMINOACIDOS AROMATICOS LIBRES (1) ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
TIROSINA			
Control	925.24 \pm 87.3 ^{a,1}	222.27 \pm 18.1 ^{a,2}	1188.90 \pm 75.8 ^{a,2,1}
Lote II	643.40 \pm 51.2 ^{a,1}	134.14 \pm 8.9 ^{a,2}	52.35 \pm 9.0 ^{b,2}
Lote III	182.88 \pm 11.8 ^{c,1}	299.83 \pm 28.1 ^{a,b,2}	-----

Lote II	643.40 \pm 51.2 ^{a,1}	134.14 \pm 8.9 ^{a,2}	52.35 \pm 9.0 ^{b,2}
Lote IV	241.40 \pm 19.4 ^{c,1}	274.86 \pm 37.3 ^{a,b,1}	121.34 \pm 15.0 ^{b,2}
FENILALANINA			
Control	23.98 \pm 2.28 ^a	20.80 \pm 6.2 ^a	22.48 \pm 4.7 ^a
Lote II	20.84 \pm 1.60 ^a	32.15 \pm 8.4 ^a	40.52 \pm 10.8 ^a
Lote III	55.24 \pm 7.21 ^{b,1}	109.67 \pm 6.1 ^{b,2}	-----

Lote II	20.84 \pm 1.60 ^a	32.15 \pm 8.4 ^a	40.52 \pm 10.8 ^a
Lote IV	59.53 \pm 9.47 ^{b,1}	125.50 \pm 6.5 ^{b,2}	61.82 \pm 6.7 ^{b,a,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye el Triptófano.

TABLA 15

SUMA DE AMINOACIDOS AROMATICOS (AAA), SUMA DE AMINOACIDOS NEUTROS (AAN) Y RELACION ENTRE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y AMINOACIDOS AROMATICOS (AAR/AAA) ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
AAA (1)			
Control	943.31±85.6 ^{a,1}	244.02±21.7 ^{a,2}	1211.45±77.7 ^{a,1,2}
Lote II	655.32±50.4 ^{a,1}	166.27± 9.7 ^{a,2}	92.87±12.8 ^b
Lote III	238.14±13.3 ^{b,1}	409.48±27.0 ^{b,2}	-----

Lote II	655.32±50.4 ^{a,1}	166.27± 9.7 ^{a,2}	92.87±12.8 ^{b,2}
Lote IV	300.96±25.6 ^{b,a,1}	400.31±40.2 ^{b,1}	183.23±14.8 ^{b,1,2}
AAN (2)			
Control	1419.12±95.4 ^{a,1}	623.21±44.3 ^{a,2}	1786.93±90.7 ^{a,1,2}
Lote II	1013.73±52.7 ^{b,1}	506.87±24.9 ^{a,2}	564.37±91.8 ^{b,2}
Lote III	511.64±15.8 ^{a,b,1}	1290.14±63.7 ^{b,2}	-----

Lote II	513.73±91.4 ^b	506.87±24.9 ^{a,2}	564.37±91.8 ^{b,2}
Lote IV	783.25±56.5 ^b	1154.44±95.7 ^{b,2}	605.22±45.2 ^{b,1}
AAR/AAA			
Control	0.45±0.03 ^{a,1}	1.57±0.19 ^{a,2}	0.48±0.05 ^{a,1}
Lote II	0.52±0.05 ^{a,1}	1.96±0.09 ^{a,1}	5.25±0.91 ^{b,2}
Lote III	1.33±0.14 ^{b,1}	2.19±0.11 ^{b,a,2}	-----

Lote II	0.52±0.05 ^{a,1}	1.96±0.09 ^{a,1}	5.25±0.91 ^{b,2}
Lote IV	1.58±0.15 ^{b,1}	1.68±0.14 ^{a,1}	2.36±0.15 ^{a,2}

donde:

- Valores medios de seis animales ± ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) AAA = Tirosina + Fenilalanina

(2) AAN = AAR + AAA

TABLA 16

AMINOACIDOS BASICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ARGININA			
Control	13.60 \pm 5.50 ^a	55.88 \pm 28.7	20.95 \pm 2.31 ^a
Lote II	15.19 \pm 2.32 ^{a,1}	74.42 \pm 4.7 ²	59.08 \pm 9.17 ^{b,2}
Lote III	23.27 \pm 4.29 ^{a,1}	52.91 \pm 9.2 ²	-----

Lote II	15.19 \pm 2.32 ^{a,1}	74.42 \pm 4.7 ²	59.08 \pm 9.17 ^{b,2}
Lote IV	30.06 \pm 5.61 ^{b,1}	75.87 \pm 8.4 ²	30.24 \pm 5.54 ^{a,1}
HISTIDINA			
Control	343.22 \pm 51.0 ^a	380.14 \pm 25.6 ^a	489.81 \pm 61.4 ^a
Lote II	252.34 \pm 15.4 ^a	278.52 \pm 20.0 ^a	245.28 \pm 23.5 ^b
Lote III	213.27 \pm 6.9 ^{b,a}	204.23 \pm 27.6 ^{b,a}	-----

Lote II	252.34 \pm 15.4 ^a	278.52 \pm 20.0 ^a	245.28 \pm 23.3 ^b
Lote IV	428.16 \pm 36.3 ^{a,b,1}	312.87 \pm 56.9 ^{a,1}	212.01 \pm 15.2 ^{b,2,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 17

AMINOACIDOS AZUFRADOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
METIONINA			
Control	6.86 \pm 0.86 ^{a,1}	66.69 \pm 18.7 ^{a,2}	14.11 \pm 3.2 ^{a,1}
Lote II	4.99 \pm 0.74 ^a	10.88 \pm 3.7 ^b	9.64 \pm 2.3 ^a
Lote III	21.26 \pm 2.48 ^{b,1}	84.34 \pm 11.6 ^{a,b,2}	-----

Lote II	4.99 \pm 0.74 ^a	10.88 \pm 3.7 ^b	9.64 \pm 2.3 ^a
Lote IV	34.90 \pm 4.20 ^{b,1}	129.34 \pm 19.2 ^{b,2}	91.81 \pm 14.4 ^{b,2}
TAURINA			
Control	446.85 \pm 7.8 ^{a,1}	222.17 \pm 27.6 ^{a,2}	461.00 \pm 3.74 ^{a,1}
Lote II	501.67 \pm 8.0 ^{a,1}	419.05 \pm 29.3 ^{b,2}	520.38 \pm 11.96 ^{b,1}
Lote III	399.36 \pm 25.5 ^{a,b,1}	608.86 \pm 36.8 ^{b,a,2}	-----

Lote II	501.65 \pm 8.0 ^{a,1}	419.05 \pm 29.3 ^{b,2}	520.38 \pm 11.96 ^{b,1}
Lote IV	220.62 \pm 47.8 ^{b,1}	379.40 \pm 63.4 ^{b,1}	618.45 \pm 16.03 ^{b,a,2}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 18

SUMA DE AMINOACIDOS ESENCIALES (AAE), SUMA DE AMINOACIDOS NO ESENCIALES (AANE), RELACION ENTRE AMBOS (AAE/AANE) Y SUMA DE AMINOACIDOS TOTALES LIBRES (AAT) ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
AAE (1)			
Control	1414.23 \pm 85.9 ¹	1452.35 \pm 151.8 ¹	1959.74 \pm 151.2 ^{a,2}
Lote II	1555.27 \pm 97.2 ¹	2100.42 \pm 198.8 ¹	2323.04 \pm 287.2 ^{a,2,1}
Lote III	1226.14 \pm 101.3 ¹	1986.57 \pm 65.6 ²	-----

Lote II	1555.27 \pm 97.2 ¹	2100.42 \pm 198.8 ¹	2323.04 \pm 287.2 ^{a,2,1}
Lote IV	1619.73 \pm 74.7	2070.61 \pm 194.5	1392.73 \pm 97.0 ^{a,b}
AANE (2)			
Control	3531.48 \pm 229.4 ^{a,1}	3432.44 \pm 197.2 ^{a,1}	4759.24 \pm 314.5 ^{a,2}
Lote II	4094.93 \pm 271.7 ^a	4355.05 \pm 387.1 ^a	4602.59 \pm 462.9 ^a
Lote III	3565.11 \pm 258.0 ^{a,1}	2084.32 \pm 87.4 ^{a,b,2}	-----

Lote II	4094.93 \pm 271.7 ^a	4355.05 \pm 387.1 ^a	4602.59 \pm 462.9 ^a
Lote IV	5132.22 \pm 390.1 ^{b,a,1}	3516.24 \pm 568.9 ²	2724.24 \pm 190.3 ^{b,2}
AAE/AANE			
Control	0.41 \pm 0.02	0.42 \pm 0.03 ^a	0.41 \pm 0.03
Lote II	0.38 \pm 0.03 ¹	0.48 \pm 0.01 ^{a,1}	0.50 \pm 0.04 ^{2,1}
Lote III	0.35 \pm 0.04 ¹	0.96 \pm 0.04 ^{b,2}	-----

Lote II	0.38 \pm 0.03 ¹	0.48 \pm 0.01 ^{a,1}	0.50 \pm 0.04 ^{2,1}
Lote IV	0.32 \pm 0.02	0.62 \pm 0.05 ^b	0.51 \pm 0.02
AAT (3)			
Control	4999.26 \pm 276.2 ^{a,1}	5065.82 \pm 290.4 ^{a,1}	6718.82 \pm 427.9 ^{a,2}
Lote II	5664.42 \pm 339.5 ^a	6837.18 \pm 436.3 ^b	6925.63 \pm 720.8 ^a
Lote III	4773.93 \pm 276.1 ^b	4070.85 \pm 128.9 ^a	-----

Lote II	5664.42 \pm 339.5 ^a	6837.18 \pm 436.3 ^b	6925.63 \pm 720.8 ^a
Lote IV	6641.17 \pm 426.8 ^{b,a,1}	5986.23 \pm 128.1 ^{a,b,1}	3959.47 \pm 224.8 ^{b,2}

(1) AAE = Arg + His + Ile + Leu + Phe + Thr + Val + Met + Lys.

(2) AANE = Ala + Asp + Glu + Gln + Ser + Tyr + Gly.

(3) AAT = AAE + AANE.

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 19

RELACION DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ISOLEUCINA/ AAN-ISOLEUCINA			
Control	0.02 \pm 0.005 ^{a,1}	0.15 \pm 0.01 ²	0.09 \pm 0.02 ^{2,1}
Lote II	0.03 \pm 0.003 ^{a,1}	0.15 \pm 0.01 ²	0.16 \pm 0.04 ²
Lote III	0.15 \pm 0.020 ^b	0.14 \pm 0.01	-----

Lote II	0.03 \pm 0.003 ^{a,1}	0.15 \pm 0.01 ²	0.16 \pm 0.04 ²
Lote IV	0.14 \pm 0.010 ^b	0.14 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01
LEUCINA/ AAN-LEUCINA			
Control	0.17 \pm 0.01 ¹	0.30 \pm 0.02 ²	0.13 \pm 0.02 ^{a,1}
Lote II	0.21 \pm 0.02 ¹	0.29 \pm 0.02 ¹	0.48 \pm 0.02 ^{b,2}
Lote III	0.24 \pm 0.04	0.32 \pm 0.01	-----

Lote II	0.21 \pm 0.02 ¹	0.29 \pm 0.02 ¹	0.48 \pm 0.02 ^{b,2}
Lote IV	0.20 \pm 0.01 ¹	0.24 \pm 0.03 ¹	0.28 \pm 0.01 ^{b,a,2,1}
VALINA/ AAN-VALINA			
Control	0.15 \pm 0.01 ^{a,1}	0.32 \pm 0.03 ^{a,2}	0.12 \pm 0.01 ^{a,1}
Lote II	0.15 \pm 0.02 ^{a,1}	0.40 \pm 0.02 ^{a,2}	0.57 \pm 0.03 ^{b,2,1}
Lote III	0.45 \pm 0.08 ^b	0.47 \pm 0.02 ^{b,a}	-----

Lote II	0.15 \pm 0.02 ^{a,1}	0.40 \pm 0.02 ^{a,2}	0.57 \pm 0.03 ^{b,2,1}
Lote IV	0.45 \pm 0.04 ^b	0.38 \pm 0.05 ^a	0.53 \pm 0.03 ^b

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 20

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
FENILALANINA/ AAN-FENILALANINA			
Control	0.02±0.003 ^a	0.04±0.01	0.11±0.01 ^a
Grupo II	0.02±0.002 ^a	0.07±0.02	0.10±0.04 ^a
Grupo III	0.12±0.017 ^b	0.09±0.01	-----

Grupo II	0.02±0.002 ^a	0.07±0.02	0.10±0.04 ^a
Grupo IV	0.08±0.013 ^b	0.29±0.17	0.12±0.02 ^{b,a}
TIROSINA/ AAN-TIROSINA			
Control	1.97±0.21 ^{a,1}	0.57±0.04 ^{a,2}	2.05±0.19 ^{a,1}
Lote II	1.70±0.17 ^{a,1}	0.37±0.04 ^{b,2}	0.11±0.01 ^{b,2}
Lote III	0.56±0.05 ^{b,1}	0.30±0.02 ^{b,2}	-----

Lote II	0.56±0.05 ^{a,1}	0.30±0.04 ^{b,2}	0.11±0.01 ^{b,2}
Lote IV	0.45±0.01 ^{b,1}	0.32±0.04 ^{b,1}	0.25±0.02 ^{b,2,1}
FENILALANINA/TIROSINA			
Control	0.03±0.004 ^{a,1}	0.09±0.02 ^{a,2}	0.02±0.01 ^{a,1}
Lote II	0.03±0.004 ^{a,1}	0.25±0.07 ^{a,1}	0.95±0.42 ^{b,2,1}
Lote III	0.31±0.050 ^b	0.38±0.05 ^{b,a}	-----

Lote II	0.03±0.004 ^{a,1}	0.25±0.07 ^{a,1}	0.95±0.42 ^{b,2,1}
Lote IV	0.25±0.033 ^b	0.49±0.06 ^b	0.56±0.09 ^a

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 21

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ALANINA/TIROSINA			
Control	0.27 \pm 0.03 ^{a,1}	3.24 \pm 0.29 ^{a,2}	0.19 \pm 0.03 ^{a,1}
Lote II	0.66 \pm 0.05 ^{a,1}	3.91 \pm 0.25 ^{a,1}	14.53 \pm 1.67 ^{b,2}
Lote III	2.32 \pm 0.36 ^b	1.12 \pm 0.13 ^b	-----

Lote II	0.66 \pm 0.05 ^{a,1}	3.91 \pm 0.25 ^{a,1}	14.53 \pm 1.67 ^{b,2}
Lote IV	3.44 \pm 0.13 ^b	1.97 \pm 0.14 ^b	2.86 \pm 0.22 ^a
ALANINA/LEUCINA			
Control	1.24 \pm 0.20 ^{a,1}	5.07 \pm 0.33 ^{a,2}	0.91 \pm 0.07 ^{a,1}
Lote II	2.56 \pm 0.41 ^{a,1}	4.56 \pm 0.21 ^{a,2}	4.12 \pm 0.43 ^{b,2}
Lote III	4.58 \pm 0.63 ^{b,1}	1.08 \pm 0.14 ^{b,2}	-----

Lote II	2.56 \pm 0.41 ^{a,1}	4.56 \pm 0.21 ^{a,2}	4.12 \pm 0.43 ^{b,2}
Lote IV	6.57 \pm 0.59 ^{b,1}	2.42 \pm 0.16 ^{b,2}	2.60 \pm 0.38 ^{b,a,2}
ALANINA/AAR			
Control	0.60 \pm 0.08 ^{a,1}	1.91 \pm 0.15 ^{a,2}	0.38 \pm 0.03 ^{a,1}
Lote II	1.34 \pm 0.20 ^b	1.62 \pm 0.12 ^a	1.67 \pm 0.24 ^b
Lote III	1.34 \pm 0.15 ^{b,1}	0.38 \pm 0.05 ^{b,2}	-----

Lote II	1.34 \pm 0.20 ^b	1.62 \pm 0.12 ^a	1.67 \pm 0.24 ^b
Lote IV	1.80 \pm 0.13 ^{b,1}	0.82 \pm 0.09 ^{b,2}	0.81 \pm 0.10 ^{a,2}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 22

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN PLASMA

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
SER+GLI+ALA/AAR			
Control	2.50±0.21 ^{a,1}	3.63±0.26 ^{a,2}	1.89±0.26 ^{a,1}
Lote II	7.18±0.83 ^b	8.52±1.14 ^b	7.16±1.17 ^b
Lote III	7.99±1.50 ^{b,1}	1.10±0.16 ^{b,a,2}	-----

Lote II	7.18±0.83 ^b	8.52±1.14 ^b	7.16±1.17 ^b
Lote IV	5.02±0.44 ^{a,b,1}	2.54±0.31 ^{a,2}	3.32±0.30 ^{a,2}
GLICINA/VALINA			
Control	2.43±0.23 ^a	2.05±0.48 ^a	1.96±0.47 ^a
Lote II	10.07±1.52 ^{b,1}	7.31±0.74 ^{b,1}	4.93±0.84 ^{b,2,1}
Lote III	10.13±2.04 ^{b,1}	0.91±0.20 ^{a,2}	-----

Lote II	10.07±1.52 ^{b,1}	7.31±0.74 ^{b,1}	4.93±0.84 ^{b,2,1}
Lote IV	3.98±0.38 ^{a,1}	2.26±0.36 ^{a,2}	3.41±0.23 ^{a,b,1,2}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 23

AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ISOLEUCINA			
Control	58.62 \pm 15.1	77.31 \pm 6.8	67.05 \pm 8.9 ^a
Lote II	37.56 \pm 10.2	64.40 \pm 16.8	58.01 \pm 12.4 ^a
Lote III	40.43 \pm 6.5	59.25 \pm 17.3	-----

Lote II	37.56 \pm 10.2	64.40 \pm 16.8	58.01 \pm 12.4 ^a
Lote IV	56.71 \pm 7.5 ¹	43.78 \pm 6.5 ¹	20.36 \pm 2.3 ^{b,2,1}
LEUCINA			
Control	138.70 \pm 10.7 ^a	124.96 \pm 13.7 ^a	118.14 \pm 5.7
Lote II	133.53 \pm 6.2 ^{a,1}	86.50 \pm 7.8 ^{a,2}	102.38 \pm 15.0 ^{1,2}
Lote III	67.37 \pm 8.1 ^{b,1}	243.33 \pm 12.6 ^{b,2}	-----

Lote II	133.53 \pm 6.2 ^{a,1}	86.50 \pm 7.8 ^{a,2}	102.38 \pm 15.0 ^{1,2}
Lote IV	75.19 \pm 5.3 ^{b,1}	162.24 \pm 16.0 ^{a,b,2}	94.96 \pm 6.5 ¹
VALINA			
Control	68.93 \pm 7.7 ^{a,1}	163.54 \pm 15.0 ^{a,2}	61.30 \pm 4.4 ^{a,1}
Lote II	61.29 \pm 5.1 ^{a,1}	122.08 \pm 22.5 ^{a,2}	57.18 \pm 11.4 ^{a,1}
Lote III	92.14 \pm 10.8 ^{a,b,1}	329.33 \pm 24.4 ^{b,2}	-----

Lote II	61.29 \pm 5.1 ^{a,1}	122.08 \pm 22.5 ^{a,2}	57.18 \pm 11.4 ^{a,1}
Lote IV	99.14 \pm 4.7 ^{b,1}	195.68 \pm 19.9 ^{a,2}	108.75 \pm 9.5 ^{b,1}
AAR (1)			
Control	266.25 \pm 27.2 ¹	365.81 \pm 33.3 ^{a,2}	246.49 \pm 9.3 ¹
Lote II	232.37 \pm 15.4	272.97 \pm 38.5 ^a	217.56 \pm 34.2
Lote III	199.94 \pm 22.6 ¹	631.92 \pm 26.5 ^{b,2}	-----

Lote II	232.37 \pm 15.4	272.97 \pm 38.5 ^a	217.56 \pm 34.2
Lote IV	231.04 \pm 16.1 ¹	401.79 \pm 34.2 ^{a,2}	224.08 \pm 17.8 ¹

AAR = Ile + Leu + Val.

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 24a

AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ASPARTICO			
Control	388.19 \pm 38.4 ^{a,1}	37.43 \pm 4.3 ^{a,2}	432.33 \pm 63.7 ^{a,1}
Lote II	330.62 \pm 46.8 ^{a,1}	43.56 \pm 11.8 ^{a,2}	405.17 \pm 71.2 ^{a,1}
Lote III	35.89 \pm 6.3 ^{b,1}	176.36 \pm 25.5 ^{b,2}	-----

Lote II	330.62 \pm 46.8 ^{a,1}	43.56 \pm 11.8 ^{a,2}	405.27 \pm 71.2 ^{a,1}
Lote IV	51.52 \pm 5.1 ^{b,1}	164.82 \pm 9.9 ^{b,2}	171.18 \pm 11.9 ^{b,2}
GLUTAMICO			
Control	1195.57 \pm 55.8 ^a	985.51 \pm 96.9 ^a	1062.11 \pm 99.5 ^a
Lote II	878.43 \pm 47.6 ^{b,1}	638.33 \pm 40.1 ^{a,1}	524.68 \pm 37.2 ^{b,2,1}
Lote III	553.90 \pm 19.0 ^{b,1}	362.23 \pm 44.6 ^{b,a,2}	-----

Lote II	878.43 \pm 47.6 ^{b,1}	638.33 \pm 40.1 ^{a,1}	524.68 \pm 37.2 ^{b,2,1}
Lote IV	748.29 \pm 46.3 ^{b,1}	529.50 \pm 37.4 ^{a,1}	509.27 \pm 93.4 ^{b,1,2}
ASPARRAGINA			
Control	141.78 \pm 17.6 ^a	95.84 \pm 6.7	96.23 \pm 15.3
Lote II	127.71 \pm 6.0 ^a	82.11 \pm 13.9	92.53 \pm 12.1
Lote III	64.38 \pm 5.0 ^b	65.22 \pm 5.5	-----

Lote II	127.71 \pm 6.0 ^a	82.11 \pm 13.9	92.53 \pm 12.1
Lote IV	59.86 \pm 4.7 ^b	72.95 \pm 4.2	64.95 \pm 4.7
SERINA			
Control	397.99 \pm 22.5 ^{a,1}	258.73 \pm 14.2 ^{a,2}	324.49 \pm 65.8 ^{a,1,2}
Lote II	750.00 \pm 62.9 ^b	689.31 \pm 87.9 ^b	815.97 \pm 89.1 ^{b,1}
Lote III	383.47 \pm 33.1 ^a	272.98 \pm 43.3 ^a	-----

Lote II	750.00 \pm 62.9 ^b	689.31 \pm 87.9 ^b	815.97 \pm 89.1 ^{b,1}
Lote IV	332.39 \pm 21.6 ^a	377.35 \pm 21.4 ^a	349.67 \pm 29.7 ^{a,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 24b

AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
GLUTAMINA			
Control	506.98 \pm 77.0 ^{a,1}	394.86 \pm 41.7 ^{a,1}	676.35 \pm 85.1 ^{a,1,2}
Lote II	471.00 \pm 31.2 ^{a,1}	205.86 \pm 20.2 ^{b,2}	343.78 \pm 28.7 ^{b,2,1}
Lote III	588.93 \pm 28.8 ^{a,1}	193.99 \pm 17.7 ^{b,2}	-----

Lote II	471.00 \pm 31.2 ^{a,1}	205.86 \pm 20.2 ^{b,2}	343.78 \pm 28.7 ^{b,2,1}
Lote IV	895.74 \pm 29.1 ^{b,1}	248.88 \pm 27.1 ^{b,2}	237.60 \pm 10.4 ^{b,2}
GLICINA			
Control	569.77 \pm 63.3 ^a	459.36 \pm 26.9 ^a	415.40 \pm 53.9 ^a
Lote II	1368.98 \pm 66.0 ^b	1531.84 \pm 82.3 ^b	886.85 \pm 78.3 ^b
Lote III	390.88 \pm 63.9 ^b	379.32 \pm 42.2 ^a	-----

Lote II	1368.98 \pm 66.0 ^b	1531.84 \pm 82.3 ^b	886.85 \pm 78.3 ^b
Lote IV	696.45 \pm 44.2 ^a	575.84 \pm 50.6 ^a	671.90 \pm 33.8 ^a
TREONINA			
Control	406.07 \pm 21.9 ^{a,1}	218.13 \pm 13.7 ^{a,2}	287.35 \pm 43.2 ^{a,1,2}
Lote II	1188.42 \pm 42.5 ^b	1000.02 \pm 56.9 ^{b,1}	858.76 \pm 98.9 ^b
Lote III	370.83 \pm 73.2 ^a	313.32 \pm 30.5 ^a	-----

Lote II	1188.42 \pm 42.5 ^b	1000.02 \pm 56.9 ^{b,1}	858.76 \pm 98.9 ^b
Lote IV	155.20 \pm 32.1 ^{a,1}	409.89 \pm 30.7 ^{b,a,2}	318.12 \pm 32.8 ^{a,2}
ALANINA			
Control	680.64 \pm 45.6 ^a	686.64 \pm 62.3 ^a	628.57 \pm 71.3 ^a
Lote II	474.16 \pm 26.9 ^b	381.31 \pm 70.9 ^b	421.06 \pm 38.7 ^b
Lote III	321.22 \pm 25.0 ^{b,a}	299.35 \pm 18.6 ^b	-----

Lote II	474.16 \pm 26.9 ^b	381.31 \pm 70.9 ^b	421.06 \pm 38.7 ^b
Lote IV	430.90 \pm 18.4 ^b	400.87 \pm 55.4 ^b	285.90 \pm 23.4 ^b

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 25

AMINOACIDOS AROMATICOS LIBRES (1) ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
TIROSINA			
Control	278.64 \pm 40.1 ^a	260.70 \pm 28.7 ^a	161.93 \pm 30.4
Lote II	163.45 \pm 28.3 ^b	63.42 \pm 32.0 ^a	81.32 \pm 31.9
Lote III	76.36 \pm 11.9 ^{b,1}	169.46 \pm 20.7 ^{b,2}	-----

Lote II	163.45 \pm 28.3 ^b	63.42 \pm 32.0 ^a	81.32 \pm 31.9
Lote IV	80.03 \pm 8.8 ^{b,1}	144.86 \pm 17.4 ^{b,a,2}	65.51 \pm 9.7 ¹
FENILALANINA			
Control	28.14 \pm 4.11 ¹	47.26 \pm 5.4 ^{a,2}	20.11 \pm 5.20 ^{a,1}
Lote II	34.77 \pm 7.80	30.95 \pm 4.3 ^a	23.19 \pm 2.63 ^a
Lote III	33.70 \pm 5.90 ¹	91.29 \pm 10.3 ^{b,2}	-----

Lote II	34.77 \pm 7.80	30.95 \pm 4.3 ^a	23.19 \pm 2.63 ^a
Lote IV	23.35 \pm 3.43 ¹	68.39 \pm 5.2 ^{a,b,2}	38.13 \pm 4.35 ^{b,a,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye el Triptófano.

TABLA 26

SUMA DE AMINOACIDOS AROMATICOS, SUMA DE AMINOACIDOS NEUTROS Y RELACION ENTRE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y AMINOACIDOS AROMATICOS ($\mu\text{mol/l}$) EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
AAA (1)			
Control	306.77 \pm 41.7 ^a	307.96 \pm 33.1 ^a	182.04 \pm 31.7
Lote II	198.22 \pm 35.0 ^a	94.37 \pm 35.0 ^b	104.51 \pm 33.8
Lote III	110.06 \pm 11.5 ^{b,a,1}	260.76 \pm 17.8 ^{a,2}	-----

Lote II	198.22 \pm 35.0 ^a	94.37 \pm 35.0 ^b	104.51 \pm 33.8
Lote IV	103.38 \pm 10.2 ^{b,a,1}	213.25 \pm 21.1 ^{a,2}	103.64 \pm 9.2 ¹
AAN (2)			
Control	543.53 \pm 53.9 ^a	668.86 \pm 61.1 ¹	421.53 \pm 40.5 ^{1,2}
Lote II	459.15 \pm 32.5 ^a	393.05 \pm 59.9	322.08 \pm 27.6
Lote III	291.97 \pm 18.6 ^b	692.68 \pm 65.8	-----

Lote II	459.15 \pm 32.5 ^a	393.05 \pm 59.9	322.08 \pm 27.6
Lote IV	344.96 \pm 21.7 ^{b,a,1}	644.98 \pm 42.5 ²	334.83 \pm 25.4 ¹
AAR/AAA			
Control	0.92 \pm 0.11 ^{a,1}	1.23 \pm 0.11 ^{a,1}	1.50 \pm 0.22 ^{2,1}
Lote II	1.36 \pm 0.23 ^a	4.37 \pm 1.38 ^b	3.74 \pm 1.60
Lote III	1.94 \pm 0.31 ^{b,a}	2.45 \pm 0.13 ^{a,b}	-----

Lote II	1.36 \pm 0.23 ^a	4.37 \pm 1.38 ^b	3.74 \pm 1.60
Lote IV	2.30 \pm 0.19 ^b	1.92 \pm 0.13 ^{a,b}	2.18 \pm 0.10

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P < 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P < 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) AAA = Tirosina + Fenilalanina

(2) AAN = AAR + AAA

TABLA 27

AMINOACIDOS BASICOS LIBRES (1) ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ARGININA			
Control	48.66 \pm 4.2 ^a	48.53 \pm 2.9	37.40 \pm 6.6
Grupo II	89.05 \pm 4.3 ^{b,1}	52.57 \pm 3.8 ²	31.58 \pm 12.6 ²
Grupo III	51.52 \pm 1.7 ^a	43.93 \pm 2.3	-----

Grupo II	89.05 \pm 4.3 ^{b,1}	52.57 \pm 3.8 ²	31.58 \pm 12.6 ²
Grupo IV	37.80 \pm 1.7 ^a	54.59 \pm 6.7	49.13 \pm 4.2
HISTIDINA			
Control	389.97 \pm 59.2 ^{a,1}	303.74 \pm 32.1 ^{a,1}	520.27 \pm 65.4 ^{a,1,2}
Grupo II	357.89 \pm 29.0 ^{a,1}	158.35 \pm 15.5 ^{b,2}	264.45 \pm 22.1 ^{b,1,2}
Grupo III	453.02 \pm 22.1 ^{a,1}	149.22 \pm 13.6 ^{b,2}	-----

Grupo II	357.89 \pm 29.0 ^{a,1}	158.35 \pm 15.5 ^{b,2}	264.45 \pm 22.1 ^{b,1,2}
Grupo IV	689.05 \pm 22.4 ^{b,1}	191.44 \pm 20.8 ^{b,2}	182.83 \pm 18.2 ^{b,2}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye la Lisina.

TABLA 28

AMINOACIDOS AZUFRADOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
METIONINA			
Control	23.09 \pm 3.6 ^a	33.41 \pm 9.3	22.41 \pm 1.4 ^a
Lote II	10.61 \pm 0.8 ^{a,1}	22.60 \pm 1.4 ²	5.59 \pm 1.1 ^{b,2,1}
Lote III	18.15 \pm 1.0 ^{a,b,1}	47.50 \pm 5.5 ²	-----

Lote II	10.61 \pm 0.8 ^{b,1}	22.60 \pm 1.4 ²	5.59 \pm 1.1 ^{b,2,1}
Lote IV	17.79 \pm 1.2 ^{a,b,1}	31.82 \pm 3.1 ²	22.64 \pm 3.4 ^{a,1,2}
TAURINA			
Control	325.29 \pm 62.3	227.55 \pm 33.6	276.30 \pm 24.7
Lote II	215.66 \pm 20.9	259.30 \pm 46.0	229.46 \pm 42.0
Lote III	333.01 \pm 25.4	294.43 \pm 27.0	-----

Lote II	215.66 \pm 20.9	259.30 \pm 46.0	229.46 \pm 42.0
Lote IV	252.23 \pm 21.1	220.65 \pm 19.3	245.44 \pm 22.4

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ----- Efecto letal de la dieta.

TABLA 29

SUMA DE AMINOACIDOS ESENCIALES, SUMA DE AMINOACIDOS NO ESENCIALES, RELACION ENTRE AMBOS Y SUMA DE AMINOACIDOS TOTALES LIBRES ($\mu\text{mol/l}$) EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
AAE (1)			
Control	1754.34 \pm 144.6 ^a	1451.71 \pm 75.7	1595.99 \pm 81.8 ^a
Lote II	2335.91 \pm 60.1 ^b	2120.79 \pm 192.1	1685.68 \pm 182.4 ^a
Lote III	1469.45 \pm 83.9 ^a	1507.31 \pm 82.8	-----

Lote II	2335.91 \pm 60.1 ^b	2120.79 \pm 192.1	1685.68 \pm 182.4 ^a
Lote IV	1442.58 \pm 84.9 ^{a,1}	1373.23 \pm 59.0 ¹	1045.62 \pm 68.7 ^{b,2}
AANE (2)			
Control	3967.76 \pm 167.6 ^{a,1}	3083.27 \pm 138.4 ^{a,2}	3711.28 \pm 166.9 ^{a,1,2}
Lote II	4426.54 \pm 206.8 ^{a,1}	3153.63 \pm 249.1 ^{a,2}	3478.93 \pm 140.1 ^{a,2}
Lote III	3350.60 \pm 153.4 ^{a,b,1}	1853.70 \pm 118.2 ^{b,2}	-----

Lote II	4426.54 \pm 206.8 ^{a,1}	3153.63 \pm 249.1 ^{a,2}	3478.93 \pm 140.1 ^{a,2}
Lote IV	3235.32 \pm 66.9 ^{b,1}	2442.18 \pm 165.7 ^{b,2}	2624.40 \pm 121.6 ^{b,2}
AAE/AANE			
Control	0.44 \pm 0.02	1.24 \pm 0.77	0.43 \pm 0.01
Lote II	0.53 \pm 0.02	0.66 \pm 0.12	0.49 \pm 0.06
Lote III	0.45 \pm 0.04 ¹	0.82 \pm 0.03 ²	-----

Lote II	0.53 \pm 0.02	0.66 \pm 0.12	0.49 \pm 0.06
Lote IV	0.44 \pm 0.02 ¹	0.57 \pm 0.03 ¹	0.40 \pm 0.03 ^{1,2}
AAT (3)			
Control	5477.05 \pm 197.5 ^{a,1}	4495.55 \pm 189.4 ^{a,2}	5307.27 \pm 246.2 ^{a,1,2}
Lote II	6782.94 \pm 244.7 ^{b,1}	5432.26 \pm 344.5 ^{a,1}	5164.61 \pm 229.6 ^{a,2,1}
Lote III	4960.48 \pm 239.8 ^{a,1}	3361.01 \pm 197.5 ^{a,b,2}	-----

Lote II	6782.94 \pm 244.7 ^{b,1}	5432.26 \pm 344.5 ^{a,1}	5164.61 \pm 229.6 ^{a,2,1}
Lote IV	4560.78 \pm 52.6 ^{b,a,1}	3955.47 \pm 150.9 ^{a,b,2}	3521.14 \pm 148.1 ^{b,2}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) AAE = Arg + His + Ile + Leu + Phe + Thr + Val.

(2) AANE = Ala + Asp + Glu + Gln + Ser + Tyr.

(3) AAT = AAE + AANE.

TABLA 30

RELACION DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ISOLEUCINA/ AAN-ISOLEUCINA			
Control	0.12 \pm 0.03 ^a	0.15 \pm 0.02	0.19 \pm 0.03 ^a
Lote II	0.09 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.07	0.25 \pm 0.08 ^a
Lote III	0.16 \pm 0.03 ^a	0.08 \pm 0.03	-----

Lote II	0.09 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.07	0.25 \pm 0.08
Lote IV	0.20 \pm 0.02 ^{a,b,1}	0.07 \pm 0.01 ²	0.06 \pm 0.01 ^{a,b,2}
LEUCINA/ AAN-LEUCINA			
Control	0.35 \pm 0.02 ¹	0.20 \pm 0.03 ^{a,2}	0.39 \pm 0.03 ¹
Lote II	0.43 \pm 0.05	0.30 \pm 0.03 ^a	0.48 \pm 0.08
Lote III	0.31 \pm 0.05	0.38 \pm 0.01 ^{b,a}	-----

Lote II	0.43 \pm 0.05	0.30 \pm 0.03 ^a	0.48 \pm 0.08
Lote IV	0.28 \pm 0.02	0.34 \pm 0.03 ^{b,a}	0.40 \pm 0.02
VALINA/ AAN-VALINA			
Control	0.14 \pm 0.01 ^{a,1}	0.29 \pm 0.03 ^{a,2}	0.18 \pm 0.03 ^{a,1,2}
Lote II	0.16 \pm 0.02 ^{a,1}	0.45 \pm 0.03 ^{b,2}	0.22 \pm 0.04 ^{a,2,1}
Lote III	0.49 \pm 0.09 ^b	0.59 \pm 0.04 ^b	-----

Lote II	0.16 \pm 0.02 ^{a,1}	0.45 \pm 0.03 ^{b,2}	0.22 \pm 0.04 ^{a,1}
Lote IV	0.41 \pm 0.03 ^b	0.44 \pm 0.04 ^b	0.48 \pm 0.02 ^b

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 31

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
FENILALANINA/ AAN-FENILALANINA			
Control	0.05 \pm 0.01 ^a	0.14 \pm 0.06	0.05 \pm 0.01 ^a
Lote II	0.08 \pm 0.02 ^a	0.09 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01 ^a
Lote III	0.13 \pm 0.03 ^{b,a}	0.12 \pm 0.01	-----

Lote II	0.08 \pm 0.02 ^a	0.09 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01 ^a
Lote IV	0.07 \pm 0.01 ^a	0.12 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02 ^{b,a}
TIROSINA/ AAN-TIROSINA			
Control	1.37 \pm 0.53 ^a	0.84 \pm 0.16 ^a	0.60 \pm 0.10
Lote II	0.58 \pm 0.11 ^a	0.20 \pm 0.08 ^b	0.45 \pm 0.25
Lote III	0.37 \pm 0.06 ^a	0.24 \pm 0.03 ^b	-----

Lote II	0.58 \pm 0.11 ^a	0.20 \pm 0.08 ^b	0.45 \pm 0.25
Lote IV	0.30 \pm 0.03 ^{b,a}	0.29 \pm 0.03 ^b	0.24 \pm 0.02
FENILALANINA/TIROSINA			
Control	0.11 \pm 0.01 ^a	0.19 \pm 0.02	0.14 \pm 0.05
Lote II	0.21 \pm 0.03 ^a	0.39 \pm 0.02	0.56 \pm 0.22
Lote III	0.55 \pm 0.18 ^{b,a}	0.59 \pm 0.13	-----

Lote II	0.21 \pm 0.03 ^a	0.39 \pm 0.02	0.56 \pm 0.22
Lote IV	0.30 \pm 0.04 ^a	0.49 \pm 0.04 ¹	0.66 \pm 0.14 ^{2,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 32

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ALANINA/TIROSINA			
Control	2.64 \pm 0.35 ^{a,1}	2.70 \pm 0.17 ^{a,1}	4.30 \pm 0.72 ²
Lote II	3.47 \pm 0.70 ^a	6.01 \pm 1.22 ^{b,2}	5.18 \pm 1.35
Lote III	4.62 \pm 0.57 ^{a,1}	1.90 \pm 0.29 ^{a,2}	-----

Lote II	3.47 \pm 0.70 ^a	6.01 \pm 1.22 ^{b,2}	5.18 \pm 1.35
Lote IV	5.67 \pm 0.56 ^{b,a,1}	2.73 \pm 0.11 ^{a,2}	4.72 \pm 0.62 ^{1,2}
ALANINA/LEUCINA			
Control	4.98 \pm 0.29 ^a	5.81 \pm 0.56 ^a	5.41 \pm 0.52 ^a
Lote II	3.60 \pm 0.26 ^a	4.32 \pm 0.48 ^a	4.31 \pm 0.43 ^a
Lote III	5.05 \pm 0.59 ^{a,1}	1.35 \pm 0.14 ^{b,2}	-----

Lote II	3.60 \pm 0.26 ^a	4.32 \pm 0.48 ^a	4.31 \pm 0.43 ^b
Lote IV	5.86 \pm 0.47 ^{a,b,1}	2.46 \pm 0.21 ^{b,2}	3.08 \pm 0.36 ^{b,a,2}
ALANINA/AAR			
Control	2.68 \pm 0.29 ^a	2.41 \pm 0.48 ^a	2.58 \pm 0.22 ^a
Lote II	2.09 \pm 0.18 ^a	1.38 \pm 0.11 ^a	2.06 \pm 0.20 ^a
Lote III	1.70 \pm 0.19 ^{b,a,1}	0.48 \pm 0.04 ^{b,a,2}	-----

Lote II	2.09 \pm 0.18 ^a	1.38 \pm 0.11 ^a	2.06 \pm 0.20 ^a
Lote IV	1.90 \pm 0.13 ^{a,1}	1.01 \pm 0.11 ^{b,a,2}	1.30 \pm 0.13 ^{b,2}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P < 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P < 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 33

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/l}$)
EN GLOBULOS ROJOS

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
SER+GLI+ALA/AAR			
Control	6.44±0.53 ^{a,1}	3.97±0.30 ^{a,2}	5.59±0.38 ^{a,1}
Lote II	11.38±0.88 ^b	8.29±0.80 ^b	10.71±1.65 ^b
Lote III	11.35±1.89 ^{b,1}	1.50±0.13 ^{b,a,2}	-----

Lote II	11.38±0.88 ^b	8.29±0.80 ^b	10.71±1.65 ^b
Lote IV	6.52±0.65 ^{a,1}	3.43±0.30 ^{a,2}	5.98±0.48 ^{a,1}
GLICINA/VALINA			
Control	8.78±1.40 ^{a,1}	2.58±0.21 ^{a,2}	6.91±1.04 ^{a,1}
Lote II	23.17±2.37 ^{b,1}	9.71±1.86 ^{b,2}	18.79±4.23 ^{b,1,2}
Lote III	16.92±3.70 ^{a,b}	1.19±0.20 ^a	-----

Lote II	23.17±2.37 ^{b,1}	9.71±1.86 ^{b,2}	18.79±4.23 ^{b,1,2}
Lote IV	7.19±0.80 ^{a,1}	3.06±0.32 ^{a,2}	6.38±0.53 ^{a,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 34

AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA LIBRES
($\mu\text{mol/g}$ tejido) EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ISOLEUCINA			
Control	0.36 \pm 0.06 ^{a,1}	1.10 \pm 0.06 ^{a,2}	0.15 \pm 0.02 ^{a,1}
Lote II	0.88 \pm 0.06 ^b	0.54 \pm 0.09 ^a	0.91 \pm 0.17 ^b
Lote III	0.44 \pm 0.08 ^{a,1}	0.93 \pm 0.11 ^{a,2}	-----

Lote II	0.88 \pm 0.06 ^b	0.54 \pm 0.09 ^a	0.91 \pm 0.17 ^b
Lote IV	0.56 \pm 0.07 ^{a,1}	1.69 \pm 0.23 ^{b,2}	0.83 \pm 0.08 ^{b,1}
LEUCINA			
Control	0.86 \pm 0.14 ^{a,1}	1.97 \pm 0.10 ^{a,2}	0.31 \pm 0.05 ^{2,1}
Lote II	1.82 \pm 0.14 ^{b,1}	1.15 \pm 0.17 ^{b,2}	1.60 \pm 0.09 ^{1,2}
Lote III	0.72 \pm 0.11 ^{a,1}	1.54 \pm 0.16 ^{a,b,2}	-----

Lote II	1.82 \pm 0.14 ^{b,1}	1.15 \pm 0.17 ^{b,2}	1.60 \pm 0.09 ^{1,2}
Lote IV	0.98 \pm 0.12 ^{a,1}	3.10 \pm 0.24 ^{b,a,2}	1.54 \pm 0.12 ¹
VALINA			
Control	1.05 \pm 0.23 ^{a,1}	3.13 \pm 0.11 ^{a,2}	0.49 \pm 0.05 ^{a,1}
Lote II	2.13 \pm 0.14 ^{b,1}	1.16 \pm 0.15 ^{b,2}	2.53 \pm 0.07 ^{b,1}
Lote III	0.79 \pm 0.20 ^{a,1}	2.38 \pm 0.28 ^{a,b,2}	-----

Lote II	2.13 \pm 0.14 ^{b,1}	1.16 \pm 0.15 ^{b,2}	2.53 \pm 0.07 ^{b,1}
Lote IV	0.95 \pm 0.13 ^{a,1}	3.13 \pm 0.40 ^{a,2}	1.88 \pm 0.12 ^{b,a,2}
AAR (1)			
Control	2.76 \pm 0.43 ^{a,1}	6.20 \pm 0.25 ^{a,2}	2.95 \pm 0.10 ^{a,2,1}
Lote II	4.83 \pm 0.32 ^{b,1}	2.85 \pm 0.41 ^{b,2}	5.03 \pm 0.30 ^{b,1}
Lote III	1.95 \pm 0.37 ^{a,1}	4.84 \pm 0.54 ^{a,b,2}	-----

Lote II	4.83 \pm 0.32 ^{b,1}	2.85 \pm 0.41 ^{b,2}	5.03 \pm 0.30 ^{b,1}
Lote IV	2.49 \pm 0.30 ^{a,1}	7.92 \pm 0.86 ^{a,2}	4.26 \pm 0.29 ^{b,2,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) AAR = Ile + Leu + Val.

TABLA 35a

AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ASPARTICO			
Control	2.44 \pm 0.29 ¹	1.61 \pm 0.06 ^{a,2}	1.39 \pm 0.14 ^{a,2}
Lote II	1.88 \pm 0.18 ¹	1.87 \pm 0.40 ^{a,1}	1.11 \pm 0.14 ^{a,2,1}
Lote III	1.54 \pm 0.16 ¹	2.98 \pm 0.46 ^{a,2}	-----

Lote II	1.88 \pm 0.18 ¹	1.87 \pm 0.40 ^{a,1}	1.11 \pm 0.14 ^{a,2,1}
Lote IV	2.54 \pm 0.24 ¹	5.03 \pm 0.63 ^{b,1}	2.16 \pm 0.12 ^{b,1,2}
GLUTAMICO			
Control	4.31 \pm 0.66 ^{a,1}	5.73 \pm 0.82 ^{a,1}	6.90 \pm 1.49 ^{a,2}
Lote II	5.10 \pm 0.41 ^{a,1}	2.59 \pm 0.67 ^{a,2}	4.22 \pm 0.38 ^{b,1,2}
Lote III	2.07 \pm 0.23 ^b	3.75 \pm 0.65 ^a	-----

Lote II	5.10 \pm 0.41 ^{a,1}	2.59 \pm 0.67 ^{a,2}	4.22 \pm 0.38 ^{b,1,2}
Lote IV	3.40 \pm 0.41 ^{a,1}	12.06 \pm 1.07 ^{b,2}	2.44 \pm 0.42 ^{b,1}
ASPARRAGINA			
Control	0.75 \pm 0.13 ¹	1.28 \pm 0.07 ^{a,2}	0.32 \pm 0.02 ^{a,2,1}
Lote II	0.82 \pm 0.06	0.77 \pm 0.15 ^a	0.84 \pm 0.07 ^b
Lote III	0.61 \pm 0.05	0.67 \pm 0.08 ^{b,a}	-----

Lote II	0.82 \pm 0.06	0.77 \pm 0.15 ^a	0.84 \pm 0.07 ^b
Lote IV	0.88 \pm 0.04 ¹	0.69 \pm 0.18 ^{a,b,2}	1.01 \pm 0.08 ^{b,1,2}
SERINA			
Control	2.62 \pm 0.32 ^{a,1}	2.81 \pm 0.09 ^{a,1}	1.88 \pm 0.09 ^{a,2}
Lote II	3.62 \pm 0.34 ^a	3.41 \pm 0.82 ^a	5.48 \pm 0.54 ^b
Lote III	2.37 \pm 0.11 ^{a,b}	2.04 \pm 0.17 ^{b,a}	-----

Lote II	3.62 \pm 0.34 ^a	3.41 \pm 0.82 ^a	5.48 \pm 0.54 ^b
Lote IV	2.75 \pm 0.26 ^a	2.90 \pm 0.26 ^a	2.66 \pm 0.17 ^a

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 35b

AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
GLUTAMINA			
Control	6.40 \pm 1.71 ^{a,1}	5.45 \pm 0.26 ^{a,1}	6.67 \pm 0.05 ^{a,1}
Lote II	2.73 \pm 0.40 ^{a,1}	5.21 \pm 0.77 ^{a,1}	2.07 \pm 0.14 ^{a,1,2}
Lote III	0.58 \pm 0.18 ^{a,b,1}	1.74 \pm 0.30 ^{b,2}	-----

Lote II	2.73 \pm 0.40 ^{a,1}	5.21 \pm 0.77 ^{a,1}	2.07 \pm 0.14 ^{a,1,2}
Lote IV	0.34 \pm 0.05 ^{a,b,1}	2.07 \pm 0.32 ^{b,2}	7.09 \pm 0.68 ^{b,2,1}
GLICINA			
Control	5.84 \pm 0.56 ^{a,1}	11.10 \pm 0.86 ^{a,2}	14.38 \pm 1.55 ^{a,2}
Lote II	53.56 \pm 5.46 ^{b,1}	8.30 \pm 0.95 ^{a,2}	27.97 \pm 0.92 ^{b,2,1}
Lote III	8.32 \pm 1.61 ^{a,1}	3.43 \pm 0.19 ^{b,2}	-----

Lote II	53.56 \pm 5.46 ^{b,1}	8.30 \pm 0.95 ^{a,2}	27.97 \pm 0.92 ^{b,2,1}
Lote IV	6.45 \pm 0.67 ^{a,1}	4.61 \pm 0.46 ^{b,a,1}	11.03 \pm 0.81 ^{a,2}
TREONINA			
Control	0.39 \pm 0.09 ^{a,1}	0.20 \pm 0.01 ^{a,1}	2.11 \pm 1.07 ^{a,1}
Lote II	2.01 \pm 0.60 ^{a,1}	0.11 \pm 0.02 ^{b,1}	0.54 \pm 0.04 ^{a,1,2}
Lote III	1.24 \pm 0.13 ^{b,a,1}	0.96 \pm 0.14 ^{b,a,2}	-----

Lote II	2.01 \pm 0.60 ^{a,1}	0.11 \pm 0.02 ^{b,1}	0.54 \pm 0.04 ^{a,1,2}
Lote IV	0.56 \pm 0.16 ^{a,1}	8.67 \pm 1.13 ^{b,a,2}	0.37 \pm 0.04 ^{a,b,1}
ALANINA			
Control	5.31 \pm 0.87	6.52 \pm 0.50 ^a	5.00 \pm 0.21
Lote II	3.94 \pm 0.26	2.36 \pm 0.56 ^b	3.87 \pm 0.35
Lote III	3.18 \pm 0.61	3.08 \pm 0.22 ^b	-----

Lote II	3.94 \pm 0.26	2.36 \pm 0.56 ^b	3.87 \pm 0.35
Lote IV	4.58 \pm 0.45	5.86 \pm 0.43 ^a	4.28 \pm 0.29

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P < 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P < 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 36

AMINOACIDOS AROMATICOS LIBRES (1) ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
TIROSINA			
Control	0.47 \pm 0.06 ^{a,1}	1.77 \pm 0.09 ^{a,2}	0.19 \pm 0.01 ^{a,1}
Lote II	0.96 \pm 0.03 ^{b,1}	0.44 \pm 0.09 ^{b,2}	1.22 \pm 0.11 ^{b,1}
Lote III	4.02 \pm 0.63 ^{b,a,1}	0.86 \pm 0.11 ^{b,2}	-----

Lote II	0.96 \pm 0.03 ^{b,1}	0.44 \pm 0.09 ^{b,2}	1.22 \pm 0.11 ^{b,1}
Lote IV	5.09 \pm 0.37 ^{b,a,1}	1.20 \pm 0.12 ^{b,a,2}	2.12 \pm 0.18 ^{b,a,2,1}
FENILALANINA			
Control	0.43 \pm 0.06 ^{a,1}	1.16 \pm 0.05 ^{a,2}	0.11 \pm 0.02 ^{a,2,1}
Lote II	1.01 \pm 0.07 ^b	0.77 \pm 0.18 ^a	0.98 \pm 0.06 ^b
Lote III	0.50 \pm 0.08 ^a	0.72 \pm 0.10 ^a	-----

Lote II	1.01 \pm 0.07 ^b	0.77 \pm 0.18 ^a	0.98 \pm 0.06 ^b
Lote IV	0.19 \pm 0.08 ^{a,1}	2.02 \pm 0.24 ^{a,b,2}	0.93 \pm 0.09 ^{b,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye el Triptófano.

