

MARIA CONCEPCION RAGEL PRUDENCIO

Presidentes: Sr. Dr. _____

TRIBUNAL

Presidentes: Sr. Dr. Gregorio Varela

Vocales: Sr. Dr. Aula Pequero Maso

Vocales: Sr. Dr. Francisco Zorapaga

Vocales: Sr. Dr. Glens Vidales Valero

Secretario: Sr. Dr. Evangelina Palacios Alaz

«CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE ALGUNOS
FARMACOS, EN DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES, CON LA
METIONINA EN RATAS»

DIRECTORES: BALTASAR RUIZ-ROSO CALVO DE MORA
GREGORIO VARELA-MOREIRAS

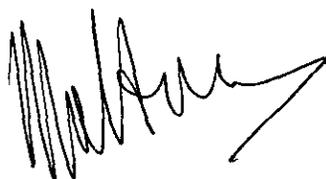
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA I
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

«CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE ALGUNOS
FARMACOS, EN DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES, CON LA
METIONINA EN RATAS»

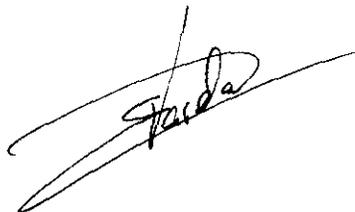
MARIA CONCEPCION RAGEL PRUDENCIO
ASPIRANTE AL GRADO DE DOCTORA EN FARMACIA,



DIRECTORES:

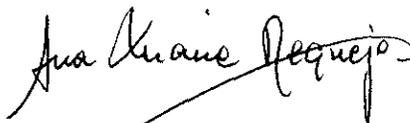


Fdo.: Dr. BALTASAR RUIZ-ROSO CALVO DE MORA



Fdo. Dr. GREGORIO VARELA MOREIRAS

VºBº DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO



Fdo. Dra. ANA MARIA REQUEJO MARCOS

En estas líneas quiero manifestar mi más sincero agradecimiento a todas las personas con las que he compartido estos años de trabajo y, que no solo han hecho posible la terminación de esta Tesis, sino que además, me han enriquecido personalmente:

- Al Prof. Gregorio Varela Mosquera, para mí un ejemplo a seguir, por poder contar durante la realización de este trabajo, con su saber y consejo científico y porque su buen humor ha hecho más grata mi estancia aquí.

- A la Dra. Ana M^a Requejo Marcos, Directora del Departamento, por permitirme realizar esta Tesis y, sobre todo, por el afecto y apoyo que he recibido de su parte tanto, a nivel de trabajo como a nivel humano, particularmente por todo lo positivo que trasmite.

- A mis Directores de Tesis:

Al Dr. Baltasar Ruiz-Roso, por la confianza profesional que siempre ha depositado en mí que me ha servido de estímulo constante y, personalmente, por enseñarme a mantener la serenidad en los momentos difíciles.

Al Dr. Gregorio Varela-Moreiras, por su inestimable ayuda y colaboración, más de compañero que de Director, pues ha participado activamente en buena parte del trabajo tanto desde: el Bioavailability Laboratory, el Instituto de Investigaciones Biomédicas como en el Departamento lo que demuestra su admirable capacidad de trabajo.

Y a los dos en conjunto porque, aunque soy "indirigible", han "dirigido" eficazmente esta Tesis que me ha permitido tomar contacto con el mundo de la investigación y, especialmente con la línea de las interacciones con la que he disfrutado mucho aprendiendo.

- Al "Vitamin Bioavailability Laboratory" del "United States Department of Agriculture", "Human Nutrition Research Center on Aging" de la "Tufts University". Boston (EEUU), por su ayuda en el análisis del ácido fólico, S-adenosilmetionina y S-adenosilhomocisteína mediante cromatografía de afinidad y HPLC.

- Al Dr. Santiago Oya y a su equipo del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina (U.C.M.) por su colaboración con los trabajos de histología.

- Al equipo del laboratorio 2.7. del Instituto de Investigaciones Biomédicas (C.S.I.C.), donde me recibieron con una entrañable acogida, a pesar de mi corta estancia.

- A mis "compis" Cayetana, Lola, Lourdes, Isabel, Elena y Elisa porque todas habeis sido buenas compañeras y quiero señalar especialmente:

- A Cayetana, por compartir conmigo muchos buenos y malos ratos.

- A Lola y Lourdes, por brindarme desinteresadamente su amplia experiencia en el manejo de animales en la última parte de la experimentación y que supuso una gran ayuda para mí.

- A Elena, por su colaboración en la extracción de ácido fólico en donde no solo pasamos buenos ratos.

- A Isabel, por su amistad y disponibilidad en todo momento.

- A mis padres para quienes todos los agradecimientos son pocos, por su sincera, cariñosa y paciente ayuda en esta Tesis y en muchas cosas más.

- Al Departamento de Química Inorgánica, al que considero mi tercera casa, en donde siempre he encontrado un ambiente agradable y la ayuda necesaria cuando la he necesitado. A la Dra. Esther Parrondo, a M^a Teresa y muy especialmente a mi hermana, la Dra. Victoria Ragel.

- A Miguel, que a su manera, también ha colaborado día a día con su apoyo y paciencia.

- A Mar, que me ayudó mucho en la determinación de las transaminasas y, sobre todo, porque hemos cultivado una sólida amistad de la que guardaré siempre un buen recuerdo.

- A Paco García Salinero por su ayuda en el cuidado de las últimas ratas y su buena disposición a colaborar.

- A Charo, Estrella, Cayetana, Ana López, Mar, Paqui, Olivia, Amalia, Eva y especialmente a Feliciano, por su desinteresada ayuda en el final del segundo experimento, sin la cual no hubiera podido realizar mi trabajo.

- A Marta de Paula y Marta Darder del Departamento de Bioquímica, porque me han sacado varias veces de apuros sin olvidar los buenos ratos de tertulia que tuvimos.

- A Juan, por su ayuda incondicional en todo momento.

- A Jesús, Charo, Ana López, Ana Pérez, Angel Agis, Isabel Orvay y Miki porque he contado con su ayuda en determinados momentos.

ABREVIATURAS:

Aa = aminoácido
ACAP = acetaminofeno o paracetamol
AIN-76 = American Institute of Nutrition (1977)
AH = análisis histológico
AINE = analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos
ASA = ácido acetilsalicílico o aspirina
ATP = trifosfato de adenosina
BHT = butilhidroxitolueno
CD = carbidopa
CDG = coeficiente de digestibilidad de la grasa
CDN = coeficiente de digestibilidad del nitrógeno
CEA = coeficiente de eficacia alimentaria
CEP = coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento
CI = control de ingesta
COMT = catecol-orto-metiltransferasa
CP = control de peso
CUM = coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno
CUN = coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno
DEF MET = deficiencia en metionina
FTF = formiltetrahidrofolatos
GOT = glutamato oxalacetato transaminasa
GPT = glutamato piruvato transaminasa
GSH = glutation reducido
GSSG = glutation oxidado
H = homocisteína
H₂F = dihidrofolato
H₄F = tetrahidrofolato
HS = parámetros hepáticos y séricos
HT = hepatotoxicidad
IHS = índice hepatosomático
INF = interacciones nutriente fármaco
LAAD = L-aminoácido aromático decarboxilasa
LD = levodopa
LD50 = levodopa/carbidopa 50/5 mg/Kg peso corporal
LD175 = levodopa/carbidopa 175/17,5 mg/Kg peso corporal
MTF = metiltetrahidrofolatos
N = nitrógeno
NABQI = N-acetilbenzoquinonaimina
PA = período de adaptación
PAF = proteína de alta afinidad por el ácido fólico
PAPS = 3'-fosfoadenosil-5-fosfosulfato
PB = período de balance
PF = lote alimentado a la par o "pair fed"
PH = peso de hígado y transaminasas
PteGlu n = ácido pteroilglutámico + n^o de restos de ácido glutámico
SAH = S-adenosilhomocisteína
SAM = S-adenosilmetionina
THF = tetrahidrofolatos sin sustituir
UDPG = uridin difosfo glucurónido

1.- INTRODUCCION Y OBJETO	1
2.- REVISION BIBLIOGRAFICA	7
2.1.- LA METIONINA COMO NUTRIENTE	9
2.1.1. Características químicas	9
2.1.2. Absorción, transporte y metabolismo	9
2.1.3. Necesidades e ingestas recomendadas	14
2.2.- ALGUNAS FUNCIONES DE LA METIONINA EN EL METABOLISMO CELULAR.	17
2.2.1. Ruta transmetilación-transulfuración.	17
2.2.1.1. Acido fólico.	19
2.2.1.2. S-adenosilmetionina y S-adenosilhomocisteína	22
2.2.2. Síntesis y niveles celulares de glutathion.	24
2.2.2.1. Glutathion y detoxificación de xenobióticos	25
2.3.- INGESTA DEFICITARIA EN METIONINA	27
2.4.- ALGUNOS FARMACOS QUE INTERACCIONAN CON LA UTILIZACION DE LA METIONINA:	32
2.4.1. Analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos: ácido acetilsalicílico y acetaminofeno	32
2.4.1.1. Clasificación farmacológica, aplicaciones terapéuticas y dosificación.	32
2.4.1.2. Consumo de estos analgésicos y grupos de riesgo.	34
2.4.1.3. Interacciones analgésicos-metionina:	37
2.4.1.3.1. Acido acetilsalicílico.	37
2.4.1.3.2. Acetaminofeno	39
2.4.2.- Antiparkinsonianos: levodopa	50
2.4.2.1. Clasificación farmacológica, aplicaciones terapéuticas y dosificación.	50
2.4.2.2. Consumo de levodopa y estado nutricional de enfermos de Parkinson	52
2.4.2.3. Interacciones levodopa-metionina.	54
2.5.- TECNICAS DE DETERMINACION DE BIODISPONIBILIDAD	59
2.5.1. Proteína.	59
2.5.2. Grasa	63
2.5.3. Folatos en tejidos.	64

3.- MATERIAL Y METODOS	65
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.	67
3.2. ANIMALES E INSTALACIONES	73
3.3. DIETAS UTILIZADAS Y ADMINISTRACION DE FARMACOS.	75
3.3.1. Experimentos A y B	75
3.3.2. Experimento C.	76
3.4. TECNICAS ANALITICAS: HUMEDAD, PROTEINA, EXTRACTO ETEREO, TRANSAMINASAS, EXTRACCION Y ANALISIS DE ACIDO FOLICO Y DERIVADOS, DE S-ADENOSILMETIONINA Y DE S-ADENOSILHOMOCISTEINA.	78
3.5. ESTUDIO MORFOLOGICO DEL HIGADO	82
3.6. PARAMETROS E INDICES CALCULADOS	87
3.7. TRATAMIENTO ESTADISTICO.	89
 4.- RESULTADOS.	 91
4.1. EXPERIMENTO A	93
4.1.1. Parámetros generales: peso corporal, crecimiento, ingesta sólida, coeficiente de eficacia alimentaria (CEA), peso del hígado e índice hepatosomático (IHS).	95
4.1.2. Utilización nutritiva del nitrógeno: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN) y coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP)	100
4.1.3. Coeficiente de utilización digestiva de la grasa.	108
4.1.4. Parámetros hepáticos:	113
4.1.4.1. Enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en hígado	113
4.1.4.2. Estudio morfológico del hígado	115
4.2. EXPERIMENTO B	121
4.2.1. Parámetros generales: peso corporal, crecimiento, coeficiente de eficacia alimentaria (CEA), peso del hígado e índice hepatosomático (IHS)	123
4.2.2. Coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP).	127

4.2.3. Folatos y derivados: concentración sérica y hepática. Distribución porcentual en hígado.	128
4.2.4. Concentración de S-Adenosilmetionina y S-Adenosilhomocisteína en hígado.	134
4.3. EXPERIMENTO C	137
4.3.1. Parámetros generales: peso corporal y coeficiente de eficacia alimentaria (CEA)	139
4.3.2. Utilización nutritiva y metabólica de la proteína: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN), coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP), coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno (CUM) y coeficiente de utilización neta del nitrógeno (CUN)	142
5.- DISCUSION DE RESULTADOS	149
5.1. ACIDO ACETILSALICILICO	151
5.1.1. Parámetros generales: ingesta solida, peso corporal, crecimiento, coeficiente de eficacia alimentaria (CEA), peso del hígado e índice hepatosomático (IHS).	151
5.1.2. Utilización nutritiva de la proteína: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN) y coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP)	152
5.1.3. Coeficiente de utilización digestiva de la grasa (CDG)	154
5.1.4. Enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en hígado	154
5.1.5. Componentes de la ruta de transmetilación-transulfuración:	154
5.1.5.1. Contenido sérico y hepático de ácido fólico. Distribución de los folatos en hígado.	155
5.1.5.2. Contenido hepático de S-Adenosilmetionina (SAM) y S-Adenosilhomocisteína (SAM). Relación SAM/SAH.	157
5.2. ACETAMINOFENO	158
5.2.1. Parámetros generales: ingesta sólida, peso corporal, crecimiento, coeficiente de eficacia alimentaria (CEA), peso del hígado e índice hepatosomático (IHS)	158
5.2.2. Utilización nutritiva de la proteína: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN) y coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP)	159

5.2.3. Coeficiente de utilización digestiva de la grasa (CDG)	160
5.2.4. Estudio morfológico del hígado: Observación mediante microscopía óptica y electrónica y análisis histológico.	161
5.2.5. Enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en hígado	161
5.2.6. Componentes de la ruta de transmetilación-transulfuración:.	162
5.2.6.1. Contenido sérico y hepático de ácido fólico. Distribución de los folatos en hígado.	162
5.2.6.2. Contenido hepático de S-Adenosilmetionina (SAM) y S-Adenosilhomocisteína (SAM). Relación SAM/SAH.	163
5.3. ACETAMINOFENO Y DEFICIENCIA DIETETICA DE METIONINA . .	164
5.3.1. Parámetros generales: ingesta sólida, peso corporal, crecimiento, coeficiente de eficacia alimentaria (CEA), peso del hígado e índice hepatosomático (IHS).	164
5.3.2. Utilización nutritiva de la proteína: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN) y coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP)	165
5.3.3. Coeficiente de utilización digestiva de la grasa (CDG)	166
5.3.4. Estudio morfológico del hígado: observación mediante microscopía óptica y electrónica y análisis histológico.	166
5.3.5. Enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en hígado.	166
5.4. ACETAMINOFENO Y LEVODOPA	168
5.4.1. Parámetros generales: peso corporal y coeficiente de eficacia alimentaria (CEA)	168
5.4.2. Utilización nutritiva de la proteína: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN), coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP), coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno (CDN) y coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno (CDN).	169
6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES	171
7.- BIBLIOGRAFIA	177

1.- INTRODUCCION Y OBJETO

El estudio de las interacciones de los xenobióticos con macro y micronutrientes es una de las áreas prioritarias de investigación de nuestro Departamento. Entre los xenobióticos ocupan un lugar muy importante los fármacos, sustancias, como sabemos, de incuestionable eficacia y seguridad en la prevención y el tratamiento de la enfermedad cuyo consumo, a veces abusivo, es ya una realidad ligada al estilo de vida de nuestra sociedad. Sin embargo, no se debe olvidar que, pese a su utilidad, se trata generalmente de sustancias extrañas a nuestro organismo y ajenas a las principales rutas metabólicas relacionadas con la biotransformación de los nutrientes.

El estudio de las interacciones nutrientes-fármacos (INF) puede abordarse desde diferentes perspectivas. Así, podemos considerar el efecto de la dieta sobre la farmacocinética del principio activo del medicamento o, a la inversa, la influencia de los fármacos en la biodisponibilidad de los nutrientes de la dieta, influencia que puede constituir un problema serio, sobre todo en el caso de medicamentos de uso crónico. Sin embargo, frecuentemente la interacción es mutua, es decir, se plantea en términos competitivos entre fármaco y nutriente.

Como es sabido, la mayor parte de la información disponible sobre el tema de las INF se refiere a puntos concretos del efecto de la dieta sobre la actuación del fármaco: el momento más adecuado de administración (antes o después de las comidas), la inducción o potenciación de efectos secundarios, etc. Por el contrario, la información es mucho más escasa cuando consideramos la interacción desde el punto de vista opuesto, aunque complementario: el efecto del fármaco sobre la utilización nutritiva de la dieta; actuación que, sobre todo en tratamientos prolongados, puede originar situaciones de desnutrición, y a su vez pueden alterar la farmacocinética del medicamento, lo que sería el desencadenante de la situación de déficit nutricional.

El trabajo realizado en esta Tesis se centra en el ámbito de los efectos de algunos fármacos sobre la bioutilización de los nutrientes, específicamente en tratamientos crónicos, área de investigación que, como ya hemos dicho, se encuentra relativamente poco estudiada. Además, no se disponen en la mayoría de los países de bancos de datos sobre esta faceta de las INF, que facilitarían al personal sanitario la labor de evitar sus consecuencias negativas sobre el estado nutricional de los pacientes ya que, aunque en algunas ocasiones las INF pueden ser positivas, en la mayoría de los casos y contando con los datos experimentales de que se dispone, no suele ser así.

Según numerosas revisiones (SWEDISH DRUG STATISTIC, 1987, EGGEN, A.E. 1993), entre los fármacos que más comúnmente se utilizan, tanto por prescripción médica como por automedicación (MENARD, G. y col. 1993), en todos los estratos de población se encuentran los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y dentro de este grupo, destacan la aspirina o ácido acetilsalicílico (QUENEAU, P. y col, 1984) y el paracetamol o acetaminofeno (NOYELLE, R.M. y col. 1987). Por este motivo, en el año 1986 se comenzó en nuestro Departamento un proyecto cuyo propósito era el estudio del consumo crónico de acetaminofeno sobre la utilización nutritiva de la dieta en general y de la utilización digestiva y metabólica de la proteína y de la grasa en particular, todo ello con distintos contenidos proteicos en la dieta. Estos estudios han dado lugar a la realización de una Tesis Doctoral (VARELA-MOREIRAS, G, 1989), así como a varias publicaciones nacionales e internacionales (VARELA-MOREIRAS, G. y col. 1988; 1990a; 1990b; 1991a). Los resultados obtenidos nos animaron a extender nuestro estudio al ácido acetilsalicílico, además del acetaminofeno, para tener una idea de la acción de cada uno de estos fármacos sobre la

dieta, entre otras cosas, por si se puede hablar de un efecto global de los AINE en el estado nutricional del individuo.

Nuestro trabajo ha consistido, básicamente, en estudiar los efectos que ejercen la administración crónica de ácido acetilsalicílico y de acetaminofeno a dosis terapéuticas, sobre diversos parámetros indicadores del estado nutritivo en ratas, tanto bien nutridas como sometidas a algunas situaciones de desnutrición experimental. El estudio se ha orientado hacia la proteína y muy especialmente a un aminoácido: la metionina, por el papel que desempeña este nutriente y sus metabolitos en los procesos de detoxificación de xenobióticos en general y concretamente del acetaminofeno al ser precursor de glutatión (SMITH, C.V. y MITCHELL, J.R. 1989; MEISTER, A. 1989b). Además, como es sabido, el metabolismo de la metionina y del ácido fólico están profundamente relacionados en la ruta metabólica denominada de transmetilación-transulfuración (STIPANUK, M.H., 1986) y existen datos bibliográficos, aunque no definitivos, de la interacción del ácido acetilsalicílico con los niveles de ácido fólico en el organismo (LAWRENCE, V.A. y col. 1984; HOPNER, K. y LAMPI, B. 1986). La mayor parte de estos estudios se han realizado en humanos y están enfocados exclusivamente a niveles séricos de folatos siendo escasa la bibliografía en relación con los niveles de folatos en otros tejidos, como el hígado. Por lo tanto, entre los parámetros que hemos determinado se encuentran los indicadores de la utilización nutritiva y metabólica general de los macronutrientes y los relativos al metabolismo de la metionina y los folatos. Además, y debido al efecto hepatotóxico del acetaminofeno, hemos realizado un estudio histológico del hígado de los animales tratados con este fármaco para comprobar si esta toxicidad varía en función del nivel de metionina en la dieta.

El problema de las INF se puede acentuar en aquellas personas con medicación múltiple, al concurrir diversas patologías, tal como ocurre frecuentemente en las personas de edad avanzada (WELLING, P.G. 1985). La posibilidad de que se produzcan interacciones aumenta con la administración de dos o más fármacos en consumo concomitante. Además, si se produjese un efecto negativo de ambos xenobióticos sobre un nutriente determinado, el resultado final podría ser aditivo solamente, pero también pudiera ser mayor que la suma de los efectos de la interacción de cada fármaco independientemente. En este sentido, faltan estudios epidemiológicos que traten el tema de las INF y también hay falta de investigación básica sobre los mecanismos por los que los fármacos y nutrientes interaccionan.

En esta Tesis, habida cuenta de que el acetaminofeno además de producir hepatotoxicidad vía necesidades de metionina (PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. 1989) puede reducir la utilización nutritiva del nitrógeno (VARELA-MOREIRAS, G. y col. 1991a), hemos querido integrar otro factor negativo sobre este aprovechamiento nutritivo de la proteína. Este factor fue la administración conjunta de levodopa a distintas dosis y de acetaminofeno, ya que ambos fármacos son de primera elección por su gran utilidad. Esto se ha realizado en base a la bibliografía revisada de la que hemos obtenido datos sobre la interacción de la levodopa tanto a nivel de competencia por los transportadores de membrana con los aminoácidos (PEARCE, L.A. y WATERBURY, L.D. 1974), como a nivel del metabolismo de la levodopa con la metionina y la S-adenosilmetionina (SURTEES, R. y HYLAND, K. 1990; CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. 1991) y, por tanto, con la ruta transmetilación-transulfuración. A esto hay que añadir el hecho práctico de que son muchas las personas, fundamentalmente de edad avanzada, que padecen Parkinson y presentan un estado nutritivo deficiente, que consumen de forma crónica analgésicos y levodopa. Esta situación nutricional parece estar causada, de una parte, por la enfermedad "per se" que produce un aumento del gasto energético, y de otra, por factores sociales que llevan a una reducción de la ingesta, por las dificultades que les supone el comprar y prepararse los alimentos. Además, los médicos

recomiendan una reducción de la ingesta proteica para maximizar la eficacia del tratamiento (MARKUS, H.S. y col. 1993), finalmente quisimos averiguar si su malnutrición también se debe al consumo de levodopa y si el acetaminofeno podría acentuarla.

Con todo esto, hemos intentado reproducir situaciones de tratamiento similares a las reales, es decir, por un lado administración de los fármacos en tratamiento crónico y por otro, administración combinada de levodopa/carbidopa con acetaminofeno en las proporciones y dosificación empleadas actualmente en terapéutica, y estudiar si en unas condiciones nutricionales óptimas los fármacos afectan al aprovechamiento nutritivo y metabólico de la proteína y metionina.

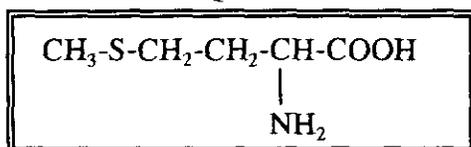
2.- REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1.- LA METIONINA COMO NUTRIENTE.

2.1.1. Características químicas.

La metionina es un sulfoaminoácido no polar alifático y neutro (LEHNINGER, A.L. 1985a; MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987). Como el resto de los aminoácidos es anfótero (en función del pH del medio se puede comportar como un ácido o como una base) y posee actividad óptica por la presencia de un C asimétrico de modo que los hidrolizados de proteínas presentes en tejidos animales y vegetales sólo aparece el isómero L (CHEFTEL, J.C. y col. 1989).

FORMULA QUIMICA:



La metionina es un aminoácido presente en las proteínas de las células del organismo y esencial tanto para el hombre (HAUSPIE, C.S. y col. 1987) como para la rata (McCOY, R.H. 1949), lo que implica que es imprescindible para la síntesis proteica de estos organismos pues no pueden sintetizar el esqueleto carbonado de la metionina a partir de otros precursores de carbono y nitrógeno (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987).

2.1.2. Absorción, transporte y metabolismo.

La principal fuente de metionina para el organismo es la proteína contenida en la dieta. Una vez ingerida la proteína actúan los enzimas proteolíticos en el tracto gastrointestinal; primero, interviene la pepsina presente en el jugo gástrico y después, las proteasas segregadas por el páncreas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas A y B, elastasa) y por las células de la mucosa intestinal (aminopeptidasas, dipeptidasas) (CHEFTEL, J.C. y col. 1989). Después de este proceso de digestión proteica se obtienen como productos finales, aminoácidos libres, o bien, péptidos pequeños que han de ser absorbidos por las células de la mucosa intestinal (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1988).

Numerosos estudios (SCHULTZ, H.N. y CURRAN, M.C. 1970) indican que el transporte de aminoácidos libres al interior de la mucosa implica la existencia de transportadores que requieren gasto de energía y son específicos para los aminoácidos neutros, ácidos o básicos. De hecho, se conocen al menos cinco proteínas de transporte distintas situadas en la membrana del enterocito a las que se unen los aminoácidos y son arrastrados hacia el interior mediante transporte activo (GUYTON, A.C. 1992). Estos mecanismos de absorción tienen una afinidad mucho mayor para transportar L-estereoisómeros de aminoácidos que D-estereoisómeros (SHINDO, H. y col. 1977; GUYTON, A.C. 1988).

Los aminoácidos esenciales, y por tanto la metionina, presentan menores dificultades para su absorción que los no esenciales (SANCHEZ BARCO, M.J. 1990), siendo dicha velocidad de absorción distinta para cada tipo; la metionina, junto con los aminoácidos de cadena ramificada, son los más rápidamente absorbidos (LINDER, M.C. 1988a).

También se ha comprobado la absorción de péptidos pequeños (KIM, Y.S. y

FREEMAN, H.J. 1977), fundamentalmente en forma de dipéptidos, por la presencia de hidrolasas en el borde velloso y el citosol de las células mucosas; el péptido entra en la célula y allí sufre la división a aminoácidos libres los cuales pasan a la circulación portal en dirección al hígado. También se sabe que los dipéptidos que se absorben utilizan un transportador específico (LINDER, M.C. 1988a). Los mecanismos de captación de péptidos son diferentes a los de captación de aminoácidos por lo que no existe competencia entre ambos (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1988).

Estas proteínas transportadoras pueden modificar su actividad por distintos mecanismos, así, por ejemplo, una reducción aguda de la ingesta dietética estimula la absorción de metionina libre pero no tiene un efecto significativo sobre el péptido metionil-metionina (LIS, M.T y col. 1972) y el mismo efecto lo ejerce una dieta con elevado contenido en metionina (MATTHEWS, D.M. 1975).

Los aminoácidos libres procedentes del tubo digestivo pasan a la vía portal y en menor medida a la circulación general, donde se mezclan con otros aminoácidos procedentes de los tejidos y se dirigen al hígado (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987). Los diferentes aminoácidos se transportan por el plasma de diferentes formas, concretamente la metionina unida a la albúmina plasmática (LINDER, M.C. 1988a).

Los distintos tipos de mecanismos de transporte aminoacídicos celulares (CHRISTENSEN, H.N., 1964) se caracterizan esencialmente por la estereoespecificidad que presentan y la capacidad de saturación mostrando afinidad por unos aminoácidos u otros en función de características químicas como aromaticidad, peso molecular y cadena lateral (OLDERDORF, W.H. y SZABO, J. 1976).

Numerosos trabajos han permitido la descripción de gran número de transportadores aminoacídicos: los pioneros en este campo fueron OXENDER, D. y CHRISTENSEN, H.N. en 1963 que, basados en procesos de competición, identificaron dos sistemas de transporte (sistema A y L) para aminoácidos neutros en células Ehrlich tumorales de ratón. Los aminoácidos neutros normalmente son transportados por más de un sistema (COLLARINI, E.J. y OXENDER, D.L. 1987). Algunos de los sistemas de transporte conocidos para aminoácidos neutros en tejidos y células de los animales superiores son los siguientes:

- Sistemas Na^+ dependientes:

Sistema A: Se encuentra en una amplia variedad de células (CHRISTENSEN, H.N. 1982) y está regulado por la disponibilidad de aminoácidos y de hormonas (COLLARINI, E.J. y OXENDER, D.L. 1987). Lo utilizan la mayoría de los aminoácidos dipolares (CHRISTENSEN, H.N. 1990) aunque transporta fundamentalmente aminoácidos de cadena corta, polares y lineales (COLLARINI, E.J. y OXENDER, D.L. 1987). Su actividad se ve reducida a un pH extracelular bajo (OXENDER, D.L. y CHRISTENSEN, H.N. 1963) y está sometido al fenómeno cinético de transinhibición que consiste en que la presencia de substrato intracelular reduce la velocidad de transporte de los aminoácidos (CHRISTENSEN, H.N. 1975).

Sistema ASC: También fue localizado en las células de Ehrlich y se encarga de transportar aminoácidos de hasta 5 átomos de carbono y prolinas (CHRISTENSEN, H.N. 1990).

Sistema N: Se encuentra en hepatocitos y esta sujeto a regulación por la biodisponibilidad de aminoácidos (KILBERG, M.S. y col. 1980). Su denominación indica la presencia de nitrógeno en la cadena, se cree exclusivo de hepatocitos puesto que no se ha caracterizado en otros tipos de células (KILBERG, M.S. 1982).

- Sistemas Na⁺ independientes:

Sistema L₁: En el mismo trabajo de OXENDER, D.L. y CHRISTENSEN, H.N. en 1963 anteriormente mencionado localizaron y describieron este sistema transportador. Se encuentra en una amplia variedad de células (GUIDOTTI, G.G. y col. 1978; CHRISTENSEN, H.N. 1982). Presenta preferencia por aminoácidos apolares de cadena ramificada (CHRISTENSEN, H.N. 1982). Su actividad transportadora se ve regulada por la disponibilidad de aminoácidos (SHOTWELL, M.A. y col. 1982) y se cree que también por el gradiente de protones (MITSUMOTO, Y. y col. 1986). Se ve sometido a transestimulación (COLLARINI, E.J. y OXENDER, D.L. 1987).

Sistema L₁ y L₂: Fue localizado en hepatocitos de rata (WEISSBACH y col. 1982). Para ejercer su actividad prefiere aminoácidos de cadenas apolares y ramificadas (CHRISTENSEN, H.N., 1982). L₂ es un sistema de baja afinidad y elevada capacidad opuestamente a L₁ (COLLARINI y OXENDER 1987). Así, L₁ parece que sirve para transportar un mayor número de substratos que L₂ (WEISSBACH y col. 1982).

Los transportadores de aminoácidos neutros ejercen su acción con: fenilalanina, leucina, tirosina, isoleucina, metionina, triptófano, valina, DOPA (dihidroxifenilalanina) y cisteína (OLDERDORF, W.H. y SZABO, J. 1976). La metionina se transporta principalmente por el sistema L y en parte por el sistema A. En los hepatocitos de rata se transporta bifásicamente por los sistemas L₁ y L₂ (TANIGUCHI, M. y col. 1989).

El carácter proteico de los transportadores (WHITTAM, R. y WHEELER, K.D. 1970) se confirma en el descenso de la actividad transportadora que se observa al trabajar con inhibidores de la síntesis proteica (GUIDOTTI, G.G. y col. 1974).

En teoría, un aminoácido que no es transportado activamente alcanzará una concentración de equilibrio en el fluido intracelular igual al extracelular, sin embargo, la mayoría de los aminoácidos tienen razones de distribución mayores a 1. Esto puede producirse por la síntesis intracelular de aminoácidos, que mantiene una concentración elevada, bien por degradación proteica en la célula o, probablemente, la causa es que pocos aminoácidos son transportados sólo por un sistema. OXENDER y CHRISTENSEN en 1963 señalan que esto daría una importancia inusual a los niveles de aminoácidos como la metionina que divide su actividad entre los sistemas A y L y podría así explicar la sensibilidad de la rata a elevados niveles de metionina dietarios (HARPER, A.E. y col. 1970).

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, L. 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 Km en un sentido (salida) que en el otro (CHRISTENSEN, H.N. y HANSLOGETEN, M.E. 1968).

PARDRIDGE, W.M. y CHOI, T.S. (1986) explican que estos sistemas de transporte de aminoácidos neutros se encuentran en las membranas luminal y antiluminal de los capilares cerebrales de los vertebrados y juegan un papel fundamental en el metabolismo cerebral de aminoácidos y vías metabólicas relacionadas con la neurotransmisión (Ej. conversión de metionina en S-Adenosilmetionina) puesto que se establecen mecanismos de competición entre los aminoácidos por el sitio de unión del transportador en la barrera hematoencefálica. Así, una alteración en las concentraciones de aminoácidos plasmáticos puede alterar el perfil aminoacídico cerebral pues en estos transportadores de aminoácidos neutros se producen

movimientos bidireccionales entre los compartimentos sanguíneo y cerebral.

Los aminoácidos, desde la circulación portal, pasan al hígado que es el órgano más importante desde el punto de vista de transformación química y (junto con el músculo) de degradación de exceso de aminoácidos (LINDER, M.C. 1988a). A partir del pool de aminoácidos libres en el plasma estos se transportan también a otros destinos como músculo, riñón, páncreas, cerebro, células epiteliales y otros tejidos periféricos (LINDER, M.C. 1988a).

Los procesos metabólicos hepáticos son muy sensibles al torrente de aminoácidos que penetra en la víscera; así, después de ingerir una dieta con elevado contenido proteico se produce una activación de procesos sintéticos, mientras que la velocidad de síntesis se reduce cuando disminuye el flujo de aminoácidos que entra en el hígado (entre comidas, durante la noche, etc) (LINDER, M.C. 1988a).

Las proteínas corporales se degradan continuamente en aminoácidos *in situ* (catabolismo) y por consiguiente deben volver a sintetizarse en cantidades apropiadas (anabolismo), este "turnover" (renovación dinámica) es más o menos rápido en función del tejido (CHEFTEL, J.C. y col. 1989). Los aminoácidos están sujetos a una serie de reacciones metabólicas que representan una compleja serie de pasos encadenados que se muestran de forma esquemática en la Figura 1. y se pueden agrupar como indicamos a continuación:

Anabolismo:

- Síntesis de proteínas: En el estado normal o estable la síntesis y la degradación de proteínas son iguales (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987).

Proteínas hísticas (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987).

Proteínas plasmáticas: Cerca de un tercio de los aminoácidos que se necesitan ingerir diariamente con la dieta se utilizan para la síntesis hepática de proteínas plasmáticas (LINDER, M.C. 1988a). La síntesis de albúmina es especialmente sensible a la entrada de aminoácidos en el hígado (CLIFFORD, A.J. 1980).

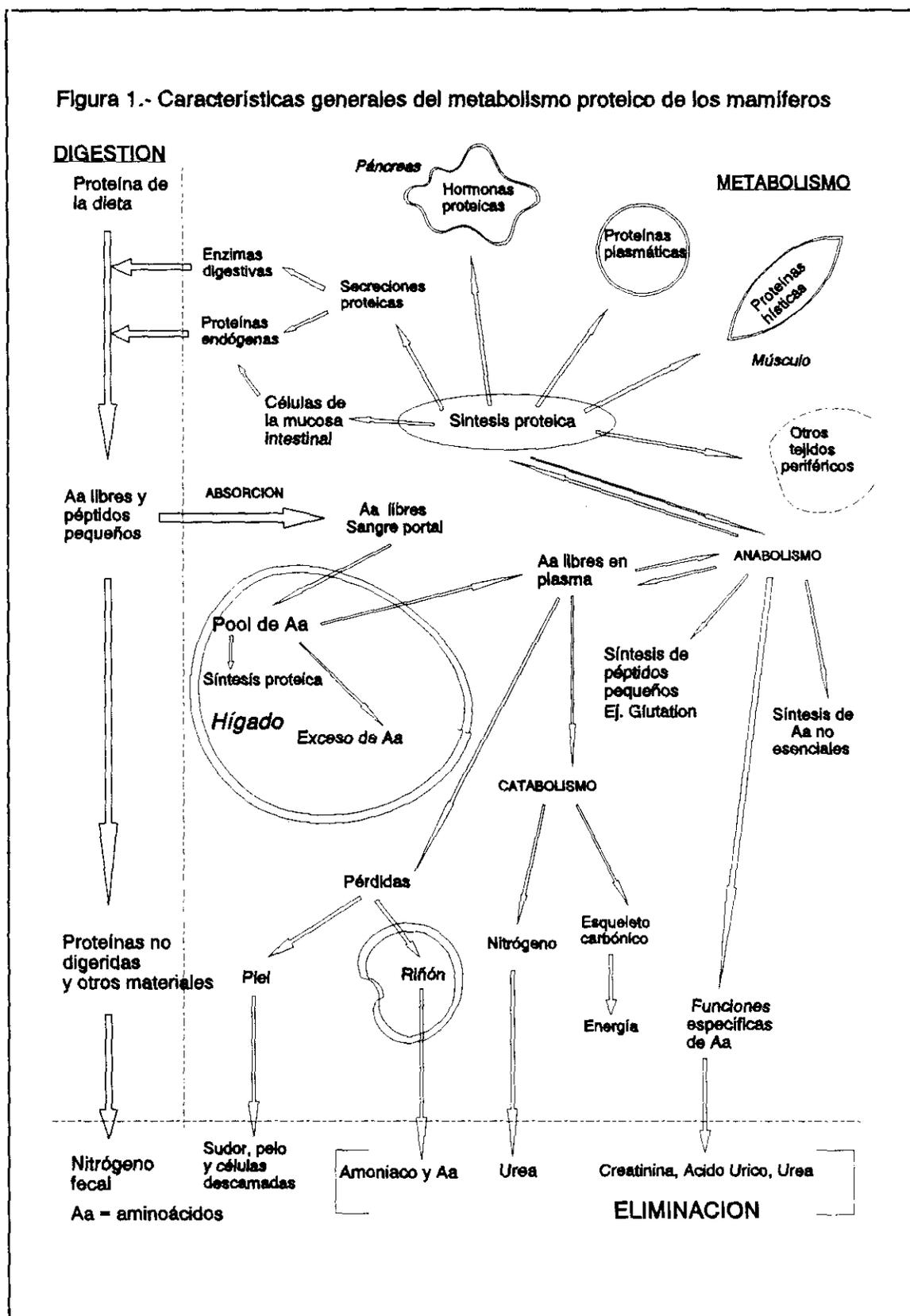
Hormonas proteicas, secreciones proteicas y péptidos (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987).

- Síntesis de aminoácidos no esenciales: Se forman en el organismo a partir de precursores como la glucosa y usando grupos aminos derivados de otros aminoácidos (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987).

- Síntesis de compuestos nitrogenados no proteicos: Estos compuestos son bases púricas y pirimidínicas, creatina y adrenalina, cuya degradación conlleva la formación de ácido úrico, creatinina y ácido vanilmandélico respectivamente (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987). La síntesis de ácidos nucleicos es especialmente sensible a la entrada de aminoácidos en el hígado (CLIFFORD, A.J. 1980).

- Funciones específicas de cada aminoácidos (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987).

En el organismo, los aminoácidos se pueden encontrar de forma libre y en forma de proteínas (LINDER, M.C. 1988a). La concentración de aminoácidos ligados a proteínas en los tejidos viene a ser por término medio 2M, mientras que el depósito de aminoácidos libres es de alrededor de 0,01M (CHRISTENSEN, H.N. 1964). Muchos trabajos realizados en hígado, músculo y plasma de ratas confirman que la concentración de aminoácidos en los tejidos es mayor que la del plasma (LUNN, P.G. y col. 1976).



El hígado está expuesto a grandes fluctuaciones en la concentración de aminoácidos, aunque tiene gran capacidad para contrarrestarla.

El pool de aminoácidos libres en plasma y en los tejidos se encuentra disponible para la síntesis proteica, y se agota si cesa la afluencia de aminoácidos, aunque se puede decir que

queda asegurado por la proteína ingerida y la proteína corporal catabolizada (CHEFTEL, J.C. y col. 1989).

La mayor parte de las proteínas plasmáticas se hidrolizan en el hígado. Sin embargo, no es así en el caso de la albúmina puesto que no se puede decir que en un órgano aislado determinado tenga lugar el metabolismo de la albúmina (WALDMANN, T.A. 1977). Se piensa que, aparte de sus funciones fisiológicas específicas, funciona en cierta manera, como una estructura almacenadora de aminoácidos y como vehículo de transporte de los mismos a tejidos periféricos para compensar las pérdidas diarias (LINDER, M.C. 1988a). El glutatión es un tripéptido que también puede considerarse como depósito y vehículo de aminoácidos (LINDER, M.C. 1988a). De todas formas, la masa muscular esquelética representa la mayor reserva proteica corporal y a partir de la cual el organismo puede tener aminoácidos en tiempo de necesidad (LINDER, M.C. 1988a).

Catabolismo:

El catabolismo se verifica fundamentalmente a nivel intracelular concretamente en los orgánulos lisosomales donde actúan las catepsinas (proteasas) (CHEFTEL, J.C. y col. 1989). Después de una comida rica en proteínas los aminoácidos llegan al hígado sobre los que actúan los enzimas de degradación constituida por transaminación y desaminación oxidativa.

Debido al catabolismo de las proteínas hísticas los aminoácidos constituyentes de las mismas vuelven al depósito de aminoácidos libres pudiendo ser reutilizados (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987).

Los aminoácidos libres presentes en exceso pueden utilizarse como material combustible (LINDER, M.C. 1988a) lo que conlleva la pérdida del esqueleto carbonado en forma de CO₂ o queda a su disposición en forma de glucógeno (aminoácidos glucogénicos) o grasa (aminoácidos cetogénicos), mientras que el nitrógeno es eliminado en forma de urea (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987) y el átomo de azufre se excreta como ión sulfato.

Los productos finales del metabolismo del nitrógeno (urea, amoniaco, ácido úrico y creatinina) se excretan por la orina (LINDER, M.C. 1988a), mientras que las sustancias de la dieta que no llegan a absorberse o las proteínas secretadas a la luz intestinal son eliminadas por las heces. Por otro lado, algunas sustancias nitrogenadas se eliminan por la piel, tanto en forma de nitrógeno soluble como en células epiteliales descamadas. Por último existen algunas vías menores de eliminación de nitrógeno como secreción nasal, caída del cabello, entre otras (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987). También pequeñas cantidades de aminoácidos se pierden diariamente vía urinaria (LINDER, M.C. 1988a).

2.1.3. Necesidades e ingestas recomendadas.

En las ratas, según el dato que nos indica MUNRO, H.N. (1970), los requerimientos diarios de metionina son 350 μ moles por 100 g de peso corporal, y el NATIONAL RESEARCH COUNCIL de EEUU (1978) indica que los requerimientos de sulfoaminoácidos totales son el 0,6% de la dieta ingerida de los cuales el 50% debe ser metionina.

Las necesidades de aminoácidos esenciales se basan fundamentalmente en estudios sobre balance de nitrógeno, y es de destacar que en los trabajos publicados a partir de este método aparecen importantes variaciones incluso dentro de un mismo estudio (MUNRO,

H.N. y CRIM, M.C. 1987), lo que hace difícil establecer los requerimientos mínimos de metionina para el mantenimiento del balance de nitrógeno en la población (YOUNG, V.R. y col. 1991).

En las Tablas 1a y 1b.- se muestran los datos existentes de necesidades medias de metionina realizada a partir de varios trabajos de investigación y de las revisiones de MUNRO, H.N. (1972) y del NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1991).

Tabla 1a.- Necesidades medias de metionina en mg por Kg de peso corporal y por día en seres humanos de diferente edad y sexo MUNRO, H.N. (1972).

Metionina		Necesidad media
Edad	Autor	mg/Kg por día
Lactante	HOLT y SNYDERMAN (1967)	50
Niños 10-12 años	NAKAGAWA y col. (1964)	27
Varón adulto	MUNRO (1972)	14
Varón adulto	INOUE y col. (1983)	11
Mujer adulta	HEGSTED (1963)	13

Tabla 1b.- Necesidades medias de metionina + cisteína en mg por Kg de peso corporal y por día en seres humanos de diferente edad NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1991).

Metionina + Cisteína	Necesidad media
Edad	mg/Kg por día
Lactantes	58
Niños (~ 2 años)	27
Niños (~ 10 años)	22
Adultos	13

En 1985 la FAO/WHO/UNU propuso que 13 mg de metionina por Kg y día son los requerimientos máximos para mantener durante largo tiempo un adecuado estatus nutricional proteico en hombres adultos jóvenes y sanos. YOUNG, V.R. y sus colaboradores (1991) se cuestionaron este dato puesto que los aminoácidos sulfurados pueden ser limitantes en algunas dietas (FAO/WHO/UNU, 1985) y realizaron un trabajo en el que por los resultados obtenidos concluyen en que probablemente los requerimientos de metionina sean superiores de los recomendados por FAO/WHO/UNU en 1985.

Expresados por Kg de peso, los requerimientos de proteína y de cada aminoácido esencial decrecen progresivamente conforme aumenta la edad. Sin embargo, este descenso en mucho más acusado en el caso de los aminoácidos esenciales que en el de las proteínas totales. De modo que la proporción de las necesidades proteicas representadas por los aminoácidos esenciales desciende desde el 43% en los lactantes al 36% en niños mayores y al 19 ó 20% en adultos (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1988). La ingesta proteica debe cubrir las necesidades requeridas para el equilibrio de nitrógeno y para el crecimiento (FAO/WHO/UNU, 1985). El descenso de los requerimientos de proteína para el crecimiento, que se hace cero en el adulto, excepto en el embarazo y la lactancia, es el responsable de la

reducción del requerimiento proteico con la edad, ya que el componente mantenimiento disminuye solo ligeramente en aquella (MILLWARD, D.J. y RIVERS, J.P. 1988).

Conviene señalar que debido a la existencia de sistemas enzimáticos y rutas metabólicas específicas gran parte de los requerimientos de metionina pueden sustituirse por cisteína o cistina (LINDER, M.C. 1988a). Por otro lado, las necesidades de aminoácidos azufrados están influenciadas no sólo por las cantidades de metionina, cisteína ingeridas sino también por las de colina y sulfato inorgánico: así MICHELS, F.G. y SMITH, J.T. (1965) advierten que las necesidades de aminoácidos azufrados en las ratas jóvenes pueden verse incrementadas si no se aporta suficiente sulfato inorgánico.

El nivel de metionina en la dieta es de gran importancia pues tanto el déficit como el exceso dan lugar a procesos patológicos. El exceso de metionina presenta toxicidad que se manifiesta principalmente en un efecto depresor del crecimiento (EDMONDS, M.S. y BAKER, D.H. 1987). En cuanto a las consecuencias del déficit se tratarán ampliamente en el apartado 3.

2.2.- ALGUNAS FUNCIONES DE LA METIONINA EN EL METABOLISMO CELULAR.

2.2.1. Ruta de transmetilación-transulfuración.

Una vez en el interior celular, además de la síntesis de proteína y de la producción de energía, la metionina tiene las siguientes funciones: es donador de grupos metilo en muchos procesos sintéticos (MUDD, S.H. y POOLE, J.R. 1975), es precursora de cisteína (LINDER, M.C. 1988a) y además, es el aminoácido iniciador de la síntesis de proteína que responde al codón de iniciación AUG del ARN mensajero (LEHNINGER, A.L. 1985b).

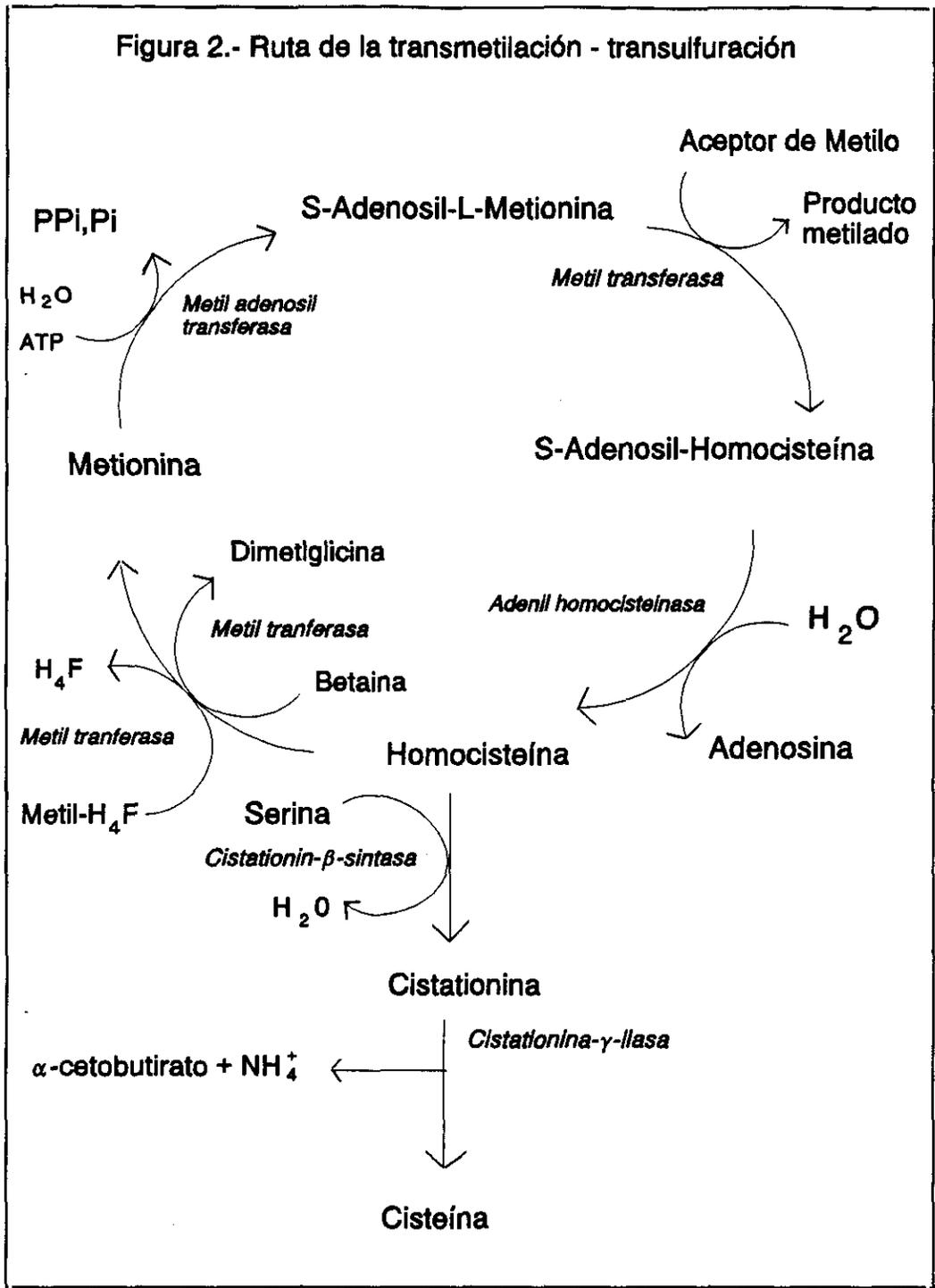
La degradación de la metionina en la rata se verifica en el hígado (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987), aunque se cree que otros tejidos también pueden tener un papel significativo en el metabolismo de la metionina, aunque exactamente el papel que desempeñan los distintos tejidos en este metabolismo *in vivo* no está bien establecido (STIPANUK, M.H. 1986).

El primer paso en esta ruta metabólica de la metionina es la formación de un compuesto con un grupo metil-sulfonio de alta energía llamado S-adenosilmetionina (SAM) (Figura 2) (LEHNINGER, A.L. 1985c). El enzima metil-adenosil-transferasa cataliza la formación de SAM por transferencia de un grupo adenosil del trifosfato de adenosina (ATP) al átomo de azufre de la metionina. En el hígado de la rata se han identificado tres isoenzimas (I, II y III) de la metil-adenosil-transferasa (SULLIVAN, D.M. y HOFFMAN, J.L. 1983). Este primer paso es común en las dos rutas metabólicas de la metionina, la transmetilación-transulfuración y la síntesis de poliaminas, y la SAM es el donador de metilos en las reacciones de transmetilación y el donador de aminopropilos en la síntesis de poliaminas (STIPANUK, M.H. 1986). Por tanto, la metionina es el principal nutriente envuelto en los procesos de metilación.

Mediante la ruta de transmetilación-transulfuración mostrada en la Figura 2, después de la formación de SAM, ésta dona un grupo metilo a átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre de elevado número de biocompuestos gracias a la metiltransferasa correspondiente y se forma como coproducto de transmetilación S-adenosilhomocisteína (SAH) (STIPANUK, M.H. 1986). La SAH por hidrólisis y la acción de la adenosilhomocisteinasa libera adenosina y pasa a homocisteína (LEHNINGER, A.L. 1985c). La homocisteína puede ser remetilada a metionina, paso en el que intervienen el metiltetrahidrofolato (Metil-H₄F) y la betaína y se forman respectivamente tetrahidrofolato (H₄F) y dimetilglicina (STIPANUK, M.H. 1986), o bien, condensada con serina por la acción catalítica de la cistationina-β-sintasa para formar cistationina, este compuesto con la cistationina-γ-liasa libera cisteína, amoniaco y α-oxobutirato (LEHNINGER, A.L. 1985c). Esta vía metabólica puede continuar hacia la formación de succinil-CoA o ruta del succinato constituyendo la degradación oxidativa de la metionina.

Esta ruta metabólica se lleva a cabo en el hígado, intestino, páncreas, riñón, tejido adiposo y cerebro (FINKELSTEIN, J.D. 1989), aunque es en el hígado donde más se ha estudiado ya que en él se encuentran todos los enzimas implicados.

La metionina además de este proceso sigue otras vías de metabolización como la ruta de transaminación y fue BENEVENGA, N.J. 1984 quien propuso que la metionina era metabolizada por un vía alternativa que conlleva su transaminación como primer paso a α-



ceto-γ-metilbutirato que es una ruta independiente de la formación de SAM y cuyo papel aún no está bien establecido.

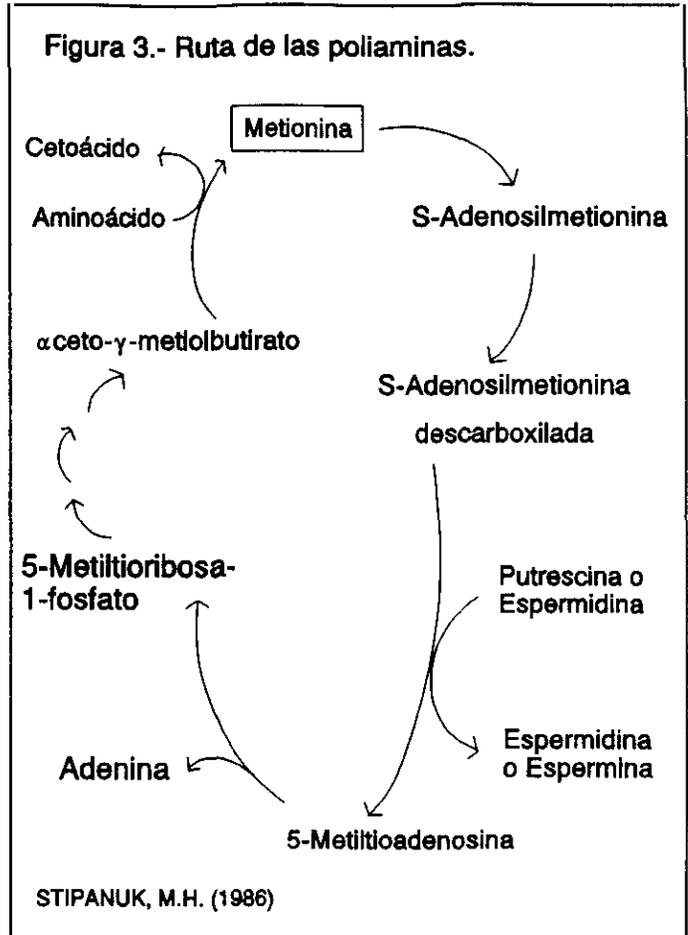
Además se conoce otra ruta de metabolización de la metionina llamada ruta de las poliaminas. Esta vía metabólica conlleva la descarboxilación de la SAM por la SAM descarboxilasa para formar SAM descarboxilada que reacciona con la putrescina, compuesto que está formado a partir de la ornitina por la acción de la ornitina descarboxilasa (STIPANUK, M.H. 1986).

La reacción da lugar a la formación de espermidina y espermina por la transferencia catalítica del grupo aminopropilo por la espermidina sintasa y espermina sintasa

respectivamente desde la SAM decarboxilada a la putrescina (PEGG, A.E. y col. 1981). Se libera así 5'-metiltioadenosina cuyo grupo metilo y sulfuro se puede reincorporar a la metionina y la adenina a los adeninnucleotidos (SCHLENK, F. 1983). La ruta de las poliaminas se muestra en la Figura 3.

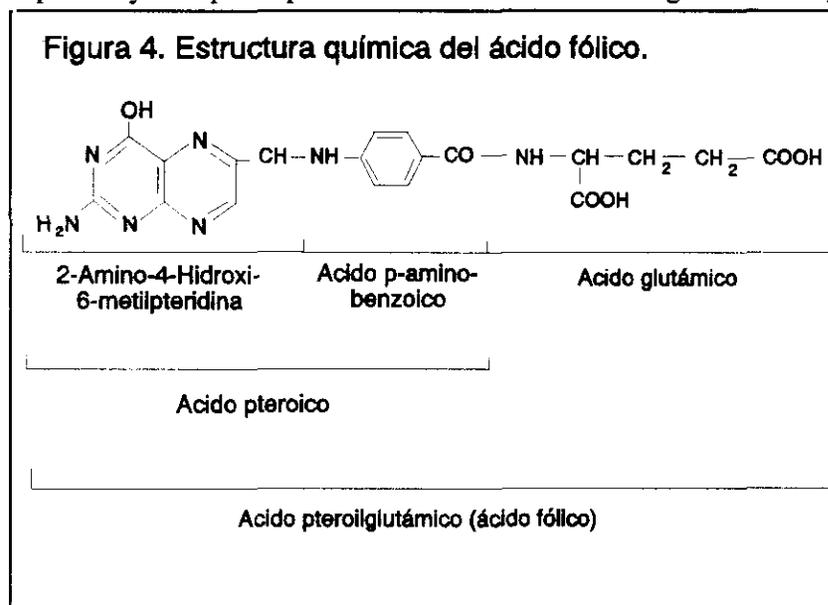
Esta ruta es importante para la síntesis de espermina y espermidina y posiblemente de otros metiltio-compuestos. La importancia de estos compuestos en la fisiología celular aún no esta bien establecida pero se sabe que son esenciales para el crecimiento normal de la célula (TABOR, C.W. y TABOR, H. 1984).

Se puede decir que el catabolismo del grupo metilo y del átomo de azufre de la metionina parece depender de la ruta de transmetilación-transulfuración, ya que la 5'-metiltioadenosina es eficientemente reciclada a metionina.



2.2.1.1. **Acido fólico.**

El ácido fólico (del latín *folium*, hoja), se encontró primeramente en las hojas de espinaca y está principalmente distribuido en los vegetales de hoja verde (LEHNINGER, A.L.



1985d). Este compuesto es una vitamina hidrosoluble y la estructura base de un grupo de micronutrientes orgánicos cuyo nombre genérico es folato, folacina o ácido pteroilglutámico (GREGORY III, J.F. 1989).

Tanto el ácido fólico como los distintos folatos presentan una estructura química que esta formada por tres sillares característicos (Figura. 4):

- 1) una pteridina sustituida, que en el ácido fólico corresponde a la 6-metilpterina
- 2) ácido p-aminobenzoico o PABA
- 3) ácido glutámico

La pterina aromática se encuentra unida al ácido p-aminobenzoico por un enlace C9-N10 y al ácido glutámico mediante un enlace amido que forman en su unión (GREGORY III, J.F. 1989).

La mayor parte del ácido fólico se encuentra en los alimentos unido a una estructura polimérica de ácido glutámico. En el proceso de absorción intestinal en la membrana con borde en cepillo del enterocito, el polímero de ácido glutámico debe romperse en unidades de monoglutamato, por la acción de la glutamilcarboxipeptidasa presente en el jugo intestinal (LINDER, M.C. 1988b). La vitamina se absorbe en el yeyuno por transporte activo, proceso pH dependiente (ROSE, R.C. y col. 1978; ROSENBERG, I.H. 1976, 1981; ROSENBERG, I.H. y col., 1979; HALSTED, C.H. 1980; SELHUB, J. y col., 1983). Además, existe un segundo mecanismo de absorción por difusión pasiva (STRUM, 1981; SELHUB y col., 1983).

Previamente a la entrada del ácido fólico en la sangre portal se transforma, en las células de la mucosa, en derivados reducidos, metilados o formilados (PERRY, J. y CHANARIN, I. 1973; STRUM, W.B. 1979; SELHUB, J. y col. 1973, 1983). Parte del folato absorbido se transporta en la sangre unido a proteínas plasmáticas; y cerca del 50% del folato total del organismo se encuentra almacenado en hígado en forma de poliglutamatos (LINDER, M.C. 1988b).

El folato está ampliamente distribuido en el organismo, tanto en los fluidos intra como extracelulares. Las mayores concentraciones de ácido fólico se encuentran en el hígado pero también en el riñón y en las células del sistema hematopoyético incluyendo eritrocitos y leucocitos. HERBERT, V. y ZALUSKY, R. (1961) encontraron que el contenido en folato del líquido cerebroespinal es tan alto como el del suero. También se sabe que existe un intercambio continuo de folato entre los fluidos y las células de los tejidos.

El poliglutamato se encuentra en el hígado en forma de metiltetrahidrofolato y se libera rápidamente a los tejidos periféricos mediante el ciclo enterohepático. Se ha demostrado en ratas que los folatos se excretan en la bilis por el hígado y experimenta posterior reabsorción. El hígado ejerce un efecto regulador para mantener la homeostasis del folato (STEINBERG, S.E. 1984). La excreción se lleva a cabo por vía biliar y también por vía urinaria, sin que la vitamina experimente reacciones catabólicas (o en muy poca extensión) (LINDER, M.C. 1988b).

El ácido fólico se convierte, por reducción en dos etapas en su forma de coenzima, en el ácido tetrahidrofólico (H_4F). El H_4F actúa como transportador intermediario de grupos hidroximetilo, formilo o metilo, en gran número de reacciones enzimáticas en la que tales grupos se transfieren desde un metabolito a otro o son interconvertidos (LEHNINGER, A.L. 1985d) de modo que la función primaria del ácido fólico es su intervención en el metabolismo monocarbonado.

Los tetrahidrofolatos son las formas coenzimáticamente activas de la vitamina y es preciso que el ácido fólico se encuentre en esta forma para que pueda llevar a cabo su función (LINDER, M.C. 1988b) en las siguientes reacciones:

- a) Reacción de formación de timidilato, que determina o limita la velocidad de síntesis

de ADN

- b) Reacciones de biosíntesis de purinas y
- c) Reacciones de biosíntesis de proteínas.

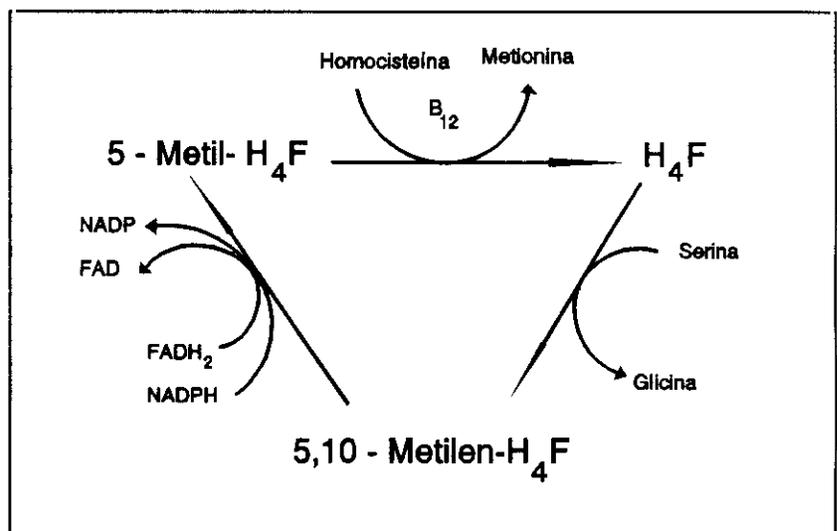
El conjunto de formas coenzimáticas del ácido fólico se obtienen por una serie de variables estructurales como son:

- La pteridina puede existir en tres estados de oxidación: en forma oxidada (aromática), en forma reducida como 7,8-dihidro (H_2 folato) y como 5,6,7,8-tetrahidrofolato (H_4 folato).