TABLA 37

SUMA DE AMINOACIDOS AROMATICOS, SUMA DE AMINOACIDOS NEUTROS Y RELACION ENTRE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y AMINOACIDOS AROMATICOS ($\mu\text{mol/g}$ tejido) EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
AAA (1)			
Control	0.90 \pm 0.12 ^{a,1}	2.87 \pm 0.14 ^{a,2}	0.30 \pm 0.03 ^{a,2,1}
Lote II	1.97 \pm 0.10 ^{b,1}	1.21 \pm 0.25 ^{b,1}	2.10 \pm 0.09 ^{b,1,2}
Lote III	4.52 \pm 0.68 ^{b,1}	1.58 \pm 0.20 ^{b,2}	-----

Lote II	1.97 \pm 0.10 ^{b,1}	1.21 \pm 0.25 ^{b,1}	2.10 \pm 0.09 ^{b,1,2}
Lote IV	4.79 \pm 0.97 ^{a,b,1}	3.04 \pm 0.36 ^{b,a,1}	2.21 \pm 0.20 ^{b,2}
AAN (2)			
Control	3.17 \pm 0.54 ^{a,1}	9.09 \pm 0.38 ^{a,2}	1.25 \pm 0.12 ^{a,1}
Lote II	6.80 \pm 0.42 ^{a,1}	4.06 \pm 0.61 ^{b,2}	7.13 \pm 0.35 ^{b,1}
Lote III	6.47 \pm 1.00 ^a	6.42 \pm 0.74 ^{a,b}	-----

Lote II	6.80 \pm 0.42 ^{a,1}	4.06 \pm 0.61 ^{b,2}	7.13 \pm 0.35 ^{b,1}
Lote IV	7.28 \pm 1.26 ^{b,a,1}	10.96 \pm 1.21 ^{a,1}	26.37 \pm 2.16 ^{b,a,2}
AAR/AAA			
Control	2.46 \pm 0.16 ^{a,1}	2.15 \pm 0.05 ^{a,1}	3.20 \pm 0.20 ^{a,1,2}
Lote II	2.45 \pm 0.06 ^a	2.55 \pm 0.26 ^a	2.41 \pm 0.15 ^b
Lote III	0.44 \pm 0.04 ^{b,1}	3.11 \pm 0.08 ^{b,a,2}	-----

Lote II	2.45 \pm 0.06 ^a	2.55 \pm 0.26 ^a	2.41 \pm 0.15 ^b
Lote IV	1.22 \pm 0.74 ^a	2.63 \pm 0.08 ^a	1.94 \pm 0.17 ^{b,a}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) AAA = Tirosina + Fenilalanina

(2) AAN = AAR + AAA

TABLA 38

AMINOACIDOS BASICOS LIBRES (1) ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ARGININA			
Control	1.30 \pm 0.21 ^{a,1}	0.86 \pm 0.13 ^{a,1}	2.32 \pm 0.34 ^{a,2}
Lote II	1.20 \pm 0.17 ^{a,1}	1.06 \pm 0.13 ^{a,1}	0.53 \pm 0.04 ^{b,2,1}
Lote III	0.48 \pm 0.07 ^{a,b,1}	1.95 \pm 0.23 ^{b,2}	-----

Lote II	1.20 \pm 0.17 ^{a,1}	1.06 \pm 0.13 ^{a,1}	0.53 \pm 0.04 ^{b,2,1}
Lote IV	0.55 \pm 0.03 ^{a,1}	3.46 \pm 0.25 ^{b,2}	1.91 \pm 0.14 ^{a,2,1}
HISTIDINA			
Control	6.88 \pm 0.86 ^{a,1}	16.97 \pm 0.68 ^{a,2}	1.89 \pm 0.23 ^{a,2,1}
Lote II	3.36 \pm 0.27 ^{b,1}	4.77 \pm 0.78 ^{b,1}	11.02 \pm 0.34 ^{b,2}
Lote III	5.42 \pm 0.58 ^{a,b,1}	2.12 \pm 0.06 ^{b,2}	-----

Lote II	3.36 \pm 0.27 ^{b,1}	4.77 \pm 0.78 ^{b,1}	11.02 \pm 0.34 ^{b,2}
Lote IV	7.10 \pm 0.83 ^a	5.88 \pm 0.31 ^b	6.15 \pm 0.37 ^{b,a}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye la Lisina.

TABLA 39

AMINOACIDOS AZUFRADOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
METIONINA			
Control	0.94 \pm 0.23	1.04 \pm 0.09 ^a	0.71 \pm 0.10 ^a
Lote II	1.36 \pm 0.25	1.04 \pm 0.21 ^a	0.47 \pm 0.04 ^a
Lote III	0.61 \pm 0.09	0.96 \pm 0.16 ^a	-----

Lote II	1.36 \pm 0.25	1.04 \pm 0.21 ^a	0.47 \pm 0.04 ^a
Lote IV	0.75 \pm 0.11 ¹	3.27 \pm 0.33 ^{b,2}	1.31 \pm 0.10 ^{b,1}
TAURINA			
Control	7.45 \pm 1.25 ^{a,1}	6.11 \pm 0.44 ^{a,1}	11.08 \pm 0.99 ^{a,1,2}
Lote II	9.84 \pm 0.92 ^{a,1}	21.19 \pm 1.16 ^{b,2}	7.77 \pm 0.44 ^{a,1}
Lote III	7.57 \pm 1.13 ^a	7.94 \pm 0.62 ^a	-----

Lote II	9.84 \pm 0.92 ^{a,1}	21.19 \pm 1.16 ^{b,2}	7.77 \pm 0.44 ^{a,1}
Lote IV	5.22 \pm 0.62 ^{a,b,1}	9.71 \pm 0.51 ^{b,a,2}	23.55 \pm 3.57 ^{b,2}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 40

SUMA DE AMINOACIDOS ESENCIALES, SUMA DE AMINOACIDOS NO ESENCIALES, RELACION ENTRE AMBOS Y SUMA DE AMINOACIDOS TOTALES LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido) EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
AAE (1)			
Control	12.22 \pm 1.36 ¹	26.38 \pm 2.04 ^{a,2}	8.10 \pm 1.40 ^{a,1}
Lote II	13.77 \pm 0.30 ¹	10.61 \pm 1.47 ^{b,1}	18.57 \pm 0.50 ^{b,2}
Lote III	10.20 \pm 1.07	11.55 \pm 0.80 ^b	-----

Lote II	13.77 \pm 0.30 ¹	10.61 \pm 1.47 ^{b,1}	18.57 \pm 0.50 ^{b,2}
Lote IV	12.49 \pm 1.23 ¹	31.21 \pm 2.32 ^{a,2}	14.92 \pm 0.59 ^{b,a,2}
AANE (2)			
Control	27.39 \pm 2.82 ^{a,1}	34.98 \pm 2.05 ^{a,1}	46.68 \pm 2.43 ^{a,2}
Lote II	71.79 \pm 6.77 ^{b,1}	23.66 \pm 3.83 ^{a,2}	45.85 \pm 1.39 ^{a,2,1}
Lote III	21.98 \pm 2.45 ^{a,1}	17.88 \pm 1.77 ^{b,a,1}	-----

Lote II	71.79 \pm 6.77 ^{b,1}	23.66 \pm 3.83 ^{a,2}	45.85 \pm 1.39 ^{a,2,1}
Lote IV	24.32 \pm 2.52 ^{a,1}	33.54 \pm 2.77 ^{a,1}	51.17 \pm 3.38 ^{a,2}
AAE/AANE			
Control	0.45 \pm 0.02 ^{a,1}	0.75 \pm 0.04 ^{a,2}	0.19 \pm 0.03 ^{a,2,1}
Lote II	0.19 \pm 0.02 ^{b,1}	0.45 \pm 0.04 ^{b,2}	0.41 \pm 0.01 ^{b,2}
Lote III	0.46 \pm 0.03 ^{a,1}	0.65 \pm 0.02 ^{a,2}	-----

Lote II	0.19 \pm 0.02 ^{b,1}	0.45 \pm 0.04 ^{b,2}	0.41 \pm 0.01 ^{b,2}
Lote IV	0.51 \pm 0.04 ^{a,1}	0.93 \pm 0.05 ^{a,2}	0.29 \pm 0.01 ^{b,a,2,1}
AAT (3)			
Control	39.61 \pm 4.10 ^{a,1}	61.36 \pm 3.80 ^{a,2}	54.78 \pm 2.62 ^{1,2}
Lote II	85.56 \pm 6.76 ^{b,1}	34.27 \pm 5.16 ^{b,2}	64.42 \pm 1.79 ¹
Lote III	32.18 \pm 3.32 ^a	29.43 \pm 2.56 ^b	-----

Lote II	85.56 \pm 6.76 ^{b,1}	34.27 \pm 5.16 ^{b,2}	64.42 \pm 1.79 ¹
Lote IV	36.81 \pm 3.47 ^{a,1}	64.75 \pm 4.65 ^{a,2}	66.09 \pm 3.89 ²

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

(1) AAE = Arg + His + Ile + Leu + Phe + Thr + Val.

(2) AANE = Ala + Asp + Glu + Gln + Ser + Tyr.

(3) AAT = AAE + AANE.

TABLA 41

RELACION DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ISOLEUCINA/ AAN-ISOLEUCINA			
Control	0.13 ± 0.01^a	0.14 ± 0.01^a	0.14 ± 0.01^a
Lote II	0.15 ± 0.01^b	0.15 ± 0.01^a	0.15 ± 0.03^a
Lote III	$0.07 \pm 0.01^{a,b,1}$	$0.17 \pm 0.01^{a,2}$	-----

Lote II	0.15 ± 0.01^b	0.15 ± 0.01^a	0.15 ± 0.03^a
Lote IV	$0.11 \pm 0.03^{a,1}$	$0.18 \pm 0.01^{b,a,1}$	$0.03 \pm 0.01^{b,a,1,2}$
LEUCINA/ AAN-LEUCINA			
Control	$0.38 \pm 0.02^{a,1}$	$0.28 \pm 0.01^{a,2}$	$0.33 \pm 0.01^{a,1}$
Lote II	$0.37 \pm 0.01^{a,1}$	$0.40 \pm 0.03^{b,1}$	$0.29 \pm 0.01^{b,2}$
Lote III	$0.13 \pm 0.01^{b,1}$	$0.32 \pm 0.01^{a,b,2}$	-----

Lote II	$0.37 \pm 0.01^{a,1}$	$0.40 \pm 0.03^{b,1}$	$0.29 \pm 0.01^{b,2}$
Lote IV	$0.20 \pm 0.05^{b,1}$	$0.42 \pm 0.05^{b,2}$	$0.06 \pm 0.01^{b,a,1}$
VALINA/ AAN-VALINA			
Control	$0.48 \pm 0.04^{a,1}$	$0.53 \pm 0.01^{a,1}$	$0.65 \pm 0.02^{a,1,2}$
Lote II	$0.46 \pm 0.01^{a,1}$	$0.42 \pm 0.03^{b,1}$	$0.56 \pm 0.03^{a,2}$
Lote III	$0.14 \pm 0.02^{b,1}$	$0.59 \pm 0.01^{a,2}$	-----

Lote II	$0.46 \pm 0.01^{a,1}$	$0.42 \pm 0.03^{b,1}$	$0.56 \pm 0.03^{a,2}$
Lote IV	$0.20 \pm 0.06^{b,1}$	$0.39 \pm 0.02^{b,1}$	$0.08 \pm 0.01^{b,1,2}$

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 42

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
FENILALANINA/ AAN-FENILALANINA			
Control	0.16 \pm 0.01 ^{a,1}	0.14 \pm 0.01 ^{a,1}	0.10 \pm 0.01 ^{a,2}
Lote II	0.17 \pm 0.01 ^a	0.23 \pm 0.04 ^a	0.16 \pm 0.01 ^b
Lote III	0.09 \pm 0.01 ^{b,1}	0.13 \pm 0.01 ^{a,2}	-----

Lote II	0.17 \pm 0.01 ^a	0.23 \pm 0.04 ^a	0.16 \pm 0.01 ^b
Lote IV	0.10 \pm 0.02 ^{b,1}	0.23 \pm 0.01 ^{b,a,2}	0.04 \pm 0.01 ^{b,a,2,1}
TIROSINA/ AAN-TIROSINA			
Control	0.18 \pm 0.01 ^{a,1}	0.24 \pm 0.01 ^{a,2}	0.18 \pm 0.02 ^{a,1,2}
Lote II	0.17 \pm 0.01 ^{a,1}	0.13 \pm 0.02 ^{b,1}	0.19 \pm 0.02 ^{a,1,2}
Lote III	1.72 \pm 0.24 ^{b,1}	0.15 \pm 0.01 ^{b,2}	-----

Lote II	0.17 \pm 0.01 ^{a,1}	0.13 \pm 0.02 ^{b,1}	0.19 \pm 0.02 ^{a,1,2}
Lote IV	1.54 \pm 0.05 ^{b,1}	0.10 \pm 0.01 ^{b,2}	4.07 \pm 0.10 ^{b,2,1}
FENILALANINA/TIROSINA			
Control	0.93 \pm 0.04 ^{a,1}	0.63 \pm 0.01 ^{a,2}	0.59 \pm 0.08 ^{a,2}
Lote II	1.04 \pm 0.06 ^a	2.07 \pm 0.63 ^a	0.91 \pm 0.14 ^a
Lote III	0.13 \pm 0.02 ^{b,1}	0.84 \pm 0.07 ^{a,2}	-----

Lote II	1.04 \pm 0.06 ^{a,1}	2.07 \pm 0.63 ^a	0.91 \pm 0.14 ^a
Lote IV	0.12 \pm 0.01 ^{b,1}	1.99 \pm 0.08 ^{b,a,2}	0.44 \pm 0.10 ^{b,2,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 43

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
ALANINA/TIROSINA			
Control	12.38 \pm 3.01 ^{a,1}	3.67 \pm 0.18 ^{a,1}	27.25 \pm 2.05 ^{a,2}
Lote II	4.10 \pm 0.22 ^{b,1}	5.22 \pm 0.27 ^{b,1}	3.60 \pm 0.63 ^{b,1,2}
Lote III	9.07 \pm 2.08 ^{a,1}	3.73 \pm 0.32 ^{a,2}	-----

Lote II	4.10 \pm 0.22 ^{b,1}	5.22 \pm 0.27 ^{b,1}	3.60 \pm 0.63 ^{b,1,2}
Lote IV	9.85 \pm 0.90 ^{a,1}	5.97 \pm 0.47 ^{b,2}	2.05 \pm 0.10 ^{b,2,1}
ALANINA/LEUCINA			
Control	7.31 \pm 1.38 ^{a,1}	3.92 \pm 0.14 ^{a,1}	16.65 \pm 1.44 ^{a,1,2}
Lote II	2.17 \pm 0.07 ^a	2.10 \pm 0.38 ^b	2.42 \pm 0.14 ^b
Lote III	4.97 \pm 1.37 ^a	2.04 \pm 0.29 ^b	-----

Lote II	2.17 \pm 0.07 ^a	2.10 \pm 0.38 ^b	2.42 \pm 0.14 ^b
Lote IV	4.85 \pm 0.39 ^{a,b,1}	1.90 \pm 0.05 ^{b,2}	2.80 \pm 0.11 ^{b,2,1}
ALANINA/AAR			
Control	2.85 \pm 0.94 ^{a,1}	1.05 \pm 0.06 ^{a,1}	5.43 \pm 0.47 ^{a,1,2}
Lote II	0.82 \pm 0.04 ^a	0.84 \pm 0.14 ^a	0.77 \pm 0.03 ^b
Lote III	1.89 \pm 0.53 ^a	0.65 \pm 0.05 ^{b,a}	-----

Lote II	0.82 \pm 0.04 ^a	0.84 \pm 0.14 ^a	0.77 \pm 0.03 ^b
Lote IV	1.90 \pm 0.15 ^{a,b,1}	0.76 \pm 0.05 ^{a,2}	1.01 \pm 0.04 ^{b,a,2,1}

donde:

- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

TABLA 44

RELACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES ($\mu\text{mol/g}$ tejido)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO

	DIA 4	DIA 10	DIA 14
SER + GLI + ALA/AAR			
Control	7.03 \pm 1.79 ^{a,1}	3.29 \pm 0.12 ^{a,1}	23.62 \pm 3.58 ^{a,2}
Lote II	12.66 \pm 0.83 ^{b,1}	5.04 \pm 0.44 ^{b,2}	7.45 \pm 0.25 ^{b,2}
Lote III	7.93 \pm 1.39 ^{a,b,1}	1.83 \pm 0.17 ^{b,a,2}	-----

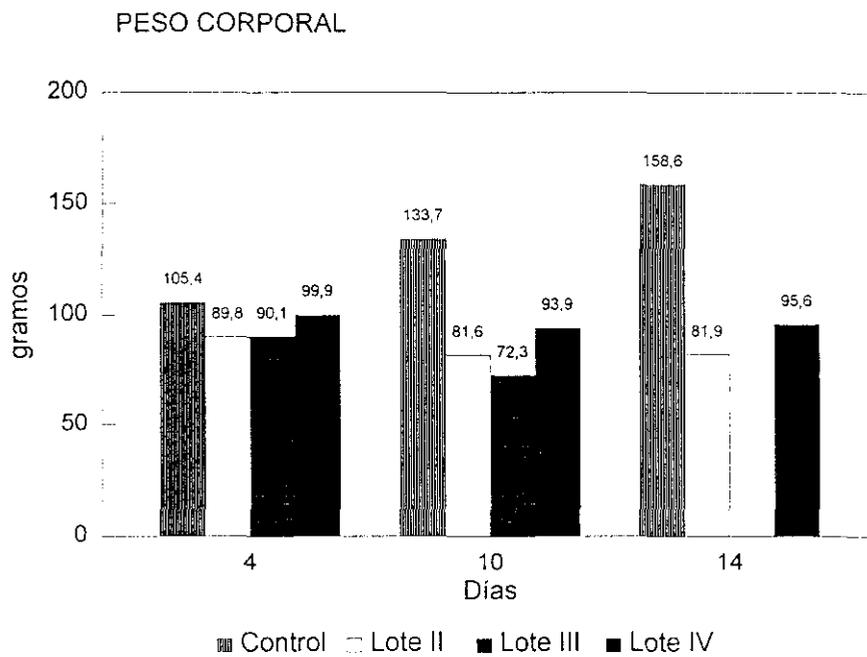
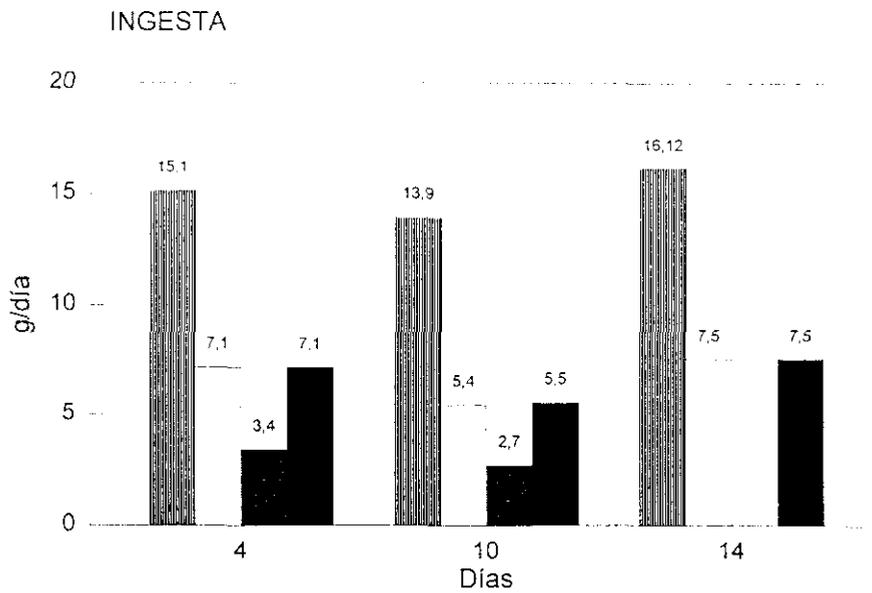
Lote II	12.66 \pm 0.83 ^{b,1}	5.04 \pm 0.44 ^{b,2}	7.45 \pm 0.25 ^{b,2}
Lote IV	5.75 \pm 0.45 ^{a,1}	1.73 \pm 0.10 ^{b,a,2}	4.25 \pm 0.21 ^{b,a,1}
GLICINA/VALINA			
Control	6.58 \pm 1.51 ^{a,1}	3.54 \pm 0.22 ^{a,1}	30.94 \pm 5.47 ^{a,1,2}
Lote II	25.33 \pm 2.15 ^{b,1}	7.29 \pm 0.41 ^{b,2}	11.07 \pm 0.27 ^{a,2,1}
Lote III	12.36 \pm 3.05 ^{a,1}	1.55 \pm 0.24 ^{b,a,2}	-----

Lote II	25.33 \pm 2.15 ^{b,1}	7.29 \pm 0.41 ^{b,2}	11.07 \pm 0.28 ^{a,2,1}
Lote IV	7.28 \pm 0.93 ^{a,1}	1.55 \pm 0.15 ^{b,a,2}	5.92 \pm 0.41 ^{b,1}

donde:

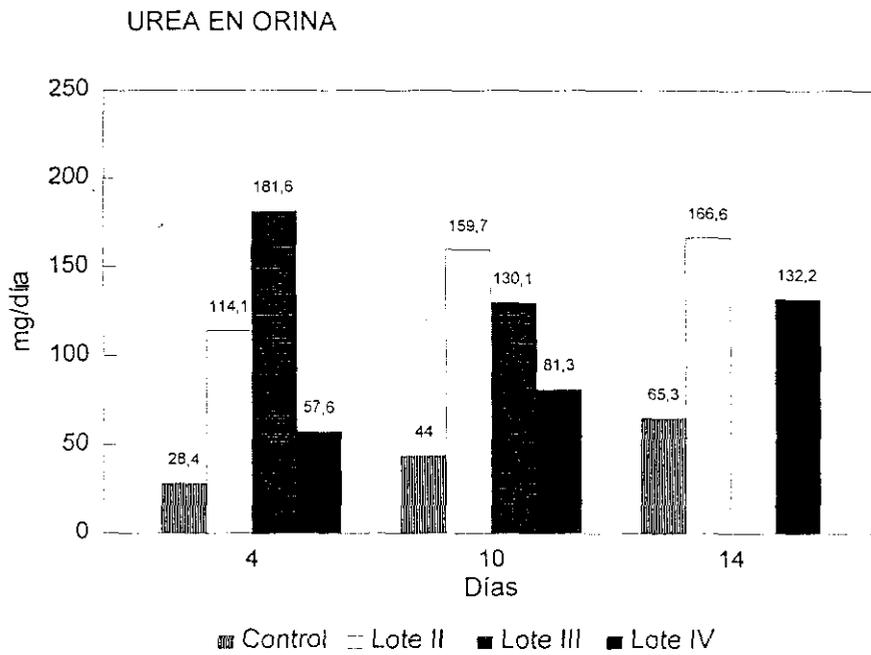
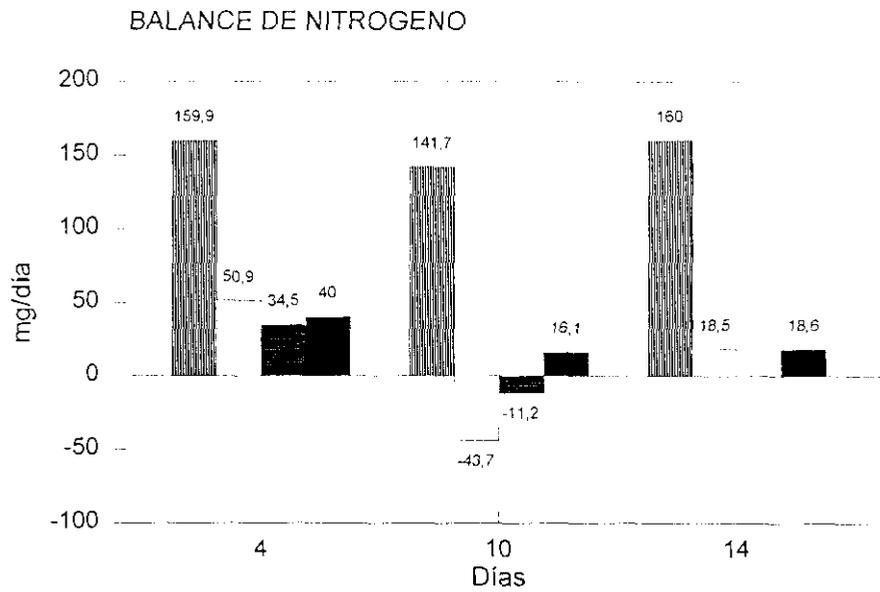
- Valores medios de seis animales \pm ESM.
- Letras diferentes en columnas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) en el día de la experiencia.
- Números diferentes en filas indican variaciones significativas ($P \leq 0.05$) entre días.
- ---- Efecto letal de la dieta.

GRAFICA I: INGESTA Y PESO CORPORAL DEL ANIMAL



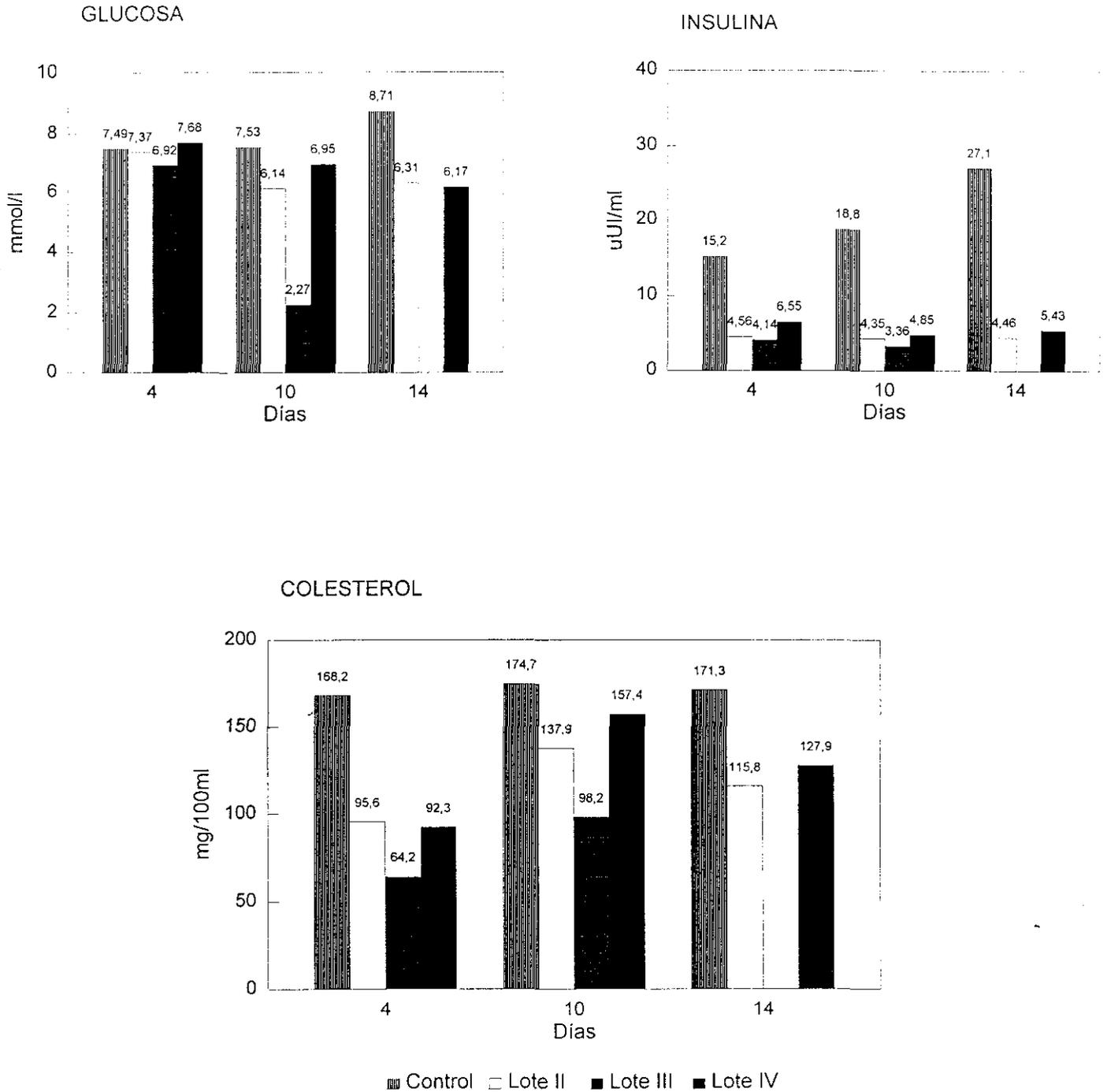
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

GRAFICA II: BALANCE DE NITROGENO Y UREA EN ORINA



Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

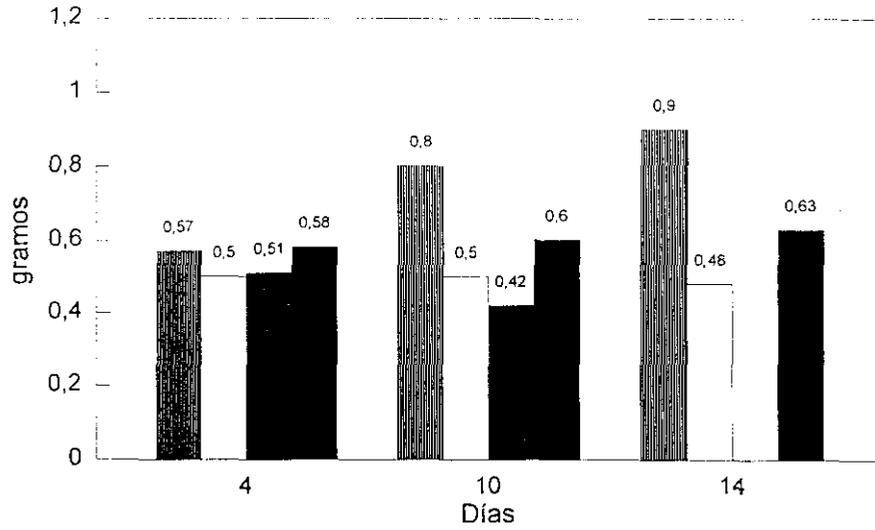
**GRAFICA III:
NIVEL PLASMATICO DE GLUCOSA,
INSULINA Y COLESTEROL**



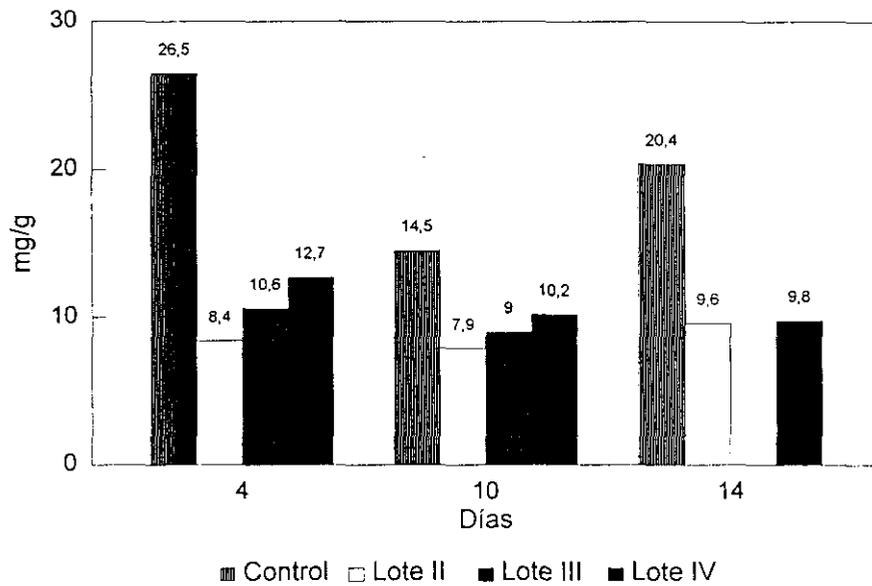
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

GRAFICA IV: PESO Y PROTEINAS SOLUBLES EN MUSCULO GASTROCNEMIO

PESO MUSCULO GASTROCNEMIO

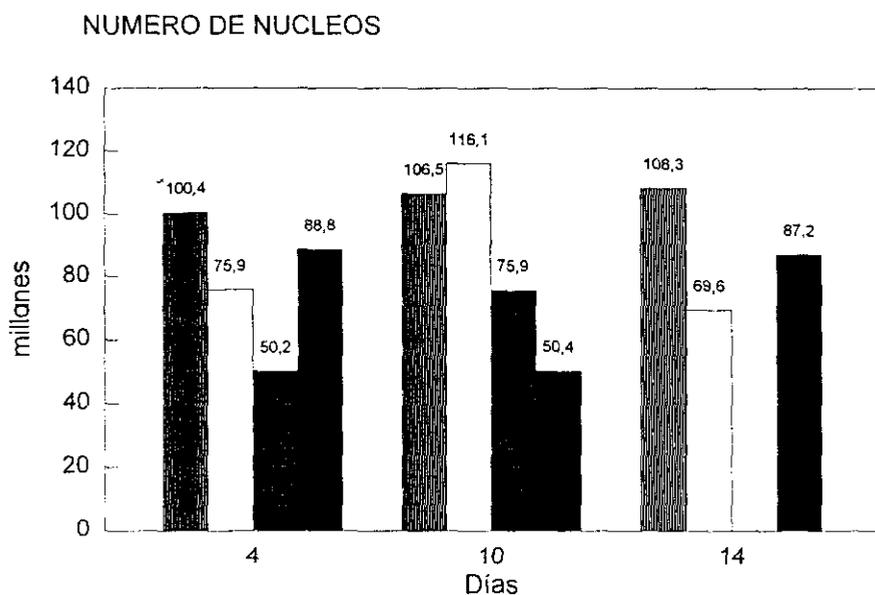
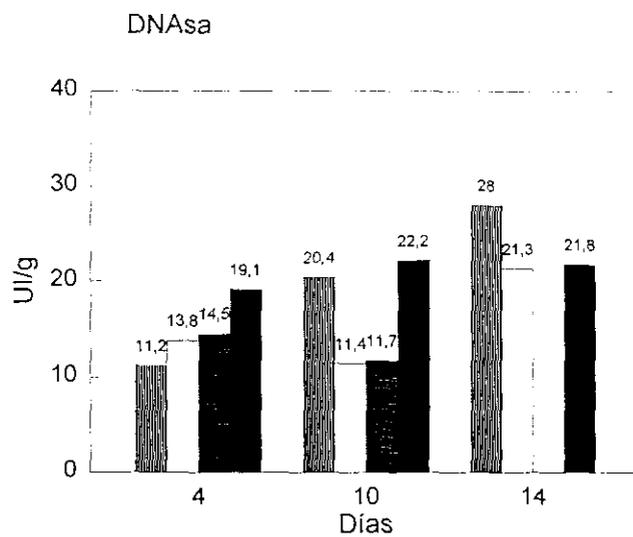
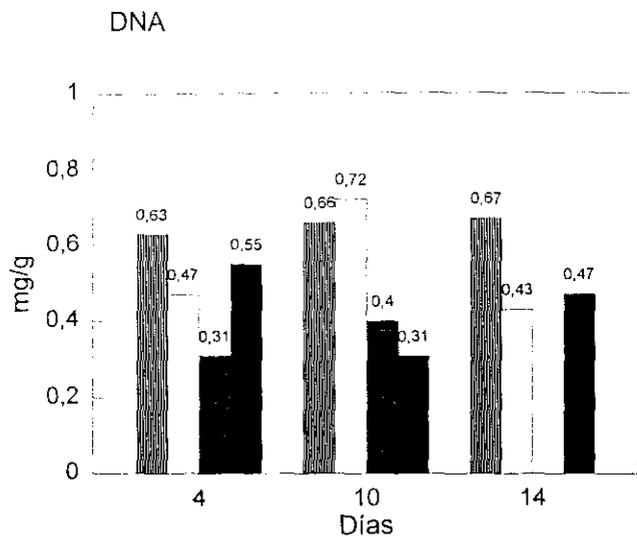


PROTEINAS SOLUBLES



Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

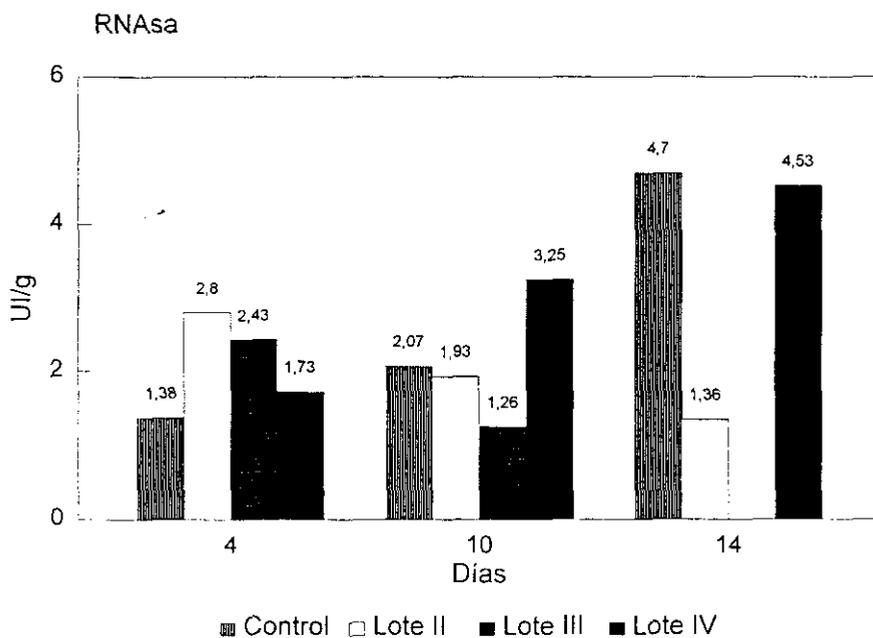
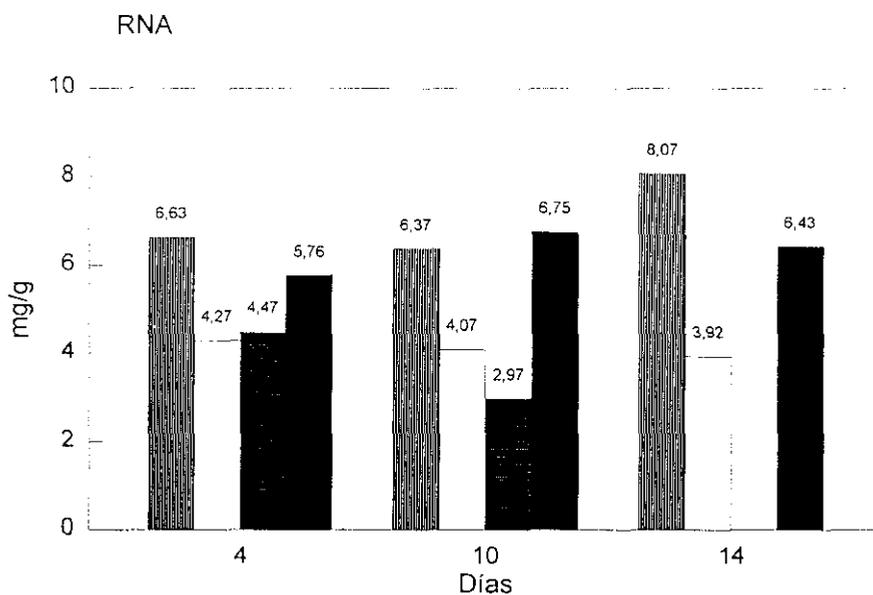
**GRAFICA V:
CONTENIDO DE DNA, ACTIVIDAD DNAsa
Y NUMERO DE NUCLEOS
EN MUSCULO GASTROCNEMIO**



■ Control □ Lote II ■ Lote III ■ Lote IV

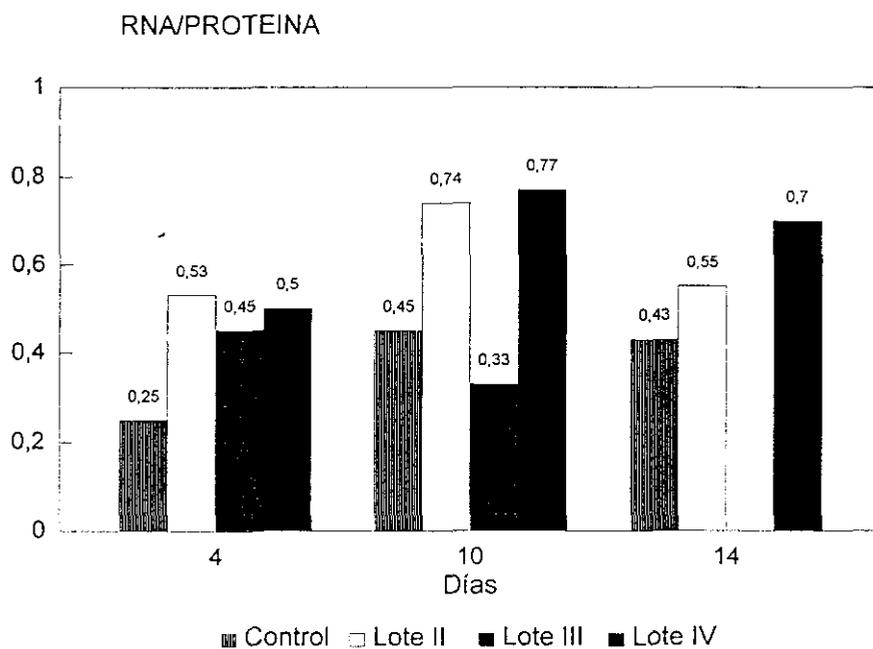
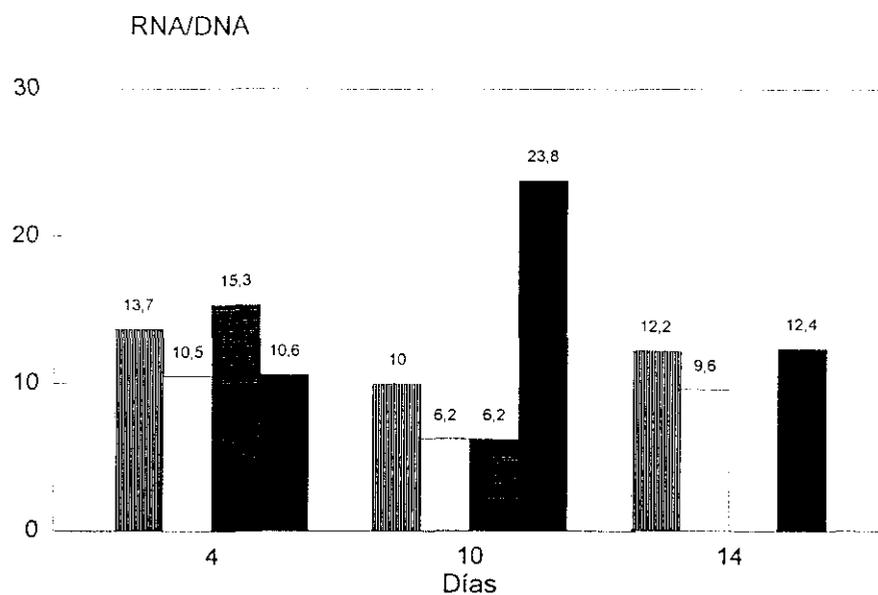
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA VI:
CONTENIDO DE RNA Y ACTIVIDAD RNAsa
EN MUSCULO GASTROCNEMIO**



Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

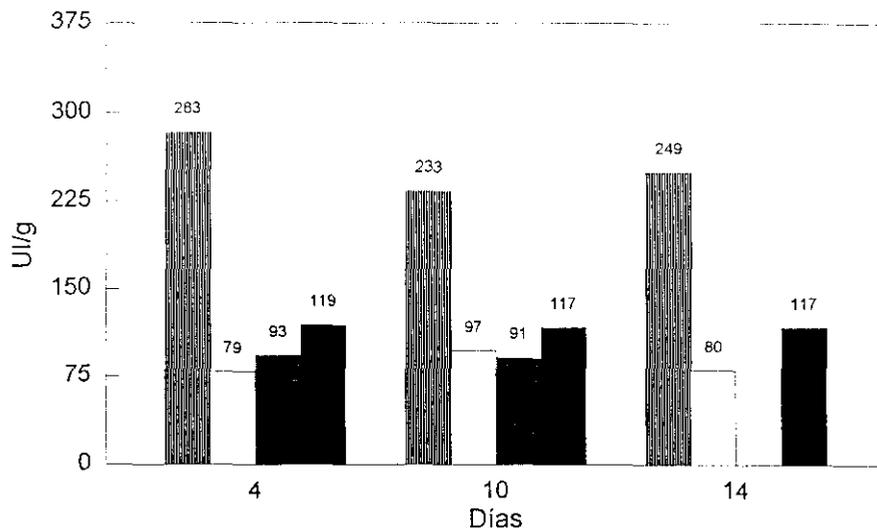
**GRAFICA VII:
RELACIONES RNA/DNA (CONTENIDO DE RNA POR CELUL
Y RNA/PROTEINA (CAPACIDAD DE SINTESIS PROTEICA)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO**



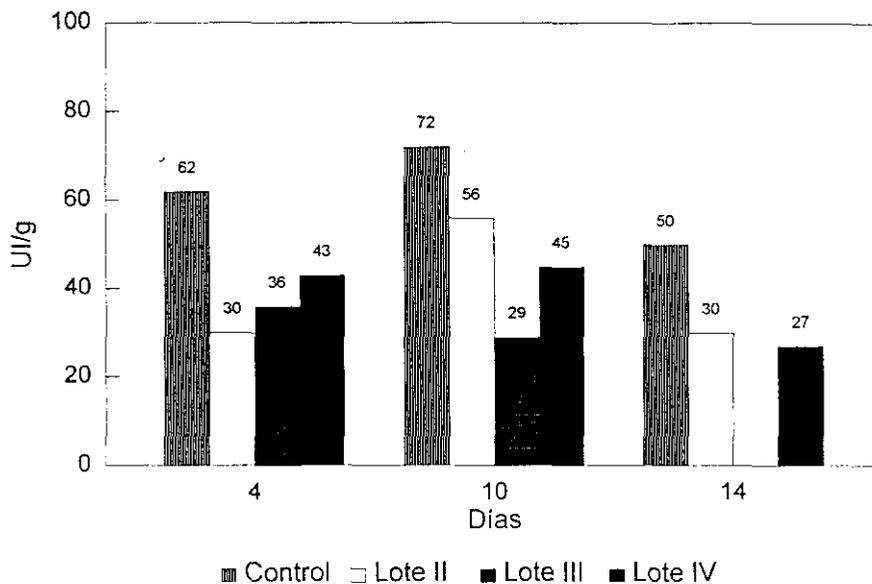
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA VIII:
ACTIVIDADES HIDROLASICA EN MUSCULO
GASTROCNEMIO: FOSFATASAS ACIDA
Y ALCALINA**

FOSFATASA ACIDA

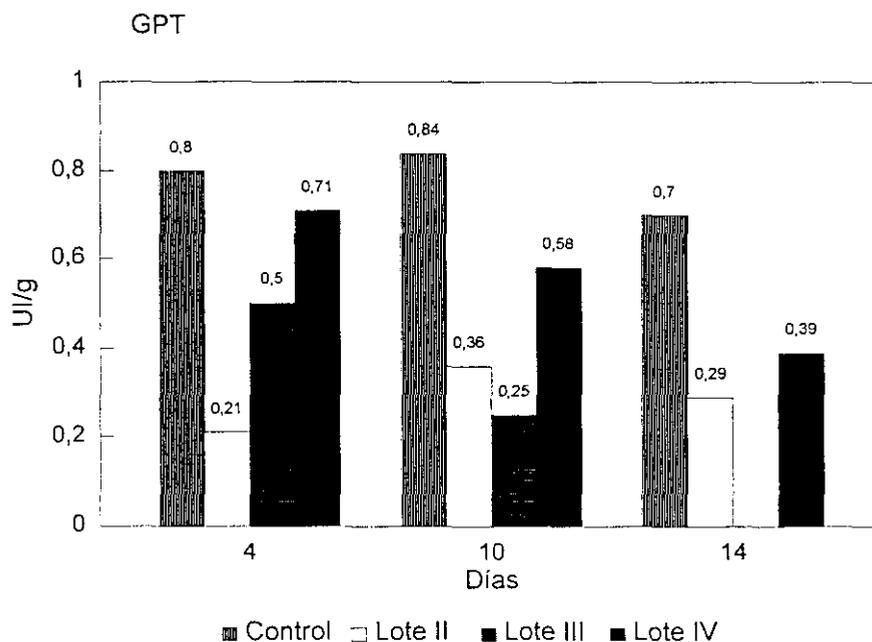
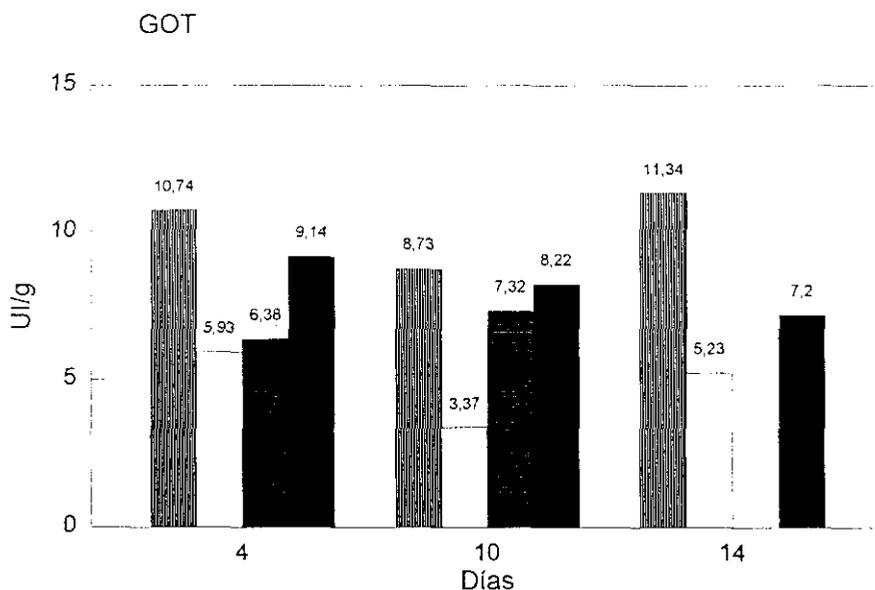


FOSFATASA ALCALINA



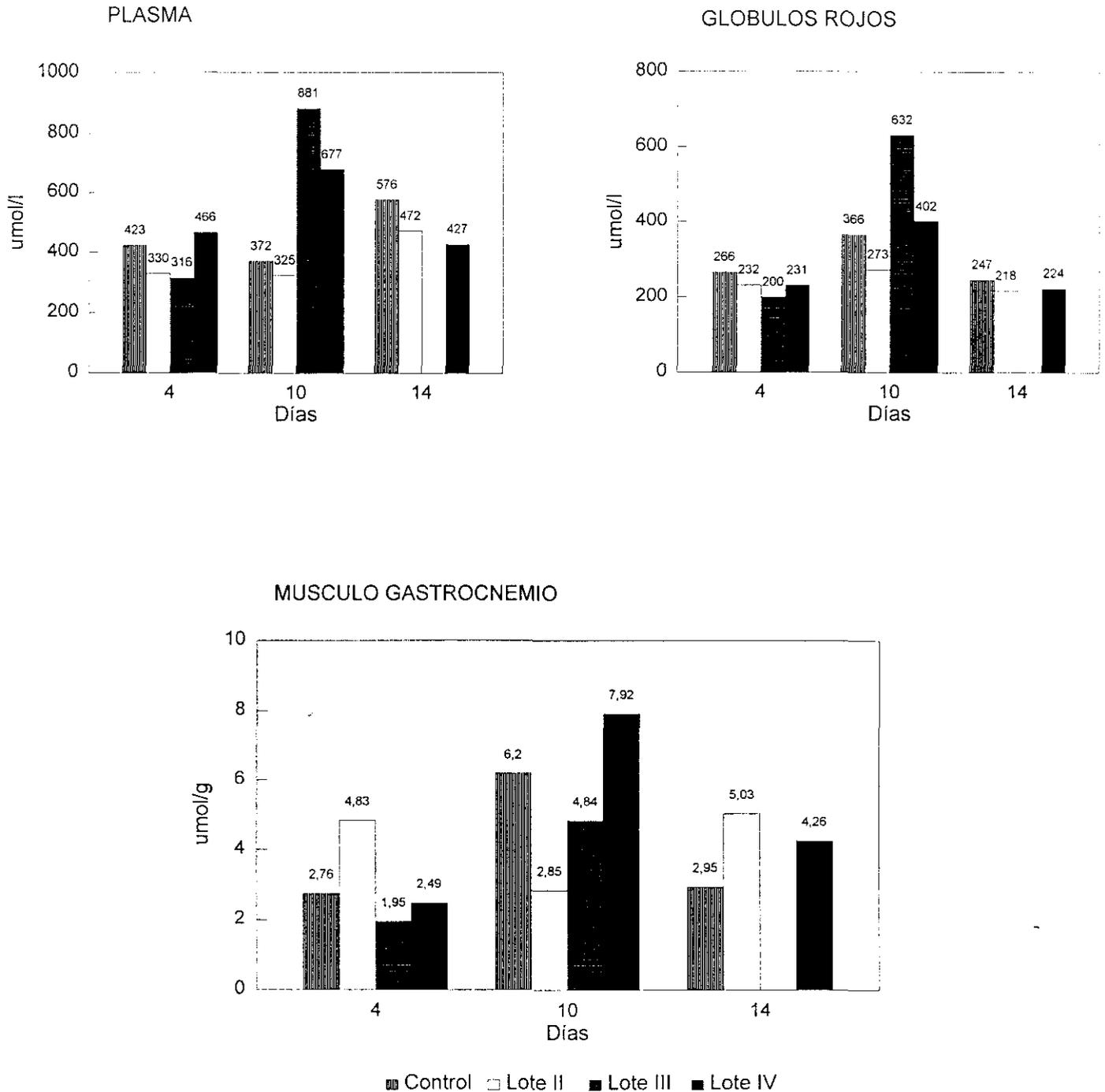
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA IX:
ACTIVIDAD TRANSAMINASICA (GOT Y GPT)
EN MUSCULO GASTROCNEMIO**