- Los sustituyentes monocarbonados pueden encontrarse en las posiciones N-5 ó N-10 ó en ambas. Estos grupos monocarbonados también pueden diferir en su estado de oxidación dando lugar a un gran número de derivados: 5,10-metilen- H_4 folato, 5-metil- H_4 folato, 5-formil- H_4 folato, 10-formil- H_4 folato, 5,10-metenil- H_4 folato y 5-formimino- H_4 folato (GREGORY III, J.F. 1989).

- El ácido fólico se encuentra unido por el grupo gamma-carboxilo del ácido glutámico a restos de ácido glutámico unidos entre sí mediante enlaces peptídicos y en un rango de cinco a siete restos en condiciones normales (LEHNINGER, A.L. 1985d) e incluso más en diversas situaciones (Ej. deficiencia dietaria de folatos) tal como demostraron VARELA-MOREIRAS, G. y SELHUB, J. (1992).

Para evitar que el ácido fólico quede inactivo en forma de metil- H_4 F, la homocisteína se transforma por metilación (reacción que requiere vitamina B_{12}), en metionina como indica el esquema, de modo, que la reacción permite regenerar el H_4 F que se utilizará en la síntesis de ADN y otras biomoléculas (LINDER, M.C. 1988b).



El ácido fólico es de vital importancia para el organismo pues su deficiencia en los mamíferos puede provocar una disminución del crecimiento y la aparición de determinadas formas de anemia (LEHNINGER, A.L. 1985d).

Los tejidos con mayor índice de proliferación celular como la médula ósea (órgano hematopoyético por excelencia) son los más severamente afectados por la deficiencia de H_4 F; en ausencia de suficiente cantidad de vitamina B_{12} , la síntesis de ADN (necesaria para una normal hematopoyesis) se reducirá por la escasa biodisponibilidad de timidilato; consecuentemente, en la médula ósea se forman células sanguíneas megaloblásticas, que tienen suficiente material citoplásmico pero insuficiente material genético para dividirse adecuadamente. En situaciones deficitarias de ácido fólico aparece un cuadro similar, pues también esta inhibida la replicación del ADN: tanto por la reducción de la síntesis de timidilato (al faltar metilen- H_4 F), como por la de purinas (al faltar de formil- H_4 F). Asimismo, un exceso de glicina y metionina en la dieta reduce también la biodisponibilidad de metilen- H_4 F, bloqueando el curso normal de las reacciones que convierten homocisteína en metionina,

y serina en glicina (LINDER, M.C. 1988b).

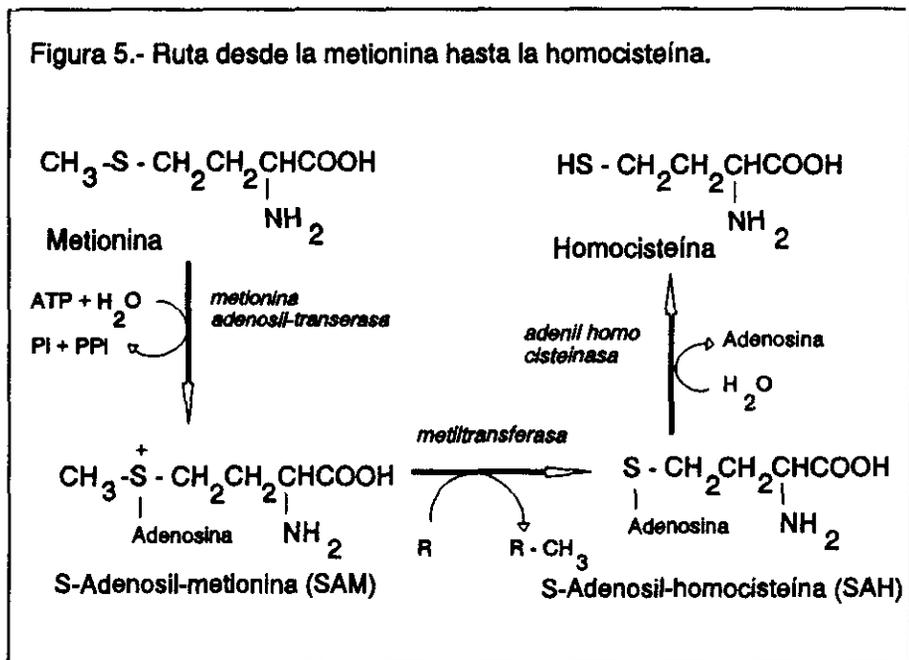
La deficiencia de folato también puede provocar alteraciones neurológicas y psiquiátricas, que se caracterizan porque generalmente aparecen asociadas a otros factores causales (RUNCIE, J. 1979). Los síntomas en los procesos depresivos pueden verse agravados por una deficiencia secundaria de folato (REYNOLDS, E.H. 1976) provocando un círculo "vicioso" de sintomatología: depresión, dieta pobre, deficiencia de folato, agravamiento de la depresión.

Los requerimientos diarios mínimos de ácido fólico están muy relacionados con el crecimiento corporal y con la capacidad de la vitamina para ser absorbida; se sitúan, aproximadamente, cerca de los 50 µg/día. Sin embargo la FAO/WHO ha establecido unas Recomendaciones Dietéticas (RD) del orden de 200 µg/día para los varones y 180 µg/día para las mujeres, suponiendo un 50% de eficacia en el proceso de absorción de ácido fólico, aunque la verdadera biodisponibilidad del ácido fólico se desconoce (LINDER, M.C. 1988b, NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1991).

El estado nutricional de un individuo para una vitamina es función de varios procesos. Con respecto al folato, hay diversos factores que afectan a su biodisponibilidad: la absorción intestinal, incluyendo las variables dietéticas y fisiológicas, así como los factores intrínsecos que afectan al metabolismo y la excreción de la vitamina (GREGORY III, J.F. 1989). Los requerimientos de ácido fólico se van a ver incrementados en distintas situaciones fisiológicas (edad, gestación, lactancia) y patológicas (enfermedad crónicas) además de otros factores como interacción con xenobióticos, y factores socioeconómicos (BAILEY, L.B. y CERDA, J.J. 1988).

2.2.1.2. S-Adenosilmetionina (SAM) y S-Adenosilhomocisteína (SAH).

En el transcurso del metabolismo de la metionina, ésta pierde el metilo del átomo de azufre para transformarse en homocisteína, este es el llamado proceso de **transulfuración**. Para ello, primero la metionina se convierte en su forma activada que es la S-Adenosil-L-metionina (SAM) según la reacción descrita por primera vez por CANTONI,



G.L. en 1950 indicada en la Figura. 5., y posteriormente, después de ceder el grupo metilo, se libera como producto de desmetilación la S-Adenosilhomocisteína (SAH) (LEHNINGER, A.L., 1985c), proceso llamado **transmetilación**. Como ya indicamos, anteriormente también es el iniciador de la **síntesis de poliaminas**.

La SAM es una molécula fisiológica que se encuentra presente en todos los mamíferos y ampliamente distribuida en sus tejidos (GALIANA, A. 1987) y fue aislada por primera vez por CANTONI, G.L. y col. en 1953. La tasa de producción de SAM en hígado de rata es extremadamente rápida: así, en trabajos realizados con administración de metionina marcada se detectó SAM marcada en menos de cinco minutos y su vida media fue del orden de diez minutos. Sin embargo, en el cerebro de la rata la producción y el consumo de SAM es más lenta que en el hígado y esto se debe a la menor actividad de la metionin-adenosil transferasa cerebral. Las concentraciones normales de SAM en hígado y cerebro de rata son respectivamente 29 y 11 $\mu\text{g/g}$ de órgano (BALDESSARINI, R.J. 1975).

La biodisponibilidad de la SAM puede ser incrementada por un aumento de la entrada de metionina y su utilización también aumenta si se incrementa la biodisponibilidad de los aceptores metilo (BALDESSARINI, R.J. 1975). Además, la administración sistémica de metionina en ratas produce un gran aumento de la concentración de SAM en hígado y tejidos periféricos y un pequeño incremento en cerebro (BALDESSARINI, 1966, RUBIN y col. 1974, SCHATZ y SELINGER, 1975), efecto que también se ha encontrado en conejos (SALVATORE y col. 1971). Por lo tanto, parece que la producción de SAM en el hígado depende de la biodisponibilidad de su precursor la metionina (BALDESSARINI, R.J. 1975).

La importancia metabólica de la SAM se basa en que, además de jugar un importante papel en la síntesis y catabolismo de las catecolaminas, es el donador de metilos esencial en más de 400 reacciones biológicas conocidas, y entre los aceptores de estos grupos metilo se encuentran el guanidinoacetato, neurotransmisores, ácidos nucleicos, drogas, fosfolípidos y hormonas (STIPANUK, M.H. 1986; GALIANA, A. 1987). Existen procesos celulares que implican transmetilación tan importantes como la biosíntesis de fosfolípidos fundamental para el mantenimiento de la fluidez y los procesos de membrana (SCHACHTER, D. 1984). La especificidad de la metilación depende la naturaleza de la metiltransferasa que catalice la reacción (WILLIAMS, R.T. 1978). Las numerosas formas de transmetilación incluyen según WILLIAMS, R.T. (1978):

- metilación de N en aminas primarias, secundarias y terciarias y N terciario en N-heterociclos
- metilación de grupos OH particularmente en catecoles
- metilación de S en compuestos con grupos -SH

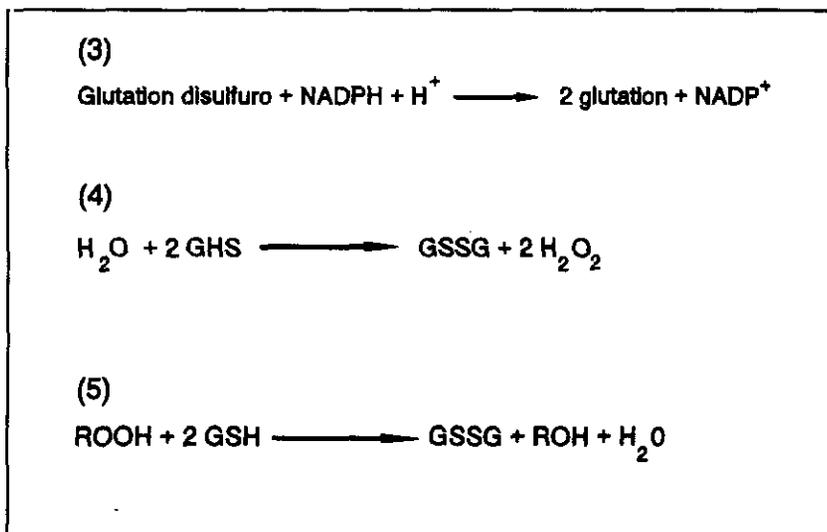
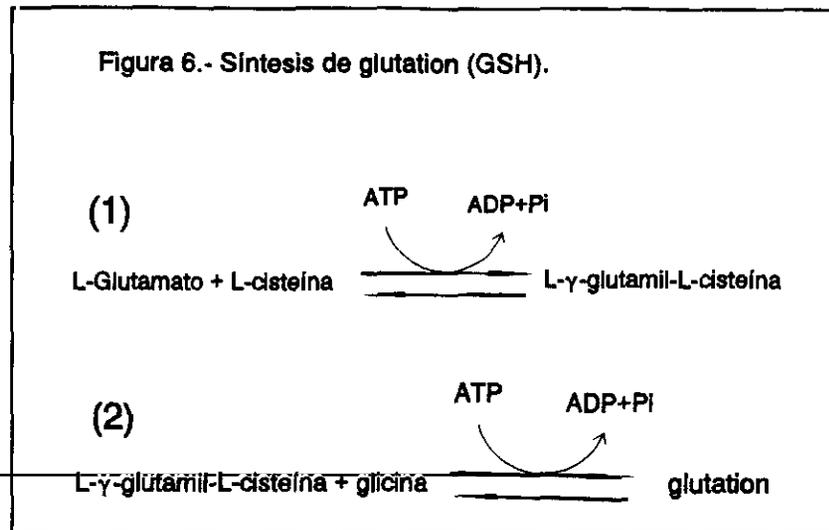
La SAH es un aminoácido presente en el organismo que no forma parte de las proteínas (LEHNINGER, A.L. 1985a), y ha demostrado ser de gran interés bioquímico por tratarse de un neurotransmisor (GALIANA, A. 1987).

La concentración celular de SAH o la relación de SAM a SAH puede servir como un feedback regulador de las reacciones biológicas de metilación, de modo que la mayoría de las metiltransferasas que utiliza la SAM son inhibidas por la SAH (STIPANUK, M.H. 1986). Esto es así, pues la mayoría de las metiltransferasas tienen una similar afinidad para SAM y SAH y dada la gran importancia de la transmetilación es necesario mantener una relación SAM/SAH dentro de una límites muy estrictos (CORRALES IZQUIERDO, F. 1992).

La SAM se utiliza en el tratamiento de hepatopatías crónicas pues se ha visto que los niveles hepáticos de SAM disminuyen drásticamente después de la administración de tetracloruro de carbono, y que aumentan a valores normales con administración de SAM exógena. Así, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos trabajos para determinar el papel terapéutico de la SAM frente a enfermedades o como protector frente a drogas. Como hepatoprotector es virtualmente atóxica y la DL 50 i.v. es superior a 2 g/Kg de rata (GALIANA, A. 1987).

2.2.2. Síntesis y niveles celulares de glutatión.

Los experimentos en hígado de rata realizados por BLOCH, K. y ANKER, H.S. (1947) y BRAUNSTEIN, A.E. y col. (1948) demostraron la síntesis de glutatión desde sus tres aminoácidos constituyentes. Los enzimas que catalizan la síntesis de glutatión son γ -glutamylcisteín sintetasa y la glutatión sintetasa (MEISTER, A. 1989a). La síntesis se verifica en dos pasos (1) y (2) donde la reacción limitante es la primera por inhibición "feedback" del glutatión CHRISTENSEN, H.N. (1990).



Este glutatión así obtenido se le denomina glutatión reducido (GSH) y en el organismo, debido a su función, puede oxidarse formándose glutatión oxidado que presenta un grupo disulfuro (GSSG) (4)(5) (KOSOWER, E.M. 1989).

La reducción de GSSG a GSH se realiza enzimáticamente por la glutatión disulfuro reductasa (MEISTER, A.

1989a) y se encarga de mantener un nivel elevado de GSH celular (3). El rango de concentración celular de GSH se encuentra entre 0,1 y 10 mM (KOSOWER, E.M. 1989) y supone el 99,5% de glutatión total (GSH + GSSG) (MEISTER, A. 1989a).

Por tanto, el glutatión puede considerarse como un componente celular esencial puesto que una prolongada alteración del mantenimiento de su concentración celular adecuada pone en peligro la supervivencia de la célula (KOSOWER, E.M. 1989).

El movimiento de glutatión se verifica principalmente desde el elevado número de células de origen, especialmente hepáticas, hacia el riñón donde el péptido es degradado y sus aminoácidos reutilizados CHRISTENSEN, H.N. (1990).

El glutatión es un biocompuesto con propiedades multifuncionales y realiza papeles vitales en células de todos los estados evolucionados (DOUGLAS, K.T. 1989), y es el

principal responsable del mantenimiento del estado de oxido-reducción de las células (CORRALES IZQUIERDO, F. 1992). Así, el glutathion reducido participa en varios tipos de reacciones enzimáticas como coenzima, como cosustrato, o como parte de la arquitectura molecular del sustrato. Es una molécula crucial en diversidad de procesos como detoxificación de xenobióticos, eliminación de peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos y radicales libres y posiblemente transporte de aminoácidos a través de membranas (DOUGLAS, K.T. 1989). Se encuentra incluido en los procesos inflamatorios por contribuir en la estructura del leucotrieno, y en las respuestas hormonales. El glutathion disulfuro es sustrato de la glutathion reductasa e interviene en la regulación de la vía de la hexosa monofosfato y de la fosforilación oxidativa.

Muchas reacciones importantes de conjugación en el metabolismo de compuestos endógenos y de fármacos requieren sulfocofactores tales como *sulfato activo* (PAPS: 3'—fosfoadenosil—5'—fosfosulfato), glutathion, o taurina (GLAZENBURG, E.J. y col. 1983). La cisteína presenta un papel central en el metabolismo de drogas como precursor de estos compuestos (SINGER, T.P. 1975) y la metionina por ser precursora de la cisteína. Las reacciones de detoxificación consumen glutathion hepático lo que conduce a una estimulación compensatoria de su síntesis (LAUTERBURG, B.H. y col. 1980).

El nivel de glutathion celular depende de la biodisponibilidad de sus aminoácidos componentes y siendo la cisteína es el aminoácido limitante más frecuente (MEISTER, A. 1989b). En trabajos realizados con hepatocitos cultivados se demuestra que la velocidad de transporte al interior intracelular de la cisteína dobla a la de la metionina. Por tanto, si sólo se considera este dato, la cisteína parece ser la principal fuente de glutathion (TANIGUCHI, M. y col. 1989). Aún así, la concentración de cisteína en el medio es demasiado baja para detectarse y, por tanto, es la metionina el sulfoaminoácido más efectivo para mantener el nivel intracelular de glutathion puesto que, aunque la velocidad de transporte es baja, sirve como precursor de glutathion al convertirse, como se indica en la Figura 2, rápidamente a cisteína vía transulfuración (TANIGUCHI, M. y col. 1989).

Ciertos aminoácidos y dipéptidos estimulan el turnover de glutathion hepático, de hecho, estudios *in vivo* demuestran el efecto estimulador directo de la metionina sobre el flujo de glutathion hepático, y aunque deben estar incluidos varios mecanismos en la regulación del flujo de glutathion no está muy clara cual es la señal responsable del incremento de este flujo en presencia de metionina (LAUTERBURG, B.H. y SMITH, C.V. 1986).

2.2.1.1. Glutathion y detoxificación de fármacos.

La mayoría de las drogas, xenobióticos y moléculas endógenas son convertidas metabólicamente a especies más polares para facilitar su excreción. La transformación metabólica generalmente se realiza en dos pasos: primero se produce la activación metabólica del compuesto a un reactivo intermedio y como segunda fase se produce la desactivación del mismo con una sustancia polar (como el glutathion reducido) para formar un producto de eliminación. El producto intermedio activado puede ser un problema potencial si es capaz de reaccionar con moléculas celulares críticas que alteren la estructura y función celular de forma que no sea compatible con la viabilidad de la célula (SMITH, C.V. y MITCHELL, J.R. 1989).

La naturaleza química de los compuestos o los reactivos intermedios que pueden

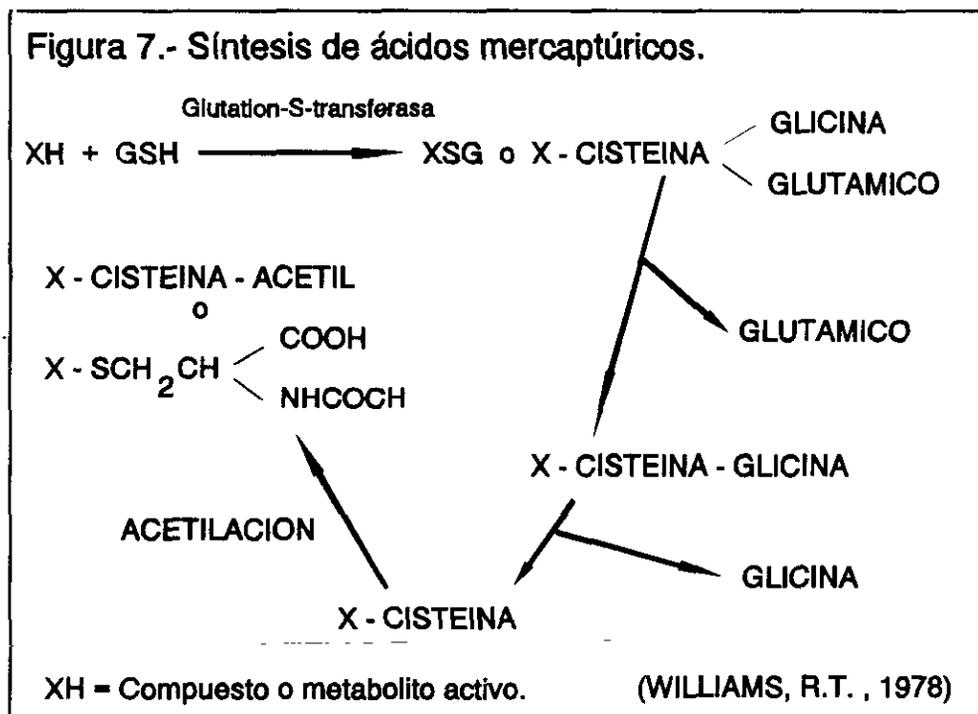
reaccionar con glutation (GSH) se pueden clasificar según SMITH, C.V. y MITCHELL, J.R. (1989) en:

- Electrófilos fuertes o no sustratos de la GSH-S-transferasa: Ej. furosemida.
- Electrófilos débiles o sustratos de la GSH-S-transferasa: Ej. acetaminofeno.
- Radicales libres orgánicos: Ej. tetracloruro de carbono.
- Generadores de especies oxígeno-reactivas: Ej. nitrofurantoína.

El glutation se caracteriza por su actividad antioxidante que se debe a la capacidad reductora de su grupo más reactivo, el grupo tiólico de su cisteína que se encarga de proteger de la oxidación a grupos -SH esenciales de las proteínas y como resultado aparece la forma oxidada (GSSG), cuyo puente disulfuro es altamente tóxico para la célula (BARJA DE QUIROGA, G. 1991). El grupo tiólico actúa como donador de electrones y, por tanto, como un nucleófilo que elimina radicales libres.

La adición nucleófila y las reacciones de sustitución conducen a la formación de conjugados de glutation que por sucesivas degradaciones se transforman en productos de excreción como ácidos mercaptúricos, tioglucurónidos y metiltio, metilsulfinil y metilsulfonyl derivados (MANNERVIK, B. y col. 1989).

Por tanto, el glutation es un importante agente conjugante cuyo mayoritario producto final son los ácidos mercaptúricos y cuya síntesis se indica en la Figura 7.



2.3.- INGESTA DEFICITARIA EN METIONINA.

La ingesta de aminoácidos esenciales es importante fundamentalmente para la síntesis proteica y el crecimiento. Por tanto, la carencia total o parcial de un aminoácido esencial puede llevar a un balance negativo de nitrógeno, pérdida de peso, alteración del crecimiento en niños, deficiencias subclínicas y síntomas clínicos que varían según el aminoácido deficiente (SANCHEZ BARCO, M.J., 1990).

A partir de la bibliografía revisada se puede decir que una deficiencia dietética en metionina puede afectar negativamente a numerosos parámetros nutricionales, bioquímicos y fisiológicos. De ellos, los que se encuentran dentro del marco de esta Tesis serían los siguientes:

* Síntesis proteica:

Cuando se ingiere una dieta deficiente en aminoácidos se produce una interrupción de la síntesis proteica (MEISTER, A. 1965) y, en el caso de la metionina, esta interrupción es más efectiva por el papel iniciador de la misma que presenta la metionina (LEHNINGER, A.L. 1985b).

Por ello, uno de los primeros efectos encontrados cuando a un animal se le administra una dieta deficiente en metionina está lógicamente en relación con la velocidad de crecimiento, la cual es directamente dependiente de la ingesta de metionina, de modo que ratas que ingieren una dieta deficiente en metionina crecen más lentamente que ratas que toman una dieta con un valor de metionina adecuado (PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. 1989).

Durante los años 60 y 70 se realizaron varios trabajos sobre el tema: encontramos autores (YAMASHITA, K. y ASHIDA, K. 1969; SAID, A.K. y HEGSTED, D.M. 1970) que indican que en animales alimentados con dietas carentes en la mayoría de los aminoácidos esenciales se produce una reducción del peso corporal menor que la producida en animales alimentados con dietas carentes de proteína, y explican el proceso como la presencia de mecanismos bioquímicos desconocidos que inducen cambios adaptativos los cuales van a permitir la conservación de los aminoácidos esenciales cuando se ingieren en poca cantidad. En otros trabajos (SAID, A.K. y col. 1974) la reducción del peso corporal es aproximadamente del mismo nivel tanto en ratas alimentadas con ausencia de proteína como en otras alimentadas con carencia de metionina.

Lógicamente, una disminución en la ingesta de sulfoaminoácidos es de esperar que afecte a los procesos anabólicos resultando así una disminución del peso corporal de ratas (SAID, A.K. y col. 1974; GLAZENBURG, E.J. y col. 1983; JABLONSKI, E. y RAFALSKI, H. 1984; SANCHEZ BARCO, M.J., 1990). En 1974 ZAMENHOF, S. y col. administraron a ratas gestantes una dieta deficiente en metionina y el peso tanto de las madres como de los neonatos fueron significativamente menores que el de los alimentados con dietas completas. Esta reducción del crecimiento se ha apreciado también en otros animales de experimentación como en las codornices japonesas (SHIM, K.F. y LEE, T.K. 1988) y en pollos (SAUNDERSON, L. y MACKINLAY, J. 1990).

La administración de dietas carentes de un aminoácido esencial puede provocar cambios en el metabolismo proteico de órganos y tejidos. Así, en gastrocnemio de ratas que han ingerido dietas carentes de metionina se produce un descenso de la proteína muscular

(SIDRANSKY, H. y VERNEY, E. 1970). El crecimiento muscular se ve afectado, con una marcada reducción de la tasa de la síntesis proteica muscular (MARTINEZ, J.A. y col. 1987), puesto que el músculo, abundante en la rata y de tasa metabólica baja, frente a una malnutrición por deficiencia de metionina disminuye su peso más que otros tejidos y órganos (52% respecto al control), y esto es debido, como ya hemos dicho, al papel iniciador de la síntesis proteica de la metionina que hace que el resto de los aminoácidos aportados por la dieta no pueden ser utilizados con fines sintéticos (SANCHEZ BARCO, M.J., 1990).

*** Ingesta:**

La ingesta voluntaria de un alimento esta influenciada por numerosos factores (MERCER, L.P. y col. 1989). En general, los animales de experimentación cuando ingieren dietas desequilibradas en algún nutriente responden, debido a la presencia de mecanismos de adaptación, con una supresión voluntaria de la ingesta (HARPER, A.E., 1967).

OSBORNE, T.B. y MENDEL, L.B. (1916) y ROSE, W.C. (1931) fueron los primeros en demostrar que la deficiencia de un aminoácido en la dieta provoca una reducción de la ingesta del alimento. Son varias las hipótesis existentes: según algunos autores (HARPER, A.E. y col. 1964) esta disminución de la ingesta puede deberse a las variaciones del patrón normal de aminoácidos plasmáticos y, según otros, (RUSSEK, M. 1971) a la presencia de receptores hepáticos que monitorizan los niveles de glucosa y amonio.

Se cree que el sistema nervioso central se encuentra intrínsecamente envuelto en el proceso de regulación de la ingesta cuando se administran dietas desequilibradas en cuanto a la concentración de aminoácidos (ROGERS, Q.R. y LEUNG, M.B., 1973), pero los datos existentes son poco concluyentes. Mientras que MELLINKOFF, S. (1957) opina que son las modificaciones en las concentraciones plasmáticas de aminoácidos la señal que actúa sobre el centro regulador del apetito, ROGERS, Q.R. y LEUNG, M.B. (1973) nos indican que parece que el centro de la saciedad no esta envuelto en la regulación de la ingesta de dietas desequilibradas en aminoácidos. Posteriormente, HARPER, A.E. (1977) indica que en los animales sometidos a dietas con desequilibrio en aminoácidos, y debido, según cree, a la existencia de un mecanismo cerebral sensible a los cambios en las proporciones de aminoácidos esenciales, asociado al descenso en la concentración cerebral del aminoácido limitante de la dieta, se produce una disminución temporal en la ingesta. Otros datos los aportan NODA, K. y CHIKAMORI, K. (1976) de cuyos resultados se concluye que es el amonio el que puede deprimir la ingesta de dietas desequilibradas en aminoácidos por acción sobre el área cortical prepiriforme.

Trabajos como el de VELU, J.G. y col. (1972) indican que la administración de una dieta carente de proteína en animales permite un nivel de ingesta satisfactorio si se compara con otros alimentados con dietas deficientes en un único aminoácido. En el trabajo realizado por SANCHEZ BARCO, M.J. (1990) la administración a ratas de una dieta carente de metionina y de cisteína provocó una reducción de la ingesta de un 50% respecto a los controles.

MERCER, L.P. y col. en 1989 han realizado un reciente trabajo orientado a esclarecer el mecanismo regulador de la ingesta, en el que administraron a distintos lotes de animales dietas con concentraciones progresivamente superiores de los distintos aminoácidos esenciales, desde la deficiencia hasta un valor superior a los requerimientos nutricionales (en el caso de la metionina desde 0,0 hasta 0,8% de concentración en la dieta). En cuanto a los

resultados obtenidos, se vio que la concentración de cada aminoácido esencial cerebral se correspondía linealmente con la concentración sérica del mismo para cada dieta, por lo que concluyen que los niveles séricos están sujetos a saturación cinética pero que el nivel de saturación no se ha visto en el cerebro debido al rango limitado de concentración sérica. Por otro lado, se observó que la histidina cerebral aumentaba en todas las deficiencias de aminoácidos esenciales y que este aumento era directamente proporcional a la disminución de la ingesta. Además, se vio que se producía un nivel de ingesta próximo en cada limitación dietética de aminoácidos esenciales. Todos estos datos, junto con que la histidina es un aminoácido precursor de neurotransmisores podría indicar que la ingesta voluntaria puede estar correlacionada con la concentración cerebral de histidina, de modo que, el nivel de histidina cerebral podría ser la señal fisiológica de una dieta desequilibrada y proteger al organismo del potencial perjuicio de su ingesta.

* Balance de nitrógeno:

Según los datos de HEGER, J. y FRYDRICH, Z. (1985) realizados en animales de experimentación, la ingesta de una dieta carente de aminoácidos esenciales produce una pérdida de nitrógeno corporal que alcanza su valor máximo cuando se trata de aminoácidos azufrados. Así, parece que la pérdida de nitrógeno por la ingesta deficiente de aminoácidos depende de la limitación de aminoácidos endógenos que son importantes precursores de la síntesis proteica *de novo* HEGER, J. y FRYDRICH, Z. (1985).

Tanto SAID, A.K. y HEGSTED, D.M. (1970) como BENDER, A.E. (1965) identifican la ingesta de dietas carentes de aminoácidos azufrados como las que producen una pérdida de nitrógeno corporal comparable a una ingesta de una dieta desprovista de proteína. Por tanto, comparando lotes de ratas a las que se les administra dietas carentes de cada aminoácido esencial, es la deficiencia en sulfoaminoácidos la que produce un balance de nitrógeno mínimo.

Todo esto se explica por la menor eficacia de utilización que presentan los sulfoaminoácidos para el crecimiento y el mantenimiento, comparados con el resto de los aminoácidos, según indican HEGER, J. y FRYDRICH, Z. (1985) basados en otros estudios de análisis de carcasa (PELLET, P.L. y KABA, H. 1972) y de medidas de oxidación de aminoácidos marcados (AGUILAR, T.S. y col. 1972). La menor utilización indicada se debe a que parece que una considerable proporción de la metionina dietética es requerida como donador de grupos metilo para la síntesis de ácidos nucleicos y otros componentes esenciales como colina y metilhistidina así, para la síntesis de cisteína, taurina y sulfato HEGER, J. y FRYDRICH, Z. (1985).

En un trabajo reciente realizado en ratas se ha observado que la administración de dietas con distintos niveles de metionina no afectaba a los niveles de eliminación de nitrógeno total urinario (PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. 1989).

En el estudio de SANCHEZ BARCO, M.J. (1990) la administración a ratas de una dieta carente de metionina y de cisteína produjo un aumento de la urea excretada por orina y una reducción significativa del balance de nitrógeno respecto al control pero de menor intensidad que en el trabajo de HEGER, J. y FRYDRICH, Z. (1985). Son muchos los trabajos que indican el aumento de la urea plasmática durante la deficiencia de aminoácidos esenciales. En el trabajo indicado de SANCHEZ BARCO, M.J., (1990) en ratas, se produjo una significativa elevación de la urea en plasma (con un aumento del 135 y 152% frente al control) que disminuye al final del período experimental (aumento del 46% frente al control).

*** Procesos bioquímicos:****1.- Cambios relacionados con la ruta de la transmetilación-transulfuración:**

Como ya indicamos, la metionina sirve como precursor de *sulfato activo* (PAPS: 3'—fosfoadenosil—5'—fosfosulfato), glutatión o taurina (GLAZENBURG, E.J. y col. 1983) pues se convierte rápidamente a cisteína vía transulfuración por medio de la cistationina (GREENBERG, D.M. 1975; SINGER, T.P. 1975). Así, la presencia de metionina y cisteína en la dieta permite las reacciones de sulfatación y la conjugación con glutatión y, por tanto, una reducción de los sulfoaminoácidos reduce la disponibilidad de los sulfocofactores. Así lo demuestran trabajos de PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. (1989) y GLAZENBURG, E.J. y col. (1983) realizados en animales a los cuales se les ha proporcionado una dieta sulfo deficiente y en los que el contenido de metionina en la dieta es directamente proporcional al contenido de glutatión hepático.

La vía metabólica de transulfuración es un ciclo bioquímico en el que intervienen SAM, SAH y ácido fólico. Una deficiencia dietética de metionina puede provocar, como ya hemos dicho, una demanda de cisteína para la sulfatación y la biosíntesis de glutatión, que puede afectar a la transulfuración y por tanto a la concentración de SAM según nos indica REICKS, M. y col. (1992). De hecho, se ha sugerido que la concentración de SAM es el factor clave de regulación de la transulfuración (FINKELSTEIN, J.D. 1990) y que, tanto SAM como SAH, cuyas concentraciones hepáticas se alteran con deficiencia dietética de metionina (HOFFMAN, D.R. y col. 1979), son buenos indicadores sobre estados carenciales de grupos metilo (HENNING, S.M. y col. 1989). HOFFMAN, R.M. (1984) ha sugerido que una disminución de los niveles de SAM en animales alimentados con una dieta metilodeficiente podría disminuir la metilación del ADN y provocar la activación de oncogenes (COOK, R.J. y col., 1989).

HENNING, S.M. y col. en 1989 realizaron un estudio con ratas en el que se administró a un lote una dieta deficiente en metionina y cuando se compararon con otro lote que consumió la misma dieta pero suplementada con metionina los resultados obtenidos fueron una disminución significativa del contenido hepático de SAM y de la relación SAM:SAH junto con una reducción de aproximadamente un 50% del glutatión hepático. Resultados similares se han obtenido en trabajos realizados anteriormente por FINKELSTEIN, J.D. y col. (1982) y SHIVARPURKAR N. y POIRIER, L.S. (1983).

También se han realizado estudios a nivel enzimático de la transulfuración en animales con deficiencia dietética de metionina. En pollos, SAUNDERSON, L. y MACKINLAY, J. (1990), encontraron un incremento en la actividad de la metionin-adenosil transferasa, la metiltetrahidrofólico-homocistein metiltransferasa, la colina oxidasa y de la betain-homocistein metiltransferasa, así como una disminución de la actividad de la cistationin β -sintasa en los animales que consumieron una dieta deficiente en metionina con respecto a los que consumieron una dieta que cubría los requerimientos de metionina del pollo.

WAGNER, C. (1985) demostró que la glicina metiltransferasa es alostéricamente inhibida por N^5 -metil- H_4F , que es la forma del poliglutamato que se acumula en las células durante la deficiencia de metionina. Por tanto, esta regulación de la glicina metiltransferasa puede jugar un papel en la conservación de grupos metilos lábiles cuando la ingesta de metionina es inadecuada.

2.- Cambios relacionados con el metabolismo proteico:

Existen varios trabajos referidos al catabolismo aminoacídico y, en concreto, a los efectos sobre los enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y la glutamato-piruvato transaminasa (GPT), enzimas esenciales en los procesos oxidativos de los aminoácidos. AMUBODE, F.O. y FETUGA, B.L. (1984) estudiaron el efecto de la metionina dietética sobre estos enzimas en pollos y encontraron que la GOT no se afectaba por distintos niveles de ingesta de metionina ni en plasma ni en el hígado, mientras que la GPT plasmática tendía a incrementarse cuando se administraba metionina en niveles entre el 0,26 y el 0,50% de contenido en la dieta. SANCHEZ BARCO, M.J. (1990) en el trabajo realizado con administración de dietas carentes de metionina y cisteína en ratas vio una disminución de la actividad enzimática de la GOT como de la GPT muscular con respecto a los controles.

* Sistema nervioso central

La síntesis proteica de las células neuronales parece ser la más vulnerable a un inadecuado aporte de aminoácidos durante las fases de más rápido crecimiento de las estructuras cerebrales, ya que el anabolismo proteico y, por tanto, los requerimientos de aminoácidos son particularmente altos (HUETHER, G. 1989).

El cerebro necesita de los aminoácidos para su crecimiento, desarrollo y función y puesto que no pueden ser sintetizados por las células cerebrales los obtiene del torrente sanguíneo y, en este punto, se producen interferencias en la captación y utilización cerebral de aminoácidos que pueden llevar a alteraciones como retraso y trastornos mentales (BAÑOS, G. y col. 1973), de hecho, la ausencia de metionina dietética durante la segunda mitad de la gestación puede ser tan perjudicial como la ausencia dietética de proteína en el mismo período en cuanto a desarrollo cerebral prenatal se refiere (ZAMENHOF, S. y col. 1974).

Varios aminoácidos, entre ellos la metionina, compiten por el sitio de unión del sistema transportador de aminoácidos neutros localizado en la barrera hematoencefálica (PARDRIDGE, W.M. 1983). VENERO, J.L. y col. (1992) estudiaron el efecto de la administración de una dieta carente en metionina sobre los niveles de distintos neurotransmisores en la sustancia nigra y el cuerpo estriado, y observaron que la deficiencia produjo en el cuerpo estriado una reducción significativa de la concentración de triptófano (precursor de serotonina) tanto en el sistema serotoninérgico como en el dopaminérgico, en este último también se produjo una reducción significativa del ácido homovanílico (metabolito de la dopamina). Los autores interpretan los resultados de la siguiente forma: la metionina es precursora de la cisteína y ésta a su vez interviene en la síntesis de glutatión, el cual no sólo interviene en importantes procesos de detoxificación (SIES, H. y col 1983) sino también en el metabolismo oxidativo de las catecolaminas centrales (HOTHERSALL, J.S. y col. 1982). Por tanto, el glutatión es fundamental en el mantenimiento del estado redox celular (REED, D.J. y col. 1983). Como además, una deficiencia dietética de metionina produce una marcada reducción del glutatión hepático podría suceder que afectase también a la concentración de glutatión cerebral aunque en menor medida.

2.4. ALGUNOS FARMACOS QUE INTERACCIONAN CON LA UTILIZACION DE LA METIONINA.

2.4.1. Analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos.

2.4.1.1. Clasificación farmacológica, aplicaciones terapéuticas y dosificación.

Se trata de un conjunto de fármacos que se denominan analgésicos periféricos o antalgésicos y en general analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos. Presentan claras diferencias con los analgésicos opiáceos y con los antiinflamatorios esteroídicos y sus principales acciones son (FLOREZ, J. y col. 1987a; INSEL, P.A. 1991):

- Analgésica: Actúan a nivel periférico, son de moderada eficacia y presentan preferencia sobre dolores reumáticos, cefaleas y mialgias.
- Febrífuga: Disminuyendo la temperatura anormalmente elevada.
- Antiinflamatoria.

Su prototipo es el ácido acetilsalicílico, pero en la actualidad se han obtenido numerosos fármacos que pertenecen a diferentes familias químicas tal como se indica en el siguiente cuadro:

Grupos	Fármacos prototipo
Acido salicílico	Acido acetilsalicílico
Pirazoles	Dipirona, Fenilbutazona
Paraaminofenol	Paracetamol o Acetaminofeno
Acido indolacético	Indometacina
Acido pirrolacético	Tolmetín
Acido bencenoacético	Diclofenac
Acido propiónico	Naproxen
Acido antranílico	Acido mefenámico
Oxicams	Piroxicam

Aunque la mayoría de los componentes de este grupo poseen las acciones indicadas anteriormente, la eficacia relativa de cada uno puede ser diferente para cada acción; es decir, un fármaco puede mostrar mayor actividad antiinflamatoria y menor analgésica que otro, o viceversa. De ahí que su utilización en una u otra indicación terapéutica dependerá de su grado de eficacia y de su grado de toxicidad.

Con frecuencia se consumen sin control médico, para aliviar dolores moderados o para bajar la fiebre, bien como fármacos solos o en asociación con otros (FLOREZ, J. y col. 1987a).

* Acido acetilsalicílico o Aspirina (ASA)

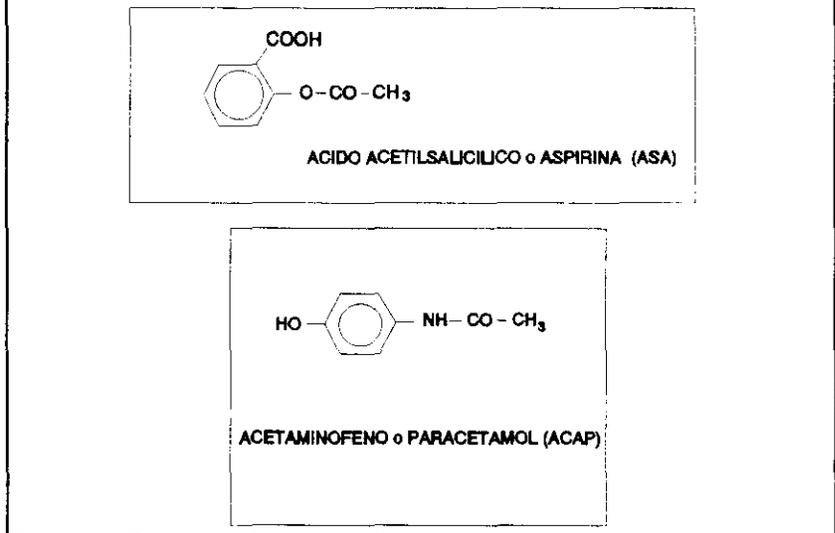
El ácido acetilsalicílico o aspirina (ASA) es un ester acetilado del ácido salicílico o 2-hidroxibenzoico cuya estructura química se muestra en la Figura 8.

El ASA presenta acción analgésica, para dolores de baja intensidad, antiinflamatoria y antipirética, realizándolo de forma rápida y eficaz (INSEL, P.A., 1991). El mecanismo de acción es mediante la inhibición de la ciclooxigenasa por acetilación irreversible del enzima (FLOREZ, J. y col. 1987a).

Las dosis de ASA a administrar para sus distintas aplicaciones terapéuticas según las revisiones de FLOREZ, J. y col. (1987a) y de INSEL, P.A. (1991) son:

Dolor: La eficacia antiálgica en dolor agudo es dosis-dependiente hasta un techo de unos 1200 mg; si existe un componente inflamatorio, la acción antiinflamatoria contribuye a reducir el dolor. La frecuencia de administración dependerá del tipo de dolor y de su respuesta a la primera dosis. Hay dolores que ceden con una sola dosis, pero si persisten requieren dosis de 300-1000 mg cada 4-5 horas.

Figura 8.- Formula química del ácido acetilsalicílico y del acetaminofeno.



Las indicaciones antiálgicas más frecuentes son:

- Neuralgias, cefaleas, jaquecas, y dolores de diverso tipo y origen (cefaleas de tensión, dolores radiculares, dolores de causa tumoral, dolores dentarios, por infecciones).
- Dolores postoperatorios y postpartum: si son de pequeña o moderada intensidad responden a los salicilatos.
- Dismenorrea: es frecuente la utilización de los salicilatos y su eficacia se debe a la reducción de prostaglandinas que contribuyen a la patogenia del síndrome.
- Dolor de origen canceroso: los salicilatos están indicados sólo en los primeros estadios.

Síndromes articulares: Los salicilatos han retenido su posición preeminente en el tratamiento de enfermedades reumáticas durante casi 100 años.

- Artritis reumatoide: Para el dolor agudo ocasional la dosis es 0,6-1,2 g, y de 4-6 g/día divididos en 4-6 dosis para mantener la actividad antiinflamatoria, tratando de mantener un nivel plasmático de 15 a 30 mg/100ml. En el tratamiento de fiebre reumática aguda la dosis puede llegar a ser de 4 a 8 gramos al día en dosis divididas.
- Osteoartritis: Se administrarán dosis de 2-4 mg/día.
- Artritis reumatoide juvenil: La dosis es de 90-130 mg/kg/día. En la fiebre reumática, 60 mg/kg/día, pero si los síntomas son graves puede llegar a 180 mg/kg/día, con grave riesgo de toxicidad.
- Tendinitis, bursitis, etc. Son necesarias dosis de 3-4 g/día.

Fiebre: La dosis en el adulto es de 500-1000 mg cada 4-6 horas, y en el niño 10-20 mg/kg cada 6 horas.

Prevención del infarto de miocardio: El ASA esta recomendado para prevenir la reinfartación miocárdica y el riesgo de algunos ataques isquémicos recurrentes en dosis de 650 mg dos veces al día o 325 mg cuatro veces al día. Sin embargo, el valor de este tratamiento no es fácil de establecer (MARTINDALE, 1982). Actualmente se piensa que en

el tratamiento o profilaxis de enfermedades asociadas con la hiperagregabilidad plaquetaria, aunque no se ha establecido la dosis óptima, se piensa que 325 mg o menos por día es suficiente para obtener efectos beneficiosos.

* Acetaminofeno o Paracetamol (ACAP)

El acetaminofeno (ACAP) es el derivado de la anilina más utilizado y se denomina también paracetamol o N-acetil-p-aminofenol, inicialmente fue identificado como metabolito activo de la fenacetina. Su fórmula química aparece en la Figura 8.

Del ACAP destaca la actividad analgésica para dolores moderados y la antipirética de similar eficacia al ASA, aunque quizá el techo antiálgico sea algo menor. Tiene alguna, aunque escasa, actividad antiinflamatoria demostrable sólo en algunos edemas experimentales.

El mecanismo de acción resulta todavía algo oscuro. En relación con la síntesis de prostaglandinas, el ACAP puede estimularla (mucosa gástrica), no modificarla (pulmón y plaquetas), o inhibirla moderadamente (sistema nervioso central). Quizá eso explicaría su escasa eficacia antiinflamatoria, su acción antitérmica y analgésica y su inocuidad a nivel gástrico (FLOREZ, J. y col. 1987a).

El ACAP se emplea como antipirético y como analgésico menor. La dosis habitual en adultos es de 500 mg cada 4 horas; en dolores moderados pero algo agudos se puede empezar con 1 g, y seguir después con 500 mg (FLOREZ, J. y col. 1987a). Se puede llegar a un máximo de 4 gramos al día (MARTINDALE 1982). En niños, la dosis oscila desde 10-15 mg/kg cada 4-6 horas en los de menos de 1 año, a 250 mg cada 4-6 horas en niños de 6 años. El ACAP se prescribe solo pero, con mayor frecuencia, se incorpora en fórmulas antiálgicas y anticatarrales (FLOREZ, J. 1987). No se ha encontrado que su uso crónico pueda llegar a producir problemas de tolerancia (MARTINDALE, 1982; SERRANO MOLINA, J.S. 1981; NOYELLE, R.M. y col. 1987).

Naturalmente, en la posología de los fármacos intervienen numerosos factores entre los que hay que tener en cuenta las interacciones nutrientes-fármacos. Es muy difícil, en general, la cuantificación de estas interacciones sobre la biodisponibilidad y la dosis terapéutica de un determinado fármaco. Por ello, es de especial valor el intento de ROE (1989) en este sentido. Esta investigadora ha diseñado un Banco de Datos con el fin de suministrar al clínico información sobre la posología adecuada para estos fármacos, teniendo en cuenta dichas interacciones. Sin embargo, en el caso del ACAP, por ejemplo, como indica HODGES, R.E. (1981), esta información no es demasiado útil por tratarse de un fármaco de libre dispensación, extendiéndose el problema a todos aquellos medicamentos cuya dispensación no está bajo el control del clínico.

2.4.1.2. Consumo de estos analgésicos y grupos de riesgo.

El consumo de analgésicos se verifica frecuentemente por automedicación, ya que la mayoría de estas sustancias se pueden adquirir sin prescripción médica, lo cual conduce a un difícil seguimiento y a una farmacovigilancia a veces deficiente (MENARD, G. y col. 1993). Además, estos medicamentos no están exentos de producir toxicidad, sobre todo aquellos consumidos de forma crónica (RAINSFORD, K. 1984). Un ejemplo, es el síndrome clínico denominado nefropatía analgésica que esta asociada al consumo de analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos, entre los que se encuentran tanto el ASA como el ACAP (NANRA, R.S., 1993).

La popularidad y consumo de estos analgésicos en general es muy grande en todos los estratos de población: por ejemplo en niños y adolescentes (SWEDISH DRUG STATISTIC, 1987) pero, probablemente, sea en el grupo de Personas de Edad Avanzada (PEA) donde es más alto (AHONEN, R. y col. 1991). Con la edad, se produce un aumento generalizado tanto en el consumo como en la prescripción de fármacos, y especialmente en los medicamentos dispensados sin receta médica ("over-the-counter", OTC). Así lo demuestran numerosos estudios: CHIEN, C.P. y col. (1978) encontraron en un estudio con 244 personas con una edad por encima de los 60 años, que entre los fármacos más comúnmente utilizados, el 66% eran analgésicos. En este estudio, el 83% de la población tomaban dos ó más fármacos y los medicamentos OTC constituían el 40% del total de la medicación utilizada. GUTTMAN, P. (1978), con una muestra de 441 PEA, encontró que el 61% tomaban fármacos OTC, de los cuales el 31% eran analgésicos. OUSLANDER, J.G. (1981), en un estudio realizado en Estados Unidos observó que los analgésicos eran unos de los medicamentos más frecuentemente prescritos.

ROE, D.A. (1984a) señala en su estudio que los grupos de medicamentos más consumidos por los ancianos son:

- 1.- agentes antiinfecciosos.
- 2.- analgésicos y antiinflamatorios.
- 3.- sedantes, tranquilizantes y antidepresivos
- 4.- cardiotónicos, antihipertensivos y diuréticos

Esta misma autora y HATHCOCK, J.N. (1985), enumeran las principales razones que explicarían, según su criterio, el excesivo consumo o mala utilización de fármacos en este grupo de población:

- a) Prescripciones de varios médicos a los que suelen acudir.
- b) Piensan que si una dosis baja resulta inefectiva, una más alta si lo será.
- c) Hipocondriasis.
- d) Obsesión respecto a todos los problemas relacionados con su salud.
- e) Uso abusivo, en algunas ocasiones, por parte del médico, de fármacos con el fin de hacer al paciente más manejable.
- f) Dificultades para seguir el régimen de medicación impuesto, mezclando incorrectamente diferentes medicamentos.
- g) Consumo de fármacos prescritos para otras personas con el fin de probar si les van bien para su salud.
- h) No ser tenido en cuenta muchas veces por los médicos si la dosis que utilizan está en relación con el peso corporal.

WELLING, P.G. (1985) indicó que aunque hay numerosas estadísticas sobre el consumo de fármacos en las PEA, todas ellas suelen coincidir en que las personas de edad que viven en sus hogares toman entre 2 y 4 medicamentos distintos al día, aumentando esta cifra en los ancianos institucionalizados hasta 5-10 diarios. Se ha comprobado además, que el consumo de fármacos aumenta con la edad. En el estudio de CHEN, L.H. y col. (1985), se encontró que el Tylenol (ACAP) era la especialidad más consumida por los ancianos institucionalizados, mientras que en los que vivían en sus hogares, ocupaba el segundo lugar. ROE, D.A. (1984b), en un estudio llevado a cabo en Gran Bretaña, confirmó el excesivo consumo de analgésicos, ya que se sitúan inmediatamente después de los diuréticos.

Por último, y sin referirse específicamente a las PEA, SOLM, A. y MENDEN, B.

(1983) destacaron a modo de ejemplo que el 16% de la población alemana tomaba al menos un medicamento al día, el 10% lo hacía una o más veces a la semana y solo el 57% no lo hacían nunca o casi nunca. Estos datos se confirmaron en nuestro país según una estadística del año 1985, que situó al ASA como el primer fármaco más consumido a continuación del ACAP. Como ya se ha comentado, el ACAP es un analgésico de consumo muy extendido, principalmente en países anglosajones como Estados Unidos y Gran Bretaña (NOYELLE, R.M. y col. 1987). En una encuesta realizada a 895 pacientes de consulta reumatológica revelaron que el 49,7% de los enfermos estaban automedicados y que el principio activo más frecuente era el ASA (QUENEAU, P. y col. 1984).

En la revisión de INSEL, P.A. 1991 se indica que el ASA además de ser el analgésico estándar para la comparación y evaluación de los demás, aún es el más prescrito y se estima que las cantidades consumidas de esta droga en E.E.U.U. son de 10.000 a 20.000 toneladas anuales.

Se ha realizado recientemente un trabajo por MENARD, G. y col. 1993 mediante encuesta en seis oficinas de farmacia de una ciudad francesa y durante un solo día, sobre el consumo de analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos: el estudio se orientó especialmente a la obtención de datos sobre el porcentaje de automedicación, de consejo farmacéutico y de prescripción médica de estos fármacos, sobre el tipo de analgésico consumido, y sobre los grupos de población consumidores de estos compuestos. Los resultados de la encuesta fueron, por un lado, que el porcentaje de prescripción médica era mayor (62,2%) que la automedicación (29,4%) y ésta, mayor que el consejo farmacéutico (8,4%). En cuanto al fármaco más dispensado fue el ACAP, en gran medida por ser el menos caro, seguido del ASA y este último seguido de las asociaciones medicamentosas anticatarrales. En cuanto a la edad del consumidor encontraron que la edad más representada es de 20 a 30 años con un 21,8% del consumo, seguida de 30-40 (16%), seguida de más de 60 años (14,3%), seguida de 0-10 años (13,4%), seguida de 10-20 y de 50-60 años (9,2%) y por último de 40-50 años (5,9%). En cuanto a la distribución por sexos del consumo encontraron que el consumo en las mujeres (66,4%) era mayor que en los hombres (32%).

Otro estudio reciente sobre el consumo de los analgésicos se ha realizado en Noruega por EGGEN, A.E. en 1993, sobre una población de 19137 sujetos, de los que 9864 eran mujeres y 9273 eran hombres. Se les sometió a dos cuestionarios, uno referido a sus hábitos y enfermedades y otro a los fármacos consumidos durante los 14 días que duró la prueba. Se estudió como influía la edad, el sexo, la menstruación, la presencia de enfermedades, los hábitos y distintos factores socioeconómicos sobre el consumo de analgésicos por los individuos. Los resultados obtenidos, en cuanto al consumo de éstos compuestos, que fueron los fármacos más consumidos (54% de la población) durante los 14 días, aproximadamente el 28% de las mujeres y el 13% de los hombres eran consumidores de analgésicos, disminuyendo el consumo en los grupos de menor edad. Durante la menstruación, una elevada proporción de mujeres de 15-24 años utilizan usualmente analgésicos y a partir de los 25 años el uso disminuye con la edad. El mayor descubrimiento de este trabajo es la fuerte asociación entre el consumo de analgésicos y el dolor de cabeza y algo menor con infecciones y dolor de espalda o cuello. Otros factores que están asociados al uso de analgésicos son depresión en las mujeres, insomnio en los hombres, el consumo de café y el nivel de educación, aunque estos últimos con menor significación que los primeros.

Como resumen de este apartado se puede concluir que debido al excesivo consumo de medicamentos de este grupo, es muy alta la posibilidad de interacciones entre nutrientes y fármacos.

2.4.1.3. Interacciones analgésicos-metionina.

2.4.1.3.1. ACIDO ACETILSALICILICO (ASA).

Que conozcamos, no hay apenas estudios que se hayan enfocado al efecto del consumo de ASA sobre la biodisponibilidad de los nutrientes. Por una parte, podríamos indicar una posible interacción entre ASA y metionina pues parece afectar al metabolismo general de los macronutrientes y, entre ellos, la proteína. Y esto es así, pues el fármaco puede interactuar con el catabolismo proteico general, por el papel que el fármaco a dosis altas tiene sobre la función mitocondrial ya que desacopla la fosforilación oxidativa en el músculo esquelético, hígado y riñón compitiendo con el NAD (nicotin-adenin-dinucleótido) (LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987) impidiendo la fosforilación del ADP aún cuando la cadena respiratoria continua su proceso oxidativo (AZANZA, J.R. y CUENA, R. 1986; HAAS, R. y col 1985), como consecuencia la eficiencia de la oxidación de la glucosa, medida como producción de ATP (trifosfato de adenosina), decrece a pesar de que aumentan las unidades de glucosa metabolizadas y el consumo de oxígeno (MIYIHARA, J.T. y KARLER, R. 1965; THURSTON, J.H. y col. 1970; LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987). Al déficit de ATP contribuye también el estímulo de la actividad ATPásica por los salicilatos. Por tanto, también el metabolismo oxidativo de las grasas y el catabolismo de las proteínas y aminoácidos aumentan; a dosis altas, contribuyen a este efecto un aumento de secreción de cortisol por estímulo hipotalámico y aumenta el cortisol libre por desacoplamiento de las proteínas plasmáticas (LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987).

El déficit de ATP puede ser importante con dosis tóxicas de los salicilatos y trae una serie de consecuencias metabólicas: la síntesis de triglicéridos disminuye y puede haber un balance negativo de nitrógeno, no sólo por el aumento de catabolismo proteico sino por que la falta de ATP para la reabsorción activa de aminoácidos en el riñón de lugar a aminoaciduria. Aunque la activación corticosuprarrenal puede contribuir con esto mediante el incremento del catabolismo proteico, el mecanismo de la aminoaciduria producida por los salicilatos se conoce poco (INSEL, P.A. 1991). Las dosis altas de salicilatos pueden provocar en los animales y en el hombre algunas alteraciones evidenciadas por proteinuria, cilindruria y aumento del número de células en el sedimento de la orina: se trata de lesiones degenerativas tubulares, pero que son reversibles y desaparecen espontáneamente (LITTER, M. 1986). El déficit de ATP, al inhibir la síntesis de mucopolisacáridos y mucopéptidos, puede ser responsable de algunas acciones antiinflamatorias, antireumáticas y de fenómenos erosivos en la mucosa gástrica (LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987).

El ASA es uno de los fármacos más utilizados en la práctica pediátrica, por ello MONCKEBERG, F. y col. (1978) estudiaron la cinética de la concentración plasmática de salicilatos en niños menores de 1 año con desnutrición severa (marasmus) en comparación con niños que presentan un estado nutritivo normal. A ambos grupos se les administró intravenosamente 12 mg/Kg peso corporal de ASA. En condiciones normales los salicilatos se unen a la albúmina sérica en un porcentaje muy elevado (GILLETE, J. 1972) y una pequeña fracción queda libre, sin embargo, en los niños desnutridos la concentración de salicilato libre en plasma aumenta significativamente a la vez que la eliminación constante de la misma es mucho menor en los niños desnutridos que en los normales. Esto tiene una enorme importancia porque cuando se utilizan los salicilatos como antipiréticos la dosis se prescribe solamente de acuerdo con los cambios de temperatura. Resultados similares han obtenido recientemente ASHTON, M. y col. (1993).

Otro posible mecanismo de interacción del ASA es con el metabolismo de la metionina

se explica a través de los trabajos realizados sobre el efecto del consumo del fármaco sobre los folatos ya que, como ya explicamos en el apartado 2.2.1.1., el metabolismo de ambas moléculas están muy interrelacionados.

El estudio de LAWRENCE, V.A. y col. (1984) ha servido de apoyo a las observaciones previas hechas por ALTER, H.J. y col. 1971 sobre la depleción de folato inducida por la administración de ASA. Se demostró en una mujer sana que presentaba niveles séricos más bajos, tanto de fólico libre como conjugado, durante el tiempo en el que estaba tomando dosis terapéuticas de ASA que antes o después de este período. Se controló la ingesta de ácido fólico en su dieta y se vio que era similar en todo el período de investigación. El mecanismo por el cual el ASA desplazó al folato podría ser mediante acetilación de la albúmina plasmática según (LAWRENCE, V.A. y col. 1984), disminuyendo así la fijación proteica de los folatos (FERRY, M. y FOGLIETTI, M.J. 1992). En 1984, SHEVCHUK, O.A. y ROE, D.A. realizaron un estudio sobre la excreción de folato durante un tratamiento con ASA: la eliminación urinaria de folato no aumentó durante el período de administración de la droga, aunque si se encontró una alteración en la concentración y unión de folato plasmático (SHEVCHUK, O.A. y ROE, D.A. 1985). Los autores sugieren que el efecto del ASA puede ser un dato importante como explicación para los bajos valores de folato encontrados en ciertos grupos de pacientes, incluyendo las PEA, y como un problema en caso de pacientes en los que simultáneamente a la administración de ASA presentan una alteración y/o una ingesta inadecuada de folato y, por tanto, su estatus en folato ya estaría previamente comprometido (ROE, D.A. 1985).

Si la administración de ASA se hace de forma discontinua la disminución de la concentración de folato sérico es rápidamente invertida según LAWRENCE, V.A. y col. (1984), pero ALTER, H.J. y col. (1971) indican que un consumo crónico de ASA y otros salicilatos puede ejercer un efecto antagonista sobre el estatus de folato bien, por retrasar la absorción (ZIMMERMAN, J. y col. 1985) o bien, por incrementar la excreción. Los niveles bajos de folato que se encuentran de forma crónica en pacientes con artritis reumatoide, podrían explicarse en parte por el uso de ASA (ALTER, H.J. y col. 1971). Otros autores sin embargo, indican que la administración crónica de ASA no reduce la biodisponibilidad de mono o poliglutamilfolato en ratas (HOPNER, K. y LAMPI, B. 1986). El suplemento recomendado, por algunos autores, en caso de administración terapéutica de ASA es de 0,4-1,0 mg/día (GARABEDIAN-RUFFALO, S.M. y RUFFALO, R.L. 1986).

Un trabajo realizado por INOUE, F. y WALSH, R.J. en 1983, trató de estudiar la posible interacción entre fenitoína y salicilato cuando se administra un suplemento de folato. El nivel de fenitoína total del suero disminuía inicialmente por la adición de ASA. Posteriormente, después de 4 meses de tratamiento con combinación de ASA-fenitoína, aumentan los niveles séricos de fenitoína y la deficiencia sérica de folato. La disminución del nivel del folato sérico atribuido al incremento de los requerimientos de folato por el metabolismo de la fenitoína, la cual es desplazada de sus sitios de unión por el ASA.

Todas estas informaciones han dado lugar a la reciente realización de estudios sobre los posibles efectos de los analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos sobre los enzimas dependientes del folato. Las primeras informaciones al respecto las aportaron HA, T. y col. en 1990 y, posteriormente BAGGOTT, J.E. y col. en 1992 realizaron un trabajo en el que se investigaba el efecto de los analgésicos más importantes sobre la dihidrofolato reductasa y la fosforibosil-aminoimidazol-carboxamida formiltransferasa (AICAR transformilasa). En cuanto al ASA los resultados obtenidos sobre su actividad inhibidora enzimática fueron que se mostraba activa sobre la AICAR transformilasa e inactiva sobre la dihidrofolato reductasa.

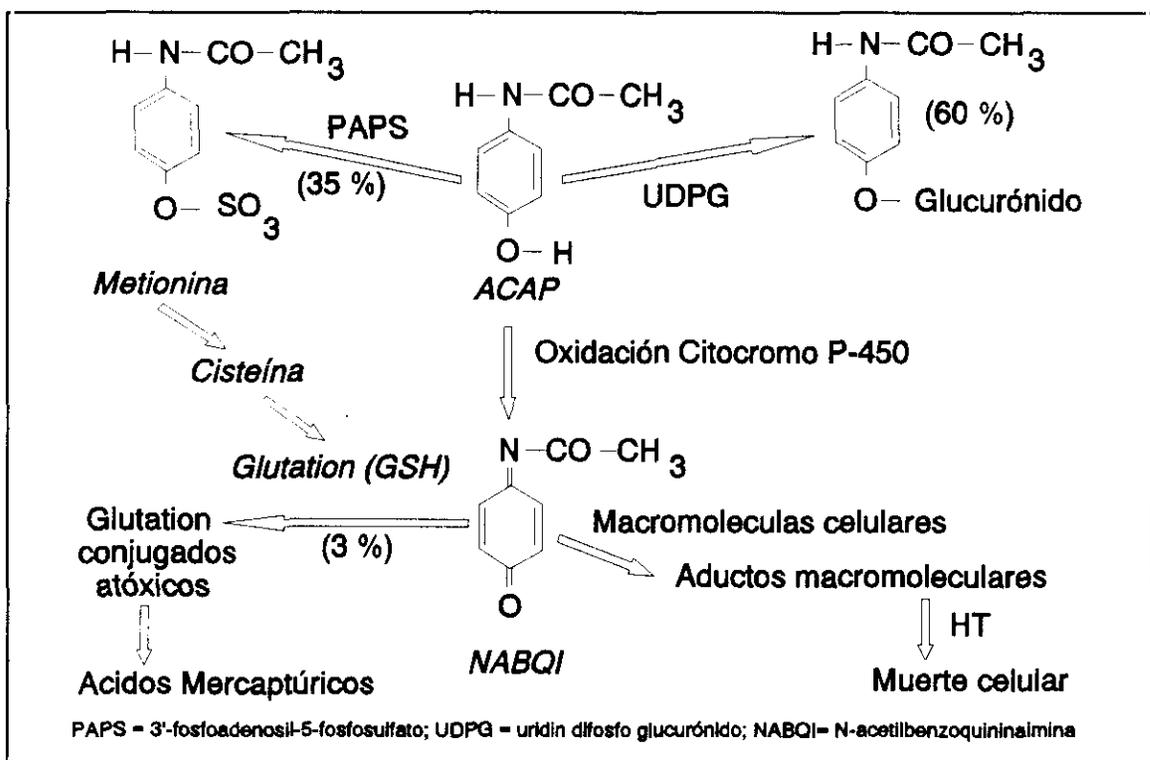
2.4.1.3.2. ACETAMINOFENO (ACAP).

El mecanismo de interacción entre el ACAP y la metionina se basa en el metabolismo del fármaco y la hepatotoxicidad que produce:

* Metabolismo y hepatotoxicidad (HT) del ACAP.

El ACAP se metaboliza en un 95% en el hígado siguiendo tres vías metabólicas principales indicadas en la Figura 9. La vida media de eliminación es de 2 a 2,5 horas que aumenta en casos de marcada insuficiencia hepática (HATHCOCK, J.N. 1990).

Figura 9. Vías de metabolización del ACAP en el hígado.



Estos son los metabolitos obtenidos en orina en porcentajes para dosis terapéuticas y en el hombre (INSEL, P.A. 1991), aunque existe cierta variabilidad (HOUSTON, J.B. y LEVY, G. 1976; HUEI, J. y LEVY, G. 1981).

En la reciente revisión bibliográfica realizada por HATHCOCK, J.N. (1990) se indican las rutas metabólicas del ACAP; dos de estas vías metabólicas son fases directas de conjugación y dan lugar a los principales metabolitos que son conjugados de sulfato y ácido glucurónico (JOLLOW, D.J. y col. 1974) y que se eliminan finalmente por orina. Menos del 5% se elimina como ACAP sin metabolizar. Una pequeña fracción (4-5%), sufre una tercera vía de metabolización (JOLLOW, D.J. y col. 1974; DAVIS, D.C. y col. 1974) y, utilizando el sistema de oxidasas mixtas y citocromo P-450, se origina un metabolito altamente reactivo arilante, la N-acetilbenzoquinonaimina (NABQI) (CORCORAN, G.B. y col. 1980). Finalmente la NABQI es atrapada e inactivada con glutatión eliminándose como conjugado con cisteína y ácido mercaptúrico (MINER, D.J. y KISSINJER, P.T. 1979). Cuando la

NABQI, no conjugada se forma en cantidades suficientes como para agotar el glutatión (MITCHELL, J.R. y col. 1973) hepático reacciona con grupos sulfhidrilos de macromoléculas proteicas produciendo necrosis hepática (BARTOLONE, J.B. y col. 1987; LUPO, S. y col. 1987) y dando lugar a la HT característica del ACAP. Esto es debido a que este producto como compuesto electrofílico tiene capacidad de unión a moléculas nucleofílicas (MINER, D.J. y KISSINJER, P.T. 1979). Durante la síntesis de los compuestos electrofílicos se generan radicales orgánicos, es decir con uno o más electrones desapareados. Así, en el metabolismo del ACAP a NABQI podría estar envuelto la formación de un radical fenoxilo que sufriría una oxidación a NABQI (SMITH, C.V. y MITCHELL, J.R. 1989). Además cuando la depleción de glutatión alcanza un nivel umbral la peroxidación lipídica que se desarrolla contribuye como mecanismo adicional a la alteración celular (COMPORTI, M. 1987).

A dosis terapéuticas, el ACAP en el ratón se metaboliza en: 45% ACAP-sulfato, 35% ACAP-glucurónido, 4% ácido mercaptúrico y 12% de ACAP libre (JOLOW, D.J. y col. 1974 y GALINSKY, R.E. y LEVY, G. 1981).

La producción metabólica y la excreción de sulfato disminuye en ratas en ayuno (MULDER, G.J. y col. 1982) y con deficiencia de proteína (KRIJGSHELD, K.R. y col. 1981b) y en humanos con anorexia nerviosa y con kwashiorkor. Una administración aguda de ACAP en ratas produce un depleción temporal de sulfato endógeno (KRIJGSHELD, K.R. y col. 1979; MORRIS, M.E. y LEVY, G. 1983), pero una administración prolongada no disminuye los niveles plasmáticos de este compuesto (REICKS, M. y col. 1988), lo que sugiere que una administración prolongada de ACAP incrementa el valor de la producción de sulfato.

La alteración molecular ocasionada por la NABQI y la fisiopatología atribuible a la reacción química aún no ha sido identificada (SMITH, C.V. y MITCHELL, J.R. 1989). Por ello, son numerosos los estudios que se han realizado para elucidar el mecanismo toxicológico del ACAP. La hipótesis de la unión de la NABQ a macromoléculas hepáticas surgió al comprobar que cuando se provocaba una HT por dosis masivas del fármaco en ratones o cobayas "Syriam", no había una correlación directa entre los niveles de ACAP en tejidos y el grado de lesión hepática (MITCHELL, M.C. y col. 1981; LUPO, S. y col. 1987). Además, al estudiar los efectos del tratamiento con inductores enzimáticos y con inhibidores del metabolismo microsomal hepático, se observó que el grado de necrosis hepática era mayor en los animales que eran previamente tratados con un inductor metabólico, y menor en aquellos que habían recibido un inhibidor. Estas observaciones dieron lugar a la hipótesis de que el agente tóxico no era el ACAP, sino un producto de su transformación metabólica. Al administrar ACAP marcado radioactivamente a animales normales y a animales previamente tratados con inductores o inhibidores enzimáticos se encontró, después de analizar muestras de hígado y músculo, que se producía una fijación covalente de un derivado del ACAP a macromoléculas del hígado, mientras que tal fijación no se daba en el músculo esquelético, donde no había transformación metabólica del fármaco (JOLLOW, D.J. y col., 1973; MITCHELL, M.C. y JOLLOW, D.J. 1975). JOLLOW, D.J. y col. en 1973, demostraron que la fijación covalente del metabolito del ACAP a las proteínas hepáticas no tiene significación hasta que la concentración del fármaco inmodificado en el hígado disminuye en más de un 50%.

Se han estudiado los posibles mecanismos de actuación para la toxicidad del ACAP con los análogos 3,5-dimetilACAP y 2,6-dimetilACAP, en hepatocitos aislados de ratas. Se encontró que el ACAP es el más citotóxico de los tres y que todos ellos producían un

descenso en las concentraciones de glutatión celular. Los resultados indican que los tres compuestos análogos causan sus efectos citotóxicos por mecanismos diferentes, aunque la toxicidad parece estar mediada en todos los casos por sus productos de oxidación, las quinoniminas (PORUBEK, D.J. y col. 1987).

Los datos existentes sobre la formación de la NABQI constituyen la teoría de la unión covalente y la consecuente muerte celular, pero se han llegado a proponer mecanismos alternativos para la HT. En cuanto al citocromo P-450, un estudio indica que la HT del ACAP no va a depender únicamente de la oxidación mediada por el citocromo P-450 sino que también depende de la actividad de la cicloxigenasa hepática (BEN-ZVI, Z. y col. 1990). Otros autores nos explican, que la HT producida por la degradación del ACAP puede determinarse en parte por los niveles relativos de los diferentes enzimas del sistema P-450 (KALHORN, T.F. y col. 1990).

Otro aspecto, al que han prestado buena atención diferentes grupos de investigación, ha sido la inhibición en la rata de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-asa}$ durante la HT por ACAP, confirmando que su actividad en la membranas plasmáticas disminuye aproximadamente un 52% dentro de las 3 horas posteriores al tratamiento con 850 mg/Kg de ACAP (CORCORAN, G.B. y col. 1987b). Otros indican que la HT del ACAP resulta de la alteración de la función mitocondrial, la cual precede a la pérdida de integridad de la membrana plasmática (BURCHAM, P.C. y HARMAN, A.W. 1990).

Hace algunos años se descubrió el papel del calcio en la muerte celular a nivel del hígado. Así, SCHANNE, F.A.X. y col. (1979) comprobaron que la letalidad de numerosos tóxicos añadidos a cultivos de hepatocitos dependía de la concentración de calcio en el medio. Se ha postulado que la mayoría de los hepatotóxicos actúan alterando el funcionamiento de la membrana celular y permitiendo la entrada masiva de calcio, el cual va a tener un efecto letal. De hecho, algunos autores opinan que precisamente esta alteración en la regulación del calcio y el incremento intracelular del mismo es el mecanismo por el cual el ACAP causa lesión y muerte hepatocelular (CORCORAN, G.B. y col. 1988 y BOOBIS, A.R. y col. 1990). Sin embargo, GREWAL, K.K. y RACZ, W.J. (1993) opinaron que las alteraciones en la homeostasis del calcio citosólico producidas por el ACAP no son la principal causa del proceso hepatotóxico.

También se han realizado trabajos *in vitro* con cultivo de hepatocitos de ratón en el que el ACAP produce pérdida de la regulación iónica, acumulación de Ca^{2+} en el núcleo y fragmentación de ADN (SHEN, W. y col. 1992), este último efecto no fue significativo en el experimento de MILLER, R. y col. (1993) que se realizó con cultivo de hepatocitos de trucha y en el que se produjeron efectos como la disminución de proteína y ADN celular a la vez que aumentaba la actividad de la lactato deshidrogenasa celular, con el aumento de la concentración de ACAP en el medio. También se observó una abundante vacuolización citoplásmica, reducción de glucógeno y agregación perinuclear de mitocondrias en un medio con ACAP.

En el uso normal, el ACAP no es hepatotóxico, pero en casos de sobredosificación en el adulto, puede producir necrosis hepática tras la ingestión de una dosis de 10-15 g, mientras que 25 g ó más son potencialmente fatales (INSEL, P.A. 1991).

De este modo, en Estados Unidos sobre todo, se utiliza como preparado de elección para fines suicidas, al no ser necesaria prescripción médica para su dispensación. En Inglaterra y Gales el número de muertes por intoxicación con ACAP van aumentando

constantemente desde los primeros casos de HT fulminante ya relatados en 1966 (DAVIDSON, D.G.D. y EASTHMAN, W.N. 1966 y MEREDITH, T.J. y VALE, J.A. 1984). Sólo en 1984, se diagnosticaron 176 muertes por intoxicación con ACAP. Los adultos son los que presentan los casos más graves y fulminantes mientras que los niños raramente toman ACAP suficiente para provocar el cuadro de mortalidad (MEREDITH, T.J. y col. 1986).

El mismo día después de la toma de una dosis hepatotóxica de ACAP pueden aparecer algunos síntomas leves como náuseas, vómitos, diarrea, etc, de modo que, en este período, los síntomas no reflejan la gravedad potencial del envenenamiento. A las 12-24 horas de la ingestión empiezan a ser anormales las pruebas de función hepática, aumentando espectacularmente las aminotransferasas (aspartato y alanina) y la deshidrogenasa láctica; se prolonga el tiempo de protrombina y también aumenta la bilirrubina plasmática (FLOREZ, J. 1987a; INSEL, P.A. 1991). El cuadro cambia a las 24-48 horas, que es cuando comienzan a apreciarse signos de afección hepática, en este punto la recuperación normalmente es rápida y completa. La intensidad de la alteración hepática crece en los días siguientes a la vez que se incrementa la ictericia y la encefalopatía desarrollada al tercer y cuarto día. Se puede desarrollar una alteración renal, acidosis metabólica e hiperlactacidemia junto a la lesión hepática. Sin un tratamiento rápido al cabo de varios días dos tercios de los pacientes con una concentración plasmática de ACAP por encima de la concentración límite pueden morir por encefalopatía y lesión hepática severa (MEREDITH, T.J. y col. 1986). El diagnóstico temprano es vital en el tratamiento de la sobredosis de ACAP y se dispone de métodos para la rápida determinación de concentraciones plasmáticas de la droga, pero el tratamiento no debe demorarse hasta la obtención de los resultados del laboratorio. En los casos no fatales las lesiones hepáticas son reversibles en un período de semanas o meses (INSEL, P.A. 1991).

Un estudio realizado por PLACKE, M.E. y col. en 1987 nos define histológicamente el proceso hepatotóxico producido después de una ingesta de 600 mg/Kg de peso de ACAP en ratón: Durante las dos primeras horas aparece citomegalia y rápida progresión a necrosis. Ultraestructuralmente aparece vesiculación, vacuolización, y degeneración de la membrana mitocondrial y plasmática, culminándose el proceso a las cuatro horas con la muerte celular, las células quedan esparcidas y a las ocho horas se produce la necrosis centrilobular en gran extensión. Se cree que el retículo endoplásmico es el punto de activación y de ataque inicial del ACAP y, por ello, se piensa que estos orgánulos juegan un papel crítico en la HT producida por el ACAP.

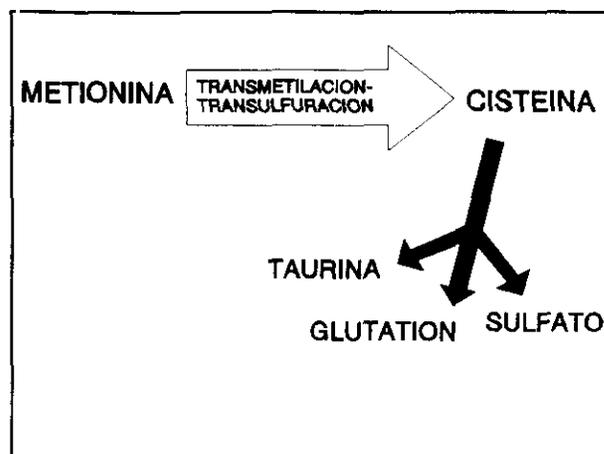
*** Papel de la metionina y su metabolismo en la HT del ACAP**

En este punto es preciso recordar la Figura 2. (pág.), en ella se muestra la ruta metabólica de transmetilación-transulfuración de la metionina de forma esquemática; en ella, a partir de la metionina, dietética o endógena, se sintetiza la S-adenosilmetionina (SAM) y posteriormente cisteína que, según el esquema indicado en la Figura 6. (pág.), permitirá la síntesis de glutatión. Son estas tres biomoléculas, metionina, SAM y glutatión, los puntos claves en el metabolismo y la HT del ACAP.

Muchas son las reacciones de conjugación en el metabolismo de compuestos endógenos y de fármacos, como el ACAP que requieren sulfocofactores tales como sulfato activo (PAPS: 3'-fosfo-adenosil-5-fosfosulfato), glutatión y taurina (GLAZENBURG, E.J. y col. 1983), por tanto, la metionina sirve como precursor de estos cofactores, ya que se convierte vía transulfuración, por medio de la cistationina, a cisteína que presenta un papel

central de metabolismo de fármacos (GREENBERG, D.M. 1975; SINGER, T.P. 1975).

El efecto tóxico del ACAP se produce probablemente, como ya se ha indicado anteriormente, por la activación del citocromo P-450, seguramente hacia el reactivo intermediario N-acetilbenzoquinonaimina (JOLLOW, D.J. y col. 1973; WONG, L.T. y col. 1981; POTTER, W.Z. y col. 1974). Dicho metabolito intermedio tóxico puede ser detoxificado a través de la unión con glutatión reducido. El glutatión conjugado es posteriormente excretado en la bilis o también en orina, principalmente como ácido mercaptúrico (Figura. 7, pág.). Un descenso en el nivel de glutatión conduce a la unión del metabolito intermedio reactivo a macromoléculas celulares, siendo esta unión probablemente responsable del efecto tóxico producido por el fármaco.



Se ha postulado que, dado que lo que caracterizaba al metabolito intermedio era su extrema reactividad, parecía lógico pensar que el derivado formado sufría una conjugación inmediata con algún producto endógeno, el cual ejercería una especie de función "tampón" y que sólo al consumirse la totalidad de éste, el metabolito reaccionaría con las proteínas del entorno. Se pensó que el "tampón" ideal sería el glutatión contenido en el hepatocito, confirmando esto al descubrirse una notable correlación inversa entre el nivel de glutatión en hígado y el grado de fijación covalente en las proteínas hepáticas tras la administración del producto (POTTER, W.Z. y col. 1974). Se concluye en este trabajo que sólo se llega a producir fijación covalente cuando la dosis del fármaco es lo suficientemente elevada como para agotar el glutatión disponible. Se considera que el glutatión es el más importante detoxificador de elevadas dosis de ACAP (MEISTER, A. 1989b) y la HT producida por el ACAP va a depender del balance entre la tasa de formación de la reacción del metabolito tóxico y la biodisponibilidad del glutatión y, por tanto, de su tasa de síntesis (CASTELL, J.V. y col. 1990).

Aún así, algunos autores sugieren, que esta unión covalente es insuficiente por sí misma para inducir la toxicidad celular provocada por el ACAP (MEREDITH, T.J. y col. 1986).

El efecto protector del glutatión según GALIANA, A. (1987) se debería a:

- Su capacidad para conjugarse con algunos fármacos o sus metabolitos y dar los respectivos ácidos mercaptúricos.
- Su capacidad para hacer reversible la inhibición SH de ciertos enzimas, ya que ciertos fármacos se fijan a dichos grupos bloqueando su actividad.
- Su efecto protector de la integridad de la membrana eliminando hidroperóxidos lipídicos u otros peróxidos originados en el metabolismo de algunos fármacos.
- Protección de los ataques electrófilos de los metabolitos alquilantes de algunos fármacos a algunos lugares nucleófilos de los hepatocitos.

En cuanto a la SAM, se sabe que en algunas patologías hepáticas la actividad

enzimática de la SAM-sintetasa, encargada de sintetizar SAM a partir de metionina y ATP, se encuentra reducida (MARTIN DUZE, A. y col. 1988) y que en gran número de trastornos hepáticos se produce una reducción de la concentración de SAM (PASCALE, R. y col. 1984). Además, algunos trabajos han mostrado que existe una correlación directa entre una reducción de la concentración de glutatión (GSH) hepático y una inhibición de la SAM sintetasa y, por tanto, de los niveles de SAM, en el hígado de rata (CORRALES, F. y col. 1991). Por tanto, se puede decir que la SAM puede actuar promoviendo las reacciones de la vía de transulfuración y consecuentemente aumenta la capacidad de detoxificación de este sistema metabólico (ALMASIO, P. y col. 1990), aunque, el mecanismo de acción preciso de la SAM en cada uno de estas alteraciones hepáticas no se conoce por el momento (CUTRIN, C. y col. 1991).

*** Prevención y tratamiento nutricional de la HT.**

Ante la posibilidad de que se produzcan suicidios por intoxicación con ACAP (ANKER, A. y SMILKSTEIN, M.J. 1993), se han realizado trabajos encaminados a la prevención y tratamiento de los mismos.

El conocimiento del papel del glutatión como hepatoprotector en la intoxicación por ACAP ha llevado a ensayar las posibilidades de utilizar precursores del glutatión así como de otros donadores del grupo SH, ya que el glutatión exógeno no es capaz de penetrar en el interior del hepatocito. La administración de **aminoácidos o dipéptidos** que sean buenos substratos para la transpeptidación por la gamma-glutamil transferasa incrementa el turnover hepático de glutatión (LAUTENBURG, B.H. y SMITH, C.V. 1986). Así, los primeros estudios publicados por PRESCOTT, L.F. y col., en 1974, se centraron en la posibilidad de emplear cisteamina por vía intravenosa. Este producto inhibe la conversión de ACAP a N-acetilbenzoquinonaimina (HARVEY, F. y GOULDING, R. 1974) y estimula la síntesis de glutatión (REVESZ, L. y MODIG, H. 1965). El problema de este compuesto es que puede ocasionar efectos adversos tales como anorexia, náuseas, vómitos, etc.

En la actualidad, debido a su efectividad y tolerancia, es la **N-acetilcisteína** el preparado de elección (MEISTER, A. 1989b; INSEL, P.A. 1991; ANKER, A. y SMILKSTEIN, M.J. 1993). Este producto se puede emplear por vía oral, aunque la mayoría de los autores recomiendan acudir a la vía intravenosa (BANDA, P.W. y QUART, B.D. 1987; WONG, B.K. y CORCORAN, G.B. 1987) pues por vía oral aparecen frecuentemente vómitos. Al igual que sucede con otros protectores, la eficacia del tratamiento con N-acetilcisteína depende del momento de su administración. Si se inicia dentro de las primeras 8-10 horas después de ingerir el producto, la protección es virtualmente completa, pero su efectividad disminuye a partir de ese momento, de tal modo que el efecto beneficioso no se mantiene cuando han transcurrido más de 15 horas desde la ingestión del ACAP (PRESCOTT, L.F. y col. 1979; BANDA, P.W. y QUART, B.D. 1987; CORCORAN, G.B. y WONG, B.D. 1986; INSEL, P.A. 1991; ANKER, A. y SMILKSTEIN, M.J. 1993). Como hemos indicado la vía intravenosa es la vía preferente, aunque algunos pacientes han desarrollado una serie de procesos como son sarpullido, angioedema, hipotensión y broncoespasmo (BATEMAN, D.N. y col. 1984 y MANT, T.G.K. y col. 1984). La unión covalente del ACAP representa una lesión bioquímica capaz de romper la homeostasis del calcio y producir la muerte celular. La N-acetil-cisteína bloquea la acumulación del calcio eliminando así la alteración hepática producida por el ACAP (CORCORAN, G.B. y col. 1987a).

Junto a la N-acetilcisteína existe otro tratamiento alternativo que es la administración

de **metionina**. La prevención de la HT se puede conseguir mediante la administración de comprimidos que contengan simultáneamente ACAP y pequeñas cantidades de metionina (SKOGLUND, L.A. y col. 1986; VIÑA, J. y col. 1986). Por ejemplo, en Gran Bretaña, ya se ha realizado la comercialización de la asociación 500 mg de ACAP y 250 mg de metionina, lo cual ha despertado detractores entre otras causas por el elevado costo. La metionina reduce la depleción de glutatión después de una dosis tóxica de ACAP y actúa manteniendo la síntesis de glutatión (MOLDEUS, P. 1981). Este aminoácido, reduce la frecuencia y la gravedad de la HT inducida por el ACAP (CROME, P. y col. 1976) y es tan efectivo como la N-acetil-cisteína (VALE, J.A. y col. 1981). Además, es más barata y puede administrarse por vía oral. El principal inconveniente que presenta es que su eficacia puede verse reducida por la producción de vómitos en determinados pacientes. Del mismo modo que la anterior, debe administrarse antes de pasadas 15 horas después de la sobredosis (MEREDITH, T.J. y col. 1986).

Además de N-acetil-cisteína y de la metionina, en los últimos años también se está estudiando el efecto protector de la **SAM** frente al efecto hepatotóxico del ACAP, cuya posible utilidad en hepatopatías crónicas fue sugerida por SZANTAY, y col. en 1971 los cuales demostraron que enfermos de cirrosis hepática presentaban una reducción de los niveles de taurina, sulfatos y de aminoácidos sulfurados, lo que prueba que en estas condiciones patológicas, existe una reducción de las reacciones de transmetilación (GALIANA, A. 1987). La SAM se encuentra a la venta en el mercado farmacéutico, ya que se ha demostrado la acción hepatoprotectora de la SAM frente a lesiones producidas mediante agentes hepatotóxicos, ACAP (STRAMENTINOLI, G. y col. 1987; BRAY, G.P. y col. 1992), tetracloruro de carbono, etanol (CUTRIN, C. y col. 1991; CUTRIN, C. y col. 1992) y frente a trastornos hepáticos como cirrosis (MURIEL, P. 1993), colestasis (ALMASIO, P. y col. 1990).

STRAMENTINOLI, G. y col. (1987), basados en este efecto, muestran que la administración de SAM en ratones es capaz de reducir la mortalidad inducida por elevadas dosis de ACAP desde un 43% a un 7 u 8% dependiendo de que la dosis de SAM administrada sea 10 ó 20 mg/Kg, valores inferiores a los obtenidos cuando se administra la misma dosis de ACAP junto con 7,5 mg/Kg de metionina (16,7%). Este efecto se debe a la disminución de la alteración hepática ya que los hígados de los ratones aparecieron, según pruebas histológicas, marcadamente protegidos cuando se les administró SAM. Los autores concluyen que posiblemente la protección de la SAM dependa de la acción directa de la droga sobre las macromoléculas microsomales previniendo así la unión del derivado tóxico y por lo tanto, que la protección se refiere a la ruta de transmetilación-transulfuración mediante derivados tiólicos capaces de favorecer la eliminación de el agente tóxico formado.

En este sentido, también se han realizado trabajos (PONSODA, X. y col. 1991) con cultivos de hepatocitos humanos orientados a estudiar por una parte, el efecto de la concentración de SAM en el medio sobre los niveles de glutatión, y por otra, este mismo efecto pero en presencia de ACAP. Así, se observó un incremento dosis-dependiente del contenido de glutatión intracelular a medida que aumenta la concentración de SAM en el medio, y además, si los hepatocitos se incuban con SAM y metionina simultáneamente aparece un efecto aditivo sobre el nivel de glutatión intracelular. Por otra parte, si los hepatocitos se incuban con ACAP en dos medios con y sin SAM, los incubados con SAM mantienen niveles de glutatión más altos que los que no tienen SAM, por tanto, los autores concluyen que la SAM previene la depleción de glutatión inducida por el ACAP.

Por todo esto, BRAY, G.P. y col. (1992) proponen que la SAM podría ser una

alternativa efectiva en los casos en que la N-acetil-cisteína o la metionina no sean bien toleradas pues ambos presentan importantes efectos colaterales negativos. Estos autores continúan en esta línea de investigación estudiando la protección de la SAM en dos especies de ratones frente a la HT del ACAP obteniéndose los siguientes resultados, la administración simultánea de ACAP y SAM reduce la mortalidad de los ratones y disminuye la depleción de glutatión respecto a ratones a los que se les administra solo ACAP, por tanto, el SAM reduce la HT del ACAP con tal que se administre en las 5 horas después de la ingestión de ACAP.

* Factores nutricionales que influyen en la HT

Ingesta de una dieta deficiente en metionina: Un amplio estudio sobre el tema que nos ocupa se ha realizado recientemente por PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. en 1989 en el cual se obtuvieron numerosos datos. En este trabajo se estudiaron los efectos de una ingesta con varios niveles de metionina sobre diversos parámetros y su relación con el metabolismo del ACAP y su toxicidad.

La ingesta de metionina y cisteína es fundamental para metabolizar el ACAP. Los procesos de detoxificación de sustancias ajenas al organismo en los que intervienen sulfoaminoácidos incluyen también la conjugación con cisteína, metalotioneína y síntesis de enzimas y de otras proteínas incluidas en estos procesos y en las oxidasas de función mixta que catalizan la activación del ACAP (REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1988a, 1988b; PARKE, D.V. y IOANNIDES, C. 1981).

Con una dieta deficiente en sulfoaminoácidos disminuye la síntesis de 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato y de glutatión en el hígado, y por tanto, disminuye el aclaramiento de los metabolitos conjugados correspondientes del ACAP (WOODCOCK, B.G. y WOOD, G.C. 1971; KRIJGSHELD, K.R. y col. 1981b) de modo, que el contenido de metionina en la dieta es directamente proporcional al contenido de glutatión hepático (PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. 1989; GLAZENBURG, E.J. y col. 1983). PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. en 1989 nos indican que animales con dieta sulfo deficiente, bajas dosis de ACAP metabolizan la droga más lentamente debido a una marcada reducción en la capacidad de sulfatación y demostraron mediante estudios histológicos que a medida que disminuye el contenido de metionina en la dieta con la que se alimenta a los animales, aumenta la incidencia en los mismos a la lesión y necrosis hepática. Por tanto, en ausencia del aminoácido hay una relación lineal entre la muerte de animales de experimentación y la dosis de ACAP administrada (GALIANA, A. 1987).

Independientemente del incremento del efecto hepatotóxico inducido por una disminución del porcentaje de metionina en la dieta, GLAZENBURG, E.J. y col. en 1983 demostraron que el metabolismo de una elevada dosis de ACAP en ratas está sorprendentemente poco afectada con la administración de una dieta con un contenido constante o muy bajo de metionina y cisteína.

Todas estas observaciones indican la posibilidad de que un estado nutricional deficiente en cuanto a sulfoaminoácidos se refiere, el cual se puede dar en malnutrición proteica, puede aumentar la susceptibilidad a la lesión hepática por ACAP en humanos (PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. 1989).

Por otro lado, como hemos indicado en la Figura 2. la vía metabólica de

transulfuración es un ciclo bioquímico en el que intervienen SAM, S-adenosilhomocisteína (SAH) y ácido fólico, y que es el punto clave de síntesis de moléculas sulfuradas requeridas para la disposición de ACAP. Una deficiencia dietética de metionina provocaría una demanda de cisteína para la sulfatación y la biosíntesis de glutatión que puede afectar a la transulfuración y por tanto a la concentración de SAM según nos indica REICKS, M.M. y col. (1992). En este sentido en 1992 REICKS, M.M. y col. realizaron un estudio con ratones alimentados con dieta completa (0,5%) y deficiente (0,25%) de metionina y a los que se les administró un 0,0% y 0,5% de ACAP. Los resultados obtenidos fueron, en cuanto al crecimiento un reducción significativa del lote con ACAP y alimentado con 0,25% de metionina, en cuanto a la actividad enzimática, un aumento significativo de la glutatión peroxidasa y de la superóxido dismutasa con el aumento de metionina ingerida y un aumento también de la glutatión S-transferasa con la ingestión de ACAP por la formación del metabolito tóxico formado que se va a conjugar con el glutatión. La concentración de SAM hepática no aumentó con el tratamiento dietético ni con la administración del fármaco pero si aumenta la concentración de SAH y disminuye la relación SAM:SAH cuando se administra ACAP del lote alimentado con 0,5% de metionina respecto al que consumió 0,25% y estas modificaciones se deben como ya hemos indicado a la pronunciada conversión de metionina a cisteína.

La composición de la dieta y distintos nutrientes también pueden influir en el metabolismo del ACAP. En este sentido, MARTINELLI, A.L. y col. 1989 observaron que la ingestión de una dieta compuesta exclusivamente con sacarosa protege a los animales de los efectos hepatotóxicos del ACAP independientemente de la vía de administración de la droga.

En el trabajo de PETERSON, F.J. y KNOPELL, R.G. (1984) se estudia la posible acción del ácido ascórbico como protector frente a la lesión hepática en ratones. La administración de la vitamina en dosis de 1 g/Kg peso una hora antes y después del tratamiento con ACAP disminuye el daño hepatocelular, sin embargo, la vitamina E potencia la HT del ACAP. Una deficiencia en selenio inhibe la necrosis hepática producida por este fármaco debido al incremento de la metabolización del ACAP por la GSH-S-transferasa que provoca la deficiencia (FLOHÉ, L. 1989). Del trabajo realizado por RAHEJA, K.L. y col. en 1983, en el que se estudió el efecto de una deficiencia dietética de riboflavina en ratas sobre la toxicidad del ACAP, mediante distintos parámetros y determinaciones nutricionales, plasmáticas e histológicas, se concluye que la deficiencia dietética de riboflavina en las ratas protege de la HT provocada por el ACAP, pero el grado de protección depende también del estado nutricional general del animal. PETERSON, F.J. y col. (1992) en su estudio sobre los efectos de una dieta deficiente en selenio y vitamina E, observaron que la deficiencia de ambos nutrientes en ratones, incrementa la mortalidad a la que da lugar el ACAP independientemente del status de glutatión hepático.

Un factor que puede estimular la toxicidad inducida por el ACAP a través de los enzimas hepáticos microsomales encargados de la metabolización de los fármacos es el etanol (PETERSON, F.J. y col. 1980). REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. (1984) estudian los efectos de la metionina de la dieta y el etanol sobre la HT por el ACAP en ratones. En el experimento, se demuestra que una deficiencia de metionina da lugar a una disminución en los niveles de GSH, lo que va a predisponer al ratón a aumentar la HT, complementándose dicho efecto con el del etanol.

MEHTA, S. y col. en 1982 realizaron un estudio sobre la farmacocinética del ACAP en niños con malnutrición proteico-calórica y se observó una disminución de la tasa constante

de eliminación y una prolongación de la vida media plasmática del fármaco. Según indica el mismo autor, estos niños malnutridos tienen comprometida la capacidad de biotransformación de drogas incluso es concebible que las rutas normales de transformación se saturan con menores niveles plasmáticos y por tanto, este aspecto del metabolismo del ACAP debe estudiarse minuciosamente y observar la posible influencia sobre la toxicidad del ACAP.

* **Efecto del ACAP sobre la biodisponibilidad de proteína y la metionina.**

En diferentes estudios (VARELA MOREIRAS, G. y col. 1990a, 1991a) se encontró en ratas, que el ACAP no afecta a la utilización digestiva de la proteína pues no se observó que afectase al coeficiente de digestibilidad del nitrógeno. En el trabajo de VARELA MOREIRAS, G. (1991a) también se estudió el efecto de la administración crónica de ACAP en ratas sobre la utilización metabólica de la proteína de la dieta. Los resultados mostraron que había un descenso significativo en esta utilización metabólica del nitrógeno comparando ratas tratadas con ratas control. El trabajo se realizó administrando dos tipos de dieta una deficiente en proteína (5% caseína) y otra completa (12% caseína), en los lotes a los que se les suministró una dieta deficiente junto con el fármaco se vio que disminuía también la utilización metabólica del nitrógeno en los dos balances metabólicos estudiados (días 4-11 y 36-42). Esto puede ser debido a distintos procesos con los que está asociado el tratamiento crónico con ACAP. Por una parte, una administración prolongada de ACAP produce una disminución de la excreción de creatinina (REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1989), y por otra, se produce un incremento de los requerimientos de sulfoaminoácidos para el metabolismo del ACAP. En el experimento llevado a cabo por PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. (1989) que como ya hemos dicho se trataron a distintos lotes de ratas con ACAP y se les administraron distintos niveles de metionina en la dieta, los valores de eliminación de nitrógeno urinario se mantuvieron relativamente constantes en todos los lotes. Así, independientemente de la ingesta de metionina los autores indicaron que el ACAP no afecta a la eliminación urinaria de nitrógeno.

Si el ACAP está recomendado en dosis diarias de más de 4 gramos más del 50% de esta dosis se conjuga con sulfato o con glutatión (REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1988a). La ingesta de ACAP y su metabolismo bajo estas condiciones representa 13,2 mmol/día de sulfato más la depleción de glutatión. Virtualmente todo el glutatión deriva del metabolismo de la metionina o cisteína y en humanos la mayoría del sulfato urinario deriva de la oxidación de sulfoaminoácidos (SABRY, Z.I. y col. 1965 y KRIJGSHELD, K.R. y 1981a). Por tanto, la conjugación de ACAP con sulfato y glutatión requiere cantidades estequiométricas de sulfoaminoácidos y su consumo prolongado produce un incremento de los requerimientos de sulfoaminoácidos a través de la depleción de sulfato y glutatión (REICKS, M. y col. 1987; HATHCOCK, J.N. 1987). De hecho, el tratamiento crónico con ACAP está asociado a una disminución prolongada de los niveles tisulares de glutatión (REICKS, M. y col. 1988; REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1988a, 1989), al aumento de la actividad de la glutatión S-transferasa (REICKS, M. y col. 1992) y al aumento de la oxidación de [¹⁴C]fenilalanina que indica un aumento de la biodisponibilidad del aminoácido para la oxidación debido a la deficiencia de metionina que induce el ACAP (REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1989). Además, estudios con roedores han mostrado que una administración prolongada de ACAP puede producir deficiencia de metionina o inducirla si se le administra una dieta deficiente en aminoácidos sulfurados por la adicional demanda del metabolismo del ACAP (HATHCOCK, J.N. 1990). Se produce entonces, la inhibición de la síntesis de proteína, disminución de cisteína libre en el plasma, y excreción de creatinina y N—metilnicotinamida, aunque parece no afectar a los requerimientos de metionina para las reacciones de metilación

de fármacos y otros compuestos (HATHCOCK, J.N. 1987, REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1989). Un reciente trabajo de MICHELLI, L. y col. (1993) demostraron en ratas que la administración de ACAP da lugar a una reducción significativa de los niveles de glutatión cerebrales, especialmente en el hipotálamo y en la corteza cerebral, aunque el mecanismo bioquímico que da lugar a este efecto es aún desconocido.

Los efectos de la administración prolongada de ACAP sobre los indicadores de la función de la metionina están indicados en el siguiente cuadro (HATHCOCK, J.N. 1990).

Indicador	Efecto
Crecimiento	Disminuido
Síntesis de proteínas	Disminuida
Cisteína libre en hígado	Disminuida
Glutatión hepático	Disminuido
Oxidación de L-[¹⁴ C]Fenilalanina	Incrementada
N-Metilnicotinamina en orina	Disminuida
Creatinina en músculo	No afectada
Creatinina en plasma	No afectada
Creatinina en orina	Disminuida

La disminución del crecimiento puede deberse al posible efecto directo inhibitorio del crecimiento del ACAP, McLEAN, A.E.M. y col. (1989), nos indica como en ratas alimentadas con una dieta que contenía un 1% de ACAP se produce una disminución del crecimiento dosis-dependiente, y que este efecto se debe a la depleción de aminoácidos en el curso del metabolismo del ACAP. En este experimento la dosis utilizada era equivalente a la dosis humana normalmente utilizada y, por tanto, la posibilidad de inducir una deficiencia de aminoácidos con el uso crónico de ACAP en una dosis normal es elevada. Los indicadores primarios del status de metionina, alterados por niveles ACAP que no generan HT, demuestran que la deficiencia de metionina puede ser inducida por el ACAP cuando las ingestas de aminoácidos sulfurados son marginales (REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1989).

2.4.2.- Antiparkinsonianos: Levodopa

2.4.2.1. Clasificación farmacológica, aplicaciones terapéuticas y dosificación.

La levodopa es el fármaco que se utiliza en primera instancia para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Por ello, en primer lugar indicamos, aunque brevemente, las características y sintomatología fundamental de la enfermedad y posteriormente trataremos básicamente algunos aspectos de la farmacología de la levodopa a partir de las revisiones realizadas por FLOREZ, J. y col., (1987b), PLUM, F. y POSNER, J.B. (1988) y CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. (1991).

Los ganglios basales presentan diversas funciones entre las que destacan la capacidad de controlar la actividad motora y una de sus disfunciones es la llamada enfermedad de Parkinson conocida también como un síndrome acinético-rígido. Dentro de la arquitectura de los ganglios basales, es el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen) el que recibe la mayor parte de las aferencias que llegan desde diversas áreas o núcleos y a su vez, éste emite información canalizándola a través del globo pálido y de la zona reticulata de la sustancia negra. Desde el punto de vista neuroquímico la vía nigroestriada es de naturaleza dopaminérgica y se origina en las neuronas pigmentadas de la zona compacta de la sustancia negra. Algunas de las neuronas situadas en el núcleo caudado son de naturaleza colinérgica, de modo que se acepta la existencia en condiciones normales de una función contrapuesta y equilibrada entre la actividad dopaminérgica y colinérgica, de manera que la disminución de una se acompaña de la hiperactividad de la segunda. La destrucción de las neuronas dopaminérgicas inhibitorias situadas en la sustancia negra da lugar a la enfermedad de Parkinson, es una lesión degenerativa de vía nigroestriada, con pérdida profunda de dopamina a este nivel. La pérdida de la catecolamina subyace a todas las manifestaciones motoras principales del parkinsonismo.

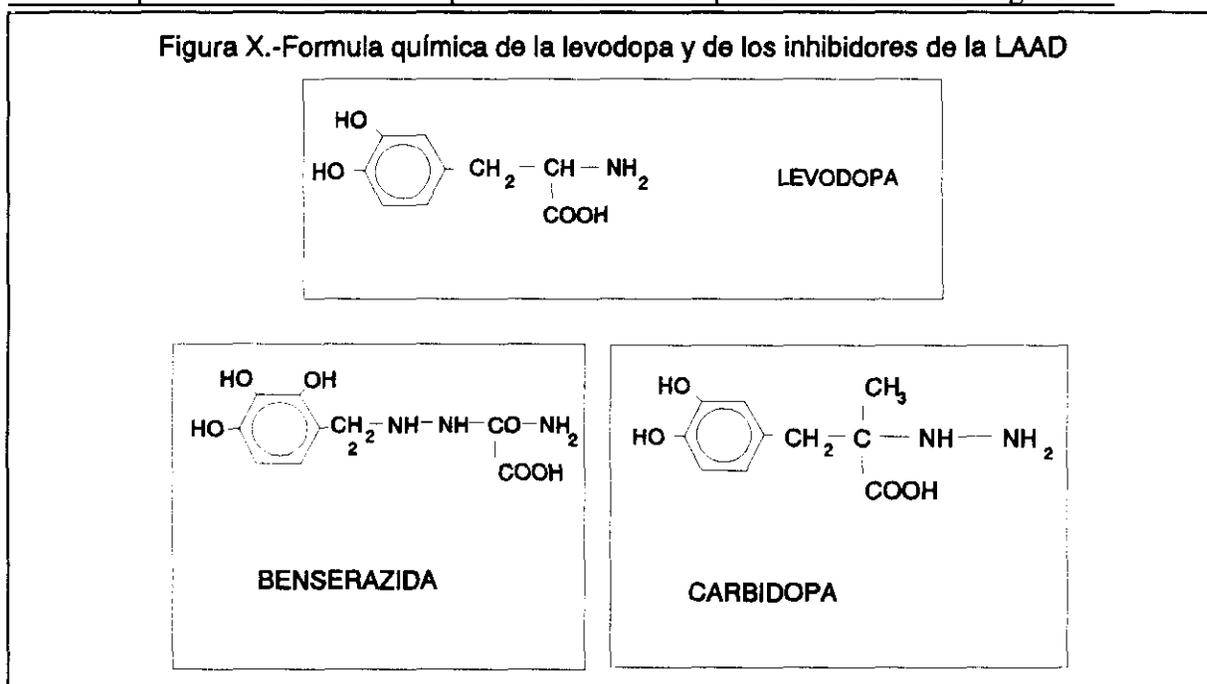
La enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 como "parálisis agitante" y es un síndrome que se caracteriza por: bradicinesia (lentitud y pobreza de movimientos), rigidez muscular (percibida por el examinador como un aumento de la resistencia de los músculos al movimiento pasivo), temblor en reposo (usualmente se calma con el movimiento voluntario), anormalidades en la postura y en la marcha, además de otras incapacidades funcionales como alteraciones del habla, de actividades delicadas, facies inexpresiva, depresión y eventualmente demencia. Los síntomas de la enfermedad de Parkinson no se desarrollan hasta que aproximadamente un 80% de las neuronas de la sustancia negra han sido destruidas. A pesar de que la fisiopatología de la enfermedad se conoce bien, su etiología aún no se conoce.

El Parkinson es una enfermedad exclusivamente humana, por tanto, no se pueden provocar simultáneamente todos los síntomas en animales de experimentación (ANTAL, J. y JASZSAGI-NAGI, E. 1978). Así, solamente se ha conseguido provocar un síndrome similar al parkinsonismo en primates cuando se les administra MPTP (N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (BURNS, R.S. y col. 1983).

Como hemos dicho, en el cuerpo estriado existe un equilibrio entre los componentes inhibitorios dopaminérgicos y los excitatorios colinérgicos y, por tanto, una de las estrategias terapéuticas para el parkinson es la de bloquear la hiperactividad colinérgica producida al existir una hipofunción dopaminérgica. Sin embargo, el restablecimiento de la transmisión dopaminérgica mediante diversas sustancias de las cuales la levodopa es el prototipo

constituye la línea fundamental de tratamiento de la enfermedad.

La dopamina, como tal molécula, no atraviesa la barrera hematoencefálica cuando se administra en forma sistémica por lo que no tiene efectos terapéuticos, de este modo se recurre a la administración del aminoácido precursor inmediato de la dopamina, la levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina). La levodopa se absorbe en el intestino, y posteriormente atraviesa la barrera hematoencefálica mediante el transportador de aminoácidos neutros y pasa al tejido estriatal donde se descarboxila produciendo dopamina. Las neuronas dopaminérgicas que sobreviven en la enfermedad de Parkinson captan la levodopa tratando de compensar la actividad perdida. La estructura química de la levodopa se muestra en la Figura 10.



La L-aminoácido aromático descarboxilasa es un enzima que se encuentra en células de naturaleza y localización diversas, así, fuera del sistema nervioso central (SNC) se encuentra en la células de la mucosa intestinal, de los capilares cerebrales y en el hígado, de tal modo que el 95% de la levodopa administrada sola se convierte en dopamina fuera del SNC. Por esto, la administración concurrente de levodopa con un inhibidor de la L-aminoácido aromático descarboxilasa disminuye en gran medida la descarboxilación del fármaco en los tejidos periféricos. Estos inhibidores son la carbidopa y la benserazida cuya fórmula química se muestra en la Figura 10. estos xenobióticos no atraviesan la barrera hematoencefálica por ello no ejercen su acción en el SNC.

La ventajas de la terapéutica combinada de un inhibidor de la L-aminoácido aromático descarboxilasa y levodopa son: 1) La dosis de levodopa puede reducirse en un 75%, 2) disminuyen en gran medida los efectos secundarios y las interacciones de la administración de una elevada dosis de levodopa y 3) aumenta el porcentaje de pacientes que presentan mejoría así como el grado de dicha mejoría.

En cuanto a los preparados y la dosificación para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson encontramos asociaciones de carbidopa/levodopa (CL) en proporción 1/10 o de benserazida/levodopa (BL) en proporción 1/4. Las dosis iniciales son 25/250 mg/día de CL o de 25/100 de BL. Las dosis de mantenimiento son 50-75/500-750 mg/día de CL y de 100-200/400-800 de BL. Las dosis máximas serán 150/1500 mg/día de CL y 150/600 de BL.

2.4.2.1. Consumo de levodopa y estado nutritivo de enfermos de Parkinson.

* Consumo de levodopa

Como hemos indicado, la enfermedad de Parkinson es un síndrome clínico de etiología desconocida, en el que se produce una lesión degenerativa en los ganglios basales del encéfalo y, específicamente, del sistema dopaminérgico nigroestriatal (CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. 1991), una degeneración supone que el tratamiento se administrará durante un amplio período de tiempo, encontramos así publicaciones de tratamientos administrados durante períodos de 2 hasta 17 años (SWEET, R.D. y McDOWELL, F.H. 1975; YAHR, M.D. 1978; CEBARDAUM, J.M. y McDOWELL, F.H. 1986; UITTI, R.J. 1993). Después de 4 a 8 años de tratamiento los pacientes se vuelven refractarios al tratamiento y la medicación pierde su eficacia paulatinamente por lo que se tiene que recurrir a otras drogas antiparkinsonianas (LITTER, M. 1988).

Aunque, un 5% de los pacientes de Parkinson a los que se les administra levodopa no experimentan beneficio alguno y a pesar de los efectos secundarios de la medicación (FLOREZ, J. y col. 1987b), la combinación de levodopa con un inhibidor de la L-aminoácido aromático descarboxilasa es actualmente el preparado más efectivo disponible para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. 1991).

La incidencia de la enfermedad aumenta con la edad: afecta al 1% de los adultos mayores de 65 años en todo el mundo y usualmente se manifiesta después de los 55 años (MARTILLA, R.J. 1983). Según MUTCH, W.J. y col. (1986) el Parkinson es una alteración neurológica crónica que afecta al 1 por 1000 de la población.

Los avances en la farmacoterapia del parkinsonismo logrados en los últimos 25 años han reducido en forma notable la morbilidad de la enfermedad y constituyen un triunfo en la farmacología de la enfermedad (CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. 1991). Concretamente en cuanto a la levodopa, la mortalidad se ha reducido a la mitad desde que apareció el fármaco y se produce un progreso más lento en la intensidad de los síntomas cuando el tratamiento con levodopa se inicia poco después de que se diagnostica la enfermedad de Parkinson (HOEHN, M. 1983, DIAMOND, S.G. y col. 1987); por esto, el tratamiento con levodopa debe iniciarse temprano en el curso de la enfermedad (CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. 1991).

* Estado nutritivo de enfermos de Parkinson

El estudio de las interacciones de la levodopa sobre los distintos nutrientes es especialmente interesante pues los enfermos de Parkinson son pacientes que en su mayoría están delgados y desnutridos (MARKUS, H.S. y col. 1993). Se ha sugerido que esto podría ser el resultado de, un incremento del gasto de las reservas de nutrientes del organismo, o por efecto del tratamiento terapéutico (VARDI, J. y col. 1976).

Por una parte, el Parkinson es una enfermedad que cursa con una sintomatología caracterizada por temblor, bradiquinesia, rigidez y trastornos de postura, marcha y equilibrio (FLOREZ, J. y col. 1987b), procesos que podrían aumentar los requerimientos de energía o de determinados nutrientes. De hecho, se ha demostrado que en pacientes con Parkinson

y en reposo, tanto de mediana edad como en ancianos, se produce un incremento del gasto energético (LEVI, S. y col. 1990; BROUSELLE, E. y col. 1991; COX, M. y col. 1992) con respecto a personas no Parkinsonianas.

Además, los pacientes de Parkinson presentan numerosos síntomas que pueden disminuir la ingesta: alteraciones en la deglución, descordinación mano-boca debida a los movimientos involuntarios que produce la enfermedad (LIEBERMAN, A.N. y col. 1980); disminución del apetito, producción excesiva de saliva, y alteraciones en la motilidad intestinal, como lentificación del vaciamiento gástrico y constipación (TANNER, C. y col. 1987). La disminución de la ingesta también se puede producir por factores sociales como aislamiento y dificultades que presentan concretamente estos pacientes para comprar y prepararse los alimentos (ABBOTT, H. y col. 1992a y b).

Junto con todo lo anterior, se ha postulado que la reducción del nivel de proteína de la dieta en determinadas tomas maximiza la eficacia del tratamiento (RILEY, D. y LANG, A.E. 1988); por lo que frecuentemente, se recomienda la disminución de la ingesta proteica directamente sin indicar la necesidad de una compensación dietaria.

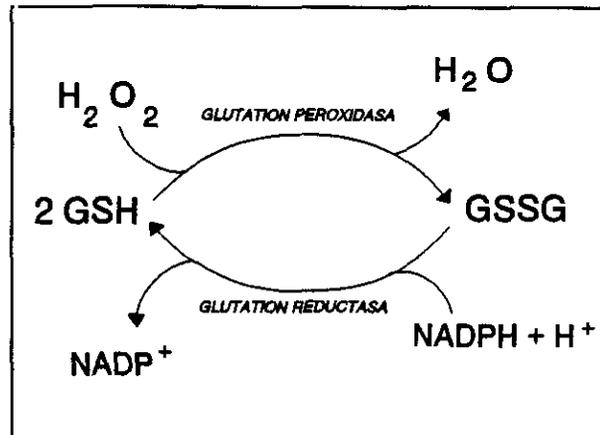
La presencia de todas o de algunas de estas circunstancias en los enfermos de Parkinson, el aumento del gasto energético, la disminución de la ingesta total y parcial de proteína, produce en ellos variaciones de los indicadores del estado nutritivo como lo indican diferentes trabajos: WAXMAN, M. y col. (1990); MARCUS, H.S. y col. (1992); ABBOTT, H. y col. (1992a y b); PARE, S. y col. (1992); MARKUS, H.S. y col. (1993) han demostrado la reducción del peso corporal que se produce en estos pacientes, además de que un elevado porcentaje de los mismos presentan un IMC (índice de masa corporal) menor de 20. ABBOTT, H. y col. (1992b) estudiaron también otros parámetros bioquímicos y cuando se compararon niveles plasmáticos de pacientes parkinsonianos con un grupo control sano, se encontró una reducción significativa ($p < 0,05$) en los niveles de albúmina, vitamina A, vitamina E, hierro y cinc. Estas deficiencias parecen estar relacionadas, según estos autores, con una ingesta deficitaria para la demanda resultante de su alterado estado neuromuscular.

Por otra parte, se ha postulado que durante la enfermedad de Parkinson aparece stress oxidativo durante el cual se forma peróxido de hidrógeno y radicales libres derivados del oxígeno, que pueden provocar daños celulares y jugar un papel importante en la progresión de la enfermedad (PARKINSON STUDY GROUP, 1989; FAHN, S. y COHEN, G. 1992). Además el metabolismo químico y enzimático de la dopamina puede aumentar el nivel de especies de radicales libres por si mismo (JENNER, P. 1993). Algunos indicadores del stress oxidativo (FAHN, S. y COHEN, G. 1992) son: (1) reducción de la mayoría de las sustancias reductoras, como ascorbato, glutatión o tocoferol; (2) cambio en el estado redox celular tal como un incremento en la razón glutatión oxidado a glutatión reducido; (3) acumulación de macromoléculas como peróxidos lipídicos, proteínas oxidadas y ADN alterado.

Si esta hipótesis es válida, durante la enfermedad de Parkinson se puede provocar una disminución de antioxidantes y, por tanto, la disminución plasmática de vitamina E y cinc indicada en el trabajo de ABBOTT, H. y col. (1992b) resultaría del incremento de los requerimientos de estos antioxidantes. Sin embargo, en el trabajo de JIMENEZ-JIMENEZ, F.J. y col. (1993) se observó que las concentraciones de carotenoides séricos aparentemente no están relacionados con el riesgo de desarrollar Parkinson. PERRY, T.L. y col. (1982) mostraron una reducción de los niveles de glutatión reducido (GSH) en la sustancia nigra en enfermos de Parkinson y sugirieron que era debido a su utilización por algunas toxinas allí acumuladas. Por otro lado, RIEDERER, P. y col. (1989) mostraron que los niveles de

glutation total (GSH + GSSG) en enfermos de Parkinson eran 50 % menores que los valores control. La relación glutacion oxidado (GSSG) a glutacion reducido (GSH) se inclina a favor de la forma oxidada (JENNER, P. 1993).

En este sentido, bajo condiciones fisiológicas el glutacion reducido (GSH) se encarga de eliminar el peróxido de hidrógeno cuando se encuentra en baja concentración, que se ha liberado por el metabolismo de la dopamina, formándose así glutacion oxidado (GSSG) (FAHN, S. y COHEN, G. 1992; YOSHIKAWA, T. 1993), como indica la figura:



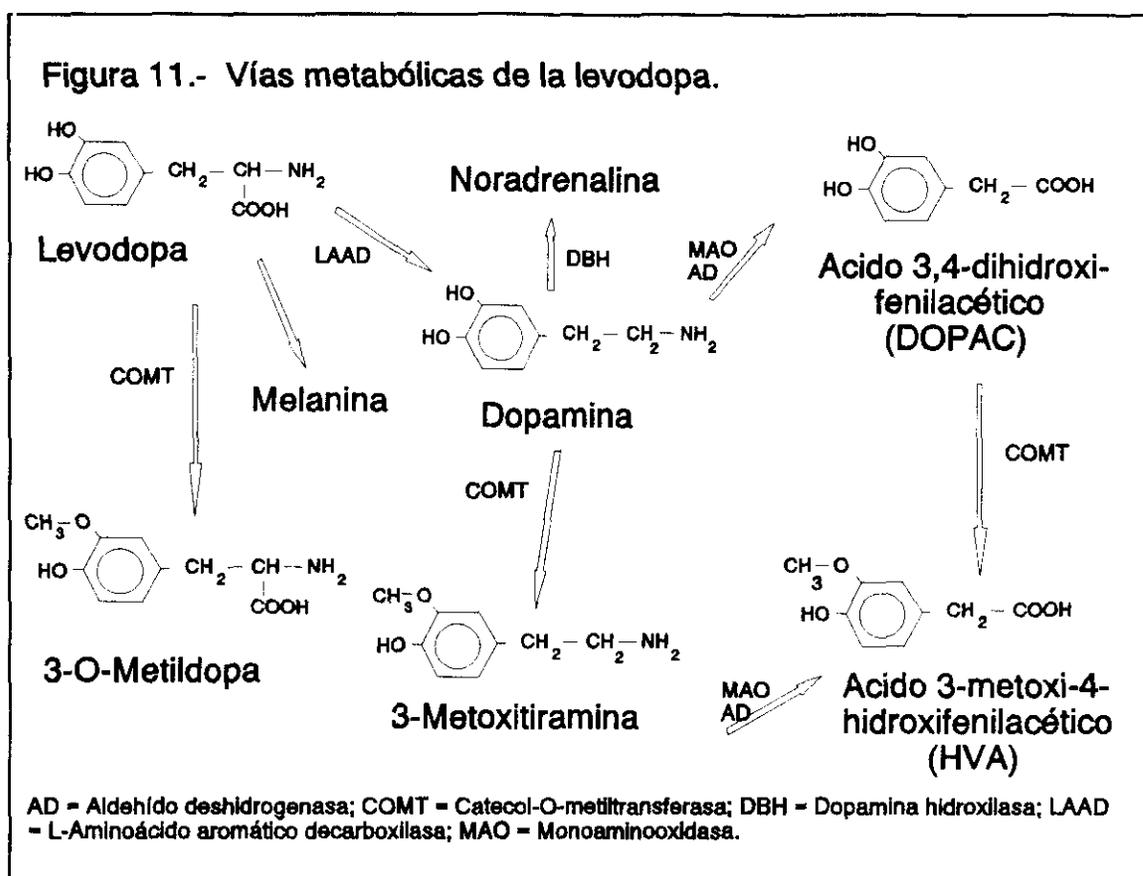
Una pequeña pero significativa reducción de la glutacion peroxidasa se encontró en la sustancia nigra de pacientes de Parkinson lo cual, se supone debido a la alteración de este área del cerebro mediada por los radicales libres y el peróxido de hidrógeno (KISH, S.J. y col. 1985).

2.4.2.3. Interacciones levodopa-metionina.

Primeramente definimos un mecanismo de interacción de la levodopa con la bioutilización de la metionina que se verifica a través de su principal vía metabólica, la ruta de transmetilación-transulfuración, indicada esquemáticamente en la Figura 11.

Para desarrollar este punto es necesario indicar las principales vías metabólicas de la levodopa que aparecen en la Figura 11. En ella se indica que después de una administración de levodopa, ésta es ampliamente metilada, mediante la catecol O-metiltransferasa (COMT), a 3-O-metildopa, la cual se convierte en ácido homovanílico por decarboxilación (WURTMAN, R.J. y ROSE, C.M. 1970). Esta es la ruta metabólica mayoritaria de levodopa exógena en los mamíferos (WURTMAN, R.J. y col. 1970a). El grupo metildonador en la O-metilación, tanto de levodopa como de dopamina, es la **S-adenosilmetionina (SAM)** (AXELROD, J. y TOMCHICK, R. 1958), que además es el compuesto donador de grupos metilo en el metabolismo extraneuronal de catecolaminas (AXELROD, J. 1971). Por esto, se han realizado diferentes trabajos enfocados al estudio del efecto de la administración de levodopa sobre los niveles corporales de SAM. WURTMAN, R.J. y ROSE, C.M. (1970); WURTMAN, R.J. y col. (1970b) y ORDOÑEZ, L.A. y WURTMAN, R.J. (1973a) demostraron que las concentraciones de SAM en cerebro y riñón disminuyen marcadamente cuando a las ratas se les administra una dosis comparable a la utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Por tanto, la administración de levodopa disminuye la concentración de SAM en tejidos disminuyendo así la biodisponibilidad de este metildonador para las reacciones de transmetilación.

Recientemente se han realizado más trabajos sobre el tema. TAUFEEK, H.R. y BONE, A.H. en 1980 también demostraron la reducción de los niveles tisulares de SAM con administración de levodopa e iproniacida (IMAO) y la reversibilidad del efecto con la administración de una dosis equimolecular a la cantidad de levodopa de metionina. SURTEES, R. y HYLAND, K. en 1990, demostraron que un aumento de la concentración de levodopa en el SNC en niños produce, por una parte, una marcada reducción de la



concentración de SAM en el fluido cerebrospinal debido, según los autores, a la formación endógena de levodopa y, por otra, un aumento de los niveles de 3-metoxitirosina, lo que sugiere que la concentración de SAM es el factor gobernante en el SNC de la metilación de la levodopa. Por todo esto, SURTEES, R. y HYLAND, K. (1990) proponen que sería interesante considerar la administración conjunta de SAM o de otros metildonadores, metionina o betaína, cuando se trata a los pacientes con levodopa.

Existen discrepancias en cuanto al papel de la SAM en la sintomatología de la enfermedad, puesto que, por un lado, MEGNA, G. y col. (1977) realizaron un estudio en el que se administraron 60 mg de SAM durante 15 días a sujetos afectados de Parkinson que estaban tratados crónicamente con levodopa y se observó que favorecía la remisión de algunos síntomas de la enfermedad. Por otro lado, CHARLON, C.G. y WAY, E.L. (1978) observaron que la administración intracerebroventricular de SAM en ratones induce la aparición de temblores de forma dosis-dependiente. Además una reciente investigación (CROWELL, B.G. y col. 1993) demostró en ratas que la administración de SAM tiene efecto hipocinético.