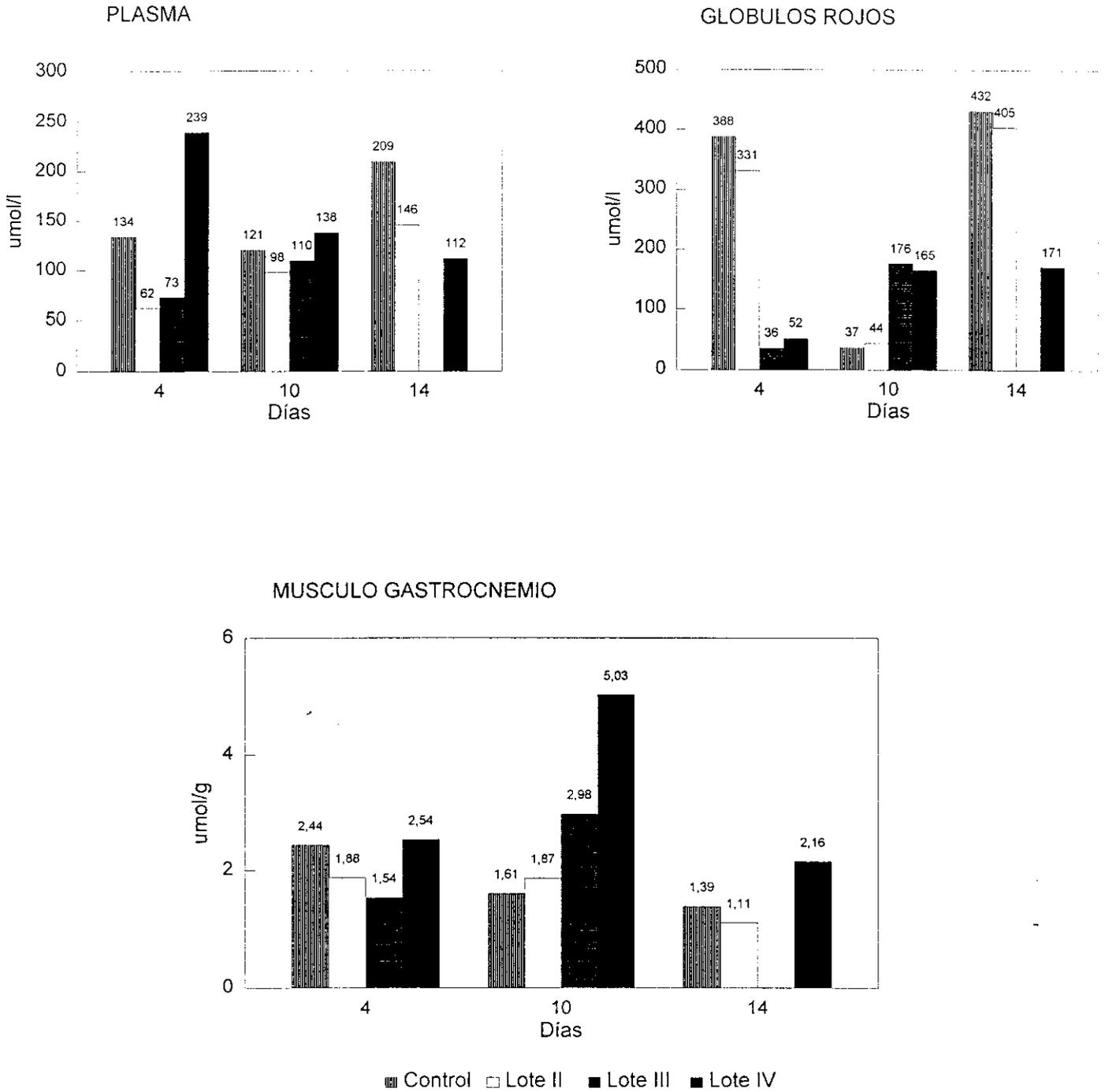
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA X:
SUMA DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA
(AAR) EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



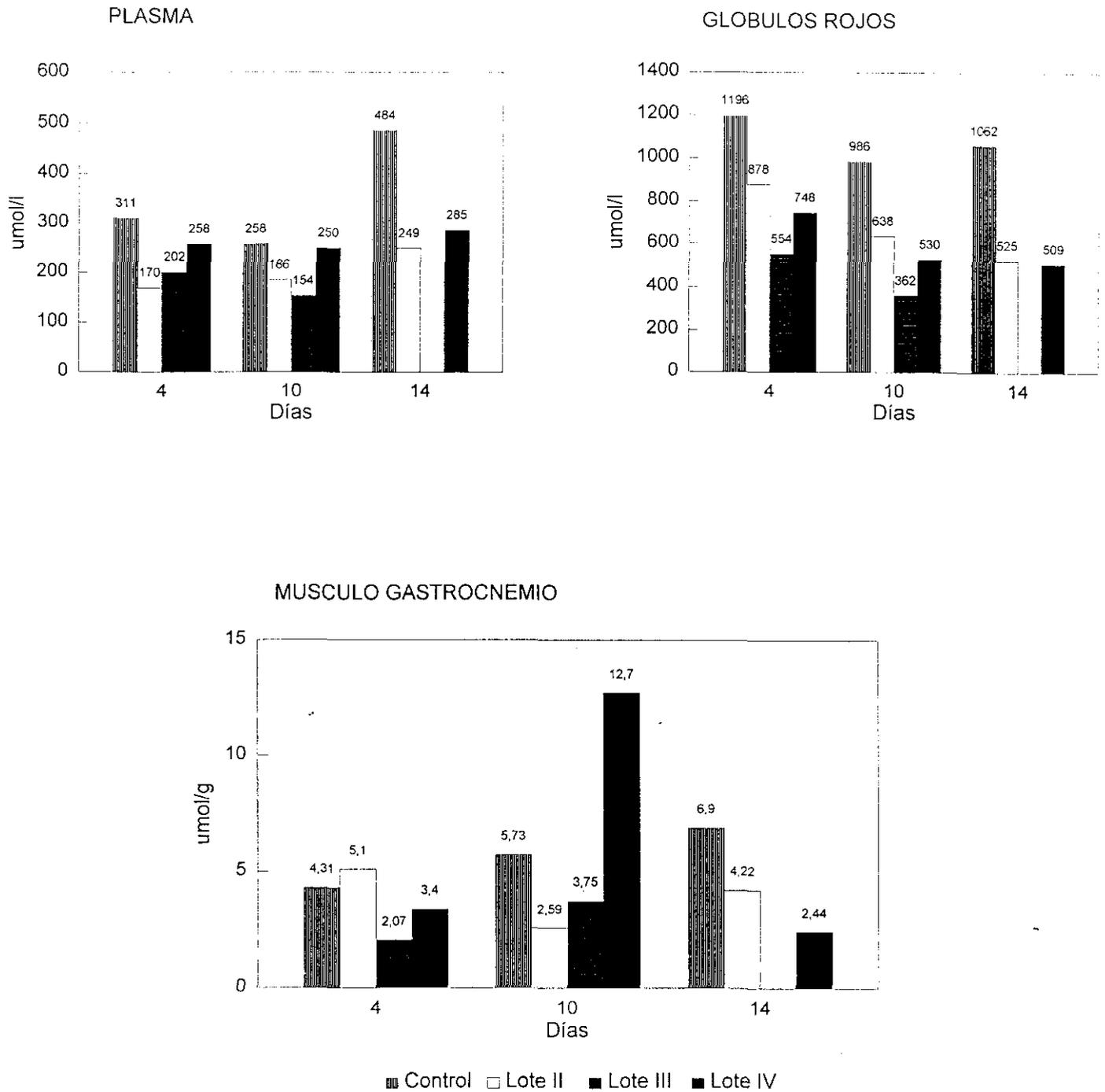
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XI:
CONCENTRACIONES DE ACIDO ASPARTICO
LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



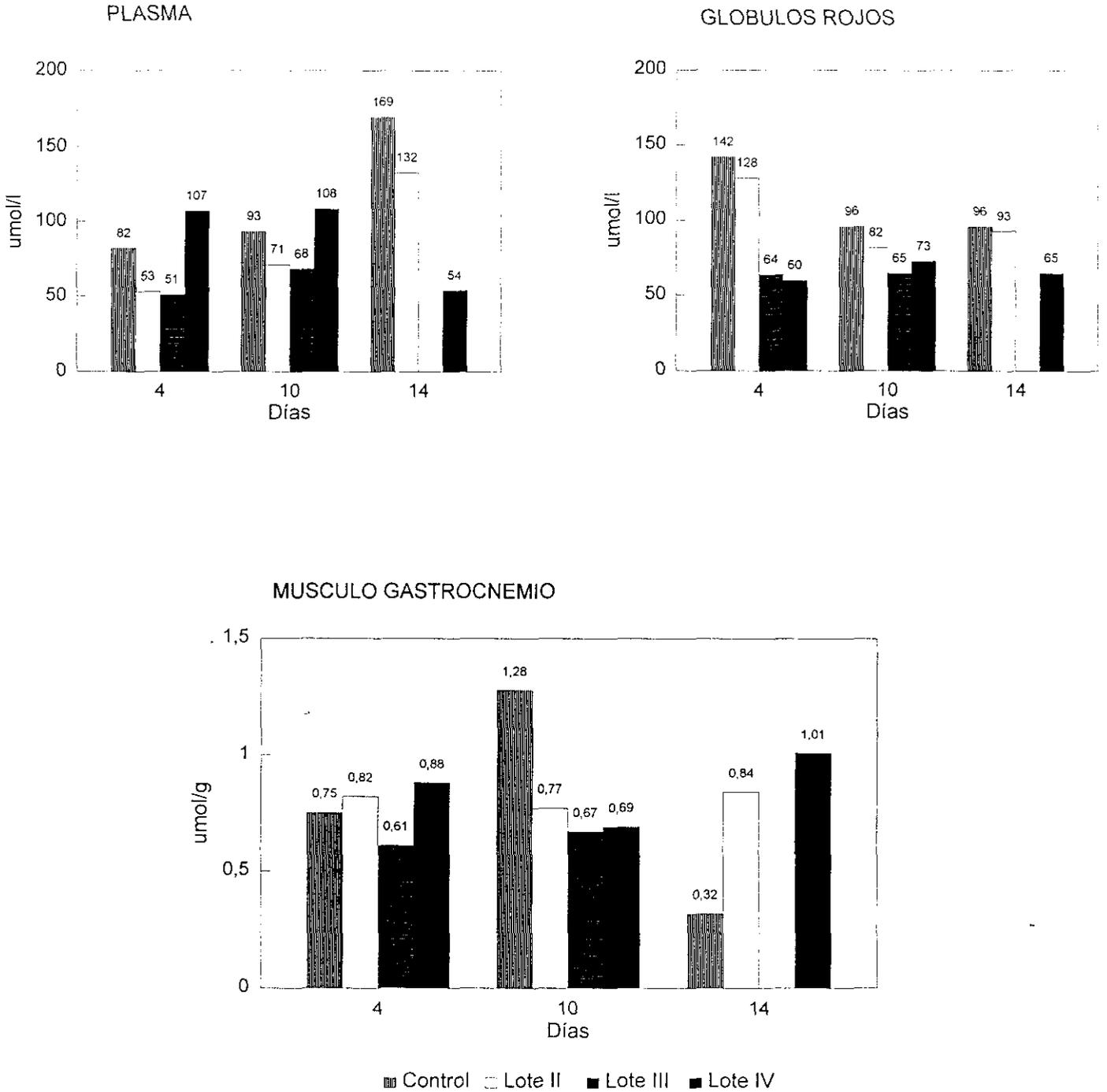
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XII:
CONCENTRACIONES DE ACIDO GLUTAMICO
LIBRE EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



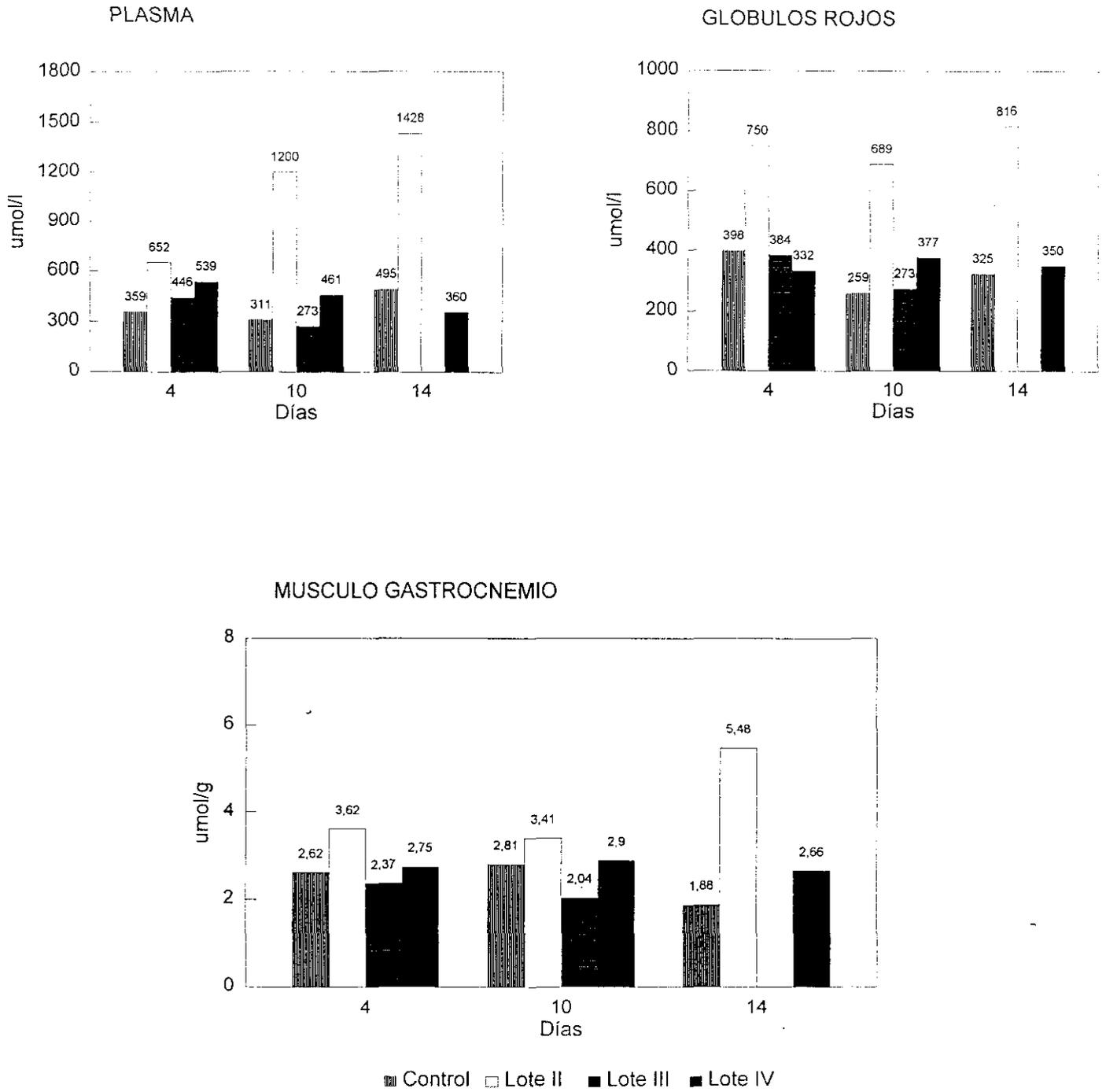
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XIII:
CONCENTRACIONES DE ASPARRAGINA LIBRE
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



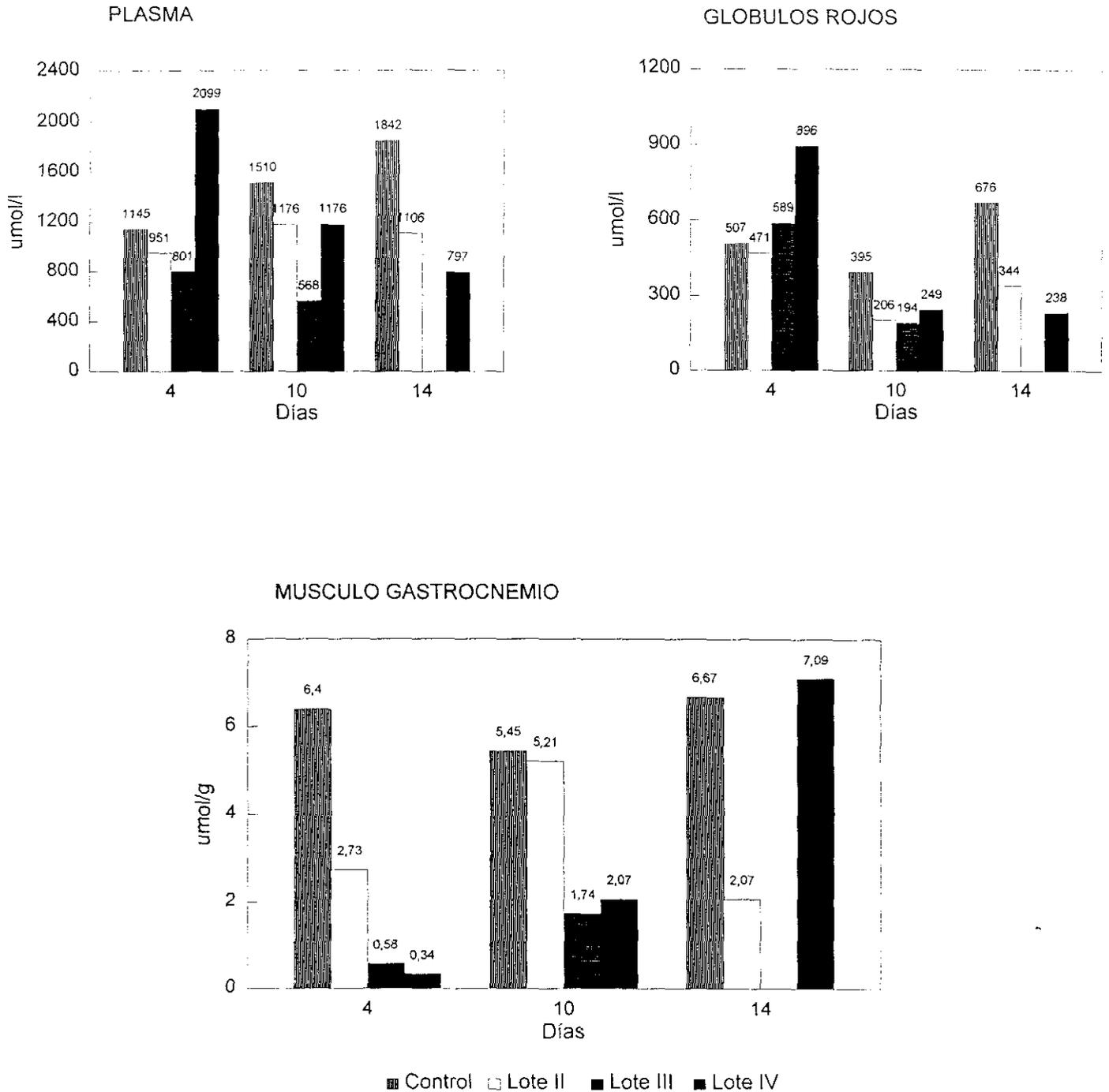
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XIV:
CONCENTRACIONES DE SERINA LIBRE
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



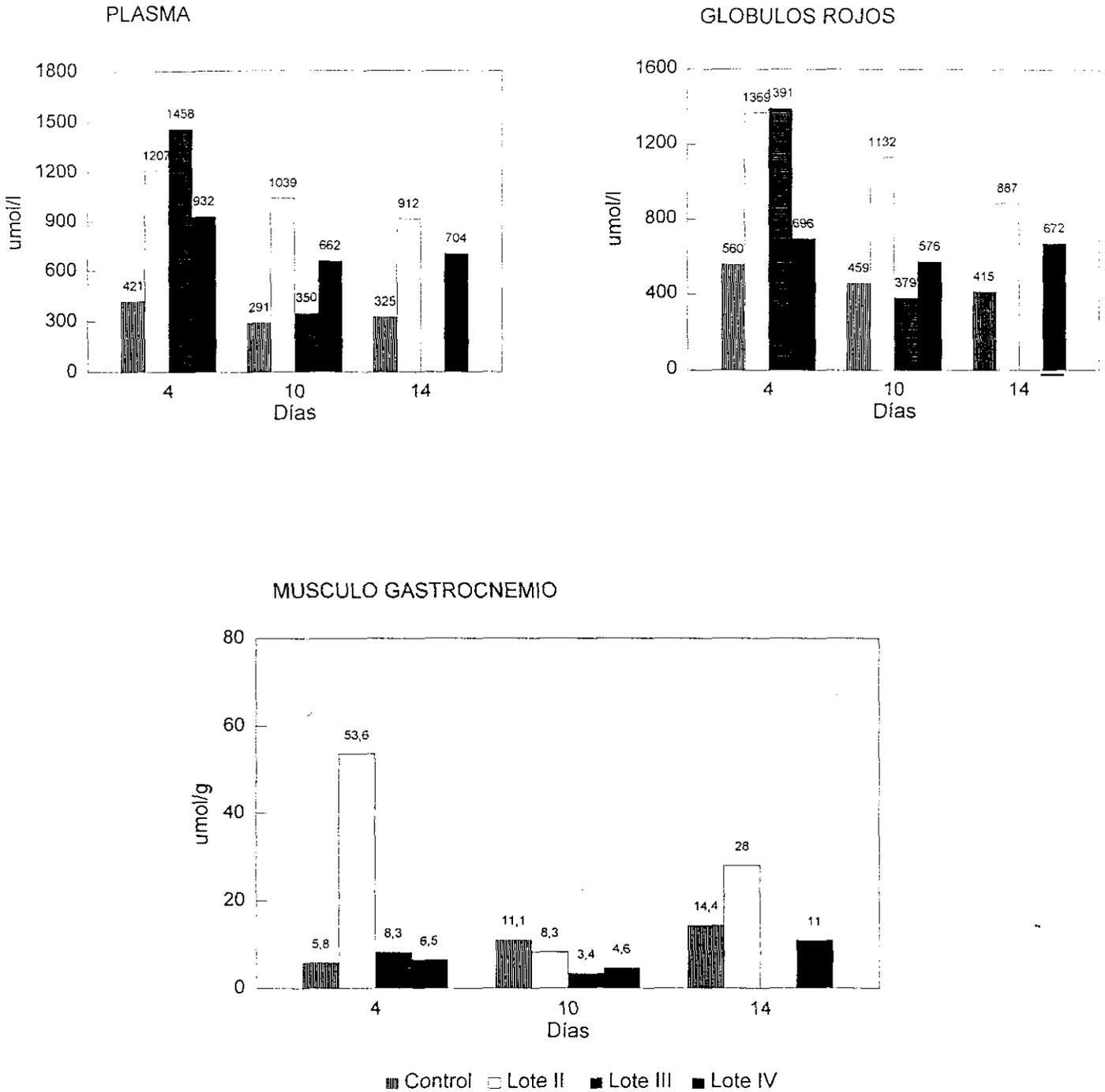
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XV:
CONCENTRACIONES DE GLUTAMINA LIBRE
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



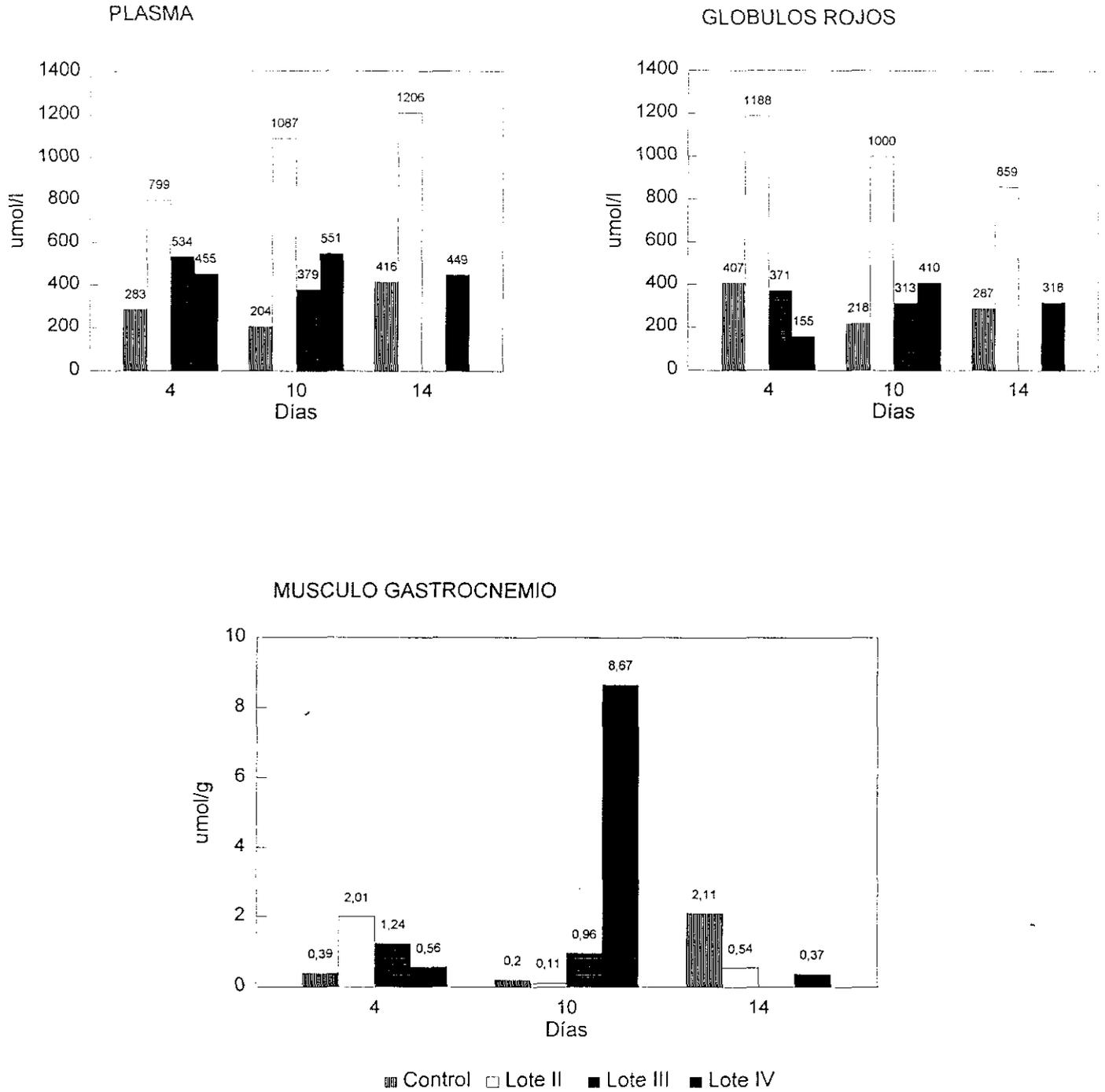
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XVI:
CONCENTRACIONES DE GLICINA LIBRE
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



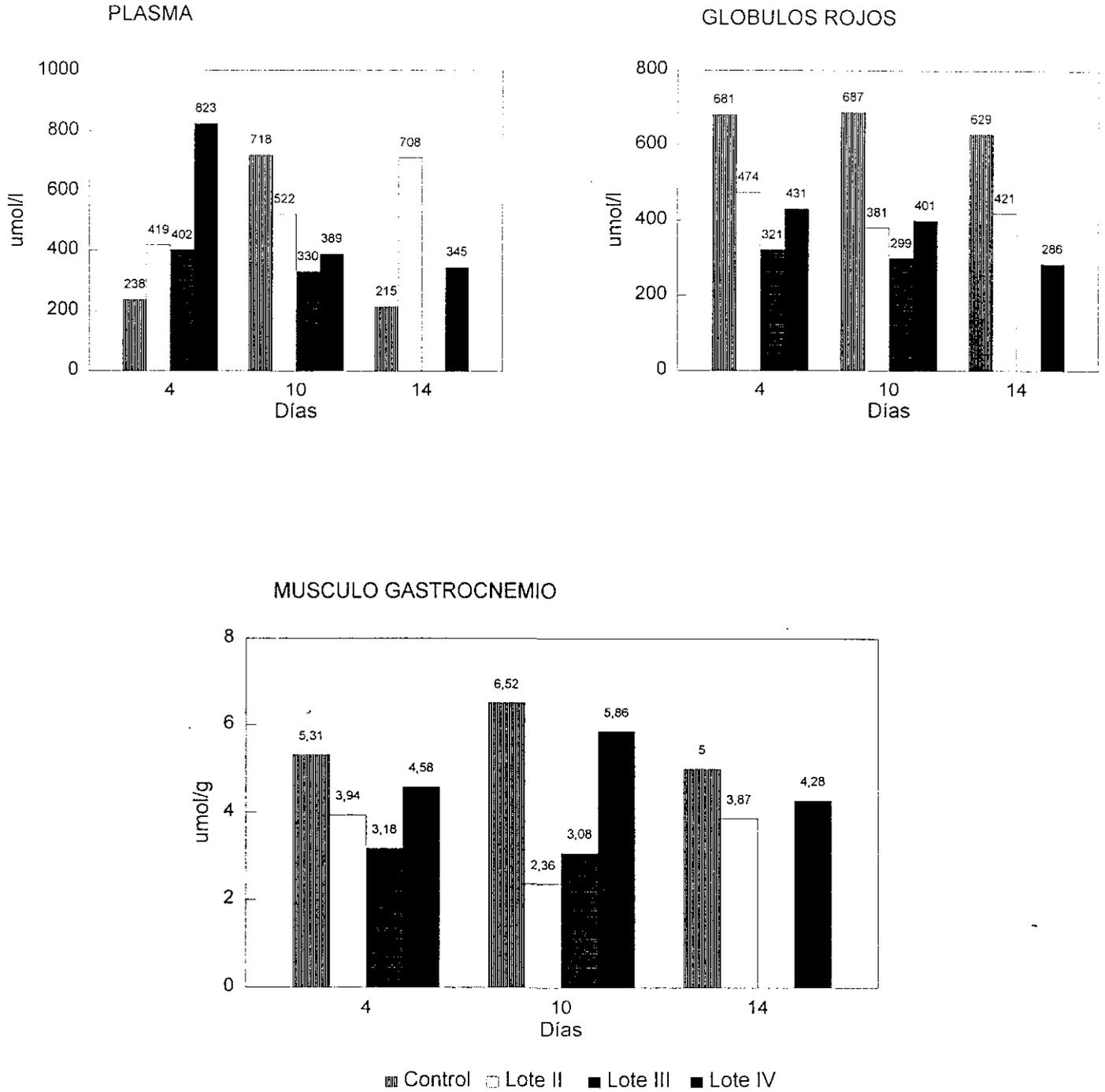
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XVII:
CONCENTRACIONES DE TREONINA LIBRE
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



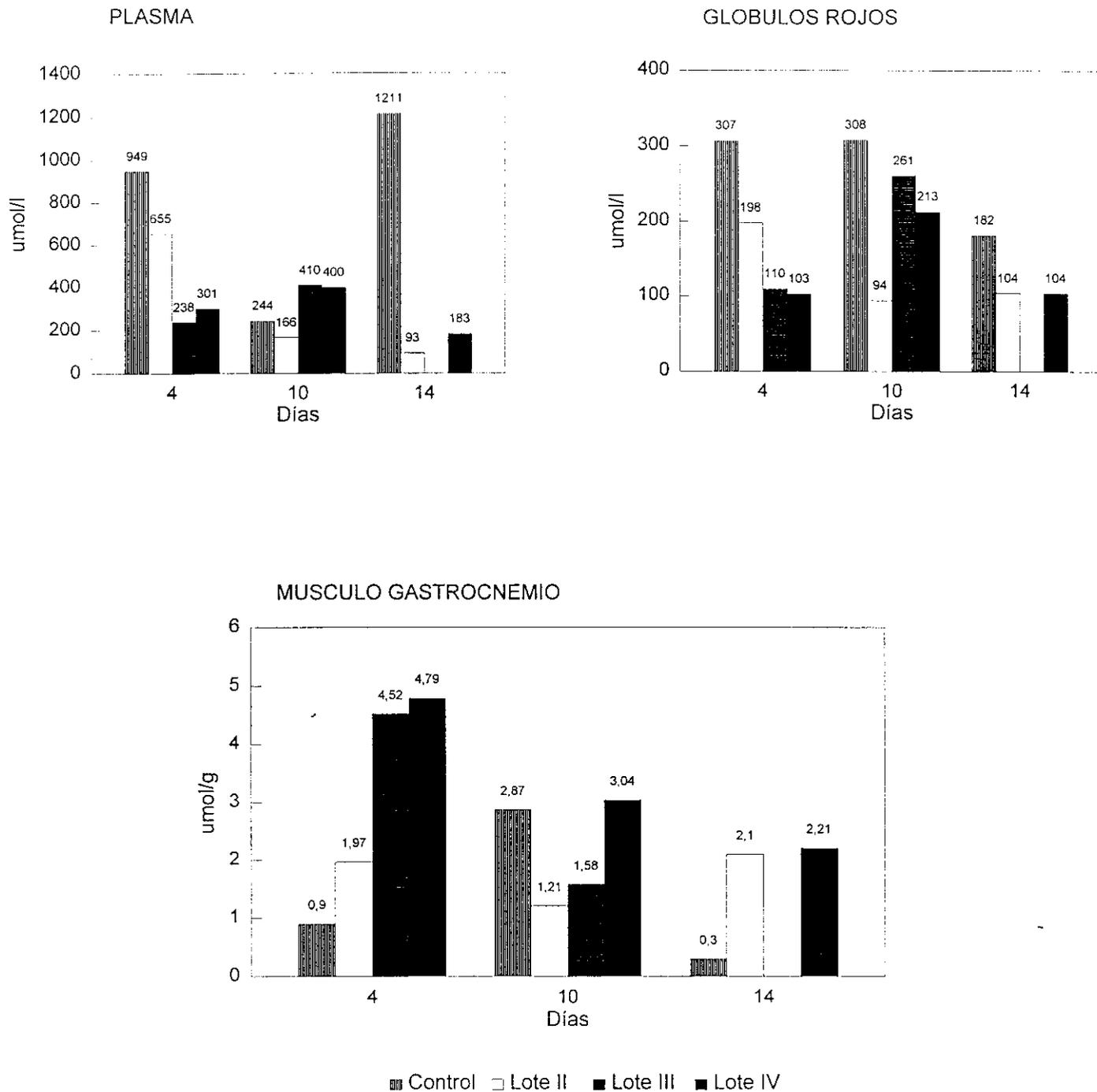
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XVIII:
CONCENTRACIONES DE ALANINA LIBRE
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



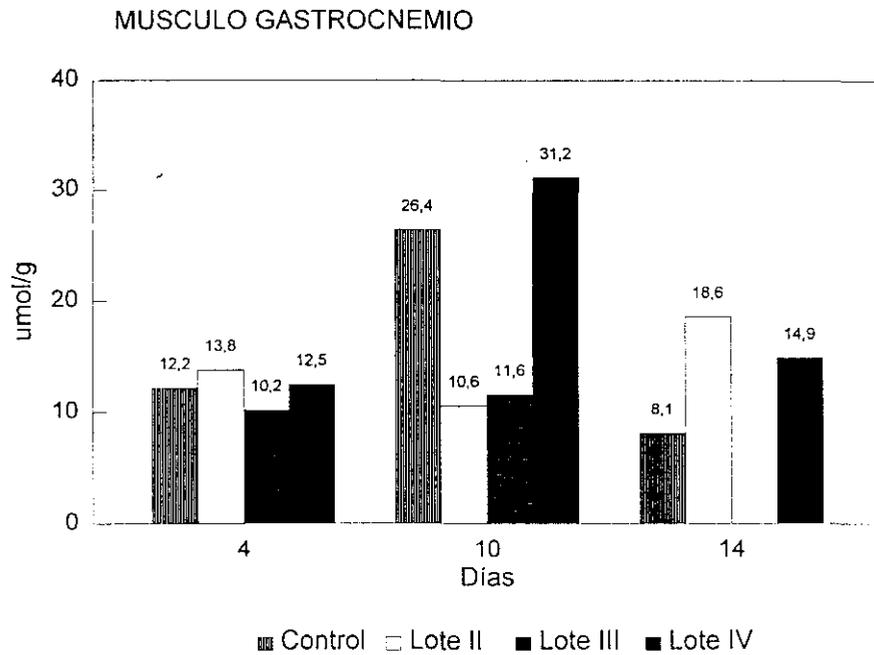
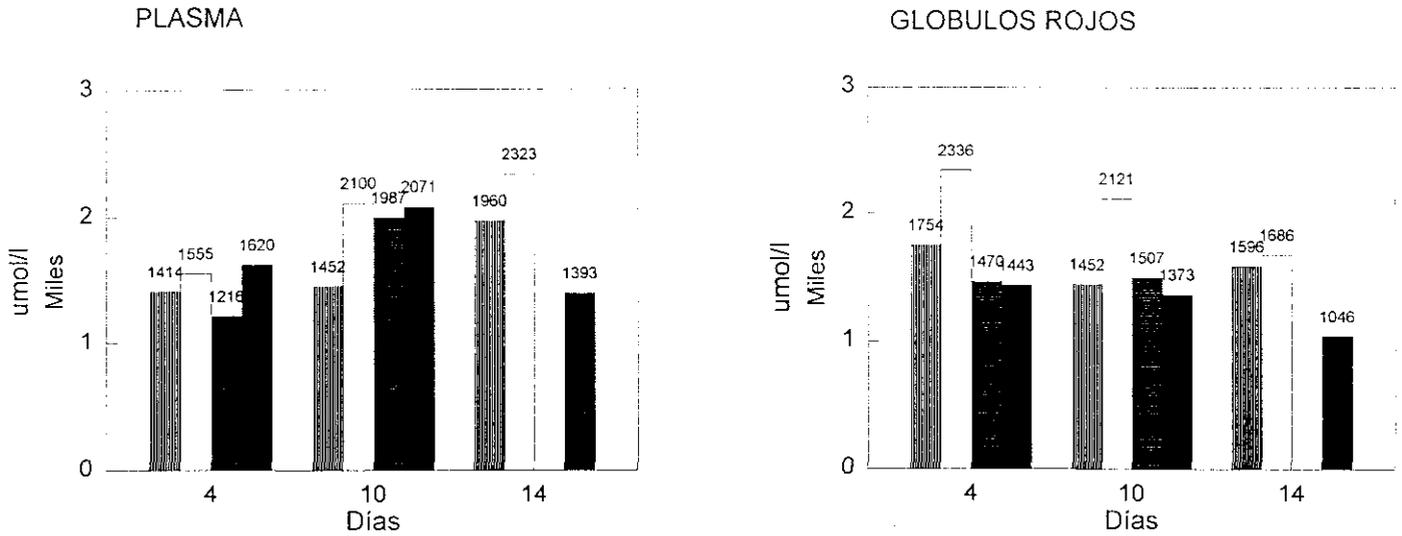
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XIX:
SUMA DE AMINOACIDOS AROMATICOS (Phe+Tyr)
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



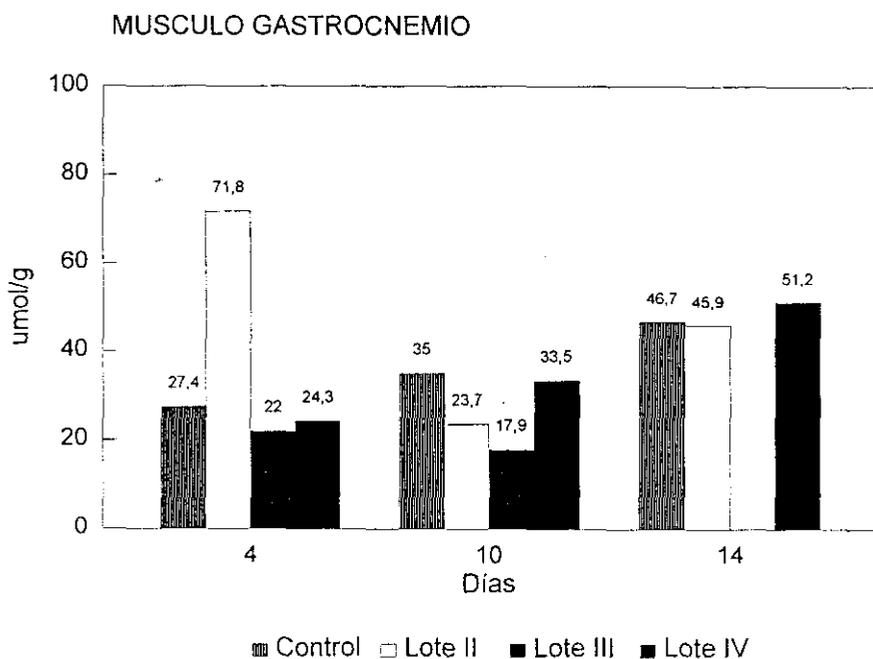
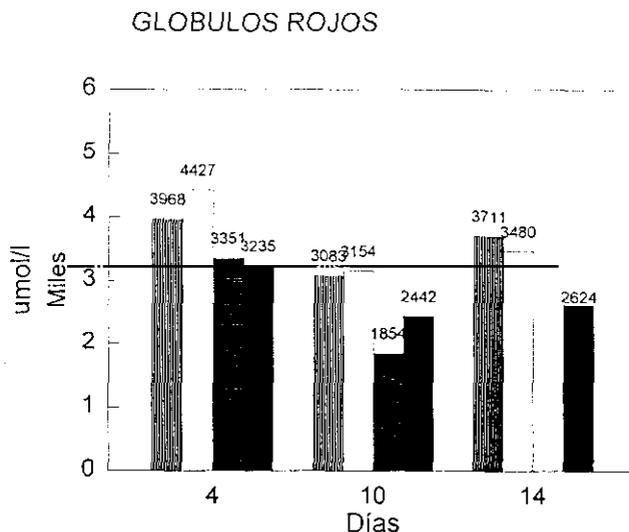
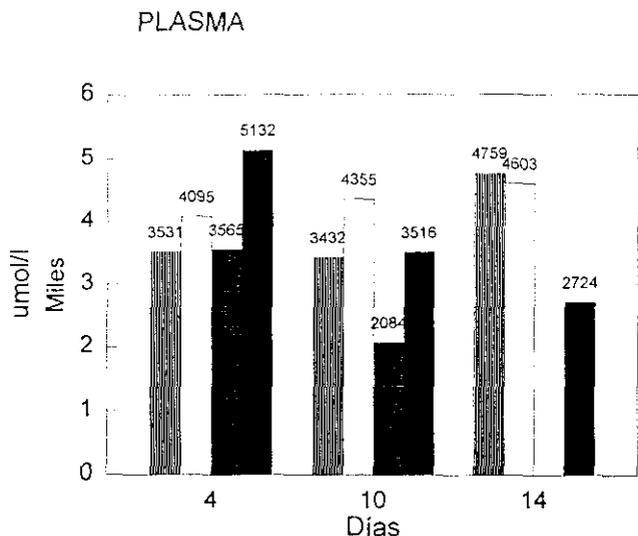
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XX:
SUMA DE AMINOACIDOS ESENCIALES (AAE)
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



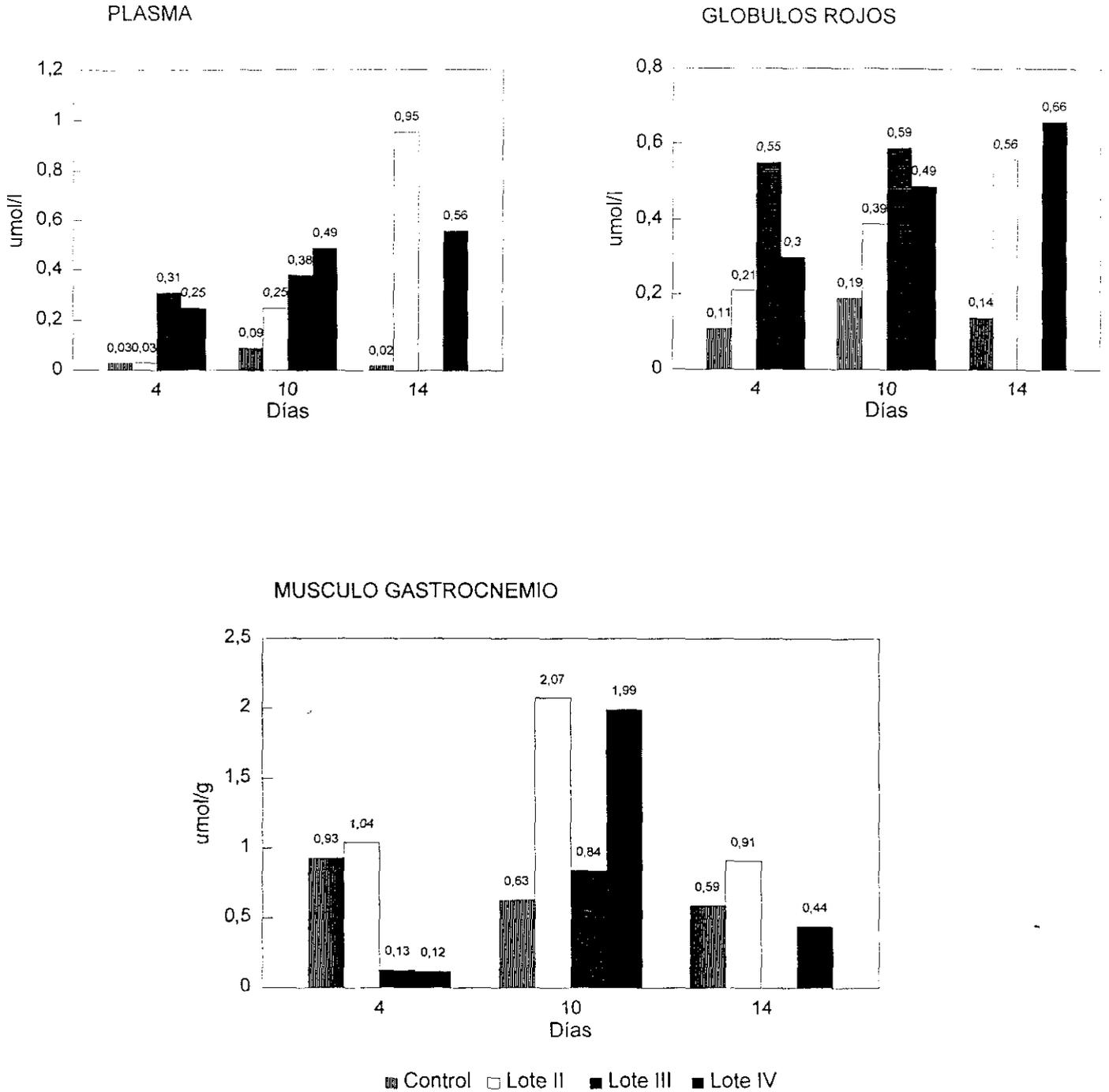
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XXI:
SUMA DE AMINOACIDOS NO ESENCIALES (AANE)
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



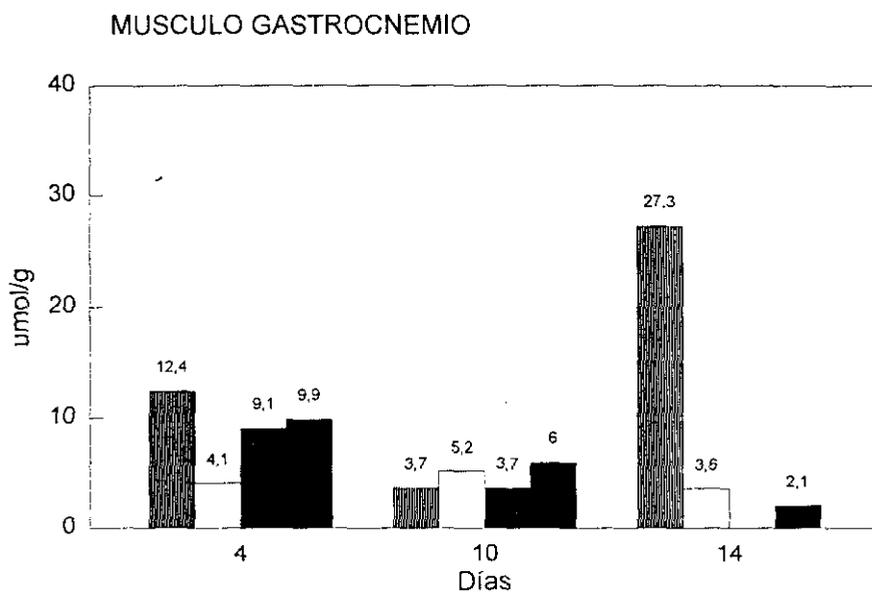
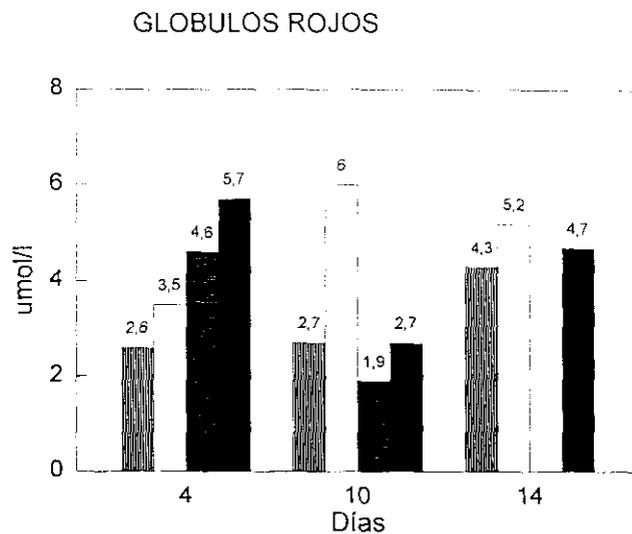
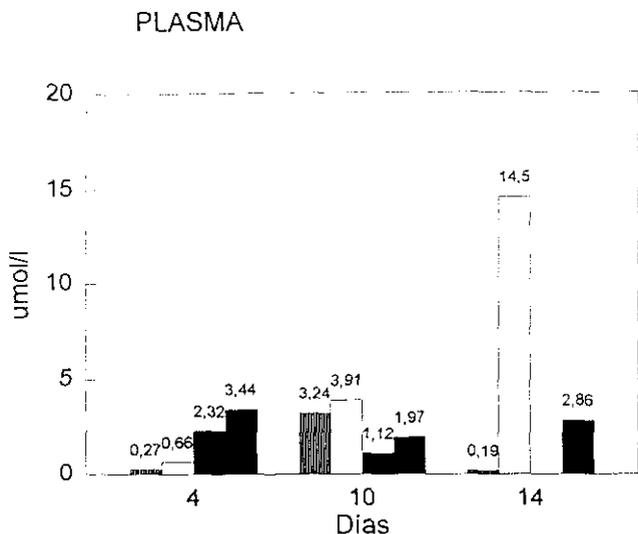
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XXII:
RELACION DE AMINOACIDOS LIBRES PHE/TYR
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