WURTMAN, R.J. y ROSE, C.M. (1970) opinan que parece posible que una prolongada administración de levodopa cause una relativa disminución de metionina en el organismo. En una terapia prolongada con levodopa la relación DOPAC/HVA (ácido 3,4-dihidroxifenilacético/ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético) que se excreta aumenta, reflejando una depleción de dadores metilo necesarios para el metabolismo por la COMT, y por tanto buena parte de la metionina dietética es utilizada por el metabolismo de grandes dosis terapéuticas de levodopa (CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. 1991). La concentración tisular de metionina va a variar en función de la condiciones experimentales; ORDOÑEZ, L.A. y WURTMAN, R.J. (1973a) realizaron un trabajo en ratas en el que con

una primera inyección de levodopa (i.e., 30-100 mg/Kg) no se encontraron ninguna variación en las concentraciones séricas y cerebrales de metionina libre; si se administran dos inyecciones de levodopa en un intervalo de 45 minutos se reduce un 40% la concentración de metionina sérica aunque no se afecta a la concentración de metionina cerebral; y sólo después de cuatro inyecciones, la concentración de metionina cerebral disminuye significativamente. Al igual que ocurre con la SAM según el trabajo de TAUFER, H.R. y BONE, A.H. en 1980 se produce una reducción de los niveles tisulares de metionina con administración de levodopa e iproniácida (IMAO) y el efecto es reversible con la administración de una dosis equimolecular a la cantidad de levodopa de metionina. En el trabajo indicado anteriormente de SURTEES, R. y HYLAND, K. en 1990, no aparecen alteraciones en la concentración de metionina en el fluido cerebroespinal de niños tratados con levodopa. La rata tiene todos los enzimas necesarios para regenerar grupos metilo desde la serina (ORDOÑEZ, L.A. y WURTMAN, R.J. 1973b), por tanto, ORDOÑEZ, L.A. y WURTMAN, R.J. (1974) y SURTEES, R. y HYLAND, K. (1990), sugieren que la capacidad de mantener las concentraciones de metionina después de una dosis de levodopa capaz de disminuir la concentración cerebral de SAM y la de metionina sérica, es el resultado de la regeneración de metionina a partir de la homocisteína formada después de la trasmetilación de dopa y sus derivados catecólicos.

Los enzimas necesarios para la síntesis de metionina a partir de la serina requieren entre otros cofactores **ácido fólico** y **vitamina B₁₂**. En el trabajo de ORDOÑEZ, L.A. y WURTMAN, R.J. (1974) se estudió el efecto de una deficiencia dietética crónica de ácido fólico sobre la trasmetilación cerebral cuando se administra a ratas levodopa en una dosis comparable a la terapéutica. Entre los efectos encontrados, apareció una disminución significativa de la concentración cerebral de SAM en los animales deficientes en folato. Estas investigaciones mostraron que mientras que la deficiencia de folato "per se" alteraba el metabolismo cerebral de los grupos metilo, la levodopa incrementaba la trasmetilación en este tejido dificultando la capacidad cerebral para mantener los niveles de metionina. Esto sugiere que durante el tratamiento crónico con levodopa, la utilización excesiva de las vías de síntesis de novo de grupos metilo podría incrementar los requerimientos nutricionales de ácido fólico y vitamina B₁₂. En el trabajo indicado anteriormente de SURTEES, R. y HYLAND, K. (1990) no aparecen alteraciones en la concentración de 5-metiltetrahydrofolato en el fluido cerebroespinal de niños tratados con levodopa. Finalmente, si la deficiencia relativa o absoluta de ácido fólico y vitamina B₁₂ contribuye a los efectos secundarios cerebrales de la levodopa aún no está determinado.

Se ha postulado también, aunque aún no está claro que así ocurra, que el tratamiento de Parkinson con levodopa estimula la formación de peróxido de hidrógeno (BLIN, J. y col. 1988) y como ya indicamos en el punto anterior el encargado de neutralizar este compuesto es el **glutathion** reducido. De hecho, en un trabajo reciente realizado por MYTILINEOU, C. y col. (1993) con cultivos de células del mesencéfalo, observaron un aumento del 125,2 % respecto al valor control en el contenido de glutathion reducido cuando al cultivo se le añade levodopa.

Otro mecanismo de interacción de la levodopa con la metionina se verifica a nivel de absorción por la existencia de mecanismos competitivos entre el fármaco y la metionina, además de con otros aminoácidos, por la proteína de transporte correspondiente.

En el punto 1.- de esta revisión ya vimos como la absorción intestinal de la proteína se verifica en la membrana luminal de las células epiteliales por la presencia de distintas proteínas de transporte específicas a las que se unen los aminoácidos (también péptidos

pequeños) y son arrastrados hacia el interior mediante transporte activo (GUYTON, A.C. 1992). Estos mecanismos de transporte tienen una afinidad mucho mayor para transportar L-esteroisómeros de aminoácidos que D-esteroisómeros (SHINDO, H. y col. 1977; GUYTON, A.C. 1988). Por tanto, cuando en la luz intestinal se encuentran simultáneamente la levodopa (L-dopa) y determinados aminoácidos neutros, como la L-metionina (PEARCE, L.A. y WATERBURY, L.D. 1974), el L-triptófano (LEHMANN, J. 1973) o la L-fenilalanina (GRANERUS, A.K. y col. 1971), se produce una inhibición de la absorción del medicamento o del aminoácido por competencia por el transportador.

La competitividad por los transportadores va a dar lugar lógicamente, por un lado, a la disminución de la disponibilidad del fármaco (OLDENDORF, W.H. 1971; DANIEL, P.M. y col. 1976; RECHES, A. y FAHN, S. 1982) y, por tanto, de su eficacia farmacológica y, por otro, a la reducción de la absorción y biodisponibilidad de algunos aminoácidos (GRANERUS, A.K. y col. 1971; LEHMANN, J. 1973; PEARCE, L.A. y WATERBURY, L.D. 1974).

En cuanto a la disminución de la biodisponibilidad del fármaco por la presencia de compuestos proteicos en la dieta hay trabajos suficientes para constatar esta teoría GILLESPIE, N. G. y col. (1973); PEARCE, L.A. y WATERBURY, L.D. (1974); MENA, I. y COTZIAS, G.C. (1975). Este dato está recogido en numerosas revisiones generales de interacciones fármaco-nutriente (ROE, D.A. 1984a; SHILS, M.E. y YOUNG, V.R. (1988); GARABEDIAN-RUFFALO, S.M. y RUFFALO, R.L. 1986; WALTER-SACK, I. 1987a; WALTER-SACK, I. 1987b), en las que en la mayoría se recomienda una baja ingesta proteica en enfermos de Parkinson tratados crónicamente con levodopa (WELLING, P.G. 1977).

Trabajos realizados sobre el tema en los últimos años dan lugar a conclusiones a veces contradictorias; NUTT, J.G. y col. (1989) indican que en la mayoría de los pacientes la variación de la concentración plasmática de aminoácidos neutros no es un contribuyente importante en la fluctuación de la respuesta clínica de la levodopa. Sin embargo, CROXSON, S. y col. (1991) demuestran una relación directa entre una reducción de la ingesta de aminoácidos neutros y la mejora significativa de los pacientes tratados. Anteriormente, McDOWELL, F.H. y SWEET, R.D. (1976) indican que el ácido glutámico, fenilalanina y metionina producen una inhibición de la reabsorción intestinal de más del 50% de la levodopa administrada mientras que el resto de los aminoácidos sólo la inhiben en un 10%.

En el trabajo de PARE, S. y col. (1992) se concluye con que en individuos no hospitalizados con Parkinson que se encuentren altamente motivados se puede mantener un ingesta con una dieta restringida en proteína pues la ingesta de la mayoría de los nutrientes en estos casos suele ser adecuada. Sin embargo, aquellos pacientes cuya ingesta se ve seriamente comprometida no deben ser sometidos a esta restricción proteica a no ser que experimenten grandes fluctuaciones al tratamiento con levodopa. Todos estos datos han dado lugar a la realización de trabajos como el de KARSTAEDT, P.J. y PINCUS, J.H. (1993) en el que se cuestiona si la utilización de un edulcorante artificial (Aspartame), compuesto que es hidrolizado en el intestino dando lugar a fenilalanina, podría dar lugar a variaciones en la respuesta al tratamiento con levodopa, concluyéndose finalmente que ingestas moderadas de aspartame no producían efectos adversos en los pacientes con Parkinson.

En cuanto a la alteración de la absorción de aminoácidos en presencia de levodopa en 1971 GRANERUS, A.K. y col. realizaron un estudio en nueve pacientes con Parkinson a los que les administraban vía oral L-fenilalanina y levodopa y por los resultados obtenidos por

la concentración plasmática de L-fenilalanina, la levodopa reduce la tasa de absorción de este aminoácido cuando ambos se encuentran simultáneamente en el lumen intestinal.

LEHMANN, J. en 1971 planteó la posibilidad de que el tratamiento con levodopa produjera una deficiencia de triptófano por el mecanismo competitivo anteriormente comentado. De hecho, en 1973 demostró que seis pacientes de Parkinson tratados con levodopa y después de haber ingerido triptófano presentaban niveles de triptófano sérico más bajos que los que presentaban después de una toma similar de aminoácido y sin administración de fármaco. También LEHMANN, J. en 1971 propuso que esta interacción levodopa-triptófano fuera la responsable de la depresión y otros efectos secundarios producidos por la levodopa, ya que vio que una administración de triptófano presenta efectos beneficiosos sobre los efectos secundarios psiquiátricos inducidos por la levodopa y esto sería así, por que si la levodopa inhibe competitivamente la absorción intestinal de triptófano también podría inhibir la entrada del mismo al cerebro lo que produciría una reducción de la síntesis de serotonina o 5-hidroxitriptamina que provocaría la depresión a la que da lugar el tratamiento con levodopa.

El proceso de competición parece ser que no sólo se produce al nivel intestinal, sino además en las células endoteliales de los capilares cerebrales donde, como ya indicamos anteriormente, también se encuentra el sistema de transporte para aminoácidos neutros (OLDENDORF, W.H. 1971; DANIEL, P.M. y col. 1976) el cual es capaz de saturarse y por el que se establece una competitividad entre los aminoácidos circulantes de la sangre y la levodopa para atravesar la barrera hematoencefálica y acceder al cerebro (RICHTER, J.J. y WAINER, A. 1971; DANIEL, P.M. y col. 1976; PARDRIDGE, W.M. 1977; NUTT, J.G. y col. 1984; PARDRIDGE, W.M. y CHOI, T.B. 1986; KURLAN, R. 1987). Este punto constituye una interacción importante pues, por una parte los pacientes de Parkinson presentan variaciones en las concentraciones de neurotransmisores cerebrales (BIRKMAYER, W. 1976) y por tanto la levodopa debe acceder al cerebro para producir los cambios neuroquímicos orientados a la disminución de los síntomas de la enfermedad y, además, distintos aminoácidos deben también acceder al cerebro por su papel precursor de distintos neurotransmisores (ANTAL, J. y JASZSAGI-NAGI, E. 1978).

El trabajo (BATTISTIN, L. y col. 1971) nos proporciona datos sobre la concentración sérica y cerebral y de almacenamiento en las distintas regiones cerebrales de metionina y fenilalanina, con estos datos, ANTAL, J. y JASZSAGI-NAGI, E. (1978) estudiaron el efecto en ratas de la administración, bajo condiciones agudas, de levodopa sobre las concentraciones plasmáticas y cerebrales y la distribución en las distintas regiones cerebrales de metionina y de fenilalanina y por tanto sobre la formación de neurotransmisores. Los resultados obtenidos fueron que la administración del fármaco aumenta la concentración de metionina plasmática y disminuye, durante varias horas después, el almacenamiento cerebral de la misma, sin embargo, esta disminución de la incorporación de metionina al cerebro fue significativa o no en función de la zona cerebral estudiada. Estos autores relacionan este último efecto con los datos de WURTMAN, R.J. y col. (1970a) que nos indican la disminución de la concentración de SAM cerebral con administración de levodopa. En cuanto al efecto sobre los niveles de fenilalanina se vio que la administración de levodopa no afectaba a la concentración plasmática de fenilalanina aunque si aumentaban los niveles cerebrales en general.

2.5. TECNICAS DE DETERMINACION DE BIODISPONIBILIDAD

Como sabemos, la biodisponibilidad de los nutrientes está condicionada por diferentes factores que se podrían clasificar como:

* Propios del hombre: Estado de salud o enfermedad, situación fisiológica (crecimiento, gestación, envejecimiento, etc), variaciones individuales (composición corporal, historia dietética, adaptación, etc.).

* Propios de la dieta: presencia de interacciones entre nutrientes o con xenobióticos como fármacos, aditivos, contaminantes, componentes no nutritivos de los alimentos.

* Procesos industriales y culinarios: fundamentalmente por tratamientos térmicos.

Por todo esto, se nos plantea la dificultad de conocer la bioutilización de un nutriente determinado, que vendría condicionada por los diferentes factores antes relacionados y que, por tanto, tiene una problemática diferente para cada uno de los considerados en esta Tesis, que a continuación relacionamos.

2.5.1. Proteína

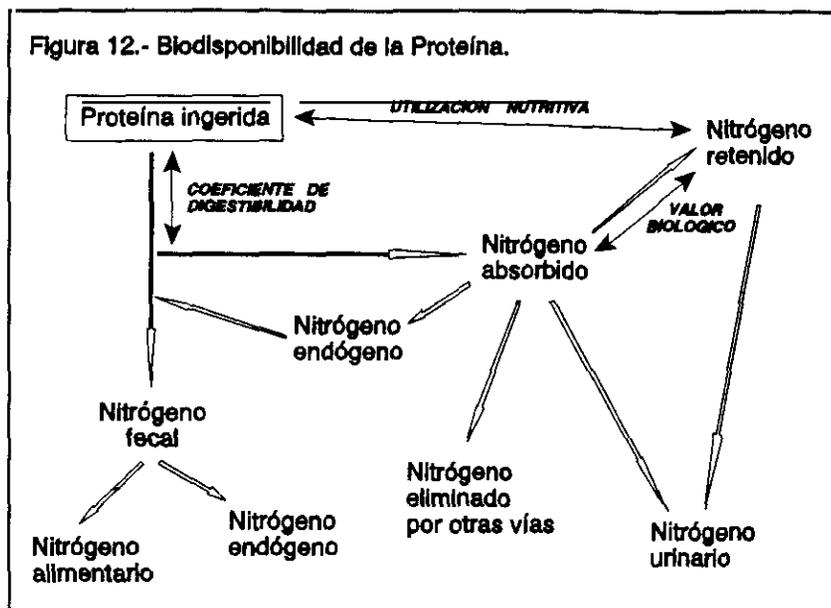
Con respecto a este nutriente resumimos a continuación las revisiones sobre técnicas de biodisponibilidad en las que se indican los índices más utilizados, así como su fundamento para conocer el valor nutritivo de la proteína de la dieta limitándonos a las que consideramos fundamentales:

El papel fundamental de este nutriente, como es sabido, es el de formar proteínas corporales y su valor nutritivo depende de la proporción en que la proteína dietética pueda incorporarse a la de los tejidos corporales. El concepto de calidad de la proteína trata de cuantificar el papel de este nutriente y se debe señalar la necesidad de tenerlo en cuenta al objeto de poder estimar sus recomendaciones dietéticas, puesto que no todas las proteínas tienen la misma capacidad de proporcionar aminoácidos útiles al organismo (MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. 1987).

Por tanto, en principio, una proteína tiene mejor calidad nutricional que otra, cuando su composición en aminoácidos se parece más a la de la proteína corporal aunque en su valor nutritivo influya también su biodisponibilidad. Una cuantificación de esta idea es lo que se pretende mediante el parámetro NPU (*Net Protein Utilization*) que expresa el porcentaje de nitrógeno proteico incorporado a nuestros tejidos, descontando del ingerido el que se elimina por heces y orina. Por tanto, una proteína será mejor utilizada cuanto más alto sea el NPU. Por consiguiente, y basándonos en este parámetro, es posible cuantificar la calidad de la proteína de los alimentos (MILLER, D.S. y BEMDER, D.E. 1955).

En el estudio de las interacciones fármaco-nutriente, surge la posibilidad de que algunos de estos xenobióticos pudieran influir en la utilización nutritiva de la proteína. Es en esta parcela en la que se incluye una parte del contenido de ésta Tesis que aquí presentamos.

Antes de comentar las diferentes técnicas utilizadas para la determinación de la proteína es conveniente que recordemos, brevemente, las etapas que deciden la utilización nutritiva de la misma. La cuantificación de la utilización nutritiva de la proteína de un alimento se lleva a cabo por diversas técnicas que permiten obtener distintos parámetros de los que merecen destacarse los que aparecen reseñados en la Figura 12.



El valor proteico de un alimento corresponde a su capacidad para satisfacer las necesidades del consumidor en nitrógeno y aminoácidos asegurando el crecimiento y mantenimiento convenientes (CHEFTEL, J.C. y col. 1989). Existen numerosos métodos para valorar la calidad nutricional de una proteína. En la revisión del año 1970 (VARELA y col.), se indicaban los índices más corrientemente usados, así como su

fundamento para conocer la calidad proteica. Posteriormente, se han incrementado considerablemente estos métodos, aquí nos vamos a limitar a citar varias revisiones que consideramos fundamentales: las indicadas por VARELA-MOREIRAS, G. (1989) que incluye la publicada por la UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES UNIDAS en el año 1980, la de BODWELL, C.E. (1977), la de CRIM, M.C. y MUNRO, H.N. (1984) y la de FIDANZA, F. (1984) y actualizada con otras más recientes como la de LINDER, M.C. (1985a), MUNRO, H.N. y CRIM, M.C. (1987) y CHEFTEL, J.C. y col. (1989).

Según BLOCK, R. y MITCHELL, H. (1947), el potencial nutritivo de una proteína de la dieta viene determinado en función del aminoácido limitante de la misma, este aminoácido esencial será el que se encuentre presente en menor concentración en relación con las necesidades del individuo.

Los índices de calidad nutricional de la proteína los podemos clasificar:

Índices Químicos:

La calificación química de una proteína por su valor nutritivo tiene, como objetivo principal, determinar el aminoácido limitante de la misma, y se determina sobre la base de su contenido en aminoácidos esenciales con relación a las necesidades del individuo. Los índices químicos no permiten aclarar los efectos negativos del exceso de aminoácidos o de los factores antinutricionales presentes en el alimento proteico.

Aminograma: Es la composición en aminoácidos de la proteína.

Relación huevo de un aminoácido: Es la relación, en tanto por ciento, entre el contenido de un aminoácido en la proteína problema y el contenido en la proteína de huevo.

Cómputo químico (Chemical Score): En el concepto de BLOCK, R. y MITCHELL, H. (1947), indica la relación entre los mg de aminoácido limitante por g de proteína problema y los mg del mismo aminoácido en una proteína de referencia.

Índice de aminoácidos esenciales (AAE) de Oser: Es la media geométrica de las relaciones huevo de los diez aminoácidos esenciales.

Lisina Disponible: Según CARPENTER, K.J. (1960), se considera disponible la lisina cuyo grupo amino no está bloqueado. Es un índice correlacionable con los índices biológicos en las proteínas cuyo aminoácido limitante sea la lisina.

Índices enzimáticos: Este método se basa en medir la liberación de aminoácidos esenciales después de la exposición de la proteína a la acción de una o varias proteasas bajo unas condiciones normalizadas permitiendo estimar la digestibilidad proteica, el valor biológico y/o la disponibilidad biológica de algunos aminoácidos.

Índices Biológicos:

Básicamente la evaluación de una fuente proteica comienza con el análisis de nitrógeno y los aminoácidos mediante pruebas biológicas, que presentan como criterio de eficacia la ganancia de peso o la retención de nitrógeno. La utilización biológica de una proteína depende primariamente de su digestibilidad por las peptidasas, composición, absorción y transporte (SWAINGOOD, H.A. y CATIGNANI, G.L. 1991). Cuando el ensayo biológico se hace de forma que determinado aminoácido (aportado por una proteína) sea nutricionalmente limitante el resultado indica la disponibilidad biológica de ese aminoácido limitante. Los ensayos biológicos conducen a una clasificación de las proteínas en función de su valor nutritivo y permiten descubrir las alteraciones de la calidad proteica. Las pruebas biológicas son las siguientes:

Coefficiente de Digestibilidad (CD) de Proteína: Se define como la relación porcentual entre la cantidad de nitrógeno absorbido y el ingerido. Cuando el nitrógeno absorbido se determina por diferencia entre el nitrógeno ingerido y el fecal total se obtiene el CD Aparente (CDA); si el valor del nitrógeno fecal se corrige con la eliminación del nitrógeno fecal endógeno determinado previamente, se obtiene el CD Verdadero (CDV). Revisado también por SARWAR, G. (1987) Y SWAINGOOD, H.A. y CATIGNANI, G.L. (1991).

Valor Biológico de la Proteína (VB): Se denomina así al procedimiento clásico de medición de la calidad de las proteínas a partir de los cambios en las proteínas orgánicas. Según el concepto original de THOMAS y MITCHELL, expresa el tanto por ciento de nitrógeno retenido del absorbido y supone medir la ingesta de nitrógeno procedente de las proteínas de la dieta y la eliminación de nitrógeno por heces y orina.

Utilización Neta de la Proteína (NPU = Net Protein Utilization): Expresa el tanto por ciento de nitrógeno retenido del ingerido y es, aritméticamente, el producto del VB por CDV.

Coefficiente de Eficacia Proteica en Crecimiento (PER = Protein Efficiency Ratio): Expresa la ganancia en peso de los animales, en gramos, por gramo de proteína ingerida, por tanto, acredita la proteína utilizada para el crecimiento o el mantenimiento del peso.

Coefficiente de Eficacia Proteica Neta (NRP = Net Protein Ratio): cuando se incluye la pérdida de peso de un lote de ratas alimentadas con una dieta carente de proteínas, éstas pueden valorarse por su capacidad para el mantenimiento y crecimiento con esta determinación: $NPR = \text{ganancia de peso} + \text{pérdida de peso del lote alimentado sin proteínas/proteínas ingeridas}$

Valor Bruto de la Proteína (GPV = *Gross Protein Value*): Para su determinación se utilizan tres lotes de animales. Uno de ellos ingiere una dieta básicamente de cereales, otro se alimenta de la misma dieta suplementada con la proteína problema y el tercero, la dieta básica suplementada con caseína. El GPV expresa el aumento de peso debido a la suplementación con la proteína problema, en relación porcentual con el efecto de la suplementación en caseína.

Depleción proteica: Expresa la cantidad de proteína necesaria para recuperar el peso en animales previamente sometidos a una dieta con un nivel de proteína insuficiente.

Indices basados en la determinación de nitrógeno corporal: Expresan el porcentaje entre el nitrógeno ingerido y el aumento de nitrógeno corporal después de la ingestión de la proteína problema. Dicho concepto fue posteriormente revisado y se expresa actualmente como Valor Productivo de la Proteína (PPV = *Protein Productive Value*).

Indices microbiológicos: Existen diversas técnicas para determinar la disponibilidad de un aminoácido utilizando cultivos de diferentes gérmenes cuyas exigencias en aminoácidos esenciales son conocidas. Han sido muy utilizados "Tetrahymena piriformis" y sobre todo "Estreptococcus zymogenes" cuyas necesidades en aminoácidos son semejantes a las de los mamíferos. Los microorganismos también tienen sus propios enzimas proteolíticos y su crecimiento sobre la proteína a estudiar puede utilizarse como índice de calidad proteica.

Otras técnicas e índices:

Por último, existen también una serie de técnicas que tratan de relacionar el contenido de aminoácidos del suero con la cantidad y calidad de las proteínas ingeridas. Así mismo, las relaciones azufre-nitrógeno, nitrógeno-creatinina, y azufre-creatinina en la orina pueden ser un índice de calidad nutritiva de la proteína de la dieta. Otra técnica alternativa más reciente, ha sido el estudio de la respuesta del metabolismo proteico a diferentes condiciones nutricionales, mediante el uso de isótopos, con los que se marcan los aminoácidos administrados por infusión. A continuación, se mide la dilución del isótopo en el organismo y así se puede obtener una estimación del *pool* metabólico.

Por otro lado si, como ya hemos dicho, no resulta fácil conocer la calidad de la proteína ingerida, tampoco lo es conocer la proteína hística a la que va destinada. En este sentido, recordemos que nuestras estructuras proteicas están en equilibrio dinámico, intercambiando aminoácidos entre la sangre y los otros tejidos, con distintas velocidades y ritmos de recambio (*turnover*). Una consecuencia de esto es que para poder interpretar el papel nutricional de la proteína de la dieta hace falta considerar al menos dos escalones: 1) La relación de la composición en aminoácidos de la proteína de la dieta con la del "pool" general de aminoácidos sanguíneos y 2) la relación de estos aminoácidos del "pool" sanguíneo con la composición en aminoácidos de los diferentes tejidos a los que van a incorporarse. Conviene también significar que en el "pool" de aminoácidos no se diferencian los absorbidos de la dieta de los que proceden de la degradación de las proteínas hísticas y que, por tanto, van a ser utilizados en igualdad de condiciones en la biosíntesis de las diferentes proteínas de los tejidos de nuestro organismo.

2.5.2.- Grasa

Como es sabido, el proceso digestivo que sigue la grasa es bastante complejo al intervenir en él numerosos factores. Sin embargo, pese a esta complejidad, la eficacia digestiva, cuantificada por el Coeficiente de Digestibilidad (CD), es extremadamente elevada. Así, como ejemplo, en un trabajo de nuestro Departamento (VARELA, G. y col. 1986) se encontró para el aceite de oliva crudo un CD de 0,99. Este coeficiente tan alto adquiere una significación mayor si tenemos en cuenta algunas consideraciones:

En primer lugar, hay que hacer notar lo que todavía tiene de válido la revisión pionera de DEUEL, J.R. en el año 1955. Así, este autor destaca que hay que diferenciar los conceptos muchas veces confusos de digestibilidad y absorción, ya que suelen considerarse sinónimos. Sin embargo, para el bioquímico y el fisiólogo, absorción y digestibilidad constituyen dos aspectos diferentes del proceso, aunque a menudo relacionados. También conviene recordar aquí los trabajos ya clásicos de VARELA, G. (1963) y VARELA, G. y MURILLO, A. (1975) sobre digestibilidad del aceite de oliva en comparación con otras grasas.

En esta eficacia digestiva, hay que tener en cuenta, fundamentalmente, factores relacionados con el fisiologismo del hombre que la ingiere, otros ligados a la propia grasa y en general factores dietéticos varios.

En cuanto a los factores ligados al hombre podemos destacar la edad del individuo. Diversos investigadores han demostrado que los niños menores de un año absorben las grasas de forma ineficaz (SOBEL y col. 1949). Por otra parte, las grasas son absorbidas y metabolizadas más lentamente en individuos de edad avanzada que en jóvenes adultos (BECKER y col. 1950). Además, influyen otros aspectos fisiológicos, según nos indica McNEIL, N.I. (1988) de modo que, por un lado, los lípidos de la mucosa intestinal pueden añadirse a la grasa luminal durante su paso a través del intestino delgado e introducirse en el pool metabólico lipídico existente en ese punto.

En relación con los factores dietéticos que pueden influir en la digestibilidad, conviene resaltar la revisión de GRANDE COVIAN, F. (1988). Recuerda este autor que en general, con igual grado de saturación, los ácidos grasos de cadena corta se absorben mejor que los de mayor tamaño (DEUEL y HALLMAN, 1940). Además, a igualdad de peso molecular, las grasas insaturadas van a ser mejor absorbidas que las saturadas y más cuanto mayor sea su grado de insaturación. También se sabe que los triglicéridos con ácidos grasos de cadena impar son absorbidos más lentamente que los de cadenas pares (ALFIN-SLATER, R.B. y AFTERGOOD, L. 1987). Se ha demostrado que los triglicéridos con ácido palmítico en posición 2 son absorbidos mejor que las grasas con ácido palmítico en otras posiciones, o con otros ácidos grasos en posición 2. TOMARELLI y col. (1968) y FILER y col. (1969) indicaron que la absorción se ve afectada negativamente cuando el ácido palmítico, el ácido esteárico o ambos aparecen en las posiciones 1,3 del triglicérido.

Existen otros factores dietéticos que pueden influir en la cuantificación de la eficacia digestiva para la grasa. Un ejemplo de constituyente de la dieta que podría modificar este parámetro es la proteína dietética. Hay autores, PRIMROSE, M.F. y BURR, G.O. (1955) entre otros, que opinan que las grasas son peor digeridas tras ingerir una dieta relativamente baja en proteína (14%) que una alta (30%), aunque hay otros investigadores que no encontraron una disminución de la digestibilidad en perros o humanos que ingerían dietas bajas en proteína (JAGERROOS, B.H. 1955). Por otro lado, COFFEY, R.J. (1955) opina

que los niveles proteicos no tienen mucha importancia en cuanto a la digestibilidad de la grasa.

También el volumen de la ingesta de grasa puede llegar a modificar el CD de la misma con mayor sensibilidad que el tipo de grasa empleada ya que, como es sabido, existe un proceso de adaptación cuali y cuantitativo del aparato digestivo al tipo y nivel de grasa normalmente ingerido por el animal. La tasa con la que las grasas abandonan el intestino se ve primeramente aumentada cuando hay cantidades importantes; el porcentaje de grasas absorbidas disminuye por que una parte se pierde en las heces antes de que puedan ser absorbidas por la mucosa intestinal. La administración de grasas en pequeñas cantidades, tanto si son de absorción lenta como si son de absorción rápida, no parece afectar a su utilización nutritiva, sin embargo, cuando una grasa de absorción lenta es suministrada en alta dosis, puede perderse una cantidad considerable en heces probablemente porque la grasa que llega al colon no puede llegar a absorberse según nos indica McNEIL, N.I. (1988). En lo que concierne a su valor nutricional, no parece tener importancia el hecho de que la grasa sea de absorción rápida o lenta (ALFIN-SLATER, R.B. y AFTERGOOD, L. 1987).

En resumen, pensamos que es de interés señalar que dentro de un margen de variaciones en las que influyen circunstancias propias del hombre, de la grasa y de los animales de experimentación en los que se ensaya, la digestibilidad de las grasas más habitualmente utilizadas en los diferentes procesos culinarios o industriales es muy elevada y que también a efectos prácticos, estos procesos, fundamentalmente los culinarios, en general no afectan a la digestibilidad.

2.5.3. Acido fólico

Las múltiples formas en que el folato aparece en los tejidos hace que el análisis de la distribución de folato sea una labor difícil e incómoda (KRUMDIECK, C.L. y col. 1983; SELHUB, J. 1980). El método tradicional que combina cromatografía DEAE-celulosa con ensayos microbiológicos (SILVERMAN, M. y col. 1961; BIRD, O.D. y col. 1965), incluye la realización de múltiples cromatogramas y la recopilación de múltiples fracciones. Cada una de estas fracciones se trata con pteroilpoliglutamato hidrolasas que producen la ruptura de los poliglutamilfolatos a sus respectivos derivados monoglutámicos. Entonces, se realizan los ensayos microbiológicos usando dos, o hasta tres organismos.

Otros métodos, incluyendo los basados en la ruptura selectiva del enlace C₉-N₁₀ (ETO, I. y KRUMDIECK, C.L. 1982) y los que se realizan sobre complejos ternarios de timidilato sintasa con H-5-fluorodeoxiuridinamofosfato (SILVERMAN, M. y col. 1961) y 5,10-metilentetrahidrofolatos (PRIEST, D.G. y col. 1980 y 1981), comprenden también numerosos pasos.

El método descrito y utilizado en nuestros experimentos está diseñado para analizar la molécula completa de folato en un procedimiento constituido sólo por dos pasos. En el primero, los folatos presentes en el extracto del tejido se purifican por cromatografía de afinidad utilizando folato de leche unido a proteína como la matriz de afinidad (SELHUB, J. y col. 1980 y 1988). En el siguiente paso, la mezcla de folato purificada se analiza utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en combinación con un sistema de detección de diodo array (SELHUB, J. 1989).

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este diseño está estructurado en tres experimentos A, B, y C que hemos diferenciado a efectos prácticos.

En el experimento A las pruebas se realizaron según el diseño experimental indicado en la Figura I en cuatro lotes diferentes de 10 ratas *Wistar* en crecimiento. Tres lotes consumieron una dieta ajustada en todos los nutrientes y satisfactoria para las necesidades normales en dicha edad con un nivel proteico del 12% (Caseína + DL-Metionina). El cuarto lote también consumió una dieta al 12% de proteína, pero se diferencia del anterior en que no fue suplementada con DL-Metionina. Por tanto, la fracción proteica estuvo constituida en este último lote exclusivamente por caseína.

Por otro lado, en la Figura II se esquematizan y relacionan los diferentes parámetros controlados y determinaciones efectuadas, que se detallarán en el apartado correspondiente.

También se esquematiza en las Figura III, el calendario de las determinaciones realizadas en los diferentes períodos de administración del fármaco, que fueron siempre precedidas de un período de adaptación de los animales a la dieta.

En el experimento B se estableció un diseño experimental indicado en la Figura IV para cinco lotes diferentes de 6 ratas *Wistar* en crecimiento todas machos. Todos los lotes consumieron una dieta ajustada en todos los nutrientes y satisfactoria para las necesidades normales en dicha edad con un nivel proteico del 12% (Caseína + DL-Metionina).

En la Figura V se esquematizan y relacionan los diferentes parámetros controlados y determinaciones efectuadas en esta parte de la experimentación y en la Figura VI, se esquematiza el calendario de las determinaciones realizadas en el período experimental.

El experimento C se diseñó para 6 lotes de 6 ratas *Wistar* macho adultas y en las Figuras VII, VIII y IX se muestran, respectivamente, el diseño experimental, parámetros y determinaciones calculadas y calendario seguido.

Para las tres pruebas, los animales fueron alojados individualmente en células metabólicas donde consumieron la dieta experimental durante tres días como período de adaptación y durante el período de experimentación.

FIGURA I: EXPERIMENTO A: DISEÑO EXPERIMENTAL

(DURACION: 43 DÍAS)

<u>LOTES EXPERIMENTALES</u>	<u>Nº ANIMALES</u>	<u>PROTEINA DIETARIA</u>
* CONTROL	10	Caseína + DL-metionina
* ACIDO ACETILSALICILICO (ASA)	10	Idem
* ACETAMINOFENO (ACAP)	10	Idem
* ACETAMINOFENO (ACAP DEF MET)	10	Caseína

FIGURA II: EXPERIMENTO A: PARAMETROS E INDICES**PARAMETROS Y DETERMINACIONES**

- * Peso
- * Ingesta
- * Nitrógeno fecal
- * Grasa fecal
- * Peso del hígado
- * Transaminasas
- * Histología hepática

INDICES CALCULADOS

- * Coeficiente de eficacia alimentaria (CEA)
- * Coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP)
- * Coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN)
- * Coeficiente de utilización digestiva de la grasa (CDG)
- * Indice hepatosomático (IHS)

FIGURA III: EXPERIMENTO A: CALENDARIO DE DETERMINACIONES

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
PA																							
CP																							
CI																							
PB																							

Día	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
CP																						
CI																						
PB																						
PH																						
AH																						

Nº = N° del día experimental
 PA = Período de adaptación

CP = Control de peso
 CI = Control de ingesta

PB = Período de balance
 PH = Peso de hígado y transaminasas

AH = Análisis histológico

FIGURA IV: EXPERIMENTO B: DISEÑO EXPERIMENTAL

(DURACION 32 Días)

<u>LOTES EXPERIMENTALES</u>	<u>Nº ANIMALES</u>	<u>PROTEINA DIETARIA</u>
* CONTROL	6	Caseína + DL-metionina
* ACIDO ACETILSALICILICO (ASA)	6	Idem
* ALIMENTADO A LA PAR CON LOTE ASA	6	Idem
* ACETAMINOFENO (ACAP)	6	Idem
* ALIMENTADO A LA PAR CON LOTE ACAP	6	Idem

FIGURA V: EXPERIMENTO B: PARAMETROS E INDICES**PARAMETROS Y DETERMINACIONES**

- * Peso
- * Ingesta
- * Peso del hígado
- * Concentración de S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH) hepáticos
- * Concentración y distribución de los folatos en suero e hígado.

INDICES CALCULADOS

- * Coeficiente de eficacia alimentaria (CEA)
- * Coeficiente eficacia proteica para el crecimiento (CEP)
- * Índice hepatosomático (IHS)
- * Relación SAM/SAH

FIGURA VI: EXPERIMENTO B: CALENDARIO DE DETERMINACIONES

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
PA																
CP																
CI																

Nº	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
CP																
CI																
HS																

Nº = Nº del día experimental
 PA = Período de adaptación

CP = Control de peso CI = Control de ingesta
 HS = Parámetros hepáticos y séricos.

FIGURA VII: EXPERIMENTO C: DISEÑO EXPERIMENTAL

(DURACION: 30 Días)

<u>LOTES EXPERIMENTALES</u>	<u>Nº ANIMALES</u>	<u>PROTEINA DIETARIA</u>
* CONTROL ALIMENTADO A LA PAR	6	Caseína + DL-metionina
* ACETAMINOFENO (ACAP)	6	Idem
* LEVODOPA/CARBIDOPA (50/5 mg/kg) (LD50)	6	Idem
* LEVODOPA/CARBIDOPA (175/17,5 mg/Kg) (LD175)	6	Idem
* ACAP + LD50	6	Idem
* ACAP + LD175	6	Idem

FIGURA VIII: EXPERIMENTO C: DISEÑO EXPERIMENTAL**PARAMETROS Y DETERMINACIONES:**

- * Peso
- * Ingesta
- * Nitrógeno fecal
- * Nitrógeno urinario

INDICES CALCULADOS

- * Coeficiente de eficacia alimentaria (CEA)
- * Coeficiente eficacia proteica para crecimiento (CEP)
- * Coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN)
- * Coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno (CUM)
- * Coeficiente de utilización neta del nitrógeno (CUN)

FIGURA IX: EXPERIMENTO C: CALENDARIO DE DETERMINACIONES

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PA															
CP															
CI															

Nº	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CP															
CI															
PB															

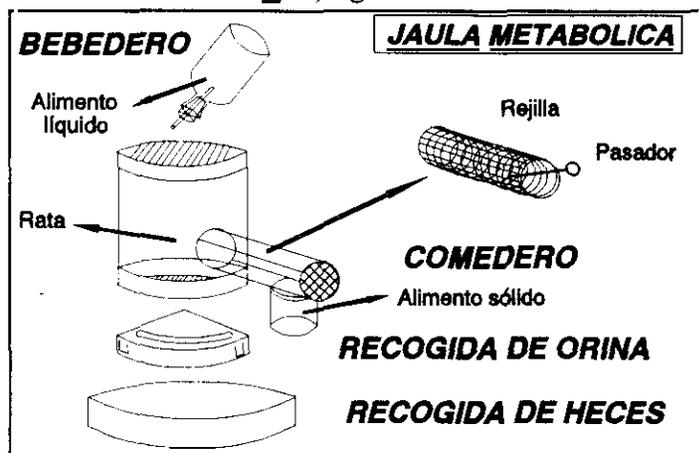
Nº = Nº del día experimental
 CI = Control de ingesta

PA = Período de adaptación
 PB = Período de balance

CP = Control de peso

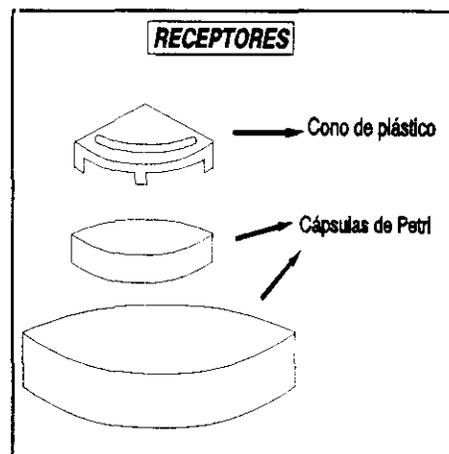
3.2. ANIMALES E INSTALACIONES

Se emplearon siempre ratas *Wistar*, machos y hembras en el primer ensayo y únicamente machos en la segunda y tercera pruebas, procedentes del Servicio de Animales del Centro Mixto Departamento de Nutrición y Bromatología I e Instituto de Nutrición CSIC-UCM (Facultad de Farmacia U.C.M.), seleccionadas entre las de una misma camada para cada prueba y para que el peso inicial medio en cada una fuera del mismo orden, con una DS máxima inicial de $\pm 2,0$ g.



ingesta, además de la recogida por separado de heces y orina.

En todas las pruebas se realizó un control diario de la ingesta y cada 48 horas del peso corporal de los animales lo que permitió el cálculo de la dosis de fármaco por Kg de peso. Las recogidas de heces y orina se realizaron en cápsulas de Petri concéntricas: una mayor para las heces y otra menor, en el interior de la misma, que contenía ácido sulfúrico diluido (4%) para la orina. A esta última cápsula se le adaptó un cono de plástico sobre el que se colocó un papel de filtro, empapado en el mismo ácido sulfúrico diluido, con el fin de evitar posibles pérdidas de nitrógeno. Durante los períodos de balance, se recogieron diariamente las heces y orinas, y se almacenaron individualmente en bolsas de plástico herméticas mantenidas en armario congelador a -30°C hasta la realización de los análisis.



En el experimento A se realizaron además, por un lado, en el último día del experimento la anestesia por inhalación de cloroformo, de 9 animales 3 correspondientes al lote control (CONTROL) sin fármaco, 3 correspondientes al lote que consumió dieta con caseína + DL-metionina (ACAP) y 3 al carente del suplemento de DL-metionina (ACAP DEF MET), ambas tratadas con acetaminofeno. A continuación, se extrajo rápidamente el hígado de los 9 animales, se colocaron sobre capa de hielo picado y se pesaron en balanza de precisión. El hígado se introdujo en formol al 7% en proporción 7/1 en volumen, para su posterior estudio histológico. También en el último día del experimento (día 43) se anestesió al resto de los animales por inhalación de cloroformo, se realizó la extracción y pesada rápida de los hígados, que congelamos inmediatamente por inmersión en N_2 líquido y mantuvimos en armario congelador a -30°C , hasta que se realizó la determinación de la actividad de enzimas transaminasas.

En el experimento B el día 32 que se corresponde con el último día del experimento se anestesió a los animales por inyección de pentobarbital sódico y se extrajeron hígados y sueros que se trataron (según procedimiento de preparación, ver apartado 3.4. Técnicas analíticas) para el análisis de contenido en S-Adenosilmetionina, S-Adenosilhomocisteína y folatos.

3.3. DIETAS UTILIZADAS Y ADMINISTRACION DE FARMACOS

3.3.1. Experimentos A y B:

Las dietas suministradas a los animales de experimentación en las dos primeras pruebas se prepararon en nuestro Departamento.

El proceso consistió en pesar cada componente por separado para ser homogéneamente mezclados. Los correctores vitamínico y mineral se realizaron independientes el uno a continuación del otro pero con la misma sistemática. Así, se pesaron los compuestos de menor a mayor peso para asegurar una mejor homogeneidad de mezcla de los mismos. A la grasa empleada (aceite de oliva) se le adicionó un conservante (BHT, 50 mg/Kg dieta) para evitar una posible reacción de oxidación. Posteriormente, todos los ingredientes se mezclan exhaustivamente para terminar con una doble tamización con dos luces de malla diferentes. Las dietas se prepararon en dos períodos diferentes dentro de cada prueba, uno al comienzo del experimento y otro al final del mismo para conseguir una buena conservación.

De este modo, en el primer ensayo se suministraron dos tipos de dietas semisintéticas isocalóricas del mismo nivel proteico pero diferenciadas en su contenido en DL-Metionina. Es importante destacar que, como es sabido, las necesidades de aminoácidos sulfurados de la rata en crecimiento no son cubiertas por el aporte de caseína y, por tanto, se complementa la proteína dietaria hasta las recomendaciones dietéticas para este animal con la cantidad necesaria de DL-Metionina. En el segundo tipo de dieta no existe este suplemento, pues el objetivo era estudiar precisamente, el efecto de una dieta deficiente de DL-Metionina en ratas tratadas con Acetaminofeno.

En la segunda prueba la dieta administrada a todos los animales fue dieta completa, es decir, la que contenía el suplemento adecuado de DL-metionina.

La composición por 100 g de sustancia seca de las dietas fue:

1ª - Dieta semisintética con el 12% de proteína (Caseína + DL-Metionina):

Caseína (*)	11,76
DL-Metionina	0,24
Grasa (aceite de oliva)	8,0
Celulosa microcristalina	5,0
Complemento mineral	3,343
Complemento vitamínico	0,1168
Almidón de trigo y sacarosa	al 50% c.s.p.

2ª - Dieta semisintética con el 12% de proteína (Caseína):

Caseína (*)	12
Grasa (aceite de oliva)	8,0
Celulosa microcristalina	5,0
Complemento mineral	3,343
Complemento vitamínico	0,1168
Almidón de trigo y sacarosa	al 50% c.s

(*) Casein alkalilöslich. E. Merck, Darmstadt. Contenido aproximado en sulfoaminoácidos 2,6 %.

La composición del complemento mineral (en mg para 100 g de dieta) fue la siguiente: IK 0,021; SO₄Cu.5H₂O 2,472; FNa 0,243; SO₄Fe.7H₂O 19,904; SO₄Mn.H₂O 16,904; ClNa 90,63; CO₃Mg 76,978; SO₄Mg.7H₂O 225,0; PO₄HCa 680,0; PO₄H₂K 820,0; PO₄H₂Na 226,45; CO₃Ca 1000,0; CO₃Zn 2,556; CO₃HK 610,343; SeO₃Na 0,024; CrO₄Na₂; 1,110.

La composición del complemento vitamínico (en mg/Kg de dieta) fue la siguiente: Vitamina A 1,514 mg; Vitamina D1 1111 UI; Vitamina E 33,33 mg; Vitamina K 0,055 mg; Colina 1111,11 mg de Cl; Acido fólico 1,11 mg; Niacina 22,22 mg; Pantotenato Ca 8,88 mg; Riboflavina 3,33 mg; Tiamina 4,44 mg; Vitamina B₆ 6,66 mg; Vitamina B₁₂ 0,055 mg.

3.3.2. Experimento C:

La dieta utilizada fue AIN-76A (American Institute of Nutrition, 1977) (Dyets Inc., 2508 Easton Avenue, P.O. Box A, Bethlehem, Pennsylvania 18017), con la siguiente composición (g/Kg): Caseína, 200; DL-Metionina, 3; almidón de maíz, 150; sacarosa, 500; celulosa, 50; aceite de oliva, 50; corrector mineral, 35; corrector vitamínico, 10; colina bitartrato, 2. La principal diferencia entre esta dieta y las de los experimentos A y B fue su contenido proteico formado en este caso por un 18% del total de la dieta y sin modificaciones en el contenido necesario de DL-metionina.

Administración de fármacos

Durante todos los experimentos se ajustó diariamente al peso del animal la dosis de fármaco y se mezcló homogéneamente con la dieta correspondiente. El ácido acetilsalicílico y el acetaminofeno se administraron como productos puros pulverizados y se obtuvieron de la Cooperativa Farmacéutica Española (COFARES, Madrid). La levodopa y carbidopa se administraron a partir de tabletas trituradas en mortero hasta pulverización (SINEMET, Merck, Sharp and Dohme de España, S.A.) cuya composición es de: carbidopa 25 mg, levodopa 250 mg y excipiente, c.s.

Las dosis administradas a los animales de cada experimento, las hemos obtenido a partir de la bibliografía revisada indicada para dosis humanas, a las que hemos aplicado los factores de conversión para dosificación equivalente. Estos factores se encuentran indicados en tablas en FREIREICH, G. y col. (1966) y proporcionan factores de conversión aproximados para convertir dosis expresadas en mg/Kg peso corporal en una especie a una dosis por superficie corporal equivalente expresada igualmente en mg/Kg peso corporal en otras especies. Las dosis reales aplicadas fueron:

En el experimento A:

- * Lote ASA: 448 ± 55 mg aspirina/Kg peso corporal
- * Lote ACAP: 573 ± 59 mg acetaminofeno/Kg peso corporal
- * Lote ACAP DEF MET: 410 ± 62 mg acetaminofeno/Kg peso corporal

En el experimento B:

- * Lote ASA: 450 mg aspirina/Kg peso corporal
- * Lote ACAP: 600 mg acetaminofeno/Kg peso corporal

En el experimento C:

- * Lote ACAP: 600 mg acetaminofeno/Kg peso corporal
- * Lote LD50: 50/5 mg levodopa/carbidopa/Kg peso corporal
- * Lote LD175: 175/17,5 mg levodopa/carbidopa/Kg peso corporal
- * Lote ACAP + LD50: 600/50/5 mg acetaminofeno/levodopa/carbidopa/Kg peso corporal
- * Lote ACAP + LD175: 600/175/17,5 mg acetaminofeno/levodopa/carbidopa/Kg peso corporal

3.4. TECNICAS ANALITICAS

Tanto en las dietas preparadas como en las heces y orinas obtenidas hemos tomado muestras alícuotas por triplicado y realizado las siguientes determinaciones:

HUMEDAD

Por pérdida de peso en estufa a 105°C hasta peso constante.

PROTEINA

Mediante la determinación de nitrógeno total por el método Kjeldahl y conversión a proteína multiplicando por el factor 6,25 (A.O.A.C., 1975).

EXTRACTO ETereo

Por el método Soxhlet, utilizando el sistema Soxtec de extracción (Mod.1040. Tecator, Suecia). La extracción se realizó con éter de petróleo (punto de ebullición entre 40 y 60°C) y pesada, previa desecación total, del extracto etéreo.

Para los análisis bioquímicos tisulares se han utilizado las siguientes técnicas:

GLUTAMATO PIRUVATO TRANSAMINASA (GPT) Y GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA (GOT) EN HIGADO:

Se determinaron por el *método standard* comercializado por Boehringer Mannheim GmbH (Nº referencia 124354).

El procedimiento consistió en pesar aproximadamente y por triplicado 1 g de hígado y llevarlos a 20 ml con solución tampón a 0°C y pH=7,4 formado por ClNa 0,15M y CO₃HNa 0,005M. A continuación, se trituraron con un homogenizador de tejidos (ULTRA-TORRAX, Janke and Kunkel KG, IKA WECK) durante 45 segundos, hasta conseguir un perfecto homogeneizado. El siguiente paso consistió en centrifugar las muestras durante 10 minutos a 3000 r.p.m. y a 4°C, separando el sobrenadante resultante con una pipeta Pasteur. De dicho sobrenadante se ensayaron distintas diluciones para que la concentración de enzima entrase dentro de la curva de calibrado previamente establecida. Todas las operaciones de manipulación de las muestras se realizaron sobre capa de hielo picado. Posteriormente se efectuaron las lecturas en un espectrofotómetro (PU 8620 UV/VIS/NIR Philips) a una longitud de onda de 546 nm.

EXTRACCION Y ANALISIS DEL ACIDO FOLICO Y DERIVADOS EN HIGADO:

Para la extracción de ácido fólico en hígado y cerebro se siguió el procedimiento de SELHUB, J y col. 1988, se tomaron alícuotas de aproximadamente 1 g, se trocearon finalmente, y se incluyeron en 10 volúmenes de una solución tampón que contenía: 10 mmol/L 2-mercaptoetanol y 2% ascorbato sódico en 0,1 mol/L [bis (2-hidroxietil) imino] tris (hidroximetil)-metano a pH 7,85. Después de 15 minutos sometidos a cocción, los tubos que contenían las muestras se enfriaron en baño de hielo, se homogeneizaron las muestras, y se centrifugaron a 20000 rpm (36000 g) durante 15 minutos. Los sobrenadantes resultantes se introdujeron en vacutainers y se mantuvieron así a 70°C hasta el posterior análisis de folatos.

El análisis de los folatos tisulares se realizó usando un método reciente que combina Cromatografía de Afinidad y HPLC de par iónico para la determinación de la concentración y distribución de los folatos (VARELA-MOREIRAS, G. y col. 1991b). El procedimiento

consiste en varios pasos:

- * Purificación, mediante cromatografía de afinidad, de la proteína láctea de alta afinidad con el ácido fólico (PAF) a partir de suero comercial pulverizado.
- * Fijación de la PAF purificada mediante reacción con bromuro de cianógeno (CNBr) a la Sefarosa 4B activada.
- * Purificación de los folatos procedentes de los extractos tisulares mediante el empleo de la preparación de PAF-Sefarosa como una matriz de afinidad.
- * Análisis cromatográfico de la preparación de folato purificada mediante HPLC de par iónico el cual se encuentra conectado a un sistema de detección UV de diodos.

El proceso comienza con la preparación de la columna de folato Sefarosa:

Lo primero fue activar la Sefarosa para ello, se mezclaron 400 ml de Sefarosa 4B con 400 ml de agua mediante agitación magnética y a la suspensión se le adicionaron 30 g de CNBr. Se adicionó lentamente NaOH 5 M para ajustar el pH entre 10-11 y se utiliza hielo para mantener la temperatura alrededor de 20°C. Cuando se ha disuelto totalmente el CNBr en estas condiciones, se considera que la activación ha terminado, se procedió entonces a la filtración en vacío de la suspensión y posteriormente al lavado con solución de NaHCO₃ 0,1 M en frío. A la Sefarosa activada se le hizo reaccionar con 1,6-diaminohexano (1,8 g) disuelto previamente en 400 ml de NaHCO₃ 0,1 M y a pH 9. La mezcla se agitó durante 48 horas en una habitación fría, posteriormente se vuelve a filtrar y lavar con bicarbonato sódico y finalmente se resuspende a temperatura ambiente en 400 ml de NaHCO₃ 0,1 M.

Continuamos con la unión del folato a la Sefarosa, así, a la suspensión de Sefarosa se le añadió una suspensión de 4 g de ácido fólico en 50 ml de agua y NaOH 1 N, se agitó y ajustó el pH a 8,5. En este momento se añadió 4 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida-HCl a temperatura ambiente y se procedió a agitación continua durante 3 horas y se mantuvo durante 48 horas en habitación fría. La suspensión se lavó y se separó el folato no unido con 4 litros de ClNa 2 M que contenía buffer de fosfato potásico 0,05 M y pH 7, 2 litros de agua, 1 litro de ácido acético 0,2 M y 2 litros de agua. Finalmente la matriz de Sefarosa se resuspendió en un volumen igual de agua, se introdujo en la columna (7 × 40 cm), se lavó en 1 litro de buffer de fosfato potásico 1 M de pH 7 y con 1 litro de agua. La columna ya estaba preparada.

El siguiente paso consistió en la purificación de PAF desde suero de leche desecado: 4 Kg de suero se suspendieron en 8 litros de agua y se ajustó el pH a 7 con NaOH 5 M, se sometió a centrifugación (10 min a 20000 g) y la fracción sobrenadante se introdujo en la columna folato-Sefarosa anteriormente preparada a temperatura ambiente. Se procedió al lavado de la columna con 2 litros de ClNa 1 M que contenía 0,05 M Tris ClH, a pH 7,4 seguido de 1 litro de agua. La PAF absorbida se eluyó con ácido acético 0,2 M. Durante el lavado ácido se controló el pH del efluente y cuando llegó a ser ácido, se separó una fracción de 300 ml, de los cuales 0,2 ml se reservó para la determinación de la actividad de la PAF y el resto se liofilizó. La columna folato-Sefarosa se regeneró por lavado con 400 ml de buffer de fosfato potásico 1 M de pH 7,4 y con 1 litro de agua. Este proceso se repitió utilizando una serie de 9 fracciones más de suero.

A continuación se determinó la actividad de la PAF:

Para ello se prepararon dos mezclas: una de ácido fólico [³H] (20-40 μCi/nmol, Amersham, Arlington Heights, IL) con ácido fólico no marcado a la radiactividad específica deseada, y otra llamada dextrano cubierto de carbón, en la que 1 g de dextrano T20 se disolvió en 100 ml de agua y se añadieron 2,5 g de carbón ácido lavado (Norit A) se agitó

durante una hora y se guardó refrigerada.

El procedimiento consiste en mezclar en un tubo 0,1 ml de buffer de fosfato potásico 1M y pH 7,4, 0,05 ml de la solución de ácido fólico [^3H], 0,1 ml de albúmina sérica bovina, suficiente PAF para unir 2-30 pmol de ácido fólico y agua hasta un volumen final de 1 ml. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron finalmente a la mezcla de incubación 0,25 ml de la suspensión dextrano cubierto de carbón y se procedió a centrifugación (10 min 2000 g). 0,5 ml del sobrenadante se analizó en contador de líquido de centelleo y la actividad de la PAF se determina por la siguiente formula:

Unidades de PAF/ml proteína = $2,5 \text{ (dpm-blanco)/V(SA)}$

Siendo: V = volumen en ml de la solución original de proteína PAF añadida a la mezcla de incubación y SA = la actividad específica de la solución de ácido fólico [^3H] utilizada en dpm/pmol (desintegraciones por minuto).

La siguiente fase consistió en preparar la matriz PAF-Sefarosa:

La columna PAF-Sefarosa debe tener una capacidad para al menos 25-50 Kilounidades (30-60 nmol) por ml de volumen y sabemos que tenemos aproximadamente 5000 Kilounidades a partir de las 10 preparaciones séricas. Se procedió a la suspensión en 250 ml de NaHCO_3 0,1 M de las preparaciones de PAF purificada que se encontraban como polvo liofilizado. Se activó aproximadamente 1ml de Sefarosa por cada 50-70 Kilounidades de PAF, que se suspendió en 50 ml de NaHCO_3 y se mezcló con la solución de PAF. Se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y se mantuvo durante 48 horas a 4°C. Se procedió al lavado de la matriz con 2 litros de ClNa 2 M en Tris Cl 0,05 M a pH 7,4, 1 litro de agua, 2 litros de ácido trifluoroacético 0,02 M, 2 litro de buffer fosfato potásico 0,05 M pH 7,4 y finalmente con 1 litro de agua. La Sefarosa se suspendió en un volumen igual de azida de sodio al 0,3% y se guardó en nevera.

En este punto, se procedió a la purificación de los folatos extraídos del hígado por cromatografía de afinidad:

Para ello, a una alícuota del sobrenadante con aproximadamente 2-15 nmol de folato total se le adicionó una cantidad traza de ácido fólico tritiado (0,2 μCi ácido fólico [^3H]; Amersham, Arlington Heights, IL) y se aplicó sobre la columna de afinidad de 1 ml compuesta por Sefarosa 4B y PAF. Después de su uso, la columna se lavó con 5 ml de ácido trifluoroacético 0,02 M, 5 ml de agua y 5 ml de buffer fosfato potásico 1 M pH 7,4. y después de la aplicación de cada muestra la columna se lavó con 10 ml del mismo buffer seguido de 10 ml de agua. El folato absorbido eluía por la columna con ácido trifluoroacético 0,02 M que contenía ditioeritritol 10 mM, para ello previamente se lava la columna con 1 ml de esta solución descartándose la fracción de lavado. Los siguientes 1,5 ml incluyen la fracción ácida, que se recogió en un tubo por separado y se neutralizó a pH 7,5 por la adición de 0,02 ml de piperazina 1 M. A una alícuota de 0,05 ml se le realizó el recuento de radioactividad para determinar la recuperación de folato. Si la recuperación es menor del 85% es inaceptable y la purificación debe repetirse con una fracción menor de sobrenadante.

Finalmente se procedió al análisis de los folatos:

Una alícuota de 1ml se empleó para el análisis de la distribución de los folatos y se empleó para ello HPLC combinada con un sistema de detección de diodos. Las características del sistema HPLC son una columna C-18 Econosphere (5 μ , 4,6 \times 100 mm) y un gradiente formado por dos soluciones que contenían: 5 mM fosfato de tetrabutylamonio, 0,5 mM

ditioeritritol, y 25mM ClNa. La solución A se hizo con agua y la solución B con un 65% de acetonitrilo y 35% de agua. La columna se equilibró con una mezcla que contenía 90% de A y 10% de B y se mantuvo un flujo constante de 1ml/min. Las características del sistema de detección de diodos son que controla la actividad del folato en la columna y es capaz de determinar simultáneamente la absorción a 280, 350 y 258nm.

Con este método, los diferentes folatos quedan registrados según el número de residuos de glutamato. Por lo tanto, aquellos que tienen el mismo número de glutamatos se registran en un mismo grupo, con tres diferentes fracciones: grupo 1, que contiene 10-formiltetrahidrofolatos, tetrahidrofolatos y dihidrofolatos; grupo 2 formado por 5-formiltetrahidrofolatos, y grupo 3 formado por 5-metiltetrahidrofolatos. En el análisis espectral el tiempo de retención no es suficiente para la identificación de todos los folatos, esto es así, pues en un mismo área pueden haber eluido más de un compuesto perteneciente al mismo grupo, y se requiere una característica diferencial espectral específica que nos proporciona el sistema de detección de diodos. Finalmente para la identificación de los compuestos derivados del anillo pteridínico se realizó según los valores observados en las lecturas de absorción UV a 258 y 350 nm, que son diferentes para cada grupo estructural.

Para la determinación cuantitativa se procedió como sigue: los folatos reducidos y tritiados fueron sometidos a cromatografía de par iónico y se analizaron las fracciones recogidas para estimar el contenido de [^3H] folato bajo cada pico de área. De estos cromatogramas se obtuvieron valores de coeficientes molares del pico expresados como picos de área integrados para cada derivado pteridínico. La concentración de folato contenida en cada pico se puede determinar basada en estos coeficientes pues, el coeficiente molar del pico esta definido en unidades de pico de área integradas por nmol de folato. Estas áreas integradas son reproducibles solo si la tasa de flujo de la fase móvil se mantiene constante.

Las determinaciones fueron realizadas en el « Vitamin Bioavailability Laboratory » perteneciente al Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston (EEUU).

EXTRACCION Y ANALISIS DE S-ADENOSILMETIONINA (SAM) Y DE S-ADENOSILHOMOCISTEINA (SAH) EN HIGADO:

La extracción de SAM y SAH se realizó mediante el método de FELL, D. y col. (1985) ligeramente modificado utilizando HPLC de fase reversa. Los hígados congelados se homogeneizaron en 2 volúmenes con ácido perclórico 0,4 M, se centrifugaron 10 min a 9000 g. Los sobrenadantes obtenidos se guardan a -70°C hasta el análisis de la concentración de SAM y SAH.

Se ajustó el pH con hidróxido potásico hasta 6,5-7,5 y cuando finalizó la precipitación de la sal de perclorato, los 2 ml de sobrenadante neutralizados se aplicaron a un cartucho de Sep-Pak C_{18} que habíamos cargado con 1ml de metanol y lavado con agua. Los eluyentes fueron 1,2 ml de ácido acético 0,175 M, seguido de 3 ml de metanol al 25% en ácido acético 0,175 M. La fase estacionaria fue $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ (5 μm , $300 \times 9,9$ mm). La fase móvil fue ácido octanosulfónico 5mM en metanol al 5%, pH 4,0. Se utilizaron 100 μl como muestra para el HPLC y finalmente se detectó la absorbancia de cada compuesto a 254 nm.

Las determinaciones fueron realizadas en el « Vitamin Bioavailability Laboratory » perteneciente al Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston (EEUU).

3.5. HISTOLOGIA. ESTUDIO MORFOLOGICO DEL HIGADO.

Las muestras de hígado fueron introducidas en botes de plástico y conservadas en formol al 7% fueron analizadas en el laboratorio del Dr. Santiago Oya del Departamento de Biología Celular (Facultad de Medicina) de la U.C.M.

Las muestras de hígado se procesaron para su observación con microscopía óptica. Para ello describiremos el procedimiento que se siguió para la realización de esta técnica.

METODO DE MICROSCOPIA OPTICA

La técnica empleada fue un método de rutina frecuentemente utilizado en este departamento durante mucho tiempo y revisado ya, desde 1949, por ADDISON, W.H.F.