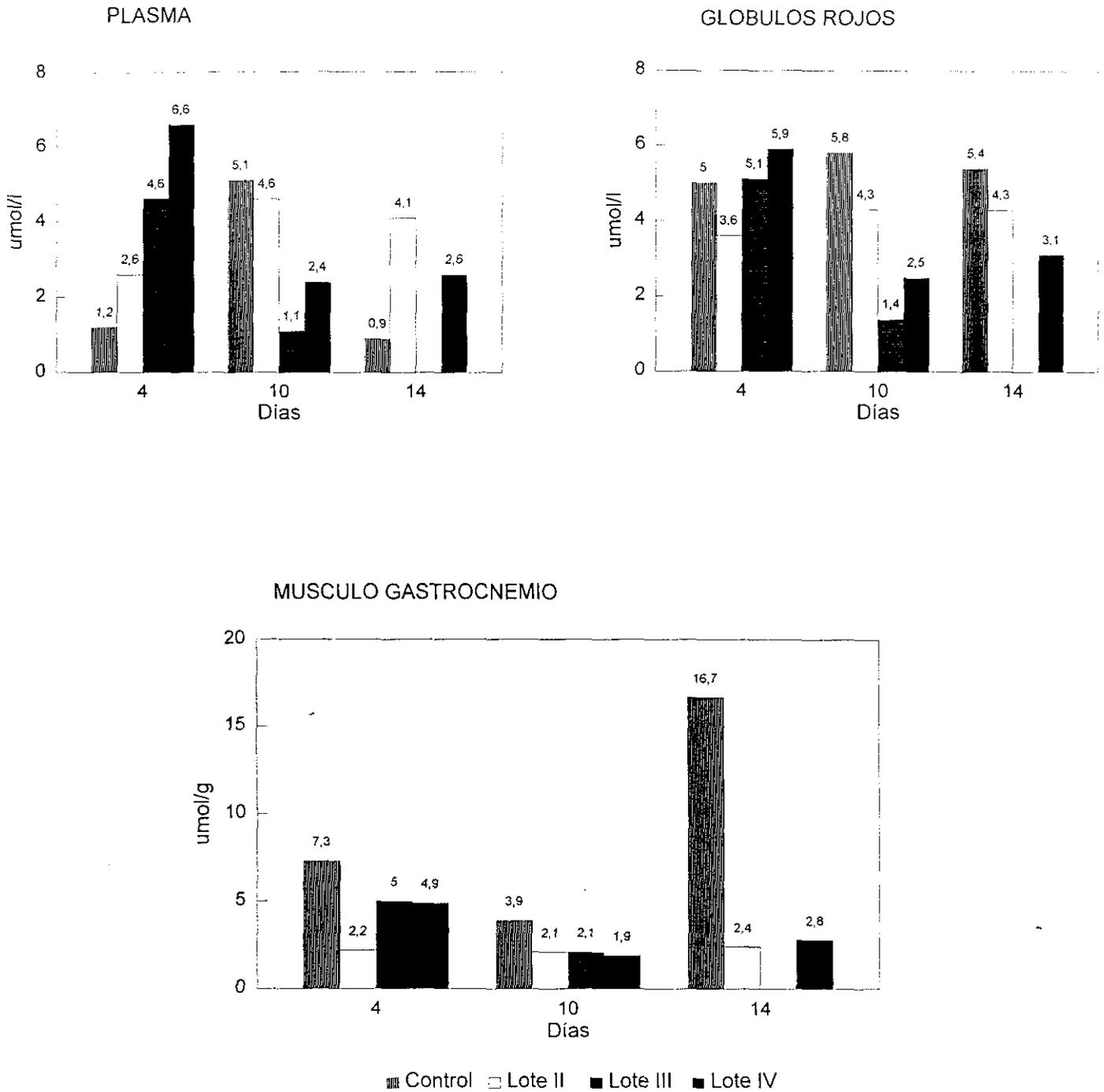
**GRAFICA XXIII:
RELACION DE AMINOACIDOS LIBRES ALA/TYR
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



Control
 Lote II
 Lote III
 Lote IV

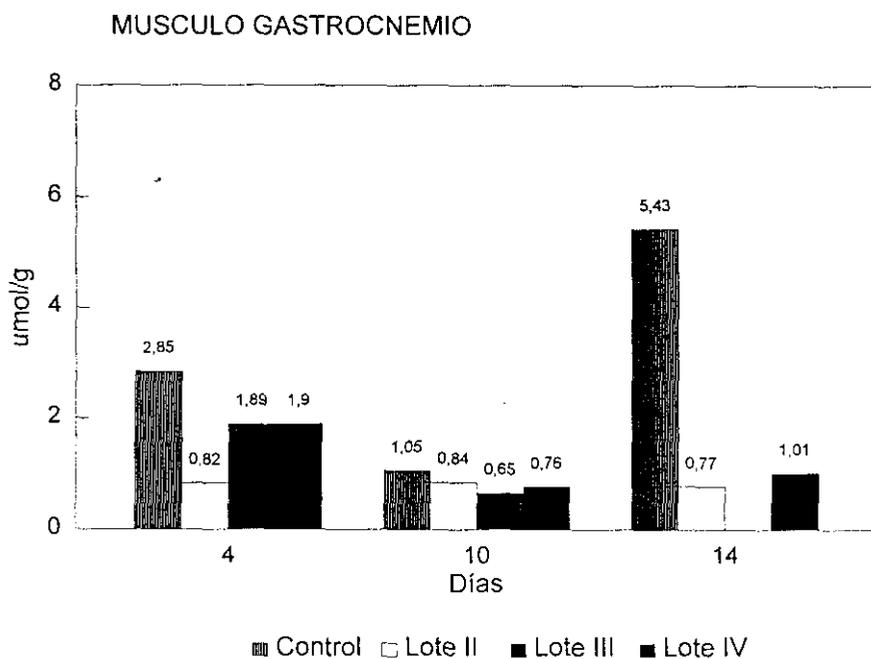
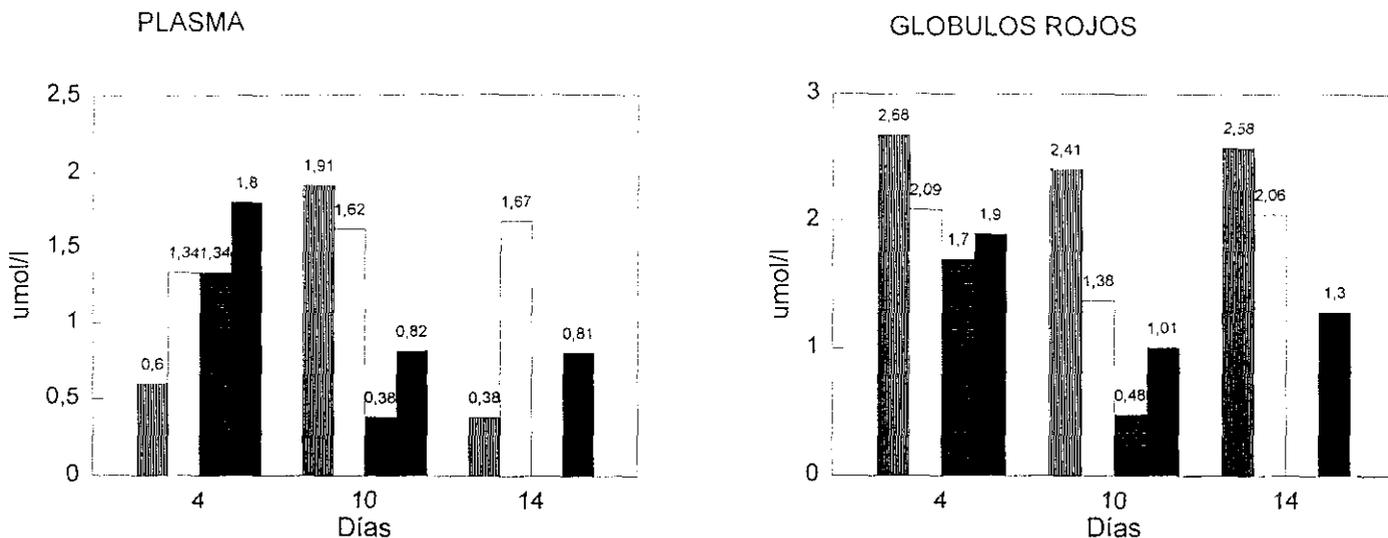
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XXIV:
RELACION DE AMINOACIDOS LIBRES ALA/LEU
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



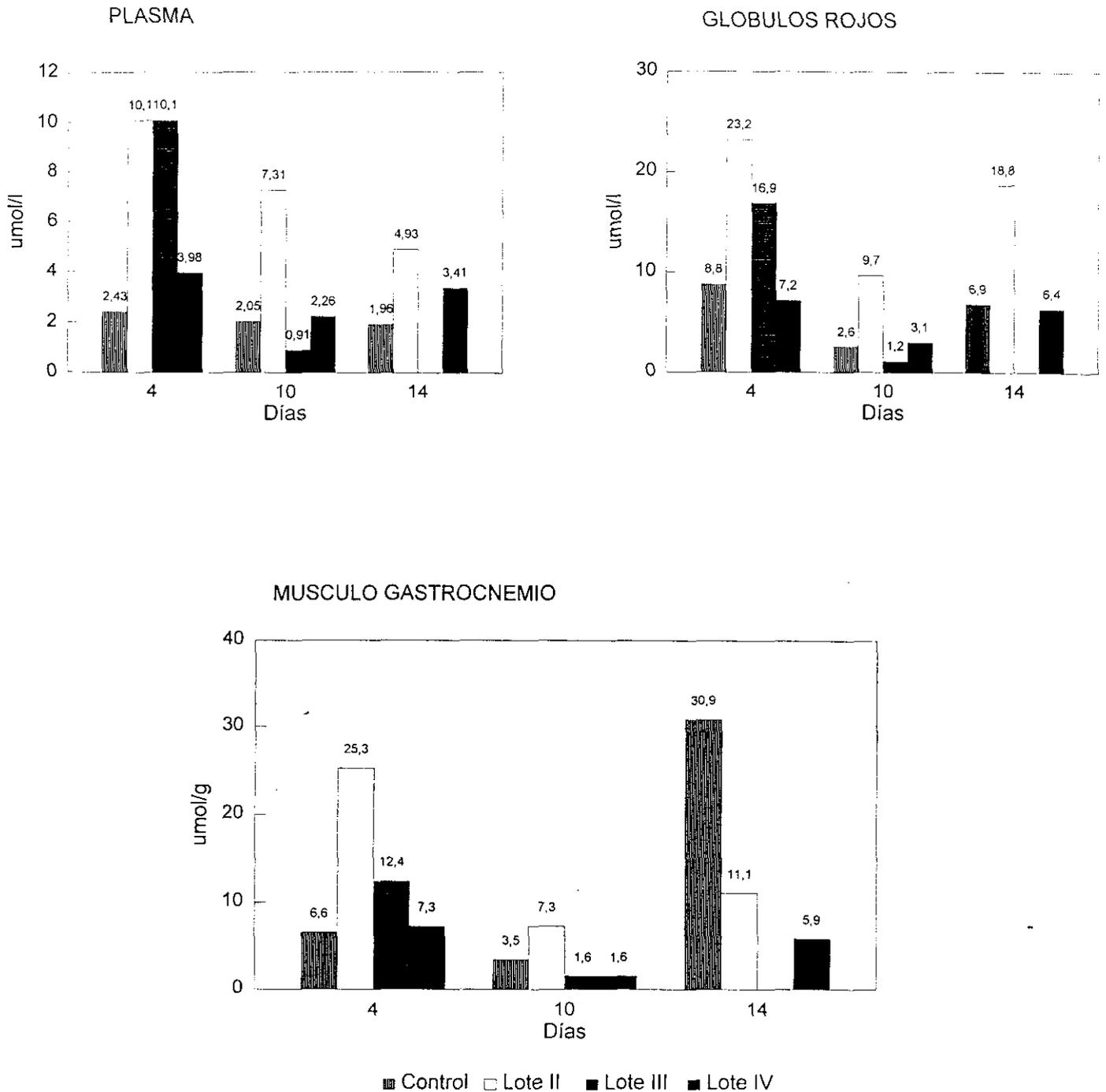
Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XXV:
RELACION DE AMINOACIDOS LIBRES ALA/AAR
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

**GRAFICA XXVI:
RELACION DE AMINOACIDOS LIBRES GLY/VAL
EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS
Y MUSCULO GASTROCNEMIO**



Control (10% proteína) = Lote IV (Ingesta = Lote II)
 Lote II: carente de Phe+Tyr+Trp
 Lote III: carente de Phe+Tyr+Trp y 1/2 de energía

5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

5.1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE PHE+TYR+TRP Y ENERGIA SOBRE LA INGESTA Y PESO CORPORAL.

5.1.1. INGESTA

El contenido proteico y la composición de aminoácidos de la dieta pueden modificar la ingesta y la selección de alimentos. Existen mecanismos que permiten al animal detectar el contenido proteico de la dieta, y éste disminuye la ingesta de dietas deficientes en un aminoácido por su diferente olor y sabor (BOOTH y SIMSON, 1971, 1974). Igualmente, PENG y col. (1974) demostraron que animales alimentados con una dieta con un contenido proteico alto o bajo disminuyen la ingesta de alimentos, al igual que cuando la dieta es deficiente en un aminoácido esencial (ROGERS y LEUNG, 1973). Posteriormente, SEMON y col. (1987) mostraron que las ratas disminuyen su ingesta con dietas que contienen una inadecuada o excesiva cantidad de proteína.

Si bien se desconoce porqué los animales rechazan una dieta deficiente o con desequilibrio de aminoácidos, se considera que se debe a influencias extrahipotalámicas. Los animales *pretenden mantener un patrón equilibrado de aminoácidos plasmáticos y, por tanto, una ingesta normal* (TACKMAN y col., 1990).

La disminución de la ingesta en animales alimentados con una dieta baja en proteína puede considerarse como un mecanismo protector, puesto que una ingesta energética elevada en relación a la proteica, aumenta la severidad de los efectos adversos que conlleva una ingesta proteica inadecuada (HARPER, 1976).

Cuando la ingesta proteica es menor que los requerimientos, los aminoácidos se utilizan primeramente para la síntesis de proteínas tisulares y si la ingesta de proteína supera los requerimientos, los sistemas de síntesis proteica se saturan y los aminoácidos sufren degradación oxidativa.

El contenido proteico de la dieta influye en la ingesta energética, ganancia de peso corporal, eficiencia de la proteína y utilización energética (OKITOLONDA y col., 1988). EDOZIEN y col. (1978) indican que ratas alimentadas con una dieta de bajo contenido proteico reducen voluntariamente su ingesta. La ingesta reducida influye sobre el crecimiento originando una carencia tanto de proteína como de energía.

TEWS y col. (1992) sometieron a ratas a ingestas de un 15% de caseína con diferentes sabores, demostrando que el sabor tiene un papel importante en el total de comida ingerida.

CRACE y col. (1991) alimentaron a ratas con una dieta normal (18% de proteína), con una dieta con restricción proteica (5% de proteína) y con una dieta adecuada en proteína, pero con restricción energética. El aumento del peso corporal fue inhibido tanto por la deficiencia de proteína como por la restricción energética, pero el crecimiento se reanudó cuando a las ratas se les suministró una dieta normal, durante 6 semanas.

En nuestro caso, la administración de una dieta que carece de Phe+Tyr+Trp y esta dieta con restricción energética del 50% a ratas en crecimiento produce una disminución de la ingesta (Tabla 1 y Gráfica II) en ambos lotes carentes con respecto al lote control a lo largo del proceso experimental, siendo de un 53%, 62% y 54% los días 4, 10 y 14 para el lote II y, por diseño experimental, 76% y 80% los días 4 y 10 para el lote III, respectivamente, debido principalmente a la carencia de aminoácidos aromáticos en la dieta. El deterioro físico al que conduce esta situación limita su viabilidad hasta el día 12 del experimento en el lote III.

El mismo efecto se ha observado al administrar parenteralmente a ratas, mezclas de aminoácidos exentas de histidina o treonina (LEUNG y ROGERS, 1969), y al someter a ratas a dietas carentes de proteína (PENG y col., 1974).

Los aminoácidos juegan un papel importante en la regulación de la ingesta mediante la síntesis de neurotransmisores. Una proteína de baja calidad provoca una disminución en la síntesis proteica cerebral, siendo el cerebro más vulnerable en la fase de desarrollo en niños que el del adulto (LAJTHA y col., 1987; CHEREL y LEMAHO, 1991). Se ha relacionado la menor ingesta proteica con una disminución en la concentración de aminoácidos en cerebro (PETERS y HARPER, 1987), lo cual conduce a una alteración en la ingesta por mecanismos asociados al menor contenido en aminoácidos cerebrales (HARPER y col., 1970). HARPER y PETERS (1989) indican que, posiblemente, exista en el cerebro un mecanismo que responda a las variaciones en la proporción de aminoácidos esenciales de la misma, ya que ésta se refleja en un descenso en la concentración en cerebro del aminoácido limitante de la dieta para el crecimiento, y se manifiesta con un descenso de la ingesta. Asimismo, concluyen que existe un control de la ingesta para mantener la concentración de aminoácidos esenciales en el cerebro entre 1.5 y 2.3 nmol/g (PETERS y HARPER, 1985).

BEVERLY y col. (1991) indican que existe un código específico del genoma que transcribe un mRNA capaz de traducir determinadas proteínas que impiden la aversión a una dieta.

El desequilibrio de una dieta en aminoácidos esenciales afecta al genoma, impidiendo la formación de las proteínas codificadas por el citado mRNA y, por consiguiente, provocando un rechazo a la dieta.

5.1.2. PESO CORPORAL

Cuando un animal adulto es expuesto a un nivel bajo de energía, disminuye su peso corporal (WATERLOW, 1990), siendo las variaciones del mismo una de las manifestaciones más importantes de la adaptación a cambios en la dieta y un indicador del estado nutricional (JOLETS y col., 1988).

El crecimiento se debe a que prevalecen los procesos anabólicos sobre los catabólicos (MILLWARD y col., 1975). La privación de aminoácidos esenciales en la dieta provoca una pérdida de peso como consecuencia de la disminución de la síntesis proteica (CARMONA DA MOTA y col., 1990). Algunos estudios que incluyen el uso de isótopos han sugerido que el músculo y el hígado responden de modo diferente a varias condiciones nutricionales (WATERLOW y col., 1978b).

El peso corporal (Tabla 1 y Gráfica I) en los animales alimentados con la dieta control aumentan a lo largo del proceso experimental por tratarse de animales en período de crecimiento. Como consecuencia de la disminución de la ingesta hubo una disminución paralela en el peso corporal en ambos lotes carentes al compararlos con el control, que fué del 15%, 39% y 48% en el lote II, estando de acuerdo con los datos obtenidos por CARMONA DA MOTA y col. (1990), SINGH y col. (1990) y RANA y METHA (1991). La falta de energía en la dieta del lote III hace que haya una disminución del 14% y 45% los días 4 y 10, respectivamente.

De la comparación de los lotes II y IV podemos deducir que la disminución del peso corporal en los animales se debe más a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta que a la disminución de la ingesta que dichos aminoácidos provocan.

Como se puede observar, la disminución de la energía no influye demasiado en la disminución del peso. McDONALD (1990) indica que no hay una relación lineal entre la falta de energía de la dieta y la pérdida de peso. Esta apreciación coincide con la de SOARES y SHETTY (1991), quienes indican que los animales sometidos a carencias energéticas disminuyen su metabolismo basal para así ahorrar energía, mediante un proceso de adaptación.

Todos nuestros datos coinciden con los de TAYLOR y col. (1986), quienes alimentaron a ratas con diferentes cantidades de proteína, observando que la pérdida de peso corporal fué significativamente menor en ratas alimentadas con dietas bajas en proteína, al igual que YAMAGUCHI y col. (1993), quienes *más recientemente demuestran que el descenso en el peso corporal se debe a la restricción en la ingesta.*

Existen estudios previos que muestran una correlación entre el peso corporal y el peso muscular (TAMAKI, 1985; SMITH y col., 1989). Estos resultados sugieren que el aumento en el peso muscular con la edad es debido al aumento en el peso corporal. YAMAGUCHI y col. (1993) también demuestran que el peso muscular aumenta con la edad, mientras que una restricción severa *hace que el peso muscular disminuya.*

En cuanto a la diferencia entre sexos, estudios de GRAYSTONE (1968) y MILLWARD y col. (1975) muestran que el músculo de ratas macho aumenta linealmente desde la semana 3 hasta la 14 hasta llegar a 144 g. Las hembras comienzan con la misma cantidad de masa muscular al nacer, pero la tasa de crecimiento es menos rápida, especialmente después de las 8 semanas de edad. A las 14 semanas de edad, las ratas hembras llegan a un peso de 90 g. Sin embargo, el desarrollo de la masa celular aumenta de igual forma en machos que en hembras hasta la tercera semana. Después, hasta las 9 semanas, aumenta más rápidamente en hembras para igualarse a partir de la semana 13.

5.2. BALANCE DE NITROGENO, UREA, CREATININA Y 3-METILHISTIDINA EN ORINA

5.2.1. BALANCE DE NITROGENO

El balance de nitrógeno tiene como finalidad mantener un equilibrio entre la ingesta proteica y energética y el contenido proteico del animal. La respuesta adaptativa a dietas bajas en proteínas hace que la pérdida de nitrógeno sea menor, con el objeto de mantener la masa proteica corporal (WATERLOW, 1986). Sin embargo, se ha visto una mayor influencia de la ingesta energética en este parámetro (CHEREL y LEMAHO, 1991). Si la deficiencia calórica no es muy grande y hay una reserva proteica adecuada, la pérdida inicial de nitrógeno corporal no es muy rápida y el animal se va adaptando a una ingesta calórica reducida, disminuyendo su actividad

catabólica y tendiendo hacia un equilibrio del balance de nitrógeno (MORRISON y NARAYANA RAO, 1967) y a una síntesis proteica adecuada (GARLICK y col., 1980).

Si la dieta carece de proteínas y el contenido energético es bajo (GARLICK y col., 1980), se produce un aumento del catabolismo de la grasa y proteínas lábiles de reserva, dando lugar a un balance de nitrógeno negativo y el animal muere.

El balance de nitrógeno disminuye con dietas deficitarias en aminoácidos esenciales. Así, al someter a ratas a una dieta control y a otra con baja calidad de proteína, se observa que en esta última el balance de nitrógeno disminuye.

ROSE (1957) realizó estudios de balance de nitrógeno en hombres voluntarios adultos y sanos que fueron alimentados con dietas deficientes en uno o más aminoácidos. Estos estudios definieron un grupo de ocho aminoácidos, de tal forma que cuando uno de esos aminoácidos fueron suprimidos de la dieta, los voluntarios rápidamente tenían un balance de nitrógeno negativo. Estos aminoácidos esenciales para mantener la salud en el adulto son: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina.

Posteriormente, JACKSON (1983) realizó una clasificación de los aminoácidos siendo histidina, isoleucina, leucina, metionina, valina, fenilalanina y triptófano de esqueleto carbonado esencial, puesto que el esqueleto carbonado de estos aminoácidos no pueden ser sintetizados por los humanos, pero pueden ser sintetizados por transaminación a partir de sus ketoácidos o hidroxiaácidos análogos. La deficiencia de estos aminoácidos se manifiesta por un rápido balance de nitrógeno negativo.

Las pérdidas más altas de nitrógeno corporal se han encontrado en ratas alimentadas con dietas carentes de aminoácidos azufrados seguidas, en orden decreciente, por dietas carentes en valina, treonina, isoleucina, triptófano, aminoácidos aromáticos, leucina y lisina (HEGER y FRYDRYCH, 1985).

Análisis en tejidos de animales, tales como el hígado y el músculo, confirman que casi todo el nitrógeno presente en estos órganos está en forma de proteína, con sólo una pequeña cantidad (1-2%) en forma de aminoácidos libres o péptidos. Una cantidad igualmente pequeña está en forma de ácidos nucleicos y nitrógeno de fosfolípidos y, en el caso del músculo, como creatinina y los dipéptidos carnosina y anserina.

En este experimento, el balance de nitrógeno (Tabla I y Gráfica II) en los lotes control a lo largo del proceso experimental no varía. Sin embargo, el suministro de dietas carentes de Phe+Tyr+Trp y esta dieta con la mitad de energía producen una disminución significativa del

balance de nitrógeno a lo largo del período experimental, llegando a ser negativa el día 10 con respecto a los grupos control en ambos lotes carentes. El día 4 disminuye en ambos lotes carentes en un 68% y 78%, respectivamente. El día 10, el descenso encontrado fué del 131% para el lote II y del 108% para el lote III. Los resultados obtenidos se deben más a la falta de aminoácidos aromáticos y a la deficiencia energética en la dieta que a la disminución de la ingesta, como podemos deducir al comparar los lotes II y IV.

Se pueden resumir los resultados expresados en la tabla 1 que la falta de aminoácidos aromáticos y el déficit energético del 50% con respecto a la dieta control disminuye la ingesta, el peso corporal y el balance de nitrógeno.

5.2.2. UREA Y CREATININA EN ORINA

La urea es el principal compuesto nitrogenado procedente del catabolismo de los aminoácidos y los defectos en su producción reflejan las alteraciones en la ingesta proteica dietaria y en el patrón de utilización de aminoácidos, siempre que no esté comprometida la función renal. La concentración plasmática de urea se relaciona con la síntesis de la misma. En este sentido, se ha señalado en ratas (BOOTH y SIMSON, 1971, 1974) y rumiantes (LEUNG y ROGERS, 1969) una relación directa con la ingesta proteica e inversa con la calidad de la proteína.

Cuando existe una adaptación larga al ayuno, disminuye tanto el turnover de glucosa como la gluconeogénesis hepática a partir de aminoácidos disminuyendo, por tanto, la excreción de urea por orina.

Durante los 2 ó 3 primeros días de adaptación en humanos, aumenta la liberación de aminoácidos del músculo, aumentando la proteólisis muscular para suministrar sustrato para la gluconeogénesis hepática. Así, hay un aumento de la gluconeogénesis (reflejado por un aumento en la producción de urea) y de la proteólisis muscular (medida como un aumento de la excreción de 3-metilhistidina), según GIESECKE y col. (1989).

En este experimento, se observa (Tabla 2 y Gráfica II) que la producción de urea en orina aumenta en el lote control a lo largo del período experimental, siendo este aumento del 130% al comparar los días 4 y 14 de la experiencia. Al someter las ratas a una dieta deficiente de aminoácidos aromáticos (Phe+Tyr+Trp) y esta dieta con una restricción energética del 50%, se observa un aumento en el lote II los días 4, 10 y 14 del 302%, 263% y 155% con respecto al control, así como en el lote III los días 4 y 10 de un 539% y 196%, respectivamente.

De estos resultados podemos concluir que el aumento en la producción de urea en los animales tratados con ambas dietas carentes se debió más a la falta de aminoácidos aromáticos que a la disminución de la ingesta, si bien al final del experimento la disminución de la ingesta afectó ya significativamente a la producción de urea. Estos resultados reflejan, o una inhibición de la síntesis proteica, o un aumento de la proteólisis muscular ya que ambas proporcionan sustratos aminoacídicos para la gluconeogénesis hepática, como se indicó anteriormente.

La creatinina en orina es la forma en que se elimina la creatina. Después de ser sintetizada en el hígado, se deposita en el músculo en forma de fosfato de creatina, molécula que almacena energía y la libera en forma de ATP, en caso necesario.

La excreción de creatinina ha sido utilizada para medir la masa muscular total. GRAYSTONE (1968) demostró la elevada correlación existente entre la masa muscular libre de grasa y los niveles de excreción de creatinina por orina.

Dicha excreción varía dependiendo de la masa muscular. Si esta masa disminuye en estados de malnutrición, infección o trauma (SANTIDRIAN, 1981), es menor la excreción renal de creatinina.

Así, pues, puede decirse que la excreción de creatinina en orina es un índice de la masa muscular o masa corporal magra, y es un indicador sensible de la deplección proteica. Por tanto, si la masa corporal magra disminuye como consecuencia de la deficiencia de proteína dietaria, la eliminación de creatinina por orina disminuye (RETTMER, 1993).

En este experimento, se observa en la orina (Tabla 2) en el lote control un aumento significativo los días 10 y 14 con respecto al día 4 de un 97% y 126%, respectivamente. Al comparar ambos lotes carentes con el control, se observa una disminución del contenido de creatinina en orina al final de la experiencia, el día 14 para el lote II (35%) y el día 10 para el lote III (60%). Este efecto observado puede ser debido a una menor masa muscular, consecuencia de la disminución de la ingesta y del peso muscular en ambos lotes carentes (Tabla 4).

5.2.3. 3-METILHISTIDINA EN ORINA

La 3-metilhistidina está integrada en la actina y miosina de las fibras musculares (JOHNSON y PERRY, 1970). Se forma por modificaciones translacionales de ciertos residuos de histidina de la cadena polipeptídica (YOUNG y col., 1972). Después de la liberación durante la degradación proteica, la 3-metilhistidina no puede ser reutilizada para la síntesis proteica en el

músculo, puesto que el tRNA específico para este aminoácido es deficiente (YOUNG y col., 1972). Se considera que no se metaboliza y que es rápidamente excretada por orina (LONG y col., 1975).

La metilación de la histidina en la actina y miosina ocurre sólo después de que la actina y la miosina hayan sido sintetizadas en el músculo. Cuando la proteína miofibrilar es catabolizada, la 3-metilhistidina es excretada por orina y proporciona un índice de medida de la degradación de la proteína muscular. El músculo es el reservorio de la 3-metilhistidina en el organismo, y es excretada por orina en un período corto de tiempo (MUNRO y CRIM, 1988).

Puesto que más del 90% del "pool" de 3-metilhistidina está localizada en el músculo esquelético, la excreción urinaria de 3-metilhistidina es consecuencia del catabolismo de la proteína miofibrilar y se ha asociado en múltiples estudios con pérdida de nitrógeno (BALLARD y TOMAS, 1983).

Los aminoácidos que se liberan durante el catabolismo intracelular de las proteínas pueden ser reutilizados para la síntesis proteica de la célula, llamado reciclaje aminoacídico intracelular, o pueden ser transportados a otros órganos donde entran en las rutas de anabolismo proteico, llamado reciclaje intercelular (SCHOCH y col., 1990). El reciclaje de aminoácidos es un *proceso normal e importante en la economía de los aminoácidos del organismo y varía con el estado nutricional.*

Para el estudio del catabolismo proteico se necesita un aminoácido que no esté sujeto a otra vía metabólica diferente a la del catabolismo proteico en los diversos estados fisiológicos y patológicos y que sea aplicable a estudios en humanos. Así, se ha estudiado la utilidad potencial de la 3-metilhistidina como indicador del catabolismo proteico muscular "in vivo" en animales de experimentación y en humanos (YOUNG y MUNRO, 1978).

Sin embargo, se ha demostrado que la dieta puede afectar a la tasa de eliminación de la 3-metilhistidina. Así, GARLICK y col. (1975) y MILLWARD y col. (1976), utilizando infusiones continuas de aminoácidos marcados isotópicamente, han demostrado grandes alteraciones en las tasas de síntesis y de catabolismo proteico en el músculo como respuesta a los cambios en el aporte de proteína y energía de la dieta, así como con alteraciones del balance hormonal.

Una dieta restringida en proteína produce un descenso rápido de la pérdida de 3-metilhistidina, aumentando después de una realimentación (HAVERBERG y col., 1975b). Sin embargo, GARLICK y col. (1975) observan que una ingesta restringida lleva a una disminución del catabolismo proteico muscular rápida y progresivamente. No se conoce la razón de estas diferentes observaciones. Más tarde, YOUNG y MUNRO (1978) observaron que una dieta con restricción tanto *proteica como energética produce una disminución en la eliminación de 3-metilhistidina, y es mayor*

durante la primera fase de una replección nutricional. Sin embargo, al continuar la rehabilitación, aumentaba la eliminación del aminoácido.

La excreción de 3-metilhistidina en niños con malnutrición (kwashiorkor y marasmo) es menor que en niños bien nutridos de la misma edad (NARASHINGA RAO, 1985). YOUNG y MUNRO (1978) estudiaron la recuperación en niños con malnutrición proteico-energética, observando que la eliminación de 3-metilhistidina es baja al principio de la recuperación, pero si continúa hay un aumento progresivo, lo cual implica un aumento en el "turnover" proteico muscular. Ellos concluyen que la síntesis de proteína está disminuida en animales alimentados con dietas carentes en proteína y, posiblemente, en los niños malnutridos la menor tasa de catabolismo proteico muscular puede tomarse como una adaptación, favoreciendo el mantenimiento del balance entre la síntesis y el catabolismo en este tejido.

Estudios en rata han demostrado que la 3-metilhistidina de la región esplácnica constituye el 20-40% de la excreción urinaria total de la 3-metilhistidina en situación normal (MILLWARD y col., 1983a), pero más recientemente, SJOLIN y col. (1989), han observado que menos del 10% de la excreción urinaria de 3-metilhistidina se origina a partir de la región esplácnica y que el músculo esquelético es la fuente principal.

Se ha demostrado en la rata que hay un metabolismo extenso y dependiente de la edad de 3-metilhistidina a su derivado N-acetilado y que es necesaria una hidrólisis ácida de la orina antes del análisis de la 3-metilhistidina (YOUNG y col., 1972).

En este experimento, al someter las ratas a dietas deficientes de Phe+Tyr+Trp y esta dieta con un 50% menos de energía (Tabla 2) no se observaron variaciones importantes durante la experiencia. Únicamente el día 10 hay un aumento de la 3-metilhistidina urinaria en el lote II (184%) con respecto al control y una disminución en el lote III el día 10 con respecto al día 4 (82%). Si se comparan los lotes II y IV se observa un aumento el día 10 y una disminución el día 14 en el contenido de 3-metilhistidina; este aumento el día 10 es debido a la disminución de la ingesta y no a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta. Estas observaciones concuerdan con las de HAVERBERG y col. (1975b), ya que la restricción de energía produce un mantenimiento o incluso un ligero aumento de la eliminación de 3-metilhistidina el día 4 y disminución el día 10, tal vez porque el turnover proteico está aumentado el día 4 y el día 10 la pérdida de proteína es tan grande que la eliminación de 3-metilhistidina se reduce.

5.3. COLESTEROL, GLUCOSA, INSULINA Y RELACION INSULINA/GLUCOSA PLASMATICOS

5.3.1. COLESTEROL

La homeostasis del colesterol depende de la interacción entre la edad, el "turnover" de colesterol y la calidad y cantidad de la proteína dietaria (GIBNEY, 1982; SUGANO, 1983).

Al aumentar la edad del individuo, el turnover del colesterol se reduce, dando lugar a una elevación del nivel de colesterol sérico (KRITCHEVSKY, 1980). El efecto de la calidad y cantidad de la proteína dietaria sobre el metabolismo del colesterol parece depender del colesterol dietario (EKLUND y SJOBLOM, 1986). A esto se añade el hecho de que la proteína de la dieta modifica la producción de ácidos grasos (fosfolípidos y eicosanoico) en los tejidos (SUGANO y col., 1988).

En este trabajo se pretende detectar el efecto que produce sobre el metabolismo del colesterol la administración de dietas carentes de aminoácidos aromáticos. Estas dietas que están libres de colesterol y están constituidas por una mezcla de aminoácidos cristalinos carentes de Phe+Tyr+Trp, producen un efecto hipocolesterolémico como puede apreciarse en la Gráfica III.

El colesterol plasmático (Tabla 3) no varía en los lotes control a lo largo del período experimental. Al observar el efecto producido por ambas dietas carentes, se aprecia que hay una disminución de los niveles de colesterol plasmático al final de la experiencia en ambos grupos carentes, el día 14 para el lote II y el día 10 para el lote III (32% y 44%, respectivamente), respecto al grupo control. Esta disminución observada en ambos lotes se debe tanto a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta como a la disminución de la ingesta, como puede apreciarse al comparar los lotes II y IV el día 14. En el lote III, la disminución del colesterol se debe principalmente a la reducción energética de la dieta. La disminución observada en ambos lotes carentes se debe más a la restricción energética impuesta que a la falta de aminoácidos aromáticos y disminución de la ingesta que padecen los animales.

Finalmente, hay que destacar la correlación observada por SUGANO y col. (1983) entre la concentración de insulina plasmática y el nivel de colesterol sérico. El descenso encontrado en ambos parámetros en nuestro trabajo apoyan esas observaciones.

5.3.2. GLUCOSA, INSULINA Y RELACION INSULINA/GLUCOSA

La malnutrición severa produce intolerancia a la glucosa, debido a un descenso en la secreción de insulina o a la resistencia a esta hormona (SMITH y col., 1975). También PUGLIESE (1990) señala que tanto la glucosa como la insulina disminuyen en sangre por malnutrición o ayuno.

A pesar de que la malnutrición crónica se ha asociado con hipoglucemia (SLONE y col., 1961) el diseño experimental al que se someten estos animales (menor duración e intensidad del tratamiento), permiten el mantenimiento de niveles plasmáticos de glucosa similares a los presentados en el mismo día por el lote control (Gráfica III).

La baja respuesta de insulina para la carga de glucosa está igualada en ratas restringidas en alimentos por una tolerancia normal a la glucosa (ESCRIVA y col., 1992). Estos datos concuerdan con OKITOLONDA y col. (1987) y se podría explicar por un aumento en la sensibilidad a la insulina por estas ratas con restricción dietaria (OKITOLONDA y col., 1988; ESCRIVA y col., 1990).

Las rutas metabólicas que contribuyen a la producción de glucosa son probablemente diferentes en los controles (glucogenólisis principalmente) y en ratas con restricción de alimento (principalmente gluconeogénesis) y se ha propuesto que la gluconeogénesis es menos sensible a la inhibición de la insulina que la glucogenólisis (CHIASSON y col., 1976).

En la tabla 3 y en la Gráfica III se observa que los niveles de glucosa en plasma no sufren variación a lo largo del proceso experimental en el lote control. En el lote II hay un descenso del 28% el día 14. Este descenso no es muy drástico debido a la glucogenólisis de las reservas del glucógeno hepático y muscular, que por transaminación de los aminoácidos de cadena ramificada producen glutamina y alanina, siendo transportados al hígado y siendo fuente la alanina como sustrato para la gluconeogénesis y la glutamina como producto detoxificante del amoníaco (FELIG y col., 1970), además de un mayor contenido de hidratos de carbono y grasas en la dieta de este lote:

La disminución de la glucosa que se produce en ambos lotes carentes, pero sobre todo en el lote III el último día del proceso experimental, es debido al agotamiento del glucógeno hepático y de las reservas proteicas musculares que no pueden suministrar los aminoácidos gluconeogénicos suficientes para mantener la glucemia en los niveles normales; por ello la mortalidad de los animales es muy grande, sobre todo a partir del día 12.

ESCRIVA y col. (1992) demostraron que en ratas con restricción en la ingesta de alimentos, la respuesta a la secreción de insulina disminuye. Puede ser debido a cambios en la ultraestructura en las células beta del páncreas (WEINKOWE y col., 1977) o a un aumento en la concentración de somatostatina que YOUNOSZAI y DIXIT (1980) encontraron en ratas con deficiencia proteica.

La malnutrición proteico-calórica puede inducir un daño persistente en las células beta del páncreas, con un progresivo deterioro de su función (ESCRIVA y col., 1992).

La insulina favorece la entrada de aminoácidos en las células, la síntesis proteica y la tasa de RNA y DNA en músculo, aún en ausencia de glucosa; disminuye la gluconeogénesis hepática, aminora los requerimientos hepáticos de aminoácidos y la liberación de aminoácidos por el músculo. Con falta de insulina decrece la formación de polisomas, y los ribosomas traducen peor los mRNA con deterioro de la síntesis proteica (FLAKOLL y col., 1989).

En nuestro experimento, los niveles de insulina plasmática (Tabla 3 y Gráfica III) no varían en el lote control a lo largo del período experimental. Sin embargo, en ambos lotes carentes se produce una marcada disminución para el lote II del 70%, 77% y 84% los días 4, 10 y 14 respectivamente; para el lote III, la disminución observada fue del 73% y 82% los días 4 y 10 respectivamente. Estos resultados están en concordancia con los observados por otros autores (MUÑOZ-MARTINEZ y col., 1992) y se deben por igual a la disminución de la ingesta y a la falta de Phe+Tyr+Trp y energía en la dieta; la disminución es más efectiva por la falta de Phe+Tyr+Trp y menor energía de la dieta.

Debido a las acciones opuestas de la insulina y del glucagón en el hígado, ya que la glucosa suprime la secreción de glucagón, mientras que estimula la secreción de insulina, UNGER (1985) sugirió que la relación molar insulina/glucosa, mejor que la concentración de cada hormona por separado, gobierna la homeostasis, en su conjunto, de la glucosa. Mientras que la administración de glucosa normalmente suprime la secreción de glucagón, la hipoglucagonemia no es necesaria para una normal disposición de glucosa, con tal que la secreción de insulina sea normal (SHERWIN y col., 1976).

La disminución de la glucosa que se observa en ambos lotes carentes, sobre todo en el lote III y la disminución de la insulina que se produce más drásticamente, hace que la relación insulina/glucosa (Tabla 3), índice que determina la sensibilidad de las células beta a la glucosa, sea poco importante al final de la experiencia en el lote II y no varía en el lote III, debido a una falta de sensibilidad por la baja concentración de glucosa y al deterioro de las células beta para secretar insulina. La disminución de esta relación también es remarcada por HEARD y col. (1977) en ratas

jóvenes alimentadas con dietas bajas en proteínas, considerando la disfunción de las células beta del páncreas como posible responsable de este resultado. WANG y col. (1988) observaron una asociación entre la edad y una situación de restricción energética como un descenso importante de la tolerancia a la glucosa debido, probablemente, a una menor sensibilidad de las células beta del páncreas y a una mayor sensibilidad de los tejidos periféricos, de ahí la disminución de los niveles de glucosa en sangre el día 10 en el lote III.

5.4. EFECTO DE LA CARENCIA DE PHE+TYR+TRP Y PHE+TYR+TRP Y ENERGIA SOBRE EL CRECIMIENTO MUSCULAR

5.4.1. MODIFICACIONES EN EL PESO DEL MUSCULO GASTROCNEMIO Y PROTEINA SOLUBLE DEL MISMO

La deficiencia dietaria de proteína y energía influye sobre el peso del animal, dependiendo de la edad, calidad de la proteína y el tiempo de administración de la dieta (CHEREL y LE MAHO, 1991), *de forma que cuanto menor sea la edad del animal, mayor será el efecto de la alteración nutricional en su organismo.*

Los estudios de MERTZ (1972) indican que, en caso de malnutrición, el organismo reserva los tejidos con mayor tasa metabólica (tejidos viscerales excepto el hígado, en el que disminuye el contenido proteico aún teniendo un alto metabolismo), degradando con mayor rapidez los tejidos con una tasa metabólica lenta, como son el músculo y la piel, que al mismo tiempo son los más abundantes (MURILLO y col., 1991).

El crecimiento se produce en una primera fase por aumento de la síntesis de DNA y de proteínas, representando una mayor división celular y aumento del número de células. El tamaño de estas células se mantiene constante, denominándose a este proceso hiperplasia. En la siguiente fase las células se dividen más lentamente, reflejando una disminución en la síntesis de DNA. Las proteínas se siguen formando en una proporción más elevada, aumentando el volumen de la célula; a esta fase se denomina hipertrófica y en ella, la relación proteína /DNA aumenta. En la rata esta hipertrofia aparece a partir del día 90 (MUNRO, 1964).

Si durante la hiperplasia se administra una dieta carente, el número de células se reduce ya que la división celular es más lenta. En consecuencia, se produce una disminución en el contenido de DNA, RNA, enzimas, síntesis proteica, tamaño celular y peso del órgano (SINGH y col., 1990). Estas alteraciones son irreversibles, incluso con el suministro posterior de una dieta adecuada. Si la dieta carente se administra en la fase hipertrófica, es decir, tras los primeros 90 días de vida de la rata, se recupera el crecimiento con una dieta adecuada.

Al igual que sucedió con el peso corporal, ocurre con el peso del músculo gastrocnemio que aumentó en el lote control (Tabla 4 y Gráfica IV) desde el día 4 al 14, siendo del 40% y del 58% los días 10 y 14 con respecto al día 4. En cambio, en ambos grupos carentes hubo una reducción del peso muscular, siendo al final de la experiencia del 46% para el lote II el día 14 y del 48% en el lote III el día 10.

El aumento del peso muscular del lote control a lo largo de la experiencia se debe a que son ratas en período de crecimiento. Además, el crecimiento muscular está relacionado con modificaciones en la síntesis y degradación proteica, predominando la primera en relación con la segunda, y coincidiendo con las variaciones paralelas en las concentraciones libres de insulina y de triyodotironina (T_3) (JEPSON y col., 1988).

Como se puede observar, la ingesta energética no tiene una clara influencia en el crecimiento muscular, que es estimulado por el contenido proteico de la dieta con incremento del contenido de RNA, de acuerdo con los datos de JEPSON y col. (1988). Tanto la insulina como la T_3 tienen un efecto positivo en el turnover proteico muscular; la insulina estimula la actividad del RNA, bajos niveles de T_3 estimulan el contenido de RNA y altos niveles incrementan la proteólisis.

Estos datos coinciden con los de MARTINEZ y col. (1987), quienes encuentran una disminución en el peso del músculo gastrocnemio en ratas alimentadas con proteína de baja calidad, debido a una disminución de la síntesis proteica. Esta disminución se debe a la reducción de la actividad del RNA muscular (proteína/RNA), según FONG y col. (1989).

El peso relativo del músculo gastrocnemio (Tabla 4) no varía durante el proceso experimental en los diferentes grupos ni al comparar los grupos carentes con el control los distintos días del experimento. La respuesta general del músculo a la carencia de Phe+Tyr+Trp y esta dieta con un 50% de restricción energética, es una reducción de la síntesis proteica que va acompañada de una disminución de la proteólisis, que es menor en ratas con restricción energética (MILLWARD y col., 1976). Por ser el peso del músculo gastrocnemio un buen representante de las variaciones de la masa muscular, en general, afecta al peso del animal de forma paralela, por lo que el peso relativo no se modifica.

Un prerrequisito esencial para la utilización de proteína extracelular es su degradación. Las proteínas extracelulares pueden entrar en la célula por endocitosis y ser degradadas por las proteasas lisosomales (MORTIMORE y POSO, 1984). Otra posibilidad de degradación de las proteínas plasmáticas se debe a las proteinasas asociadas a las membranas celulares, degradando péptidos en su superficie (BEYNON y BOND, 1986).

El contenido proteico soluble muscular (Tabla 4 y Gráfica IV) no varía en el lote control y disminuye en los lotes carentes, siendo esta disminución de un 68% y 60% en los lotes II y III el día 4; de un 45% y 38% en los lotes II y III el día 10 y de un 53% el lote II el día 14 con respecto al lote control esos días. Estos datos coinciden de nuevo con los de MARTINEZ y col. (1987) y JEPSON y col. (1988), en donde observan una menor síntesis proteica en ratas alimentadas con dietas de baja calidad. Al comparar los lotes II y IV que diferencian el efecto de la dieta carente de aminoácidos aromáticos con el efecto de la disminución de la ingesta, ambos lotes provocan por igual la disminución del contenido proteico soluble, e igualmente sucede por la reducción del contenido energético.

5.4.2. MODIFICACIONES PRODUCIDAS EN EL CONTENIDO DE DNA, NUMERO DE NUCLEOS, TAMAÑO CELULAR, ACTIVIDAD ENZIMATICA DNAsa ACIDA POR ORGANO Y POR mg DE PROTEINA Y RELACION DNAsa/DNA

En el músculo de animales en periodo de crecimiento se observa un aumento en el contenido de DNA. La malnutrición disminuye la cantidad de ácidos nucleicos (SINGH y col., 1990). Tanto el déficit proteico como el proteico-energético modifica la síntesis del DNA, RNA y la capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) en músculo, interviniendo como moduladores algunas enzimas lisosomales, la tasa de insulina, corticoides, somatotropa, tiroxina y la concentración de aminoácidos libres en plasma.

Cuando las concentraciones de aminoácidos son bajas en ratas que son alimentadas con dietas bajas en proteína, la aminoacil-tRNA sintetasa funciona en el músculo con una baja actividad. En el músculo, la síntesis proteica está deprimida como consecuencia de la baja ingesta proteica y los factores de iniciación en unión a la subunidad 40S ribosomal son muy bajas (FLAIM y col., 1982). Esto sugiere que la baja capacidad de iniciación de la síntesis proteica es un mecanismo adaptativo a la carencia de aminoácidos, produciéndose también una disminución de la proteólisis con una reducción de los procesos lisosomales y no lisosomales ATP-dependientes.

Aunque los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano no son metabolizados en el músculo, sí son utilizados en la síntesis proteica del mismo.

La tasa de DNA en músculo gastrocnemio no se modifica en el grupo control a pesar de ser ratas en período de crecimiento (Tabla 5 y Gráfica V). Lo mismo sucede en los lotes II y III los distintos días, aunque se aprecia una ligera disminución frente al control el día 4 en ambos lotes carentes. La ligera disminución ese día en los lotes II y III se debe a un aumento de la degradación por mayor actividad DNAsa por mg de proteína e inhibición de la síntesis. Este efecto es mayor por la deficiencia energética impuesta que por la falta de aminoácidos aromáticos en el dieta.

En estudios en donde se restringe la proteína y la energía en la dieta, se inhibe la síntesis de DNA en el músculo, y la síntesis de DNA es más sensible a la deficiencia proteico-energética que a la proteica. No obstante, no se observa pérdida de DNA en estas condiciones experimentales, resultados que concuerdan con los de TRENKLE (1974).

Numerosos estudios han descrito el efecto de la malnutrición sobre el crecimiento del músculo esquelético en la rata. La malnutrición durante el período de crecimiento, provoca una disminución de la tasa de síntesis de DNA en el músculo esquelético (HOWARTH, 1972). En el músculo de ratas jóvenes alimentadas con una dieta baja en calorías y proteínas, HILL y col. (1970) encontraron una marcada reducción tanto en el contenido de DNA como en la fracción proteína/DNA (tamaño celular). Por el contrario, cuando a los animales se les restringe las calorías pero la dieta tiene un contenido proteico adecuado, hay una menor reducción en el crecimiento muscular o en el número de núcleos. En estos animales, la fracción proteína/DNA es normal, e incluso la reducción de la ingesta calórica puede afectar a la replicación del DNA, pero la reducción de calorías y proteínas tiene efectos más serios en la síntesis intracelular de proteínas.

HOWARTH (1972) muestra que la acumulación total de DNA en el músculo gastrocnemio está directamente relacionado con el contenido proteico de la dieta, y no se observa aumento en el DNA muscular durante los 14 días en los que las ratas fueron sometidas a una dieta libre de proteína, aunque el tamaño celular está disminuido. Estos resultados han sido posteriormente confirmados por NNANYELUGO (1976).

Las fases del crecimiento muscular comienzan por una fase de hiperplasia simple, con un incremento proporcional del peso, contenido proteico y de DNA. El número de células aumenta, mientras el tamaño de las células individuales no cambian. Esta fase finaliza cuando la tasa de síntesis neta de DNA comienza a enlentecerse, mientras que el peso y el contenido proteico continúan aumentando en la misma proporción, resultando una fase transicional de hiperplasia e hipertrofia concomitantes, la cual dura hasta la parada de la síntesis neta de DNA. Después, el

crecimiento es más bien por hipertrofia. Finalmente, cuando el peso se estabiliza y se detiene la *síntesis neta de DNA*, el crecimiento termina (WINICK y NOBLE, 1965).

En cuanto al número de núcleos (Tabla 5 y Gráfica V), no se observa ninguna variación significativa a lo largo de todo el proceso experimental en los 3 lotes, ni al comparar los lotes carentes frente al lote control los distintos días (normoplasia), siguiendo la misma tendencia que el DNA.

Respecto al tamaño celular o unidad de masa por célula (Tabla 5), en el lote control no se modifica significativamente. Al comparar el efecto de ambas dietas carentes con el de la dieta control, el tamaño celular no varía en el lote II. En el lote III hay un descenso significativo el día 10 respecto al día 4 (100%). Este efecto se debe a la disminución del peso del músculo a lo largo del proceso experimental como consecuencia de la deficiencia de aminoácidos aromáticos en la dieta.

La actividad DNAsa (Tabla 6 y Gráfica V) aumenta en el lote control a lo largo de la experiencia por órgano, pero no por mg de proteína, mientras que en el grupo II aumenta tanto por órgano como por mg de proteína el último día de la experiencia. En el lote con déficit energético disminuye, aunque no de forma significativa.

Si se comparan con el control los efectos de las dietas carentes de aminoácidos aromáticos sobre la actividad DNAsa ácida, solamente aumenta por mg de proteína (Tabla 6) el día 4 en un 268% y 225% ese mismo día por déficit energético, afectando por igual la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta, la disminución de la ingesta y la falta de calorías en la dieta. Estos valores se igualan al control el día 10.

La actividad DNAsa por célula muscular (DNAsa/DNA) aumenta al final de la experiencia en el lote II y disminuye en el lote III (Tabla 6). Si se comparan ambos lotes carentes en los distintos días frente al control, tiende a aumentar dicha actividad en el lote II y disminuye por déficit energético en el lote III, debido a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta en el primer caso, y a la falta de aminoácidos aromáticos y energía en el segundo, aunque los valores estudiados no son significativos en estas condiciones experimentales.

No obstante, ARRUDA VEIGA y col. (1992) observan que la malnutrición proteico-calórica en el período de crecimiento causa una reducción drástica del peso corporal, contenido de DNA, RNA y proteínas, reduciéndose el tamaño y el número de células.

5.4.3. VARIACIONES EN EL RNA TOTAL, RNA/DNA, RNA/PROTEINA Y ACTIVIDAD RNAsa ACIDA

El contenido de RNA es proporcional al volumen de la célula (NAKAHARA y col., 1990; SINGH y col., 1990), depende del DNA disponible para su síntesis (SINGH y col., 1990) y es un parámetro muy sensible al contenido proteico de la dieta, constituyendo un factor esencial en las modificaciones en la síntesis proteica a corto plazo (CORTAMIRA y col., 1991).

La tasa de síntesis de RNA aumenta durante el período prenatal y alcanza su máximo algún tiempo después del nacimiento. La cantidad de RNA celular puede variar no sólo como resultado de cambios en la síntesis, sino también como resultado de cambios en la tasa de degradación (ROZOVSKI y col., 1978) y por alteraciones en el transporte desde el núcleo al citoplasma.

La síntesis proteica está relacionada con el contenido de RNA de cada célula asociada al núcleo. El contenido de RNA de un tejido, o la relación RNA/proteína es un buen indicador de la síntesis proteica en él (CASPERSSON, 1950). Además, se puede añadir que la mayor parte del RNA contenido en un tejido es ribosomal y su concentración refleja la tasa de síntesis proteica "in vivo".

La tasa de elongación (aminoácido incorporado al ribosoma por segundo), aunque es similar en varios tejidos, depende del número de ribosomas activos (polisomas). Así, las elongaciones más rápidas estarían acompañadas por pocos ribosomas activos (músculo) y las más lentas por muchos más ribosomas activos (cerebro).

Durante el crecimiento, hay reducción de la actividad del RNA en músculo (MILLWARD y col., 1975), siendo la incorporación de aminoácidos más baja en los ribosomas del músculo de la rata cuando incrementa su edad.

La actividad de la RNA polimerasa dependiente del DNA está incrementada en la rata después del nacimiento, aumentando el contenido de ribosomas por célula, pero después del crecimiento postnatal y del desarrollo no se producen cambios hasta los 550 g de peso corporal. En la rata hay pocos cambios en hígado y músculo, pero sí hay una caída en el cerebro de ratas viejas (WINICK y NOBLE, 1966). LEWIS y WINICK (1978) observan que una alimentación a corto término con una dieta baja en proteína, conduce a una estimulación del núcleo para sintetizar y procesar más rápidamente el RNA nuclear y nucleoplásmico.

La discrepancia existente entre un descenso en el contenido de RNA y un aumento en la síntesis de RNA durante la malnutrición pueden ser explicadas por una tasa incrementada de la degradación del RNA, reflejada por una actividad aumentada de la ribonucleasa (ROSSO y WINICK, 1975).

En nuestro experimento, el contenido de RNA por órgano (Tabla 7 y Gráfica VI) no se modifica en el lote control a lo largo de la experiencia, observándose un ligero aumento el día 14 debido a que son ratas en período de crecimiento. La disminución de los niveles de nucleótido en el órgano total con respecto al control, se cifra en un 36% y 33% para los lotes II y III el día 4, 36% y 53% para los lotes II y III el día 10, y del 51% el día 14 para el lote II. La disminución del contenido de RNA en el lote II se debe a la falta de aminoácidos aromáticos en el dieta, como se observa al comparar los lotes II y IV los distintos días de la experiencia. El contenido de RNA en el músculo en el lote III los días 4 y 10 se reduce más por falta de energía en la dieta. Estos resultados están de acuerdo con GOENA y col. (1988), quienes señalan el descenso en el contenido de RNA en el músculo de ratas alimentadas con dietas deficientes en aminoácidos respecto a los controles alimentados con caseína, pudiendo añadir que tanto la falta de aminoácidos aromáticos como el déficit energético añadido provocan una reducción mayor de la síntesis del RNA que de su catabolismo ya que la actividad RNAasa tiende a disminuir tanto por órgano como por mg de proteína, según se discutirá más adelante.

MILLWARD y col. (1974a) sugieren que los cambios en la concentración de RNA en el músculo de ratas en ayuno podrían seguir un esquema similar a lo que ocurre en el hígado, siendo controlados principalmente por cambios en la tasa degradativa, aunque en el músculo desciende el catabolismo proteico cuando existe pérdida de RNA en estados deficitarios. Esto significaría que la regulación se obtendría mediante un descenso en la síntesis (MILLWARD y WATERLOW, 1978). JEPSON y col. (1988) encuentran una correlación positiva entre la proteína de la dieta y la concentración de RNA en el músculo, aunque la evidencia de que los aminoácidos estimulan los niveles de ribosomas musculares es todavía escasa (McLENNAN y col., 1987; JEPSON y col., 1988).

La relación RNA/proteína (Tabla 7 y Gráfica VII) aumenta significativamente en el lote control como consecuencia del aumento del RNA a lo largo del período experimental. Al comparar el efecto de la dieta II respecto al control, aunque no hay variación significativa, se observa un aumento de un 112%, 64% y 28%, respectivamente, debido al descenso de proteína esos días. El día 14, la relación es menor por el aumento del contenido proteico. En el lote III se observa un aumento con respecto al lote control que, aunque no es estadísticamente significativo, es del orden de un 80% el día 4 debido a la disminución del RNA y una disminución del 27% el día 10. Estos resultados

están de acuerdo con los obtenidos por MILLWARD y col. (1974a), al observar una disminución de esta relación en ratas alimentadas con dietas carentes de proteína.

La reducción que se produce en la potencialidad funcional de la célula se relaciona con el bajo contenido de RNA del órgano en las ratas deficientes. En este sentido, JEPSON y col. (1988) señalan descensos en la relación RNA/proteína en músculo de ratas alimentadas con una dieta carente de proteína, como consecuencia de una reducción de la síntesis de RNA.

Además de la disminución de los niveles de RNA por órgano, se produce un descenso en el contenido del nucleótido por célula, el cual se relaciona directamente con el nivel de síntesis proteica muscular, a la vista de la evolución de la relación RNA/DNA o tasa de acumulación de RNA por célula (Tabla 7 y Gráfica VII). Esta relación se mantiene en el lote control, pero hay una ligera pérdida en el lote II de un 23%, 38% y 21% los días 8, 10 y 14, respectivamente, siendo de un 38% para el lote III el día 10, debido a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta (lote II-lote III) de acuerdo con SANTIDRIAN y col. (1988), quienes encuentran descensos en la relación RNA/DNA en músculo de ratas alimentadas con dietas carentes en aminoácidos esenciales.

Estos datos confirman los encontrados por MILLWARD y col. (1974a), quienes señalan una reducción de la relación RNA/DNA durante la restricción proteica y ayuno. Estos autores también observan cómo los cambios en el RNA muscular, expresados por la relación RNA/DNA, son paralelos a las modificaciones que se producen en la insulina plasmática, lo cual también coincide con nuestros datos, reflejando la función de la hormona en la síntesis de RNA.

Experimentos en ratas muestran que hay una disminución tanto en la síntesis como en la degradación con bajas ingestas proteicas. La disminución de la síntesis se produce cuando hay una disminución en la concentración celular del RNA ribosómico (*ratio RNA/DNA*), según GARLICK y col. (1975). El descenso de la capacidad de síntesis proteica se relaciona directamente con la disminución de la actividad de RNA (gramos de proteína sintetizada por gramos de RNA y por día), caracterizada en dietas sin proteína (JEPSON y col., 1988).

Esta reducción del contenido de RNA puede, de igual forma, relacionarse con los bajos niveles de insulina encontrados en los animales de experimentación, debido a la ya conocida acción estimuladora de la hormona sobre la síntesis proteica muscular en la fase de traducción (JEFFERSON, 1980; JEPSON y col., 1988).

Por otra parte, la observación de los resultados obtenidos en relación a la actividad RNAsa (Gráfica 8), con reducción del 7% y 71% en el lote II los días 10 y 14, respectivamente, y del 39% en el lote III el día 10, induce a pensar que los bajos niveles de RNA ya mencionados son el resultado de una disminución de su síntesis y no a un aumento del catabolismo.

La reducción de la actividad catabólica enzimática RNAsa por mg de proteína (Tabla 8), los días 4 y 14 en el lote II y en los días 4 y 10 en el lote III, puede interpretarse como un intento de mantener la tasa de RNA, predominando más la reducción de la síntesis que el aumento del catabolismo enzimático.

La relación RNAsa/RNA (Tabla 8), o actividad enzimática por mg de RNA, no se modifica a lo largo de la experiencia en los tres lotes. Únicamente se observa un aumento el día 4 en ambos lotes carentes respecto al lote control, que fué de 235% para el lote II y de 185% para el lote III ese día, debido a una mayor actividad inducida por falta de aminoácidos aromáticos en la dieta, igualándose a los controles a partir de dicho día 10.

La razón RNAsa/DNA (Tabla 8) indica la actividad RNAsa por célula muscular; tiende a aumentar en el lote control a lo largo del proceso experimental y a reducirse en los lotes carentes. Existe un aumento de dicha actividad el día 4 en ambos lotes carentes por falta de aminoácidos aromáticos en la dieta y falta de energía, siendo del 128% en el lote II y 178% en el lote III. Al final de la experiencia disminuye dicha actividad por célula en el lote II el día 4 y en el lote III el día 10, debido también a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta y al déficit energético.

5.4.4. EFECTO SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS LISOSOMALES HIDROLASAS: FOSFATASA ACIDA, FOSFATASA ALCALINA Y BETA-D-GLUCURONIDASA POR ORGANO Y POR mg DE PROTEINA

ROBINSON y KARNOVSKY (1983), han demostrado que las estructuras de la fosfatasa ácida, que se presume están en los lisosomas, son más numerosas en el músculo de lo que se creía anteriormente.

La respuesta de la malnutrición impuesta por la carencia de aminoácidos en la dieta se traduce también en cambios en la actividad enzimática hidrolásica. En este sentido, algunos autores han observado modificaciones en la actividad de enzimas de tejidos y órganos animales, como consecuencia de la deficiencia o del exceso de aminoácidos esenciales en la dieta (TEMLER y col., 1983).

En estudios para determinar si la fosfatasa alcalina del suero humano está influida por la dieta, WEIL y RUSSELL (1940), observaron en ratas en ayuno durante 8 horas un marcado descenso de la fosfatasa alcalina en suero, confirmado por BODANSKY (1934) en perros. En personas no hay cambios significativos en la fosfatasa alcalina en suero tras 18 horas de ayuno, tras

una comida con elevada concentración de proteínas, o tras 40 horas de ingesta de una dieta alta en grasa.

Tanto la fosfatasa ácida como la alcalina catalizan la hidrólisis de una amplia variedad de fosfomonoésteres. Específicamente, la fosfatasa alcalina libera fosfato inorgánico de un éster fosfato orgánico con la consiguiente producción de un alcohol; la fosfatasa ácida necesita un medio ácido (pH = 4.5-7.0) y cataliza la hidrólisis de varios monésteres ortofosfóricos para dar lugar al correspondiente alcohol y un fosfato inorgánico.

En malnutrición, la fosfatasa alcalina está disminuída en plasma (McLEAN, 1966). También existen descensos en la actividad fosfatasa alcalina en distintas condiciones patológicas como en hipotiroidismo, hipofosfatemia, kwashiorkor, cretinismo y anemia severa.

Las actividades fosfatasa ácida y alcalina por órgano (Tabla 9 y Gráfica VIII), no se modifican a lo largo del período experimental tanto en el lote control como en ambos lotes carentes II y III. Si se comparan dichas actividades de ambos lotes carentes frente al control, se observa una disminución del 72%, 58% y 68% los días 4, 10 y 14 respectivamente para el lote II, y del 67% los días 4 y 10 y 61% en el lote III para la fosfatasa ácida. Para la fosfatasa alcalina, se observa una disminución de un 52%, 22% y 40% en el lote II, los días 4, 10 y 14 y, para el lote III, de un 42% y 60% los días 4 y 10. Se debe tanto en el lote II como en el III a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por McLEAN (1966) y TEMPLER y col. (1983).

Si se estudia la actividad fosfatasa ácida por mg de proteína (Tabla 9), en los lotes II y III se observa una reducción de la misma, mientras que en la fosfatasa alcalina no se observan modificaciones significativas aunque sí una tendencia a aumentar dicha actividad por efecto de la carencia de aminoácidos aromáticos en la dieta en el lote II, y a disminuir en el lote con déficit energético.

La beta-D-Glucuronidasa por órgano (Tabla 10) aumenta ligeramente en el lote control a lo largo del proceso experimental sin ser significativa, existiendo una reducción en el lote II del 10%, 49% y 48%, los días 4, 10 y 14, respectivamente y en el lote III del 38% el día 4 y del 40% el día 10, mientras que por mg de proteína a partir del día 10 no se modifica.

Todas estas enzimas tienden a disminuir por efecto de la carencia de aminoácidos aromáticos en la dieta y la reducción energética en el músculo gastrocnemio, lo cual puede indicar una ligera reducción del tamaño de la fibra muscular.

5.5.5. EFECTO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE TRANSAMINASAS, GOT Y GPT

La síntesis proteica en los mamíferos es una respuesta al suministro de aminoácidos; si éste es inadecuado se produce una respuesta adaptativa con mayor o menor habilidad para llevarla a cabo.

A lo largo del período experimental, la actividad GOT/músculo gastrocnemio (Tabla 11 y Gráfica IX) no se modifica en el lote control ni en ambos lotes carentes. La administración de dietas carentes de Phe+Tyr+Trp y con 50% de energía a ratas durante el período experimental produce un descenso en la actividad de la GOT, llegando a ser del 45%, 61% y 54% los días 4, 10 y 14, respectivamente. Si se comparan los lotes II y IV se detecta un descenso del 35%, 59% y 27% en el lote II los días 4, 10 y 14 con respecto al lote IV, debido principalmente a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta.

La administración de la dieta carente de aminoácidos aromáticos y con restricción energética en un 50% produce una disminución de la actividad GOT del 41% y 16% los días 4 y 10, respectivamente.

La actividad GPT/músculo gastrocnemio disminuye en ambos lotes carentes frente al control, siendo significativa el día 4 en el lote II y del orden del 74%, y del 57% y 59% los días 10 y 14, respectivamente. La reducción energética produce un descenso de la actividad del orden del 38% y del 70% en el lote III los días 4 y 10, respectivamente, a pesar de la reducción del contenido proteico soluble. Tal vez la proteólisis muscular y la hepática contribuyen al suministro de la fenilalanina, tirosina y triptófano necesarios para incrementar la síntesis de la GPT, que las dietas experimentales no aportan.

Como referencia de la influencia de la dieta baja en proteína sobre la actividad transaminasa en el músculo hay controversia según los autores. Para unos no hay ningún efecto (SKETCHER y col., 1974), para otros hay aumento (SKETCHER y JAMES, 1974), y para otros descenso de la actividad (McFARLANE y VON HOLT, 1969).

La actividad GOT por mg de proteína aumenta en ambos lotes carentes, aunque no de forma significativa debido por igual, tanto a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta, como a la disminución de la ingesta, a pesar de la menor concentración de proteína soluble. Tal vez la proteólisis del músculo gastrocnemio y de otros órganos proporcionen los aminoácidos aromáticos necesarios para que aumente la síntesis de GOT/mg de proteína, que las dietas experimentales no aportan.

La actividad GTP por mg de proteína no se modifica a lo largo de la experiencia en los distintos lotes. Al comparar los grupos carentes con respecto al control se aprecia un ligero descenso el día 10 del 53% en el lote III, aunque no llegó a ser significativo.

5.5. EFECTO DE LA CARENCIA EN LA DIETA DE PHE+TYR+TRP Y PHE+TYR+TRP Y ENERGIA SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS LIBRES EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y MUSCULO GASTROCNEMIO

Los factores que pueden afectar a la concentración de aminoácidos libres en los distintos compartimentos son el aporte procedente de la dieta, el turnover proteico (WATERLOW y col., 1978a), la biosíntesis, transaminación y transporte a través de las membranas celulares y la oxidación.

El contenido proteico de la dieta y la composición relativa de la misma en aminoácidos esenciales y no esenciales provoca respuestas fisiológicas diferentes, de forma que la variación selectiva de los aminoácidos repercute en la concentración de aminoácidos libres en diferentes tejidos y en el comportamiento frente a la ingesta alimentaria.

La respuesta de los aminoácidos no esenciales a la falta de proteína en la dieta es una disminución de las concentraciones de alanina, serina, glicina y glutamina en un 10-50%, treonina y glutamato no cambian, y las concentraciones de aspártico y asparragina aumentan un 40% (MILLWARD y col., 1974b). El descenso en la concentración de varios de los aminoácidos no esenciales es debido probablemente a su oxidación para fines energéticos. Así, los descensos en las concentraciones de alanina y glutamina en sangre durante un período de ayuno, se debe a estar implicadas en el transporte de nitrógeno desde el músculo hasta el hígado y el riñón, y son utilizadas mediante el ciclo glucosa-alanina para la síntesis de glucosa por gluconeogénesis (FELIG y col., 1970).

El metabolismo de los aminoácidos de los tejidos periféricos está condicionado por el metabolismo hepático e intestinal, regulando cuidadosamente la concentración sanguínea de los mismos para cuidar la síntesis proteica de órganos vitales como el cerebro.

Los animales que consumen dietas altas en proteína ajustan su ingesta de alimento según su capacidad para degradar los aminoácidos ingeridos en exceso y para regular la síntesis de las proteínas tisulares (PETERS y HARPER, 1985).

Las concentraciones plasmáticas de la mayoría de los aminoácidos disminuyen en la fase de post-prandial. Los cambios en los niveles de aminoácidos no parecen influir en los cambios del aminoacil-tRNA.

TESSARI y col. (1987) midieron la síntesis y degradación proteica mediante una infusión intravenosa de una mezcla de aminoácidos utilizando leucina marcada; observaron un incremento en la síntesis, pero sin cambios en la degradación. Cuando se administran conjuntamente insulina y aminoácidos existe un incremento de la síntesis y una disminución en la degradación proteica. Por ello, TESSARI y col. (1987) sugieren que la insulina y los aminoácidos ejercen un efecto complementario. Esto mismo fué observado en perros por NISSEN y HAYMOND (1986). Cuando se incuban músculos y se añaden aminoácidos al medio, se observa un aumento en la síntesis y una disminución en la degradación (FULKS y col., 1975; PACY y col., 1987). Un efecto similar se ha observado en incubaciones de fibras musculares humanas; cuando se incrementa la concentración de aminoácidos en el medio de 1 a 10 por encima de la concentración plasmática normal, se provoca un incremento en la síntesis proteica (LUNDHOLM y SCHERSTEN, 1977).

Así, pues, McNURLAN y GARLICK (1989) concluyen que la administración de insulina sola aumenta la síntesis proteica o no varía y la degradación proteica disminuye o no varía. La administración de aminoácidos aumenta la síntesis proteica o no varía, mientras que la degradación disminuye o no varía y la administración conjunta de insulina y aminoácidos aumenta la síntesis proteica y disminuye la degradación.

Según MILLWARD (1985), si la ingesta de alimentos es baja, hay menor síntesis proteica, y menor aporte de aminoácidos. Tras la absorción, se reduce la entrada de aminoácidos en el "pool" y, por tanto, hay menores pérdidas por oxidación.

La actividad de muchas enzimas del metabolismo de aminoácidos se modifican por el nivel de la ingesta proteica, como sucede con la tirosina aminotransferasa, triptófano pirrolasa, glutámico deshidrogenasa y aminotransferasas en el hígado (HARPER, 1965).

En cuanto a la influencia de los aminoácidos sobre la degradación proteica, el número de aminoácidos que inhiben directamente la proteólisis hepática es pequeño siendo mayor, sin embargo, que en músculo esquelético y cardíaco, en donde sólo la leucina es activa (CHUA y col., 1979). En el hígado inhiben la degradación proteica: leucina, tirosina, fenilalanina,

glutamina, prolina, histidina, triptófano y metionina (POSO y col., 1982). Como la fenilalanina es degradada a tirosina en el hígado, las actividades de estos dos aminoácidos aromáticos no pueden diferenciarse. Tanto la fenilalanina como tirosina pueden ser suprimidos, por sí solos, sin afectar a la degradación (SHIMAN y GRAY, 1980; SHIMAN y col., 1982).

FELIG y col. (1969) estudiaron la concentración plasmática de 20 aminoácidos en sujetos obesos durante 5-6 semanas de ayuno, observando:

- un aumento en la concentración plasmática de los aminoácidos de cadena ramificada isoleucina, leucina y valina durante los primeros 5 días de ayuno,
- una disminución de glicina, treonina y serina hasta el día 5 y un aumento después del día 5,
- tirosina y fenilalanina no varían hasta el día 40,
- triptófano desciende muy ligeramente,
- 8 de los aminoácidos descendieron en el ayuno (prolina, alanina, cisteína, histidina, arginina, ornitina, triptófano y citrulina), pero la disminución menor durante la primera semana de ayuno fue la alanina. Concluyeron que el marcado descenso de la alanina plasmática (70%) es debido al aumento en la utilización de este aminoácido,
- los niveles de la mayoría de los aminoácidos fueron menores en sangre venosa hepática que en sangre arterial,
- la excreción urinaria de glicina fue mucho mayor que las de otros aminoácidos.

La administración de insulina, glucagón y cortisol provocan cambios en la concentración de aminoácidos plasmáticos; así, al inyectar insulina a concentraciones fisiológicas a ratas fetales, disminuye la glutamina, alanina, aspártico, glutámico, aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina), ornitina, arginina y citrulina. Por el contrario, al inyectar glucagón, los aminoácidos glutámico e isoleucina disminuyen y taurina aumenta. De estos resultados se deduce que el tratamiento con glucagón provoca una disminución relativamente específica de treonina, serina, fenilalanina, tirosina, glicina, histidina, lisina y cisteína.

La administración de insulina a ratas recién nacidas frente a ratas control, provoca un descenso en los aminoácidos asparragina, glutámico, citrulina, alanina, lisina y arginina (GIRARD y col., 1976).

La inyección de glucagón a ratas recién nacidas frente a ratas control, aumenta los niveles de taurina, mientras que disminuye los de tirosina y arginina. También aumenta la capacidad de convertir el lactato en glucosa. El glucagón disminuye la alanina en plasma más que la insulina, mientras la insulina disminuye la glutamina ligeramente más que el glucagón (GIRARD y col., 1976).

La administración de cortisol a ratas recién nacidas frente a ratas control, provoca hiperaminoacidemia (GIRARD y col., 1976). También aumenta la capacidad de convertir el lactato, la alanina y la serina en glucosa.

En el plasma, la concentración de aminoácidos está afectada por factores hormonales, actividad de los transportadores transmembrana, concentración de aminoácidos en el "pool" intracelular y por el aclaramiento plasmático que se lleva a cabo fundamentalmente en el hígado para casi todos los aminoácidos, excepto para los aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina) que tienen lugar principalmente en el músculo.

Los eritrocitos contienen la mayoría de los aminoácidos en concentración igual o más alta que en el plasma (HAGENFELDT y ARVIDSSON., 1980). Estudios "in vitro" demuestran que la captura de aminoácidos por los eritrocitos es muy lenta (WINTER y CHRISTENSEN, 1964). Estos estudios sugieren que los eritrocitos y el plasma representan compartimentos completamente separados.

Algunos estudios han proporcionado evidencias sobre una participación activa de los eritrocitos en el intercambio de aminoácidos entre la sangre y los tejidos, lo que significa que la captura de aminoácidos o la cesión por los eritrocitos era mayor "in vivo" que lo esperado de los datos obtenidos "in vitro" (HEITMAN y BERGMAN., 1980; HEITMAN y BERGMAN., 1981).

USSING (1943) fué el primero que demostró que los eritrocitos eran permeables a los aminoácidos "in vitro". ELWIYN y col. (1972) observaron que a través de varios órganos (tales como el músculo), los cambios en los niveles sanguíneos totales de varios aminoácidos podían no estar relacionados únicamente con los cambios que tienen lugar en plasma indicando que el contenido intracelular del eritrocito cambiaba más rápidamente "in vivo" que lo que se esperaba de los datos "in vitro".

PAYNE-ROBINSON y BROWN (1992) comparan la unión de la insulina a los receptores de los eritrocitos en ratas control y en ratas con malnutrición. Demostraron que la unión a los receptores es menor en las ratas malnutridas en un 44% que en el control. Anormalidades en la estructura de la membrana celular caracterizan los cambios fisiológicos producidos durante la malnutrición. Así, se han encontrado anormalidades en la composición lipídica de la membrana de los eritrocitos en niños malnutridos (VAJRESWARI y col., 1990). También se ha observado una

fragilidad anormal de la membrana, así como una funcionalidad incorrecta de la bomba de sodio en glóbulos rojos de niños con malnutrición, estando también afectadas las actividades enzimáticas de la membrana en niños con kwashiorkor (RAMADADHAN y KAPLAY, 1982).

Otro aspecto de la funcionalidad de la membrana eritrocitaria es su alteración como consecuencia de la malnutrición con baja capacidad de unión a los receptores de insulina (NEUFELD y col., 1986). A este respecto, se ha estudiado en niños con malnutrición los receptores de insulina de los eritrocitos, encontrándose una baja afinidad por la unión (PAYNE-ROBINSON y col., 1988).

Así, pues, se concluye que los eritrocitos están implicados en el transporte de aminoácidos, aunque existen controversias acerca de la contribución de los mismos al metabolismo tisular de los aminoácidos (ELWIN y col., 1972). Se acepta que el plasma y los eritrocitos tienen papeles independientes y a menudo opuestos respecto al transporte de aminoácidos entre órganos, existiendo un intercambio muy lento entre los aminoácidos del plasma y eritrocitos, y rápido entre cada uno de ellos con los tejidos.

5.5.1. AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA

Los aminoácidos de cadena ramificada (AAR) constituyen un 20% del total de los aminoácidos en la mayoría de las proteínas. Su concentración en el "pool" de aminoácidos es relativamente baja y sensible a cambios de sus niveles por suministro de aminoácidos. El primer paso en su catabolismo es la transaminación, principalmente en el músculo, seguido por una irreversible descarboxilación de los keto-ácidos. Así, si disminuye la ingesta de proteínas, disminuye la oxidación de los AAR (SKETCHER y JAMES, 1974).

La leucina es el aminoácido que más inhibición provoca sobre la degradación proteica en el hígado. Los otros aminoácidos de cadena ramificada valina e isoleucina no tienen capacidad inhibitoria (SEGLIN y col., 1980).

TISCHLER y col. (1982) demostraron que la inhibición de la degradación proteica es debida al keto-ácido de la leucina, mientras que la estimulación de la síntesis proteica es debida a la propia leucina. Por el contrario, McNURLAN y col. (1982) midieron la síntesis proteica muscular "in vivo" después de la inyección de leucina y no observaron ninguna estimulación de la síntesis proteica en ratas alimentadas y en ayuno.

También BUSE y col. (1979) mostraron que la inyección de leucina de 1 a 2 horas antes de morir provocaba un incremento en la agregación de ribosomas a polisomas en ratas en ayuno, pero no si éstas habían comido.

Tanto en ratas en ayuno como recién alimentadas, si se les inyecta insulina y glucosa incrementan la síntesis proteica. Así, la interacción entre la insulina y los aminoácidos es debido a los AAR, y sobre todo a la leucina, demostrando que se necesita insulina y AAR para la síntesis proteica (BUSE y col., 1979).

El esqueleto carbonado de la leucina se dirige hacia el ciclo del ácido cítrico (CHANG y GOLDBERG, 1978a; 1978b). Sin embargo, el esqueleto carbonado de la isoleucina no se utiliza en el ciclo del ácido cítrico (WAGENMAKERS y col., 1985).

No se conoce si el efecto de la leucina en el turnover proteico es debido a la leucina o a algún producto de la degradación de la leucina-tRNA. Parece ser que es el leucil-tRNA el metabolito de la leucina que regula el turnover proteico. La capacidad de la leucina para promover la síntesis proteica e inhibir la degradación en el músculo tiene un papel fisiológico importante en la regulación de la masa del músculo (GOLDBERG y CHANG, 1978b). También el L-triptófano estabiliza la *ornitina aminotransferasa*, enzima no comprometida en el mecanismo de degradación del triptófano (CHEE y SWICK, 1976).

De entre los aminoácidos del plasma, la leucina, en particular, promueve la síntesis proteica e inhibe la degradación. El mecanismo es desconocido, pero el efecto estimulante de los aminoácidos de cadena ramificada en la síntesis proteica está asociado con la formación y acúmulo de polisomas y disminución de monosomas (ATWELL y col., 1977), el efecto de estimulación no está inhibido por la actinomicín-D (GOLDBERG y CHANG, 1978b), la acción de los AAR se realiza a nivel de la translocación y está asociada con una mejora del polipéptido de iniciación.

JENSEN y col. (1988) demuestran en sujetos en ayuno que la leucina aumenta.

Una hiperinsulinemia, además de una infusión de aminoácidos, provoca una disminución de la tasa de leucina dentro del compartimento plasmático en un 80%. Esto supone un índice cualitativo de la tasa de proteolisis (FREXES-STEED y col., 1992). La leucina sola es más potente que cualquier otro aminoácido en la supresión de la proteolisis (TISCHLER y col., 1982). De forma similar, en el hígado, la leucina es la responsable del 50% de los efectos supresores de la proteolisis hepática de entre un lote de aminoácidos reguladores, incluyéndose tirosina, leucina, glutamina, prolina, metionina, histidina y triptófano (MORTIMORE y col., 1987; MORTIMORE y col., 1988).

Cuando hay hip aminoacidemia (falta de aminoácidos), una dosis farmacológica de insulina provoca una supresión de la degradación proteica, de la oxidación de la leucina y de la síntesis proteica. La restauración de la leucina plasmática a valores normales, bien por la infusión de una solución de L-leucina sola o en combinación con otros aminoácidos, provoca una supresión de la degradación proteica, lo cual pone de manifiesto la importancia de la leucina en la modulación del efecto de la insulina sobre la proteólisis (FREXES-STEED y col., 1992).

Cuando los niveles plasmáticos de leucina están elevados, la presencia de insulina impide su oxidación (FREXES-STEED y col., 1992).

De esta forma, se puede resumir de los trabajos en músculo esquelético, que la mayor parte del efecto de una mezcla de aminoácidos se debe a la leucina y a sus concentraciones fisiológicas; tanto para la síntesis como para la degradación se necesita la presencia de insulina.

El hígado es el principal lugar del organismo en la degradación de los aminoácidos indispensables o esenciales con la excepción de los aminoácidos de cadena ramificada, y de la síntesis de aminoácidos. En contraste, el músculo actúa como reservorio inerte de aminoácidos, los cuales pueden ser movilizados en situaciones de ayuno o de estrés. Por lo tanto, los aminoácidos del músculo actúan como precursores para la síntesis proteica muscular o hepática, o son liberados por el hígado y el músculo en la proteólisis y/o reciclados para una nueva proteosíntesis en ambos órganos.

Los músculos esquelético y cardíaco son muy activos en el catabolismo de varios aminoácidos, particularmente leucina, isoleucina y valina, y en la síntesis de otros, específicamente alanina y glutamina (FELIG, 1975).

El músculo no degrada de forma significativa los esqueletos carbonados de ciertos aminoácidos encontrados en plasma, tales como lisina, serina, prolina, treonina, metionina, cisteína, fenilalanina, histidina, tirosina y triptófano (GOLDBERG y ODESSEY, 1972). En cambio, el músculo es el lugar principal para el catabolismo de los AAR, oxida leucina a CO_2 y convierte los esqueletos carbonados de aspartato, asparragina, glutamato, isoleucina y valina en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

Al estudiar los valores obtenidos para los AAR en los tres compartimentos estudiados (Tabla 12 y Gráfica X), se observa que en plasma la suma de Ile+Leu+Val aumenta en el lote III el día 10 en 137% con respecto al lote control, mientras que el lote II no varía. Esto es debido a un incremento de la proteólisis por déficit energético o a una inhibición de la proteosíntesis en relación con la insulinemia. La invariabilidad de la dieta II concuerda con los resultados de YOUNG y HILL (1981). El aumento por el déficit energético se debe a isoleucina, leucina y valina. También

WIDHALM y col. (1989) observan aumentos en la valina, leucina e isoleucina de obesos sometidos a una dieta muy baja en calorías, indicando un estado catabólico elevado, con aumento del flujo aminoacídico desde el músculo al plasma. Es significativo el descenso de leucina en plasma el día 4 (55%) por efecto de la restricción energética, pero esta disminución se restablece el día 10, llegando a aumentar el nivel de leucina (118%) por encima del valor control en plasma, como también sucede con isoleucina y valina en un 94% y 178%, respectivamente ese día.

El aumento en las concentraciones de AAR en plasma en el lote III el día 10, va acompañado de una disminución plasmática de insulina (Tabla 3).

Las concentraciones de los AAR en glóbulos rojos (tabla 23), en el lote control aumenta la suma el día 10 para recuperarse el día 14 a los valores iniciales. Al comparar ambos lotes carentes con el control no se producen modificaciones en el lote II y en el lote III aumenta el día 10 con respecto al control en un 73% debido al aumento de leucina y valina ese mismo día. Este efecto se debe a la falta de energía en la dieta.

Como se puede deducir de estos resultados, hay modificaciones paralelas en la suma de AAR tanto en plasma como en glóbulos rojos, produciéndose un aumento de dicha suma al final de la experiencia en el lote sometido a carencia de aminoácidos aromáticos y a restricción energética, debiéndose principalmente a la elevada concentración de valina y leucina encontrada en ambos compartimentos. El importante aumento de leucina concuerda con los datos presentados anteriormente, ya que va a servir como fuente energética para el músculo, retardando la oxidación de la glucosa en el mismo. La liberación de leucina aumenta y su captura disminuye. La leucina aumenta en sangre, así como la capacidad de degradación por el músculo de este aminoácido; por tanto, parece probable que inhiba la oxidación de piruvato y éste estimule la formación de alanina por transaminación con otros aminoácidos. Así, se incrementan la síntesis de los aminoácidos precursores de la gluconeogénesis.

En músculo gastrocnemio, al comparar los efectos de las dietas carentes frente al control, se observa en el lote II un aumento los días 4 y 10 de un 75% y 71% respectivamente, mientras que en el lote III no se producen diferencias significativas los días 4 y 10 con respecto al lote control. El aumento observado se debe a isoleucina, leucina y valina, destacando este último.

5.5.2. AMINOACIDOS GLUCONEOGENICOS

FELIG y col. (1970) observan que los aminoácidos liberados del músculo en el estado postabsortivo o durante el ayuno no representan el hidrolizado de la proteína muscular, ya

que alanina y glutamina se liberan en cantidades mucho mayores de las que se esperarían a partir del catabolismo de las proteínas musculares. Estos dos aminoácidos se sintetizan "de novo" en el músculo a partir de los lotes amino generados por la degradación de los aminoácidos. En estas situaciones, el músculo libera leucina, isoleucina, valina y ácido aspártico en menores cantidades de las que se esperarían de su presencia en la proteína tisular, lo cual refleja una rápida degradación de estos aminoácidos en el músculo (GOLDBERG y CHANG, 1978b). Estos procesos tienen importancia en el mantenimiento de la homeostasis de los aminoácidos y de la glucemia.

Mecanismos adaptativos a cambios cuali o cuantitativos en el consumo de proteína dietaria en comparación con una dieta control bien equilibrada en proteína, ayudan al organismo a *disponer de aminoácidos de forma que se alcanza la mejor situación equilibrada posible* contribuyendo de esta forma a la homeostasis de los aminoácidos (COLOMBO y col., 1992). La disminución de la ingesta provocada en los animales del lote III carente de Phe+Tyr+Trp y con 1/2 de energía da lugar a que los animales entren en un estado de estrés que da lugar a la liberación de glucocorticoides que van a favorecer la gluconeogénesis para paliar de esta forma la falta de glucosa que padecen los animales.

A continuación se revisan las modificaciones que provoca la dieta carente en Phe+Tyr+Trp y ésta con 1/2 de energía en la concentración de aminoácidos gluconeogénicos ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, serina, glutamina, glicina, treonina y alanina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio.

5.5.2.1. ACIDO ASPARTICO Y ASPARRAGINA

En plasma, el ácido aspártico (Tabla 13a y Gráfica XI) no se modifica a lo largo del proceso experimental en el lote control, y aumenta en ambos lotes carentes. Si se comparan ambos lotes carentes los días 4, 10 y 14 con el control, no se observan variaciones significativas. Lo mismo sucede con la asparragina (Tabla 13a y Gráfica XIII).

En glóbulos rojos, en el lote III el ácido aspártico (Tabla 24a y Gráfica XI) disminuye el día 4 un 91% y aumenta el día 10 en un 371%. La asparragina disminuye en el lote III el día 4 en un 55% y el día 10 en un 32%. Aunque la disminución no es significativa, se mantiene en el lote II los últimos días del experimento comparándolos con los del control.

En músculo gastrocnemio, el ácido aspártico (Tabla 35a y Gráfica XI) no se modifica por el suministro de ambas dietas carentes frente al control, mientras que la asparragina (Tabla 35a y

Gráfica XIII) aumenta en el lote carente de AAA y disminuye en el deficitario de energía los días 10 y 14 en un 48% y 163%, respectivamente.

El ácido aspártico en el músculo se convierte en glutamina por el ciclo tricarboxílico (GOLDBERG y CHANG, 1978b; CHANG y GOLDBERG, 1978a; 1978b). KADOWAKI y col. (1984) señalan al ácido aspártico entre los aminoácidos que son siempre captados por el músculo y por el hígado, con independencia de sus niveles plasmáticos, sugiriendo que este aminoácido, debido a su neurotoxicidad potencial, es rápidamente aclarado del torrente sanguíneo por los dos órganos, siendo oxidado a CO₂ de modo preferente.

La asparragina es otro de los aminoácidos que posteriormante a la proteolisis entran en el ciclo tricarboxílico en el músculo (GOLDBERG y CHANG, 1978b; CHANG Y GOLDBERG, 1978a; 1978b).

5.5.2.2. ACIDO GLUTAMICO Y GLUTAMINA

Los aminoácidos generados por el catabolismo proteico en ayuno pueden tener diferentes destinos en el músculo (GOLDBERG y CHANG, 1978a; 1978b).

El ácido glutámico puede ser metabolizado en el músculo para aportar esqueletos carbonados para la síntesis de glutamina y alanina. La glutamina es sintetizada "de novo" en grandes cantidades en el músculo, y su liberación por el músculo es una forma de desintoxicar al organismo del amoníaco; el esqueleto de la glutamina es consumido en la gluconeogénesis renal y como fuente de energía (CHANG y GOLDBERG, 1978b).

Aunque el glutamato no es absorbido, está presente en la dieta en mayores cantidades que cualquier otro aminoácido. El glutamato es metabolizado por el epitelio intestinal durante la absorción y parte de él puede ser convertido en alanina (NEAME y WISEMAN, 1958). Estudios en intestino perfundido de rata (WINDMUELLER y SPAETH, 1975), mostraron que 1/3 del nitrógeno de la glutamina es transaminado con el piruvato para la formación de alanina y su liberación a la sangre y 1/2 del carbono es usado para la producción de CO₂. Glutamina y glutamato son utilizados como fuentes energéticas y producción de alanina en el intestino; también participan en el transporte de nitrógeno para la amoniogénesis en el riñón y para la ureogénesis en el hígado.

La carencia de Phe+Tyr+Trp provoca un descenso en los niveles musculares de ácido glutámico en el lote II (Tabla 35a y Gráfica XII) que llega a ser del 39% el día 14, de acuerdo con SOEMITRO y col. (1989), quienes señalan una disminución en el contenido de glutámico en el

músculo de ratas alimentadas con dietas sin caseína. En el lote con déficit energético, el contenido de ácido glutámico disminuye en un 52% el día 4 y aumenta ligeramente el día 10, aunque la concentración por gramo de tejido sigue siendo menor con respecto al control ese día en un 35%.

También ADIBI y col. (1973) observan una reducción de la concentración de este aminoácido durante los dos primeros días de privación proteica, con un ligero aumento en el cuarto día, pese al cual los valores permanecen a nivel reducido, descripción similar a la evolución observada en nuestros resultados.

Por otra parte, en el grupo control, el ácido glutámico en plasma (Tabla 13a y Gráfica XII) aumenta la concentración el día 14 en un 56% con respecto al día 4. Durante el proceso experimental, en el lote carente de Phe+Tyr+Trp aumenta el día 14 en un 46%. Al comparar ambos lotes carentes frente al control los distintos días del proceso experimental, el lote II en plasma disminuye su concentración los días 4, 10 y 14 en un 45%, 28% y 49%, respectivamente, y en el lote III en un 35% y 40%, debido a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta y a la falta de energía.

En glóbulos rojos, la concentración de glutámico se reduce lo mismo que en plasma en ambos lotes carentes, siendo la disminución más importante el efecto de la dieta con 50% de energía. Para el lote II disminuye la concentración en un 26%, 35% y 51% los días 4, 10 y 14, y para el lote III en un 54% y 63% los días 4 y 10, respectivamente.

El ácido glutámico puede ser metabolizado en músculo para aportar esqueletos carbonados para la síntesis de glutamina y alanina (CHANG y GOLDBERG, 1978a; 1978b). La evolución de los niveles de este aminoácido se podría relacionar con la modificación de la concentración de insulina plasmática, ya que, según AOKI y col. (1972), la insulina ejerce un efecto positivo sobre la entrada de glutámico en el músculo, de forma que al disminuir los niveles de insulina en plasma (Tabla 3), favorece el flujo del aminoácido hacia el plasma y los glóbulos rojos.

En el mismo sentido, AOKI y col. (1972) proponen que la insulina sensibiliza de algún modo la membrana del eritrocito, de forma que cuando éstos atraviesan zonas musculares con una síntesis proteica activa en las que hay gran requerimiento de aminoácidos, son incapaces de mantener el gradiente, liberando aminoácidos al plasma y al músculo. Es evidente el papel de los glóbulos rojos en el transporte de aminoácidos desde las regiones del organismo con mayor concentración hacia otras en que éstas es menor o existe mayor demanda.

La glutamina es el transportador de nitrógeno más importante entre órganos; transporta 1/3 del nitrógeno circulante de los aminoácidos (SOUBA, 1987).

ELIA y col. (1988) observan que la liberación de nitrógeno en el músculo esquelético en humanos se produce en forma de glutamina en mayor proporción que otros aminoácidos. La glutamina es el aminoácido más abundante del organismo. Se encuentra en mayor concentración en el plasma, y justifica alrededor del 50% del contenido de aminoácidos intracelular (ELIA y col., 1988). Es sintetizada a partir de glutamato y amoníaco; una gran variedad de tejidos contienen glutamina sintetasa. Es hidrolizada por las glutaminasas para dar glutamato y amoníaco (KOVACEVIC y McGIVAN 1983).

La glutamina tiene un papel central en la fisiología celular y en el metabolismo. Es el mayor constituyente dietario de proteínas endógenas y péptidos. Tiene un papel importante en el equilibrio ácido-base; actúa como "combustible" en la mucosa intestinal, fibroblastos y reticulocitos. También es el precursor de los amino-azúcares y de varios nucleótidos como ATP, purinas y pirimidinas. En el hombre, actúa como agente detoxificante (CERSOSIMO y col., 1986).

El "pool" de glutamina muscular disminuye cuando la síntesis proteica está disminuida y la degradación proteica es elevada (RENNIE, 1985). ARDAWI y MAJZOUN (1991) han demostrado que existe una inhibición en la síntesis proteica y una aceleración en la degradación de la proteína muscular, la cual está asociada con una reducción de la concentración de glutamina libre. Situaciones catabólicas están asociadas con un marcado incremento en la liberación de glutamina del músculo (SOUBA, 1991). Aproximadamente un 50% del "pool" de glutamina intramuscular está preservado. Así, mecanismos compensatorios como el aumento de la degradación de la proteína muscular debería contribuir a aumentar la liberación de glutamina.

La glutamina se encuentra en relativamente altas concentraciones en muchas células de mamíferos donde sirve como un reservorio de amonio y como un donador de nitrógeno para la biosíntesis de un número de compuestos importantes tales como nucleótidos, aminoazúcares y aminoácidos (SMITH, 1990). Además, es el aminoácido más abundante en la sangre y es un vehículo de transporte de nitrógeno para la amoniogénesis en el riñón y para la ureagénesis en el hígado (SOUBA, 1987). El hígado juega un papel importante en el metabolismo de la glutamina, debido a su capacidad para funcionar como un consumidor neto de glutamina y como un productor neto de glutamina (BODE, 1990; HAUSSINGER, 1990).

La glutamina es el vehículo más importante para la transferencia de nitrógeno entre los órganos y transporta un tercio del nitrógeno circulante de los aminoácidos (SOUBA, 1987). Sus concentraciones en la sangre total y en los tejidos descienden significativamente durante enfermedades críticas, dando lugar a un estado de marcada deplección de glutamina (VINNARS y col., 1975; ASKAZANI y col., 1980; SOUBA y col., 1990).

Se ha comprobado en numerosas especies de animales que, en condiciones normales y de acidosis, el intestino delgado (BERGMAN y col., 1982) y los riñones (SOUBA, 1991) son los lugares esenciales para la utilización de glutamina, mientras que su producción, tanto en condiciones normales como patológicas, se realiza principalmente en el músculo esquelético (ELIA y col., 1988; SOUBA, 1991) a partir de ácido glutámico y amonio y con la intervención de la glutamina sintetasa.

La concentración de glutamina en músculo gastrocnemio (Tabla 35b y Gráfica XV) es considerablemente superior en el lote control que en ambos lotes carentes, de acuerdo con los resultados de RENNIE y col. (1982), teniendo una disminución que, aunque no es significativa, es del 57% y 69% los días 4 y 14, respectivamente en el lote II, y del 91% y 68% los días 4 y 10, respectivamente en el lote III, siendo estos valores significativos.

En el músculo esquelético de ratas, la glutamina estimula la síntesis proteica e inhibe la proteólisis (McLENNAN y col., 1987). El transportador de glutamina muscular es conocido por crear un elevado gradiente de concentración que modula el volumen celular.

En músculos incubados aislados y en tratamiento con corticosteroides a baja concentración, FURST y col. (1992) han observado una estimulación de la síntesis proteica muscular con glutamina. Una estimulación modesta de la síntesis proteica muscular puede ser observada después de una infusión de glutamina en el músculo de individuos sanos y una marcada estimulación puede ser observada tras 3 días en pacientes post-operatorios con nutrición parenteral de alanina y glutamina (BARUA y col., 1992). ARDAWI, (1991) ha demostrado que en nutrición parenteral con glutamina en ratas, disminuye el balance de nitrógeno negativo y se preserva la síntesis proteica muscular aproximadamente a los valores normales, mientras se inhibe la degradación proteica.

En este experimento, en el lote control la concentración de glutamina en plasma y en glóbulos rojos (Tabla 13 b y Gráfica XV) aumenta progresivamente a lo largo del período experimental, mientras que en ambos lotes carentes se observa una disminución a lo largo del proceso y con respecto a los controles, siendo del 40% en el lote II el día 14 y del 62% en el lote III el día 10 en plasma y en en glóbulos rojos del 49% en el lote II el día 14 y del 51% el día 10 en el lote con déficit energético.

El descenso de glutamina en plasma y glóbulos rojos pudiera estar relacionado con un aumento de la demanda de este aminoácido por tejidos como intestino y riñón, que tiene lugar en estados catabólicos. CERSOSIMO y col. (1986) relacionan con un aumento de la amoniogénesis en estos tejidos, aumentando así mismo la captación de amoníaco por el músculo esquelético y

favoreciendo la síntesis de glutamina frente a la de alanina, lo cual constituye un conjunto de cambios adaptativos.

La glutamina, siendo el aminoácido esencial más importante encontrado en plasma y en tejido muscular, contribuye de una manera importante al balance de nitrógeno negativo. Como demostraron ASKANAZI y col. (1980), la disminución de la glutamina provoca la disminución en el músculo de los niveles de aminoácidos esenciales.

5.5.2.3. SERINA, GLICINA, TREONINA Y ALANINA

5.5.2.3.1. Serina

La concentración de serina en plasma (Tabla 13a y Gráfica XIV) aumenta al final de la experiencia en el lote control y en el lote II. Si comparamos el lote II frente al control, aumenta en un 82%, 286% y 188% los días 4, 10 y 14, respectivamente, mientras que en el lote III disminuye, aunque esta disminución no es significativa.

Estos datos concuerdan con los realizados por FELIG y col. (1969), quienes estudiaron la concentración plasmática de aminoácidos en sujetos obesos durante 5-6 semanas con dietas bajas en calorías, observando una disminución de la serina hasta el día 5 y un aumento después del día 5. Igualmente, ADIBI y col. (1973) también señalan aumentos significativos en la serina plasmática en ratas sometidas a una dieta sin proteína.

En glóbulos rojos, la serina (Tabla 24a y Gráfica XIV) también experimenta un aumento significativo frente al control en el lote II de un 88%, 166% y 151% los días 4, 8 y 14, respectivamente, confirmando su activa participación en las modificaciones de los niveles de aminoácidos libres en los distintos tejidos. En el lote III, igual que en plasma, presenta un ligero descenso el día 4.

En el lote II, en el músculo gastrocnemio (Tabla 35a y Gráfica XIV), la serina muestra una evidente tendencia a aumentar, siendo significativo este aumento el día 14 en un 191%. Del mismo modo, ADIBI y col. (1973) observan este aumento en la serina en músculo de ratas sometidas a una dieta sin proteína que también señalan en plasma, en clara coincidencia con nuestras observaciones. Más tarde, SOEMITRO y col. (1989), asimismo, indican niveles mayores de serina en el músculo de ratas al descender el contenido proteico de la dieta. En el lote III, la serina disminuye los días 4 y 10 sin resultar significativa.

5.5.2.3.2. Glicina

La concentración de glicina en plasma (Tabla 13 b y Gráfica XVI) no varía a lo largo del proceso experimental en los lotes control y II y disminuye en el lote III el día 10; sus valores son superiores en el lote II a los del control en un 186%, 257% y 180% los días 4, 10 y 14, respectivamente; aumenta en el lote III el día 4 en un 246% para igualarse a los controles el día 10, de acuerdo con los resultados obtenidos por ADIBI y col. (1973) y SOEMITRO y col. (1989).

En glóbulos rojos (Tabla 24b y Gráfica XVI), la glicina también experimenta un aumento en el lote II con respecto al control de un 140%, 146% y 113% los días 4, 10 y 14, mientras que en el lote con déficit energético disminuye los días 4 y 10 en un 31% y 17% respectivamente. Según DARMAUN y col. (1989), sólo una fracción de la glicina de los glóbulos rojos se puede intercambiar con el plasma. El glutatión, tripéptido rico en glicina que se halla en elevada concentración en los glóbulos rojos, es la fuente principal de este aminoácido.

La glicina en músculo gastrocnemio (Tabla 35b y Gráfica XVI) aumenta los días 4 y 14 en el lote II frente al control en 817% y 95%, respectivamente, y se reduce el día 10 en el lote con déficit energético en un 69%. Este proceso se relaciona con un mayor catabolismo proteico para el grupo carente de aminoácidos aromáticos y la disminución observada en el lote con déficit energético se debe a la síntesis de alanina por transaminación a el piruvato para paliar la falta de energía.

5.5.2.3.3. Treonina

La treonina presenta un aumento en los lotes II y III respecto al control, tanto en plasma como en glóbulos rojos, al igual que sucedía con la serina y la glicina. Sin embargo, en músculo gastrocnemio, la falta de AAA reduce el contenido de treonina en un 45% y 74% los días 10 y 14. Por el contrario, el déficit energético aumenta en un 218% y 380% los días 4 y 10, respectivamente (Tablas 13b, 24b y 35b; Gráfica XVII).

WILDHAM y col. (1989) observan un aumento constante en los niveles de glicina, serina y treonina en plasma de individuos sometidos a restricción calórica, y afirman que estas variaciones se deben a un aumento en la liberación periférica de estos aminoácidos en ayuno.

La serina es, a su vez, precursor de la glicina y está relacionada con la treonina. Por tanto, un aumento en los valores de serina justifica la elevación de la concentración de estos aminoácidos.

TANAKA y col. (1987) afirman que el esqueleto carbonado de la serina y de la glicina se utiliza más para la síntesis proteica que para producir energía. Como en este experimento disminuye la síntesis proteica por la falta de Phe+Tyr+Trp, se favorece la acumulación de estos aminoácidos.

5.5.2.3.4. Alanina

La alanina es el principal aminoácido precursor de la gluconeogénesis en el hígado (FELIG y col., 1970). El músculo interviene de manera importante en la producción de alanina a partir de la transaminación de los aminoácidos al piruvato que proviene de la oxidación de la glucosa.

Incluso durante el ayuno, el músculo capta glucosa para liberarla como alanina en plasma. Para ello, la fuente de nitrógeno no sólo es el catabolismo proteico muscular, sino también la leucina captada por el músculo desde la sangre. Cuando aumenta la concentración sanguínea de leucina, aparece más alanina y glutamina, disminuyendo la oxidación de glucosa en el músculo, ya que se inhibe la oxidación del piruvato.

La alanina es sintetizada "de novo" en grandes cantidades por el músculo, y su liberación es una forma de desintoxicar al organismo de amoníaco; el esqueleto carbonado de la alanina es el mejor sustrato para la gluconeogénesis hepática (CHANG y GOLDBERG, 1978a).

La alanina posee una pequeña actividad inhibitoria de la degradación proteica. Tanto el piruvato como el lactato pueden ser sustituidos por alanina, pero las concentraciones que requieren son 20 veces mayores (POSO y MORTIMORE, 1984).