1.- Fijación. La fijación de los hígados se realizó mediante inmersión en formalina neutra tamponada al 10%. La solución se preparó con la siguiente sistemática:

Disolver en 1 litro de formalina al 10%: 4 g de fosfato ácido de sodio monohidratado y 6,5 g de fosfato disódico anhidro y a pH de la disolución 6,5-7,5.

3.- Inclusión en parafina. Previamente se procedió al lavado y deshidratación de las piezas con alcohol etílico de graduación creciente.

2.- Método de tinción. Las piezas fueron fijadas en formol al 10% teñidos con hematoxilina y eosina (HEINDENHAIN, M. 1896) como sigue:

- Colorantes empleados:

- Hematoxilina de Carazzi, preparada de la siguiente forma:

En mortero añadir 0,5 g de Hematoxilina, 0,1 g de iodato potásico y 25 g de alumbre potásico (sulfato aluminico potásico), mezclar y pulverizar. Añadir 100 ml de glicerina bidestilada, mezclar bien; añadir poco a poco 400 ml de agua bidestilada. Mover hasta conseguir una mezcla homogénea, con disolución de todos los componentes. Poner en frasco transparente a la luz para su maduración (aproximadamente 10 días). Filtrar antes de usar.

- Eosina alcohólica, se preparó una solución inicial de conservación ilimitada, del siguiente modo: Disolver 1 g de eosina Y amarilla (soluble en agua) en 20 ml de agua destilada. Posteriormente añadir y disolver 80 ml de etanol de 95° ó 96°. La solución de trabajo se obtuvo mezclando una parte de la solución inicial anterior con 3 partes de etanol de 80°. Antes de su uso, añadir 0,5 ml de ácido acético glacial a cada 100 ml de la mezcla de colorante.

- Procedimiento de tinción:

- Desparafinar mediante empleo de alcoholes de distinta graduación e hidratar con agua.

- Tratar con hematoxilina de Carazzi, 10 minutos.

- Lavar con agua del grifo circulante, 10 minutos.

- Contrastar con la eosina alcohólica, de 30 segundos a 2 minutos (depende del envejecimiento de la eosina).

- Deshidratar con alcoholes, aclarar con xileno y montar el corte.

Posteriormente los materiales de estudio fueron procesados para su observación con microscopía electrónica. Para ello describiremos sucesivamente los distintos procedimientos que se siguieron para la realización de esta técnica.

METODO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

1. Fijación:

Para la fijación se emplearon dos tipos de soluciones fijadoras, el glutaraldehído tamponado con cacodilato (SABATINI, D.D. y col., 1963) y el tetróxido de osmio tamponado (RHODIN, J., 1954).

a). Glutaraldehído tamponado con cacodilato:

Glutaraldehído al 12,5%	10 c.c.
Solución de cacodilato sódico 0,1 M	10 c.c.; pH resultante 7,4.

b) Solución de tetróxido de osmio tamponado:

Se preparó mezclando a partes iguales la solución de tetróxido de osmio y de tampón, que a continuación describimos:

Solución de tetróxido de osmio

Tetróxido de osmio	0,1 g
Agua bidestilada	5 c.c.

(Se mantiene durante 8 horas para que se disuelva el tetróxido de osmio).

Solución de tampón

Acetato sódico	1,904 g en 100 c.c. de agua bidestilada libre de CO ₂
Veronal sódico	2,58 g en 100 c.c. de agua bidestilada libre de CO ₂
Acido clorhídrico	0.1 N 100 c.c.; pH resultante 7,4

Para la realización de la fijación, los productos obtenidos fueron previamente fijados en glutaraldehído tamponado en el que se mantuvieron por espacio de dos horas y posteriormente en tetróxido de osmio. El glutaraldehído se conserva antes y durante el fijado bajo refrigeración. A continuación, el producto se lavó en solución tampón o en tampón sacarosa, durante 5 a 10 minutos y posteriormente se fijaba en tetróxido de osmio tamponado, por espacio de una hora.

2. Inclusión

Utilizamos, para la inclusión del tejido, los métodos Vestopal (RYTER, A. y KELLENBERGER, E., 1958), Epon (LUFT, J.H., 1961) y Araldita (MAALOE, O. y BIRCH-ANDERSEN, A., 1956).

a) Método del Vestopal

Después de fijado el producto se realizaron los siguientes pasos destinados a deshidratar el tejido:

Lavado en tampón	10-15 minutos
Acetona al 50%	15-30 "
Acetona al 70%	30 "
Acetona al 90%	60 "
Acetona al 100%	60 "

En este momento se puede incluir el material en la sustancia comercial Vestopal. Es este un producto que tiene la propiedad de polimerizar, haciéndose sólido en determinadas condiciones; para ello es necesario prepararlo del siguiente modo:

Vestopal	20 c.c.
Iniciador Vestopal	0,2 c.c.
Activador Vestopal	0,1 c.c.

Después de agitado con varillas de vidrio y sedimentado, se mezcló una parte del producto con tres partes de acetona (100%), y a continuación se introdujo en él los fragmentos tisulares que acabamos de extraer de la acetona al 100%. Los tejidos, introducidos ya en Vestopal mezclado con las tres partes de acetona, se dejaron al descubierto durante dos horas, con lo cual se produce evaporación de la acetona. Ya en el Vestopal puro se procedió al traslado de los productos de punción a las cápsulas de gelatina (GILEV, V.P., 1958) situándolos en su base. Después de cuatro horas de permanencia en medio ambiente, se introducen en estufa a 60°C, donde permanecerán 48 horas, con lo cual quedó la inclusión en Vestopal finalizada.

b) Método de Epon:

Después de fijado el producto de punción se procedió a la deshidratación con alcoholes:

Alcohol al 50%	10 minutos
Alcohol al 70%	10 "
Alcohol al 80%	10 "
Alcohol al 96%	20 "
Alcohol al 100%	60 "

A continuación se hacen los siguientes pasos:

Oxido de propileno	15 minutos
Mezcla de Epon y Oxido de Propileno a partes iguales	12 horas (T ^a ambiente)
Mezcla definitiva	48 horas (en estufa a 60° C)

La obtención de la solución definitiva del Epon se realizó de la siguiente forma:

Mezcla A:	Epon	31 c.c.
	D.D.S.A.	50 c.c.
Mezcla B:	Epon	50 c.c.
	M.N.A.	45 c.c.
Mezcla definitiva: 10 c.c. de A + 20 c.c. de B + 0,47 de catalizador DMP. 30.		

c) Método Araldita:

Una vez fijados los productos de punción en glutaraldehido se lavaron tres veces en solución buffer, de la siguiente forma:

- 1° lavado (5-10 minutos)
- 2° lavado (5-10 minutos)
- 3° lavado (12 horas)
- Postfijación:

Después del último baño en buffer se pasaron a solución de osmio al 1% en buffer fosfato y se dejaron en esta solución de media hora a 2 horas. A continuación se decantaron el fijador (solución de osmio-buffer fosfato) y se lavaron tres veces con buffer, dejándolos en éste último cinco minutos cada vez.

- Deshidratación:

Acetona al 30%	.15 minutos
Acetona al 50%	.dos pases de 15 minutos cada uno
Acetona al 70% + Acetato de Uranilo al 2%	.12 horas
Acetona al 100%	.dos pases de 15 minutos cada uno
Acetona al 100% desecada con SO ₄ Cu deshidratado	.dos pases de 15 minutos cada uno
Oxido de propileno	.dos pases de 15 minutos cada uno

- Inclusión:

Mezcla de Durcopan I + Oxido de propileno (1-3)	60 minutos
Mezcla de Durcopan I + Oxido de propileno (1-1)	60 "
Mezcla de Durcopan I + Oxido de propileno (3-)	12 horas
Mezcla de Durcopan I	2-4 horas
Mezcla de Durcopan I	12 "
Mezcla de Durcopan II	1 "

A continuación se introdujeron los tejidos en cápsulas de gelatina (GILEV, V.P., 1958) y llenar éstas con Durcopan II, manteniéndolas en estufa a 70-75°C, durante 48-50 horas.

Preparación de la mezcla Durcopan I:

Componente B (Azul)	10 c.c.
Componente A/M (Rojo)	10 c.c.
Componente D (Verde)	0,1-0,2 c.c.

Preparación de la mezcla Durcopan II:

Componente B (Azul)	10 c.c.
Componente A/M (Rojo)	10 c.c.
Componente D (Verde)	0,1-0,2 c.c.
Componente C (Amarillo)	0,3-0,4 c.c.

La preparación de las mezclas ha de realizarse añadiendo los componentes por el orden citado.

El motivo de haber utilizado tres tipos de inclusión diferentes, fue porque hemos observado que cuando usábamos el Vestopal, los cortes ultrafinos vistos al microscopio electrónico con pequeños aumentos tenían un gran contraste, mientras que, a grandes aumentos, las membranas celulares se hacían difuminadas. Con el Epon ocurría lo contrario. También hemos podido apreciar que con el método Epon, en el contraste de los cortes es imprescindible usar un plomo preparado de una forma extraordinariamente meticulosa, ya que de no proceder así, se produce un fino punteado que entorpece la visión y priva de nitidez la microfotografía. El tercer método, la Araldita, da también una gran nitidez a las membranas y permite su estudio fundamentalmente a aumentos intermedios.

3. Corte

Después de quitar la cápsula de gelatina a los bloques formados, se sostuvieron éstos en un soporte, de tal forma que pueda visualizarse con el microscopio estereoscópico la zona donde hemos situado el tejido. Con una cuchilla se quita la resina de los lados de la pieza, y mediante un corte horizontal la situada por encima de ésta. De esta forma el tejido queda

situado en la punta de una pirámide más o menos truncada. A continuación, se colocó el bloque en un ultramicrotomo y se procedió al corte.

Hemos utilizado el Ultramicrotomo LKB, empleando cuchillas de vidrio fabricadas con aparato LKB. Los cortes obtenidos en balsa de agua, formada en la cuchilla, según método ya muy clásico, fueron seleccionados antes de ser utilizados, aprovechando únicamente los de color grisáceo o plateado, es decir, los de un espesor que oscila entre 500 y 900 Å. Después de extendidos los cortes, cambiando momentáneamente la tensión superficial mediante vapores de éter, cloroformo o xilol, son recogidos en las clásicas rejillas.

De todas las muestras procuramos efectuar cortes de control de buen grosor, para ser observados al microscopio óptico y servirnos de orientación. Estos cortes fueron obtenidos con el Ultramicrotomo LKB mediante el dispositivo especial para tal fin y la tinción de las muestras fue con Azul de Metileno.

4. Contraste de cortes ultrafinos:

Las soluciones utilizadas fueron descritas respectivamente por WATSON (1958) Y REYNOLDS, E.S. (1963):

a) Acetato de uranilo

A 20 c.c. de agua bidestilada se le añadió acetato de uranilo, calentando lentamente al mismo tiempo. Se dejó de añadir uranilo cuando el líquido toma color amarillo tenue.

b) Citrato de plomo	2,66 g
Citrato de sodio deshidratado	3,52 g
Agua bidestilada	60,0 c.c.

Agitar intensamente durante 30 minutos y añadir a continuación 16 c.c. de NaOH 1/N.

Forma de realización:

Los cortes fueron contrastados en solución de acetato de uranilo por espacio de 20 minutos. A continuación fueron lavados en agua bidestilada, secados y contrastados en citrato de plomo durante tres minutos. El exceso de plomo puede eliminarse mediante una solución al 0,2% de hidróxido sódico.

5. Observación

Los cortes así obtenidos fueron estudiados en un microscopio electrónico Philips 201 que pertenece al Servicio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

3.6. PARAMETROS E INDICES CALCULADOS

* **INGESTA SOLIDA E INCREMENTO DE PESO**

-Coeficiente de Eficacia Alimentaria (CEA)

$$\text{CEA} = \frac{\text{Incremento de peso del animal (g/día)}}{\text{Ingesta total (g sustancia seca/día)}}$$

* **UTILIZACION NUTRITIVA DE LA PROTEINA Y COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA**

-Coeficiente de Digestibilidad del Nitrógeno (CDN): Relación porcentual de la cantidad de nitrógeno absorbido del ingerido. El nitrógeno absorbido se ha determinado por diferencia entre el ingerido y el fecal total

$$\text{CDN} = \frac{I - F}{I}$$

I = Nitrógeno ingerido total
F = Nitrógeno fecal total

-Coeficiente de Eficacia Proteica para el Crecimiento (CEP): Expresa, numéricamente, la ganancia de peso corporal en relación con la cantidad de proteína ingerida.

$$\text{CEP} = \frac{\text{Ganancia de peso corporal}}{\text{Cantidad de proteína consumida (N x 6,25)}}$$

- Coeficiente de Utilización Metabólica del Nitrógeno (CUM): Se refiere al tanto por ciento de nitrógeno retenido del absorbido. El nitrógeno retenido se ha determinado por diferencia entre el absorbido y el eliminado por orina.

$$\text{CUM} = \frac{I - (F + U)}{I - F}$$

U = Nitrógeno urinario total

- Coeficiente de Utilización Neta del Nitrógeno (CUN): Expresa, globalmente, la utilización digestiva y metabólica de nitrógeno por el organismo. Es el tanto por ciento de nitrógeno retenido del ingerido.

$$\text{CUN} = \frac{I - (F + U)}{I}$$

*** UTILIZACION DIGESTIVA DE LA GRASA**

-Coefficiente de Digestibilidad de la Grasa (CDG): Relación porcentual de la cantidad de grasa absorbida de la ingerida. La grasa absorbida se determinó por diferencia entre la ingerida y la fecal total:

$$\text{CDG} = \frac{\text{GI} - \text{GF}}{\text{GI}}$$

GI = Grasa ingerida.
GF = Grasa fecal total.

*** PARAMETROS Y DETERMINACIONES HEPATICAS Y SERICAS:**

-Indice Hepatosomático (IHS):

$$\text{IHS} = \frac{\text{Peso de hígado (g)}}{\text{Peso corporal total del animal (g)}}$$

- Transaminasas (GOT y GPT):

Determinadas como ya hemos indicado y expresadas en UI/g de hígado.

- Concentración de S-adenosilmetionina y S-adenosilhomocisteína:

Determinadas como ya hemos indicado y expresadas en nmol/g de hígado.

- Concentración y distribución de los folatos:

Determinadas como ya hemos indicado y expresada para el suero en ng/ml de suero y para el hígado en nmol/g de órgano.

3.7. TRATAMIENTO ESTADISTICO

Los resultados en el experimento A y B se trataron estadísticamente mediante el test de la *T de Student* y se estableció el nivel de significación: $P \leq 0,05$. En el caso del análisis del contenido y distribución de folatos, se utilizó además, es test de ajuste de Bonferroni (DAVID, H.A. 1980).

Los resultados del experimento C se trataron estadísticamente con análisis de varianza mediante ANOVA de una vía.

4.- RESULTADOS

EXPERIMENTO A

- * Efectos de la administración de ácido acetilsalicílico y acetaminofeno durante 43 días con ingestas "ad libitum", sobre algunos parámetros nutricionales y bioquímicos. Tratamiento estadístico.
- * Efecto de la deficiencia dietética de metionina, con administración prolongada (43 días) de acetaminofeno, sobre algunos parámetros nutricionales y determinaciones hepáticas relativas a la toxicidad producida por el fármaco. Tratamiento estadístico.

TABLA 1
PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (43 DIAS)

LOTE CONTROL

RATA Nº	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
1	57	2,4	8,0	0,30	7,4	53,8
2	56	1,5	7,6	0,20	6,0	48,9
3	55	2,0	8,4	0,24	8,0	55,9
4	57	1,4	8,1	0,17	5,5	47,5
5	58	2,2	8,4	0,27	7,0	52,2
6	59	1,2	7,8	0,15	5,2	47,1
7	57	2,4	8,5	0,29	8,0	49,3
8	59	2,4	8,2	0,30	6,6	49,4
9	60	2,4	9,7	0,24	6,7	41,3
10	55	2,1	8,1	0,27	6,2	48,6
MEDIA	57,3	2,0	8,3	0,24	6,6	49,4
± DS	±1,7	±0,5	±0,6	±0,05	±1,2	±4,2

TABLA 2
PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (43 DIAS)

LOTE ACIDO ACETILSALICILICO

RATA Nº	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
11	59	0,8	5,6	0,14	4,3	46,7
12	60	0,5	5,6	0,10	3,4	40,6
13	58	0,8	6,1	0,13	4,2	50,0
14	58	0,6	5,8	0,11	4,2	49,0
15	60	0,3	5,1	0,06	3,9	53,9
16	58	1,2	6,0	0,21	3,5	35,0
17	58	1,2	5,8	0,21	4,4	43,7
18	58	1,4	7,2	0,19	4,1	34,8
19	56	1,0	6,2	0,16	3,6	39,9
20	57	1,5	7,6	0,20	6,5	52,8
MEDIA	58,2	0,9	6,1	0,15	4,4	43,7
± DS	±1,2	±0,4	±0,8	±0,05	±1,1	±7,2

PESO I = Peso inicial

S.S.I. = Dieta ingerida en sustancia seca

CEA = Coeficiente de eficacia alimentaria

PESO H = Peso del hígado

IHS = Indice hepatosomático

TABLA 3
PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (43 DIAS)

LOTE ACETAMINOFENO

RATA Nº	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
21	60	1,9	7,7	0,25	5,9	46,8
22	55	1,4	6,8	0,20	5,4	47,0
23	60	1,3	6,8	0,19	6,2	54,3
24	60	1,5	7,8	0,20	7,1	62,8
25	60	2,0	8,5	0,24	6,5	44,5
26	57	2,3	8,8	0,26	7,7	49,5
27	56	1,1	7,0	0,16	5,4	52,1
28	60	1,8	8,8	0,20	7,5	54,9
29	58	1,5	7,4	0,20	5,9	48,2
30	56	1,8	8,9	0,21	6,0	50,2
MEDIA	58,2	1,6	7,9	0,21	6,4	51,5
± DS	±2,0	±0,4	±0,8	±0,03	±0,9	±5,4

TABLA 4
PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (43 DIAS)

LOTE ACETAMINOFENO DEFICIENTE EN METIONINA

RATA Nº	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
31	60	0,9	6,3	0,14	4,9	50,5
32	55	0,6	5,6	0,10	4,4	55,0
33	59	1,1	7,0	0,16	4,7	48,3
34	57	0,4	5,1	0,09	4,9	64,4
35	58	0,7	4,6	0,16	3,0	51,5
36	59	1,1	6,9	0,16	5,4	51,1
37	59	0,3	4,7	0,06	3,2	45,3
38	58	0,8	5,2	0,16	4,4	50,6
39	60	0,5	5,2	0,09	3,6	45,2
40	59	0,4	5,0	0,09	3,3	44,2
MEDIA	58,4	0,7	5,6	0,12	4,4	50,6
± DS	±1,5	±0,3	±0,9	±0,04	±0,8	±6,3

PESO I = Peso inicial

S.S.I. = Dieta ingerida en sustancia seca

CEA = Coeficiente de eficacia alimentaria

PESO H = Peso del hígado

IHS = Indice hepatosomático

TABLA 5
PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (43 DIAS)

RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO

LOTE	PESO i (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
CONTROL:						
MEDIA	57,3	2,0	8,3	0,24	6,6	49,4
± DS	±1,7	±0,5	±0,6	±0,05	±1,2	±4,2
ASA:						
MEDIA	58,2	0,9	6,1	0,15	4,4	43,7
± DS	±1,2	±0,4 ^a	±0,8 ^a	±0,05 ^a	±1,1 ^a	±7,2
ACAP:						
MEDIA	58,2	1,6	7,9	0,21	6,4	51,5
± DS	±2,0	±0,4	±0,8	±0,03	±0,9	±5,4
ACAP DEF MET:						
MEDIA	58,4	0,7	5,6	0,12	4,4	50,6
± DS	±1,5	±0,3 ^b	±0,9 ^b	±0,04 ^b	±0,8 ^b	±6,3

ASA = Acido acetilsalicílico

ACAP = Acetaminofeno

ACAP DEF MET = Acetaminofeno y deficiencia en metionina

PESO I = Peso inicial

S.S.I. = Dieta ingerida en sustancia seca

CEA = Coeficiente de eficacia alimentaria

PESO H = Peso del hígado

IHS = Indice hepatosomático

Los resultados están expresados como valor medio ± DS para 10 animales por lote; **a** = $p \leq 0,05$, cuando se compara con el lote control, **b** = $p \leq 0,05$, lote ACAP DEF MET significativamente diferente cuando se compara con el lote ACAP.

FIGURA 1. EVOLUCION DIARIA DE LA INGESTA SOLIDA EN EL LOTE CONTROL.

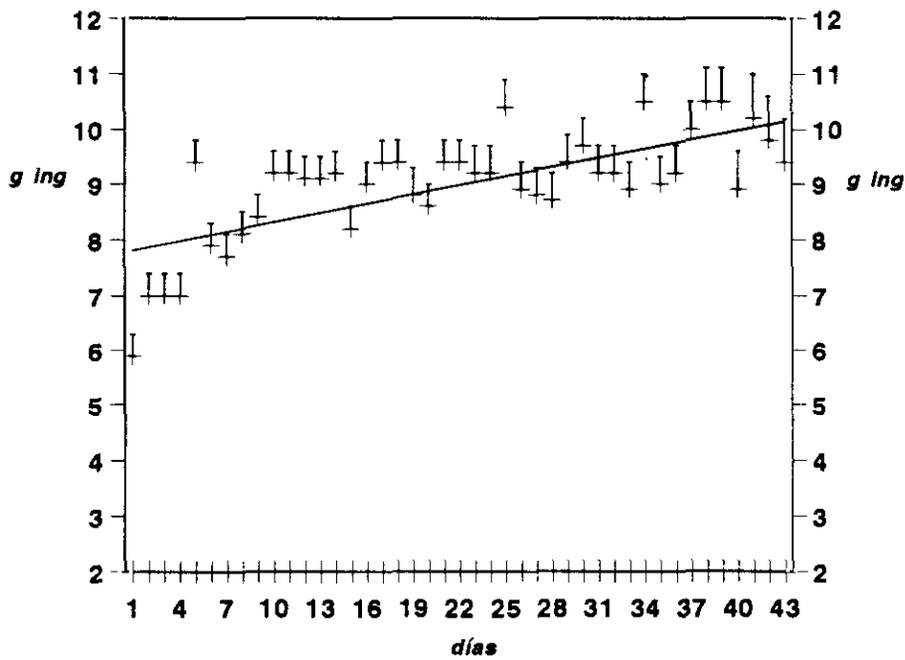
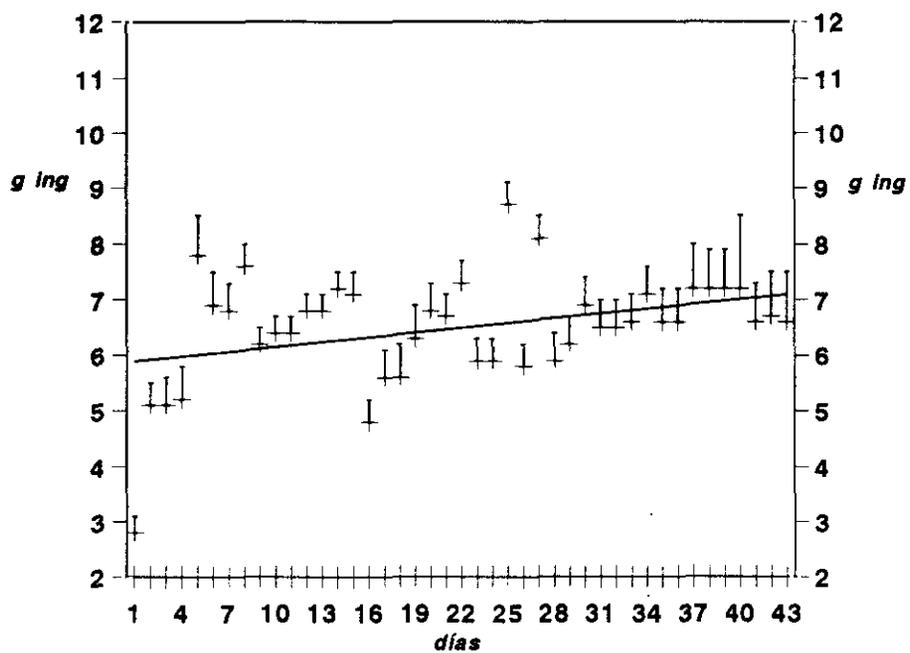


FIGURA 2. EVOLUCION DIARIA DE LA INGESTA SOLIDA EN EL LOTE ACIDO ACETILSALICILICO.



Los resultados están expresados como valor medio \pm error estándar por lote y día.

FIGURA 3. EVOLUCION DIARIA DE LA INGESTA SOLIDA EN EL LOTE ACETAMINOFENO.

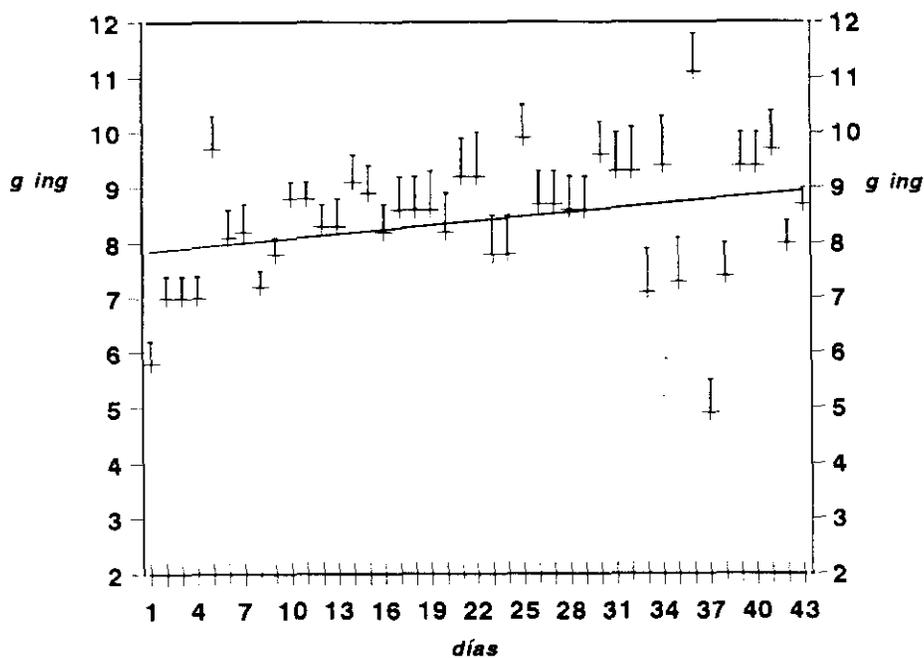
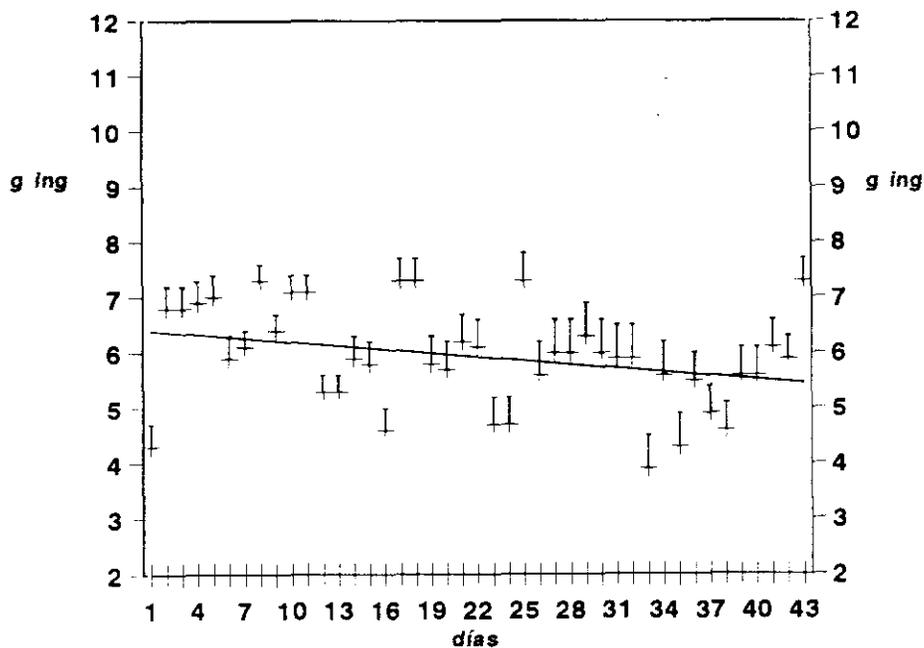


FIGURA 4. EVOLUCION DIARIA DE LA INGESTA SOLIDA EN EL LOTE ACETAMINOFENO DEFICIENTE EN METIONINA.



Los resultados están expresados como valor medio \pm error estándar por lote y día.

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DEL NITROGENO (CDN)

LOTE CONTROL

TABLA 6

DIAS 4-11			
RATA N°	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
1	138	10	0,93
2	150	10	0,93
3	165	11	0,93
4	183	16	0,91
5	148	8	0,95
6	177	11	0,94
7	142	10	0,93
8	165	11	0,93
9	168	14	0,92
10	158	9	0,94
MEDIA ± DS	159 ± 14,8	11 ± 2,3	0,93 ± 0,01

TABLA 7

DIAS 34-43			
RATA N°	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
2	168	13	0,92
3	176	16	0,91
4	155	12	0,92
6	161	14	0,91
7	202	12	0,94
9	221	16	0,93
MEDIA ± DS	181 ± 25,8	14 ± 1,9	0,92 ± 0,01

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DEL NITROGENO (CDN)

LOTE ACIDO ACETILSALICILICO

TABLA 8

DIAS 4-11			
RATA N°	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
11	138	11	0,92
12	126	6	0,95
13	133	11	0,92
14	107	9	0,91
15	110	9	0,92
16	123	8	0,94
17	127	7	0,95
18	131	8	0,94
19	125	7	0,95
20	153	11	0,93
MEDIA ± DS	127 ± 13,1	9 ± 1,8	0,93 ± 0,01

TABLA 9

DIAS 34-43			
RATA N°	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
11	105	7	0,94
12	99	6	0,94
14	127	10	0,92
15	103	9	0,91
18	176	14	0,92
20	175	14	0,92
MEDIA ± DS	131 ± 35,9	10 ± 3,6	0,93 ± 0,01

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DEL NITROGENO (CDN)

LOTE ACETAMINOFENO

TABLA 10

DIAS 4-11			
RATA N°	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
21	157	9	0,94
22	133	9	0,93
23	134	11	0,92
24	161	13	0,92
25	161	8	0,95
26	150	8	0,95
27	158	9	0,95
28	172	10	0,94
29	169	10	0,94
30	191	15	0,92
MEDIA ± DS	159 ± 17,3	10 ± 2,4	0,94 ± 0,01

TABLA 11

DIAS 34-43			
RATA N°	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
22	147	8	0,94
23	139	10	0,93
25	166	13	0,92
26	185	12	0,93
27	148	9	0,94
28	177	13	0,92
29	139	9	0,93
MEDIA ± DS	157 ± 18,9	11 ± 2,1	0,93 ± 0,01

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DEL NITROGENO (CDN)

LOTE ACETAMINOFENO DEFICIENTE EN METIONINA

TABLA 12

DIAS 4-11			
RATA N°	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
31	147	10	0,93
32	142	11	0,92
33	144	10	0,93
34	131	9	0,93
35	103	9	0,91
36	132	8	0,94
37	119	8	0,93
38	122	9	0,93
39	123	9	0,92
40	112	7	0,94
MEDIA ± DS	127 ± 14,5	9 ± 1,4	0,93 ± 0,01

TABLA 13

DIAS 34-43			
RATA N°	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
31	132	11	0,91
32	94	8	0,91
34	91	6	0,93
36	134	9	0,93
37	85	7	0,91
39	92	7	0,93
MEDIA ± DS	104 ± 22,0	8 ± 2,1	0,92 ± 0,01

**COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DEL NITROGENO (CDN)
RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO**

TABLA 14

DIAS 4-11			
LOTE	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
CONTROL	159 ± 14,8	11 ± 2,3	0,93 ± 0,01
ASA	127 ± 13,1	9 ± 1,8	0,93 ± 0,01
ACAP	159 ± 17,3	10 ± 2,4	0,94 ± 0,01
ACAP DEF MET	127 ± 14,5	9 ± 1,4	0,93 ± 0,01

TABLA 15

DIAS 34-43			
LOTE	N INGERIDO (mg/día)	N FECAL (mg/día)	CDN
CONTROL	181 ± 25,8	14 ± 1,9	0,92 ± 0,01
ASA	131 ± 35,9	10 ± 3,6	0,93 ± 0,01
ACAP	157 ± 18,9	11 ± 2,1	0,93 ± 0,01
ACAP DEF MET	104 ± 22,0	8 ± 2,1	0,92 ± 0,01

Los resultados están expresados como valor medio ± desviación estándar.

ASA = Acido acetilsalicílico

ACAP = Acetaminofeno

ACAP DEF MET = Acetaminofeno y deficiencia en metionina

TABLA 16

COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA PARA EL CRECIMIENTO (CEP)

LOTE CONTROL

RATA N°	CEP I	CEP II	CEP III	CEP IV	CEP V	CEP TOTAL
1	2,84	2,13	2,03	(-)	(-)	2,35
2	2,93	1,56	1,49	0,82	1,27	1,61
3	3,88	1,97	1,36	1,23	1,16	1,93
4	3,27	1,39	0,91	0,59	0,81	1,33
5	3,23	2,40	1,72	(-)	(-)	2,11
6	2,41	2,69	0,66	0,52	0,23	1,21
7	3,44	2,07	1,78	2,04	2,04	2,28
9	2,95	2,55	0,97	1,65	1,56	1,93
10	3,95	1,61	1,28	(-)	(-)	2,09
MEDIA	3,21	2,04	1,35	1,14	1,18	1,87
± DS	±0,50	±0,45	±0,45	±0,61	±0,62	±0,40

TABLA 17

COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA PARA EL CRECIMIENTO (CEP)

LOTE ACIDO ACETILSALICILICO

RATA N°	CEP I	CEP II	CEP III	CEP IV	CEP V	CEP TOTAL
11	3,01	0,13	1,45	0,76	0,69	1,08
12	1,07	1,08	1,05	1,18	-0,02	0,78
13	2,89	0,34	0,13	(-)	(-)	0,99
14	1,33	1,47	1,20	0,52	0,87	0,88
15	2,23	0,16	0,88	0,45	0,88	0,44
16	2,84	1,85	0,91	(-)	(-)	1,63
18	2,12	0,77	1,70	1,70	1,51	1,52
19	2,82	0,02	1,39	(-)	(-)	1,27
20	3,07	1,72	1,47	0,67	1,83	1,59
MEDIA	2,37	0,94	1,13	0,88	0,95	1,13
± DS	±0,74	±0,69	±0,47	±0,48	±0,65	±0,40

PERIODOS (días): I = 4-11; II = 12-19; III = 20-27; IV = 28-35; V = 36-43; T = 4-43

TABLA 18

COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA PARA EL CRECIMIENTO (CEP)

LOTE ACETAMINOFENO

RATA Nº	CEP I	CEP II	CEP III	CEP IV	CEP V	CEP TOTAL
21	2,93	1,24	1,67	1,85	(-)	1,93
22	2,19	1,46	0,34	1,88	1,62	1,62
23	1,66	1,77	1,45	1,64	0,92	1,46
24	2,79	1,61	1,29	0,15	(-)	1,55
25	3,01	1,54	1,65	1,93	0,87	1,86
26	3,13	2,05	1,93	1,13	1,32	2,04
27	2,42	0,65	0,52	0,92	1,31	1,24
28	2,90	1,03	1,56	1,26	0,89	1,60
29	2,91	0,79	1,37	0,92	1,35	1,59
30	3,02	1,24	0,81	1,49	(-)	1,61
MEDIA	2,70	1,34	1,26	1,32	1,18	1,65
± DS	±0,46	±0,44	±0,53	±0,56	±0,29	±0,23

TABLA 19

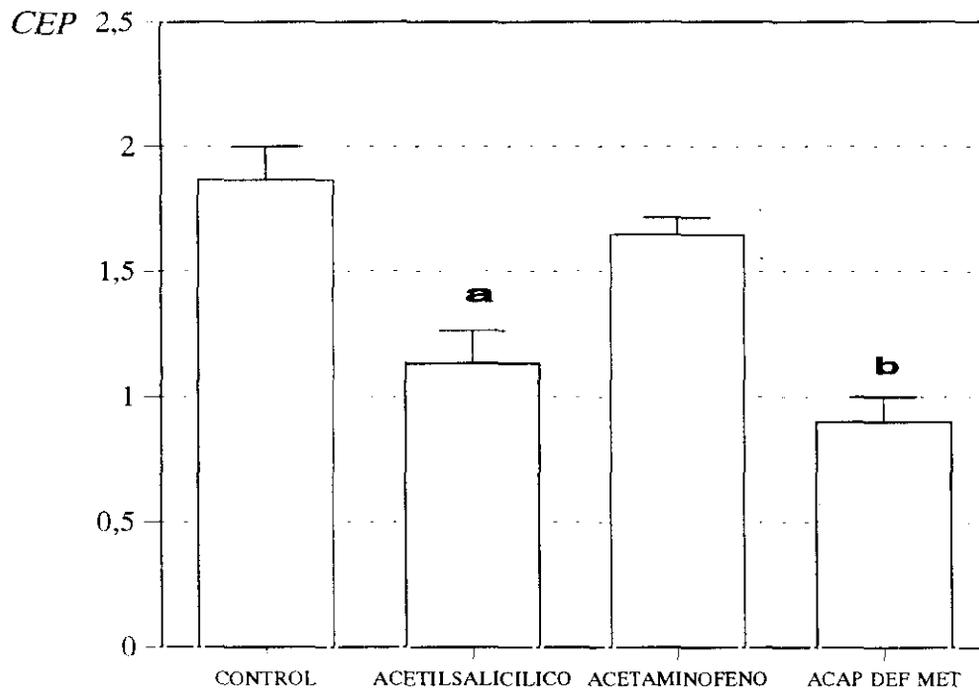
COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA PARA EL CRECIMIENTO (CEP)

LOTE ACETAMINOFENO DEFICIENTE EN METIONINA

RATA Nº	CEP I	CEP II	CEP III	CEP IV	CEP V	CEP TOTAL
31	1,81	0,46	0,44	1,48	0,94	1,08
32	1,94	0,19	0,31	1,02	0,64	0,81
33	2,24	0,87	1,07	1,20	(-)	1,24
34	1,51	0,53	0,49	0,77	-0,05	0,69
35	0,12	0,38	0,58	-1,02	(-)	1,23
36	0,88	1,49	1,08	1,27	0,70	1,25
37	1,87	0,53	0,64	-0,16	0,75	0,45
39	1,61	0,84	0,64	0,29	0,64	0,69
40	0,92	1,33	0,92	0,47	(-)	0,70
MEDIA	1,43	0,73	0,68	0,59	0,60	0,94
± DS	±0,67	±0,44	±0,28	±0,80	±0,34	±0,30

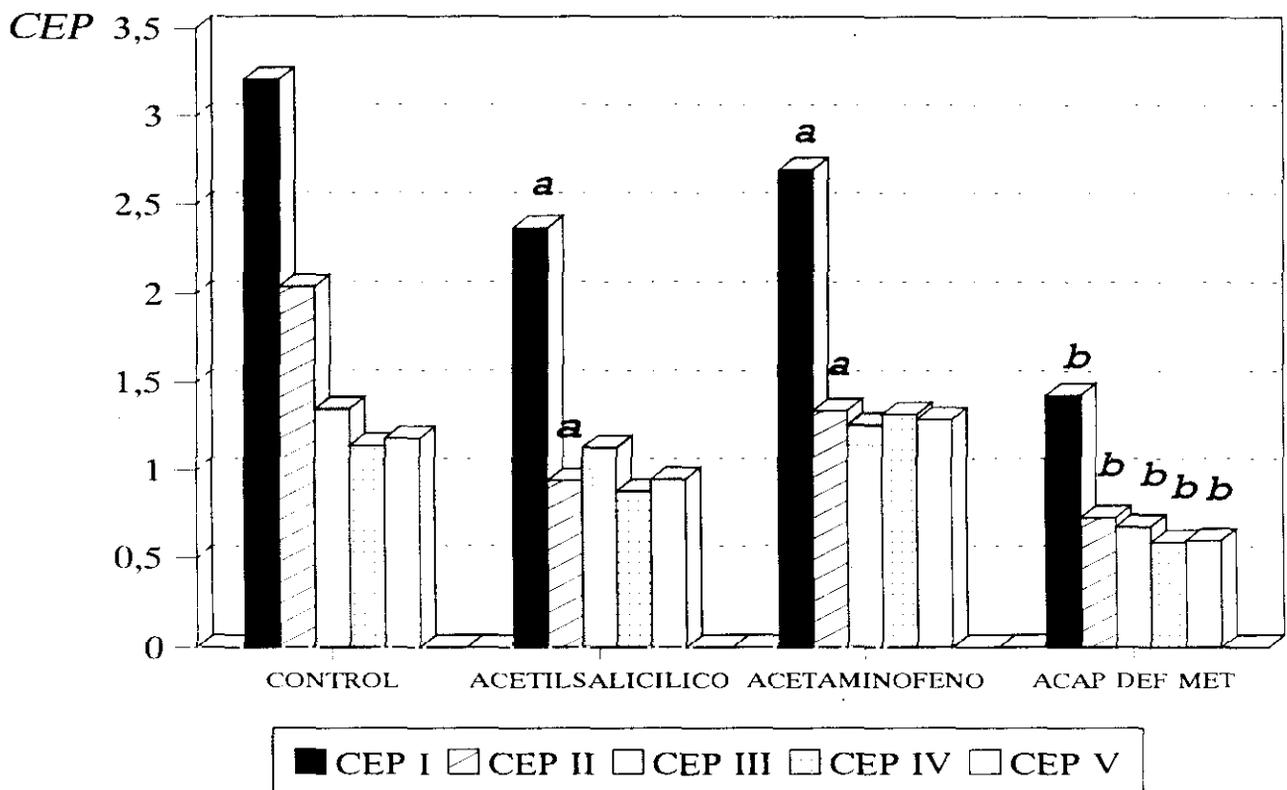
PERIODOS (días): I = 4-11; II = 12-19; III = 20-27; IV = 28-35; V = 36-43; T = 4-43

FIGURA 5. COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA PARA EL CRECIMIENTO (CEP) GLOBAL Y SEMANAL.



Los resultados están expresados como valor medio \pm error estándar por lote.
 a = significativo frente al lote control ($p \leq 0,05$), b = significativo frente al lote acetaminofeno ($p \leq 0,05$).

PERIODOS (días): I = 4-11; II = 12-19; III = 20-27; IV = 28-35; V = 36-43; T = 4-43
 ACAP DEF MET = Acetaminofeno deficiente en metionina.



COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LA GRASA (CDG)

LOTE CONTROL

TABLA 20

DIAS 4-11			
RATA N°	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
1	567	9	0,98
2	617	9	0,99
3	679	12	0,98
4	751	14	0,98
5	610	9	0,99
6	727	10	0,99
7	581	9	0,98
8	679	11	0,98
9	689	10	0,98
10	647	10	0,98
MEDIA ± DS	655 ± 60,9	10 ± 1,7	0,98 ± 0,00

TABLA 21

DIAS 34-43			
RATA N°	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
2	692	13	0,98
3	621	20	0,97
4	637	10	0,98
6	661	13	0,98
7	831	15	0,98
9	908	17	0,98
MEDIA ± DS	742 ± 105,8	15 ± 3,5	0,98 ± 0,00

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LA GRASA (CDG)

LOTE ACIDO ACETILSALICILICO

TABLA 22

DIAS 4-11			
RATA N°	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
11	569	10	0,98
12	519	6	0,99
13	547	17	0,97
14	441	12	0,97
15	454	12	0,97
16	505	7	0,99
17	521	9	0,98
18	539	9	0,98
19	512	11	0,98
20	630	20	0,97
MEDIA ± DS	524 ± 54,1	11 ± 4,4	0,98 ± 0,00

TABLA 23

DIAS 34-43			
RATA N°	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
11	430	4	0,99
12	407	5	0,99
14	520	9	0,98
15	425	8	0,98
18	724	14	0,98
20	717	14	0,98
MEDIA ± DS	537 ± 147,3	9 ± 4,3	0,98 ± 0,00

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LA GRASA (CDG)

LOTE ACETAMINOFENO

TABLA 24

DIAS 4-11			
RATA N°	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
21	645	10	0,98
22	547	10	0,98
23	549	16	0,97
24	661	44	0,93
25	660	11	0,98
26	617	12	0,98
27	650	9	0,99
28	705	10	0,99
29	692	11	0,98
30	786	21	0,97
MEDIA ± DS	652 ± 70,7	15 ± 10,6	0,97 ± 0,02

TABLA 25

DIAS 34-43			
RATA N°	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
22	602	9	0,98
23	569	12	0,98
25	684	15	0,98
26	761	12	0,98
27	610	9	0,98
28	729	8	0,99
29	571	15	0,97
MEDIA ± DS	647 ± 77,8	11 ± 2,9	0,98 ± 0,01

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LA GRASA (CDG)

LOTE ACETAMINOFENO DEFICIENTE EN METIONINA

TABLA 26

DIAS 4-11			
RATA N°	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
31	555	14	0,97
32	636	14	0,97
33	544	11	0,98
34	495	6	0,99
35	389	6	0,98
36	500	7	0,98
37	449	5	0,99
38	455	9	0,98
39	462	11	0,97
40	422	9	0,98
MEDIA ± DS	511 ± 89,9	9 ± 3,1	0,98 ± 0,01

TABLA 27

DIAS 34-43			
RATA N°	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
31	497	25	0,95
32	356	10	0,97
34	342	10	0,97
36	504	10	0,98
37	321	6	0,98
39	348	6	0,98
MEDIA ± DS	395 ± 82,8	11 ± 7,0	0,97 ± 0,01

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD DE LA GRASA (CDG)

RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO

TABLA 28

DIAS 4-11			
LOTE	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
CONTROL	655 ± 60,9	10 ± 1,7	0,98 ± 0,00
ASA	524 ± 54,1	11 ± 4,4	0,98 ± 0,01
ACAP	652 ± 70,7	15 ± 10,6	0,97 ± 0,02
ACAP DEF MET	511 ± 89,9	9 ± 3,1	0,98 ± 0,01

TABLA 29

DIAS 34-43			
LOTE	GRASA INGERIDA (mg/día)	GRASA FECAL (mg/día)	CDG
CONTROL	742 ± 105,8	15 ± 3,5	0,98 ± 0,00
ASA	537 ± 147,3	9 ± 4,3	0,98 ± 0,00
ACAP	647 ± 77,8	11 ± 2,9	0,98 ± 0,01
ACAP DEF MET	395 ± 82,8	11 ± 7,0	0,97 ± 0,01

Los resultados están expresados como valor medio ± desviación estándar.

ASA = Acido acetilsalicílico

ACAP = Acetaminofeno

ACAP DEF MET = Acetaminofeno y deficiencia en metionina

TRANSAMINASAS HEPATICAS

UI/g = Actividad enzimática en Unidades Internacionales por gramo de órgano.

TABLA 30: LOTE CONTROL

RATA N°	GPT (UI/g)	GOT (UI/g)
2	10	16
3	10	24
4	9	16
6	11	49
7	8	41
9	14	35
MEDIA ± DS	10 ± 2,3	30 ± 13,4

TABLA 31: LOTE ACIDO ACETILSALICILICO

RATA N°	GPT (UI/g)	GOT (UI/g)
11	13	50
12	16	63
14	10	37
15	12	50
18	13	53
20	9	46
MEDIA ± DS	12 ± 2,9	50 ± 10,8

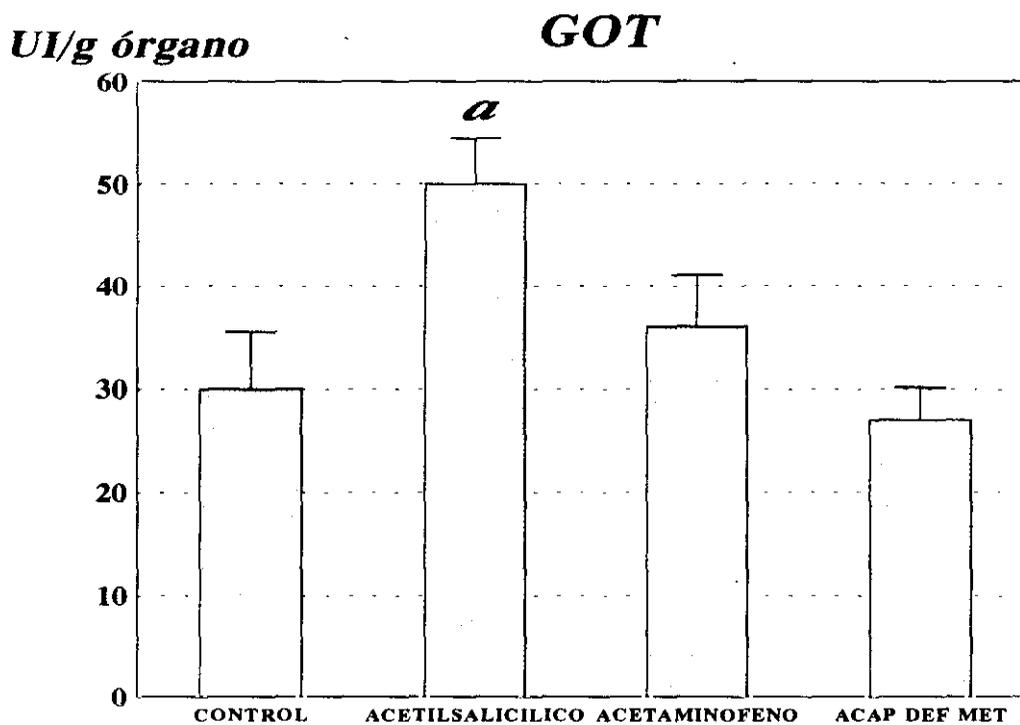
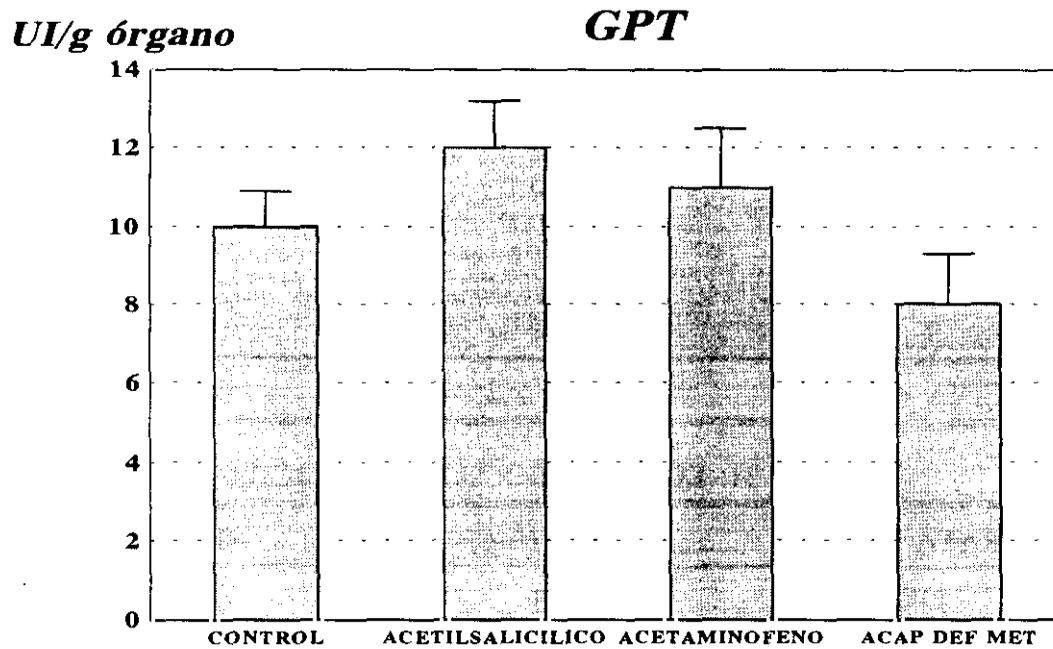
TABLA 32: LOTE ACETAMINOFENO

RATA N°	GPT (UI/g)	GOT (UI/g)
22	7	58
23	9	32
25	10	26
26	11	41
27	17	33
28	8	19
29	16	46
MEDIA ± DS	11 ± 3,9	36 ± 13,5

TABLA 33: LOTE ACETAMINOFENO DEFICIENTE EN METIONINA

RATA N°	GPT (UI/g)	GOT (UI/g)
31	9	19
32	10	23
34	4	39
36	5	30
37	6	31
39	11	19
MEDIA ± DS	8 ± 3,1	27 ± 7,9

FIGURA 6. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TRANSAMINASAS HEPATICAS.



ACAP DEF MET = acetaminofeno y deficiencia en metionina.

Los resultados están expresados como valor medio \pm error estándar por lote.

a = significativo frente al lote control ($p \leq 0,05$).

UI/g órgano = Actividad enzimática en Unidades Internacionales por gramo de órgano.

Microscopía óptica

En el estudio histológico las preparaciones observadas del lote control son normales completamente, como vemos en la Figura 7 mientras que en los lotes tratados con acetaminofeno aparecen distintos grados de degeneración en función de que se les haya administrado suficiente metionina o no.

En el lote acetaminofeno (ACAP) encontramos hepatocitos con citoplasma vacuolizado (Figura 8).

En el lote acetaminofeno con deficiencia en metionina (ACAP DEF MET) encontramos en el parénquima hepático extensas zonas de necrosis (Figura 9), así como ligeros infiltrados mononucleares alrededor de los vasos. (Figura 10).

Microscopía electrónica

En el estudio estructural de los hígados del lote ACAP se aprecia una vacuolización del citoplasma celular (Figuras 11 y 12) evidenciándose algunas células que conservan restos citoplasmáticos de mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso.

En el estudio ultraestructural de los hígados del lote ACAP DEF MET se aprecian los hepatocitos (Figura 13), con gran abundancia de retículo endoplásmico rugoso en situación perinuclear con mitocondrias de matriz densa y gránulos de glucógeno (Figura 14). El núcleo está constituido por cromatina laxa evidenciándose los nucleolos.

FIGURA 7. PREPARACION DE UN CORTE DE HIGADO CORRESPONDIENTE AL LOTE CONTROL.

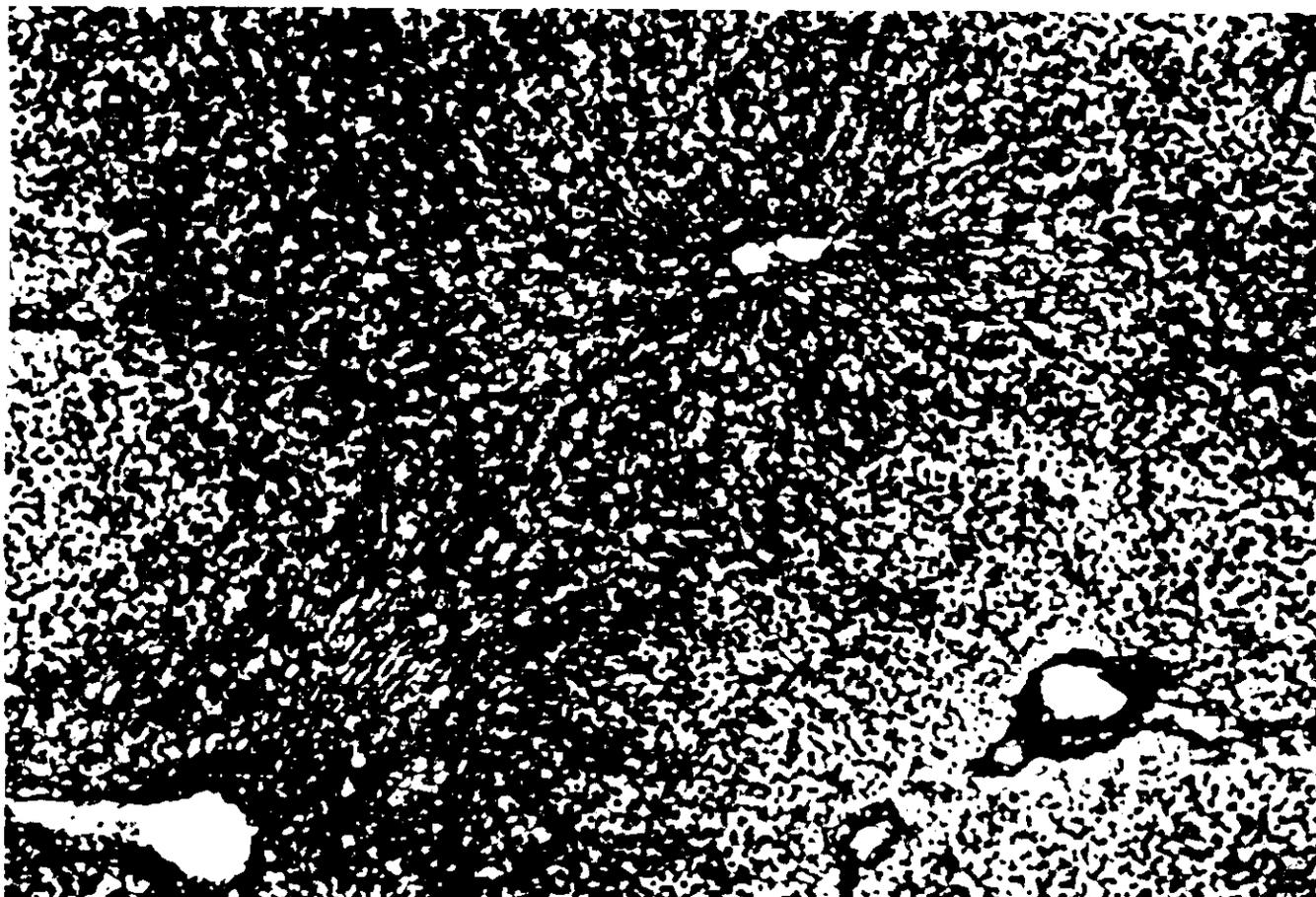


FIGURA 8. PREPARACION DE UN CORTE DE HIGADO CORRESPONDIENTE AL LOTE ACETAMINOFENO.

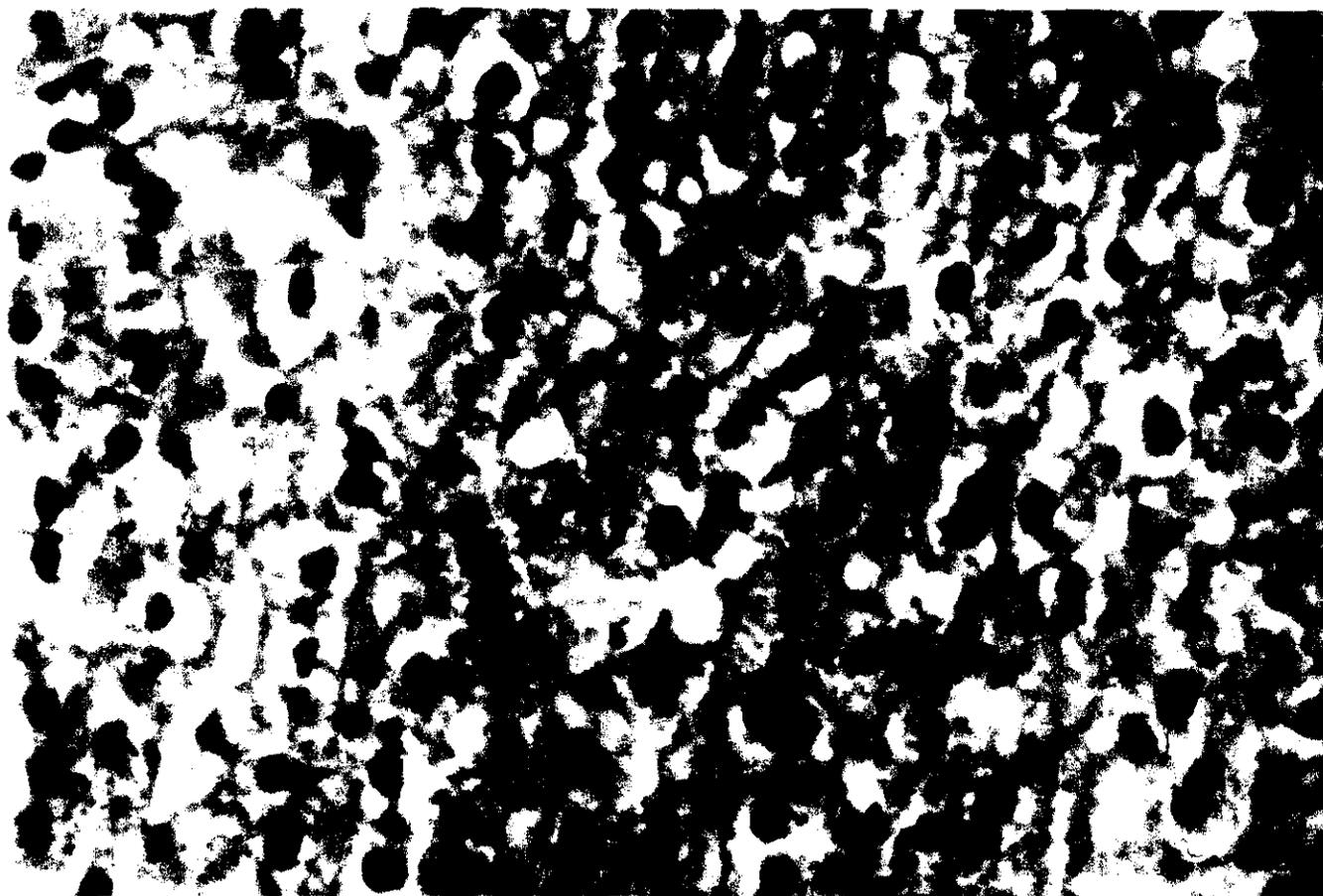


FIGURA 9. PREPARACION DE UN CORTE DE HIGADO CORRESPONDIENTE AL LOTE ACETAMINOFENO DEFICIENTE EN METIONINA.



FIGURA 10. PREPARACION DE UN CORTE DE HIGADO CORRESPONDIENTE AL LOTE ACETAMINOFENO DEFICIENTE EN METIONINA.

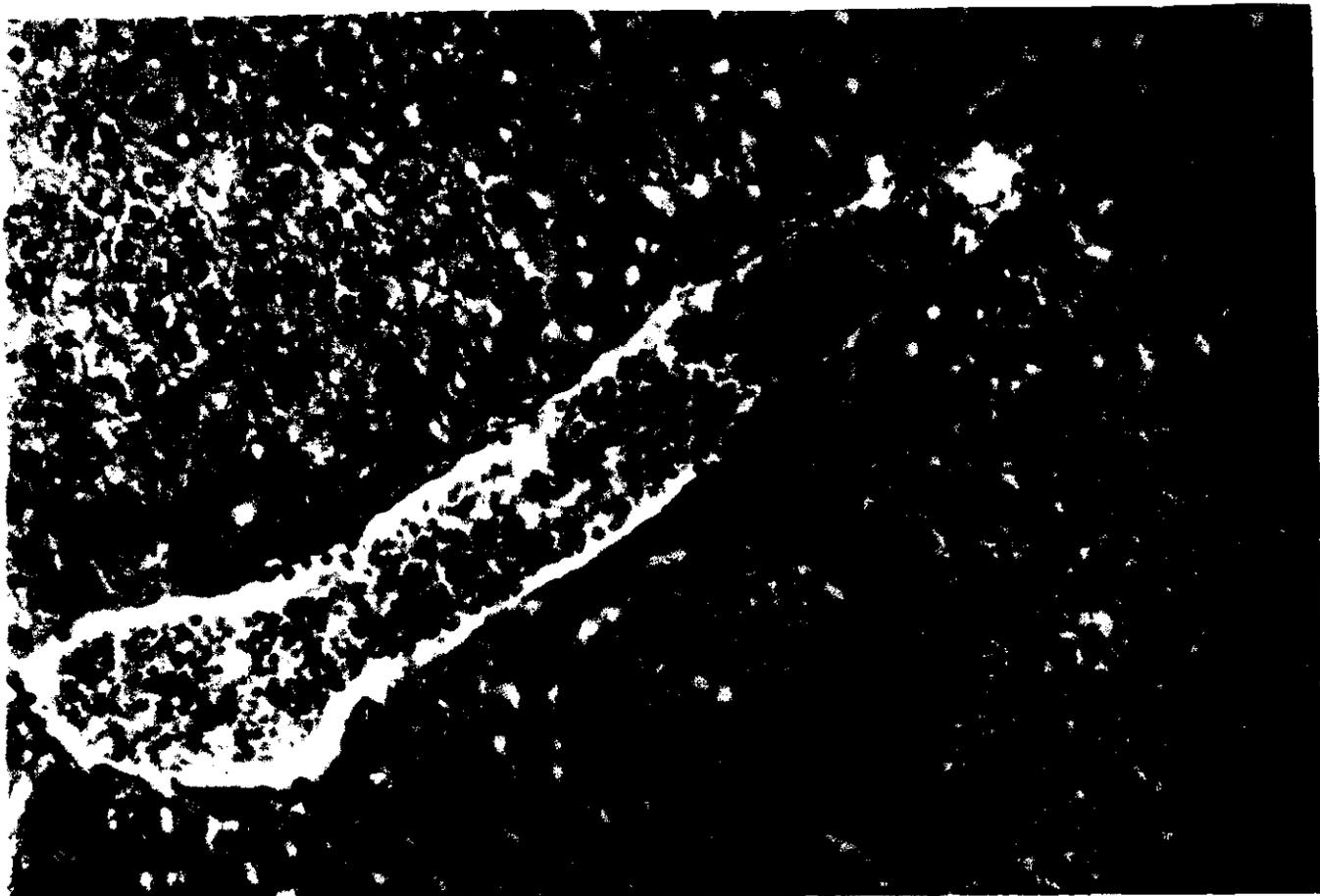
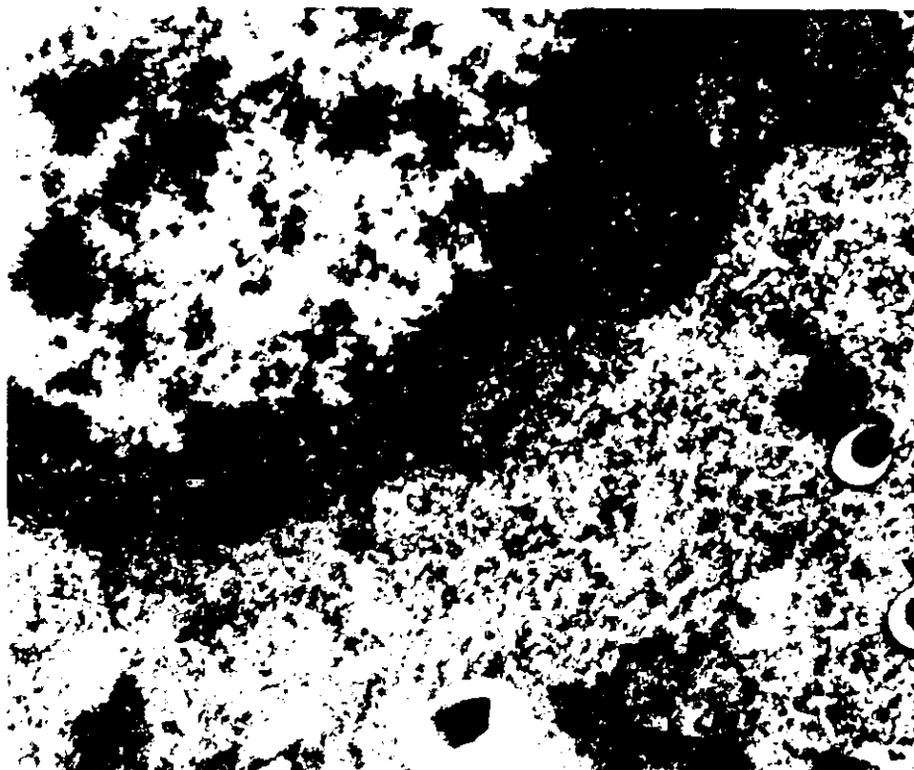


FIGURA 11. MICROFOTOGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO CORRESPONDIENTE AL LOTE ACETAMINOFENO.



FIGURA 14. MICROFOTOGRAFIA DE UN CORTE DE HIGADO CORRESPONDIENTE AL LOTE ACETAMINOFENO CON DEFICIENCIA EN METIONINA.



EXPERIMENTO B

Efecto de la administración de ácido acetilsalicílico y de acetaminofeno durante 32 días, con ingestas pareadas, sobre algunos parámetros nutricionales generales y algunos intermediarios metabólicos de la ruta de transmetilación-transulfuración de la metionina y los folatos. Tratamiento estadístico.

**PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (32 DIAS)
TABLA 34
LOTE CONTROL "AD LIBITUM"**

RATA Nº	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
1	46	4,3	12,0	0,36	12,199	67,8
2	47	5,4	13,7	0,39	10,980	51,2
3	47	5,7	14,7	0,39	12,301	54,7
4	50	5,3	13,7	0,38	12,081	56,6
5	46	5,5	15,2	0,36	13,703	63,4
6	45	3,0	10,2	0,30	6,999	50,1
MEDIA	46,8	4,9	13,2	0,36	11,377	57,3
± DS	± 1,7	± 1,0	± 1,8	± 0,03	± 2,313	± 7,0

**TABLA 35
LOTE ACIDO ACETILSALICILICO**

RATA Nº	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
7	47	2,3	9,4	0,24	6,193	52,5
8	48	2,6	9,4	0,28	6,829	52,6
9	46	2,5	8,7	0,29	6,035	48,9
10	47	2,6	9,3	0,28	6,967	54,7
11	47	2,6	9,2	0,29	6,010	46,6
12	45	3,0	8,8	0,34	6,738	48,5
MEDIA	46,7	2,6	9,1	0,29	6,462	50,6
± DS	± 1,0	± 0,2	± 0,3	± 0,03	± 0,430	± 3,1

**TABLA 36
LOTE ALIMENTADO A LA PAR CON EL LOTE ACIDO ACETILSALICILICO**

RATA Nº	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
13	45	3,4	9,4	0,36	6,690	44,2
14	47	3,2	9,4	0,34	5,717	38,9
15	48	2,7	8,6	0,32	6,445	48,2
16	44	3,2	9,3	0,34	6,488	45,6
17	47	2,9	9,2	0,32	5,916	42,7
18	48	2,8	8,7	0,32	5,857	43,3
MEDIA	46,5	3,0	9,1	0,33	6,185	43,8
± DS	± 1,6	± 0,3	± 0,4	± 0,02	± 0,403	± 3,1

PESO I = Peso inicial; S.S.I. = Dieta ingerida en sustancia seca; CEA = Coeficiente de eficacia alimentaria; PESO H = Peso del hígado; IHS = Índice hepatosomático.

**PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (32 DIAS)**

**TABLA 37
LOTE ACETAMINOFENO**

RATA N°	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
20	46	2,6	9,5	0,27	6,169	48,8
21	50	2,6	9,5	0,27	6,007	45,7
22	45	2,7	9,5	0,28	6,186	47,8
23	45	2,6	9,5	0,28	7,810	61,7
24	50	2,5	9,5	0,26	6,643	52,4
MEDIA	47,2	2,6	9,5	0,27	6,563	51,3
± DS	± 2,6	± 0,1	± 0,0	± 0,01	± 0,736	± 6,3

**TABLA 38
LOTE ALIMENTADO A LA PAR CON EL LOTE ACETAMINOFENO**

RATA N°	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS (%)
26	50	2,8	9,5	0,29	6,869	49,9
27	47	2,7	9,5	0,29	5,384	40,9
28	45	3,1	9,5	0,32	5,849	41,4
29	45	3,1	9,5	0,32	5,820	41,5
30	49	2,9	9,5	0,31	6,624	47,3
MEDIA	47,2	2,9	9,5	0,31	6,109	44,2
± DS	± 2,3	± 0,2	± 0,0	± 0,01	± 0,616	± 4,1

PESO I = Peso inicial; S.S.I. = Dieta ingerida en sustancia seca; CEA = Coeficiente de eficacia alimentaria; PESO H = Peso del hígado; IHS = Índice hepatosomático

TABLA 39
PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (43 DIAS)
RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO

LOTE	PESO I (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA	PESO H (g)	IHS
CONTROL:						
MEDIA	46,8	4,9	13,2	0,36	11,377	57,3
± DS	± 1,7	± 1,0	± 1,8	± 0,03	± 2,313	± 7,0
ASA:						
MEDIA	46,7	2,6 ^{ab}	9,1 ^a	0,29 ^{ab}	6,462 ^a	50,6 ^b
± DS	± 1,0	± 0,2	± 0,3	± 0,03	± 0,430	± 3,1
PFASA:						
MEDIA	46,5	3,0	9,1 ^a	0,33	6,185	43,8
± DS	± 1,6	± 0,3	± 0,4	± 0,02	± 0,403	± 3,1
ACAP:						
MEDIA	47,2	2,6 ^{ab}	9,5 ^a	0,27 ^{ab}	6,563 ^a	51,3 ^b
± DS	± 2,6	± 0,1	± 0,0	± 0,01	± 0,736	± 6,3
PF ACAP:						
MEDIA	47,2	2,9	9,5 ^a	0,31	6,109	44,2
± DS	± 2,3	± 0,2	± 0,0	± 0,01	± 0,616	± 4,1

PESO I = Peso inicial; S.S.I. = Dieta ingerida en sustancia seca; CEA = Coeficiente de eficacia alimentaria; PESO H = Peso del hígado; IHS = Indice hepatosomático.

ASA: Acido acetilsalicílico; ACAP: Acetaminofeno; PF: Alimentado a la par con el lote con fármaco correspondiente.

a = significativo frente al lote control ($p \leq 0,05$); **b** = significativo frente al lote alimentado a la par correspondiente ($p \leq 0,05$).

FIGURA 15. EVOLUCION DEL PESO CORPORAL EN EL LOTE ACIDO ACETILSALICILICO Y SU CORRESPONDIENTE LOTE ALIMENTADO A LA PAR ("Pair fed").

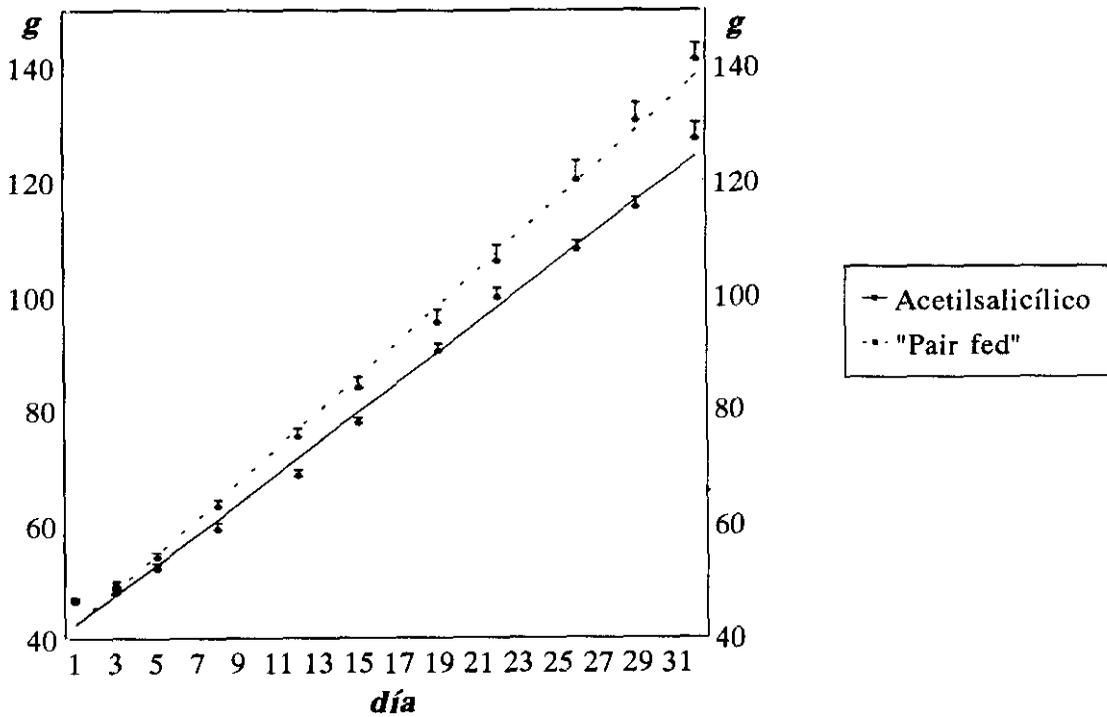
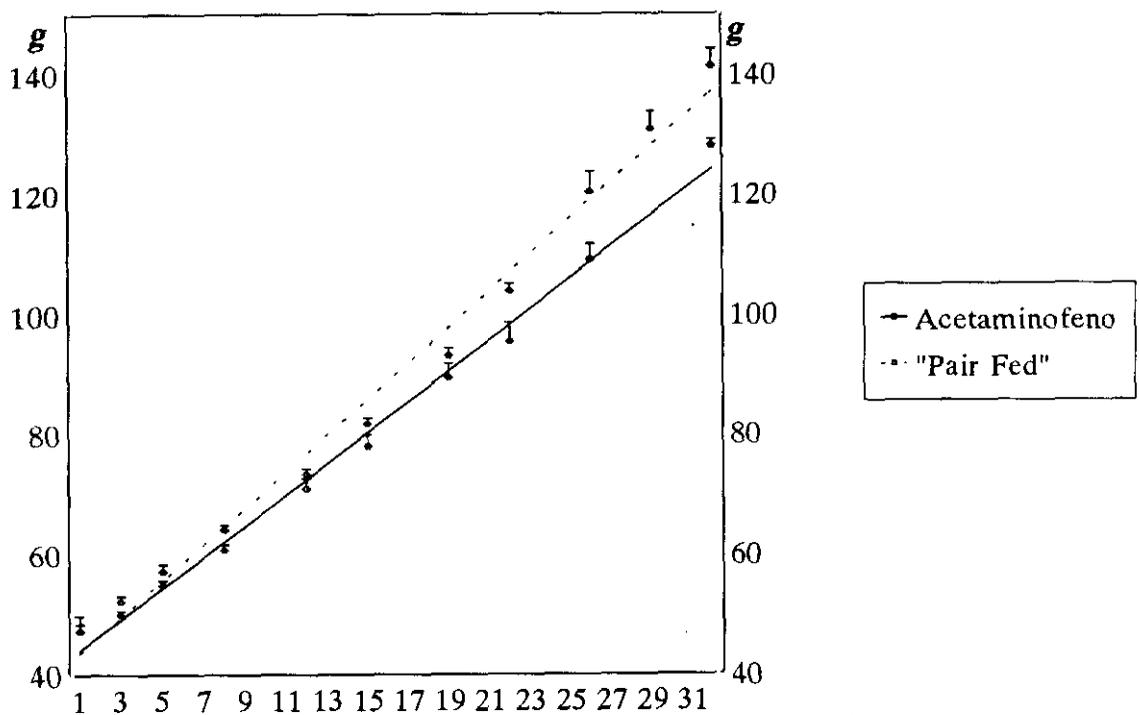


FIGURA 16. EVOLUCION DEL PESO CORPORAL EN EL LOTE ACETAMINOFENO Y SU CORRESPONDIENTE LOTE ALIMENTADO A LA PAR ("Pair fed").

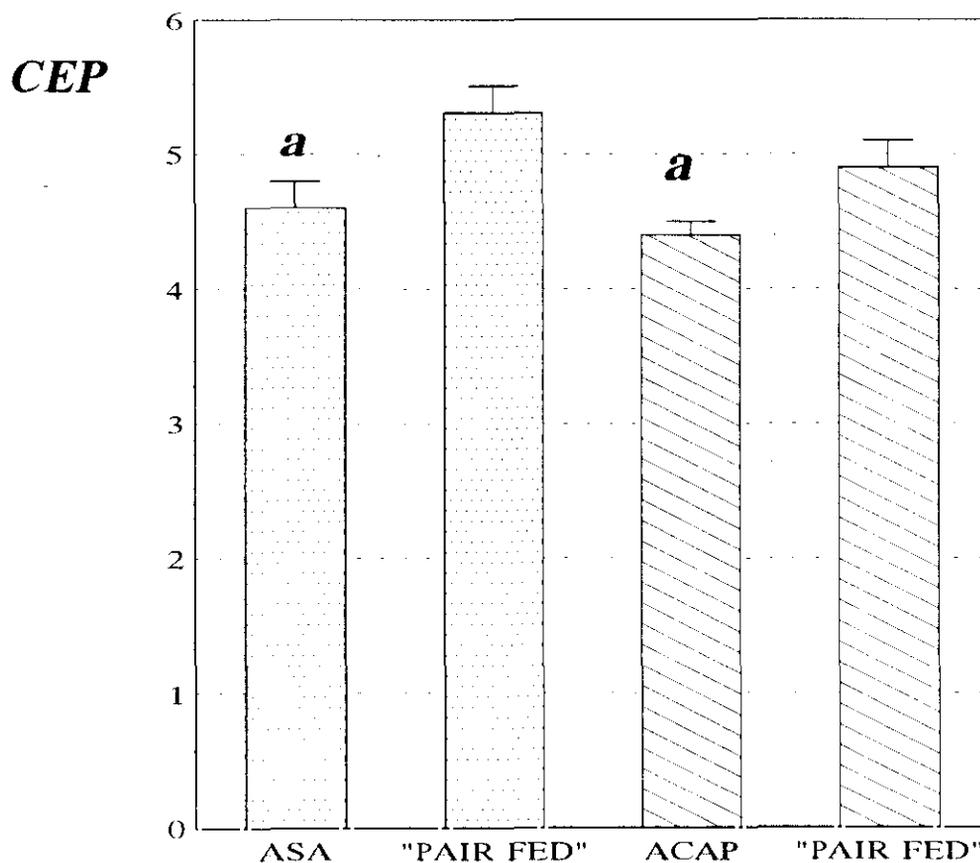


Los datos están expresados como valor medio \pm error estándar por lote y día.

TABLA 40
COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA PARA EL CRECIMIENTO (CEP)
DURANTE TODO EL PERIODO EXPERIMENTAL

RATA	CONTROL	ASA	"PAIR FED" ASA	ACAP	"PAIR FED" ACAP
1	5,81	3,96	5,86	4,41	4,74
2	6,35	4,48	5,52	4,41	4,58
3	6,26	4,63	5,09	4,58	5,25
4	6,31	4,48	5,52	4,41	5,25
5	5,91	4,56	4,60	4,24	4,91
6	4,69	5,55	5,18		
MEDIA	5,89	4,61	5,29	4,41	4,95
± DS	±0,63	±0,52	±0,44	±0,12	±0,30

FIGURA 17. COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA PARA EL CRECIMIENTO (CEP).



Los resultados están expresados como valor medio \pm error estándar.

a = significativo frente al lote alimentado a la par correspondiente ($p \leq 0,05$).

ASA = ácido acetilsalicílico; ACAP = acetaminofeno; "PAIR FED" = lote alimentado a la par con el lote con fármaco correspondiente.

TABLA 41
CONCENTRACION DE FOLATOS EN SUERO (ng/ml)

RATA	ASA	"PAIR FED" ASA	ACAP	"PAIR FED" ACAP
1	47	64	52	90
2	78	59	65	57
3	53	91	53	172
4	199	82	64	158
5	33	48	38	49
6				51
MEDIA	68	68	54	96
± DS	± 68,57	± 14,41	± 11,20	± 55,52

TABLA 42
CONCENTRACION DE FOLATOS EN HIGADO (nmol/g)

RATA	ASA	"PAIR FED" ASA	ACAP	"PAIR FED" ACAP
1	24,96	14,29	21,95	25,05
2	37,47	30,12	15,20	14,33
3	33,74	16,20	18,64	20,00
4	25,00	22,92	22,89	21,40
5	43,19	13,48	19,17	19,86
6	17,53	58,74		13,76
MEDIA	30,31	25,96	19,57	19,07
± DS	± 9,48	± 17,25	± 3,03	± 4,32

TABLA 43
CONCENTRACION DE FOLATOS EN SUERO E HIGADO
RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO

LOTE	SUERO (ng/ml)	HIGADO (nm/g)
ACIDO ACETILSALICILICO	68 ± 68,57	30,31 ± 9,48
"PAIR FED" DEL ACETILSALICILICO	68 ± 14,41	25,96 ± 17,25
ACETAMINOFENO	54 ± 11,20	19,57 ± 3,03
"PAIR FED" DEL ACETAMINOFENO	96 ± 55,52	19,07 ± 4,32

ASA = Acido acetilsalicílico

ACAP = Acetaminofeno

"PAIR FED" = Alimentado a la par con el lote con fármaco correspondiente.

TABLA 44

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE FOLATOS DERIVADOS DEL ANILLO PTERIDINICO EN EL HIGADO EN EL LOTE ACIDO ACETILSALICILICO Y SU CORRESPONDIENTE LOTE ALIMENTADO A LA PAR ("PAIR FED")

LOTE	ACIDO ACETILSALICILICO			"PAIR FED"		
	THF	MTF	FTF	THF	MTF	FTF
1	22,4	44,0	33,5	18,4	69,4	12,2
2	43,9	45,5	13,4	40,4	52,1	8,2
3	14,9	54,8	30,3	45,5	46,0	8,6
4	41,2	43,7	11,2	8,1	44,2	48,1
5	37,2	49,1	12,6	36,6	57,3	4,6
6	39,4	37,6	23,1	27,2	37,1	8,3
MEDIA ± DS	33,2 ±11,70	45,8 ±5,78	20,7 ±9,70	29,4 ±14,22	51,0 ±11,35	15,0 ± 16,39

TABLA 45

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE FOLATOS DERIVADOS DEL ANILLO PTERIDINICO EN EL HIGADO EN EL LOTE ACETAMINOFENO Y SU CORRESPONDIENTE LOTE ALIMENTADO A LA PAR ("PAIR FED")

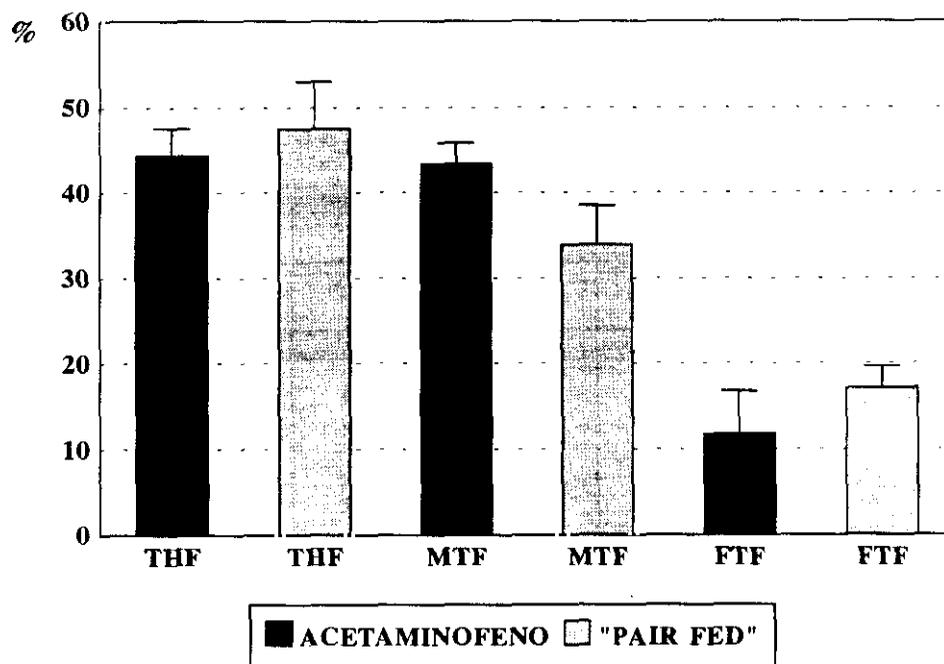
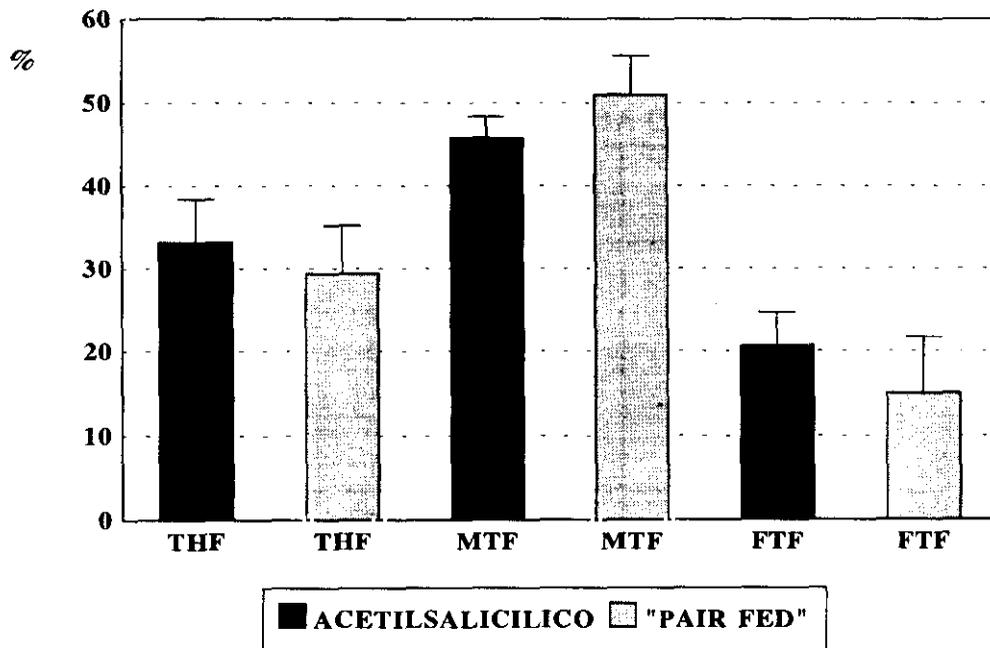
LOTE	ACETAMINOFENO			"PAIR FED"		
	THF	MTF	FTF	THF	MTF	FTF
1	32,1	37,5	30,4	49,1	33,5	17,4
2	46,0	51,1	3,0	71,5	17,0	6,3
3	49,5	45,0	5,4	31,9	30,9	36,5
4	45,5	45,5	8,8	45,4	41,5	11,9
5	48,9	38,1	11,5	39,5	31,5	29,2
6				48,5	49,7	1,6
MEDIA ± DS	44,4 ±7,09	43,4 ±5,68	11,8 ±10,88	47,6 ± 13,35	34,0 ±11,02	17,1 ±13,47

THF = Tetrahidrofolatos sin sustituir

MTF = Metiltetrahidrofolatos

FTF = Formiltetrahidrofolatos.

FIGURA 18. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE FOLATOS DERIVADOS DEL ANILLO PTERIDINICO EN EL HIGADO. RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO.



Los resultados están expresados como % \pm error estándar.

THF = Tetrahidrofolatos no sustituidos

MTF = Metiltetrahidrofolatos

FTF = Formiltetrahidrofolatos.

"PAIR FED" = Alimentado a la par con el lote con fármaco correspondiente.

TABLA 46
DISTRIBUCION PORCENTUAL DE FOLATOS EN EL HIGADO SEGUN EL
NUMERO DE RESTOS DE ACIDO PTEROILGLUTAMICO CON
ADMINISTRACION CRONICA DE ACIDO ACETILSALICILICO

RATA	PteGlu1	PteGlu2	PteGlu4	PteGlu5	PteGlu6	PteGlu7
1	3,3	5,3	0,0	54,4	33,5	2,8
2	16,5	6,3	4,4	52,0	25,7	0,0
3	11,7	20,6	0,0	48,3	19,4	0,0
4	3,8	13,0	3,5	52,0	26,5	0,0
5	8,1	6,6	5,1	53,3	26,8	1,1
6	7,6	29,8	0,0	51,1	11,6	0,0
MEDIA	8,5	13,6	2,2	51,8	23,9	0,6
±DS	±4,99	±9,83	±2,43	±2,09	±7,51	±1,14

TABLA 47
DISTRIBUCION PORCENTUAL DE FOLATOS EN EL HIGADO SEGUN EL
NUMERO DE RESTOS DE ACIDO PTEROILGLUTAMICO EN EL LOTE
ALIMENTADO A LA PAR CON EL LOTE ACIDO ACETILSALICILICO

RATA	PteGlu1	PteGlu2	PteGlu4	PteGlu5	PteGlu6	PteGlu7
1	9,6	9,9	0,0	40,1	40,4	0,0
2	3,3	4,0	3,7	48,4	41,3	0,0
3	2,3	4,8	0,0	31,4	51,0	10,6
4	15,6	21,0	0,0	35,5	28,3	0,0
5	12,4	6,9	0,0	56,0	21,5	0,0
6	19,9	20,4	2,3	42,5	15,0	0,0
MEDIA	10,5	11,2	1,0	42,3	32,9	1,8
±DS	±6,90	±7,66	±1,61	±8,89	±13,61	±4,33

PteGlu n = ácido pteroilglutámico + n° de restos de ácido glutámico.

TABLA 48
DISTRIBUCION PORCENTUAL DE FOLATOS EN EL HIGADO SEGUN EL
NUMERO DE RESTOS DE GLUTAMICO CON ADMINISTRACION CRONICA DE
ACETAMINOFENO

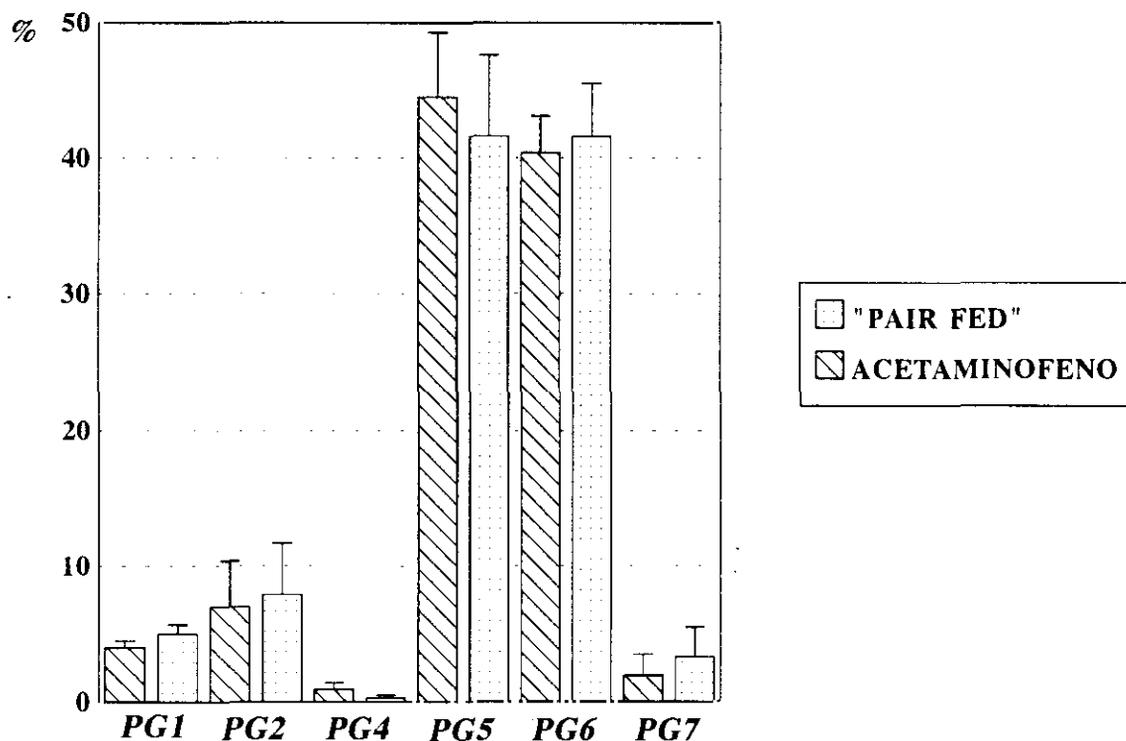
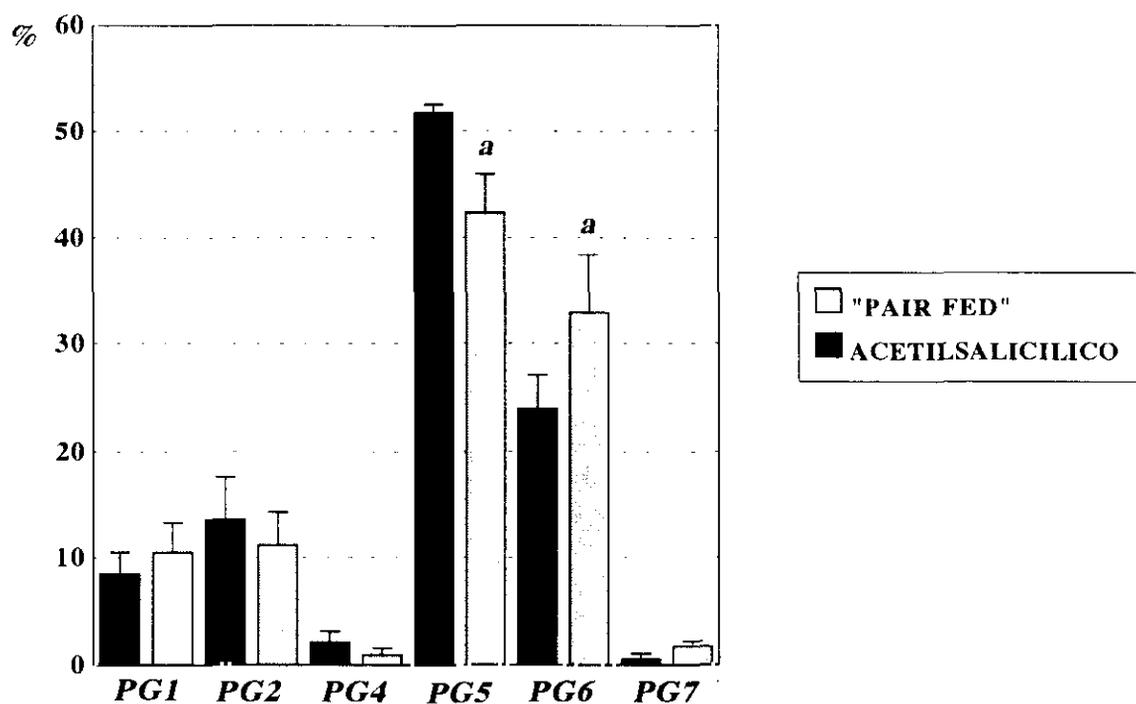
RATA	PteGlu1	PteGlu2	PteGlu4	PteGlu5	PteGlu6	PteGlu7
1	6,7	22,7	0,0	33,5	36,8	0,0
2	3,4	4,5	0,0	34,4	49,2	8,6
3	3,6	0,0	0,0	55,0	41,3	0,0
4	3,6	7,3	2,6	44,1	41,6	1,1
5	3,3	7,3	2,7	55,7	33,0	0,0
6	3,2	0,0	0,0			
MEDIA	3,9	6,9	0,9	44,5	40,4	1,9
±DS	±1,35	±8,38	±1,37	±10,71	±6,07	±3,75

TABLA 49
DISTRIBUCION PORCENTUAL DE FOLATOS EN EL HIGADO SEGUN EL
NUMERO DE RESTOS DE GLUTAMICO EN EL LOTE ALIMENTADO A LA PAR
CON EL LOTE ACETAMINOFENO

RATA	PteGlu1	PteGlu2	PteGlu3	PteGlu4	PteGlu5	PteGlu6
1	3,0	0,0	1,7	49,5	43,7	2,1
2	4,1	4,0	0,0	19,5	57,9	14,4
3	5,3	25,3	0,0	34,2	34,5	0,9
4	6,8	4,2	0,0	43,6	44,2	1,2
5	7,4	11,4	0,0	40,0	31,1	1,1
6	3,6	2,5	0,0	62,9	38,4	0,0
MEDIA	5,0	7,9	0,28	41,6	41,6	3,3
±DS	±1,78	±9,33	±0,69	±14,60	±9,46	±5,49

PteGlu n = ácido pteroilglutámico + n° de restos de ácido glutámico.

FIGURA 19. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE FOLATOS EN EL HIGADO SEGUN EL NUMERO DE RESTOS DE ACIDO PTEROILGLUTAMICO. RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO.



PG n = ácido pteroilglutámico + n° de restos de ácido glutámico.

"PAIR FED" = Alimentado a la par con el lote con fármaco correspondiente.

TABLA 50

CONCENTRACION HEPATICA DE S-ADENOSILMETIONINA (SAM), S-ADENOSILHOMOCISTEINA (SAH) Y RELACION SAM/SAH EN EL LOTE ACIDO ACETILSALICILICO Y SU CORRESPONDIENTE LOTE ALIMENTADO A LA PAR ("PAIR FED")

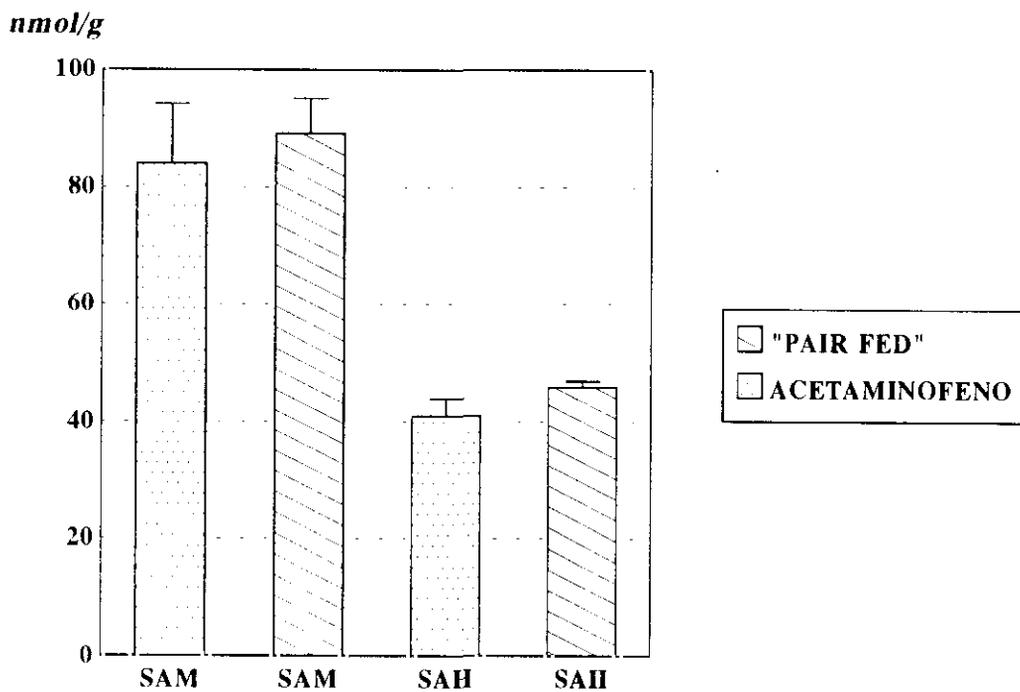
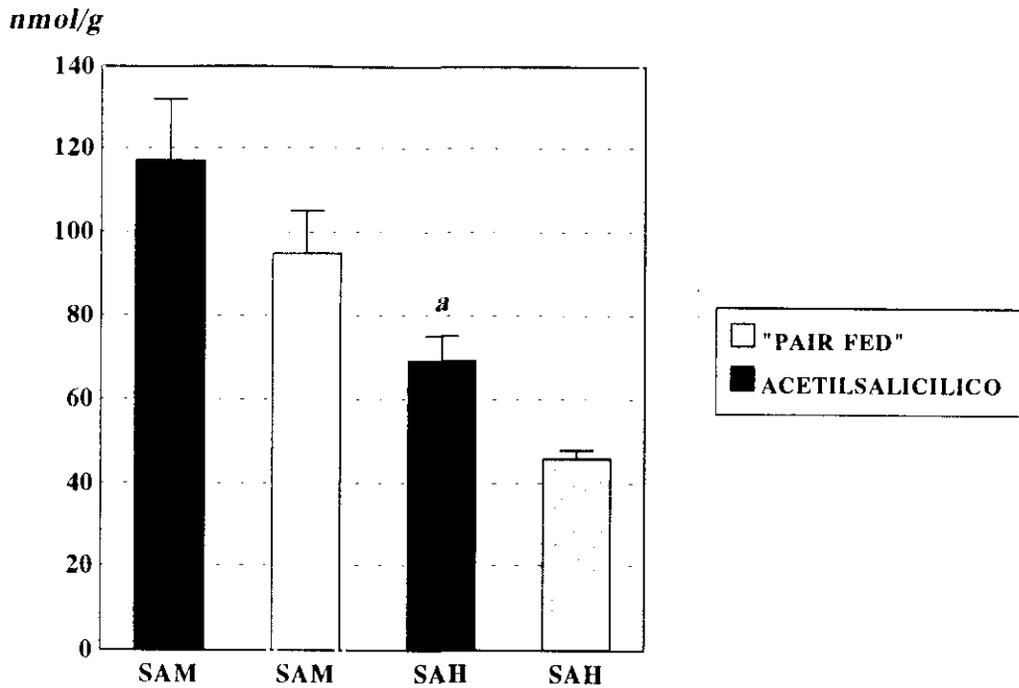
LOTE	ACIDO ACETILSALICILICO			"PAIR FED"		
RATA	SAM (nmol/g)	SAH (nmol/g)	SAM/SAH	SAM (nmol/g)	SAH (nmol/g)	SAM/SAH
1	151,90	77,60	1,96	98,31	42,77	2,30
2	83,60	79,00	1,06	77,15	49,36	1,56
3	125,50	75,05	1,67	72,53	40,59	1,79
4	77,24	48,91	1,58	95,00	46,50	2,46
5	146,13	66,36	2,20	132,00	53,55	2,04
MEDIA ±DS	116,9 ±34,8	69,38 ±12,4	1,69 ±0,43	94,99 ±23,6	46,55 ±5,2	2,03 ±0,37

TABLA 51

CONCENTRACION HEPATICA DE S-ADENOSILMETIONINA (SAM), S-ADENOSILHOMOCISTEINA (SAH) Y RELACION SAM/SAH EN EL LOTE ACETAMINOFENO Y SU CORRESPONDIENTE LOTE ALIMENTADO A LA PAR ("PAIR FED")

LOTE	ACETAMINOFENO			"PAIR FED"		
RATA	SAM (nmol/g)	SAH (nmol/g)	SAM/SAH	SAM (nmol/g)	SAH (nmol/g)	SAM/SAH
1	109,86	46,81	2,35	76,71	45,01	1,70
2	79,46	42,47	1,87	101,86	49,13	2,07
3	61,86	33,10	1,87	87,55	45,84	1,91
4	83,73	40,8	2,05	92,26	42,47	2,15
MEDIA ±DS	83,72 ±19,8	40,79 ±5,7	2,03 ±0,22	89,59 ±10,45	45,61 ±2,7	1,96 ±0,20

FIGURA 20. CONCENTRACION HEPATICA DE S-ADENOSILMETIONINA (SAM), S-ADENOSILHOMOCISTEINA (SAH) Y RELACION SAM/SAH. RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO.



"PAIR FED" = Alimentado a la par con el lote con fármaco correspondiente.

Los resultados están expresados como valor medio \pm error estándar.

a = significativo ($p \leq 0,01$) frente al correspondiente lote alimentado a la par.

EXPERIMENTO C

Efecto de la administración de acetaminofeno, levodopa:carbidopa y asociación de los tres fármacos durante 30 días, con ingestas pareadas, sobre algunos parámetros nutricionales generales y la utilización nutritiva de la proteína.

Tratamiento estadístico.

**PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (30 DIAS)**

TABLA 52
LOTE CONTROL

RATA N°	PESO INICIAL (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA
1	190	3,7	16,7	0,22
2	192	3,8	16,7	0,23
3	180	4,3	16,7	0,25
4	178	3,4	16,7	0,20
5	172	4,4	16,7	0,26
6	189	3,0	16,7	0,18
MEDIA ± DS	183,5 ±8,0	3,8 ±0,5	16,7 ±0,0	0,22 ±0,03

TABLA 53
LOTE ACETAMINOFENO

RATA N°	PESO INICIAL (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA
7	188	3,3	16,1	0,21
8	187	3,7	16,7	0,22
9	182	3,7	16,7	0,22
10	183	3,7	16,7	0,22
11	170	3,0	16,7	0,18
12	185	3,6	16,7	0,22
MEDIA ± DS	182,5 ±6,5	3,5 ±0,3	16,6 ±0,2	0,21 ±0,02

TABLA 54
LOTE LD50

RATA N°	PESO INICIAL (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA
13	192	5,6	16,7	0,33
14	190	3,4	16,7	0,20
15	182	4,1	16,7	0,24
16	189	3,8	16,7	0,23
17	171	3,7	16,7	0,22
18	184	4,0	16,7	0,24
MEDIA ± DS	184,7 ±7,7	4,1 ±0,8	16,7 ±0,0	0,24 ±0,04

S.S.I. = Dieta ingerida en sustancia seca; CEA = Coeficiente de eficacia alimentaria.
LD50 = Levodopa/Carbidopa 50/5 mg/Kg peso corporal

**PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (30 DIAS)**

**TABLA 55
LOTE LD175**

RATA N°	PESO INICIAL (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA
19	194	3,2	16,7	0,19
20	175	3,6	16,7	0,22
21	181	3,7	16,7	0,22
22	175	3,6	16,7	0,22
23	196	3,4	16,7	0,20
24	181	3,4	16,7	0,20
MEDIA ± DS	183,7 ±9,2	3,5 ±0,2	16,7 ±0,0	0,21 ±0,01

**TABLA 56
LOTE ACETAMINOFENO + LD50**

RATA N°	PESO INICIAL (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA
25	182	3,9	16,7	0,23
26	192	3,6	16,7	0,21
27	194	4,3	16,7	0,25
28	176	4,2	16,7	0,25
29	181	3,7	16,6	0,22
30	171	3,8	16,7	0,23
MEDIA ± DS	182,7 ±8,9	3,9 ±0,3	16,7 ±0,0	0,23 ±0,02

**TABLA 57
LOTE ACETAMINOFENO + LD175**

RATA N°	PESO INICIAL (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA
31	176	3,3	16,7	0,19
32	191	4,1	16,7	0,24
33	195	4,0	16,7	0,24
34	183	3,3	16,7	0,20
35	183	4,1	16,7	0,24
36	173	3,6	16,7	0,21
MEDIA ± DS	183,5 ±8,4	3,7 ±0,4	16,7 ±0,0	0,22 ±0,02

CEA = Coeficiente de eficacia alimentaria; S.S.I. = Dieta ingerida en sustancia seca.

LD50 = Levodopa/Carbidopa 50/5 mg/Kg peso corporal.

LD175 = Levodopa/Carbidopa 175/17,5 mg/Kg peso corporal.

TABLA 58
PARAMETROS GENERALES
PERIODO COMPLETO (30 DIAS)

RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO

LOTE	PESO INICIAL (g)	Δ PESO (g/día)	S.S.I. (g/día)	CEA
CONTROL: MEDIA ±DS	183,5 ±8,0	3,8 ±0,5	16,7 ±0,0	0,22 ±0,03
ACAP: MEDIA ±DS	182,5 ±6,5	3,5 ±0,3	16,6 ±0,2	0,21±0,02
LD50: MEDIA ±DS	184,7 ±7,7	4,1 ±0,8	16,7 ±0,0	0,24 ±0,04
LD175: MEDIA ±DS	183,7 ±9,2	3,5 ±0,2	16,7 ±0,0	0,21 ±0,01
ACAP+LD50: MEDIA ±DS	182,7 ±8,9	3,9 ±0,3	16,7 ±0,0	0,23±0,02
ACAP+LD175: MEDIA ±DS	183,5 ±8,4	3,7 ±0,4	16,7 ±0,0	0,22 ±0,02

CEA = Coeficiente de eficacia alimentaria

S.S.I. = Dieta ingerida en sustancia seca

ACAP = Acetaminofeno

LD50 = Levodopa/Carbidopa 50/5 mg/Kg peso corporal

LD175 = Levodopa/Carbidopa 175/17,5 mg/Kg peso corporal

TABLA 59
UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA
PERIODO DIAS 22-30

LOTE CONTROL ALIMENTADO A LA PAR

DETERMINACIONES

RATA N°	N ingerido (mg/día)	N fecal (mg/día)	N orina (mg/día)
1	539	27	150
2	539	21	189
3	539	23	126
4	539	23	147
5	539	24	186
6	539	28	210
MEDIA ± DS	539,0 ±0,0	24,3 ±2,6	168,0 ±31,8

INDICES CALCULADOS

RATA N°	CDN	CEP	CUM	CUN
1	0,95	1,24	0,71	0,67
2	0,96	1,25	0,64	0,61
3	0,96	1,41	0,75	0,72
4	0,96	1,13	0,71	0,68
5	0,95	1,45	0,64	0,61
6	0,95	0,99	0,59	0,56
MEDIA ± DS	0,95 ±0,00	1,24 ±0,17	0,67 ±0,06	0,64 ±0,06

CDN = Coeficiente de digestibilidad del nitrógeno

CEP = Coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento

CUM = Coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno

CUN = Coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno

TABLA 60
UTILIZACION NUTRITIVA DE LA PROTEINA
PERIODO DIAS 22-30

LOTE ACETAMINOFENO

DETERMINACIONES

RATA N°	N ingerido (mg/día)	N fecal (mg/día)	N orina (mg/día)
7	493	23	101
8	539	27	248
9	539	27	190
10	539	21	220
11	539	34	139
12	539	29	139
MEDIA ± DS	531,3 ±18,8	26,8 ±4,6	172,8 ±55,9

INDICES CALCULADOS

RATA N°	CDN	CEP	CUM	CUN
7	0,95	1,15	0,78	0,75
8	0,95	1,23	0,52	0,49
9	0,95	1,24	0,63	0,60
10	0,96	1,23	0,57	0,55
11	0,94	0,98	0,72	0,68
12	0,95	1,20	0,73	0,69
MEDIA ± DS	0,95 ±0,01	1,17 ±0,10	0,66 ±0,10	0,63 ±0,10

CDN = Coeficiente de digestibilidad del nitrógeno

CEP = Coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento

CUM = Coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno

CUN = Coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno

TABLA 61
UTILIZACION NUTRITIVA DE LA PROTEINA
PERIODO DIAS 22-30

LOTE LD50

DETERMINACIONES

RATA N°	N ingerido (mg/día)	N fecal (mg/día)	N orina (mg/día)
13	539	23	139
14	539	24	197
15	539	21	176
16	539	26	178
17	539	25	178
18	539	26	204
MEDIA ± DS	539,0 ±0,0	24,2 ±1,9	178,7 ±22,6

INDICES CALCULADOS

RATA N°	CDN	CEP	CUM	CUN
13	0,96	1,84	0,73	0,70
14	0,96	1,13	0,62	0,59
15	0,96	1,35	0,66	0,63
16	0,95	1,28	0,65	0,62
17	0,95	1,22	0,65	0,62
18	0,95	1,31	0,60	0,57
MEDIA ± DS	0,95 ±0,00	1,35 ±0,25	0,65 ±0,04	0,62 ±0,04

LD50 = Levodopa/Carbidopa 50/5 mg/Kg peso corporal

CDN = Coeficiente de digestibilidad del nitrógeno

CEP = Coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento

CUM = Coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno

CUN = Coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno

TABLA 62
UTILIZACION NUTRITIVA DE LA PROTEINA
PERIODO DIAS 22-30

LOTE LD175

DETERMINACIONES

RATA N°	N ingerido (mg/día)	N fecal (mg/día)	N orina (mg/día)
19	539	24	146
20	521	29	174
21	539	25	155
22	539	29	220
23	539	26	
24	539	25	157
MEDIA ± DS	536,0 ±7,3	26,3 ±2,2	170,4 ±29,5

INDICES CALCULADOS

RATA N°	CDN	CEP	CUM	CUN
19	0,96	1,07	0,72	0,68
20	0,94	1,20	0,65	0,61
21	0,95	1,22	0,70	0,66
22	0,95	1,20	0,57	0,54
23	0,95	1,13		
24	0,95	1,12	0,69	0,66
MEDIA ± DS	0,95 ±0,01	1,16 ±0,06	0,67 ±0,06	0,63 ±0,06

LD175 = Levodopa/Carbidopa 175/17,5 mg/Kg peso corporal

CDN = Coeficiente de digestibilidad del nitrógeno

CEP = Coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento

CUM = Coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno

CUN = Coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno

TABLA 63
UTILIZACION NUTRITIVA DE LA PROTEINA
PERIODO DIAS 22-30

LOTE ACETAMINOFENO + LD50

DETERMINACIONES

RATA N°	N ingerido (mg/día)	N fecal (mg/día)	N orina (mg/día)
25	539	26	160
26	539	23	173
27	533	19	138
28	539	22	217
29	508	22	161
30	539	27	157
MEDIA ± DS	532,8 ±12,4	23,2 ±2,9	167,7 ±26,7

INDICES CALCULADOS

RATA N°	CDN	CEP	CUM	CUN
25	0,95	1,30	0,69	0,65
26	0,96	1,19	0,66	0,64
27	0,96	1,41	0,73	0,70
28	0,96	1,39	0,58	0,55
29	0,96	1,23	0,67	0,64
30	0,95	1,25	0,69	0,66
MEDIA ± DS	0,96 ±0,00	1,29 ±0,09	0,67 ±0,05	0,64 ±0,05

LD50 = Levodopa/Carbidopa 50/5 mg/Kg peso corporal

CDN = Coeficiente de digestibilidad del nitrógeno

CEP = Coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento

CUM = Coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno

CUN = Coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno

TABLA 64
UTILIZACION NUTRITIVA DE LA PROTEINA
PERIODO DIAS 22-30

LOTE ACETAMINOFENO + LD175

DETERMINACIONES

RATA N°	N ingerido (mg/día)	N fecal (mg/día)	N orina (mg/día)
31	546	27	170
32	539	25	150
33	539	22	212
34	566	29	183
35	539	25	189
36	539	28	180
MEDIA ± DS	544,7 ± 10,8	26,0 ± 2,5	180,7 ± 20,5

INDICES CALCULADOS

RATA N°	CDN	CEP	CUM	CUN
31	0,95	1,08	0,67	0,64
32	0,95	1,36	0,71	0,68
33	0,96	1,34	0,59	0,56
34	0,95	1,10	0,66	0,62
35	0,95	1,36	0,63	0,60
36	0,95	1,18	0,65	0,61
MEDIA ± DS	0,95 ± 0,00	1,24 ± 0,13	0,65 ± 0,04	0,62 ± 0,04

LD175 = Levodopa/Carbidopa 175/17,5 mg/Kg peso corporal

CDN = Coeficiente de digestibilidad del nitrógeno

CEP = Coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento

CUM = Coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno

CUN = Coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno

TABLA 65
UTILIZACION NUTRITIVA DE LA PROTEINA
PERIODO DIAS 22-30

RESUMEN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADISTICO

DETERMINACIONES

LOTE	N ingerido (mg/día)	N fecal (mg/día)	N orina (mg/día)
CONTROL	539,0 ±0,0	24,3 ±2,6	168,0 ±31,8
ACAP	531,3 ±18,8	26,8 ±4,6	172,8 ±55,9
LD50	539,0 ±0,0	24,2 ±1,9	178,7 ±22,6
LD175	536,0 ±7,3	26,3 ±2,2	170,4 ±29,5
ACAP + LD50	532,8 ±12,4	23,2 ±2,9	167,7 ±26,7
ACAP + LD175	544,7 ±10,8	26,0 ±2,5	180,7 ±20,5

INDICES CALCULADOS

LOTE	CDN	CEP	CUM	CUN
CONTROL	0,95 ±0,00	1,24 ±0,17	0,67 ±0,06	0,64 ±0,06
ACAP	0,95 ±0,01	1,17 ±0,10	0,66 ±0,10	0,63 ±0,10
LD50	0,95 ±0,00	1,35 ±0,25	0,65 ±0,04	0,62 ±0,04
LD175	0,95 ±0,01	1,15 ±0,06	0,67 ±0,06	0,63 ±0,06
ACAP+LD50	0,96 ±0,00	1,29 ±0,09	0,67 ±0,05	0,64 ±0,05
ACAP+LD175	0,95 ±0,00	1,23 ±0,13	0,65 ±0,04	0,62 ±0,04

CDN = Coeficiente de digestibilidad del nitrógeno

CEP = Coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento

CUM = Coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno

CUN = Coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno

ACAP = Acetaminofeno

LD50 = Levodopa/Carbidopa 50/5 mg/Kg peso corporal

LD175 = Levodopa/Carbidopa 175/17,5 mg/Kg peso corporal

5.- DISCUSION DE RESULTADOS

5.1. ACIDO ACETILSALICILICO (ASA).

En este apartado vamos a tratar de la influencia que la administración crónica de ácido acetilsalicílico (ASA) ejerce sobre los distintos parámetros nutricionales y bioquímicos estudiados en ratas adecuadamente nutridas. La ingesta en el experimento A fue "ad libitum" en los lotes control y ASA y, en el experimento B se alimentaron a la par el lote ASA y el que fue su control "pair fed". Con todo ello, compararemos estadísticamente los resultados obtenidos entre los lotes de ratas a los que no se les administró fármaco con los que consumieron ASA.

Queremos recordar en primer lugar, y como ya se ha explicado detalladamente en el apartado MATERIAL Y METODOS, que en todos los animales se controló la ingesta sólida diariamente, y las variaciones de peso corporal en períodos de 2-3 días. Ello nos permitió observar la evolución del animal de experimentación y analizar los posibles cambios interperiodos en los parámetros nutricionales generales.

En cuanto a la dosis administrada a las ratas se ha calculado, como ya indicamos en el apartado MATERIAL Y METODOS, mediante una tabla obtenida de FREIREICH, G. y col. (1966) que nos proporciona los factores de conversión para dosificación equivalente según la superficie corporal. Así, a partir de la dosis terapéutica en humanos, obtenemos la dosis equivalente y conviene indicar que la dosis de ASA empleada aunque elevada, se encuentra dentro del rango de dosis terapéuticamente empleadas para humanos y en experimentación para los animales utilizados: ratas.

5.1.1. Parámetros generales: ingesta sólida, peso corporal, crecimiento, coeficiente de eficacia alimentaria (CEA), peso del hígado e índice hepatosomático (IHS).

Al analizar los resultados del experimento A, indicados en la Tabla 5 se observa una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en la ingesta total de los animales a los que se les había administrado ASA ($6,1 \pm 0,8$ g/día) frente a los controles ($8,3 \pm 0,6$ g/día) en todos los períodos estudiados. Estas diferencias comienzan ya en los primeros días de consumo de ASA y continúan a lo largo de todo el proceso. En las Figuras 1 y 2 se muestra la evolución diaria de la ingesta sólida de ambos lotes ASA y control. Por tanto, el consumo de ASA da lugar a una modificación importante de la ingesta, debida posiblemente a las conocidas alteraciones que ejerce el fármaco sobre la mucosa gástrica (FLOREZ, J. 1987a; LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987).

Al estudiar los incrementos de peso del experimento A encontramos, como era de esperar que también los animales que consumieron ASA tienen un crecimiento medio diario significativamente menor ($0,9 \pm 0,4$ g/día) que los controles ($2,0 \pm 0,5$ g/día; $p \leq 0,001$) (Tabla 5). Esto podría deberse a la menor ingesta exclusivamente. Sin embargo, en el experimento B (Tabla 39) también observamos una reducción significativa ($p \leq 0,01$) del incremento de peso de los animales que consumieron ASA ($2,6 \pm 0,2$ g/día) respecto al grupo alimentado a la par con él ($3,0 \pm 0,3$ g/día), lo que indica que el consumo crónico del fármaco influye negativamente sobre el crecimiento, aunque no hemos encontrado otros trabajos referentes a este punto. En la Figura 7 se muestran las curvas de crecimiento del lote que consumió ASA respecto a su correspondiente "pair fed" y se puede observar la reducción del mismo en el primero. Estos resultados respecto al crecimiento se observan también claramente al considerar el aprovechamiento nutritivo de la dieta basado en el CEA, que es el cociente entre el incremento de peso del animal (g/día) y la ingesta (g/día). Este parámetro

muestra diferencias significativas ($p \leq 0,005$) entre el lote que consumió ASA ($0,15 \pm 0,05$) y el lote control ($0,24 \pm 0,05$) (Tabla 5) en el experimento A. Por ello, parece que el ASA no sólo actúa negativamente en las condiciones estudiadas sobre la ingesta sino también sobre la utilización nutritiva de la dieta. De hecho, en el experimento B se verifica que la administración crónica de ASA reduce significativamente ($p \leq 0,01$) el valor de CEA ($0,29 \pm 0,03$) frente al valor de su lote "pair fed" ($0,33 \pm 0,02$) (Tabla 39), lo que nos indica que pese a no existir diferencias significativas en la cantidad de dieta consumida entre ambos lotes, el ASA actúa reduciendo la utilización nutritiva general de la dieta. El CEA del lote ASA es menor considerando globalmente el período de experimentación, pero si se divide la prueba en períodos de 15 días, observamos que el CEA de la primera quincena del lote ASA ($0,29 \pm 0,01$) es significativamente menor ($p \leq 0,01$) que el del lote alimentado a la par ($0,35 \pm 0,04$) mientras que el CEA de la segunda quincena del lote ASA ($0,31 \pm 0,06$) no varía significativamente respecto al CEA "pair fed" ($0,36 \pm 0,01$) en el mismo período. Por tanto, el efecto es más marcado en el período inicial del consumo del fármaco coincidiendo con el período de mayor crecimiento y de inmadurez enzimática de los animales.

En cuanto al peso del hígado, vemos que aparecen, en el experimento A, diferencias significativas entre el lote ASA ($4,4 \pm 1,1$ g) y el lote control ($6,6 \pm 1,2$ g) (Tabla 5) que se explicarían por una disminución del peso total, puesto que al independizar los valores de peso de hígado y peso total del animal, es decir, aplicando el IHS, no aparecen diferencias significativas entre el lote ASA ($43,7 \pm 7,2$) y el lote control ($49,4 \pm 4,2$) (Tabla 5).

En el experimento B, (Tabla 39) se muestra que, como era de esperar, tanto el lote con administración de ASA como su lote "pair fed" muestran pesos hepáticos y corporales significativamente menores ($p < 0,01$) que los valores del lote control (ingesta "ad libitum"), debido a las menores ingestas de los primeros. Comparando el peso del hígado de los animales que consumieron ASA ($6,462 \pm 0,43$) con el de su control "pair fed" ($6,185 \pm 0,40$) (Tablas 39), se observa que, aunque no de forma significativa el peso de los hígados del lote ASA es superior al del lote "pair fed". Si comparamos el IHS entre el lote ASA ($50,6 \pm 3,1$) con su respectivo lote "pair fed" ($43,8 \pm 3,1$) (Tabla 39) se observa que el lote con administración de fármaco presenta un índice significativamente superior ($p \leq 0,01$), lo que nos puede indicar que a igualdad de ingesta la administración del fármaco influye fundamentalmente sobre el crecimiento general pero también sobre el crecimiento hepático aunque en sentido inverso, posiblemente debido a alteraciones metabólicas que podrían dar lugar a un ligero aumento del peso del hígado. En cuanto a bibliografía sobre el tema que nos ocupa, no hemos encontrado ninguna referencia con quién comparar nuestros resultados.