CHANG y GOLDBERG (1978a) consideran a la alanina como un transportador de nitrógeno en el metabolismo de aminoácidos en el organismo. La liberación de alanina refleja la síntesis "de novo" de los aminoácidos en el músculo esquelético. La alanina tiene un papel importante en la transferencia de los amino producidos por transaminación y desaminación de otros aminoácidos (FELIG y col., 1970).

Para aumentar la actividad del sistema A de transporte, la insulina podría aumentar el flujo unidireccional de metionina y alanina (BONADONNA y col., 1993). El metabolismo de alanina es clave para el sustrato gluconeogénico (FELIG y col., 1970). El aumento del flujo interno de alanina a través del sistema A en respuesta a la insulina podría ocurrir simultáneamente con la inhibición de la proteólisis (GELFAND y BARRETT, 1987; FRYBURG y col., 1991), y limitar el aporte de la alanina muscular para la gluconeogénesis hepática.

La concentración de alanina (Tablas 23b, 24b y 35b; Gráfica XVIII) en plasma aumenta en el lote II frente al control los días 4 y 14 en un 76% y 27% y disminuye en glóbulos rojos los días 4, 10 y 14 en un 30%, 45% y 33%, respectivamente. En músculo gastrocnemio disminuye el día 10 en un 64% para igualarse con el control el día 14. La dieta con déficit energético disminuye el contenido en los tres compartimentos; así, en plasma disminuye el día 10 frente al control en un 54%, en glóbulos rojos en un 53% el día 4 y en 56% el día 10; en músculo gastrocnemio la disminución de este aminoácido el día 10 es del 100%. La alanina es transportada al hígado por la sangre y utilizada por la ruta gluconeogénica para paliar el déficit energético sintetizando glucosa.

5.5.3. AMINOACIDOS AROMATICOS

Las variaciones en la concentración de los aminoácidos aromáticos (AAA) fenilalanina, tirosina y triptófano influyen en la síntesis de catecolaminas y/o serotonina (THURMOND y col., 1990; TACKMAN y col., 1990). El acceso al cerebro de estos aminoácidos depende también de las concentraciones de otros aminoácidos que compiten por el mismo transportador (OLDENDORF Y SZABO, 1976).

Por lo tanto, es importante el aporte equilibrado de aminoácidos al cerebro, que depende de la concentración plasmática de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada. Estos varían con el contenido proteico de la dieta (SOEMITRO y col., 1989).

En ratas a las cuales se les administra una dieta y se mide la liberación de tirosina, se observa que se reduce tanto después de una dieta normal como después de una dieta carente de proteínas, atribuido a la incorporación de la tirosina a las proteínas (GOODMAN y GOMEZ, 1987).

Al estudiar los niveles de catecolaminas, hay un notable incremento en la concentración de tirosina después de la administración de una dieta deficiente en proteínas en el "corpus striatum" y en la "sustancia nigra". Con una dieta deficiente en fenilalanina no se observa este efecto en ambas regiones (VENERO y col., 1992).

Al comparar la concentración de tirosina en plasma del lote II con respecto al control, hay una disminución de un 31%, 40% y 96% y en glóbulos rojos de un 41%, 76% y 50% los días 4, 10 y 14, respectivamente, como consecuencia de la falta de AAA en la dieta. En el músculo se produce un aumento de tirosina libre los días 4 y 14 del 104% y 54% y una disminución el día 10 del 75%. La restricción energética, además de la carencia de AAA, provoca una disminución en el plasma el día 10 del 40% en el lote II y un aumento del 35% el día 10 en el lote III (Tablas 14, 25 y 36).

En glóbulos rojos, la restricción energética del 50% disminuye la concentración de tirosina los días 4 y 10 en un 73% y 35%, respectivamente y en músculo gastrocnemio la concentración de tirosina aumenta el día 4 en un 755% y disminuye el día 10 en un 51%. Los efectos observados se deben tanto a la falta de aminoácidos aromáticos como a la disminución de la ingesta, según podemos observar al comparar los lotes II y IV en los tres compartimentos.

Los descensos concuerdan con los datos obtenidos por ADIBI y col. (1973) y PETERS y HARPER (1985), quienes encuentran una proporcionalidad entre las concentraciones de tirosina y el contenido proteico de la dieta en un margen del 5 al 20% de caseína.

Si se estudian las concentraciones plasmáticas y en glóbulos rojos de fenilalanina libre (Tablas 14, 24 y 36), se observa que a lo largo de la experiencia en el lote control y en el carente de aminoácidos aromáticos no hay variaciones significativas; en músculo gastrocnemio aumenta el día 10 para disminuir el día 14 y recuperar los valores del día 4 del experimento. En el lote III hay un aumento de fenilalanina plasmática y en glóbulos rojos, mientras que en músculo gastrocnemio no se modifica.

Al estudiar el efecto que producen ambas dietas carentes frente a la dieta control, en el lote II no se produce ninguna modificación en la concentración de fenilalanina en plasma y glóbulos rojos con respecto al control; en cambio, en músculo gastrocnemio aumenta los días 4 y 14 en un 16% y 791% respectivamente. Estos efectos se deben principalmente a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta. La concentración de fenilalanina plasmática experimenta un aumento en el lote con déficit energético respecto al control todos los días del experimento y el día 10 en glóbulos rojos. En músculo gastrocnemio no se producen variaciones significativas ya que las enzimas que catabolizan este aminoácido deben estar disminuidas por falta de los aminoácidos aromáticos esenciales fenilalanina y triptófano en la dieta.

En este sentido, PETERS y HARPER (1985), señalan que en ratas alimentadas con dietas con un contenido de caseína inferior al 35%, la fenilalanina plasmática disminuye proporcionalmente, lo cual también ocurre con el triptófano.

El aumento en las concentraciones plasmáticas de fenilalanina y tirosina en el lote III frente al control reflejan el aumento del "turnover" proteico muscular que está teniendo lugar. Las tasas de oxidación e hidroxilación de la fenilalanina son los factores más afectados por una ingesta baja en proteína o restringida en fenilalanina y tirosina (CORTIELLA y col., 1992).

Estos resultados se resumen en la tabla 15 al observa que la suma de aminoácidos aromáticos (AAA) fenilalanina y tirosina en plasma y en la tabla 26 en glóbulos rojos disminuyen mientras que en músculo aumentan en el lote II. El déficit energético aumenta la suma de Phe+Tyr

el día 10 en plasma y no se modifica en glóbulos rojos, mientras que en músculo gastrocnemio disminuye (Tabla 37 y Gráfica XiX).

SUZIC y col. (1987) señalan que la concentración plasmática de la suma de los AAA, así como la de los aminoácidos neutros varía directamente con el contenido proteico de la dieta.

YOUNG (1974) examinó el efecto de la edad en ratas en respuesta a las concentraciones plasmáticas de triptófano, comprobando que en ratas jóvenes se necesita menor cantidad de triptófano para mantener los niveles normales en sangre que en ratas adultas. Si se aumenta la ingesta de triptófano, hay aumento del paso de éste al cerebro, aumentando la síntesis de serotonina. El triptófano compite con los aminoácidos de cadena ramificada, disminuyendo la entrada al cerebro por la barrera hematoencefálica cuando aumentan éstos (FERNSTROM y WURTMAN, 1971).

5.5.4. SUMA DE AMINOACIDOS NEUTROS Y RELACION AAR/AAA EN PLASMA, GLOBULOS ROJOS Y MUSCULO GASTROCNEMIO

Se sabe que el cerebro es uno de los órganos más sensibles a los desequilibrios aminoacídicos provocados por la dieta. El transporte de aminoácidos a través de la barrera hematoencefálica regula la disponibilidad de nutrientes en este órgano (PARDRIDGE, 1983) y muchas de las rutas del metabolismo cerebral se ven influidas por el aporte del precursor correspondiente (WURTMAN y FERNSTROM, 1975). El bajo valor de la Km para el transporte de aminoácidos a través de la barrera hemato-encefálica, en comparación con otros órganos, proporciona las bases de la vulnerabilidad del cerebro de la rata a los cambios en el aporte de aminoácidos (PARDRIDGE y CHOI, 1986). Así, el metabolismo cerebral de la tirosina, triptófano y fenilalanina es función, no sólo de su concentración plasmática en sí misma, sino de la relación de cada uno de estos aminoácidos a la suma de las concentraciones de los restantes aminoácidos neutros que compiten por la entrada al cerebro (FERNSTROM y FALLER, 1978).

Los aminoácidos neutros (AAN) están formados por la suma de los aminoácidos de cadena ramificada (Ile, Leu y Val), junto con los aminoácidos aromáticos (Phe y Tyr). Al analizar los tres compartimentos estudiados en plasma, los aminoácidos neutros aumentan al final del proceso en el lote control y en el lote III y disminuyen en el lote II, variaciones que son semejantes a lo que sucede con la suma de AAA, ya que los AAR no varían salvo en el lote III que también aumenta el día 10.

Al estudiar el efecto de ambas dietas experimentales II y III en plasma frente a la dieta control en la suma de aminoácidos neutros plasmáticos se observa que en el último día del experimento para cada tratamiento hay una disminución en el lote II (68%) y un aumento en el lote III (107%). *Estas modificaciones siguen las mismas variaciones que se observan en la suma de AAA para el lote II y el aumento en la suma de AAA para el lote III el día 10.*

La reducción simultánea de los valores en el plasma de todos los AAN que provocan la dieta carente de Phe+Tyr+Trp, impide posibles fenómenos de competencia en el transporte, según afirman PARDRIDGE y CHOI (1986), en el sentido de que el contenido cerebral de cualquiera de los aminoácidos neutros es función directa de su nivel plasmático e inversa de *cualquiera o la totalidad de los restantes aminoácidos neutros en el plasma.*

Debido a la disminución que se produce en la suma de AAA en plasma (Tabla 15) en el lote II el día 14, la relación AAR/AAA aumenta ese día al compararlo con el control; en cambio, en el lote III el aumento en la relación AAR/AAA los días 4 y 10 del experimento se debe a la *disminución de la suma de los AAA el día 4 y al aumento el día 10 de la suma de AAR.*

En glóbulos rojos, cuyo papel es movilizar los aminoácidos hacia zonas de menor concentración (AOKI y col., 1972), se observa a lo largo del período experimental que únicamente *aumenta la suma de AAN en el lote III el día 10, no significativamente (Tabla 26).* El tratamiento dietario impuesto a los animales de experimentación hizo que en el lote II no se dieran diferencias significativas con respecto al control los días 4, 10 y 14. En el lote III sólo los AAN disminuyen frente al control el día 4 debido a la disminución de la suma de AAA por disminución de la ingesta aumentando el día 10 (por aumento exagerado de los AAR), aunque este valor del día 10 no es significativo.

La relación AAR/AAA en glóbulos rojos aumenta en el lote carente de Phe+Tyr+Trp el día 10 en un 255% y el día 14 en un 149% por el descenso de la suma de AAA esos días al compararlo con el control. En cambio, en el lote III con restricción energética añadida, se produce un aumento de dicha relación todos los días del experimento al compararlos con el control, *debido a las disminuciones de la suma de los AAA los días 4 y 10 y al aumento en el contenido de AAR el día 10.*

En músculo gastrocnemio, los AAN (Tabla 37) por efecto de las dos dietas se comportan de igual forma que los AAA y AAR, a excepción de los AAN el día 4 tanto el lote II como el lote III; los valores no se modifican con respecto al lote control por el efecto compensador de los AAA ese día.

En músculo gastrocnemio los AAR y los AAA se modifican de forma semejante a lo largo del período experimental, exceptuando los AAN del lote II y del lote III el día 4; mientras los

AAA en el lote II aumentan, los AAR también aumentan, mientras en el lote III los AAA aumentan y los AAR disminuyen. Por lo tanto, dicha relación no se modifica para los lotes II y III ese día, y sí aumentan el día 14 para el lote II y disminuyen el día 10 para el lote III por aumentar más los AAR y disminuir más los AAA ese día.

5.5.5. AMINOACIDOS BASICOS Y AZUFRADOS

La arginina es un aminoácido que interviene en el ciclo de la urea del hígado en las reacciones de detoxificación de amonio del organismo cuando las ingestas proteicas son elevadas. Alternativamente, la ruta podría facilitar la conservación de nitrógeno cuando las ingestas son bajas.

Las concentraciones de arginina libre en plasma (Tabla 16) no se modifican a lo largo del período experimental en el lote control; en cambio, en el lote carente de aminoácidos aromáticos aumenta los días 10 y 14 al compararlos con el día 4, como también sucede en la restricción energética.

Al estudiar el efecto que ambas dietas experimentales producen frente a la dieta control, se observa un aumento de la concentración de arginina libre en plasma en el lote II el día 14, mientras que en el lote III no se produce ninguna variación respecto al lote control. Este efecto se debe a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta. En glóbulos rojos (Tabla 27), al final de la experiencia no hay modificaciones en la concentración de arginina en ambos lotes carentes respecto al control, y en músculo gastrocnemio (Tabla 38) disminuye la arginina el día 14 un 77% por efecto de la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta, y aumenta el día 10 en el lote con déficit energético en un 127%.

La concentración de histidina libre en plasma no se modifica durante el período experimental en ninguno de los lotes. La carencia dietaria de Phe+Tyr+Trp junto con la restricción energética de los lotes II y III provoca un descenso en plasma que fué significativo el día 14 en un 50% para el lote II y del 38% y del 46% para los días 4 y 10 en el lote III. Este efecto se debe tanto a la falta de aminoácidos aromáticos como a la disminución de la ingesta, como se deduce de la comparación de los lotes II y IV, y por el déficit energético en el lote III. Estos datos coinciden con los obtenidos por PETERS y HARPER (1987) y por SOEMITRO y col. (1989) en estudios con ratas sometidas a dietas sin proteínas.

En glóbulos rojos, la histidina libre aumenta en el lote control al final de la experiencia, y disminuye en ambos lotes carentes, siendo los días 10 y 14 para el lote II del 56% y 26% con respecto al día 4 y para el lote III del 99% el día 10. Si se comparan ambos lotes carentes

frente al control los distintos días del experimento, se observa que a partir del día 10 hay una disminución en la concentración de histidina del 48% y 49% los días 10 y 14 en el lote II y del 51% el día 10 para el lote III. En el lote II, la disminución se debe tanto a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta como a la disminución de la ingesta que éstos provocan. En el lote III se debe a la falta de energía.

La histidina es particularmente abundante en la hemoglobina y en la carnosina, un dipéptido presente en gran proporción en el músculo. Se ha sugerido que durante la privación de histidina, estos "pools" pueden ser movilizados y pueden mantener el balance de nitrógeno normal o positivo durante largos períodos de tiempo (NASSET y GATEWOOD, 1956).

TERRY y col. (1977) llevaron a cabo un experimento en hombres sanos a los cuales se les administró nutrición parenteral durante 27 días con una preparación de aminoácidos proporcionando todos los aminoácidos esenciales excepto la histidina. Tanto la histidina en plasma como en orina disminuyeron rápidamente y se mantuvieron bajas durante todo el período de estudio. Cuando se administra histidina, los valores de ésta en plasma y en orina vuelven a su valor normal.

SHENG y col. (1977) observan alteraciones en la flora intestinal durante estos estudios, poniendo de manifiesto la importancia de la histidina para la flora intestinal.

CHO y col. (1984) sometieron a individuos sanos a dietas deficientes en histidina durante 8 semanas, demostrando que el balance de nitrógeno se hace negativo y que las concentraciones de hemoglobina y de hematocrito descienden mientras que los niveles de hierro aumentan significativamente. Al introducir histidina en la dieta, el balance de nitrógeno vuelve rápidamente a ser positivo.

En músculo gastrocnemio (Tabla 38), la concentración de histidina disminuye en ambos lotes carentes con respecto al control, siendo en el lote II los días 4 y 10 de un 51% y 72% y aumenta el día 14 en un 483% debido a la falta de AAA en la dieta. En el lote III, el descenso de histidina muscular es mayor el día 10, del orden del 88%, debido a la restricción energética. Estos resultados concuerdan con los de MERCER y col. (1989), quienes asocian la deficiencia proteica y de aminoácidos esenciales con la elevación de histidina en músculo, y con los de PARKER y col. (1985), que indican que este aumento es consecuencia del mayor catabolismo de la hemoglobina, de la degradación de la carnosina (β -alanil-histidina), y del menor catabolismo de la histidina, coincidiendo con el aumento observado para el lote II el día 14.

La metionina es uno de los aminoácidos iniciadores de la síntesis proteica. La insulina aumenta el flujo unidireccional de metionina y alanina activando el sistema A de transporte

(BONADONNA y col., 1993). La metionina podría estar disponible desde el "pool" circulante para apoyar la transulfuración, transmetilación y la formación de metionina t-RNA en el músculo.

A lo largo de la experiencia no se modifican los valores de metionina (Tablas 17, 28 y 39) en los lotes control y carentes de Phe+Tyr+Trp en plasma y músculo gastrocnemio, mientras que disminuye en glóbulos rojos el día 14 en el lote II; el lote III aumenta a lo largo del proceso experimental en plasma y glóbulos rojos, y no varía en músculo gastrocnemio. Si se comparan los lotes carentes con el control los distintos días de la experiencia, se observa una reducción del contenido plasmático de metionina en el lote II el día 10 que es del orden del 84% y el día 14 del 32%. En el lote con déficit energético aumentan los niveles plasmáticos de metionina los días 4 y 10 en un 210% y 26%, respectivamente.

En glóbulos rojos, la disminución observada en el lote II se hace significativa el día 14, siendo del 75% debido a la falta de AAA en la dieta. Los valores de metionina para el lote III los días 10 y 14 no difieren de los controles.

En músculo gastrocnemio no se observan variaciones significativas por efecto de las tres dietas en la concentración de metionina libre los días 4, 10 y 14 y tampoco al comparar ambas dietas carentes con la dieta control esos días.

La taurina es uno de los aminoácidos libres más abundantes en el cuerpo humano y no se incorpora a las proteínas (JACOBSEN y SMITH, 1968). Sus funciones biológicas son la formación de los ácidos biliares conjugados. La taurina también está implicada como neurotransmisor (HUXTABLE y BRESSLER, 1973) y tiene un papel fundamental en el cerebro y en el desarrollo del sistema nervioso (STURMAN y GAULL, 1975), así como en la función cardíaca (AZUMA y col., 1985).

Los niños poseen un elevado "pool" de taurina, presumiblemente procedentes de la madre. La taurina está presente en elevadas cantidades en la placenta (PHILLIPS y col., 1978).

La concentración de taurina en plasma (Tabla 17) disminuye en el lote control y en el lote II el día 10, para igualarse el día 14 al día 4, mientras que en el lote III aumenta ese día. Al comparar el efecto de las dietas carentes con el control los distintos días, se observa un aumento de taurina los días 10 y 14 en el lote II que fué del 89% y del 13%, respectivamente y en el lote III el día 10 fué del 174%. En glóbulos rojos (Tabla 28) no se observan modificaciones ni por las dietas administradas a lo largo del tiempo, ni por la carencia de AAA y energía frente a controles.

En músculo gastrocnemio (Tabla 39) se observa un aumento por falta de AAA en la dieta el día 10 que fué del 247%, para igualarse a los controles el día 14. La restricción energética no alteró los valores de taurina libre frente al control los días 4 y 10.

Las modificaciones observadas se deben más bien a la falta de AAA en la dieta en plasma y músculo gastrocnemio.

5.5.6. AMINOACIDOS ESENCIALES, NO ESENCIALES, RELACION AAE/AANE Y AMINOACIDOS TOTALES

En plasma, la suma de aminoácidos esenciales (AAE) aumenta al final del período experimental en los 3 lotes estudiados (control, lote II y lote III). En glóbulos rojos no se modifican a lo largo del proceso, mientras que en músculo gastrocnemio aumenta el día 10 en el lote control para igualarse al día 4 el día 14; aumentan en el lote II y no se modifican en el lote III (Tablas 18, 29 y 40; Gráficas XX y XXI).

Al observar el efecto que producen en ambas dietas carentes los lotes II y III respecto al control, en el lote II la suma de AAE en plasma y glóbulos rojos no varía respecto al control, mientras que en músculo gastrocnemio disminuye en un 60% y aumenta el día 14 en un 129%. En cuanto a los resultados obtenidos para el lote III, no se produce ninguna modificación en plasma y glóbulos rojos, mientras que en músculo gastrocnemio disminuye el día 10 en un 56%.

La suma de aminoácidos no esenciales (AANE) en plasma no sufre ninguna modificación en ambas dietas experimentales respecto a la dieta control; en glóbulos rojos únicamente hay una disminución en la suma el día 10 en el lote III por efecto de la restricción energética impuesta, debido a las disminuciones individuales paralelas de alanina, glutámico y glutamina, que son utilizadas con fines energéticos para paliar el déficit dietario. En músculo gastrocnemio los AANE aumentan por efecto de la dieta carente de Phe+Tyr+Trip el día 4 en un 172% y disminuyen el día 10 por efecto de la reducción energética de la dieta en un 49%.

La relación AAE/AANE, en plasma aumenta en el lote III el día 10 respecto al día 4 y al compararlo con el lote control, debido a la invariabilidad de la suma de AAE y a una ligera disminución en la suma de AANE. En glóbulos rojos esta relación no se modifica por efecto de las dietas II y III y sólo se produce un aumento en el lote III el día 10 respecto al día 4, debido a la disminución en la suma de AANE. En músculo gastrocnemio hay un aumento de esta fracción el día 14 en el lote II, consecuencia del aumento de los AAE. La restricción energética impuesta al lote III

no modifica dicha relación porque los AAE y AANE se modifican por igual. Las variaciones observadas se deben a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta.

MUNRO (1982) muestra que la deficiencia proteica produce una reducción aproximadamente del 50% de los AAE y AANE en plasma. LUNN y col. (1976) obtienen resultados similares en músculo e hígado, aunque relativamente menores.

WANNEMACHER y ALLISON (1968) observan que las concentraciones de aminoácidos están relacionadas con el grado de deplección de nitrógeno corporal. Asimismo, señalan que en plasma e hígado las concentraciones de AAE disminuyen más rápidamente que las de AANE, pero en músculo se produce una pequeña disminución hasta alcanzar la etapa más severa de deplección. Además, encuentran un ligero aumento en los AANE.

Los aminoácidos totales en plasma aumentan en el control el último día de la experiencia y no se modifican a lo largo del tiempo en los lotes II y III. Si se comparan los efectos de ambas dietas carentes frente al lote control, se observa únicamente en el lote II un aumento significativo del 35% el día 10 que se iguala al control el día 14. Ello es debido a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta. La reducción energética dietaria no modifica la suma de los AAT en plasma con respecto al control el día 14. En glóbulos rojos no se modifican en los lotes carentes ni se observan modificaciones significativas, salvo el día 4 en el lote II que aumenta en un 24% para igualarse a los controles los días 10 y 14 y en el lote III el día 10 que disminuye en un 25%, no siendo este descenso significativo.

En músculo gastrocnemio hay un aumento en el lote control que se hace patente el día 10 y se mantiene el día 14 con respecto al día 4. En los lotes carentes de AAA y con reducción energética, aumenta el día 4 en un 116%, disminuye el día 10 en un 44% y no varía el día 14 con respecto al lote control. La reducción energética en la dieta disminuye el contenido de AAT libres el día 10 en un 52%, debido a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta y al déficit energético. También la reducción, tanto de los AAE como de los AANE puede ser debida a la utilización de los mismos con fines gluconeogénicos para mantener los niveles de glucosa en sangre y así suministrar este metabolito al cerebro para su supervivencia.

5.5.7. RELACIONES ENTRE AMINOACIDOS: Ile/AAN-Ile, Leu/AAN-Leu, Val/AAN-Val, Phe/AAN-Phe, Tyr/AAN-Tyr, Phe/Tyr, Ala/Tyr, Ala/Leu, Ala/AAR, Ser+Gli+Ala/AAR y Gly/Val

Si se estudian las relaciones de aminoácidos libres Ile/AAN-Ile, Leu/AAN-Leu y Val/AAN-Val (Tablas 19, 30 y 41), que representan la proporción entre cada uno de los aminoácidos de cadena ramificada y la suma de aminoácidos neutros exceptuando el aminoácido al que nos referimos, reflejan la competitividad por los mismos sistemas transportadores entre cada uno de ellos y los restantes. Se observa en plasma para las dos primeras relaciones que no se producen modificaciones en ambos lotes carentes con respecto al control, con la excepción del aumento que aparece en el lote II el último día de la experiencia para la relación Leu/AAN-Leu que fue del 269% y en el lote III el día 4 para la relación Ile/AAN-Ile. La relación Val/AAN-Val aumenta en ambos lotes carentes al final del experimento con respecto al control el día 14 en un 375% y en un 200% y 47% los días 4 y 10 respectivamente para el lote III.

En glóbulos rojos, la relación Ile/AAN-Ile no experimenta ninguna modificación en los lotes II y III frente al control y a la relación Leu/AAN-Leu aumenta en el lote III al final de la experiencia respecto al lote control en un 90%, y para Val/AAN-Val aumenta en el lote III respecto al control durante todo el proceso el día 4 en un 250% y el día 10 en un 103%, respectivamente, mientras que en el lote II aumenta el día 10 en un 55% y no varía respecto al control al final de la experiencia.

En músculo gastrocnemio, Ile/AAN-Ile y Leu/AAN-Leu no varían, exceptuando el aumento de Ile/AAN-Ile el día 4 en el lote II en un 15% y la disminución en el lote III ese día en un 46% con respecto al control y la disminución el día 4 de la relación Leu/AAN-Leu en un 66%. La relación Val/AAN-Val aumenta a lo largo del período experimental en los tres lotes, pero ambos lotes carentes disminuyen frente al control, siendo significativo el día 10 para el lote II (21%) y para el lote III el día 4 (71%). Estas variaciones son debidas a la falta de AAA en la dieta y a la reducción energética en el lote II y III, respectivamente.

Las relaciones Phe/AAN-Phe, Tyr/AAN-Tyr y Phe/Tyr (Tablas 20, 31 y 42) completan la descripción de la proporción entre los aminoácidos aromáticos estudiados y la suma del resto de los AAN. En plasma la relación Phe/AAN-Phe no se modifica en ambos lotes carentes al final del período experimental con respecto al control, Tyr/AAN-Tyr disminuye en el lote II el día 14 en un 95% y en el lote III el día 10 disminuye en un 47%. La relación Phe/Tyr (Gráfica XXI) aumenta

en un 465% el día 14 en el lote II debido a la marcada disminución de tirosina y aumenta en un 322% el día 10 en el lote III.

En glóbulos rojos, igual que en plasma, la relación Phe/AAN-Phe no se modifica al final del proceso en ambos lotes carentes respecto al control; la relación Tyr/AAN-Tyr disminuye en un 76% en el lote II el día 10 respecto al control y el día 14 se iguala al control; en el lote III disminuye en un 71% el día 10. La relación Phe/Tyr en glóbulos rojos, no se modifica en el lote II. En el lote III aumenta con respecto al control el día 4 en un 400% y el día 10 sigue aumentando, sin llegar a ser significativo con respecto al control debido al aumento de la fenilalanina y a la disminución de la tirosina en el lote III esos días.

En músculo gastrocnemio, la relación Phe/AAN-Phe aumenta en el lote II con respecto al control el día 14 en un 60% y en el lote III disminuye el día 4 en un 44% comparado con el control. La relación Tyr/AAN-Tyr disminuye en el lote II el día 10 en un 46% y no varía los días 4 y 14; la restricción energética hace que esta relación aumente el día 4 comparándola con el grupo control en un 56% y disminuye el día 10 en un 38%. La relación Phe/Tyr aumenta, aunque no de forma significativa en el lote II con respecto al control los días 4, 10 y 14, debido principalmente al aumento de la fenilalanina. En el lote III disminuye con respecto al control el día 4 en un 86%, debido al aumento de la tirosina; el día 10 se iguala al lote control por descenso de la tirosina libre.

Las fracciones Ala/Tyr, Ala/Leu y Ala/AAR (Tablas 21, 32 y 43) están relacionadas con el metabolismo de la glucosa. En plasma siguen un mismo perfil de variación determinado por las variaciones que experimenta la alanina, principal sustrato gluconeogénico. Al comparar el efecto de ambas dietas experimentales con respecto a la dieta control, se observa en el lote II un aumento en las tres relaciones el día 14 del experimento debido al incremento de las concentraciones de alanina plasmática. La restricción energética impuesta al lote III hace que la alanina disminuya en plasma al final del proceso experimental, lo cual hace que estas relaciones disminuyan al ser utilizada la alanina con fines gluconeogénicos.

En glóbulos rojos, se observa en el lote II que la relación Ala/Tyr (Gráfica XXIII) el día 10 aumenta debido principalmente a la disminución de Tyr; este aumento se mantiene hasta el final del proceso, pero fué menos importante ya que la disminución de Tyr es menos marcada, y la concentración de alanina en glóbulos rojos es también más baja. La relación Ala/Leu (Gráfica XXIV) no experimenta ninguna modificación en el lote II y sí en el lote III que disminuye el día 10 en un 77% con respecto al lote control, debido principalmente a la disminución de la alanina. La relación Ala/AAR (Gráfica XXV), disminuye únicamente en el lote III los días 4 y 10 en un 37% y 80%, respectivamente, debido a ser utilizado este aminoácido por gluconeogénesis para producir glucosa y suplir así la falta energética de la dieta.

En músculo gastrocnemio, las relaciones Ala/Tyr, Ala/Leu y Ala/AAR disminuyen por el efecto de ambas dietas carentes con respecto al control los últimos días de la experiencia, es decir, el día 14 para el lote II y el día 10 para el lote III, a excepción de la relación Ala/Tyr que no varía el día 10 en el lote III con respecto al control, debido al descenso de alanina y tirosina. Los descensos de estas relaciones se deben a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta para el lote II y al déficit energético para el lote III.

Las relaciones Ser+Gli+Ala/AAR y Gly/Val (Tablas 22, 33 y 44; Gráfica XXVI) aumentan en plasma en el lote II los días 4, 10 y 14 en un 187%, 135% y 279% para la primera fracción y para la fracción Gly/Val en un 317%, 57% y 152%, respectivamente, frente al control. En el lote III hay aumento el día 4 en un 220% y 317%, respectivamente; en el día 10 disminuye en un 70% la relación Ser+Gli+Ala/AAR, y en un 56% la fracción Gly/Val, pero no significativamente.

En glóbulos rojos, Ser+Gli+Ala/AAR y Gly/Val se comportan igual a lo que sucede en plasma, es decir, aumentan ambas fracciones en el lote II y en el lote III aumenta el día 4 y disminuye el día 10, siendo esta disminución de Ser+Gli+Ala/AAR significativa.

FAUS y col. (1984) también encontraron valores más elevados en estos índices medidos en plasma de niños con malnutrición proteico-calórica.

En músculo gastrocnemio, del mismo modo que sucede en plasma y glóbulos rojos, la fracción Ser+Gli+Ala/AAR aumenta los días 4 y 10 para el lote II y disminuye el día 14 frente al control. La restricción energética añadida a la dieta carente de Phe+Tyr+Trp disminuye dicha fracción significativamente en un 44% el día 10.

La fracción Gly/Val en músculo gastrocnemio no se modifica al final de la experiencia en el lote II, mientras que en plasma y glóbulos rojos aumenta ese día. La restricción energética disminuye la fracción el día 10, como también sucede en plasma y glóbulos rojos. La finalidad es suministrar, por transaminación de los aminoácidos con el piruvato, la formación de alanina que genera glucosa por gluconeogénesis en el hígado mediante el ciclo glucosa-alanina.

6. CONCLUSIONES

Esta tesis tiene como finalidad estudiar el efecto de la malnutrición proteica y proteico-energética inducida en ratas Wistar macho, mediante el suministro de dietas sintéticas de aminoácidos cristalinos carentes de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (lote II) y carentes de fenilalanina, tirosina y triptófano con la mitad de energía del lote II (lote III) frente a un control alimentado con 10% de proteína (Caseína 9.8 % + DL-Metionina 0.2 %), con el objeto de cuantificar las variaciones de algunos parámetros que pueden constituirse en índices de malnutrición, así como la administración de una dieta IV (lote IV) igual a la dieta control, pero suministrada "pair fed" con respecto a la dieta II con la finalidad de distinguir los efectos de la disminución de la ingesta de la falta de aminoácidos aromáticos (Phe+Tyr+Trp).

Para ello, además de determinar constantes sanguíneas y urinarias de tipo general, se ha caracterizado la respuesta metabólica del tejido muscular a la ausencia de aminoácidos aromáticos en la dieta mediante la determinación de sus componentes intracelulares y enzimáticos implicados en el metabolismo proteico.

Así mismo, se han valorado las modificaciones en los niveles de aminoácidos libres en el músculo gastrocnemio y su relación con las concentraciones de los mismos en el plasma y los glóbulos rojos de la sangre.

De los resultados obtenidos se pueden deducir las siguientes conclusiones:

Referentes al animal:

- 1ª. La ausencia de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano en la dieta sin restricción de energía o con limitaciones de la misma a la mitad, provoca un conjunto de manifestaciones que se enmarcan dentro de una malnutrición proteica y proteico-calórica, respectivamente.
- 2ª. La administración de ambas dietas experimentales a ratas en crecimiento produce una disminución de la ingesta a lo largo del proceso experimental. El deterioro físico al que conduce esta situación limita su viabilidad hasta el día 12 del experimento en el lote III.
- 3ª. El peso corporal disminuye en ambos lotes carentes al compararlos con el control, más por la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta que por la disminución de la ingesta.

- 4^a. Debido a la elevada pérdida de nitrógeno corporal que se produce con las dietas deficitarias, tiene lugar una disminución del balance de nitrógeno que llega a alcanzar valores negativos en los animales sometidos a restricción energética (lotes II y III).

Referentes a los resultados obtenidos en orina:

- 1^a. La producción de urea aumenta con ambas dietas carentes reflejando la disminución de la síntesis proteica y el aumento de la proteólisis muscular.
- 2^a. El contenido de creatinina en orina disminuye al final de la experiencia con ambos tratamientos debido a una menor masa muscular.
- 3^a. El contenido de 3-metilhistidina en orina únicamente aumenta en el lote II el día 10 con respecto al control.

Referentes a los resultados obtenidos en sangre:

- 1^a. Ambas dietas carentes producen un efecto hipocolesterolémico al final de la experiencia con respecto al grupo control.
- 2^a. La glucemia e insulinemia disminuyen al final del proceso experimental con ambas dietas carentes.
- 3^a. La disminución de la relación insulina/glucosa en ambos lotes carentes provoca una disminución de la sensibilidad a la insulina.

Referentes a los resultados obtenidos en músculo gastrocnemio:

- 1^a. Las limitaciones de la ingesta impuestas por la carencia de aminoácidos aromáticos provocan una disminución del peso del músculo gastrocnemio, así como de su contenido de proteínas solubles, mientras que el peso relativo no varía.
- 2^a. La tasa de DNA disminuye ligeramente en los lotes II y III debido a un aumento de la degradación por una mayor actividad DNAsa. Igualmente disminuye el número de núcleos en los lotes carentes, mientras que la actividad DNAsa/mg proteína aumenta en dichos lotes.

- 3^a. El tamaño celular o unidad de masa por célula disminuye ligeramente el día 10 en ambos lotes carentes, debido a la disminución del peso del músculo a lo largo del proceso experimental.
- 4^a. La falta, tanto de aminoácidos aromáticos como el déficit energético, provocan una reducción mayor de la síntesis del RNA que de su catabolismo, a pesar del descenso de la actividad RNAsa ácida, tanto por órgano como por mg de proteína, que tiende a impedir la degradación del RNA.
- 5^a. La relación RNA/DNA disminuye en ambos lotes carentes como consecuencia de la falta de aminoácidos aromáticos y de la disminución de la insulina, reflejando la función de esta hormona en la síntesis del RNA. En cuanto a las relaciones RNAsa/RNA y RNAsa/DNA, sólo aumentan el día 4 en ambos lotes carentes.
- 6^a. Las actividades fosfatasa ácida y alcalina y β -D-glucuronidasa por órgano disminuyen de forma general a lo largo del período experimental en ambos lotes carentes frente al control. Esto, junto al hecho de que disminuye el peso del músculo gastrocnemio, refleja la posible involución del mismo.
- 7^a. Las actividades transaminasas GOT y GPT disminuyen en ambos lotes carentes, debido a la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta.

Referentes a las variaciones en las concentraciones de aminoácidos en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio:

- 1^a. Los aminoácidos de cadena ramificada en plasma aumentan en el lote III el día 10, tanto en plasma como en glóbulos rojos, debido principalmente a leucina y valina, por un aumento de la proteólisis por déficit energético o por una inhibición de la proteosíntesis. Este aumento va acompañado de una disminución plasmática de insulina. En músculo gastrocnemio aumenta en el lote II por aumento de isoleucina, leucina y valina, predominando este último.
- 2^a. Respecto a los aminoácidos gluconeogénicos, destacar los aumentos de glicina y treonina en plasma y glóbulos rojos en ambos lotes carentes y la disminución de glutamina, ácido glutámico y alanina en los tres compartimentos estudiados, sobre todo en el lote con déficit energético.

- 3^a. En los aminoácidos aromáticos, hay disminución de tirosina en plasma y glóbulos rojos en el lote II todos los días de la experiencia como consecuencia de la falta de aminoácidos aromáticos en la dieta, y aumento en músculo gastrocnemio. En el lote III aumenta en plasma y disminuye en músculo gastrocnemio. La fenilalanina aumenta en el lote II en el músculo gastrocnemio y en el lote III en plasma y glóbulos rojos.
- 4^a. Los aminoácidos neutros en plasma aumentan en el lote III y disminuyen en el lote II en el último día de la experiencia. En glóbulos rojos sólo aumenta en el lote III, mientras que en músculo gastrocnemio aumentan en el lote II y disminuyen en el lote III.
- 5^a. En los aminoácidos básicos se observa un aumento en plasma en el lote II el día 14 de la arginina, no modificándose ésta en glóbulos rojos, y disminuyendo en músculo gastrocnemio el día 14 en el lote II y sólo aumenta en este órgano el día 10 en el lote III. La histidina disminuye en ambos lotes carentes en los tres compartimentos estudiados, exceptuando el aumento en el lote II el día 14 en el músculo gastrocnemio.
- 6^a. Con respecto a los aminoácidos azufrados, la metionina disminuye en plasma los días 10 y 14 en el lote II, aumentando en el lote III, mientras que disminuye en el lote II en glóbulos rojos y no varía en ambos lotes carentes todos los días de la experiencia en músculo gastrocnemio. La taurina aumenta en plasma en el lote II todos los días de la experiencia, aumentando en el lote III el día 10; no varía en glóbulos rojos y aumenta en músculo gastrocnemio solamente el día 10 en el lote II.
- 7^a. La suma de aminoácidos esenciales (AAE) no varía en los lotes II y III respecto al control en plasma y glóbulos rojos, mientras que en músculo gastrocnemio en el lote II disminuye el día 10 y aumenta el día 14, y en el lote III disminuye el día 10.
- 8^a. La suma de aminoácidos no esenciales (AANE), de forma general, no varía respecto al control en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio en el lote II, y en el lote III disminuyen en los tres compartimentos.
- 9^a. La relación AAE/AANE en plasma aumenta en el lote III el día 10 respecto al día 4 y al compararlo con el lote control ese día, debido a la invariabilidad de la suma de AAE y a una ligera disminución en la suma de AANE. En glóbulos rojos esta relación no se modifica por efecto de las dietas II y III y sólo se produce un aumento en el lote III el día

- 10 respecto al 4, debido a la disminución en la suma de AANE. En músculo gastrocnemio hay un aumento de esta fracción el día 14 en el lote II, consecuencia del aumento de los AAE.
- 10^a. Respecto a los aminoácidos totales (AAT), en plasma únicamente se observa en el lote II un aumento el día 10 que se iguala al control el día 14. En glóbulos rojos hay aumento en el lote II el día 4 y disminución en el lote III el día 10. En músculo gastrocnemio, en el lote II aumentan el día 4 y disminuyen el día 10.
- 11^a. Ile/AAN-Ile, Leu/AAN-Leu y Val/AAN-Val. En plasma y glóbulos rojos aumentan el último día de la experiencia Leu/AAN-Leu y Val/AAN-Val en ambos lotes carentes frente al control y en músculo gastrocnemio disminuyen en el lote II y no varían en el lote III.
- 12^a. Phe/AAN-Phe, Tyr/AAN-Tyr y Phe/Tyr. En plasma y glóbulos rojos, la relación Tyr/AAN-Tyr disminuye en los lotes II y III y la relación Phe/Tyr aumenta. En músculo gastrocnemio, aumentan las tres relaciones al final del período experimental en el lote II y sólo disminuye Tyr/AAN-Tyr el día 10 en el lote III.
- 13^a. Ala/Tyr, Ala/Leu y Ala/AAR en plasma en el lote II aumentan el día 14 y en el lote III el día 10 disminuyen por ser utilizadas con fines gluconeogénicos. En glóbulos rojos en el lote II no se modifican y en el lote III disminuyen significativamente. En músculo gastrocnemio disminuyen estas tres relaciones en el lote II y en el lote III Ala/Tyr no varía, mientras que Ala/Leu y Ala/AAR disminuyen.
- 14^a. Ser+Gly+Ala/AAR y Gly/Val en plasma aumentan en el lote II el día 14 y en el lote III el día 10 disminuyen. En glóbulos rojos aumentan en el lote II frente al control el día 14 y disminuyen el día 10 en el lote III. En músculo gastrocnemio disminuyen ambas relaciones en los lotes II y III al final de la experiencia.

7. RESUMEN

De todas las conclusiones obtenidas se resume que la carencia de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano en la dieta y de éstos con restricción energética del 50%, provoca un estado de malnutrición proteica y proteico-calórica, respectivamente, causando en los animales de experimentación:

Disminución de la ingesta, del peso corporal y del balance de nitrógeno; aumento de urea y disminución de creatinina en orina; disminución del colesterol, insulina y glucosa en plasma.

En músculo gastrocnemio provocan disminución del peso, contenido de proteínas solubles y de DNA, por aumento de la actividad actividad DNAsa y descenso en el número de núcleos y tamaño celular. El contenido de RNA disminuye debido a la disminución de su síntesis, a pesar del descenso de la actividad RNAsa que tiende a impedir la degradación del mismo. También disminuyen las actividades fosfatasa ácida y alcalina, β -D-Glucuronidasa, así como las actividades transaminasas GOT y GPT.

Respecto a las concentraciones de aminoácidos libres en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio, se observa un aumento de los aminoácidos de cadena ramificada por aumento de la proteólisis muscular. Respecto a los aminoácidos gluconeogénicos se observa un ligero aumento de todos ellos en el lote II y disminución en el lote III por ser utilizados con fines energéticos.

Los aminoácidos básicos disminuyen en plasma y glóbulos rojos, mientras que en músculo gastrocnemio aumenta la histidina. De los aminoácidos azufrados disminuye la metionina y aumenta la taurina en los tres compartimentos por efecto de ambas dietas carentes. Los aminoácidos esenciales no varían en plasma y glóbulos rojos, disminuyen en músculo gastrocnemio el día 10 y aumentan el día 14, mientras que los aminoácidos no esenciales disminuyen en los tres compartimentos en el lote III.

Los aminoácidos totales, de forma general, aumentan en los tres compartimentos en el lote II y disminuyen en el lote III, ya que se utilizan con fines gluconeogénicos.

8. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, S.O.; NISSLEY, S.P.; HANDWERGER, S.; RECHLER, M.M. (1983). "Developmental patterns of insulin-like growth factor-I and -II synthesis and regulation in rat fibroblasts". *Nature*, 302: 150-153.
- ADIBI, S.A.; GRAY, S.J.; MENDEN, E. (1967). "The kinetics of amino acids absorption and alteration of plasma composition of free amino acid after intestinal perfusion of amino acid mixtures". *Am. J. Clin. Nutr.*, 20: 24.
- ADIBI, S.A.; MODESTO, T.A.; MORSE, E.L.; AMIN, P.M. (1973). "Amino acid levels in plasma, liver and skeletal muscle during protein deprivation". *Am. J. Physiol.*, 225: 408-414.
- ALBANESE, A.A. (1952). "The effects of amino acid deficiencies in man". *J. Clin. Nutr.*, 1: 44-51.
- ALBERTSE, E.C.; GARLICK, P.J.; PAIN, V.M.; REEDS, P.J.; WATKINS, P.J.; WATERLOW, J.C. (1979). "Effects of insulin treatment on protein turnover in adult diabetics". *Proc. Nutr. Soc.*, 38: 90A.
- ANDERSON, H.L.; HEINDEL, M.B. (1969). "Effect on nitrogen balance of adult man of varying source on nitrogen and level of calorie intake". *J. Nutr.*, 99: 82-90.
- AOKI, T.T.; BRENNAN, M.F.; MULLER, W.A.; MOORE, F.D.; CAHILL, G.F. Jr. (1972). "Effect of insulin on muscle glutamate uptake". *J. Clin. Invest.*, 5: 2889-2894.
- AOKI, T.T.; FINLEY, R.J.; CAHILL, G.F. (1977). "The redox state and regulation of amino acid metabolism in man". *Biochem. Soc. Symp.*, 43: 17-29.
- AUSMAN, L.M.; GALLINA, D.L.; HEGSTED, D.M. (1989). "Protein-calorie malnutrition in squirrel monkeys: adaptive response to calorie deficiency". *Am. J. Clin. Nutr.*, 50: 19-29.
- APFELBAUM, M.; BOSTSARRON, J.; BRIGANT, L. (1969). "La diminution de la consommation basale d'oxygene sous l'effet d'une restriction calorique chez des sujets en bilan d'azote équilibré" *Rev. Franc. Etud. Clin. Biol.*, 14: 361-372.
- ARDAWI, M.S.M. (1991). "Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition on septic rats". *Clin. Sci.*, 81: 215-222.

- ARDAWI, M.S.M.; MAJZOUN, M.F. (1991). "Glutamine metabolism in skeletal muscle of septic rats". *Metabolism*, 40: 155-164.
- ARROYAVE, G.; WILSON, D. (1961). "Urinary excretion of creatinine of children under different nutritional conditions". *Am. J. Clin. Nutr.*, 9: 170-175.
- ARRUDA VEIGA, M.C.F.; TAMBELI, C.H.; SANTOIA, A.C.; JOSE, J.L. (1992). "Influência do teor protéico da dieta sobre a genese do tecido de reparo em ratos". *Arch. Latinoam. Nutr.*, 4:414-419.
- ASHFORD, A.J.; PAIN, V.M. (1986a). "Effect of diabetes on the rates of synthesis and degradation of ribosomes in rat muscle and liver in vivo". *J. Biol. Chem.*, 261: 4059-4065.
- ASHFORD, A.J.; PAIN, V.M. (1986b). "Insulin stimulation of growth in diabetic rats. Synthesis and degradation of ribosomes and total tissue protein in skeletal muscle and heart". *J. Biol. Chem.*, 261: 4066-4070.
- ASKANAZI, J.; CARPENTIER, C.B.; MICHELSEN, C.B. (1980). "Muscle and plasma amino acids following injury". *Ann. Surg.*, 192: 78-85.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMIST (1970). "Official methods of analysis". *Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C.*, pp: 800-801.
- ATWELL, J.R.; HEDDEN, M.P.; MANCUSI, V.J. BUSE, M.G. (1977). "Branched chain amino acids (BCAA) as regulators of muscle protein synthesis". *Diabetes*, 26: 373-378.
- AZUMA, J.; SAWAMURA, A.; AWATA, N. (1985). "Therapeutic effect of taurine in congestive heart failure: a double-blind crossover trial". *Clin. Cardiol.*, 8: 276-282.
- BAILLIE, A.G.S.; GARLICK, P.J. (1991a). "Responses of protein synthesis in different skeletal muscles to fasting and insulin in the rat". *Am. J. Physiol.*, 260: E891-E896.
- BAILLIE, A.G.S.; GARLICK, P.J. (1991b). "Attenuated responses of muscle protein synthesis to fasting and insulin in adult female rats". *Am. J. Physiol.*, 262: E1-E5.
- BAILLIE, A.G.S.; GARLICK, P.J. (1992). "Attenuated responses of muscle protein synthesis to fasting and insulin in adult female rats". *Am. J. Physiol.*, 262: E1-E5.

- BALLARD, F.J.; TOMAS, F.M. (1983). "3-methylhistidine as a measure of skeletal muscle protein breakdown in human subjects: The case for its continued use". *Clin. Sci.*, 65: 209-215.
- BAÑOS, G.; DANIEL, P.M.; MOORHOUSE, S.R.; PRATT, O.E. (1973). "The influx of amino acids into the brain of the rat in vivo. The essential compared with some non-essential amino acids". *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 183, 59-70.
- BARRETT, E.J.; GELFAND, R.A. (1989). "The in vivo study of cardiac and skeletal muscle protein turnover". *Diabetes/Metab. Rev.*, 5: 133-148.
- BARUA, J.M.; WILSON, E.; DOWNIE, S.; WERYK, B.; CUSCHIERI, A.; RENNIE, M.J. (1992). "The effect of alanyl-glutamine peptide supplementation on muscle protein synthesis in post-surgical patients receiving glutamine-free amino acids intravenously". *Proc. Nutr. Soc.*, 51: 115.
- BATES, P.C.; HOLDER, A.T. (1988). "The anabolic actions of growth hormone and thyroxine on protein metabolism in snell dwarf and normal mice". *J. Endocrinol.*, 119: 31-41.
- BATTISTIN, L.; PICCOLI, F.; LAJHA, A. (1972). "Heteroexchange of amino acids in incubated slices of brain". *Arch. Biochem. Biophys.*, 151: 102-111.
- BEAUFRERE, B.; HORBER, F.F.; SCHWENK, W.F.; MARSH, H.M.; MATTHEWS, D.; GERICH, J.E.; HAYMOND, M.W. (1989). "Glucocorticosteroids increase leucine oxidation and impair leucine balance in humans". *Am. Physiol.*, 257: E712-E721.
- BECKER, D.J.; PIMSTONE, B.L.; HANSEN, J.D.L.; HENDRICKS, S. (1971). "Insulin secretion in protein-calorie malnutrition. I. Quantitative abnormalities and response to treatment". *Diabetes*, 20: 542-551.
- BEHAR, M. (1975). "The role of feeding and nutrition in the patogeny and prevention of diarrheic processes". *PAHO Bull.*, 9: 1.
- BEISEL (1975). *Ann. Rev. Med.*, 26:9.

- BENNETT, W.M.; CONNACHER, A.A.; SMITH, K.; JUNG, R.T.; RENNIE, M.J. (1990). "Inability to stimulate skeletal muscle or whole body protein synthesis in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients by insulin-plus-glucose during amino acid infusion: studies of incorporation and turnover of tracer L-[1-¹³C]-leucine". *Diabetologia*, 33: 43-51.
- BERGMAN, R.N.; BEIR, J.R. HOURINGAN, P.M. (1982). "Intraportal glucose infusion matched to oral glucose absorption. Lack of evidence for "gut factor" involvement in hepatic glucose storage". *Diabetes*, 31: 27.
- BERGMAYER, H.U. (1963). "Methods of enzymatic analysis". Ed: Bergmeyer, H.V. Verlag Acad. Press. New York-London, pp: 941-948.
- BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H.; BROCK, M.J. (1946). "A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum". *J. Biol. Chem.*, 164: 321-329.
- BESSMAN, S.P. (1979). "The justification theory: the essential nature or the non-essential amino acids". *Nutr. Rev.*, 37: 209-220.
- BEVERLY, J.L.; GIETZEN, D.W. ROGERS, Q.S. (1991). "Protein synthesis in the prepyriform cortex: Effects on intake of an amino acid-imbalanced diet by sprague-Dawley rats". *J. Nutr.*, 121: 754-761.
- BEYNON, R.J.; BOND, J.S. (1986) "Catabolism of intracellular protein: Molecular aspects". *Am. J. Physiol.*, 251: C141-C152.
- BILMAZES, C.; UAUY, R.; HAVERBERG, L.N.; MUNRO, H.N.; YOUNG, V.R. (1978). "Muscle protein breakdown rates in humans based on N-methylhistidine (3-methylhistidine) content of mixed proteins in skeletal muscle and urinary output of N-methylhistidine". *Metabolism.*, 27: 525.
- BLOXAM, D.L. (1971). "Nutritional aspects of amino acid metabolism. 1. Rat liver perfusion method for the study of amino acid metabolism". *Brit. J. Nutr.*, 26: 393-422.
- BODANSKY, A. (1934). *J. Biol. Chem.*, 104: 473.
- BODE, B.P. (1990). "Characteristics and regulation of hepatic glutamine transport". *J. Parent. Enter. Nutr.*, 14: 51S-55S.