5.1.2. Utilización nutritiva de la proteína: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN) y coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP).

Según YOUNG, V.R. y PELLET, P.L. (1987), el CDN es un parámetro extremadamente importante cuando se estudia la influencia de diferentes factores externos (Ej. drogas) sobre la utilización digestiva de la proteína que, por otro lado, tiene la ventaja de no presentar grandes fluctuaciones individuales por su metodología. Hemos estudiado esta digestibilidad en dos períodos de balance: el primero realizado durante 7 días, entre los días 4 y 11 del período experimental en lo que correspondería a un consumo de fármaco de corta duración, y el segundo de 10 días, correspondiente a los días 34-43, en lo que sería un consumo de fármaco de larga duración.

Desde el punto de vista digestivo, si consideramos los datos del CDN en las Tablas 14 y 15 encontramos que ni en la primera semana de administración de ASA ($0,93 \pm 0,01$ frente al lote control $0,93 \pm 0,01$), ni tampoco después de un consumo crónico del fármaco ($0,93 \pm 0,01$ con un control $0,92 \pm 0,01$), se afecta significativamente este índice.

Por otra parte, estudiamos el coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP), que expresa la ganancia en peso de los animales, en gramos, por gramo de proteína ingerida. Este concepto, que engloba tanto aspectos nutritivos como metabólicos, es probablemente el método más empleado, por su facilidad de realización, para la evaluación de la calidad nutritiva de la proteína. Se ha calculado este parámetro, por una parte durante todo el período experimental y, por otra, en períodos de 8 días de duración, para poder observar su evolución.

En el experimento A, el CEP total obtenido (Tablas 16,17) para el lote control ($1,87 \pm 0,40$) es significativamente superior al CEP total del lote ASA ($1,13 \pm 0,40$) (Figura 5). Del mismo modo, en el experimento B, en el que se estudia el efecto del fármaco y no de la ingesta pues, como hemos dichos son lotes alimentados a la par, (Tabla 40), ocurre también que el CEP del lote ASA ($6,61 \pm 0,52$) es significativamente menor al de su correspondiente control "pair fed" ($5,29 \pm 0,44$) (Figura 9). Estos cambios encontrados en la utilización nutritiva de la proteína, en los animales que consumieron ASA, deberán achacarse a la influencia del fármaco sobre la utilización metabólica de dicho nutriente, y pueden ser debidas, por un lado, a que dosis altas de salicilatos pueden provocar en animales y hombre, proteinuria, cilindruria y aumento del número de células en el sedimento de la orina, como consecuencia de lesiones degenerativas tubulares reversibles (LITTER, M. 1986), lo que significa que podría producirse por estas causas un incremento de la excreción de nitrógeno. Por otra parte, el ASA actúa sobre la función mitocondrial desacoplando la fosforilación oxidativa en el músculo esquelético, hígado y riñón, por competencia con el NAD impidiendo la fosforilación del ADP, aún cuando la cadena respiratoria continua su proceso oxidativo (AZANZA, J.R. y CUENA, R. 1986; HAAS, R. y col. 1985). En consecuencia, a pesar de que aumentan las unidades de glucosa metabolizadas y el consumo de oxígeno, la eficiencia de la oxidación de la glucosa, medida como producción de ATP, disminuye (THURSTON, J.H. y col. 1970; MIYIHARA, J.T. 1965; LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987). Esto implica un déficit de ATP que, al no generarse de forma óptima, provoca un aumento en el catabolismo de los sustratos de la fosforilación para obtener la energía que necesita la célula; estos sustratos son, entre otros, los aminoácidos (LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987). Por tanto, creemos que un aumento del catabolismo aminoacídico podría manifestarse como una reducción del CEP. Además, con dosis tóxicas de salicilatos, el déficit de ATP puede ser importante puesto que puede dar lugar a un balance negativo de nitrógeno, no solo por el aumento del catabolismo proteico, sino porque la falta de ATP para la reabsorción activa de aminoácidos en el riñón da lugar a aminoaciduria (LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987). De todos modos, se conoce poco el mecanismo de la aminoaciduria provocada por salicilatos (INSEL, P.A. 1991). Junto con todo esto, al déficit de ATP contribuye el estímulo de la actividad ATPásica de los salicilatos (LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987).

Considerando las variaciones en el coeficiente de eficacia proteica a lo largo de toda la prueba dividida en períodos de 8 días en el experimento A (Figura 5) y en períodos de 15 días en el experimento B, observamos que el efecto significativo ($p \leq 0,05$) del fármaco sobre la utilización nutritiva de la proteína, se produce sobre todo en la primera parte, durante los primeros 15 días y en ambos estudios, ya que a partir de la tercera semana desaparecen las diferencias y, por tanto, puede ser que se produzca una adaptación enzimática

del animal al consumo del fármaco y/o una reducción de las necesidades proteicas para el crecimiento por el aumento de la edad, de modo que el efecto del fármaco sobre el aprovechamiento nutritivo de la proteína no sea suficiente para modificar el CEP.

5.1.3. Coefficiente de utilización digestiva de la grasa (CDG).

Se ha determinado la influencia del fármaco sobre la digestibilidad de la grasa, tanto por la importancia del nutriente en sí, como por que nos permite conocer la utilización digestiva de la dieta en general y detectar si está alterada. Por ello, la determinación del CDG es un parámetro que utilizamos para diagnosticar el funcionalismo digestivo en general.

En nuestro trabajo, como ya hemos visto, la digestibilidad de la proteína no se afecta en ningún caso, ni en la fase inicial ni en la final, por lo que cabe suponer que tampoco se encuentre alterada la digestibilidad lipídica. Es de destacar que en la bibliografía consultada no hemos encontrado trabajos equivalentes al de nuestro diseño experimental en cuanto al posible efecto de los fármacos ensayados sobre la digestibilidad de la grasa. De la misma forma que para el CDN, al comparar los resultados con el lote control (Tablas 28,29) no influye de forma significativa ni el efecto ni la duración de la administración del fármaco sobre el valor de CDG. Los valores obtenidos para el lote ASA son en el primer y segundo período $0,98 \pm 0,00$ y $0,98 \pm 0,00$ respectivamente.

5.1.4. Enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en hígado.

El hígado es el principal órgano en cuanto a catabolismo de aminoácidos se refiere (LINDER, M.C. 1988a): por ello, modificaciones bioquímicas en los sistemas metabólicos de los aminoácidos en el hígado (Ej. niveles de transaminasas) pueden ser indicativas de algunas deficiencias dietéticas (BURNETTE, M.A. y BABCOCK, M.J. 1978). Además de las variaciones encontradas en el IHS, los valores enzimáticos de GOT obtenidos muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el lote ASA ($50 \pm 10,8$ UI/g) (Tabla 31) y el lote control ($30 \pm 13,4$ UI/g) (Tabla 30) (Figura 6) que creemos pueden deberse al efecto que el ASA ejerce sobre la fosforilación oxidativa, que da lugar, como dijimos anteriormente, a un aumento del catabolismo aminoacídico (LORENZO VELAZQUEZ, B. 1987). Para que los aminoácidos entren en la fosforilación debe, primeramente, producirse una transaminación del aminoácido a un cetoácido (SANCHEZ-JIMENEZ, F. y NUÑEZ DE CASTRO, I. 1991), lo cual podría concordar con el aumento de la actividad transaminásica en el hígado. Sin embargo, los valores de GPT no muestran diferencias significativas entre el lote que consumió ASA ($12 \pm 2,9$ UI/g) (Tabla 31) y el lote control ($10 \pm 2,3$ UI/g) (Tabla 30). De todos modos, no hemos encontrado datos sobre el efecto de la administración de ASA sobre niveles de transaminasas en hígado.

5.1.5. Componentes de la ruta de transmetilación-transulfuración:

En este apartado hemos tratado de esclarecer si la administración crónica de ASA modifica de forma cualitativa o cuantitativa los folatos en el organismo, tanto a nivel sérico como hepático, y todo ello en base a distintos trabajos publicados que inducen a pensar que podría ser así, pero que sin embargo, no permiten llegar a una conclusión clara. Como es sabido, el análisis del contenido y distribución de folatos presenta numerosos problemas

metodológicos, sobre todo debido al gran número de derivados oxidados y reducidos que presenta, y a la dificultad de cuantificarlos tanto a nivel de sustitución del anillo pteridínico, como en la longitud de la cadena glutámica. En este trabajo hemos utilizado el método de VARELA-MOREIRAS, G. y col. (1991b) que emplea cromatografía de afinidad y HPLC, y que ha sido ya demostrada su utilidad en diversas publicaciones (VARELA-MOREIRAS, G. y SELHUB, J. 1992; VARELA-MOREIRAS, G. y col. 1992) en el estudio de la acción de diferentes efectores sobre el metabolismo de los folatos.

Por otra parte, hemos visto que la administración crónica de ASA puede disminuir el aprovechamiento nutritivo de la proteína y, además como ya hemos indicado, sabemos que los folatos intervienen de forma activa en el metabolismo de la metionina. Por todo ello, hemos querido ver si la administración del fármaco afecta al propio metabolismo de la metionina midiendo los niveles hepáticos de sus metabolitos (SAM y SAH).

5.1.5.1. Contenido sérico y hepático de ácido fólico. Distribución de los folatos en hígado.

El metabolismo celular del folato comprende diferentes reacciones en cada una de las cuales interviene un derivado del ácido fólico; éstos difieren entre sí en la estructura del anillo pteridínico y en la longitud de cadena del ácido glutámico.

Por tanto la determinación de la distribución de los folatos tiene el valor de contribuir a un mejor entendimiento del metabolismo celular folato-dependiente, muy especialmente en lo que se refiere al efecto de fármacos y otros nutrientes.

En diferentes estudios, se ha sugerido la posibilidad de una interacción del ASA sobre el ácido fólico sérico, debido a que la vitamina se encuentra unida a las proteínas plasmáticas en grandes proporciones aunque de una forma débil y ello hace que, sea vulnerable al desplazamiento por la acción de algunos fármacos, entre ellos el ASA (LAWRENCE, V.A. y col. 1984). La bibliografía que existe a este respecto, generalmente en humanos, es contradictoria. Así, el estudio de LAWRENCE, V.A. y col. (1984) ha servido de apoyo a las observaciones previas hechas por ALTER, H.J. y col. (1971) sobre la depleción de folato inducida por la administración de ASA: en él encontraron que en una mujer sana presentaba niveles séricos más bajos, tanto de fólico libre como conjugado, durante un período en el que estaba tomando dosis terapéuticas de ASA que antes o después del tratamiento. Se controló la ingesta de ácido fólico en su dieta y se vio que era similar en todo el período de investigación. Estos datos coinciden con los obtenidos por SHEVCHUK, O.A. y ROE, D.A. (1985) en los que se encontraba una alteración en la concentración y unión de folato plasmático en 16 mujeres sanas a las que se les controló la ingesta de esta vitamina y se les administró 3,9 g de ASA diariamente durante 3 días. Los autores sugieren que el efecto del ASA puede ser importante como explicación para los bajos valores de folato encontrados en ciertos grupos de individuos, incluyendo las personas de edad avanzada. Esto sería un problema en caso de pacientes por ejemplo, de artritis reumatoide, en los que simultáneamente a la administración de ASA presentan una ingesta inadecuada de folato y, por tanto, sus niveles corporales en folato ya estarían previamente comprometidos (ALTER, H.J. y col. 1971; SHEVCHUK, O.A. y ROE, D.A. 1985; ROE, D.A. 1985).

Sin embargo, el mecanismo de acción del ASA sobre los folatos se desconoce. Algunos autores, explican que la causa por la cual el ASA desplaza al folato podría ser la acetilación de la albúmina plasmática, disminuyéndose así la fijación proteica de la vitamina

(LAWRENCE, V.A. y col. 1984). Por otra parte, se vio que la eliminación urinaria de folato no aumentaba durante el período de administración del ASA (SHEVCHUK, O.A. y ROE, D.A. 1984). Por lo que, según ZIMMERMAN, J. y col. (1985) y la revisión de GREGORY III, J.F. (1989), el ASA lo que hace es retrasar la absorción de los folatos. Sin embargo, HOPPNER, K. y LAMPI, B. (1986), indican que la administración crónica de ASA no reduce la biodisponibilidad de mono o poliglutamilfolato en ratas. En nuestros resultados a nivel sérico, no han aparecido diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las concentraciones de folatos (Tabla 42) de las ratas del lote ASA ($68 \pm 68,5$ ng/ml) y las del lote alimentado a la par ($68 \pm 17,4$ ng/ml) y se trata de una administración crónica durante 30 días y con un control exhaustivo de la ingesta, con las limitaciones lógicas que supone la extrapolación de resultados de la rata a humanos.

En el metabolismo celular del folato indicado en el esquema inicial comprende diferentes reacciones en cada una de las cuales intervienen determinados enzimas. Se están realizando estudios muy interesantes sobre los posibles efectos de los analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos sobre los enzimas dependientes del folato. Las primeras informaciones al respecto las aportaron HA, T. y col. en 1990 y, posteriormente BAGGOTT, J.E. y col. en 1992 realizaron un trabajo en el que se investigaba el efecto de los analgésicos más importantes sobre la dihidrofolato reductasa y la fosforibosil-aminoimidazol-carboxamida formiltransferasa (AICAR transformilasa). En cuanto al ASA los resultados obtenidos sobre la inhibición competitiva con estos enzimas dependientes del folato fueron que se mostraba activo sobre la AICAR transformilasa e inactivo sobre la dihidrofolato reductasa. El trabajo concluye con que las propiedades antiinflamatorias de los analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos son resultado, en parte, de la interferencia con el metabolismo del folato.

El hígado es principal almacén de folatos en el organismo y ejerce un efecto regulador para mantener la homeostasis de la vitamina (STEINBERG, S.E. 1984). Por tanto, la determinación cuantitativa y cualitativa de los folatos a nivel hepático va a permitir evaluar si la ingesta crónica de ASA induce o no deficiencia de ácido fólico en el hígado. Además, VARELA-MOREIRAS, G. y SELHUB, J. (1992), indican que una disminución de la concentración total de folato conlleva variaciones en la formación de los distintos poliglutamatos independientemente del efector que cause esta deficiencia (VARELA-MOREIRAS, G. y col. 1992). También, EICHNER, E.R. y col. (1979) sugirieron que si el ASA provoca una disminución de los folatos séricos, esto podría perjudicar a la captación celular y una pequeña proporción de los folatos desplazados podría llegar a la orina o las heces y, por tanto, la administración diaria de ASA podría causar con el tiempo una deficiencia tisular de folatos.

En nuestros resultados en cuanto a concentración de folatos en el hígado, no aparecieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores del lote ASA ($30,31 \pm 9,48$ nmol/g) y los valores del lote "pair fed" ($25,96 \pm 17,25$ nmol/g) (Tabla 42). De acuerdo con esto, y como era de esperar, tampoco aparecieron variaciones en la distribución de los folatos hepáticos según la longitud de la cadena glutámica (Figura 11) entre los lotes ASA y "pair fed", solamente en el lote ASA se produjo un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de los derivados pentaglutmáticos ($51,8 \% \pm 2,1$) respecto al grupo alimentado a la par ($42,3 \% \pm 8,9$) a expensas de los derivados hexa y heptaglutmáticos (Tabla 45,46). También encontramos pequeños cambios en la distribución de los folatos derivados del anillo pteridínico (Figura 10): se ha visto una disminución en el lote con administración de ASA en cuanto al contenido de 5-metiltetrahidrofolato ($45,8 \% \pm 5,8$) respecto a los controles "pair fed" ($51,0 \% \pm 11,3$) (Tabla 43), lo que podría estar relacionado, según observaciones previas realizadas por VARELA-MOREIRAS, G. y SELHUB, J. (1992), con que una

deficiencia de folatos en tejidos está asociada a una disminución en la proporción de 5-metiltetrahidrofolato.

Por tanto, por los resultados obtenidos en este estudio se demuestra que la administración crónica de ASA no provoca cambios cuantitativos ni cualitativos importantes de los folatos hepáticos en las ratas.

5.1.5.2. Contenido hepático de S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH). Relación SAM/SAH.

Como hemos expuesto anteriormente en nuestras condiciones experimentales, el ASA afecta, a la utilización nutritiva de la proteína y, según la bibliografía, también a los niveles séricos de ácido fólico. Un punto en común entre ambos nutrientes podría ser el metabolismo celular de la metionina, es decir, la ruta de transmetilación-transulfuración, puesto que, por una parte, el metiltetrahidrofolato es esencial para la regeneración de la SAM (STIPANUK, M.H. 1986) y, por otra, la metionina a partir de esta vía puede seguir la ruta del succinato produciéndose la degradación oxidativa de este aminoácido (STIPANUK, M.H. 1986).

El estudio se ha realizado en el hígado, por ser el órgano en el que se sabe que se encuentran todos los enzimas implicados en la ruta transmetilación-transulfuración (FINKELSTEIN, J.D. 1989). En esta ruta, la metionina se transforma a su forma activa, la SAM que es el donador de metilos esencial en más de 400 reacciones biológicas conocidas (GALIANA, A. 1987). Por ello, la alteración de las concentraciones hepáticas de este compuesto podría afectar negativamente a numerosas rutas metabólicas.

Nuestros resultados demuestran que la administración crónica de ASA no afecta significativamente (Figura 20) a los niveles hepáticos de SAM ($116,9 \pm 34,8$ nmol/g) respecto a su lote control "pair fed" SAM ($94,99 \pm 23,6$ nmol/g) (Tabla 50), aunque aumenta significativamente ($p \leq 0,05$) la concentración de SAH ($69,38 \pm 12,4$ nmol/g) cuando se administra ASA respecto al valor control SAH ($46,55 \pm 5,2$ nmol/g) (Tabla 50). Dada la importancia de los procesos de transmetilación es necesario mantener una relación SAM/SAH dentro de unos límites determinados (CORRALES IZQUIERDO, F. 1992), así la administración de ASA no modificó este cociente SAM/SAH ($1,69 \pm 0,43$) respecto al lote alimentado a la par ($2,03 \pm 0,37$) (Tabla 50).

Por tanto, las modificaciones causadas por la administración prolongada de ASA en las concentraciones de SAM y SAH no modifican la capacidad de metilación en las ratas.

5.2. ACETAMINOFENO (ACAP).

En este Capítulo nos referiremos, a la influencia del acetaminofeno (ACAP) sobre distintos parámetros nutricionales, bioquímicos y a su toxicidad determinada mediante cortes histológicos observados a microscopía óptica y electrónica, todo ello en ratas adecuadamente nutridas. La ingesta en el experimento A fue "ad libitum", y en el experimento B se alimentaron a la par el lote que consumió ACAP y otro control al que denominamos "pair fed". Para ello, compararemos estadísticamente los resultados obtenidos entre los lotes de ratas no ingirieron ACAP y los que consumieron fármaco.

Las dosis administradas a los animales, 570 ± 59 mg/Kg peso corporal en el experimento A y 600 mg/Kg peso corporal en el experimento B y C, son del mismo orden a las empleadas por otros autores como: BEIERSCHMITT, W.P. y col. (1989), DE MORAIS, S. y WELLS, P.G. (1989), SATO, C. e IZUNI, M. (1989), etc. Y como ya explicamos en el apartado MATERIAL Y METODOS y en el caso del ASA, se han obtenido de una tabla de FREIREICH, G. y col. (1966) que nos proporciona los factores de conversión para dosificación equivalente según la superficie corporal para distintas especies. La dosis administrada a los animales que consumieron una dieta deficiente en metionina es algo menor (410 ± 62 mg/Kg peso corporal) y se ha utilizado también por autores como: PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. (1989), BEN-ZVI, Z. y col. (1990).

5.2.1. Parámetros generales: ingesta sólida, peso corporal, crecimiento, coeficiente de eficacia alimentaria (CEA), peso del hígado e índice hepatosomático (IHS).

En cuanto a la acción del fármaco sobre los distintos parámetros nutricionales generales, en el experimento A encontramos que el ACAP consumido durante 43 días, por ratas nutridas con una dieta adecuada a sus necesidades reduce algo la cantidad de dieta ingerida ($7,9 \pm 0,8$ g/día) (Tabla 5), respecto al lote control ($8,3 \pm 0,6$ g/día), aunque las diferencias no llegan a ser significativas hasta el día 33 del período experimental a partir del cual la ingesta global (días 33-43) del lote ACAP ($61,3 \pm 6,1$ g) es significativamente menor ($p \leq 0,05$) que la del lote control en ese mismo período ($71,3 \pm 9,7$ g).

En cuanto al crecimiento, en el experimento A donde los animales consumían dieta "ad libitum", la administración crónica de ACAP reduce, aunque no de forma significativa, el incremento de peso de los animales ($1,6 \pm 0,4$ g/día) (Tabla 5) con respecto al lote control ($2,0 \pm 0,5$ g/día) (Tablas 1 y 5). Cuando la ingesta es exactamente la misma, lotes ACAP y control "pair fed" ($9,5 \pm 0,0$ g/día) (Tabla 39) en el experimento B, el incremento de peso si se reduce significativamente ($p \leq 0,01$) con el consumo del fármaco ($2,6 \pm 0,1$ y $2,9 \pm 0,2$ g/día respectivamente) (Tabla 39). En la Figura 8 se muestra la evolución diaria del crecimiento en los lotes alimentados a la par ACAP y su "pair fed". Estos datos son comparables a los obtenidos por VARELA-MOREIRAS, G. y col. (1991a). También, McLEAN, A.E.M. y col. (1989) encontraron una disminución del crecimiento dosis-dependiente en ratas alimentadas con una dieta que contenía un 1% de ACAP. REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. (1989) encontraron una reducción del crecimiento en ratones cuando se aumenta la dosis de ACAP en dietas con un 0,5% de metionina durante dos semanas. Los autores explican que este efecto puede deberse al posible efecto inhibitor del crecimiento del fármaco, por la depleción de aminoácidos que produce en el curso de su metabolismo, que implica un aumento de los requerimientos de metionina (REICKS, M. y col. 1987; HATHCOCK, J.N. 1987). Por ello, creemos que se podría dar lugar a una reducción de la biodisponibilidad de la metionina para la síntesis proteica necesaria para el crecimiento del

mismo modo que ocurre cuando se administran dietas deficientes en este aminoácido (PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. 1989). Además, los hepatocitos se encuentran alterados en los animales que consumieron ACAP, como indicaremos más adelante en el estudio histológico, lo que también puede afectar la síntesis proteica, pues como es sabido el hígado es uno de los principales órganos en cuanto a metabolismo proteico se refiere (LINDER, M.C. 1988a).

Para intentar independizar los parámetros ingesta y crecimiento, utilizamos el coeficiente de eficacia alimentaria (CEA) que, como es sabido, expresa el cociente entre el incremento de peso y la sustancia seca ingerida, y encontramos en el experimento A que, aunque disminuye en los animales con administración de ACAP ($0,21 \pm 0,03$) respecto a los animales controles ($0,24 \pm 0,05$), esta reducción no es significativa (Tabla 5). VARELA-MOREIRAS, G. y col. (1988) obtuvieron anteriormente resultados similares también en ratas. Por tanto, vemos que en animales con administración crónica de ACAP que comen "ad libitum" (experimento A) se reduce la ingesta, el crecimiento y el CEA aunque no de forma significativa. En el experimento B, cuando se fija la ingesta, se reducen significativamente ($p \leq 0,01$) tanto el crecimiento como el CEA ($0,27 \pm 0,01$) del lote ACAP respecto al lote control "pair fed" ($0,31 \pm 0,01$) (Tabla 39) lo que nos indica que es el consumo del fármaco el que da lugar a un retraso del crecimiento y menor aprovechamiento nutritivo de la dieta.

En el experimento A, la administración de ACAP, reduce aunque no significativamente el peso del hígado ($6,4 \pm 0,9$ g) respecto al control ($6,6 \pm 1,2$ g) (Tabla 5). Así, al relacionar el peso del hígado con el peso total del animal mediante el índice hepatosomático (IHS) no aparecen diferencias significativas entre el valor del lote ACAP ($51,5 \pm 5,4$) y el valor del lote control ($49,4 \pm 4,2$) (Tabla 5). Anteriormente VARELA-MOREIRAS, G. (1989) obtuvieron resultados parecidos con el mismo nivel de significación y administración de ACAP. En el experimento B, no aparecen diferencias significativas entre el peso hepático del lote ACAP ($6,563 \pm 0,736$ g) y su correspondiente "pair fed" ($6,109 \pm 0,616$ g) ($p \leq 0,05$), siendo el primero algo mayor que el segundo. Sin embargo, el IHS se ve significativamente incrementado con el consumo del fármaco (lote ACAP $51,3 \pm 6,3$, lote "pair fed" $44,2 \pm 4,1$) ($p \leq 0,05$). Por lo tanto, el consumo del fármaco no sólo afecta al peso total, sino que también al peso del hígado en particular, posiblemente por las alteraciones metabólicas que origina el fármaco.

5.2.2. Utilización nutritiva de la proteína: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN) y coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP).

Desde el punto de vista digestivo, si consideramos los datos del CDN para ratas que consumieron ACAP junto con una dieta adecuada a sus necesidades (Tablas 14,15), encontramos que ni en la primera semana de balance ($0,94 \pm 0,01$, lote ACAP vs $0,93 \pm 0,01$, lote control), ni tampoco después de un consumo crónico del fármaco ($0,93 \pm 0,01$) frente al control ($0,92 \pm 0,01$), se afecta significativamente este índice. Por tanto, el ACAP, en estas condiciones, no afecta a la utilización de la proteína a nivel digestivo.

Al analizar los resultados del CEP en el experimento A, que nos indican la utilización de la proteína para el crecimiento durante todo el período experimental en animales alimentados "ad libitum", encontramos que no aparecen diferencias significativas entre el CEP del lote control ($1,87 \pm 0,40$) y el CEP del lote que consumió ACAP ($1,65 \pm 0,23$) (Figura 5). Resultados similares se obtuvieron anteriormente por VARELA-MOREIRAS, G. y col. (1988, 1991a). Según estos resultados, el ACAP no parece afectar al CEP cuando los animales pueden libremente regular la ingesta, pese a las modificaciones encontradas en su crecimiento. Posteriormente, en el experimento B, al igualar las ingestas del lote ACAP y su

control, si encontramos una reducción significativa del CEP en los animales que consumieron ACAP ($4,41 \pm 0,12$) respecto al lote "pair fed" ($4,95 \pm 0,30$) (Tabla 40, Figura 9). También quisimos comprobar en que período del consumo de ACAP, se afecta este índice. Para ello, consideramos las variaciones en el CEP a lo largo de toda la prueba dividida en períodos de 8 días y observamos que el efecto significativo ($p \leq 0,05$) del fármaco sobre la utilización nutritiva de la proteína se produce en la primera parte del estudio, durante los primeros 15 días, ya que a partir de la tercera semana desaparecen las diferencias, en parte posiblemente por una adaptación enzimática del animal al consumo del fármaco (Figura 7). No obstante, no debemos olvidar que estos resultados corresponden a animales alimentados con dietas con unos contenidos en nutrientes adecuados para el crecimiento.

Todos estos cambios encontrados en la utilización nutritiva de la proteína, determinada mediante el CEP, por la administración de ACAP, indicados en el experimento A (Figura 5), y en el experimento B (Tabla 40 y la Figura 9) deberán relacionarse con la influencia del fármaco sobre la utilización metabólica de dicho nutriente, pues como ya hemos comentado no hay variaciones en el CDN. La disminución observada del aprovechamiento proteico para el crecimiento puede deberse, según diversos autores, al incremento de los requerimientos de metionina para llevar a cabo la metabolización de ACAP (GREENBERG, D.M. 1975; REICK, M. y col. 1987; HATHCOCK, J.N. 1987; REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1989; HATHCOCK, J.N. 1990). Para ello, la metionina utiliza la ruta metabólica transmetilación-transulfuración que da lugar a la síntesis de cisteína (STIPANUK, M.H. 1986) y a la de glutatión (MOLDEUS, P. 1981), péptido encargado en gran medida de neutralizar el producto tóxico resultado de la metabolización del ACAP (MINER, D.J. y KISSINJER, P.T. 1979; MEISTER, A. 1989b). Este aumento de la utilización del aminoácido para metabolizar el ACAP podría comprometer a la metionina para la síntesis proteica, especialmente porque es el aminoácido iniciador de la misma (LEHNINGER, A.L. 1985b). Además, como veremos más adelante, el ACAP produce hepatotoxicidad en la rata y, por tanto, alteraciones en el hepatocito que también podrían dar lugar a modificaciones en la síntesis proteica.

El hecho de que en nuestras condiciones, el efecto del ACAP reduciendo el CEP aparezcan en los primeros 15 días de la prueba podría deberse a que las necesidades de metionina para la síntesis de proteínas estructurales, esenciales para el crecimiento, son más altas en este período (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1991), por ello el efecto reductor de la tasa de utilización metabólica de la proteína en el primer período de administración de fármaco (15 primeros días) es más marcado. Pensamos también, que este efecto más acusado en las etapas iniciales de consumo de fármaco, puede ser debido a una saturación de los sistemas enzimáticos detoxificadores que no se encuentren completamente desarrollados a temprana edad, y estaría en relación con el mecanismo hepatotóxico del fármaco aún no elucidado completamente.

5.2.3. Coeficiente de utilización digestiva de la grasa (CDG).

En el lote control se observa tanto en el primer período de balance ($0,98 \pm 0,00$), como en el segundo ($0,98 \pm 0,00$), unos valores de CDG excelentes y del mismo orden que en otros trabajos: SAN FELIU, P. (1983); VARELA, G. (1963) y VARELA, G. y MURILLO, A. (1975) (Tablas 28,29).

En el lote con administración de ACAP con respecto a las cifras de CDG, no se encuentran diferencias significativas con los controles, ni en el período inicial ($0,97 \pm 0,02$) ni tampoco para el período final ($0,98 \pm 0,01$) (Tablas 28,29). Resultados similares se obtuvieron anteriormente en el Departamento por VARELA-MOREIRAS, G. y col. (1990b).

5.2.4. Estudio morfológico del hígado: observación mediante microscopía óptica y electrónica y análisis histológico.

Como ya indicamos en el apartado de Revisión Bibliográfica, en el transcurso del metabolismo del ACAP se origina un metabolito electrofílico tóxico, llamado N-acetilbenzoquinonaimina (NABQI) (JOLLOW, D.J. y col. 1974). Las células hepáticas se protegen de dicho compuesto mediante el glutatión por la formación de ácidos mercaptúricos atóxicos (MINER, D.J. y KISSINJER, P.T. 1979; MEISTER, A. 1989a). Cuando la NABQI se forma en cantidades suficientes para agotar el glutatión, reacciona con grupos sulfhidrilos de macromoléculas hepáticas dando lugar a necrosis (MINER, D.J. y KISSINJER, P.T. 1974; INSEL, P.A. 1991). Además, la síntesis de glutatión depende directamente de la disponibilidad de sulfoaminoácidos como la metionina (MOLDEUS, P. 1981; PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. 1989; HATHCOCK, J.N. 1990)

Un estudio realizado por PLACKE, M.E. y col. en 1987a nos define histológicamente el proceso hepatotóxico producido después de una ingesta de una dosis aguda de 600 mg/Kg de peso de ACAP en ratón: durante las dos primeras horas aparece citomegalia y rápida progresión a necrosis. Ultraestructuralmente aparece vesiculación, vacuolización, y degeneración de la membrana mitocondrial y plasmática, culminándose el proceso a las cuatro horas con la muerte celular, las células quedan esparcidas y a las ocho horas se produce la necrosis centrilobular en gran extensión. Se cree que el retículo endoplásmico es el punto de activación y de ataque inicial del ACAP y, por ello, se piensa que estos orgánulos juegan un papel crítico en la hepatotoxicidad producida por el ACAP. En nuestro estudio observamos que la dosis de 570 ± 59 mg de ACAP/Kg administrada durante 43 días en ratas con ingesta de dieta completa y "ad libitum" produce vacuolización del citoplasma de los hepatocitos (Figura) aunque respetándose la arquitectura del parénquima hepático, lo que confirma que el ACAP, en nuestras condiciones es un fármaco hepatotóxico en ratas. Esta hepatotoxicidad puede ser debida en gran medida por la teoría de la unión covalente, indicada básicamente en el párrafo anterior, en la que la NABQI se une a proteínas hepáticas por agotamiento del glutatión reducido. Pero las ratas consumieron una dieta completa que cubría sus necesidades en cuanto a sulfoaminoácidos se refiere, por ello, creemos que también intervienen otros mecanismos tóxicos alternativos del ACAP aún no elucidados completamente, como pérdida de integridad de la membrana plasmática por alteración de la función mitocondrial (BURCHAM, P.C. y HARMAN, A.W. 1990) o modificaciones en la homeostasis celular del calcio (CORCORAN, G.B. y col. 1988; BOOBIS, A.R. y col. 1990, SHEN, W. y col. 1992).

5.2.5. Enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en hígado.

Los enzimas GOT y GPT están encargadas de la transaminación de grupos amino en una primera fase de los procesos catabólicos de los aminoácidos (SANCHEZ-JIMENEZ, F. y NUÑEZ DE CASTRO, I. 1991). Cuando se producen determinadas patologías, hepáticas y miocárdicas fundamentalmente, se produce un aumento de GOT y de GPT plasmáticas por lo que se utilizan habitualmente como indicadores de diagnóstico (HENRY, J.B. 1988). Existe una amplia descripción bibliográfica sobre el efecto del ACAP en el aumento en la actividad transaminásica sérica, al ser uno de los parámetros bioquímicos más utilizados para determinar la posible alteración hepática causada por el fármaco (CROME, P. y col. 1976; SKOGLUND, L.A. y col. 1986). Así, CROME, P. y col. en 1976 demostró en su estudio que la ingestión de una dosis alta de ACAP eleva la GOT plasmática en la mayoría de los pacientes que constituían su muestra. FLOREZ, J. y col. 1987a indican que el aumento de

la GOT y GPT séricas se produce a las 12-24 horas de la ingestión de una dosis tóxica de ACAP. Debido a este efecto tan marcado en plasma, y sabiendo que el hígado es el principal órgano en el metabolismo de aminoácidos, podría ocurrir que se afectasen también los niveles de transaminasas hepáticas. Nuestros resultados muestran un ligero aumento en la actividad enzimática de los valores de GOT ($36 \pm 13,5$ UI/g órgano) y GPT ($11 \pm 3,9$ UI/g órgano) del lote ACAP (Tabla 32) frente a los valores control (GOT $30 \pm 13,4$ UI/g órgano y GPT $10 \pm 2,3$ UI/g órgano) (Tabla 30). Sin embargo y teniendo en cuenta la gran dispersión de resultados no aparecen diferencias significativas entre ambos lotes (Figura 6).

5.2.6. Componentes y metabolitos de la ruta transmetilación-transulfuración (t-t).

Tanto por los datos de este estudio como por otros anteriores (VARELA-MOREIRAS, G. 1989), podemos decir que el ACAP, en determinadas condiciones experimentales, disminuye el aprovechamiento nutritivo de la proteína. Esto puede deberse a distintos factores, como ya discutimos anteriormente, siendo uno de ellos el incremento de las necesidades de metionina para el metabolismo del ACAP (REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1989; HATHCOCK, J.N. 1990) vía síntesis de cisteína y posteriormente de glutatión para neutralizar la NABQI (HATHCOCK, J.N. 1990). Para que se verifique este proceso es necesario que la metionina sufra la ruta t-t indicada en la Figura 2. del apartado Revisión Bibliográfica. Por ello, esta parte del estudio está orientada a observar, si el incremento del funcionamiento de esta ruta por la administración crónica de ACAP, puede afectar a algunos de los componentes (folatos) o metabolitos (SAM y SAH) que intervienen en ella.

5.2.6.1. Contenido sérico y hepático de ácido fólico. Distribución de los folatos en hígado.

La intervención de los folatos en la ruta t-t se indica en la Figura 2. del apartado 2 de la Revisión Bibliográfica y se ha comentado ampliamente en el apartado 5.1. de esta Tesis: y tiene como paso crucial que el 5-metiltetrahidrofolato es esencial para la regeneración de la SAM. Bibliográficamente este tema no ha sido muy estudiado y por ello, no hemos encontrado trabajos similares al nuestro. BAGGOTT, E. y col. (1992) realizaron un estudio sobre el efecto de los principales analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos sobre los enzimas dependientes del folato, en cuanto a los resultados obtenidos sobre el ACAP, vieron que no mostraba actividad inhibitoria sobre los enzimas estudiados y los autores explican que este hecho es debido a su escasa actividad antiinflamatoria, es decir, que las propiedades antifolato no aparecen en fármacos que solo tienen actividades analgésicas y antipiréticas.

En nuestro trabajo, tanto las concentraciones séricas de folatos en el lote ACAP ($54 \pm 11,20$ ng/ml) como hepáticas ($19,57 \pm 3,01$ nmol/g) no son significativamente diferentes de las de su control "pair fed" ($96 \pm 55,52$ ng/ml en suero) y ($19,07 \pm 4,32$ nmol/g en hígado) (Tabla 42).

En cuanto a la distribución de los folatos hepáticos según el número de restos de glutámico, no aparecen diferencias entre los dos grupos: ACAP y "pair fed" (Figura). En ambos lotes, las fracciones de derivados penta y hexaglutámicos representan las mayores fracciones (aproximadamente 85 %) con pequeños incrementos de las otras fracciones para el lote ACAP (Tabla 48,49; Figura).

La distribución de folatos hepáticos en función de la estructura del anillo pteridínico,

presenta pequeñas diferencias entre los dos lotes ACAP y "pair fed" (Figura 10) aunque no llegan a ser significativas. Así, en el lote ACAP aumenta la fracción de 5-metiltetrahidrofolatos ($43 \% \pm 5,7$) respecto al lote control ($34 \% \pm 11,0$) y disminuyen las fracciones de formiltetrahidrofolatos ($11 \% \pm 10,9$ vs $17 \% \pm 13,5$) y los folatos no sustituidos ($44 \% \pm 7,1$ vs $48 \% \pm 13,3$) (Tabla 44).

Por tanto, podemos decir que la administración prolongada de ACAP no afecta de forma significativa a los niveles corporales de ácido fólico ni a su distribución en las ratas.

5.2.6.2. Contenido hepático de S-adenosilmetionina (SAM) y de S-adenosilhomocisteína (SAH). Relación SAM/SAH.

Como ya se ha expuesto anteriormente, a partir de la metionina y mediante la ruta t-t se obtiene cisteína (STIPANUK, M.H. 1986), aminoácido que presenta un papel central en el metabolismo de muchos fármacos (GREENBERG, D.M. 1975). Este hecho es especialmente claro en el caso del ACAP pues la cisteína es un constituyente del glutathion (CHRISTENSEN, H.N. 1990), tripéptido encargado de la neutralización del metabolito tóxico del ACAP: la NABQI (MEISTER, A. 1989b). Por este mecanismo, algunos autores explican el aumento de los requerimientos de metionina cuando se consume ACAP (REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1989). Si esto es así, los distintos productos formados en la ruta podrían afectarse de alguna forma y concretamente en el hígado, pues es donde se conoce la existencia de todos los enzimas necesarios para esta vía metabólica (FINKELSTEIN, J.D. 1989).

El importante papel de la SAM en el caso de la administración de fármacos hepatotóxicos, se debe, además, a que en gran número de trastornos hepáticos se produce una reducción de los niveles de SAM (PASCALE, R. y col. 1984); por tanto, se puede decir que la SAM puede actuar promoviendo las reacciones de la vía de transulfuración y consecuentemente aumenta la capacidad de detoxificación de este sistema metabólico (ALMASIO, P. y col. 1990), aunque el mecanismo de acción preciso de la SAM en cada una de las alteraciones hepáticas no se conoce por el momento (CUTRIN, C. y col. 1991). Por otra parte, la SAM se encuentra a la venta en el mercado farmacéutico, ya que se ha demostrado su acción hepatoprotectora frente a lesiones producidas mediante agentes tóxicos, entre ellos el ACAP (STRAMENTINOLI, G. y col. 1987; BRAY, G.P. y col. 1992).

Se ha sugerido que la concentración de SAM es el factor clave en la regulación de la vía t-t (FINKELSTEIN, J.D. 1990). Por ello, en 1992 REICKS, M.M. y col. realizaron un estudio con ratones alimentados con dieta completa y deficiente de metionina (0,5% y 0,25% respectivamente) y a los que se les administró un 0,5% de ACAP. La concentración de SAM hepática no aumentó con el tratamiento dietético ni con la administración del fármaco, pero si lo hizo la concentración de SAH y, por tanto, disminuyó la relación SAM:SAH cuando se administró ACAP al lote alimentado con 0,5% de metionina respecto al que consumió 0,25% y estas modificaciones se deben, según los autores, a la pronunciada conversión de metionina a cisteína, y concluyen que una prolongada administración de ACAP en ratones no altera la disponibilidad de los grupos metilo para las reacciones de metilación. En nuestros resultados no se afectaron los niveles hepáticos de SAM ($83,72 \pm 19,8$ nmol/g), ni de SAH ($69,38 \pm 12,4$ nmol/g), ni la relación SAM/SAH ($2,03 \pm 0,22$) en las ratas que consumieron crónicamente ACAP con respecto a su control "pair fed" ($89,59 \pm 10,45$ nmol/g; $46,55 \pm 5,2$ nmol/g y $1,96 \pm 0,20$ respectivamente).

5.3. ACETAMINOFENO Y DEFICIENCIA EN METIONINA.

En este apartado nos referiremos al efecto que produce el consumo de ACAP en ratas cuando consumen una dieta cuya única fuente de aminoácidos es la caseína. Estudiamos los mismos parámetros nutricionales, bioquímicos y la toxicidad originada por el fármaco determinada mediante cortes histológicos observados a microscopía óptica y electrónica. Con este fin, compararemos los resultados de los lotes con administración de ACAP con aportes adecuado (fuente proteica caseína + DL-metionina) y deficiente de metionina (fuente proteica caseína) ambos al mismo nivel de proteína en la dieta.

5.3.1. Parámetros generales: ingesta sólida, peso corporal, crecimiento, coeficiente de eficacia alimentaria (CEA), peso del hígado e índice hepatosomático (IHS).

Como es conocido, se ha especulado por muchos autores CROME, P. y col. (1976), SKOGLUND, L.A. y col. (1986), LAUTENBURG, B.H. y SMITH, C.V. (1986), MEREDITH, T.J. y col. (1986), PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. (1989), McCLEAN, A.E.M. y col. (1989), HATHCOCK, J.N. (1990), que la metionina puede actuar como agente protector frente a la hepatotoxicidad producida por el ACAP. Por esta razón, se ha tratado de estudiar si un déficit dietario prolongado en dicho aminoácido esencial, puede potenciar los efectos de la administración de ACAP sobre los diferentes parámetros estudiados: ingesta, crecimiento, CEA e IHS.

En este sentido, se observa, como era de esperar, un efecto adicional negativo cuando se reduce el contenido de metionina en la dieta (lote ACAP DEF MET), y es entonces cuando el déficit de metionina junto con la administración del fármaco ocasionan una disminución significativa en todos los períodos estudiados ($p \leq 0,001$) tanto del peso ($0,7 \pm 0,3$ g/día vs $1,6 \pm 0,4$ g/día en el lote ACAP) como de la ingesta de las ratas ($5,6 \pm 0,9$ g/día vs $7,9 \pm 9,8$ g/día, en el lote ACAP) (Tabla 5). Se sabe que el crecimiento, cuando se ingiere una dieta deficiente en aminoácidos disminuye, pues se produce una interrupción de la síntesis proteica (MEISTER, A. 1965), y en el caso de la metionina esta interrupción es más efectiva, como ya hemos indicado, por el papel iniciador de la misma que presenta la metionina (LEHNINGER, A.L. 1985b). Por tanto, uno de los primeros efectos encontrados cuando a un animal se le administra una dieta deficiente en metionina, está en relación con el crecimiento y es directamente dependiente de la ingesta del aminoácido. Así, las ratas que ingieren una dieta deficiente en metionina reducen los procesos anabólicos y crecen más lentamente que las que toman una dieta con un valor de metionina normal (GLAZENBURG, E.J. y col. 1983; PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. 1989). Como hemos visto al comienzo de este apartado, el consumo prolongado de ACAP reduce el incremento de peso respecto a animales controles, por tanto, podríamos decir que el consumo crónico de ACAP afecta al crecimiento y que en casos de malnutrición proteica este efecto sería mucho más marcado.

En cuanto al efecto sobre la reducción de la dieta ingerida OSBORNE, T.B. y MENDEL, L.B. (1916) y ROSE, W.C. (1931) fueron los primeros en demostrar que la deficiencia de un aminoácido en la dieta provoca una reducción de la ingesta del alimento. Son varias las hipótesis existentes: según algunos autores (HARPER, A.E. y col. 1964) esta disminución de la ingesta puede deberse a las variaciones del patrón normal de aminoácidos plasmáticos y, según otros (RUSSEK, M. 1971), a la presencia de receptores hepáticos que monitorizan los niveles de glucosa y amonio. Por tanto, como la reducción de la ingesta se ve poco afectada por la administración del fármaco el efecto creemos que se produce fundamentalmente por la malnutrición proteica.

El aprovechamiento nutritivo de la dieta basado en el CEA se reduce también significativa ($p \leq 0,001$) y drásticamente en el lote ACAP DEF MET ($0,12 \pm 0,04$) frente al lote ACAP ($0,21 \pm 0,03$) (Tablas 5). Así, el déficit en el aminoácido origina un mal aprovechamiento nutritivo general de la dieta y, como el fármaco que "per se" también reduce este aprovechamiento, ambos efectos actúan conjuntamente y producen un resultado negativo mayor en este índice.

Al estudiar el peso del hígado se producen diferencias significativas ($p \leq 0,005$) entre el lote ACAP DEF MET ($4,4 \pm 0,8$ g) y el lote ACAP ($6,4 \pm 0,9$ g) (Tablas 5). Al independizar los valores de peso de hígado y peso total del animal mediante el IHS, vemos que tampoco aparecen diferencias significativas entre ambos lotes observándose un valor ($50,6 \pm 6,3$) para el lote ACAP DEF MET y ($51,5 \pm 5,4$) para el lote ACAP (Tablas 5). Por lo que se deduce que la disminución del peso del hígado en el lote con dieta deficiente en metionina es directamente proporcional a la disminución del peso total del animal.

También VARELA-MOREIRAS, G. y col. (1990a y 1991a) en las ratas a las que se les administró ACAP y con desnutrición proteica experimental encuentran menor incremento de peso, ingesta sólida, CEA y peso de hígado, mientras que no se producen diferencias significativas en el IHS. De este modo, podría compararse en cierta medida con nuestro caso, por el escaso aporte en proteína, y consecuentemente en metionina, que se produciría en el experimento de los autores mencionados.

5.3.2. Utilización nutritiva de la proteína: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN) y coeficiente de eficacia proteica (CEP).

La deficiencia de metionina en la dieta, no influye negativamente sobre el CDN en animales que consumieron ACAP, ni en el primer período de balance en el lote ACAP DEF MET ($0,93 \pm 0,01$) ni en administración prolongada ($0,92 \pm 0,01$) (Tablas 14,15) frente al lote ACAP. Por tanto, la administración crónica de ACAP y los distintos niveles de metionina en la dieta, no afectan a la digestibilidad del nitrógeno ni tampoco a la eliminación, pues algunos autores han observado en ratas alimentadas con distintos niveles de metionina y administrando la misma dosis que nosotros de ACAP, que no varían los niveles de nitrógeno total urinario (PRICE, V.F. y JOLLOW, D.J. 1989).

El CEP del lote ACAP ($1,65 \pm 0,23$) es significativamente superior ($p \leq 0,001$) (Figura 5) al CEP del lote ACAP DEF MET ($0,94 \pm 0,31$) (Tablas 18,19). Por tanto, la acción conjunta de la deficiencia en metionina y la administración de ACAP, producen un efecto en los animales significativamente negativo ($p \leq 0,05$) en cuanto a la utilización de la proteína se refiere con respecto al lote ACAP. Y esto se así, pues en el lote ACAP observamos que se producía una adaptación al consumo del fármaco a partir de la tercera semana de administración de fármaco y en el lote ACAP DEF MET no se consigue esta adaptación en ningún período estudiado (Figura 5) .

Los cambios encontrados en la utilización nutritiva de la proteína determinada mediante el CEP con administración de ACAP indicados en las Tablas 18 y 19 y en la Figura 5, deberán relacionarse con la influencia del fármaco sobre la utilización metabólica de este nutriente pues, como ya hemos indicado, no hay variaciones en el CDN. Esta disminución observada en la utilización metabólica puede deberse, por una parte a que la ingesta crónica de proteína deficiente en algún aminoácido esencial actúa, como ya hemos dicho, provocando una interrupción de la síntesis proteica (MEISTER, A. 1965), y por otra, a que el fármaco incrementa los requerimientos de metionina para llevar a cabo su metabolización y acentúa

este déficit (MINER, D.J. y KISSINJER, P.T. 1979; HATHCOCK, J.N. 1990) y, por último, a que estos trastornos pueden acentuar, como luego veremos, la toxicidad del ACAP.

5.3.3. Coeficiente de utilización digestiva de la grasa (CDG).

Los valores que se obtuvieron de CDG en el lote ACAP DEF MET no son significativamente diferentes con su control, ni en el primer balance ($0,98 \pm 0,01$) ni tampoco en el segundo ($0,97 \pm 0,01$) (Tablas 28,29).

5.3.4. Estudio morfológico del hígado: análisis histológico y observación mediante microscopía óptica y electrónica.

La administración de una dosis de $410 \pm$ mg de ACAP/Kg con déficit dietético de metionina en rata, produjo aparición en el parénquima hepático de extensas zonas de necrosis (Figura 14), así como ligeros infiltrados de mononucleares alrededor de los vasos (Figura 15). En el experimento de PRICE V.F. y JOLLOW, D.J. (1989), se demuestra mediante estudios histológicos que a medida que disminuye el contenido de metionina en la dieta con la que se alimenta a los animales de experimentación, aumenta la incidencia en los mismos de la lesión y necrosis hepática, lo cual coincide con nuestros resultados. Por lo que la metionina aparece en buena medida como protector frente a la hepatotoxicidad producida por el ACAP tal como indican también (CROME, P. y col. 1976; MOLDEUS, P. 1981; MEREDITH, T.J. y col. 1986). En ausencia del aminoácido hay una relación lineal entre la muerte de animales de experimentación y la dosis de ACAP administrada (GALIANA, A. 1987). Además, según COMPORTI, M. (1987), cuando la depleción de glutatión alcanza un nivel umbral la peroxidación lipídica que se desarrolla contribuye como mecanismo adicional a la alteración celular. Todas estas observaciones indican la posibilidad de que un estado nutricional deficiente, en cuanto a sulfoaminoácidos se refiere, puede aumentar la susceptibilidad a la lesión hepática por ACAP.

5.3.5. Enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en hígado.

En cuanto al efecto del contenido en metionina en la dieta sobre la GOT y la GPT, hemos encontrado trabajos como los de AMUBODE, F.O. y FETUGA, B.L. (1984) que encontraron que la GOT en pollos no se afectaba por distintos niveles de ingesta de metionina ni en plasma ni en el hígado, mientras que la GPT plasmática tendía a incrementarse cuando se administraba metionina en niveles entre el 0,26 y el 0,50% de contenido en la dieta. SANCHEZ BARCO, M.J. (1990), en un trabajo realizado con administración de dietas carentes de metionina y cisteína en ratas, vio una disminución de la actividad enzimática tanto de la GOT como de la GPT muscular con respecto a los controles. Respecto a nuestros resultados, en el lote ACAP DEF MET los valores obtenidos no presentan diferencias significativas en GOT ($27 \pm 7,9$ UI/g órgano) y GPT ($8 \pm 3,1$ UI/g órgano) (Tabla 33) frente al lote ACAP pero con aporte adecuado en metionina de GOT ($36 \pm 13,5$ UI/g órgano) y GPT ($11 \pm 3,9$ UI/g órgano) (Tabla 32). Sabemos que un déficit proteico disminuye la actividad transaminásica hepática por encontrarse reducida la síntesis proteica (MARCOS, A. 1982; VARELA MOREIRAS, G. 1989) en la que es especialmente importante la metionina (LEHNINGER, A.L. 1985b), y que además, existe alteración hepática histológicamente comprobada como ya indicamos anteriormente, lo cual posiblemente afecte también a la síntesis proteica. Sin embargo, nosotros hemos encontrado que la administración crónica de ACAP no afecta significativamente a los niveles de transaminasas hepáticas y AMUBODE, F.O. y FETUGA, B.L. (1984) encontraron que distintos niveles de

metionina dietéticos tampoco provocaban variaciones a este nivel; por lo tanto, podría ser que ambas circunstancias, como es en nuestro caso: consumo de ACAP y deficiencia dietética de metionina, tampoco fueran causa de modificación en los valores normales de GOT y GPT hepáticas. De todos modos, los resultados presentan un elevado grado de dispersión.

5.4. ACETAMINOFENO (ACAP) Y LEVODOPA:CARBIDOPA (LD:CD)

Conocida la interacción entre el ACAP y la metionina a nivel metabólico y sabiendo que una administración crónica puede reducir la utilización nutritiva de la dieta y de la proteína en determinadas condiciones experimentales (VARELA-MOREIRAS, G y col. 1991a), hemos querido estudiar otro medicamento: levodopa, para comprobar este aprovechamiento nutritivo. Este nuevo factor lo introducimos en base a los resultados obtenidos anteriormente para el ACAP y por la bibliografía consultada, en la que hemos encontrado datos sobre la interacción de la levodopa con la absorción y el metabolismo de aminoácidos, especialmente con la metionina (ORDOÑEZ, L.A. y WURTMAN, R.J. 1973a; PEARCE, L.A. y WATERBURY, L.D. 1974).

Hemos querido establecer unas condiciones experimentales lo más parecidas posible a la reales: tanto en lo que se refiere a las dosis (hemos mantenido la dosis de 600 mg ACAP/Kg de rata, las dosis de levodopa son 50 (Lote LD:CD50) y 175 (Lote LD:CD175) mg/Kg rata) correspondientes a la dosis mínima y máxima empleadas en terapéutica, como en la utilización además de la levodopa, que como se verifica en la mayoría de los casos, se administra asociada a un inhibidor de la L-aminoácido aromático decarboxilasa (FLOREZ, J. y col. 1987b): la carbidopa, que se administró en dosis de 5 y 17,5 mg/Kg rata respectivamente para cada dosis de levodopa, todo ello a partir de comprimidos SINEMET. Las dosis se obtuvieron, como en los experimentos anteriores, a partir de una tabla obtenida de FREIREICH, G. y col. (1966) que nos proporcionan los factores de conversión para dosificación equivalente en función de la superficie corporal entre distinta especies (MATERIAL Y METODOS).

Finalmente, como última condición experimental, hemos querido proporcionar una situación nutricional óptima para lo cual empleamos un contenido dietético de proteína óptimo (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1990) con el fin de estudiar si, en condiciones nutricionalmente adecuadas, se afectan el aprovechamiento nutritivo de la dieta y la proteína con la administración de los fármacos indicados en animales adultos ACAP, LD:CD50, LD:CD175, ACAP+LD:CD50 y ACAP+LD:CD175.

5.4.1. Parámetros generales: peso corporal y coeficiente de eficacia alimentaria (CEA).

La administración de 600 mg ACAP/Kg en ratas jóvenes (entre aproximadamente 182 y 185 g) y con un aporte óptimo de proteína no produce diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el incremento de peso ($3,5 \pm 0,3$ g/día) frente al lote control "pair fed" ($3,8 \pm 0,5$ g/día) (Tablas,). Esto a diferencia de los casos anteriores, creemos que puede deberse, por un lado, al aporte proteico que es más elevado y, por tanto, posiblemente suficiente para metabolizar el fármaco sin reducir la cantidad de metionina que debe dirigirse a la síntesis proteica o a la ruta de transmetilación-transulfuración, y por otro lado, a que los animales al ser de más edad, están fuera del período de crecimiento rápido, reduciéndose las demandas de metionina para la síntesis proteica derivada del mismo.

La administración de LD:CD tanto para dosis de 50:5 como para 175:17,5 mg/Kg peso corporal, no afecta significativamente ($p \leq 0,05$) al incremento de peso ($4,1 \pm 0,8$ g/día y $3,5 \pm 0,2$ g/día respectivamente) (Tabla) frente al lote alimentado a la par ($3,8 \pm 0,5$ g/día) (Tabla). Del mismo modo que en el caso anterior, la demanda de metionina para el metabolismo del fármaco (WURTMAN, R.J. y ROSE, C.M. 1970; CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. 1991) no es suficiente para modificar este parámetro.

La administración conjunta de ACAP y de LD:CD, en las dos dosis indicadas anteriormente, tampoco afectan al incremento de peso frente a los valores control, es decir, frente al lote "pair fed" y lotes con administración de un único fármaco.

El coeficiente de eficacia alimentaria (CEA) no se afecta ni con la administración de ACAP ($0,21 \pm 0,02$), ni con la administración de LD:CD50 ($0,24 \pm 0,04$), ni tampoco con las administraciones conjuntas con LD:CD175 ($0,21 \pm 0,01$), ni con ACAP+LD:CD50 ($0,23 \pm 0,02$). Por tanto, ninguno de los fármacos, ni las distintas dosis, ni la administración conjunta de los dos afectan a la utilización nutritiva de la dieta en ratas adultas jóvenes que consumen una dieta con aporte óptimo de proteína.

5.4.2. Utilización nutritiva de la proteína: coeficiente de utilización digestiva del nitrógeno (CDN), coeficiente de eficacia proteica para el crecimiento (CEP), coeficiente de utilización nutritiva del nitrógeno (CUN) y coeficiente de utilización metabólica del nitrógeno (CUM).

En este apartado, hemos estudiado los índices relacionados con la absorción y disponibilidad nutritiva y metabólica de la proteína. Todo ello en base a que el ACAP, como ya sabemos, necesita metionina para su metabolismo (REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1988a) y en determinadas condiciones puede disminuir el aprovechamiento nutritivo de la proteína. En cuanto a la levodopa se refiere, por una parte, puede interferir en la absorción de algunos aminoácidos (GRANERUS, A.K. y col. 1971; LEHMANN, J. 1973; PEARCE, L.A. y WATERBURY, L.D. 1974); por otro lado, interacciona con la metionina, pues necesita del aminoácido para su metabolismo (CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. 1991), de forma que la SAM es el metildonador utilizado por la COMT en el sistema nervioso central para la metilación de la levodopa (AXELROD, J. y TOMCHICK, R. 1958). Todo esto conduce, cuando se administra levodopa, a una reducción de los niveles de SAM en el cerebro, fluido cerebroespinal y el riñón (WURTMAN, R.J. y ROSE, C.M. 1970; SÜRTEES, R. y HYLAND, K. 1990) y de la metionina sérica y cerebral en determinadas condiciones experimentales (ORDOÑEZ, L.A. y WURTMAN, R.J. 1973a).

La administración de ACAP no afectó significativamente al CDN ($0,95 \pm 0,01$), ni al CEP ($1,17 \pm 0,10$), ni al CUM ($0,66 \pm 0,10$), ni al CUN ($0,63 \pm 0,10$) respecto a los valores del lote "pair fed" que fueron: $0,95 \pm 0,00$, $1,24 \pm 0,17$, $0,67 \pm 0,06$ y $0,64 \pm 0,06$ respectivamente.

Estos resultados nos indican que posiblemente los individuos adultos tengan el sistema enzimático completamente desarrollado y capaz de metabolizar el fármaco sin que esto suponga una demanda de metionina tal que pueda modificar los índices estudiados. Por tanto, en animales de aproximadamente 183 g bien nutridos la administración de ACAP no parece rebasar la capacidad de detoxificación del mismo. Además, como ya hemos dicho, en estos animales, con respecto a las pruebas anteriores se encuentra reducida la demanda proteica para el crecimiento y, por tanto, toda la metionina necesaria para entrar en la ruta transmetilación-transulfuración se encuentra disponible para este fin. Finalmente también puede ocurrir que el elevado contenido proteico de la dieta, pueda subsanar el incremento de los requerimientos de metionina que produce el ACAP (REICKS, M. y HATHCOCK, J.N. 1989) y, por tanto, no se modificaría la utilización nutricional de la proteína.

La administración de LD:CD50 y de LD:CD175, es decir, de una dosis mínima y máxima terapéutica de levodopa, tampoco afectan significativamente a estos índices

indicativos de digestibilidad y utilización de la proteína respecto a los valores control (Tabla). Existen datos bibliográficos como para intuir que o bien, en la absorción o en el metabolismo de la levodopa, podría producirse algún efecto significativo a este nivel, aunque sin embargo, esto no se da en nuestras condiciones experimentales. Creemos que se debe a, igual que explicamos en el caso del ACAP, a que los individuos adultos presentan un sistema enzimático perfectamente desarrollado, que las necesidades de metionina para el crecimiento están reducidas, de forma que el metabolismo del fármaco y, por tanto, la demanda de la ruta transmetilación-transulfuración no supone una necesidad tal como para modificar estos índices. Además hay que añadir un elevado contenido proteico en la dieta, que nos impida ver el posible efecto reductor de la absorción de aminoácidos. Y por otra parte, la utilización de carbidopa, compuesto que hemos empleado para proporcionar unas condiciones lo más próximas posibles a las utilizadas habitualmente en terapéutica, que reduce la toxicidad de la levodopa su y otros efectos secundarios (FLOREZ, J. y col. 1987b; CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. 1991b).

La administración conjunta de los fármacos estudiados y de forma crónica en animales adultos de ACAP+LD:CD50 y de ACAP+LD:CD175 no afectó significativamente ($p \leq 0,05$) a ninguno de los índices calculados en cuanto a aprovechamiento nutritivo de la proteína (Tabla). Por tanto, para justificarlo debemos indicar lo mismo que en los casos anteriores, que en las condiciones experimentales proporcionadas, es decir, en animales jóvenes de unos 183 g que ingieren dietas completas y correctas no se afectan ni la digestibilidad de la proteína ni los índices indicativos de aprovechamiento nutritivo de la misma con la administración de ACAP, LD:CD en dos dosis distintas y con los dos fármacos simultáneamente.

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha estudiado la interacción de algunos fármacos ácido acetilsalicílico (ASA), de acetaminofeno (ACAP) y levodopa (LD), a dosis terapéuticas, sobre la situación nutricional de ratas "Wistar" en crecimiento y adultas jóvenes. Los parámetros determinados son, por una parte, indicadores de la utilización nutritiva y metabólica general de macronutrientes y, por otra, de la ruta metabólica de transmetilación-transulfuración de la metionina.

En una primera parte, hemos estudiado la influencia que ASA y ACAP producen sobre distintos parámetros nutricionales y bioquímicos generales, en ratas adecuadamente nutridas. Por otro lado, hemos estudiado el efecto de la administración de ACAP sobre dichos parámetros nutricionales y bioquímicos generales en ratas cuando se les administra una dieta deficiente en sulfoaminoácidos. En este apartado, hemos realizado también un estudio histológico de los hígados de los lotes control y de los que consumieron ACAP con el fin de analizar el grado de hepatotoxicidad del fármaco en nuestras condiciones y si se incrementa por el efecto de la deficiencia dietética de metionina. En esta parte se han empleado cuatro lotes de ratas a las que se les ha administrado ASA y ACAP mezclados con la dieta consumida "ad libitum" durante seis semanas. Se han determinado los siguientes parámetros: peso corporal, ingesta sólida, peso del hígado, nitrógeno fecal, grasa fecal y enzimas transaminasas (GOT y GPT); lo que nos han permitido el cálculo de los siguientes índices: Coeficiente de Eficacia Alimentaria (CEA), Índice Hepatosomático (IHS), Coeficiente de Digestibilidad del Nitrógeno (CDN), Coeficiente de Eficacia Proteica para el Crecimiento (CEP) y Coeficiente de Digestibilidad de la Grasa (CDG).