- BODWELL, C.E.; SCHUSTER, E.M.; KYLE, E.; BROOKS, B.; WORMACK, M. (1979). "Obligatory urinary and fecal nitrogen losses in young women, older men and young men and the factorial estimation of adult human protein requirements". *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 2450-2459.
- BONADONNA, R.C.; SACCOMANI, M.P.; COBELLI, C.; DEFRONZO, R.A. (1993). "Effect of insulin on system A amino acid transport in human skeletal muscle". *J. Clin. Invest.*, 91: 514-521.
- BOOTH, D.A.; SIMSON, P.C. (1971). "Food preferences acquired by association with variations in amino acid nutrition". *Q. J. Exp. Psychol.*, 23: 135-145.
- BOOTH, D.A. SIMSON, P.C. (1974). "Taste aversion induced by an histidine-free amino acid load". *Physiol. Psychol.*, 2: 349-351.
- BOOTH, D.A. (1991). "Cytocrome c protein synthesis rate in skeletal muscle". *J. Appl. Physiol.*, 71: 1225-1230.
- BRADFIELD, R.B.; BAILEY, M.A.; MARGEN, S. (1967). "Morphological changes in human scalp hair roots during deprivation of protein". *Science, N.Y.*, 157: 438-439.
- BRAY, G.A. (1979). "Obesity in America". *Proc. 2nd Fogarty Int. Cent. Conf. Obesity. NIH Publ. Ed: Bray, G.A. Washington, D.C: US Dept. Health, Education, and Welfare.*
- BROWN, J.G.; BATES, P.C.; HOLLIDAY, M.A.; MILLWARD, D.J. (1981). "Thyroid hormones and muscle protein turnover. The effect of thyroid-hormone deficiency and replacement in thyroidectomized and hypophysectomized rats". *Biochem. J.*, 194: 771-782.
- BRUCE, A.C.; McNURLAN, M.A.; McHARDY, K.C.; BROOM, J.; BUCHANAN, K.D.; CALDER, A.G.; MILNE, E.; McGAW, B.A.; GARLICK, P.J.; JAMES, W.P.T. (1990). "Nutrient oxidation patterns and protein metabolism in lean and obese subjects". *Int. J. Obes.*, 14: 631-646.
- BUSE, M.G.; ATWELL, R.; MANCUSI, V. (1979). "In vivo effect of branched chain amino acids on the ribosomal cycle in muscles of fasted rats". *Horm. Metab. Res.*, 11: 289-292.
- BURINI, R.; SANTIDRIAN, S.; MOREYRA, M.; BROWN, P.; MUNRO, H.N. (1981). "Interaction of thyroid status and diet on muscle protein breakdown in the rat, as measured by N-methylhistidine excretion". *Metabolism.*, 30: 679-687.

- BURMAN, K.D.; WARTOFSKY, L.; DINTERMAN, R.E.; KESLER, P.; WANNEMACHER, R.W. Jr. (1979). "The effect of T₃ and reverse T₃ administration on muscle protein catabolism during fasting as measured by 3-methylhistinine excretion". *Metabolism.*, 28: 805-813.
- BURTON, K. (1956). "The conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid". *Biochem. J.*, 62: 315-323.
- CAHILL, G.F. (1976). "Insulin and glucagon". En: "Peptide hormones". Ed: Macmillan. London, pp. 85-103.
- CARMONA DA MOTA, H.; ANTONIO, A.M.; LEITAO, G.; PORTO, M. (1990). "Late effects of early malnutrition". *Lancet*, 335: 8698.
- CASPERSON, T. (1950). "Cell growth and cell function". Norton. New York.
- CASTELLINO, P.; LUZI, L.; SIMONSON, D.C.; HAYMOND, M.W.; DEFRONZO, R.A. (1987). "Effect of insulin and plasma amino concentrations on leucine metabolism in man. Role of substrate availability on estimates of whole body protein synthesis". *J. Clin. Invest.*, 80: 1784-1793.
- CASTRO, C.E. (1987). "Nutrient effects on DNA and chromatin structure". *Ann. Rev. Nutr.*, 7: 407-421.
- CERSOSIMO, E.; WILLIAMS, P.E.; RADOSEVICH, P.M.; HOXWORTH, B.T.; LACY, W.W.; ABUMRAD, N.N. (1986). "Role of glutamine in adaptations in nitrogen metabolism during fasting". *Am. J. Physiol.*, 250: E622-E628.
- CHANDRA, R.K. (1981). "Nutrition, immunity and infection: mechanisms of interaction". *Pediatr.*, 67: 407-411.
- CHANDRA, R.K. (1983). "Nutrition, immunity and infection: Present knowledge and future directions". *Lancet*, 1: 688-691.
- CHANG, T.W.; GOLDBERG, A.L. (1978a). "The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle". *J. Biol. Chem.*, 253: 3685-3693.

- CHANG, T.W.; GOLDBERG, A.L. (1978b). "The origin of alanine produced in skeletal muscle". J. Biol. Chem., 253: 3677-3684.
- CHEE, P.Y., SWICK, R.W. (1976). "Effect of dietary protein and tryptophan on the turnover of rat liver ornithine aminotransferase". J. Biol. Chem., 251: 1029.
- CHEEK, D.B.; GRAYSTONE, J.E. (1969). "Action of insulin, growth hormone, and epinephrine on cell growth in liver muscle and brain of the hypophysectomized rat". Paediat. Res., 3: 77-88.
- CHEEK, D.B.; HILL, D.E. (1970). "Muscle and liver cell growth: role of hormones and nutritional factors". Fed. Proc., 29: 1503-1509.
- CHEREL, Y.; LE MAHO, Y. (1991). "Refeeding after the late increase in nitrogen excretion during prolonged fasting in the rat". Phys. Behav., 50: 345-349.
- CHIASSON, J.L.; LILJENQUIST, J.E.; FINGER, F.E.; LAY, W.W. (1976). "Differential sensitivity of glycogenolysis and gluconeogenesis to insulin infusion in dogs". Diabetes., 25: 283-291.
- CHO, E.S.; ANDERSON, H.L.; WIXOM, R.L.; HANSON, K.C.; KRAUSE, G.F. (1984). "Long-term effects of low histidine intake on men". J. Nutr., 114: 369-384.
- CHRISTENSEN, H.N. (1964). En: "Mammalian Protein Metabolism". Vol. 3. Ed: Munro, H.N.; Allison, J.B. Academic Press, New York, pp. 105-124.
- CHRISTENSEN, H.N.; HANDLOGTEN, M.E. (1968). "Modes of mediated exodus of amino acids from the Ehrlich ascites tumor cell". J. Biol. Chem., 243: 5428-5438.
- CHRISTENSEN, H.N. (1990). "Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism". Physiol. Rev., 70: 43-77.
- CHUA, B.H.L.; SIEHL, D.L.; MORGAN, H.E. (1979). "Effect of leucine and metabolites of branched chain amino acids on protein turnover in heart". J. Biol. Chem., 254: 8358-8362.
- CLAGUE, M.B.; KEIR, M.J.; WRIGHT, P.D.; JOHNSTON, I.D.A. (1983). "The effects of nutrition and trauma on whole-body protein metabolism in man". Clin. Sci., 65: 165-175.

- CLEMMONS, D.R.; WILLIAMS, R.; SNYDER, D.K.; UNDERWOOD, L.E. (1987). "Treatment with growth hormone conserves lean body mass during dietary restriction in obese volunteers". *J. Endocrinol. Metab.*, 64: 878-883.
- CLEMMONS, D.R.; UNDERWOOD, L.E. (1992). "Role of insulin-like growth factors and growth hormone in reversing catabolic states". *Horm. Res.*, 38: 37-40.
- CLIFFORD, A.J.; RIUMALLO, J.A.; BALIGA, B.S.; MUNRO, H.N.; BROWN, P.R. (1972). "Liver nucleotide metabolism in relation to amino acid supply". *Biochim. Biophys. Acta*, 277: 443-458.
- CLIFFORD, A.J. (1980). "Nutrients with special functions: Proteins and amino acids in tissue maintenance". En: "Human nutrition. A comprehensive treatise". Vol. 3A, "Nutrition and the adult macronutrients". Ed: R.B. Alfin-Slater y D. Kritchevsky. Plenum Press. New York, London. Cap. 7, pp. 183-211.
- CLUGSTON, G.A.; GARLICK, P.J. (1982). "The response of protein and energy metabolism to food intake in lean and obese man". *Hum. Nutr. Clin. Nutr.*, 36C: 57-70.
- COATES, M.E. (1976). "The nutrition of laboratory animals". En: "The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals". Ed. UFAW. Livingstone, C. New York, cap. 3, pp: 27-47.
- COLOMBO, J.P.; CERVANTES, H.; KOKOROVIC, M.; PFISTER, U.; PERRITAZ, R. (1992). "Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rat". *Ann. Nutr. Metab.*, 36: 23-33.
- CONWAY, J.M.; MARABLE, N.L.; BODWELL, C.E. (1988). "Whole-body leucine and energy metabolism in adult women". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 42: 661-669.
- CORTAMIRA, N.O.; SEVE, B.; LEBRETON, Y.; GANIER, P. (1991). "Effect of dietary tryptophan on muscle, liver and whole-body protein synthesis in weaned piglets: relationship to plasma insulin". *Br. J. Nutr.*, 66: 423-435.
- CORTIELLA, J.; MARCHINI, J.S.; BRANCH, S.; CHAPMAN, T.E.; YOUNG, V.R. (1992). "Phenylalanine and tyrosine kinetics in relation to altered protein and phenylalanine and tyrosine intakes in healthy young men". *Am. J. Clin. Nutr.*, 56: 517-525.

- COX, M.D.; DALAL, S.S.; HEARD, C.R.C.; MILLWARD, D.J. (1984). "Metabolic rate and thyroid status in rats fed diets of different protein-energy value: the importance of free T₃. *J. Nutr.*, 114: 1609-1616.
- CRACE, C.J.; SWENNE, I.; MILNER, R.D.G. (1991). "Long-term effects on glucose tolerance and insulin secretory response to glucose following a limited period of severe protein or energy malnutrition in young rats". *Upsala J. Med. Sci.*, 96: 177-183.
- CROMPTON, L.A.; LOMAX, M.A. (1989). "The effect of growth hormone on hind-limb muscle protein metabolism in growing lambs". *Proc. Nutr. Soc.*, 48: 96A.
- DAHAN, J.J.; LANGE, M.P.; JACOBS, L.A. (1988). "Insulin-like growth factor 1 production is inhibited in human sepsis". *Arch. Surg.*, 123: 1409-1414.
- DALGLEISH; TABECHIAN (1956). *Biochem. J.*, 62:625.
- DARMAUN, D.; FROGUEL, P.; RONGIER, M.; ROBERT, J.J. (1989). "Amino acid exchange between plasma and erythrocytes in vivo humans". *J. Appl. Physiol.*, 67: 2383-2388.
- DAVIS, T.A.; KARL, I.E.; TEGTMEYER, D.F.; OSBORNE, D.F.; KLAHR, S.; HARTER, H.R. (1985). *Am. J. Physiol.*, 246: E337-E345.
- DE MOOR, P.; LOUWAGIE, A.; VAN BAELEN, H.; VAN DE PUTTE, I. (1980). "Unexplained high transcortin levels in patients with various hematological disorders and in their relatives: A connection between these high transcortin levels and HLA antigen B12". *J. Clin. Endocr. Metab.*, 59: 491.
- DEL PRATO, S.; DEFRONZO, R.A.; CASTELLINO, P.; WAHREN, J.; ALVERSTRAND, A. (1990). "Regulation of amino acid metabolism by epinephrine". *Am. J. Physiol.*, 258: E878-E887.
- DEMAEYER, E.M. (1976a). "Early signs of protein-calorie malnutrition". *Bibl. Nutr. Dieta*, 23: 1-8.
- DEMAEYER, E.M. (1976b). "Protein-energy malnutrition". En: "Nutrition in preventive medicine". Ed: G.H. Beaton y J.M. Bengoa. WHO, Geneva (Monograph series No. 62), pp. 23-54.

- D'ERCOLE, J.A.; STILES, A.D.; UNDERWOOD, L.E. (1984). "Tissue concentrations of somatomedin C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 935-939.
- DEVI, A.; MUKUNDAN, M.A.; SCRIVASTAVA, V.; SARKAR, N.L. (1963). "The effect of age on the variations of deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA) and total nucleotides in liver, brain and muscle of rat". *Exp. Cell. Res.*, 32: 242-250.
- DEVLIN, J.T.; HORTON, E.S. (1988). "Hormone and nutrient interactions". En: "Modern Nutrition in Health Disease". Ed: Shils, M.E.; Young, V.R. Lea & Febiger. Philadelphia. USA.
- DISCHE, Z. (1930). *Mikrochemie*, 8. Citado por: MARCOS, A. (1982). "Adaptación del metabolismo proteico hepático al stress, en ratas con malnutrición proteica y calórico-proteica". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- DOHERTY, T.; DE BENOIST, M.H.; HIBBERT, J.; PERSAUD, C.; JACKSON, A.A. (1989). "The effect of the level of dietary protein and the quality of dietary energy on urea kinetics in young children recovering from severe malnutrition". *Proc. Nutr. Soc.*, 48: 55A.
- DONALD, P.; PITTS, G.C.; POHL, S.L. (1981). "Body weight and composition in laboratory rats: Effects of diets with high or low protein concentrations". *Science*, 211: 185-186.
- DRUMMOND, K.N.; MICHAEL, A.E.; ULSTROM, R.A.; GOOD, R.A. (1964). "The blue diaper syndrome: Familiar hypercalcemia with nephrocalcinosis and indicanuria". *Am. J. Med.*, 37: 928.
- DUNN, M.S.; MURPHY, E.A.; ROCKLAND, L.B. (1947). "Optimal growth of the rat". *Physiol. Rev.*, 27: 72.
- DURING, M.J.; ACWORTH, I.N.; WURTMAN, R.J. (1989). "Dopamine release in rat striatum: physiological coupling to tyrosine supply". *J. Neuroch.*, 52: 1449-1454.
- EDOZIEN, J.C.; NIEHAUS, N.; MAR, M.H.; MAKOU, T.; SWITZER, B.R. (1978). "Diet-hormone interrelationships in the rat". *J. Nutr.*, 108: 1767-1776.
- EISENSTEIN, R.S.; HARPER, A.E. (1991). "Relationship between protein intake and hepatic protein synthesis in rats". *J. Nutr.*, 121: 1581-1590.

- EKLUND, A.; SJOBLOM, L. (1986). "Effects of dietary proteins on hepatic and plasma lipoprotein fractions during dietary-induced hypercholesterolemia in male rats". *Bioch. Biophys. Acta*, 877: 127-134.
- ELIA, M.; FOLMER, P.; SCHLATMANN, A.; GOREN, A.; AUSTIN, S. (1988). "Effect of short term starvation on the release of glutamine by human muscle". *Proc. Nutr. Soc.*, 17: 179A.
- ELWYN, D.H.; LAUNDER, W.J.; PARIKH, H.C.; WISE, E.M. Jr. (1972). "Roles of plasma and erythrocytes in interorgan transport of amino acids in dogs". *Am. J. Physiol.*, 222: 1333-1342.
- EMERY, P.W.; COTELLESIA, L.; HOLNESS, M.; EGAN, C.; RENNIE, M.J. (1986). "Different patterns of protein turnover in skeletal and gastrointestinal smooth muscle, and the production of N-Methylhistidine during fasting in the rat". *Biosc. Rep.*, 6: 143-153.
- ENESCO, M. (1957). "Increase in cell number and size and in extracellular space during postnatal growth of several organs of the albino rat". Ph.D. thesis, McGill University.
- ENESCO, M.; LEBLOND, C.P. (1962). "Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat". *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 10: 530-551.
- ENESCO, M.; PUDDY, D. (1964). "Increase in the number of nuclei and weight in skeletal muscle of rats at various ages". *Am. J. Anat.*, 114: 235-238.
- ENNA, S.J.; STERN, L.Z.; WASTEK, G.J.; YAMAMURA, H.I. (1977). "Neurobiology and pharmacology of Huntington's disease". *Life Sci.*, 20: 205-212.
- ENWONWU, C.O.; STAMBAUGH, R.; SREEBNY, L. (1971). *J. Nutr.*, 101: 337.
- ESCRIVA, F.; RODRIGUEZ, C.; ALVAREZ, C.; PASCUAL-LEONE, A.M. (1990). "Glucose homeostasis in suckling rats undernourished during intrauterine life". En: "Endocrine and Biochemical Development on the Fetus and Neonate". Ed: Cuezva, J.M., Pascual-Leone, A.M. and Patel. M.J. Plenum Press, New York, pp. 55-59.
- ESCRIVA, F.; RODRIGUEZ, C.; CACHO, J.; ALVAREZ, C.; PORTHA, B.; PASCUAL-LEONE, A.M. (1992). "Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction". *Am. J. Physiol.*, 263: E1-E7.

- FAO/WHO/UNU. (1985). "Energy and protein requirements: report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation". Tech. Rep. Ser., 724. World Health Organization. Geneva.
- FAUS, M.J.; GIL, A.; ROBLES, R.; SANCHEZ-POZO, A.; PITA, M.L.; SANCHEZ-MEDINA, F. (1984). "Changes in serum albumin, transferrin and amino acid indices during the first month of life in small-for-date infants". *Ann. Nutr. Metab.*, 28: 70-76.
- FAWCETT, J.K.; SCOTT, J.E. (1960). "A rapid and precise method for the determination of urea". *J. Clin. Path.*, 13: 156-159.
- FELIG, P.; OWEN, O.E.; WABREN, J.; CAHILL, G.F. Jr. (1969). "Amino acid metabolism during prolonged starvation". *J. Clin. Invest.*, 48: 584-594.
- FELIG, P.; POZEFSKY, T.; MARLISS, E.; CAHILL, G.F. Jr. (1970). "Alanine: key role in gluconeogenesis". *Science*, 167: 1003-1004.
- FELIG, P. (1975). "Amino acid metabolism in man". *Ann. Rev. Biochem.*, 44: 933-955.
- FERNSTROM, J.D.; WURTMAN, R.J. (1971). "Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels". *Sci.*, 173: 149-152.
- FERNSTROM, J.D.; FALLER, D.V. (1978). "Neutral amino acids in the brain. Changes in response to food ingestion". *J. Neurochem.*, 30: 1531-1538.
- FLAIM, D.E.; LI, J.B.; JEFFERSON, L.S. (1978a). "Protein turnover in rat skeletal muscle: Effects of hypophysectomy and growth hormone". *Am. J. Physiol.*, 234: E38-E43.
- FLAIM, D.E.; LI, J.B.; JEFFERSON, L.S. (1978b). "Effects of thyroxine on protein turnover in rat skeletal muscle". *Am. J. Physiol.*, 235: E231-E237.
- FLAIM, K.E.; PEAVY, D.E.; EVERSON, W.V.; JEFFERSON, L.S. (1982). "The role of amino acids in the regulation of protein synthesis in perfused rat liver". *J. Biol. Chem.*, 257: 2932-2938.
- FLAKOLL, P.J.; KULAYLAT, M.; FREXES-STEED, M.; HOURANI, H.; BROWN, L.L.; HILL, J.O.; ABUMRAD, N.N. (1989). "Amino acids augment insulin's suppression of whole body proteolysis". *Am. J. Physiol.*, 257: E839-E847.

- FLATT, J.P. (1978). "The biochemistry of energy expenditure". En: "Recent advances in obesity research, II". (Ed. Newman Publishing). London, pp. 211-228.
- FLECK, A.; SHEPHERD, J.; MUNRO, H.N. (1965). "Protein synthesis in rat liver: Influence of amino acids in diet on microsomes and polysomes". *Science*, 150: 628.
- FOLIN, O. (1905). "Laws governing the chemical composition of urine". *Am. J. Physiol.*, 13:66-115.
- FONG, Y.; MOLDAWER, L.L.; MARANO, M.A.; WEI, H.; BARBER, A.; FISCHMAN, D.A. LOWRY, S.F. (1989). "Starvation leads to decreased levels of RNAm for myofibrillar proteins". *J. Surg. Res.*, 46: 457-461.
- FORKER, L.L.; CHAIKOFF, I.L.; ENTERMAN, C.; TARVER, H. (1951). "Formation of muscle protein in diabetic dogs". *J. Biol. Chem.*, 188: 37-48.
- FRANCE-FERNANDEZ, M.T.; POGO, A.O. (1971). "Regulation of the nucleolar DNA-dependent ribonucleic acid polymerase by amino acids in Erlich ascites tumor cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68: 3040.
- FRENK; METCOFF; GOMEZ; RAMOS-GALVAN; CRAVIOTO; ANTONOWICZ (1957). *Pediatr.*, 20: 105.
- FREXES-STEED, M.; WARNER, M.L.; BULUS, N.; FLAKOLL, P.; ABUMRAD, N.N. (1990). "Role of insulin and branched-chain amino acids in regulating protein metabolism during fasting". *Am. J. Physiol.*, 258: E907-E917.
- FREXES-STEED, M.; LACY, D.B.; COLLINS, J.; ABUMRAD, N.N. (1992). "Role of leucine and other amino acids in regulating protein metabolism in vivo". *Am. J. Physiol.*, 262: E925-E935.
- FRYBURG, D.A.; GELFAND, R.A.; BARRETT, E.J. (1991). "Growth hormone acutely stimulates forearm muscle protein synthesis in normal humans". *Am. J. Physiol.*, 260: E499-E504.
- FUKAGAWA, N.K.; MINAKER, K.L.; ROWE, J.W.; GOODMAN, M.N.; MATTHEWS, D.E.; BIER, D.M.; YOUNG, V.R. (1985). "Insulin-mediated reduction in whole body protein breakdown". *J. Clin. Invest.*, 76: 2306-2311.

- FUKAGAWA, N.K.; MINAKER, K.L.; YOUNG, V.R.; ROWE, J.W. (1986). "Insulin dose-dependent reductions in plasma amino acids in man". *Am. J. Physiol.*, 250: E13-E17.
- FULKS, R.; LI, J.B.; GOLDBERG, A.L. (1975). "Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm". *J. Biol. Chem.*, 250: 290-298.
- FURST, P.; STEHLE, P.; RENNIE, M.J. (1992). "Glutamine and nitrogen balance". *Am. J. Clin. Nutr.*, 56: 959-960.
- GARLICK, P.J.; MILLWARD, D.J.; JAMES, W.P.T. (1973). "The diurnal response of muscle and liver protein synthesis in vivo in meal-fed rats". *Biochem. J.*, 136: 935-946.
- GARLICK, P.J.; MILLWARD, D.J.; JAMES, W.P.T.; WATERLOW, J.C. (1975). "The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat". *Biochim. Biophys. Acta*, 414: 71-84.
- GARLICK, P.J.; CLUGSTON, G.A.; WATERLOW, J.C. (1980). "Influence of low-energy diets on whole-body protein turnover in obese subjects". *Am. J. Physiol.*, 238: E235-E244.
- GARLICK, P.J.; FERN, M.; PREEDY, V.R. (1983). "The effect of insulin infusion and food intake on muscle protein synthesis in postabsorptive rats". *Biochem. J.*, 210: 669-676.
- GARLICK, P.J.; FERN, E.B. (1985). "Whole-body protein turnover: Theoretical considerations". En: "Substrate and energy metabolism in man". Ed: J. Libbey. London, pp. 7-15.
- GARLICK, P.J.; GRANT, I.; GLENNIE, R.T. (1987). "Short-term effects of corticosterone treatment on muscle protein synthesis in relation to the response to feeding". *Biochem. J.*, 248: 439-442.
- GARLICK, P.J.; MALTIN, C.A.; BAILLIE, A.G.S.; DELDAY, M.I.; GRUBB, D.A. (1989). "Fiber-type composition of nine rat muscles. II. Relationship to protein turnover". *Am. J. Physiol.*, 257: E828-E832.
- GARROW, J.S.; FLETCHER, K.; HALLIDAY, D. (1965). "Body composition in severe infantile malnutrition". *J. Clin. Invest.*, 44: 417-424.
- GARZA; SCRIMSHAW; YOUNG (1978). *J. Nutr.*, 108: 90.

- GELFAND, R.A.; BARRETT, E.J. (1987). "Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man". *J. Clin. Invest.* 80: 1-7.
- GERSHOFF, S.N.; GILL, T.J.; SIMONIAN, S.J.; STEINBERG, A.I. (1968). "Some effects of amino acid deficiencies on antibody formation in the rat". *J. Nutr.*, 95: 184-190.
- GIBNEY, M.J. (1982). "Hypocolesterolemic effect of soya-bean proteins". *Proc. Nutr. Soc.*, 41: 19-26.
- GIESECKE, K.; MAGNUSSON, I.; AHLBERG, M.; HAGENFELDT, L.; WAHREN, J. (1989). "Protein and amino acid metabolism during early starvation as reflected by excretion of urea and methylhistidines". *Metabolism*, 38: 1196-1200.
- GIRARD, J.R.; CUENDET, G.S.; MARLISS, E.B.; KERVRAN, A.; RIEUTORT, M.; ASSAN, R. (1973). "Fuels, hormones and liver metabolism at term and during the early postnatal period in the rat". *J. Clin. Invest.*, 52: 3190-3322.
- GIRARD, J.R.; GUILLET, I.; MARTY, J.; MARLISS, E.B. (1975). "Plasma amino acid levels and development on hepatic gluconeogenesis in the newborn rat". *Am. J. Physiol.*, 229: 466-473.
- GIRARD, J.R.; GUILLET, I.; MARTY, J.; ASSAN, R.; MARLISS, E.B. (1976). "Effects of exogenous hormones and glucose on plasma levels and hepatic metabolism of amino acids in the fetus and in the newborn rat". *Diabetologia*, 12: 327-337.
- GITLER (1964). En: "Mammalian Protein Metabolism". Vol. 1. Ed: Munro, H.N.; Allison, J.B. Academic Press, New York, pp. 35-69.
- GOENA, M.; SANTIDRIAN, S.; CUEVILLAS, F.; LARRALDE, J. (1988). "Muscle and liver protein synthesis and degradation in growing rats fed a raw field bean (*Vicia faba* L.) diet". *Rev. Esp. Fisiol.*, 44: 345-352.
- GOLDBERG, A.L.; ODESSEY, R. (1972). "Oxidation of amino acids by diaphragms from fed and fasted rats". *Am. J. Physiol.*, 223: 1384-1391.
- GOLDBERG, A.L.; HOWELL, E.M.; LI, J.B.; MARTEL, S.P.; PROTY, W.F. (1974). "Physiological significance of protein degradation in animal and bacterial cells". *Fed. Proc.*, 33: 1112.

- GOLDBERG, A.L.; GOLDSPINK, D.F. (1975). "Influence of food deprivation and adrenal steroids on DNA synthesis in various mammalian tissues". *Am. J. Physiol.*, 228: 310-317.
- GOLDBERG, A.L.; KOWIT, J.D.; ETINGLER, J.D. (1976). "Studies of the selectivity and mechanisms of intracellular protein degradation". En: "Proteolysis and physiological regulation". Ed: D.W. Ribbons y K. Brew. Academic Press, New York, pp. 313-337.
- GOLDBERG, A.L.; CHANG, T.W. (1978a). "Regulation of amino acids by diaphragm of fed and fasted rats". *Am. J. Physiol.*, 223: 1384-1391.
- GOLDBERG, A.L.; CHANG, T.W. (1978b). "Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle". *Fed. Proc.*, 37: 2301-2307.
- GOLDBERG, A.L.; TISCHLER, M.E.; DeMARTINO, G.; GRIFFIN, G. (1980). "Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle". *Fed. Proc.*, 39: 31-36.
- GOLDEN, M.H.N.; WATERLOW, J.C. (1977). "Total protein synthesis in elderly people: a comparison of results with (¹⁵N) glycine and (¹⁴C) leucine". *Clin. Sci. Mol. Med.*, 53: 277-288.
- GOLDEN, M.; WATERLOW, J.C.; PICOU, D. (1977). "The relationship between dietary intake, weight change, nitrogen balance, and protein turnover in man". *Am. J. Clin. Nutr.*, 30: 1354-1348.
- GOODMAN, S.I.; McINTYRE, C.A.; ETLINGER, J.D. (1976). "Studies of the selectivity and mechanisms of intracellular protein degradation". En: "Proteolysis and physiological regulation". Ed: D.W. Ribbons y K. Brew. Academic Press, New York, pp. 313-337.
- GOODMAN, M.N.; LARSEN, P.R.; KAPPLAN, M.M.; AOKI, T.T. YOUNG, V.R.; RUDERMAN, N.B. (1980). "Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism". *Am. J. Physiol.*, 239: E277-E286.
- GOODMAN, M.N. (1987). "Myofibrillar protein breakdown in skeletal muscle is diminished in rats with chronic streptozotocin-induced diabetes". *Diabetes*, 36: 100-105.
- GOODMAN, M.N.; GOMEZ, M.D.P. (1987). "Decreased myofibrillar proteolysis after refeeding requires dietary proteins or amino acids". *Am. J. Physiol.*, 253: E52-E58.

- GOSWAMI, P.; MUNRO, H.N. (1962). "The role of ribonucleic acid in the formation of prothrombin activity by rat liver microsomes". *Biochem. Biophys. Acta*, 44: 410.
- GRAYSTONE, J.E. (1968). "Creatinine excretion during growth". En: "Human Growth". Ed: Cheek. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 182-197.
- GRIFFIN, G.E.; GOLDBERG, A.L. (1977). "Hormonal control of protein synthesis and degradation in rat skeletal muscle". *J. Physiol.*, 270: P51-P52.
- GUIDOTTI, G.G.; FRANCHI-GAZZOLA, R.; GAZZOLA, G.C.; RONCHI, P. (1974). "Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells. IV. Site and mechanism of insulin action". *Biochem. Biophys. Acta*, 356: 219-230.
- GULER, H.P.; ZAPF, J.; FROESCH, E.R. (1987). "Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor-1 in healthy adults". *N. Engl. J. Med.*, 317: 137-140.
- GURNEY, J.M. (1979). "The young child: Protein-energy malnutrition". En: "Human nutrition". Ed: R.B. Alfin-Slater y D. Kritchevsky. Plenum Press. New York, London. Cap. 2.
- HADDEN, D.R. (1967). "Glucose, free fatty acids, and insulin interrelations in kwashiorkor and marasmus". *Lancet*, 2: 589-593.
- HAGENFELDT, L.; ARVIDSSON, A. (1980). "The distribution of amino acids between plasma and erythrocytes". *Clin. Chim. Acta*, 100: 132-141.
- HALL, K.; LUFT, R. (1974). "Growth hormone and somatomedin". *Adv. Metab. Disord.*, 7: 1-36.
- HAMMARQVIST, F.; WERNERMAN, J.; ALI, R.; VINNARS, E. (1990). "Effects of an amino acid solution enriched with either branched chain amino acids or ornithine-alpha-ketoglutarate on the postoperative intracellular amino acid concentration of skeletal muscle". *Br. J. Surg.*, 77: 214-218.
- HAN, H.Q.; FURUNO, K.; GOLDBERG, A.L. (1988). "The activation of the ATP-dependent proteolytic system in skeletal muscle during denervation atrophy and fasting". *Fed. Proc.*, 2: A564.

- HARPER, A.E. (1965). "Effect of variations in protein intake on enzymes of amino acid metabolism". *Can. J. Biochem.*, 43: 1589-1603.
- HARPER, A.E.; BENEVENGA, N.J.; WOHLHEUTER, R.M. (1970). "Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids". *Physiol. Rev.*, 50: 428-458.
- HARPER, A.E. (1983). "Dispensable and indispensable amino acid interrelationships". En: "Amino acids-metabolism and medical applications". Ed: Blackburn, G.L.; Grant, J.P.; Young, V.R. J. Wright, PSG Inc. Boston, pp. 105-122.
- HARPER, J.M.M.; SOAR, J.B.; BUTTERY, P.J. (1987). "Changes in protein metabolism of ovine primary muscle cultures on treatment with growth hormone, insulin-like growth factor-1 or epidermal growth factor". *J. Endocrinol.*, 112: 87-96.
- HARPER, A.E.; PETERS, J.C. (1989). "Protein intake, brain amino acid, serotonin concentration and protein self-selection". *J. Nutr.*, 119: 677-689.
- HARTSOOK, E.W.; HERSHBERGER, T.V. (1963). "Influence of low, intermediate and high levels of dietary protein on heat production of rats". *J. Nutr.*, 81: 209-217.
- HARTSOOK, E.W.; HERSHBERGER, T.V.; NEE, J.C.M. (1973). "Effects of dietary protein content and ratio of fat to carbohydrate calories on energy metabolism and body composition of growing rats". *J. Nutr.*, 103: 167-178.
- HAUSSINGER, D. (1990). "Nitrogen metabolism in liver: structural-functional organization and physiological relevance". *Biochem. J.*, 267: 289-290.
- HAVERBERG, L.N.; DECKELBAUM, L.; BILMAZES, C.; MUNRO, H.N.; YOUNG, V.R. (1975a). "Myofibrillar protein turnover and urinary N-methylhistidine output. Response to dietary supply of protein and energy". *Biochem. J.*, 152: 503-510.
- HAVERBERG, L.N.; OMSTEDT, P.T.; MUNRO, H.N.; YOUNG, V.R. (1975b). "N-methylhistidine content of mixed proteins in various rats tissues". *Biochem. Biophys. Acta*, 405: 67-71.
- HAYASE, K.; YOKOGOSHI, H. (1992). "Effect of exercise on tissue protein synthesis in rats". *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56: 1637-1639.

- HAYMOND, M.W.; HORBER, F.F.; MAURAS, N. (1992). "Human growth hormone but not insulin-like growth factor I positively affects whole-body estimates of protein metabolism". *Horm. Res.*, 38: 73-75.
- HEARD, C.R.C.; FRANGI, S.M.; WRIGHT, P.M.; McCARTNEY, P.R. (1977). "Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition: an experimental model using young rats". *Br. J. Nutr.*, 37: 1-21.
- HEGER, J.; FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". *Br. J. Nutr.*, 54: 499-508.
- HEITMAN, R.N.; BERGMAN, E.N. (1980). "Transport of amino acids in whole blood and plasma of sheep". *Am. J. Physiol.*, 239: E242-E247.
- HEITMAN, R.N.; BERGMAN, E.N. (1981). "Glutamate interconversions and glucogenicity in the sheep". *Am. J. Physiol.*, 241: E465-E472.
- HENDERSON, A.R. (1970). "The effect of feeding with a tryptophan-free amino acid mixture on rat liver magnesium ion-activated deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase". *Biochem. J.*, 120: 205.
- HENRY, C.J.K.; RIVERS, J.P.W.; PAYNE, P.R. (1988). "Protein and energy metabolites in starvation reconsidered". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 42: 543-549.
- HIRSCH, C.A.; HIATT, H.H. (1966). *J. Biol. Chem.*, 241:5936.
- HIRSCH, E.C.; GRAYBIEL, A.M.; AGID, Y.A. (1988). "Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease". *Nature*, 334: 345-348.
- HILL, D.E.; HOLT, A.B.; PARRA, A.; CHEEK, D.B. (1970). "The influence of protein calorie versus calorie restriction on the body composition and cellular growth of muscle and liver in weanling rats". *Johns Hopkins Med. J.*, 127: 146.
- HOFFER, L.J.; YANG, R.D.; MATTHEWS, D.E.; BISTRAN, B.R.; BIER, D.M.; YOUNG, V.R. (1985). "Effects of meal consumption on whole body leucine and alanine kinetics in young adult man". *Brit. J. Nutr.*, 53: 31-38.

- HOLMANG, A.; SVEDBERG, J.; JENNISCHE, E.; BJORNTORP, P. (1990). "Effects of testosterone on muscle insulin sensitivity and morphology in female rats". *Am. J. Physiol.*, 259: E555-E560.
- HOLTZ; SNYDERMAN; NORTON; ROITMAN; FINCH (1963). *Lancet*, 2: 1343.
- HOOFT, C.; TIMMERMANS, J.; SNOECK, J.; ANTENER, I.; OYAERT, W.; VAN DEN HENDE, V. (1964). "Methionine malabsorption in a mentally defective child". *Lancet*, 2: 20.
- HORBER, F.F.; ZUERCHER, R.M.; HERREN, H.; CRIVELLI, M.A.; ROBOTTI, G.; FREY, F.J. (1986). "Altered body fat distribution in patients with glucocorticoid treatment and in patients on long-term dialysis". *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 758-769.
- HORBER, F.F.; HAYMOND, M.W. (1990). "Human growth hormone prevents the protein catabolic side effects of prednisone in humans". *J. Clin. Invest.*, 86: 265-272.
- HOWARTH, R.E. (1972). "Influence of dietary protein on rat skeletal muscle growth". *J. Nutr.*, 102: 37-43.
- HUNTER, W.M.; GREENWOOD, F.C. (1962). "Preparation of ¹³¹I labeled human growth hormone of high specific activity". *Nature*, 194: 495-496.
- HUXTABLE, R.J.; BRESSLER, R. (1973). "Effects of taurine on a muscle intracellular membrane". *Biochim. Biophys. Acta*, 323: 573-583.
- INCHIOSTRO, S.; BIOLO, G.; BRUTTOMESSO, D.; FONGHER, C.; SABADIN, L.; CARLINI, M.; DUNER, E.; TIENGO, A. TESSARI, P. (1992). "Effects of insulin and amino acid infusion on leucine and phenylalanine kinetics in type 1 diabetes". *Am. J. Physiol.*, 262: E203-E210.
- INGENBLEEK, Y.; DE VISSCHER, M.; DE NAYER, P. (1972). "Measurement of prealbumin as index of protein-calorie malnutrition". *Lancet*, 6: 106-111.
- INOUE; FUJITA; NIIYAMA (1973). *J. Nutr.*, 103: 1673.
- IP, C.C.Y.; HARPER, A.E. (1973). "Effect of threonine supplementation on hepatic polysome patterns and protein synthesis of rats fed a threonine-deficient diet". *Biochim. Biophys. Acta* 331: 251.

- ISHIARA, A.; INOUE, N.; KATSUTA, S. (1991). "The relationship of voluntary running to fibre type composition, fibre area and capillary supply in rat soleus and plantaris muscles. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 62: 211-215.
- JABLONSKY, E.; RAFALSKY, H. (1984). "The utilization of protein from a low-protein diet as determined by limiting essential amino acids". *Br. J. Nutr.*, 51: 235-243.
- JACKSON, A.A. (1983). "Amino acids: essential and non-essential?". *Lancet*, 1: 1034-1037.
- JACOBSEN, J.G.; SMITH, J.H., Jr. (1968). "Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives". *Physiol. Rev.*, 48: 424-511.
- JAMES; COORE (1970). *Am. J. Clin. Nutr.*, 23: 386.
- JAMES, W.P.T. (1981). "Adaptation to different energy intakes: the mechanisms, extent and social consequences". En "Expert consultation on energy and protein requirements". Work. Pap. FAO/WHO/UNU. Rome: FAO.
- JEFFERSON, L.S. KOEHLER, J.O.; MORGAN, H.E. (1972). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69: 816.
- JEFFERSON, L.S. (1980). "Role of insulin in the regulation of protein synthesis". *Diabetes*, 29: 487-496.
- JENSEN, M.D.; MILES, J.M.; GERICH, J.E.; CRYER, P.E.; HAYMOND, M.W. (1988). "Preservation of insulin effects on glucose production and proteolysis during fasting". *Am. J. Physiol.*, 254: E700-E707.
- JEPSON, M.M.; BATES, P.C.; MILLWARD, D.J. (1988). "The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat". *Brit. J. Nutr.*, 59: 397-415.
- JOHNSON, P.; PERRY, S.V. (1970). "Biological activity and 3-methylhistidine content of actin and myosin". *Biochem. J.*, 119: 293-298.
- JOLES, J.A.; JANSEN, E.J.M.; LAAN, C.A.; WILLEKES-KOOLSCHIJIN, N.; KORTLANDT, W.; KOOMANS, H.S. (1988). "Plasma proteins in growing analbuminaemic rats fed on a diet low-protein content". *Brit. J. Nutr.*, 61: 485-494.

- JONES, B.N.; PAABO, S.; STEIN, S. (1981). "Amino acid analysis and enzymic sequence determination of peptides by an improved o-phthalaldehyde precolumn labeling procedure". *J. Liq. Chromat.*, 4: 565-568.
- KADOWAKI, M.; NOGUCHI, T.; NAITO, H. (1984). "Regulation of plasma amino acid levels by perfusion of hindquarters of rats". *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30: 187-198.
- KADOWAKI, M.; HARADA, N.; TAKAHASHI, S.; NOGUCHI, T.; HIROSIHI, N. (1989). "Differential regulation of the degradation of myofibrillar and total proteins in skeletal muscle of rats: Effects of streptozotocin. Induced diabetes, dietary protein and starvation". *J. Nutr.*, 119: 471-477.
- KAPLAN; PITOT (1970). En: "Mammalian Protein Metabolism". Vol. 4. Ed: Munro, H.N. Academic Press, New York, pp. 387-443.
- KARASOV, W.H.; DIAMOND, J.M. (1983). "Adaptive regulation of sugar and amino acid transport by vertebrate intestine". *Am. J. Physiol.*, 248: G443-G462.
- KARASOV, W.H.; SOLBERG, D.H.; CARTER, S.; HUGHES, M.; PHAN, D.; ZOLLMAN, F.; DIAMOND, J.M. (1986). "Uptake pathways for amino acids in mouse intestine". *Am. J. Physiol.*, 251: G501-G508.
- KARASOV, W.H.; SOLBERG, D.H.; DIAMOND, J.M. (1987). "Dependence of intestinal amino acid uptake on dietary protein or amino acid levels". *Am. J. Physiol.*, 252: G614-G625.
- KASPEREK, G.J.; DOHM, G.L.; TAPSCOTT, E.B.; POWELL, T. (1980). *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 164: 430-434.
- KETTELHUT, I.S.; WING, S.S.; GOLDBERG, A.L. (1988). "Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle". *Diabetes/Metab. Rev.*, 4: 751-772.
- KEUSCH, G.T.; WILSON, C.S.; WAKSAL, S.D. (1983). "Nutrition host defenses and the lymphoid system". En: "Advances in Host Defense Mechanisms". Vol. 2. Ed: Galvin, J.L.; Fauci, A.S. New York, Raven Press.
- KEYS, A.; BROZEK, J.; HENSCHEL, A.; MICKELSON, O.; TAYLOR, H.L. (1950). "The biology of human starvation". Minneapolis: Univ. Minn. Press.

- KIES, C.; FOX, H.; APRAHAMIAN, S. (1975). "Comparative value of L-, DL- and D-methionine supplementation of an fat-based diet for humans". *J. Nutr.*, 105: 809-814.
- KILBERG, M.S.; HANDLOGTEN, M.E.; CHRISTENSEN, H.N. (1980). "Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparragine, histidine and closely related analogs". *J. Biol. Chem.*, 255: 4011-4019.
- KILBERG, M.S. (1982). "Amino acid transport in isolated rat hepatocytes". *J. Membrane Biol.*, 69: 1-12.
- KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. (1988). "Cellular mechanisms involved in the action of insulin on protein synthesis". *Diabetes Metab. Rev.*, 4: 773-787.
- KOVACEVIC, Z.; MCGIVAN, J.D. (1983). "Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiologic significance". *Physiol. Rev.*, 63: 547-605.
- KREBS, H.A. (1964). "The metabolic fate of amino acids". En: "Mammalian protein metabolism". Ed: Munro, H.N.; Allison, J.B. Academic Press Inc., New York Vol. 1. pp. 163.
- KREBS, H.A. (1972). En: "Advances in enzyme regulation". Vol. 10. Ed: Weber, G. Pergamon Press, Oxford, p. 397.
- KRITCHEVSKY, D. (1980). "Age-related changes in lipid metabolism". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 165: 193-199.
- LAIDLAW, S.A.; KOPLE, J.D. (1987). "Newer concepts of the indispensable amino acids". *Am. J. Clin. Nutr.*, 46: 593-605.
- LAJTHA, A.; BANAY-SCHWARTZ, M.; GIUFFRIDA, A.M.E. (1987). "Changes in brain protein metabolism with developmental and nutritional state". En: "Basic and clinical aspects of nutritional and brain development". Ed: Rassin, D.K.; Harber, B.; Drujan, B. New York, vol. 16, pp: 345-249.
- LAZZARI, E.P.; SULLIVAN, E.; MURRAY, D.R. (1970). "Sensitive colorimetric assay for ribonuclease". *Texas Rep. Biol. Med.*, 28: 561-564.

- LEE, P.A.; BLIZZARD, R.M.; CHEEK, D.B.; HOLT, A.B. (1974). "Growth and body composition in intrauterine growth retardation (IUGR) before and during human growth hormone administration". *Metabolism* 23: 913.
- LEHNINGER, A.L. (1972a). "Degradación oxidativa de los aminoácidos". En: "Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular". Ed: Omega. Barcelona. Cap. 20, pp. 459-481.
- LEHNINGER, A.L. (1972b). "Biosíntesis de aminoácidos: fijación del nitrógeno". En: "Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular". Ed: Omega. Barcelona. Cap. 24, pp. 575-602.
- LEUNG, P.M.B.; ROGERS, Q.R. (1969). "Food intake: Regulation by plasma amino acid pattern". *Life Sci.*, 8: 1-9.
- LEWIS, C.G.; WINICK, M. (1978). "Studies on ribosomal RNA synthesis in vivo in rat liver during short-term protein malnutrition". *J. Nutr.*, 108: 329.
- LI, J.B.; GOLDBERG, A.L. (1976). "Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat muscle". *Am. J. Physiol.*, 231: 441-448.
- LI, J.B.; WASSNER, S.J. (1978). "Effects of food deprivation and refeeding on actomyosin degradation". *Am. J. Physiol.*, 246: E32-E37.
- LI, J.B.; HIGGINS, J.E.; JEFFERSON, L.S. (1979). "Changes in protein turnover in skeletal muscle in response to fasting". *Am. J. Physiol.*, 236: E222-E228.
- LINDAHL, A.; ISGAARD, J.; ISAKSSON, O.G.P. (1987). "Growth hormone "in vivo" potentiates the stimulatory effects of insulin-like growth factor-1 "in vitro" on colony formation of epiphyseal chondrocytes". *Endocrinology*, 121: 1070-1075.
- LONG, C.L.; HAVERBERG, L.N.; YOUNG, V.R.; KINNEY, J.M.; MUNRO, H.N.; GEIGER, J.W. (1975). "Metabolism of 3-methylhistidine in man". *Metabolism*, 24: 929-935.
- LOWELL, B.B.; RUDERMAN, N.B.; GOODMAN, M.N. (1986). "Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation". *Metabol. Clin. Exp.*, 25:1121-1127.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951). "Protein measurement". J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- LUNDHOLM, K.; SCHERSTEN, T. (1977). "Protein synthesis in human skeletal muscle tissue: Influence of insulin and amino acids". Eur. J. Clin. Invest., 7: 531-536.
- LUNN, P.G.; WHITEHEAD, R.G.; BAKER, B.A. (1976). "The relative effects of a low-protein-high-carbohydrate diet on the free amino acid composition of liver and muscle". Brit. J. Nutr., 36: 219-230.
- LYMAN, R.L.; COOK, C.R.; WILLIAMS, M.A. (1964). "Liver lipid accumulation in isoleucine-deprived rats". J. Nutr., 82: 432-438.
- MALINOWSKA, K.W.; HARDY, R.N.; NATHANILSA, P.W. (1972). "Plasma adrenocorticosteroid concentrations immediately after birth in the rat, rabbit and guinea-pig". Experientia, 28: 1366-1367.
- MANCHESTER, K.L. (1970). "Sites of hormonal regulation of protein metabolism". En: "Mammalian protein metabolism". Ed: Munro, H.N. Academic Press. New York. Vol. 4, pp. 229-298.
- MANN, D.M.A.; YATES, P.O.; HAWKES, J. (1982). "The noradrenergic system in Alzheimer and multi-infarct dementias". J. Neurol. Neuros. Psych., 45: 113-119.
- MARLISS, E.B.; AOKI, T.T.; CAHILL, G.F. (1972). En: "Glugacon: Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications". Ed: Lefebvre, P.J.; Unger, R.H. New York. Pergamon Press.
- MARSDEN, C.D. (1982). "Neurotransmitters and disease: basal ganglia disease". Lancet, 2: 1141-1147.
- MARSHALL, S.; MONZON, R. (1989). "Amino acid regulation of insulin action in isolated adipocytes. Selective ability of amino acids to enhance both insulin sensitivity and maximal insulin responsiveness of the protein synthesis system". J. Biol. Chem., 264: 2037-2042.
- MARTINEZ, J.A.; GOENA, M.; SANTIDRIAN, S.; LARRALDE, J. (1987). "Response of muscle liver and whole body protein turnover to two different sources of protein in growing rats". Ann. Rev. Metab., 31: 146-153.

- McCARTHY, C.F.; BORLAND, J.L. Jr.; LYNCH, H.J. Jr.; OWEN, E.E.; TYOR, M.P. (1964). "Defective uptake of basic amino acids and L-cystine by intestinal mucosa of patients with cystinuria". *J. Clin. Invest.*, 43: 1518.
- McDONALD, M.R. (1955). En: "Methods in enzymology". Ed: Colowick, S.P.; Kaplan, N.O. Academic Press. New York. Vol. II, pp. 437-447.
- McDONALD, R.B. (1990). "Effects of age and diet on glucose tolerance in Sprague-Dawley rats". *J. Nutr.*, 120: 598-601.
- McFARLANE, I.G.; VON HOLT, C. (1969). "Metabolism of amino acids in protein-calorie-deficient rats". *Biochem. J.*, 111: 557-563.
- McGRATH, J.A.; GOLDSPINK, D.F. (1982). "Glucocorticoid action on protein synthesis and protein breakdown in isolated skeletal muscle". *Biochem. J.*, 206: 641-645.
- McLAREN, D.A. (1966). "A fresh look at protein-calorie malnutrition". *Lancet*, 2: 485-488.
- McLEAN (1966). *Clin. Sci.*, 30: 129.
- McLENNAN, P.A.; BROWN, R.A.; RENNIE, M.J. (1987). "A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle". *FEBS Lett.*, 215: 187-191.
- McLEOD, M.G. (1992). "Energy and nitrogen intake, expenditure and retention at 32° in growing fowl given diets with a wide range of energy and protein contents". *Br. J. Nutr.*, 67: 195-206.
- McNURLAN, M.A.; PAIN, V.M.; GARLICK, P.J. (1980). "Conditions that alter rates of tissue protein synthesis in vivo". *Biochem. Soc. Trans.*, 8: 283-285.
- McNURLAN, M.A.; FERN, E.B.; GARLICK, P.J. (1982). "Failure of leucine to stimulate protein synthesis in vivo". *Biochem. J.*, 204: 831-838.
- McNURLAN, M.A.; GARLICK, P.J. (1989). "Influence of nutrient intake on protein turnover". *Diabetes/Metab. Rev.*, 5: 165-189.

- McNURLAN, M.A.; ESSEN, P.; MILNE, E.; VINNARS, E.; GARLICK, P.J.; WERNERMAN, J. (1993). "Temporal responses of protein synthesis in human skeletal muscle to feeding". *Br. J. Nutr.*, 69: 117-126.
- MEISTER, A. (1973). *Science*, 180: 33.
- MEISTER, A. (1979). "Biochemistry of glutamate: glutamine and glutathione. En: "Glutamic acid, advances in biochemistry and physiology". Ed: Filler, L.J. Jr. New York: Raven.
- MERCER, L.P.; DODDS, S.J.; SCHWEISTAL, M.R. DUNN, J.D. (1989). "Brain histidine and food intake in rats fed diets deficient in single amino acids". *J. Nutr.*, 119: 66-74.
- MERTZ, E.T. (1972). "The protein and amino acid needs". En: "Fish nutrition". Ed.: Halver, J.E. Academic Press. New York, pp: 105-143.
- MILLER, M.; RESNICK. O.; LEAHY, J.P.; MORGANE, P.J.; (1976). "Brain and peripheral tryptophan availability in protein malnourished rats". *Soc. Neur. Abs.*, 2: 586.
- MILLER, M.; LEAHY, J.P.; STERN, W.C.; MORGANE, P.J.; RESNICK, O. (1977). "Tryptophan availability: relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats". *Exp. Neurol.*, 57: 142-152.
- MILLWARD, D.J. (1970). *Clin. Sci.*, 39: 591.
- MILLWARD, D.J. GARLICK, P.J. (1972). *Proc. Nutr. Soc.*, 31: 257.
- MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; JAMES, W.P.T.; NNANYELUGO, D.O.; RYATT, J.S. (1973). "Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle". *Nature*, 241: 204-205.
- MILLWARD, D.J.; NNANYELUGO, D.O.; JAMES, W.P.T.; GARLICK, P.J. (1974a). "Protein metabolism in skeletal muscle. The effect of feeding and fasting on muscle RNA, free amino acids and plasma insulin concentrations". *Br. J. Nutr.*, 32: 127-142.
- MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; NNANYELUGO, D.O. (1974b). "Whole-body protein turnover in malnourished and rehabilitated rats". *Proc. Nutr. Soc.*, 34: 33A-37A.

- MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; STEWART, R.J.C.; NNANYELUGO, D.O.; WATERLOW, J.C. (1975). "Skeletal muscle growth and protein turnover". *Biochem. J.*, 150: 235-243.
- MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; NNAYELUGO, D.O.; WATERLOW, J.C. (1976). "The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation in muscle mass". *Biochem. J.*, 156: 185-188.
- MILLWARD, D.J.; WATERLOW, J.C. (1978). "Effect of nutrition on protein turnover in skeletal muscle". *Fed. Proc.*, 37: 2283-2289.
- MILLWARD, D.J.; BATES, P.C. (1983). "3-Methylhistidine turnover in the whole body and the contribution of skeletal muscle and intestine to urinary 3-methylhistidine excretion in the adult rat". *Biochem. J.*, 214: 607-615.
- MILLWARD, D.J.; ODEDRA, B.; BATES, P.C. (1983). "The role of insulin, corticosterone and other factors in the acute recovery of muscle protein synthesis on refeeding food-deprived rats". *Biochem. J.*, 216: 583-587.
- MILLWARD, D.J. (1985). "Human protein requirements: The physiological significance of changes in the rate of whole body protein turnover". En: "Substrate and energy metabolism in man". Ed. Garrows, J.S.; Halliday, D. London: Libbey, pp. 135-144.
- MILLWARD, D.J.; BATES, P.C.; COYER, P.; COX, M.; DALAL, S. (1986). "The effect of dietary energy and protein on growth as studied in animal models". En: "Energy and protein needs during infancy". Ed: Fomon, S.J.; Herid, W. Academic Press. San Diego.
- MILLWARD, D.J.; RIVERS, J.P.W. (1988). "The nutritional role of indispensable amino acids and the metabolic basis for their requirements". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 42: 367-393.
- MOATS-STAATS, B.M.; BRADY, J.L.; UNDERWOOD, L.E. (1984). "Dietary protein restriction in artificially reared neonatal rats causes a reduction in insulin-like growth factor-1 (IGF-I) gene expression". *Endocrinology*, 125: 2368-2374.
- MOON, W.Y.; KIRKSEY, A. (1973). "Cellular growth during prenatal and early postnatal periods in progeny of pyridoxine-deficient rats". *J. Nutr.*, 103: 123-133.

- MORRISON, A.B.; NARAYANA RAO, M. (1967). "Some relationships between proteins and calories". *World Rev. Nutr. Diet.*, 7: 204-224.
- MORTIMORE, G.E.; MONDON, C.E. (1970). "Inhibition by insulin of valine turnover in liver. Evidence for a general control of proteolysis". *J. Biol. Chem.*, 241: 4802.
- MORTIMORE, G.E.; POSO, R. (1984). "Lysosomal pathways in hepatic protein degradation: Regulatory role of amino acids". *Fed. Proc.*, 43: 1289-1294.
- MORTIMORE, G.E.; POSO, A.R. (1987). "Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply". *Ann. Rev. Nutr.*, 7: 539-564.
- MORTIMORE, G.E.; POSO, A.R.; KADOWAKI, M.; WERT, J.J. (1987). "Multiphasic control of hepatic protein degradation by regulatory amino acids. General features and hormonal control". *J. Biol. Chem.*, 262: 16322-16327.
- MORTIMORE, G.E.; WERT, J.J.; ADAMS, C.E. (1988). "Modulation of the amino acid control of hepatic protein degradation by caloric deprivation. Two modes of alanine co-regulation". *J. Biol. Chem.*, 263: 19545-19551.
- MOTIL, K.J.; MATTHEWS, D.E.; BIER, D.M.; BURKE, J.F.; MUNRO, H.N.; YOUNG, V.R. (1981). "Whole body leucine and lysine metabolism: Response to dietary protein intake in young men". *Am. J. Physiol.*, 240: E712-E721.
- MUNRO, H.N.; NAISMITH, D.J.; WIKRAMANAYAKE, T.W. (1953). *BIOCHEM. J.*, 54: 198.
- MUNRO, H.N. (1964). En: "Mammalian protein metabolism". Ed: Munro, H.N.; Allison, J.B. Academic Press. New York-London, vol 1, pp. 382-438.
- MUNRO, H.N.; GOLDBERG, A.L. (1964). En: "The role of the gastrointestinal tract in protein metabolism". Ed: Munro, H.N. Blackwell, Oxford, p. 189.
- MUNRO, H.N. (1968). *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 27: 1231.
- MUNRO, H.N. (1970). "Free amino acid pools and their role in regulation". En: "Mammalian protein metabolism". Ed: Munro, H.N.; Allison, J.B. Academic Press. New York, cap. 34, pp. 299-386.

- MUNRO, H.N. (1977). En: "Current Concepts in Parenteral Nutrition". Ed: Soeters, Wesdorp, Phaf, Fischer. The Netherlands, Martinus Nijhoff-Medical Division, pp. 55-68.
- MUNRO, H.N.; CRIM, M.C. (1980). "The proteins and amino acids". En: "Modern Nutrition in Health and Disease". Ed: Goodhard, R.S.; Shils, M.E. London. Cap. 3, pp. 51-98.
- MUNRO, H.N. (1982). En: "Clinical Nutrition 81". Ed: Wesdorp, R.I.C.; Soeters, P.B. Churchill-Livingstone, Edinburgh, pp: 181-189.
- MUNRO, H.N.; CRIM, M.C. (1988). "The proteins and amino acids". En: "Modern Nutrition in Health and Disease". Ed: Shils, M.E.; Young, V.R. Lea & Febiger, Philadelphia. USA.
- MUÑOZ-MARTINEZ, E.; UNZAGA, M.T.; JIMENEZ GANCEDO, B.; REY DE VIÑAS, J.L. (1992). "Glucosa, insulina, GH y aminoácidos plasmáticos en ratas sometidas a tres niveles de proteína dietarios". Arch. Latinoam. Nutr., 42: 36-40.
- MURILLO, M.P.; VALENTE, G.B.; TASCA, C.I.; ATTOS, A.G.; PESSOA-PUREUR, R. (1991). "Malnutrition induces an increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex". J. Nutr., 121: 1349-1354.
- NAIR, K.; FORD, G.C.; HALLIDAY, D. (1987). "Effect of insulin treatment in vivo whole body leucine kinetics and oxygen consumption in insulin-deprived type 1 diabetic patients". Metabolism., 36: 491-495.
- NAISMITH, D.J. (1969). "Fetus as a parasite". Proc. Nutr. Soc., 28: 25-31.
- NAISMITH, D.J.; MORGAN, B.L.G. (1976). "The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat". Brit. J. Nutr., 36: 563-566.
- NAKAHARA, H.T.; HOLLOSZY, J.O. (1974). "The actions of insulin, trypsin, and electrical stimulation on amino acid transport in muscle". J. Biol. Chem., 249: 5435-5443.
- NAKAHARA, T.; HIRANO, M.; MARSUMOTO, T.; KUROKI, T.; TATEBAYASHI, Y.; TSUTSUMI, T.; NISHIYAMA, K.; OOBOSHI, H.; NAKAMURA, K.; YAO, H.; SHIRAIISHI, A.; WAKI, M.; UCHIMURA, H. (1990). "Regional distribution of DNA and RNA in rat brain: A sensitive determination using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection". Neur. Res., 15: 609-611.

- NARASHINGA RAO, B.S. (1985). "Metabolic adaptation to chronic malnutrition". En: "Substrate and energy metabolism in man". Ed: Garrow, J.S.; Halliday, O. Libbey, London, pp. 145-154.
- NARAYANA RAO, M.; MORRISON, A.B. (1965). *Fed. Proc.*, 24: 628.
- NARIMIYA, M.; AZHAR, S.; DOLKAS, C.B.; MONDON, C.E.; SIMS, C.; WRIGHT, D.W.; REAVEN, G.M. (1984). "Insulin resistance in older rats". *Am. J. Physiol.*, 246: E397-E404.
- NASSET, E.S.; GATEWOOD, V.H. (1956). "Nitrogen balance and hemoglobin of adult rats fed amino acid diets low in L- and D-histidine". *J. Nutr.*, 53: 163-176.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978). "Nutrient requirements of the laboratory rat". National Academy of Science. Washington, pp. 13-26.
- NEAME, K.; WISEMAN, G. (1958). "The alanine and oxoacid concentrations in mesenteric blood during the absorption of L-glutamic by the small intestine of the dog, cat and rabbit in vivo". *J. Physiol.*, 140: 148-155.
- NEUFELD, N.D.; EZRIN, C.; CORBO, L.; LONG, D.; BUSH, M.A. (1986) "Effects of caloric restriction and exercise on insulin receptors in obesity: Association with changes en membrane lipids". *Metabolism*, 35: 580-587.
- NICHOLS; ALVARADO; RODRIGUEZ; HAZLEWOOD; VITERI (1974). *Pediatr.*, 84: 759.
- NISSSEN, S.; HAYMOND, M.W. (1986). "Changes in leucine kinetics during meal absorption: Effects of dietary leucine availability". *Am. J. Physiol.*, 250: E695-E701.
- NNANYELUGO, D.O. (1976). "Changes in RNA content during chronic protein deprivation in the hind limbs of rats". *Nutr. Rep. Int.*, 14: 209.
- ODEDRA, B.R.; BATES, P.C.; MILLWARD, D.J. (1983). "Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver". *Biochem. J.*, 214: 617-627.
- OKITOLONDA, W.; BRICHARD, S.M.; HENKIN, J.C. (1987). "Repercussions of chronic protein-energy malnutrition on glucose homeostasis in the rat". *Diabetologia*, 30: 946-951.

- OKITOLONDA, W.; BRICHARD, S.M.; POTTIER, A.M.; HENKIN, J.C. (1988). "Influence of low and high-protein diets on glucose homeostasis in the rat". *Br. J. Nutr.*, 60: 509-516.
- OLDENDORF, W.H.; SZABO, I. (1976). "Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers". *Am. J. Physiol.*, 230: 94-98.
- OLEFSKY, J.; BACON, V.C.; BAUR, S. (1976). "Insulin receptors of skeletal muscle: specific insulin binding sites and demonstration of decreased numbers of sites in obese rats". *Metab. Clin. Exp.*, 25: 179-183.
- OLIVER, J.R.; WILLIAMS, V.; WRIGHT, P.H. (1977). "Effects of fasting on insulin and glucagon secretion by isolated rat islets of Langerhans". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 154: 210-214.
- OLWOOKERE, J.O. (1987). "The bioenergetics of protein-energy malnutrition syndrome". *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 54: 1-25.
- OLSON. (1975). "Protein-calorie malnutrition". Ed: Olson. Academic Press, New York.
- OWEN, O.E.; FELIG, P.; MORGAN, A.P.; WAHREN, J.; CAHILL, G.F. Jr. (1967a). "Liver and kidney metabolism during prolonged starvation". *J. Clin. Invest.*, 48: 574.
- OWEN, O.E.; MORGAN, A.P.; KEMP, H.G.; SULLIVAN, J.M.; HERRERA, M.G.; CAHILL, G.F. Jr. (1967b). "Brain metabolism during fasting". *J. Clin. Invest.*, 46: 1589.
- PACY, P.J.; CHENG, K.N.; WEBSTER, J.; FORD, G.C.; HALLIDAY, D.; GARROW, J.S. (1987). "Effect of amino acid infusion on whole body leucine kinetics and metabolic rate". *Clin. Sci.*, 72: 27P.
- PAIN, V.M.; GARLICK, P.J. (1974). "Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat in vivo". *J. Biol. Chem.*, 249: 4510-4514.
- PAIN, V.M.; ALBERTSE, E.C.; GARLICK, P.J. (1983). "Protein metabolism in skeletal muscle, diaphragm and heart of diabetic rats". *Am. J. Physiol.*, 245: E604-E610.
- PASSMORE, R.; NICOL, B.M.; NARAYANA RAO, M.; BOCOBO, D.L. (1974). "Handbook on human nutritional requirements". WHO, Geneva (Monograph series No. 61).

- PARDRIDGE, V.M.; JEFFERSON, L.S. (1975). "Liver uptake of amino acids and carbohydrates during a single circulatory passage". *Am. J. Physiol.*, 228: 1155-1161.
- PARDRIDGE, V.M. (1983). "Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier". *Physiol. Rev.*, 63: 1481-1535.
- PARDRIDGE, V.M.; CHOI, T.B. (1986). "Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier". *Fed. Proc.*, 45: 2073-2078.
- PARKER, C.J.; RIESS, G.T.; SARDESAI, V.M. (1985). "Essentiality of histidine in adult mice". *J. Nutr.*, 115: 824-826.
- PAYNE-ROBINSON, H.M.; COORE, H.G.; GOLDEN, M.H.N. (1988). "Red cell insulin binding in Jamaican malnourished children". *Clin. Res.*, 36: 792A.
- PAYNE-ROBINSON, H.M. y BROWN, R. (1992). "The effect of malnutrition on insulin binding to rat erythrocytes". *Br. J. Nutr.*, 67: 279-286.
- PELL, J.M.; BATES, P.C. (1987). "Collagen and non-collagen protein turnover in skeletal muscle of growth hormone-treated lambs". *J. Endocrinol.*, 115: R1-R4.
- PELL, J.M.; GILL, M.; BEEVER, D.E.; JONES, A.R.; CAMMELL, S.B. (1989). "Hormone and nutrient interaction in the control of growth: role of growth hormone and insulin-like growth factor-1". *Proc. Nutr. Soc.*, 48: 83A.
- PELL, J.M.; BATES, P.C. (1992). "Differential actions of growth hormone and insulin-like growth factor-I on tissue protein metabolism in dwarf mice". *Endocrinology*, 130: 1942-1950.
- PENG, Y.S.; MELLIZA, L.L.; VAVICH, M.G.; KEMMERER, A.R. (1974). "Changes in food intake and nitrogen metabolism of rats while adapting to a low or high protein diet". *J. Nutr.*, 104: 1008-1017.
- PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. (1982). "Quantitative autoradiography of neurotransmitter receptors in Huntington's disease". *Neurology*, 32: 1391-1395.

- PETERS, J.C.; HARPER, A.E. (1985). "Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: Effects on food intake, plasma and brain amino acid concentration and brain neurotransmitter metabolism". *J. Nutr.*, 115: 382-398.
- PETERS, J.C.; HARPER, A.E. (1987). "Acute effects of dietary protein on food intake, tissue amino acids and brain serotonin". *Am. J. Physiol.*, 252: R902-R914.
- PHILLIPS, A.F.; HOLTZMAN, I.R.; TENG, C.; BATTAGLIA, F. (1978). "Tissue concentration of free amino acids in term human placentas". *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 131: 881-887.
- PICOU, D.; PHILLIPS, M. (1972). "Urea metabolism in malnourished and recovered children receiving a high or low protein diet". *Am. J. Clin. Nutr.*, 25: 1261-1266.
- POGSON, C.I.; SALTER, M.; KNOWLES, R.G. (1986). "Regulation of hepatic aromatic amino acid metabolism". *Biochem. Soc. Trans.*, 14: 999-1001.
- POND, W.G.; BREUER, L.H.; LOOSLI, J.K.; WARNER, R.G. (1964). "Effects on the alfa-hydroxy analogues of isoleucine, lysine, threonine and triptophan and the alfa-keto analogue of triptophan and the level of the corresponding amino acids on growth of rats". *J. Nutr.*, 83: 85-93.
- POPPER, H. (1937). "Creatinine determination in blood". *Biochem. J.*, 291: 354-367.
- POSO, A.R.; WERT, J.J. Jr.; MORTIMORE, G.E. (1982). "Multi-functional control by amino acids of deprivation-induced proteolysis in liver: Role of leucine". *J. Biol. Chem.*, 257: 12114-12120.
- POSO, A.R.; MORTIMORE, G.E. (1984). "Requirement for alanine in the amino acid control of deprivation-induced protein degradation in liver". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4270-4274.
- PREEDY, V.R.; GARLICK, P.J. (1985). "The effect of glucagon administration on protein synthesis in skeletal muscles, heart and liver in vivo". *Biochem. J.*, 228: 575-581.
- PREEDY, V.R.; GARLICK, P.J. (1986). "The response of muscle protein synthesis to nutrient intake in postabsorptive rats: the role of insulin and amino acids". *Bio. Rep.*, 6: 177-183.
- PRONCZUK, A.; ROGERS, Q.R.; MUNRO, H.N. (1970). "Liver polysome patterns of rats fed amino acid imbalanced diets". *J. Nutr.*, 100: 1249.

- PUGLIESE, M.T. (1990). "Endocrine function adaptations in undernutrition". *World Rev. Nutr. Diet*, 622: 186-211.
- RABINOVITZ, M. (1992). "The pleiotypic response to amino acid deprivation is the result of interactions between components of the glycolysis and protein synthesis pathways". *FEBS Lett.*, 2: 113-116.
- RAGHVAN, V.; MALIK, G.B.; RAYS, M.; MALAVIYA, A.N. (1976). "Serum proteins with special references to immunoglobulins in premature Indian neonates". *Indian J. Pediatr.*, 11: 815.
- RAMALINGASWAMI, V. (1975). "Nutrition, cell biology and human development". *WHO Chron.*, 29: 306.
- RAMANADHAM, M.; KAPLAY, S.S. (1982). "Eritrocyte osmotic fragility in protein-energy malnutrition: cholesterol, phospholipid and Ca^{2+} , Mg^{2+} adenosine triphosphatase". *Biochem. Med.*, 27: 226-231.
- RANA, S.V.; MEHTA, S. (1991). "Effect of protein calorie malnutrition on in vitro incorporation of ($H-C^{14}$)-glucose in brain of young rhesus monkeys". *Indian J. Exp. Biol.*, 29: 259-268.
- RANNELS, D.E.; KAO, R.; MORGAN, H.E. (1975). "Effect of insulin on protein turnover in heart muscle". *J. Biol. Chem.*, 250: 1694-1701.
- RAO, R.H. (1988). "Diabetes in the undernourished: Coincidence of consequence?" *Endocrin. Rev.*, 9: 67-87.
- REEDS, P.J.; LADITAN, A.A.O. (1976). "Serum albumin and transferrin in protein-energy malnutrition". *Br. J. Nutr.*, 36: 225.
- REEM, G.H.; FRIEND, C. (1969). "Properties of 5'-phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase in virus induced murine leukemia". *Biochim. Biophys. Acta*, 171: 58.
- REID, M.E.; VON SALLMANN, L. (1960). "Nutritional studies with the guinea pig. VI. Tryptophan (with ample dietary niacin)". *J. Nutr.*, 70: 329-336.
- REITMAN, S.; FRANKEL, S. (1957). "Determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases". *Am. J. Clin. Path.*, 28: 56-63.

- RENNIE, M.J.; EDWARDS, R.H.T.; HALLIDAY, D.; MATTHEWS, D.E.; WOLMAN, S.L.; MILLWARD, D.J. (1982). "Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man: The effects of feeding and fasting". *Clin. Sci.*, 63: 519-523.
- RENNIE, M.J. (1985). "Muscle protein turnover and the wasting due to injury and disease". *Br. Med. Bull.*, 41: 257-264.
- RETTMER, R. (1993). "Nutritional assessment: macronutrients, vitamins and trace elements". En: "Clinical Chemistry. Concepts and applications". Ed: Anderson, S.C.; Cockayne, S. W.B. Saunders Company. USA.
- ROBERT, J.-J.; BIER, D.M.; ZHAO, X.H.; MATTHEWS, D.E.; YOUNG, V.R. (1982). "Glucose and insulin effects on de novo amino acid synthesis in young men: Studies with stable isotope labeled alanine, glycine, leucine and lysine". *Metabolism.*, 31: 1210-1218.
- ROBINSON, J.M.; KARNOVSKY, M.J. (1983). "Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium". *J. Histochem. Cytochem.*, 31: 1197-1208.
- ROGERS, Q.R.; LEUNG, P.M.B. (1973). "The influence of amino acids on the neuroregulation of food intake". *Fed. Proc.*, 32: 1709-1719.
- ROSCHLAU, P.; BERNT, E.; GRUBER, W. (1975). 9th Int. Congr. of Clin. Chem., Toronto, Abst. N° 1.
- ROSE, W.C. (1957). "The amino acid requirements of adult man". *Nutr. Abstr. Rev.*, 27: 631-647.
- ROSENBERG, R.; YOUNG, J.D.; ELLORY, J.C. (1980). "L-Tryptophan transport in human red blood cells". *Biochem. Biophys. Acta*, 598: 375-384.
- ROSENTHAL, H.L.; ALLISON, J.B. (1956). *J. Agr. Fed. Chem.*, 4: 792.
- ROSSO, P. WINICK, M. (1975). "Effects of early undernutrition and subsequent refeeding on alkaline ribonuclease activity of rat cerebrum and liver". *J. Nutr.*, 105: 1104.
- ROZOVSKI, S.J.; ROSSO, P.; WINICK, M. (1978). "The effect of malnutrition and rehabilitation on the metabolism of polyamines in rat liver". *J. Nutr.*, 108, 1680.

- RUDY, J.W.; CASTRO, c.a. (1990). "Undernutrition during the brain growth period of the rat significantly delays the development of processes mediating Pavlovian Trace Conditioning". *Beh. Neur. Biol.*, 53: 307-320.
- SAID, A.K.; HEGSTED, D.M.; HAYES, K.C. (1974a). "Response of adult rats to low dietary levels of essential amino acids". *J. Nutr.*, 100: 1363-1376.
- SAID, A.K.; HEGSTED, D.M.; HAYES, K.C. (1974b). "Response of adult rats to deficiencies of different essential amino acids". *Brit. J. Nutr.*, 31: 47-57.
- SALTER, M.; KNOWLES, R.G.; POGSON, C.I. (1986). "Transport of the aromatic amino acids into isolated rat liver cells. Properties of uptake by two distinct systems". *Biochem. J.*, 233: 499-506.
- SANTIDRIAN, S. (1981). "Muscle protein breakdown in young rats fed on an energy-depleted diet". *Rev. Esp. Fisiol.*, 37: 23-30.
- SANTIDRIAN, S.; GOENA, M.; CUEVILLAS, F.; LARRALDE, J. (1988). "Muscle protein synthesis of rats fed a kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) diet". *Rev. Esp. Fisiol.*, 1: 109-110.
- SCHEEL-KRUGER, J. (1986). "Dopamine-GABA interactions: evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal ganglia and the limbic system". *Acta Neurol. Scan.*, 107: 1-54.
- SCHIMKE, R.T. (1962). "Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat". *J. Biol. Chem.*, 237: 459-468.
- SCHOCH, G.; TOPP, H.; HELD, A.; HELLER-SCHOCH, G.; BALLAUF, A.; MANZ, F.; SANDER, G. (1990). "Interrelation between whole-body turnover rates of RNA and protein". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 44: 647-658.
- SCHULTE, H.M.; CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W.; BOOTH, J.D.; OLDFIELD, E.D.; CUTLER, G.B. Jr.; LORIAUX, D.L. (1985). "Continuous administration of synthetic ovine corticotropin-releasing factor in man". *J. Clin. Invest.*, 75: 1781.
- SCHULTZ; CURRAN. (1970). *Physiol. Rev.*, 50: 637.

- SCHWENK, W.F.; TSALIKIAN, E.; BEAUFRERE, B.; HAYMOND, M.W. (1985). "Recycling of an amino acid label with prolonged isotope infusion: Implications for kinetic studies". *Am. J. Physiol.*, 248: E482-E487.
- SCHWORER, C.M.; MORTIMORE, G.E. (1979). "Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: Mediation by selective deprivation of intracellular amino acids". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3169-3173.
- SCOTT, E.B. (1956). "Histopathology of amino acid deficiencies. V. Isoleucine". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92: 134-140.
- SCOTT, E.B. (1966). "Histopathology of amino acid deficiencies". *Arch. Pathol.*, 82: 119-128.
- SCRIMSHAW (1966). *Am. J. Clin. Nutr.*, 18: 321.
- SCRIVER, C.R.; ROSENBERG, L.E. (1973). "Distribution of amino acids in body fluids". En: "Amino acid metabolism and its disorders". Ed: A.L. Shaffer. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 39-60.
- SEELIG, H.P., WUEST, H. (1969). "Creatinine determination by the Jaffe reaction". *Arztl. Lab.*, 15: 34-39.
- SEMON, B.A.; LEUNG, P.M.B.; ROGERS, Q.R.; GIETZEN, D.W. (1987). "Effect of type of protein on food intake of rats fed high protein diets". *Physiol. Behav.*, 41: 451-458.
- SEGLIN, P.O.; GORDON, P.B.; POLI, A. (1980). "Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes". *Biochim. Biophys. Acta*, 630: 103-118.
- SHENG, Y.B.; BADGER, T.M.; ASPLUND, J.M.; WIXOM, R.L. (1977). "Incorporation of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ into histidine in adult man". *J. Nutr.*, 107: 621-630.
- SHERWIN, R.; FISCHER, M.; HENDLER, R.; FELIG, P. (1976). "Hyperglucagonemia and blood glucose regulation in normal, diabetic and obese subjects". *N. Engl. J. Med.*, 294, 455.
- SHETTY, P.S.; WATRASIEWICZ, K.E.; JUNG, R.T.; JAMES, W.P.T. (1979). "Rapid turnover transport proteins: An index of sub-clinical protein-energy malnutrition". *Lancet*, 2: 230-232.

- SHIH, V.E.; BISBY, E.M.; ALPERS, D.H.; BARTSOCAS, C.S.; THIER, S.O. (1971). "Studies of intestinal transport defect in Hartnup disease". *Gastroenterology*, 61: 445.
- SHIMAN, R.; GRAY, D.W. (1980). "Substrate activation of phenylalanine hydroxylase". *J. Biol. Chem.*, 255: 4793-4800.
- SHIMAN, R.; MORTIMORE, G.E.; SCHWORER, C.M.; GRAY, D.W. (1982). "Regulation of phenylalanine hydroxylase activity by phenylalanine in vivo, in vitro, and in perfused rat liver". *J. Biol. Chem.*, 257: 11213-11216.
- SHOTWELL, M.A.; MATTER, P.M.; JAYME, D.W.; OXENDER, D.L. (1982). "Regulation of amino acid transport system L in chinese hamster ovary cells". *J. Biol. Chem.*, 257: 2974-2980.
- SHOTWELL, M.A.; KILBERG, M.S.; OXENDER, D.L. (1983). "The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells". *Biochim. Biophys. Acta.*, 737: 267-284.
- SIDRANSKY, H.; BABA, T. (1960). "Chemical pathology of acute amino acid deficiencies. III. Morphologic and biochemical changes in young rats fed valine or lysine devoid diets". *J. Nutr.*, 70: 463-483.
- SIDRANSKY, H.; VERNEY, E. (1964). "Chemical pathology of acute amino acid deficiencies. VII. Morphologic and biochemical changes in young rats force-fed arginine, leucine, isoleucine or phenylalanine devoid diets". *Arch. Pathol.*, 78: 134-148.
- SIDRANSKY, H.; WAGLE, D.S.; BONGIORNO, M.; VERNEY, E. (1969). "Studies on blood glucose and hepatic glucogen in rats force-fed a threonine devoid diet". *J. Nutr.*, 98: 477-486.
- SIDRANSKY, H.; VERNEY, E. (1970). "Enhanced hepatic protein synthesis in rats force-fed a tryptophan-devoid diet". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 135: 618-622.
- SIMONSON, D.; TAMBORLANE, W.V.; SHERWIN, R.S.; DEFRONZO, R.A. (1985). "Improved insulin sensitivity in patients with type 1 diabetes mellitus after CSII". *Diabetes* 34, Suppl. 3: 80-86.
- SINGH, U.K.; AGARWAL, K.N.; SHANKER, R. (1990). "Effect of undernutrition in succinate dehydrogenase and acetylcholinesterase in developing rat brain". *Indian J. Exp. Biol.*, 28: 868-870.

- SIREN, M.J. (1963). "A factor preventing cannibalism in cockerels". *Life Sci.*, 2: 120-124.
- SJOLIN, J.; STJERNSTROM, H.; HENNEBERG, S. (1989). "Splanchnic and peripheral release of 3-methylhistidine in relation to its urinary excretion in human infection". *Metabolism*, 38: 23-29.
- SKETCHER, R.D.; FERN, E.B.; JAMES, W.P.T. (1974). "The adaptation in muscle oxidation of leucine to dietary protein and energy intake". *Br. J. Nutr.*, 31: 333-342.
- SKETCHER, R.D.; JAMES, W.P.T. (1974). "Branched-chain amino acid oxidation in relation to catabolic enzyme activities in rats given a protein-free diet at different stages of development". *Brit. J. Nutr.*, 32: 615-623.
- SKOTTNER, A.; CLARK, R.G.; ROBINSON, I.C.A.F.; FRYKLUND, L. (1987). "Recombinant human insulin-like growth factor: testing the somatomedin hypothesis in hypophysectomized rats". *J. Endocrinol.*, 112: 123-132.
- SLOANE, D.; TAITZ, L.S.; GILCHRIST, G.S. (1961). "Aspects of carbohydrate metabolism in Kwashiorkor with special reference to spontaneous hypoglycemia". *Brit. Med. J.*, 1: 32-64.
- SMART, J.L. (1993). "Malnutrition, Learning and Behavior". *Proc. Nutr. Soc.*, 52: 189-199.
- SMITH, S.R.; GOODMAN, M.H.; ARROYAVE, G.; VITERI, F.E. (1973). *Am. J. Clin. Nutr.*, 26: 982.
- SMITH, S.R.; EDGAR, P.J.; POZEFSKY, T.; CHHETRE, M.K.; PROUT, T.E. (1975). "Insulin secretion and glucose intolerance in adults with protein calorie malnutrition". *Metabolism*, 24: 1073-1078.
- SMITH, D.M.; SUGDEN, P.H. (1986). "Contrasting response of protein degradation to starvation and insulin as measured by release of N-methylhistidine of phenylalanine from the perfused heart". *Biochem. J.*, 237: 391-395.
- SMITH, D.; GREEN, H.; THOMSON, J.; SHARRATT, M. (1989). "Capillary and size interrelationships in developing rat diaphragm, EDL, and soleus muscle fiber types". *Am. J. Physiol.*, 254: C50-C58.

- SMITH, R.J. (1990). "Glutamine metabolism and its physiologic importance". *J. Parenter. Enter. Nutr.*, 14: 40S-44S.
- SNYDER, D.K.; CLEMMONS, D.R.; UNDERWOOD, L.E. (1988). "Treatment of obese, diet-restricted subjects with growth hormone for 11 weeks: Effects on anabolism, lipolysis and body composition". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67: 54-81.
- SOARES, M.J.; SHETTY, P.S. (1991). "Basal metabolic rates and metabolic economy in chronic undernutrition". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 45: 363-373.
- SOEMITRO, S.; BLOCK, K.P.; CROWELL, P.L.; HARPER, A.E. (1989). "Activities of branched-chain amino acid degrading enzymes in liver from rats fed different dietary levels of protein". *J. Nutr.*, 119: 1203-1212.
- SOUBA, W.W. (1987). "Interorgan ammonia metabolism in health and disease: a surgeon's view". *J. Parenter. Enter. Nutr.*, 11: 569.
- SOUBA, W.W.; KLIMBERG, V.S.; PLUMLEY, D.A.; SALLOUM, R.M.; FLYNN, T.C. (1990). "The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection". *J. Surg. Res.*, 48: 383-391.
- SOUBA, W.W. (1991). "Glutamine: a key substrate for the splanchnic bed". *Annu. Rev. Nutr.*, 11: 285-308.
- STEFFEE, W.P.; ANDERSON, C.F.; YOUNG, V.R. (1981). "An evaluation of the diurnal rhythm of urea excretion in healthy young adults". *J. Parent. Ent. Nutr.*, 5: 378-384.
- STEGINK, L.D.; MOSS, J.; PRINTEN, K.J.; CHO, E.S. (1980). "D-methionine utilization in adult monkeys fed diets containing DL-methionine". *J. Nutr.*, 110: 1240-1246.
- STENFLO, J.; GANROT, P.O. (1972). "Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. I. Identification and purification of a dicoumarol-induced abnormal prothrombin from bovine plasma". *J. Biol. Chem.*, 247: 8160.
- STEPHEN, J.M.J.; (1968). "Adaptive enzyme changes in liver and muscle of rats during protein depletion and refeeding". *Br. J. Nutr.*, 22: 153-163.

- STEPHEN, J.M.J.; WATERLOW, J.C. (1968). "Effect of malnutrition on activity of two enzymes concerned with amino acid metabolism in human liver". *Lancet*, 1: 118-119.
- STIREWALT, W.S.; LOW, R.B. (1983). "Effects of insulin in vitro on protein turnover in rat epitrochlearis muscle". *Biochem. J.*, 210: 323-330.
- STORCH, K.J.; WAGNER, D.A.; BURKE, J.F.; YOUNG, V.R. (1990). [1-¹³C; methyl-²H₃]-methionine kinetics in humans: methionine conservation and cystine sparing". *Am. J. Physiol.*, 258: E790-E798.
- STURMAN, J.A.; GAULL, G.E. (1975). "Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey". *J. Neurochem.*, 25: 831-835.
- SUGANO, M. (1983). "Hypocholesterolemic effect of plant protein in relation to animal protein. Mechanism of action in animal and vegetable proteins, in lipid metabolism and atherosclerosis". Ed: Gybney, M.J.; Kritchevsky, D. Alan R. Liss Inc. New York, pp: 51-81.
- SUGANO, M.; ISHIDA, T.; KOBAYASHI, K. (1988). "Protein-fat interaction on serum cholesterol level, fatty acid desaturation and eicosanoid production in rats". *J. Nutr.*, 118: 548-554.
- SUNDAE, M.L. (1972). "Utilization of D- and DL- amino acids and analogs". *Poult. Sci.*, 51: 44-55.
- SUZIC, S.; RADUNOVIC, L.; JANKOVIC, V.; SEGOVIC, R. (1987). "Effect of protein-free diet in amino acid homeostasis of rat blood plasma and gut contents". *FEBS Letter*, 216: 287-290.
- SWENNE, I.; CRACE, C.J.; MILNER, R.D.G. (1987). "Persistent impairment of insulin secretory response to glucose in adult rats after a limited period of protein-calorie malnutrition early in life". *Diabetes*, 36: 454-458.
- TACKMAN, J.M.; TEWS, J.K.; HARPER, A.E. (1990). "Dietary disproportions of amino acids in the rat: Effects on food intake, plasma and brain amino acids and brain serotonin". *J. Nutr.*, 120: 521-533.
- TAMAKI, T. (1985). "Effect of growth on muscle capillarity and fiber type composition in rat diaphragm". *Eur. J. Appl. Physiol.*, 54: 24-29.

- TANAKA, H.; NAKATOMI, Y.; OGURA, M. (1987). "Metabolism of glycine and threonine in growing rats at various dietary protein levels". *Agric. Biol. Chem.*, 51: 3087-3093.
- TAWA, N.E. Jr.; GOLDBERG, A.L. (1980). "Protein deficiency lowers rates of protein degradation and lysosomal enzyme activities in rat skeletal muscle". *Fed. Proc.*, 39: 433.
- TAWA, N.E. Jr. (1984). "Metabolic consequences of protein deficiency and starvation". Ph. D. Thesis, Harvard University.
- TAYLOR, J.B.; CALVERT, C.C.; BALDWIN, R.L.; SAINZ, R.D. (1986). "Effects of dietary protein, fat and restriction on body composition and energy balance in lactating rats". *J. Nutr.*, 116: 1519-1528.
- TEMLER, R.S.; DORMOND, C.A.; SIMON, E. (1983). "Alterations in hepatic enzyme activities in rats fed increased levels of soya protein with or without methionine supplementation". *Nutr. Rep. Int.*, 28: 252-265.
- TERRY, B.E.; YAMANAKA, W.K.; ANDERSON, H.L.; WIXOM, R.L. (1977). "Total parenteral nutrition with selective histidine depletion in man. II. Hematological, lipid and hormonal responses". *Am. J. Clin. Nutr.*, 30: 900-909.
- TESSARI, P.; INCHIOSTRO, S.; BIOLO, G.; TREVISAN, R.; FANTIN, G.; MARESCOTTI, M.C.; IORI, E.; TIENGO, A.; CREPALDI, G. (1987). "Differential effects of hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia on leucine-carbon metabolism in vivo". *J. Clin. Invest.*, 79: 1062-1069.
- TESSARI, P.; INCHIOSTRO, S.; BIOLO, G.; VINCENTI, E.; SABADIN, L. (1991). "Effects of acute systemic hyperinsulinemia on forearm muscle proteolysis in healthy man". *J. Clin. Invest.*, 88: 27-33.
- TEWS, J.K.; REPA, J.J.; HARPER, A.E. (1992). "Protein selection by rats adapted to high or moderately low levels of dietary protein". *Physiol. Behav.*, 51: 699-712.
- THIER, S.O.; SEGAL, S.; FOX, M.; BLAIR, A.; ROSENBERG, L.E. (1965). "Cystinuria: Defective intestinal transport of dibasic amino acids and cystine". *J. Clin. Invest.*, 44: 442.

- THOMSON, R.Y.; HEAGY, F.C.; HUTCHISON, W.C.; DAVIDSON, J.N. (1953). "The deoxyribonucleic acid content of the rat cell nucleus and its use in expressing the results of tissue analysis, with particular reference to the composition of liver tissue". *Biochem. J.*, 53: 460.
- THURMOND, J.B.; FREEMAN, G.B.; SOBLOSKY, J.S.; IENI, J.R.; BROWN, J.W. (1990). "Effect of dietary tyrosine on L-dopa and amphetamine induced changes in locomotor activity and neurochemistry in mice". *Pharmacol. Biochem. & Behav.*, 37: 259-266.
- TISCHLER, M.E. (1981). "Hormonal regulation of protein degradation in skeletal and cardiac muscle". *Life Sci.*, 28: 2569-2576.
- TISCHLER, M.E.; DESAUTELS, M.; GOLDBERG, A.L. (1982). "Does leucine, leucyl-tRNA or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle?" *J. Biol. Chem.*, 257: 1613-1621.
- TORUN, B.; VITERI, F.E. (1988). "Protein-energy malnutrition". En: "Modern Nutrition in Health and Disease". Ed: Shils, M.E.; Young, V.R.. Lea & Febiger. Philadelphia. USA.
- TRENKLE, A. (1974). "Hormonal and nutritional interrelations and their effects on skeletal muscle". *J. Anim. Sci.*, 38: 1142-1152.
- TRESGUERRES, J.A.F. (1992). En: "Fisiología Humana". Ed. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid. Cap. 73.
- TREVISAN, R.; NOSADINI, R.; AVOGARO, A.; LIPPE, G.; DUNER, E.; FIORETTO, P.; DEANA, R.; TESSARI, P.; TIENGO, A.; VELUSSI, M.; CERNIGOI, A.; DEL PRATO, S.; CREPALDI, G. (1986). "Type 1 diabetes is characterized by insulin resistance not only with regard to glucose, but also to lipid and amino acid metabolism". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 1155-1162.
- TRINDER, P. (1969a). "Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor". *Ann. Clin. Biochem.*, 6: 24-27.
- TRINDER, P. (1969b). "Simple turbidimetric method for the determination of serum cholesterol". *Ann. Clin. Biochem.*, 6:165-166.

- TRISCHITTA, V.; REAVEN, G.M. (1988). "Evidence of a defect in insulin-receptor recycling in adipocytes from older rats". *Am. J. Physiol.*, 254: E39-E44.
- TWOMBLEY; MEYER (1961). *J. Nutr.*, 74: 453.
- UMANA. R. (1965). *J. Nutr.*, 85: 169.
- UMPLEBY, A.M.; BOROUJERDI, M.A.; BROWN, P.M.; CARSON. E.R.; SONKSEN, P.H. (1986). "The effect of metabolic control on leucine metabolism in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients". *Diabetologia*, 29: 131-141.
- UNGER, R.H. (1985). "Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances". *Diabetologia*, 28: 574.
- USING, H.H. (1943). "The nature of the amino nitrogen of red corpuscule". *Acta Physiol. Scan.*, 5: 335-351.
- VAJRESWARI, A.; NARAYANAREDDY, K.; SRINIVASA RAO, P. (1990). "Fatty acid composition of erythrocyte membrane lipid obtained from children suffering from kwashiorkor and marasmus". *Metabolism*, 39: 779-782.
- VANNINI, P.; MARCHESINI, G.; FORLANI, G. (1982). "Branched-chain amino acids and alanine as indices of the metabolic control in type 1 (insulin-dependent) and type 2(non-insulin-dependent) diabetic patients". *Diabetologia*, 22: 217-219.
- VAUGHAN, M.H., Jr. (1972). "Comparison of regulation of synthesis and of 45 S ribosomal precursor RNA in diploid and heteroploid human cells in response to valine deprivation". *Exp. Cell. Res.*, 75: 23.
- VELU, J.G.; SCOTT, H.M.; BAKER, D.H. (1972). "Body composition and nutrient utilization of chicks fed amino acid diets containing graded amounts of either isoleucine or lysine". *J. Nutr.*, 102: 741-748.
- VENERO, J.L.; HERRERA, A.J.; MACHADO, A.; CANO, J. (1992). "Changes in neurotransmitter levels associated with the deficiency of some essential amino acids in the diet". *Br. J. Nutr.*, 68: 409-420.

- VINNARS, E.; BERGSTROM, J.; FURST, P. (1975). "Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue". *Ann. Surg.*, 182: 665-671.
- VITALE, J.J. (1979). "Nutrition and the musculoskeletal system". En: "Human nutrition". Vol.4. "Nutrition. Metabolic and clinical applications". Plenum Press, New York.
- VITERI, F.E.; ALVARADO (1970). *Rev. Col. Med.*, 21: 175.
- VITERI, F.E; FLORES; ALVARADO; BEHAR (1973). *Am. J. Dig. Dis.*, 18: 201.
- WAGENMAKERS, A.J.M.; SALDEN, H.J.M.; VEERKAMP, J.H. (1985). "The metabolic fate of branched-chain amino acids in rat muscle homogenates and diaphragms". *Int. J. Biochem.*, 17: 957-965.
- WALSER, M. (1991). "Misinterpretation of nitrogen balances when glutamine stores fall or are replenished". *Am. J. Clin. Nutr.*, 53: 1337-1338.
- WANG, S.Y.; HALBAN, P.A.; ROWE, J.W. (1988). "Effect of aging on insulin synthesis and secretion". *J. Clin. Inv.*, 81: 176-184.
- WANNEMACHER, R.W.; ALLISON, J.B. (1968). En: "Protein nutrition and free amino acid patterns". Ed: Leathem, J.H. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, pp: 206-227.
- WARD, M.W.N.; HALLIDAY, D.; MATTHEWS, D.E.; MATTHEWS, S.M.; PETERS, J.L.; HARRISON, R.A.; CLARK, C.G.; RENNIE, M.J. (1983). "The effect of enteral nutrition support on skeletal muscle protein synthesis and whole-body protein turnover in fasted surgical patients". *Hum. Nutr. Clin. Nutr.*, 37C: 453-458.
- WARD, H.C.; HALLIDAY, D.; SIM, A.W. (1987). "Protein and energy metabolism with biosynthetic human growth hormone after gastrointestinal surgery". *Ann. Surg.*, 206: 56-61.
- WATERLOW, J.C.; WILLS, V.G. (1960). "Balance studies in malnourished Jamaican infants. I. Absorption and retention of nitrogen and phosphorus". *Br. J. Nutr.*, 14: 183.
- WATERLOW, J.C. (1963). "The assessment of marginal protein malnutrition". *Proc. Nutr. Soc.*, 22: 66.

- WATERLOW, J.C.; STEPHEN, J.M.L. (1966). "Adaptation of the rat to a low protein diet: The effect of a reduced protein intake on the pattern of incorporation of L(14C)-lysine". Br. J. Nutr., 20: 461-484.
- WATERLOW, J.C.; ALLEYNE, G.A.O. (1971). Adv. Protein Chem., 25: 117-241. Citado en MARCOS, A. (1982). "Adaptación del metabolismo proteico hepático al stress en ratas con malnutrición proteica y calórica proteica". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- WATERLOW, J.C.; GARLICK, P.J.; MILLWARD, D.J. (1978a). "Free amino acids". En: "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". North Holland Publishing Company. Amsterdam. Cap. 4, pp: 117-175.
- WATERLOW, J.C.; GARLICK, P.J.; MILLWARD, D.J. (1978b). "Protein turnover and growth". En: "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". North Holland Publishing Company. Amsterdam. Cap. 16, pp: 529-593.
- WATERLOW, J.C.; GARLICK, P.J.; MILLWARD, D.J. (1978c). "The effects of nutrition and hormones on protein turnover in muscle". En: "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". North Holland Publishing Company. Amsterdam. Cap. 18, pp: 625-694.
- WATERLOW, J.C. (1986). "Metabolic adaptation to low intakes of energy and protein". Ann. Rev. Nutr., 6: 495-526.
- WATERLOW, J.C. (1990). "Nutritional adaptation in man". Am. J. Clin. Nutr., 51: 2259-2263.
- WEIL, L.; RUSSEL, M.A. (1940). J. Biol. Chem., 136: 9.
- WEINKOWE, C.; WEINKOWE, E.A.; TIMME, M.; PIMSTONE, B.L. (1977). "Pancreatic islets of malnourished rats". Arch. Pathol. Lab. Med., 101: 266-270.
- WEISSBACH, L.; HANDLOGTEN, M.E.; CHRISTENSEN, H.N.; KILLBERG, M. (1982). "Evidence for two sodium-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Tyme-dependent changes in activity". J. Biol. Chem., 257: 12006-12011.

- WERNIG, A.; IRINTCHEV, A.; WEISSHAUPT, P. (1990). "Muscle injury, cross-sectional area and fibre type distribution in mouse soleus after intermittent wheel-running". *J. Physiol.*, 428: 639-652.
- WESTERINK, B.H.C.; DE VRIES, J.B. (1991). "Effect of precursor loading on the synthesis rate and release of dopamine and serotonin in the striatum: a microdialysis study in conscious rats". *J. Neur.*, 56: 228-233.
- WHEATLEY, S.D.; BRYANT, M.J.; LOMAX, M.A. (1989). "Effect of maintenance feeding and compensatory growth on hind-limb muscle protein metabolism of lambs during subsequent refeeding". *Proc. Nutr. Soc.*, 48: 63A.
- WHITE, M.F.; CHRISTENSEN, H.N. (1982). "Cationic amino acid transport into cultured animal cells. 2. Transport system barely perceptible in ordinary hepatocytes, but active in hepatoma cell lines". *J. Biol. Chem.*, 257: 4450-4457.
- WHITEHEAD, R.G. (1969). "The assessment of nutritional status in protein-malnourished children". *Proc. Nutr. Soc.*, 28: 1-16.
- WHITEHEAD, R.G.; ALLEYNE, G.A.O. (1971). "Pathophysiological factors of importance in protein-calorie malnutrition". *Br. Med. Bull.*, 28: 72.
- WHITEHEAD, R.G.; FROOD, J.D.L.; POSKITT, E.M.E. (1971). "Value of serum-albumin measurements in nutritional surveys. A reappraisal". *Lancet*, 8: 287.
- WHITEHEAD, R.G.; COWARD, W.A.; LUNN, P.G. (1973). "Serum-albumin concentrations and the onset of kwashiorkor". *Lancet*, i: 63.
- WHITEHEAD, R.G.; LUNN, P.G. (1979). "Endocrines in protein-energy malnutrition". *Proc. Nutr. Soc.*, 38: 69-76.
- WIDHALM, K.; ZWIAUER, K.; HADLE, M.; ROTH, E. (1989). "Plasma concentrations of free amino acids during 3 weeks treatment of massively obese children with a very low calorie diet". *Eur. J. Pediatr.*, 149: 43-47.
- WILSON, T.H. (1962). "Amino acids". En: "Intestinal absorption of essential amino acids in man". *Gastroenterology*, 52: 837.

- WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. (1975). "Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood". *Arch. Biophys. Biochem.*, 255: 662-672.
- WINICK, M.; NOBLE, A. (1965). "Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat". *Dev. Biol.*, 12: 451-466.
- WINICK, M.; NOBLE, A. (1966). "Cellular response in rats during malnutrition at various ages". *J. Nutr.*, 89: 300-306.
- WINTER, C.G.; CHRISTENSEN, H.N. (1964). "Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte". *J. Biol. Chem.*, 239: 872-878.
- WOODSIDE, K.H.; WARD, W.F.; MORTIMORE, G.E. (1974). "Effects of glucagon on general protein degradation and synthesis in perfused rat liver". *J. Biol. Chem.*, 249: 5458-5463.
- WOOL, I.G. (1963). *Biochem. Biophys. Acta*, 68: 28.
- WUNNER, W.H.; BELL, J.; MUNRO, H.N. (1966). "The effect of feeding with a tryptophan-free amino acid mixture on rat liver polysomes and ribosomal ribonucleic acid". *Biochem. J.*, 101: 417.
- WURTMAN, R.J. (1970). "Diurnal rhythms in mammalian protein metabolism". En: "Mammalian protein metabolism". Ed: Munro, H.N., Vol. 4. Academic Press. New York. Cap. 36, pp: 445-479.
- WURTMAN, R.J.; FERNSTROM, J.D. (1975). "Control of brain monoamine synthesis by diet and plasma amino acids". *Am. J. Clin. Nutr.*, 28: 538-647.
- YALOW, R.S.; BERGSON, S.A. (1956). "Effects of X rays on trace-labeled I-131 insulin and its relevance to biologic studies with I-131 labeled proteins". *Radiology*, 66: 106.
- YALOW, R.S.; BERGSON, S.A. (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man". *J. Clin. Invest.*, 39: 1157-1175.

- YAMAGUCHI, M.; KANDATSU, M. (1967). "The metabolic activity of muscle proteins. I. Changes in the activities of glutamic-oxalacetic transaminase and Ca^{++} ion-activated ATPase in muscle of rat during protein depletion". *Biol. Chem.*, 31: 776-787.
- YAMAGUCHI, A.; HORIO, Y.; SAKUMA, K.; KATSUTA, S. (1993). "The effect of nutrition on the size and proportion of muscle types during growth". *J. Anat.*, 182: 29-36.
- YAMAMOTO, Y. (1953). "Loss of reserve protein and change of cathepsin activity in protein deficiency". *J. Jap. Soc. Food Nutr.*, 6: 163-173.
- YOKOGOSHI, H.; YOSHIDA, A. (1976). "Some factors affecting the nitrogen sparing action of methionine and threonine in rats fed a protein free diet". *J. Nutr.*, 106: 48-57.
- YOUNG, V.R. (1970). "The role of skeletal muscle and cardiac muscle in the regulation of protein metabolism". En: "Mammalian protein metabolism". Ed. Munro, H.N. Vol. 4. Academic Press. New York. Cap. 40, pp. 586-674.
- YOUNG, V.R.; ALEXIS, S.D.; BALIGA, B.S.; MUNRO, H.N.; MUECKE, W. (1972). "Metabolism of administered 3-methylhistidine. Lack of muscle transfer ribonucleic acid charging and quantitative excretion as 3-methylhistidine and its N-acetyl derivative". *J. Biol. Chem.*, 247: 3592-3600.
- YOUNG, V.R. (1974). "Regulation of protein and skeletal muscle growth". *J. Anim. Sci.*, 38: 1054-1070.
- YOUNG, V.R.; MUNRO, H.N. (1978). "N-methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: and overview". *Fed. Proc.*, 37: 2291-2300.
- YOUNG, G.; HILL, G.L. (1981). "Evaluation of protein energy malnutrition in surgical patients from plasma valine and other amino acids, proteins and anthropometric measurements". *Ann. J. Clin. Nutr.*, 34: 166-172.
- YOUNOSZAI, R.; DIXIT, P.K. (1980). "Decreased insulin secretion by isolated pancreatic islets from rats fed 4% protein". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 164: 317-321.
- ZAHRINGER, J.; PRITZ, N.; GEHEEB, E.; STAB, G. (1985). "Influence of starvation and total protein deprivation on cardiac mRNA levels". *Basic Res. Cardiol.*, 80:1-11.

ZAPF, J.; FROESCH, E.R.; HUMBEL, R.E. (1981). "The insulin like growth factors (IGF) on human serum: Chemical and biological characterization and aspects of their possible physiological role". *Curr. Top. Cell Regul.*, 19: 257-309.

ZEIGLER, T.R.; YOUNG, L.S.; MANSON, J.McK. (1988). "Metabolic effects of recombinant human growth hormone in patients receiving parenteral nutrition". *Ann. Surg.*, 208: 6-16.

ABREVIATURAS

AA:	Aminoácidos
AAA:	Aminoácidos aromáticos
AAB:	Aminoácidos básicos
AAR:	Aminoácidos de cadena ramificada
AAE:	Aminoácidos esenciales
AAN:	Aminoácidos neutros
AANE:	Aminoácidos no esenciales
AAT:	Aminoácidos totales
Ala:	Alanina
Arg:	Arginina
Aspn:	Asparragina
Asp:	Acido Aspártico
Glu:	Acido Glutámico
Gly:	Glicina
Glun:	Glutamina
His:	Histidina
Ile:	Isoleucina
Leu:	Leucina
Lys:	Lisina
Met:	Metionina
Phe:	Fenilalanina
Ser:	Serina
Thr:	Treonina
Trp:	Triptófano
Tyr:	Tirosina
Val:	Valina

Presidencia
r. A. M^e REQUEJO

Vocales
r. I. A. MASOUD
r. P. ANDRES
r. M. RODRIGUEZ

Secretario:
r. R. M^e ORTEGA

Recibido, en el día de hoy, el Tribunal que al

señala se acuerda por mayor con tanto factora
de una moneda calificada

de APRO CUBI LAUDE
Madrid, 27 de Febrero de 1946

El Secretario del Tribunal

Rosa M. Ortega