Una segunda parte, ha consistido en estudiar los efectos de la administración de ASA y ACAP sobre los niveles tisulares de ácido fólico y otros componentes y metabolitos de la ruta de transmetilación-transulfuración. Todo ello con el fin de comprobar, si en condiciones nutricionales adecuadas, el consumo de estos fármacos afecta al metabolismo de la metionina. Con este fin, se han empleado cinco lotes de ratas, de los cuales dos han consumido fármaco (ASA o ACAP) durante las cuatro semanas que duró la prueba y otros dos que se han alimentado a la par con los anteriores y se utilizaron como controles. En esta fase, a diferencia de la primera parte, se ha provocado que no existiesen diferencias significativas en la ingesta entre los animales que consumieron fármaco y sus controles. Se han determinado los siguientes parámetros: peso corporal, peso del hígado, concentración de folatos en suero e hígado y distribución hepática de los mismos y concentración en hígado de S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH); lo que nos han permitido el cálculo de los siguientes índices: Coeficiente de Eficacia Alimentaria (CEA), Índice Hepatosomático (IHS), Coeficiente de Eficacia Proteica para el Crecimiento (CEP) y relación SAM/SAH.

Hemos continuado en esta línea con una tercera parte en la que se ha estudiado el efecto de la administración simultánea de acetaminofeno y de levodopa (cuyo metabolismo es dependiente de la ruta transmetilación-transulfuración) a distintas dosis, durante cuatro semanas, sobre parámetros nutricionales generales y sobre la utilización nutritiva de la proteína, todo ello en seis lotes de ratas adultas jóvenes. Los lotes fueron uno control (alimentado a la par con los demás), tres lotes que consumieron un único fármaco (ACAP o LD en dos dosis distintas) y dos lotes a los que se les administraron los dos conjuntamente (ACAP y LD en dos dosis distintas). En esta tercera parte se han determinado los siguientes parámetros: peso corporal, nitrógeno ingerido, nitrógeno fecal, nitrógeno urinario; lo que nos han permitido el cálculo de los siguientes índices: Coeficiente de Eficacia Alimentaria (CEA), Coeficiente de Digestibilidad del Nitrógeno (CDN), Coeficiente de Eficacia Proteica para el Crecimiento (CEP), Coeficiente de Utilización Metabólica del Nitrógeno (CUM) y Coeficiente de Utilización Nutritiva del Nitrógeno (CUN).

Los resultados obtenidos nos han permitido extraer las siguientes conclusiones:

Acido acetilsalicílico:

Primera conclusión: La administración de ácido acetilsalicílico en nuestras condiciones experimentales, no modifica a nivel digestivo la absorción de proteína y grasa. Sin embargo, el fármaco interfiere con el crecimiento y la utilización metabólica de la proteína dietaria, tanto cuando los animales comen "ad libitum", como cuando se les limita la ingesta. Este efecto, es menos acusado cuanto mayor es la edad del animal.

Segunda conclusión: El consumo prolongado de ácido acetilsalicílico, no altera las reservas séricas y hepáticas de folato total. Este hecho, concuerda con que tampoco aparezcan modificaciones en la distribución de los folatos, ni en la elongación de la cadena de residuos de glutámico, ni en el porcentaje de derivados según la estructura del anillo pteridínico, como serían de esperar en el caso de observar una deficiencia de folatos en el organismo.

Tercera conclusión: Los niveles hepáticos de S-adenosilmetionina y S-adenosilhomocisteína, moléculas indicadoras del ciclo de los compuestos monocarbonados, no sufren modificaciones importantes con respecto a los valores control cuando se administró ácido acetilsalicílico, al igual que ocurre con la relación SAM/SAH.

Cuarta conclusión: Pese al efecto observado sobre el crecimiento y la utilización metabólica de la proteína dietaria y las modificaciones en los parámetros hepáticos (transaminasas e índice hepatosomático) inducidas por la administración de ácido acetilsalicílico; no se afecta la ruta de transmetilación-transulfuración de la metionina, ni en cuanto a intermedios metabólicos ni en cuanto al ciclo de los folatos. Por todo ello, parece que los procesos de transmetilación generales del organismo no están comprometidos con el consumo de ácido acetilsalicílico.

Acetaminofeno:

Quinta conclusión: El consumo de acetaminofeno y en nuestras condiciones experimentales no interfiere a nivel digestivo con la absorción de proteína y grasa. Sin embargo, cuando a los animales en período de crecimiento rápido se alimentan a la par, si afecta al crecimiento y la utilización metabólica de la proteína dietaria. Cuando las ratas se alimentan "ad libitum" o cuando son adultas jóvenes, el posible incremento de los requerimientos de metionina producido por el consumo del fármaco, no produce un efecto apreciable sobre su metabolismo proteico.

Sexta conclusión: Los resultados histológicos obtenidos indican que el acetaminofeno en las condiciones estudiadas, produce un efecto generalizado en los hepatocitos de vacuolización del citoplasma.

Séptima conclusión: La administración prolongada de acetaminofeno no altera las reservas hepáticas y séricas de folato total. Este hecho está de acuerdo con que no aparezcan modificaciones en la distribución de los folatos, ni en la elongación de la cadena de residuos de glutámico, ni en el porcentaje de derivados según la estructura del anillo pteridínico que serían de esperar en el caso de observar una deficiencia de folatos en el organismo.

Octava conclusión: Los niveles de S-adenosilmétionina y S-adenosilhomocisteína hepáticos, intermedios metabólicos de la ruta de transmetilación-transulfuración de la metionina, y la relación SAM/SAH no se modifican con respecto a los valores control cuando se administra acetaminofeno.

Novena conclusión: Los efectos observados de la administración de acetaminofeno en nuestras condiciones experimentales, sobre el crecimiento y las histología hepática, no afectan a la ruta de transmetilación-transulfuración de la metionina, ni en cuanto a intermediarios metabólicos ni en cuanto al ciclo de los folatos. Por todo ello, parece que los procesos de transmetilación generales del organismo no están comprometidos con el consumo de acetaminofeno.

Décima conclusión: La administración de acetaminofeno a animales que consumen una dieta deficiente en metionina, no interfiere con la absorción de la proteína y grasa, sin embargo, en estas condiciones el retraso en el crecimiento y la reducción de la utilización metabólica de la proteína y, se pronuncia drásticamente si se compara con las ratas que consumen el fármaco y una dieta equilibrada.

Undécima conclusión: Aunque, no se observan modificaciones significativas en los índices hepáticos estudiados, la deficiencia de metionina ejerce un efecto potenciador de la hepatotoxicidad producida por la administración de acetaminofeno en ratas, así encontramos en el hígado de estos animales deficientes extensas zonas de necroticas.

Levodopa:

Duodécima conclusión: La administración aisladamente o de forma conjunta con acetaminofeno de levodopa/carbidopa, en dosis incluidas dentro del rango terapéutico, a ratas adultas jóvenes y con un aporte óptimo de proteína dietética, no afecta ni a la utilización digestiva ni metabólica de la proteína a pesar del posible efecto potenciador competitivo de las vías de detoxificación de ambos fármacos.

7.- BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, R., MARCUS, H., COX, M., HODKINSON, M. and TOMKINS, A. (1992a) *Nutritional Status of Subjects with Middle-aged onset Parkinson's Disease*. Proc. Nutr. Soc., 51:30A.
- ABBOTT, R., COX, M., MARCUS, H. and TOMKINS, A. (1992b) *Diet, Body Size and Micronutrient Status in Parkinson's Disease*. Eur. J. Clin. Nutr., 46:879-84.
- ADDISON, W.H.F. (1949) *Histologic Methods Adapted for Rat Tissues*. En: *The Rat in Laboratory Investigation*. (FARRIS, E.J. and GRIFFITH, J.Q., Eds.) Editorial Lippincott J.B., p. 453-66.
- AGUILAR, T.S., HARPER, A.E. and BENEVENGA, N.J. (1972). Citado por: HEGER, J. and FRYDRICH, Z. (1985) *Efficiency of Utilization of Essential Amino Acids in Growing Rats at Different Levels of Intake*. Brit. J. Nutr., 54:499-508.
- AHONEN, R., ENLUND, H., KLAUKKA, T. and VOHLONEN, I. (1991). Citado por: EGGEN, A.E. (1993) *The Tromso Study: Frequency and Predicting Factors of Analgesic Drug Use in Free-Living Population (12-56 Years)*. J. Clin. Epidemiol. 46:1297-304.
- ALFIN-SLATER, R.B. and AFTERGOOD, L. (1987) *Lípidos*. En: *La Nutrición en la Salud y la Enfermedad. Conocimientos Actuales*. (GOODHART, R.S. and SHILLS, M.E. Ed.) Salvat Editores, S.A. Barcelona. p. 102-29.
- ALMASIO, P., BORTOLINI, M., PAGLIARO, L. and COLTORTI, M. (1990) *Role of S-Adenosyl-L-Methionine in the Treatment of Intrahepatic Cholestasis*. Drug 40 (Suppl.3):111-23.
- ALTER, H.J., ZVAIFLER, N.J. and RATH, C.E. (1971) *Interrelationship of Rheumatoid Arthritis, Folic Acid and Aspirin*. Blood., 38:405-16.
- AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977) *Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. Report of the Committee*. J. Nutr. 107:1340.
- AMUBODE, F.O. and FETUGA, B.L. (1984) *The Influence of Dietary Methionine, Protein, and Energy Level on Glutamic-Oxalacetate and Glutamic-Pyruvate Transaminases of Chicken*. Beitr. Trop. Landwirtsch. Veterinaermed., 22:193-200. (Abstr.).
- ANKER, A. and SMILKSTEIN, M.J. (1993) *Underdosing the Antidote for Acetaminophen*. JAMA, 269:1252-3.
- ANTAL, J. and JASZSAGI-NAGI, E. (1978) *Die Wirkung von L-Dopa und Reserpin auf die Speicherung von ¹⁴C-Methionin und ¹⁴C-Phenylalanin in den Hirnregionen von Ratten*. Radiobiol. Radiother. (Berl), 19, 4:416-23.
- ASHTON, M., BOLME, P., ZERIHUM, G., HOLMBERG, K. and PAALZOW, L.K. (1993) *Disposition of Salicylic Acid in Malnourished Ethiopian Children after Single Oral Dose*. Clin. Pharmacokinet. 25:486-94.
- AXELROD, J. (1971). En: CHARLON, C.G. and WAY, E.L. (1978) *Tremor Induced by S-Adenosylmethionine: Possible Relation to L-dopa Effects*. J. Pharm. Pharmac., 30:819-20.
- AXELROD, J. and TOMCHICK, R. (1958). Citado por: WURTMAN, R.J. and ROSE, C.M. (1970) *L-Dihydroxyphenylalanine: Effect on S-Adenosylmethionine in Brain*. Science, 169:395-7.
- AZANZA, J.R. y CUENA, R. (1986) *Intoxicación e Interacciones Farmacológicas Producidas por el Acido Acetilsalicílico*. Servicio de Información y Documentación a la Oficina de Farmacia. (BAYER, Ed.) Editorial Vila Sala Hermanos S.A., Barcelona.

- CANTONI, G.L. (1950). Citado por: GALIANA, A. (1987) *Situación actual en el Tratamiento Farmacológico de las Hepatopatías*. En: *Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en Disfunciones Hepáticas*. Curso Monográfico. (CASCALES, M. y FERRANDIZ, F.) Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. p. 59-84.

- CANTONI, G.L. (1953). Citado por: CORRALES IZQUIERDO, F. (1992) *Función de los Grupos Sulfidrilo en el Mantenimiento de la Estructura y la Actividad de la SAM en Hígado de Rata*. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.M.-Instituto de Investigaciones Biomédicas, C.S.I.C., Madrid.

- CARBAJAL, A., VARELA-MOREIRAS, G., RUIZ-ROSO, B., PEREA, I. y MOREIRAS, O. (1993) *Nutrición y Salud de las Personas de Edad Avanzada en Europa: Euronut-SENECA. Estudio en España. 3. Estado Nutritivo: Antropometría, Hematología, Lípidos y Vitaminas*. Revista Española de Geriatría y Gerontología., 28:230-42.

- CARPENTER, K.J. (1960) *The Estimation of Available Lysine in Animal Protein Foods*. Biochem. J., 77:604-10.

- CASTELL, J.V., LARRAURI, A., DONATO, T., GOMEZ-LECHON, M.J. (1990) *Glutathione Levels in Human Hepatocytes Exposed to Paracetamol*. En: *Glutathione Metabolism and Physiological Functions*. (JOSE VIÑA, Ed.). CRC Press. Boca Ratón. Ann. Arbor. Boston. p.263-77.

- CEBARDAUM, J.M. and McDOWELL, F.H. (1986). Citado por: CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. (1991) *Fármacos para la Enfermedad de Parkinson, Espasticidad y Espasmos Musculares Agudos*. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición. (GOODMAN and GILMAN Eds.) Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Buenos Aires, Caracas, Madrid, Santiago de Chile, Sao Paulo. p. 458-78.

- CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. (1991) *Fármacos para la Enfermedad de Parkinson, Espasticidad y Espasmos Musculares Agudos*. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición. (GOODMAN and GILMAN Eds.) Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Buenos Aires, Caracas, Madrid, Santiago de Chile, Sao Paulo. p. 458-78.

- CHARLON, C.G. and WAY, E.L. (1978) *Tremor Induced by S-Adenosylmethionine: Possible Relation to L-dopa Effects*. J. Pharm. Pharmac., 30:819-20.

- CHEFTEL, J.C., CUQ, J.L. and LORIENT, D. (1989) *Propiedades Nutricionales de las Proteínas*. En: *PROTEÍNAS ALIMENTARIAS. Bioquímica, Propiedades funcionales, Valor Nutritivo, Modificaciones Químicas*. Ed. Acribia, S.A. p. 107-39.

- CHEN, L.H., LIU, S. and COOK NEWELL, M.E. (1985) *Survey of Drug Use by the Elderly and Possible Impact of Drugs on Nutritional Status*. Drug-Nutrient Interact., 3:73-86.

- CHIEN, C.P., TOWNSEND, E.J. and TOWNSEND, A. (1978). Citado por: ROE, D.A. (1984b) *Therapeutic Significance of Drug-Nutrient Interactions in the Elderly*. Pharmacological Reviews. Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther., 36:109S-22S.

- CHRISTENSEN, H.N. (1964) *Free Amino Acids and Peptides in Tissues*. En: *Mammalian Protein Metabolism*. Vol. I (MUNRO, H.N., ALLISON, J.B. Eds.) New York, Academic Press, p. 105-24.

- CHRISTENSEN, H.N. (1975) *Kinetics in Transport*. En: *Biological Transport*. Reading, Mass: Benjamin. Segunda Edición. p.107-65.

- CHRISTENSEN, H.N. (1982) *Interorgan Amino Acid Nutrition*. *Physiol. Rev.*, 62:1193-233.
- CHRISTENSEN, H.N. (1990) *Role of Amino Acid Transport and Countertransport in Nutrition and Metabolism*. *Physiol. Rev.*, 70:43-77.
- CHRISTENSEN, H.N. and HANSLOGTEN, M.E. (1968) *Modes of Mediated Exodus of Amino Acids from the Ehrlich Ascites Tumor Cells*. *J. Biol. Chem.*, 243:5428:38
- CLIFFORD, A.J. (1980). Citado por: LINDER, M.C. (1988a) *Nutrición y Metabolismo de las proteínas*. En: *Nutrición. Aspectos Bioquímicos, Metabólicos y Clínicos*. (LINDER, M.C. Ed.) EUNSA. Pamplona, p. 81-100.
- COFFEY, R.J. (1955). Citado por: DEUEL, J.R. En: *The Lipids*. Vol. 2. *Biochemistry*. Ed. Interscience Publisher. New York.
- COLLARINI, E.J. and OXENDER, D.L. (1987) *Mechanism of Transport of Amino Acids Across Membranes*. *Ann. Rev. Nutr.*, 7:75-90.
- COMPORTI, M. (1987) *Glutathione Depleting Agents and Lipids Peroxidation*. *Chem. Phys. Lipids.*, 45:143-69.
- COOK, R.J., HORNE, D.W. and WAGNER, C.J. (1989). Citado por: CORRALES IZQUIERDO, F. (1992) *Función de los Grupos Sulfidrilo en el Mantenimiento de la Estructura y la Actividad de la SAM en Hígado de Rata*. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.M.-Instituto de investigaciones Biomédicas, C.S.I.C., Madrid.
- CORCORAN, G.B. and WONG, B.D. (1986) *Role of Glutathione in Prevention of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity by N-acetyl-D-cysteine in Mice*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 238:54-61.
- CORCORAN, G.B., MITCHELL, J.R., VAISHNAV, Y.N. and HORNING, E.C. (1980) *Evidence that Acetaminophen and N-hydroxy-acetaminophen Form a Common Arylating Intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine*. *Mol. Pharmacol.* 18:536.
- CORCORAN, G.B., WONG, B.K. and NEESE, B.L. (1987a) *Early Sustained Rise in Total Liver Calcium During Acetaminophen Hepatotoxicity in Mice*. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 58:291-305.
- CORCORAN, G.B., CHUNG, S.J. and SALAZAR, D.E. (1987b) *Early Inhibition of the Na⁺/K⁺ - ATPase Ion Pump During Acetaminophen-induced Hepatotoxicity in Rat*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149:203-07.
- CORCORAN, G.B., BAUER, J.A. and LAU, T.W. (1988) *Immediate Rise in Intracellular Calcium and Glycogen Phosphorylase a Activities upon Acetaminophen Covalent Binding Leading to Hepatotoxicity in Mice*. *Toxicol.*, 50:157-67.
- CORRALES IZQUIERDO, F. (1992) *Función de los Grupos Sulfidrilo en el Mantenimiento de la Estructura y la Actividad de la SAM en Hígado de Rata*. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.M.-Instituto de investigaciones Biomédicas, C.S.I.C., Madrid.
- CORRALES, F., OCHOA, P., RIVAS, C., MARTIN-LOMAS, M., MATO, J.M. and PAJARES, M.A. (1991) *Inhibition of Glutathione Synthesis in the Liver Leads to S-Adenosyl-L-Methionine Synthetase Reduction*. *Hepatology*, 14:428:33.

- COX, M., MARCUS, H., ABBOTT, R., HODKINSON, M. and TOMKINS, A. (1992) *Raised Resting Energy Expenditure in Subjects with Middle-aged onset Parkinson's Disease*. Proc. Nutr. Soc., 51:75A.
- CRIM, M.C. and MUNRO, H.N. (1984) *Protein*. En: *Present knowledge in Nutrition*. Ed. Olson, R.E. The Nutrition Foundation. Inc. Washington DC, p. 131-47.
- CROME, P., VALE, J.A., VOLANS, G.N., WIDDOP, B. and GOULDING, R. (1976) *Oral Methionine in the Treatment of Severe Paracetamol (Acetaminophen) Overdose*. Lancet, 2:829-30.
- CROWELL, B.G., BENSON, R. (Jr), SHOCKLEY, D., and CHARLTON, C.G. (1993) *S-Adenosyl-L-Methionine Decreases Motor Activity in the Rat: Similarity to Parkinson's Disease-Like Symptoms*. Behavioral and Neural. Biology., 59:186-93.
- CROXSON, S., JOHNSON, B., MILLAC, P. and PYE, I. (1991) *Dietary Modification of Parkinson's Disease*. Eur. J. Clin. Nutr., 45:263-6.
- CUTRIN, C., MENIÑO, M^AJ., CARBALLO, C., PAZO, J.A., BARRIO, E. and PARAFITA, M.A. (1991) *Lactiacidemia in Rats with Cirrhosis Induced by Carbon tetrachloride and Ethanol: Treated with Colchicine, Nifedipine and S-Adenosylmethionine*. Med. Sci. Res., 19:351-2.
- CUTRIN, C., MENIÑO, M^AJ., PAZO, J.A., PEREZ-BECERRA, E., SANDE, L. and BARRIO, E. (1992) *S-Adenosylmethionine and Steatosis in an Experimental Model of Toxic Liver Injury in Rats Treated with Carbon tetrachloride and Ethanol*. Med. Sci. Res., 20:943-4.
- DANIEL, P.M., MOORHOUSE, S.R. and PRATT, O.E. (1976) *Do changes in blood levels of other aromatic amino acids influence levodopa therapy?* Lancet, 1:95.
- DAVID, H.A. (1980) *Order Statistics*. John Wiley, New York, NY, p. 72-5.
- DAVIDSON, D.G.D. and EASTHAM, W.N. (1966) *Acute Liver Necrosis Following Overdose of Paracetamol*. Br. Med. J., 497-9.
- DAVIS, D.C., POTTER, W.Z., JOLLOW, D.J. and MITCHELL, J.R. (1974). Citado por: HATHCOCK, J.N. (1990) *Nutritional Modulation of Xenobiotic Metabolism; Metabolic Depletion of Nutrients by Drugs*. J. Nutr. Biochem., 1:400-2.
- DE MORAIS, S. and WELLS, P.G. (1989) *Enhanced Acetaminophen Toxicity in Rats with Bilirubin Glucuronil Transferase Deficiency*. Hepatology. 10:1637.
- DEUEL, J.R. (1955) *The Lipids*. Vol. 1,2. Biochemistry. Ed. Interscience Publisher. New York.
- DEUEL and HALLMAN (1940). Citado por: ALFIN-SLATER, R.B. and AFTERGOOD, L. (1987) *Lípidos*. En: *La Nutrición en la Salud y la Enfermedad. Conocimientos Actuales*. (GOODHART, R.S. and SHILLS, M.E. Ed.) Salvat Editores, S.A. Barcelona. p. 102-29.
- DIAMOND, S.G., MARKHAM, C.H., HOEHN, M.M., McDOWELL, F.H. and MUENTER, M.D. (1987). Citado por: CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. (1991) *Fármacos para la Enfermedad de Parkinson, Espasticidad y Espasmos Musculares Agudos*. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición. (GOODMAN and GILMAN Eds.) Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Buenos Aires, Caracas, Madrid, Santiago de Chile, Sao Paulo. p. 458-78.

- DOMEQ, C., FUENTES, A., HURTADO, C. and ARANCIBIA, A. (1993) *Effect of Famotidine on the Bioavailability of Acetylsalicylic Acid*. *Med. Sci. Res.*, 21:219-20.
- DOUGLAS, K.T. (1989) *Biological Activities of Glutathione Analogs*. En: *COENZYMES AND COFACTORS VOLUME III. GLUTATHIONE. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part A*. (DOLPHIN, D., POULSON, R. and AVRAMOVIC Eds.). Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 281-302.
- EDMONDS, M.S. and BAKER, D.H. (1987) *Amino Acid Excesses for Young Pigs: Effects of Excess Methionine, Tryptophan, Threonine or Leucine*. *J. Anim. Sci.*, 64:1664-71.
- EGGEN, A.E. (1993) *The Tromso Study: Frequency and Predicting Factors of Analgesic Drug Use in Free-Living Population (12-56 Years)*. *J. Clin. Epidemiol.*, 46:1297-304.
- ETO, I. and KRUMDIECK, C.L. (1982) *Determination of Three Different Pools of Reduced One-carbon Substituted Folates. III. Reserved-phase High Performance Chromatography of the Azodye Derivatives of p-aminobenzoylglutamates and its Application to the Study of Unlabeled Endogenous Pteroylpolyglutamates of Rat Liver*. *Anal. Biochem.*, 120:323-9.
- FAHN, S. and COHEN, G. (1992) *The Oxidant Stress Hypothesis in Parkinson's Disease: Evidence Supporting It*. *Ann. Neurol.*, 32:804-12.
- FAO/WHO/UNU (1985) *Energy and Protein Requirements: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation* (WHO Technical Report Series, 724) World Health Organization. Geneva.
- FELL, D., BENJAMIN, L.E. and STEELE, R.D. (1985) *Determination of Adenosine and S-Adenosyl Derivatives of Sulfur Amino Acids in Rat Liver by High-Performance Liquid Chromatography*. *J. Chromat.*, 345:150-6.
- FERRY, M. et FOGLIETTI, M.J. (1992) *Interactions Nutriments-Médicament Chez les Personnes Âgées*. *Méd. et Nut. T.*, XXVIII, 6:311-6.
- FIDANZA, F. (1984) *Methods of Evaluating Protein Quality*. En: *Thermal Processing and Quality of Foods*. (ZEUTHEN, P.; CHEFTEL, J.C.; ERIKSSON, C.; JUL, M.; LENIGER, H.; LINKO, P.; VARELA, G. and VOS, G. Eds.) Elsevier Applied Science Publishers. London. p. 851.
- FILER, MATTSON, and FOMON, (1969). Citado por: ALFIN-SLATER, R.B. and AFTERGOOD, L. (1987) *Lípidos*. En: *La Nutrición en la Salud y la Enfermedad. Conocimientos Actuales*. (GOODHART, R.S. and SHILLS, M.E. Ed.) Salvat Editores, S.A. Barcelona. p. 102-29.
- FINKELSTEIN, J.D. (1989). Citado por: CORRALES IZQUIERDO, F. (1992) *Función de los Grupos Sulfidrilo en el Mantenimiento de la Estructura y la Actividad de la SAM en Hígado de Rata*. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.M.-Instituto de investigaciones Biomédicas, C.S.I.C., Madrid.
- FINKELSTEIN, J.D. (1990) *Methionine Metabolism in Mammals*. *J. Nutr. Biochem.*, 1:228-37.
- FINKELSTEIN, J.D., KYLE, W.E., HARRIS, B.J. and MARTIN, J.J. (1982) *Methionine Metabolism in Mammals: Concentration of Metabolites in Rat Tissues*. *J. Nutr.*, 112:1011-8.
- FLOHÉ, L. (1989) *The Selenoprotein Glutathione Peroxidase*. En: *COENZYMES AND COFACTORS VOLUME III. GLUTATHIONE. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part A*. (DOLPHIN, D., POULSON, R. and AVRAMOVIC Eds.). Wiley Interscience. New York,

Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 643-731.

- FLOREZ, J., ARMIJO, J.A. y MEDIAVILLA, A. (1987a) *Farmacología de la Inflamación*. En: *Farmacología Humana. Tomo I*. EUNSA. Pamplona. p. 239-64.

- FLOREZ, J., ARMIJO, J.A. y MEDIAVILLA, A. (1987b) *Farmacología de los Movimientos Anormales. Fármacos antiespásticos*. En: *Farmacología Humana. Tomo I*. EUNSA. p. 359-77.

- FREIREICH, G. (1966) *Quantitative Comparasion of Toxicity of Anticancer Agents in Mouse, Rat, Dog, Monkey and Man*. *Cancer Chemother. Rep.*, 50:219-44.

- GALIANA, A. (1987) *Situación actual en el Tratamiento Farmacológico de las Hepatopatías*. En: *Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en Disfunciones Hepáticas*. Curso Monográfico. (CASCALES, M. y FERRANDIZ, F.) Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. p. 59-84.

- GALINSKY, R.E. and LEVY, G. (1981). Citado por: HATHCOCK, J.N. (1990) *Nutritional Modulation of Xenobiotic Metabolism; Metabolic Depletion of Nutrients by Drugs*. *J. Nutr. Biochem.*, 1:400-2.

- GARABEDIAN-RUFFALO, S.M. and RUFFALO, R.L. (1986) *Drug and Nutrient Interactions*. *Am. Fam. Physician.*, 33:173.

- GILEV, V.P., (1958). Citado por: PEASE, D.C. (1964) *Embedding*. En: *Histological Techniques for Electron Microscopy*. Segunda Ed. Academic Press. New York and London. p. 34-81.

- GILLESPIE, N. G., MENA, I., COTZIAS, G.C. and BELL, M.A. (1973) *Diets Affecting Treatment of Parkinsonism with Levodopa*. *J. Amer. Diet. Assoc.*, 62:525-8.

- GILLETE, J. (1972) *Overview of Protein Binding*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 226:6.

- GLAZENBURG, E.J., JEKEL-HALSEMA, I.M.C., SCHOLTENS, E., BAARS, A.J. and MULDER, G.J. (1983) *Effects of Variation in the Dietary Supply of Cysteine and Methionine on Liver Concentration of Glutathione and "Active Sulfate" (PAPS) and Serum Levels of Sulfate, Cystine, Methionine and Taurine: Relation to the Metabolism of Acetaminophen*. *J. Nutr.*, 113:1363-73.

- GRANDE COVIAN, F. (1988) *Grasas*. En: *Problemas de la Nutrición en las Sociedades Desarrolladas*. (SAENZ DE BURUAGA, J., GONZALEZ DE GALDEANO, L., GOIRIENA DE GANDARIAS, J.J. Eds.). Salvat Editores, Barcelona. p. 71-82.

- GRANERUS, A.K., JAGENBURG, R., RÖDJER, S. and SVANBORG, A. (1971) *Inhibition of L-Phenylalanine Absorption by L-DOPA in Patients with Parkinsonism*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137:942-4.

- GREENBERG, D.M. (1975) *Biosynthesis of cysteine and Cystine*. En: *Metabolic Pathways. Metabolism of Sulfur Compounds*, (GREENBERG, D.M., Ed.), Vol. 7, Tercera Edición. Academic Press, New York. p. 505-28.

- GREGORY III, J.F. (1989) *Chemical and Nutritional Aspects of Folate Research: Analytical Procedures, Methods of Folate Synthesis, Stability, and Bioavailability of Dietary Foliates*. En: *Advances in Food and Nutrition Research*. (KINSELLA, J.E., Ed.), Vol. 33, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 1-101.

- GREWAL, K.K. and RACZ, W.J. (1993) *Intracellular Calcium Disruption as a Secondary Event in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity*. Nat. Res. Council Canada., 71:26-33.
- GUIDOTTI, G.G., FRANCHI-GAZZOLA, R., GAZZOLA, G.C. and RONCHI, P. (1974) *Regulation of Amino Acid Transport in Chick Embryo Heart Cells. IV Site and Mechanism of Insulin Action*. Biochem. Biophys. Acta., 356:219-30.
- GUIDOTTI, G.G., BORGUETTI, A.F. and GAZZOLA, G.C. (1978) *The Regulation of Amino Acid Transport in Animal Cells*. Biochem. Biophys. Acta., 515:329-366.
- GUTTMAN, P. (1978). Citado por: ROE, D.A. (1984b) *Therapeutic Significance of Drug-Nutrient Interactions in the Elderly*. Pharmacological Reviews. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics., Vol.36, Suppl.2, p. 109S-22S.
- GUYTON, A.C. (1988) *Digestión y Absorción en el Tubo Digestivo*. En: *Tratado de Fisiología Médica* Séptima Edición. Interamericana de España McGraw-Hill. p. 782-91.
- GUYTON, A.C. (1992) *Fisiología Gastrointestinal*. En: *Tratado de Fisiología Médica* Octava Edición. Interamericana de España McGraw-Hill. p. 719-777.
- HA, T., MORGAN, S.L., VAUGHN, W.H., ETO, I. and BAGGOTT, J.E. (1990) Citado por: BAGGOTT, J.E., MORGAN, S.L., VAUGHN, W.H. and HINE, R.J. (1992) *Inhibition of Folate-Dependent Enzymes by Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs*. Biochem. J., 282:197-202.
- HAAS, R., PAIKER, W.D., STAMPF, D. and EGUREN, L.A. (1985) *Salicylate-induced Loose Coupling: Protonmotive Force Measurements*. Biochem. Pharmacol., 34:000-2.
- HALSTED, C.H. (1980) *Intestinal Absorption and Malabsorption of Foliates*. Annu. Rev. Med., 31:79-87.
- HARPER, A.E. (1967) *Effects of Dietary Protein Content and Amino Acid Pattern on Food Intake and Preference*. En: *Handbook of Physiology. Section 6. Alimentary Canal* (CODE, C.F., Ed.) Vol. I, American Physiological Society, Washington, D.C. p. 399-410.
- HARPER, A.E. (1977). Citado por: SANCHEZ BARCO, M.J. (1990) *Índices Bioquímicos en Sangre y Músculo Gastrocnemio de Ratas Sometidas a Dietas Carentes de Metionina + Cisteína y con Déficit Energético*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- HARPER, A.E., LEUNG, P., YOSHIDA, A. and ROGERS, Q.R. (1964) *Some New Thoughts on Amino Acid Imbalance*. Fed. Proc., 23:1087-92.
- HARPER, A.E., BENEVENGA, N.J. and WOHLHUETER, R.M. (1970) *Effects of Ingestion of Disproportionate Amounts of Amino Acids*. Physiol. Rev., 50:428-558.
- HARVEY, F. and GOULDING, R. (1974) *Action of Cysteamine in Paracetamol Poisoning*. Lancet, p. 1082.
- HARVEY, P.W., ROUTH, M.R., REES, S.J., HEALING, G., RUSH, K.C., PURDY, K., EVERETT, D.J. and COCKBURN, A. (1993) *Steroids Pre-Treatment and Subsequent Hepatic Response to Paracetamol in Rats: do Glucocorticoids Modulate Liver Toxicity?* Med. Sci. Res., 21:165-7.
- HATHCOCK, J.N. (1985) *Metabolic Mechanisms of Drug-Nutrient Interactions (Review)*. Fed. Proc., 44(II):124-9.

- HATHCOCK, J.N. (1987) *Nutrient-Drug Interactions*. Clin. Ger. Med., 3:297-307.
- HATHCOCK, J.N. (1990) *Nutritional Modulation of Xenobiotic Metabolism; Metabolic Depletion of Nutrients by Drugs*. J. Nutr. Biochem., 1:400-2.
- HAUSPIE, C.S., LEPAGE, Y. and VERCAUTEREN, M. (1987) *Nutrition and Growth* Wld. Rev. Diet., 53:69-170. (Karger, Basel)
- HEGER, J. and FRYDRICH, Z. (1985) *Efficiency of Utilization of Essential Amino Acids in Growing Rats at Different Levels of Intake*. Brit. J. Nutr., 54:499-508.
- HEGSTED, D.M. (1963). Citado por: MUNRO, H.N. (1972) *Amino Acid Requirements and Metabolism and their Relevance to Parenteral Nutrition*. En: *Parenteral Nutrition*. (WILKINSON, A.W., Ed.) London, Churchill-Livingstone, p. 34-67.
- HEINDENHAIN, M. (1896) *Noch einmal über die darstellung der centralkörper durch eisenhamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen uber hamatoxylinfarben*. Z. Wiss Mikroskop., 13:186.
- HENNING, S.M., McKEE, R.W. and SWENDSEID, M.E. (1989) *Hepatic Content of S-Adenosylmethionine, S-Adenosylhomocysteine and Glutathione in Rats Receiving Treatments Modulating Methyl Donor Availability*. J. Nutr., 119:1478-82.
- HENRY, J.B. (1988) *Función e Integridad del Hígado*. En: *Diagnóstico y Tratamientos Clínicos por el Laboratorio*. 8ª Ed. Todd-Sdnford-Davidsohn. Salvat Editores. S.A. p. 297-329.
- HERBERT, V. and ZALUSKY, R. (1961) *Selective Concentration of Folic Acid Activity in Cerebrospinal Fluid*. En: *Drug Induced Nutritional Deficiencies*. (1985) (ROE, D.A., Ed.) AVI PUBLISHING COMPANY. INC. Westport. Connecticut. p. 1-71.
- HODGES, R.E. (1981) *Interacciones entre Nutrientes y Fármacos*. En: *Nutrición y Medicina Clínica*. (HODGES, R.E., Ed.) W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- HOEHN, M.M.M. (1983). Citado por: CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. (1991) *Fármacos para la Enfermedad de Parkinson, Espasticidad y Espasmos Musculares Agudos*. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición. (GOODMAN and GILMAN Eds.) Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Buenos Aires, Caracas, Madrid, Santiago de Chile, Sao Paulo. p. 458-78.
- HOFFMAN, R.M. (1984). Citado por: COOK, R.J., HORNE, D.W. and WAGNER, C. (1989) *Effect of Dietary Methyl Group Deficiency on One-Carbon Metabolism in Rats*. J. Nutr., 119:612-7.
- HOFFMAN, D.R., CORNATZER, W.E. and DUERCE, J.A. (1979) *Relationships between Tissue Levels of S-Adenosylmethionine, S-Adenosylhomocysteine and Transmethylation Reactions*. Can. J. Biochem., 57:56-65.
- HOLT, L.E. and SNYDERMAN, S.E. (1967) *The Amino Acid Requirements of Children*. En: *Amino Acid Metabolism and Genetic Variation*. (NYHAN, W. Ed.) New York, McGraw-Hill Book Co. p. 381-90.
- HOPPNER, K. and LAMPI, B. (1986) *Effect of Aspirin Ingestion on Folate Bioavailability Evaluated by Rat Liver Bioassay*. En: *Chemistry and Biology of Pteridines*. (COOPER, B.A. and WHITEHEAD, V.M., Eds.) (1986) De Gruyter. New York., p. 531-7.

- HOTHERSALL, J.S., GREENBOUM, A.L. and McLEAN, P. (1982) *The Functional Significance of the Pentose Phosphate Pathway in Synaptosomes: Protection against Peroxidative Damage by Catecholamines and Oxidants*. J. Neurochem., 39:1325-32.
- HOUSTON, J.B. and LEVY, G. (1976). Citado por: HATHCOCK, J.N. (1990) *Nutritional Modulation of Xenobiotic Metabolism; Metabolic Depletion of Nutrients by Drugs*. J. Nutr. Biochem., 1:400-2.
- HUEI, J. and LEVY, G. (1981). Citado por: HATHCOCK, J.N. (1990) *Nutritional Modulation of Xenobiotic Metabolism; Metabolic Depletion of Nutrients by Drugs*. J. Nutr. Biochem., 1:400-2.
- HUETHER, G. (1989) *Amino Acid Availability and Brain Development: Effects of Nutritional and Metabolic Inadequacies*. Eur. J. Clin. Nutr., 43:19-25.
- INOUE, F. and WALSH, R.J. (1983) *Folate Supplements and phenytoin-salicylate interaction*. Neurology (NY) 33:115-6.
- INOUE, G., KOMATSU, T., and KISHI, K. (1983) *Amino Acid Requirements of Japanese Young Men*. En: *Amino Acids: Metabolism and Medical Applications*. (BLACKBURN, G.L., GRANT, J.F. and YOUNG, V.R. Ed.) Boston, John Wright, p. 55-62.
- INSEL, P.A. (1991) *Agentes Analgésicos-Antipiréticos y Antiinflamatorios; Drogas Empleadas en el Tratamiento de la Artritis Reumatoidea y la Gota*. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición. (GOODMAN and GILMAN Eds.) Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Buenos Aires, Caracas, Madrid, Santiago de Chile, Sao Paulo. p. 624-66.
- JABLONSKI, E. and RAFALSKI, H. (1984) *The Utilization of Protein from a Low-Protein Diet as Determined by Limiting Essential Amino Acids*. Br. J. Nutr., 51:235-43.
- JAGERROOS, B.H. (1955) Citado por: DEUEL, J.R. En: *The Lipids*. Vol. 2. Biochemistry. Ed. Interscience Publishers. New York.
- JENNER, P. (1993) *Altered Mitochondrial Function, Iron Metabolism and Glutathione Levels in Parkinson's Disease*. Acta. Neurol. Scand., 87, Suppl.146:6-13.
- JIMENEZ-JIMENEZ, F.J., MOLINA J.A., FERNANDEZ-CALLE, P., VAZQUEZ, A., CABRERA-VALDIVIA, F., CATALAN, M.J., GARCIA-ALBEA, E., BERMEJO, F. and CODOCEO, R. (1993) *Serum Levels of β -Carotene and other Carotenoids in Parkinson's Disease*. Neuroscience Letters., 157:103S-6S.
- JOLLOW, D.J., MITCHELL, J.R., POTTER, W.Z., DAVIS, D.L., GILLETE, J.R. and BRODIE, B.B. (1973) *Acetaminophen-induced Hepatic Necrosis. II. Role of Covalent Binding in vivo*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 187:195-202.
- JOLLOW, D.J., THORGEIRSSON, S.S., POTTER, W.Z., HASHIMOTO, M. and MITCHELL, J.R. (1974). Citado por: HATHCOCK, J.N. (1990) *Nutritional Modulation of Xenobiotic Metabolism; Metabolic Depletion of Nutrients by Drugs*. J. Nutr. Biochem., 1:400-2.
- KALHORN, T.F., LEE, C.A., SLATTERY, J.T. and NELSON, S.D. (1990) *Effect of Methylxanthines on Acetaminophen Hepatotoxicity in various Induction States*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 252:112-6.
- KARSTAEDT, P.J. and PINCUS, J.H. (1993) *Aspartame Use in Parkinson's Disease*. Neurology, 43:611-3.

- KILBERG, M.S. (1982) *Amino Acid Transport in Isolated Rat Hepatocytes*. J. Membrane Biol., 69:1-12.
- KILBERG, M.S., HANDLOGTEN, M.E. and CHRISTENSEN, H.N. (1980) *Characteristics of an Amino Acid Transport System in Rat Liver for Glutamine, Asparagine, Histidine and Closely Related Analogs*. J. Biol. Chem., 255:4011-19.
- KIM, Y.S. and FREEMAN, H.J. (1977) *The Digestion and Absorption of Protein*. En: *Clinical Nutrition Update: Amino Acids*. (GREENE, H.L., HOLLIDAY, M.A. and MUNRO, H.N. Eds.) Chicago, American Medical Association. p. 141-6.
- KISH, S.J., MORITO, C. and HORNYKIEWICZ, O. (1985). Citado por: FLOHÉ, L. (1989) *The Selenoprotein Glutathione Peroxidase*. En: *COENZYMES AND COFACTORS VOLUME III. GLUTATHIONE. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part A*. (DOLPHIN, D., POULSON, R. and AVRAMOVIC Eds.). Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 643-731.
- KOSOWER, E.M. (1989) *Structure and Reactions of Thiols with Special Emphasis on Glutathione*. En: *COENZYMES AND COFACTORS VOLUME III. GLUTATHIONE. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part A*. (DOLPHIN, D., POULSON, R. and AVRAMOVIC Eds.). Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 103-46.
- KRIJGSHELD, K.R., FRANKENA, H., SCHOLTENS, E., ZWEENS, J. and MULDER, G.J. (1979) *Absorption, Serum Levels and Urinary Excretion of Inorganic Sulfate after Oral Administration of Sodium Sulfate in the Conscious Rat*. Biochem. Biophys. Acta., 586:492-500.
- KRIJGSHELD, K.R., FRANKENA, H., SCHOLTENS, E. and MULDER, G.J. (1981a) *The Oxidation of L- and D-cysteine to Inorganic Sulfate and Taurine in the Rat*. Biochem. Biophys. Acta, 677:7-12.
- KRIJGSHELD, K.R., SCHOLTENS, E. and MULDER, G.J. (1981b). Citado por: ROE, D.A. *Diet, Nutrition and Drug Reactions*. En: *Modern Nutrition in Health and Disease*. (SHILS, M.E. and YOUNG, V.R., Eds.) Septima Ed. p. 630-45.
- KRUMDIECK, C.L., TAMURA, T. and ETO, S. (1983) *Synthesis and analysis of the pteroylpolyglutamates*. Vitam. Horm., 40:45-104.
- KURLAN, R. (1987) *Dietary therapy for motor fluctuations in Parkinson's disease*. Arch. Neurol., 44:1119-21.
- LAUTENBURG, B.H., VAISHNAV, Y., STILLWELL, W.G. and MITCHELL, J.R. (1980) *The Effect of Age and Glutathione Depletion on Hepatic Glutathione Turnover in vivo determined by Acetaminophen probe Analysis*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 213:54-8.
- LAUTENBURG, B.H. and SMITH, C.V. (1986) *Stimulation of Hepatic Efflux and Turnover of Glutathione by Methionine in the Rat*. Eur. J. Clin. Inv., 16:494-9.
- LAWRENCE, V.A., LOEWENSTEIN, J.E. and EICHNER, E.R. (1984) *Aspirin and Folate Binding: In vivo and in vitro Studies of Serum Binding and Urinary Excretion of Endogenous Folate*. J. Lab. Clin. Med., 103:944-8.
- LEHMANN, J. (1971) *Levodopa and Depression in Parkinsonism*. Lancet, 1:140.
- LEHMANN, J. (1973) *Tryptophan Malabsorption in Levodopa-treated Parkinsonian Patients*. Acta. Med. Scand., 194:181-9.

- LEHNINGER, A.L. (1985a) *Los Aminoácidos, Sillares de Proteínas*. En: *Bioquímica*. Ed. Omega S.A. Segunda Edición. Barcelona. p. 73-96.
- LEHNINGER, A.L. (1985b) *Traducción: Biosíntesis de Proteínas*. En: *Bioquímica*. Ed. Omega S.A., Segunda Edición, Barcelona, p. 941-966.
- LEHNINGER, A.L. (1985c) *Biosíntesis de los Aminoácidos y de algunos Derivados: Metabolismo del Nitrógeno Inorgánico*. En: *Bioquímica*. Ed. Omega S.A., Segunda Edición, Barcelona, p. 705-737.
- LEHNINGER, A.L. (1985d) *Vitaminas y Coenzimas*. En: *Bioquímica*. Ed. Omega S.A., Segunda Edición, Barcelona, p. 341-67.
- LEVI, S. COX, M., LUGON, M., HODKINSON, M. and TOMKINS, A. (1990) *Increased Energy Expenditure in Parkinson's Disease*. *Br. Med. J.*, 301:1256-7.
- LIEBERMAN, A.N., HIROWITZ, L., REDMON, P., PACHTER, L. LIEBERMAN, I. and LIEBOWITZ, M. (1980) *Dysphagia in Parkinson's Disease*. *Am. J. Gastroenterol.*, 74(2):157-60.
- LINDER, M.C. (1988a) *Nutrición y Metabolismo de las Proteínas*. En: *Nutrición. Aspectos Bioquímicos, Metabólicos y Clínicos*. (LINDER, M.C. Ed.) EUNSA. Pamplona. p. 81-100.
- LINDER, M.C. (1988b) *Nutrición y Metabolismo de las Vitaminas*. En: *Nutrición. Aspectos Bioquímicos, Metabólicos y Clínicos*. (LINDER, M.C. Ed.) Editorial EUNSA. Pamplona, p. 101-68.
- LIS, M.T, CRAMPTON, R.F. and MATTHEWS, D.M. (1972) *Effect of Dietary Changes on Intestinal Absorption of L-Methionine and L-Methionyl-L-Methionine in the Rat*. *Brit. J. Nutr.*, 27:159-67.
- LITTER, M. (1986) *Farmacología de la piel y la Inflamación*. En: *Farmacología Experimental y Clínica*. Ed. "El Ateneo". Buenos Aires, Lima, Rio de Janeiro, Caracas, Montevideo, Mexico, Barcelona, Bogota. 7ª Edición. p. 1303-96.
- LITTER, M. (1988) *Drogas Anticonvulsivantes o Antiepilépticas. Relajantes Musculares Centrales. Drogas Antiparkinsonianas*. En: *Farmacología Experimental y Clínica*. 7ª Edición. El Ateneo. Buenos Aires, Lima, Rio de Janeiro, Caracas, Mexico, Barcelona, Madrid, Bogotá. p. 311-58.
- LORENZO VELAZQUEZ, B. (1987) *Fármacos Antitérmicos-Analgésicos y Antiinflamatorios*. En: *Farmacología y su Proyección Clínica*. Ed. OTEO. Madrid. 15ª Edición. p. 417-35.
- LUFT, J.H., (1961). Citado por: PEASE, D.C. (1964) *Embedding*. En: *Histological Techniques for Electron Microscopy*. Segunda Ed. Academic Press. New York and London. p. 34-81.
- LUNN, P.G., WHITEHEAD, R.G. and 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.*, 36:219-30.
- LUPO, S., YODIS, L.A., MICO, B.A. and BUSH, C. (1987) *In vivo and in vitro Hepatotoxicity and Metabolism of Acetaminophen in Syrian Hamsters*. *Toxicology.*, 44:229-39.
- MAALOE, O. and BIRCH-ANDERSEN, A. (1956). Citado por: SJÖSTRAND, F.S. (1967) *Embedding of Chemically Fixed Material*. En: *Electron Microscopy of Cells and Tissues*. Volume I. Academic Press. New York and London. p. 177-87.

- MANNERVIK, B., CARLBERG, I. and LARSON, K. (1989) *Glutathione: General Review of Mechanism of Action*. En: COENZYMES AND COFACTORS VOLUME III. GLUTATHIONE. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part A. (DOLPHIN, D., POULSON, R. and AVRAMOVIC Eds.). Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 475-516.
- MARCOS SANCHEZ, A. (1982) *Adaptación del Metabolismo Proteico Hepático al Stress, en Ratas con malnutrición Proteica y Calórica-Proteica*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- MARKUS, H., TOMKINS, A. and STERN, G.M. (1992) *The Incidence and Cause of Weight Loss in Parkinson's Disease. An Anthropometric Study of Eighty-five Patients*. Proc. Nutr. Soc., 51:31A.
- MARKUS, H.S., TOMKINS, A. and STERN, G.M. (1993) *Increased Prevalence of Undernutrition in Parkinson's Disease and Relationship to Clinical Disease Parameters*. J. Neural. Transm., 5:117-25.
- MARTILLA, R.J. (1983). Citado por: CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. (1991) *Fármacos para la Enfermedad de Parkinson, Espasticidad y Espasmos Musculares Agudos*. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición. (GOODMAN and GILMAN Eds.) Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Buenos Aires, Caracas, Madrid, Santiago de Chile, Sao Paulo. p. 458-78.
- MARTIN DUZE, A., ORTIZ, P., CABRERO, C., and MATO, J.M. (1988). Citado por: PAJARES, M.A., CORRALES, F., DURAN, C., MATO, J.M. and ALVAREZ, L. (1992) *How is Rat S-Adenosylmethionine Syntetase Regulated?* Fed. Eur. Biochem. Soc., 309:1-4.
- MARTINDALE (1982) *Aspirin and Similar Analgesic and Anti-inflammatory Agents*. En: *The Extra Pharmacopoeia*. (WADE, A. and REYNOLDS, J.E.F. Eds.) The Pharmaceutical Press, London (28ª Ed.). p. 235-71.
- MARTINELLI, A.L., MENEGHELLI, U.G., ZUCOLOTO, S. and LIMA, S.O. (1989) *Effect of the Intake of an Exclusive Sucrose Diet on Acetaminophen Hepatotoxicity in Rats*. Braz. J. Med. Biol. Res., 22:1381-7.
- MARTINEZ, J.A., ROSS, A.C. and BUTTERY, P.J. (1987). Citado por: MARTINEZ, J.A., GOENA, M., SANTIDRIAN, S. and LARRALDE, J. (1987) *Response of Muscle, Liver and Whole-Body Protein Turnover to Two Different Sources of Protein in Growing Rats*. Ann. Nutr. Metab., 31:146-53.
- MATTHEWS, D.M. (1975) *Protein Absorption*. *Biblhca. Nutr. Dieta.*, 22:28-41.
- McLEAN, A.E.M., ARMSTRONG, G.R. and BEALES, D. (1989) *Effect of D- or L-Methionine and Cysteine on the Growth Inhibitory Effects of Feeding 1% Paracetamol to Rats*. *Biochem. Pharmacol.*, 38:347-52.
- McCOY, R.H. (1949) *Dietary Requirements of the Rat*. En: *The Rat in Laboratory Investigation*. (FARRIS, E.J. and GRIFFITH, J.Q. Eds.) J.B. Lippincott Company. Philadelphia, London, Montreal. Segunda Edición. p. 83-86.
- McDOWELL, F.H. and SWEET, R.D., (1976). Citado por: ANTAL, J. and JASZSAGI-NAGI, E., (1978) *Die Wirkung von L-Dopa und Reserpin auf die Speicherung von ¹⁴C-Methionin und ¹⁴C-Phenylalanin in den Hirnregionen von Ratten*. *Radiobiol. Radiother. (Berl)*, 19, 4:416-23.

- McNEIL, N.I. (1988) *Nutritional Implications of Human and Mammalian Large Intestinal Function*. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 56:1-42.
- MEGNA, G., PENNETA, R. and ANDREULA, C. (1977) *Rilievi Clinici e Psicometrici Sull'uso della S-Adenosil-Metionina in Parkinsoniani Cronicamente Trattati con L-Dopa*. *Acta Neurol. (Napoli)*, 32:204-17.
- MEHTA, S., NAIN, CH.K., SHARMA, B. and MATHUR, V.S. (1982) *Disposition of Four Drug in Malnourished Children*. *Drug-Nutrient Interac.*, 1:205-11.
- MEISTER, A. (1965) *The role of Amino Acids in Nutrition*. En: *Biochemistry of the Amino Acids*. Academic Press. New York. Cap. III. p. 201-30.
- MEISTER, A. (1989a). *A Brief History of Glutathione and a Survey of Its Metabolism and Functions*. En: *COENZYMES AND COFACTORS VOLUME III. GLUTATHIONE. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part A.* (DOLPHIN, D., POULSON, R. and AVRAMOVIC Eds.). Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 1-48.
- MEISTER, A. (1989b). *Metabolism and Function of Glutathione*. En: *COENZYMES AND COFACTORS VOLUME III. GLUTATHIONE. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part A.* (1988) (DOLPHIN, D., POULSON, R. and AVRAMOVIC Eds.). Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 367-474.
- MELLINKOFF, S. (1957). Citado por: HARPER, A.E., BENEVENGA, N.J. and WOHLHUETER, R.M. (1970) *Effects of Ingestion of Disproportionate Amounts of Amino Acids*. *Physiol. Rev.*, 50:429-558.
- MENA, I. and COTZIAS, G.C. (1975) *Protein Intake and Treatment of Parkinson's Disease with Levodopa*. *N. Engl. J. Med.*, 292:181-4.
- MENARD, G., ALLAIN, H., LE ROHO, S., MOREL, G. et BENETON, C. (1993) *Enquête d'un jour en officine sur la consommation d'antalgiques et d'antipyrétiques*. *Thérapie*, 48:263-7.
- MERCER, L.P., DODDS, S.J., SCHWEISTHAL, M.R. and DUNN, J.D. (1989) *Brain Histidine and Food Intake in Rats Fed Diets Deficient in Single Amino Acids*. *J. Nutr.*, 119:66-74.
- MEREDITH, T.J. and VALE, J.A. (1984) *Epidemiology of Analgesic Overdose in England and Wales*. *Hum. Toxicol.*, 3:61S-74S.
- MEREDITH, T.J., PRESCOTT, L.F. and VALE, J.A. (1986) *Why Do Patients Still Die From Paracetamol Poisoning?* *Br. Med. J. [Clinical Res]*, 293:345-6.
- MICHELLI, L., FIASCHI, A.I., CERRETANI, D. and GIORGI, G. (1993) *Effect of Acetaminophen on Glutathione Levels in Several Regions of the Rat Brain*. *Curr. Ther. Res.*, 53:730-736.
- MICHELS, F.G. and SMITH, J.T. (1965) *A Comparison of the Utilization of Organic and Inorganic Sulfur by the Rat*. *J. Nutr.*, 87:217-20.
- MILLER, D.S. and BEMDER, D.E. (1955) *The Determination of the Net Utilization of Proteins by Shortened Methods*. *Brit. J. Nutr.*, 9:328.
- MILLER, M.R., WENTZ, E., BLAIR, J.B., PACK, D., and HINTON, D.E. (1993) *Acetaminophen Toxicity in Cultured Trout Liver Cells. I. Morphological Alterations and Effects on*

Cytochrome P450 1A1. Exp. Molecul. Pathol., 58:114-126.

- MILLWARD, D.J. and RIVERS, J.P.W. (1988). Citado por: MILLWARD, D.J. and RIVERS, J.P.W. (1988) *The Nutritional Role of Indispensable Amino Acid and the Metabolic Basis for their Requirements*. Eur. J. Clin. Nutr., 42:367-93.

- MINER, D.J. and KISSINJER, P.T. (1979). *Evidence for the Involvement of N-acetyl-p-quinoneimine in Acetaminophen Metabolism*. Biochem. Pharmacol. 28:3285-90.

- MITCHELL, J.R. and JOLLOW, D.J. (1975) *Metabolic Activation of Drugs to Toxic Substances*. Gastroenterol., 68:392-410.

- MITCHELL, J.R., JOLLOW, D.J., POTTER, W.Z., GILLETTE, J.R., and BRODI, B.B. (1973) *Acetaminophen-Induced Hepatic Necrosis. IV. Protective Role of Glutathione*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 187:211.

- MITCHELL, M.C., SCHENKER, S., AVANT, G.R. and SPEEG, K.V. (1981) *Cimetidine Protects against Acetaminophen Hepatotoxicity in Rats*. Gastroenterol., 81:1052-60.

- MITSUMOTO, Y., SATO, K., OHYASHIKI, T. and MOHRI, T. (1986) *Leucine-Proton Cotransport System in Chang Liver Cell*. J. Biol. Chem., 261:4549-54.

- MIYIHARA, J.T. and KARLER, R. (1965) *Effect of Salicylate on Oxidative Phosphorylation and Respiration of Mitochondrial Fragment*. Biochem., 97:194.

- MOLDEUS, P. (1981). Citado por: MEREDITH, T.J.; PRESCOTT, L.F. and VALE, J.A. (1986) *Why Do Patients Still Die From Paracetamol Poisoning?* Br. Med. J. [Clinical Res], 293:345-6.

- MONCKEBERG, F., BRAVO, M. and GONZALEZ, O. (1978) *Drug Metabolism and Infantile Undernutrition*. En: *Nutrition and Drug Interrelations*. (HATHCOCK, J.N. and COON, J. Eds.) Academic Press. New York, San Francisco, London. p. 399-408.

- MORRIS, M.E. and LEVY, G. (1983) *Serum Concentration and Renal Excretion by Normal Adults of Inorganic Sulfate after Acetaminophen, Ascorbic Acid, or Sodium Sulfate*. Clin. Pharmacol. Ther., 33:529-36.

- MUDD, S.H. and POOLE, J.R. (1975). Citado por: CORRALES IZQUIERDO, F. (1992) *Función de los Grupos Sulfidrilo en el Mantenimiento de la Estructura y la Actividad de la SAM en Hígado de Rata*. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.M.-Instituto de investigaciones Biomédicas, C.S.I.C., Madrid.

- MULDER, G.J., TEMMINK, T.J.M. and KOSTER, H.J. (1982) *The Effect of Fasting on Sulfation and Glucuronidation in the Rat in Vivo*. Biochem. Pharmacol., 31:1941-4.

- MUNRO, H.N. (1970) *Free Amino Acid Pools and their Role in Regulation*. En: *Mammalian Protein Metabolism*, Vol. IV. (MUNRO, H.N. Ed.) New York, Academic Press, p. 299-386.

- MUNRO, H.N. (1972) *Amino Acid Requirements and Metabolism and their Relevance to Parenteral Nutrition*. En: *Parenteral Nutrition*. (WILKINSON, A.W., Ed.) London, Churchill-Livingstone. p. 34-67.

- MUNRO, H.N. and CRIM, M.C. (1987) *Proteínas y aminoácidos*. En: *La Nutrición en la Salud y la Enfermedad. Conocimientos Actuales*. (GOODHART, R.S. and SHILLS, M.E. Ed.) Salvat Editores, S.A. Barcelona. p. 47-89.

- MUNRO, H.N. and CRIM, M.C. (1988) *The Proteins and Amino Acids*. En: *Modern Nutrition in Health and Disease*. (SHILS, M.E. and YOUNG, V.R. Ed.) Lea and Febiger. Philadelphia. Septima Ed. p. 1-37.
- MURIEL, P. (1993) *S-Adenosyl-L-Methionine Prevents and Reserves Erythrocyte Membrane Alterations in Cirrhosis*. J. App. Toxicol., 13:179-82.
- MUTCH, W.J., DINGWALL-FORDYCE, I., DOWRIE, A.W. PATERSON, J.G. and ROY, S.K. (1986). Citado en: ABBOTT, R., COX, M., MARCUS, H. and TOMKINS, A. (1992b) *Diet, Body Size and Micronutrient Status in Parkinson's Disease*. Eur. J. Clin. Nutr., 46:879:84.
- MYTILINEOU, C. SHAN-KUO, H. and COHEN, G. (1993) *Toxic and Protective Effects of L-Dopa on Mesencephalic Cell Cultures*. J. Neurochem., 61:1470-8.
- NAKAGAWA, I. TAKAHASHI, T. and SUZUKI, T. (1964). Citado por: MUNRO, H.N. (1972) *Amino Acid Requirements and Metabolism and their Relevance to Parenteral Nutrition*. En: *Parenteral Nutrition*. (WILKINSON, A.W., Ed.) London, Churchill-Livingstone. p. 34-67.
- NANRA, R.S. (1993) *Analgesic Nephropathy in the 1990s-An Australian Perspective*. Kidney International. 44:Suppl.42:86S-92S.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1990). En: *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. Tercera Ed. Revisada.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1991). En: *Raciones Dietéticas Recomendadas*. 1ª edición española de la 10ª edición original de *Recommended Dietary Allowances*. Ed. Consulta.
- NODA, K. and CHIKAMORI, K. (1976) *Effect of Ammonia Via Prepyriform Cortex on Regulation of Food Intake in the Rat*. Am. J. Physiol., 231:1263-6.
- NOYELLE, R.M., CROSSLAND, F.P.S. and PICKVANCE, J. (1987) *Tratamiento de las Cefaleas. Ibuprofen, Acido Acetil Salicílico y Paracetamol, Comparados en un Estudio Comunitario*. The Pharmaceutical Journal., 238:561-4.
- NUTT, J.G., WOODWARD, W.R., HAMMERSTAD, J.P., CARTER, J.H. and ANDERSON, J.R. (1984) *The "on-off" Phenomenon in Parkinson's Disease*. N. Engl. J. Med., 310:483-8.
- NUTT, J.G., WOODWARD, W.R., CARTER, J.H. and TROTMAN, T. (1989) *Influence of Fluctuations of Plasma Large Neutral Amino Acids with Normal Diets on the Clinical Response to Levodopa*. J. Neurol. Neurosurg. Psych., 52:481-7.
- OLDENDORF, W.H. (1971) *Brain uptake of Radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection*. Am. J. Physiol., 221:1629-39.
- OLDERDORF, W.H. and SZABO, J. (1976) *Amino Acid Assignment to One of Three Blood-Brain Barrier Amino Acid Carriers*. Am. J. Physiol., 230:94-8.
- ORDOÑEZ, L.A. and WURTMAN, R.J. (1973a). Citado por: ORDOÑEZ, L.A. and WURTMAN, R.J. (1974) *Folic Acid Deficiency and Methyl Group Metabolism in Rat Brain: Effects of L-Dopa*. Arch. Biochem. Biophys., 160:372-6.
- ORDOÑEZ, L.A. and WURTMAN, R.J. (1973b). Citado por: ORDOÑEZ, L.A. and WURTMAN, R.J. (1974) *Folic Acid Deficiency and Methyl Group Metabolism in Rat Brain: Effects of L-Dopa*. Arch. Biochem. Biophys., 160:372-6.

- ORDÓÑEZ, L.A. and WURTMAN, R.J. (1974) *Folic Acid Deficiency and Methyl Group Metabolism in Rat Brain: Effects of L-Dopa*. Arch. Biochem. Biophys., 160:372-6.
- OSBORNE, T.B. and MENDEL, L.B. (1916). Citado por: ROGERS, Q.R. and LEUNG, M.B., (1973) *The Influence of Amino Acids on the Neuroregulation of Food Intake*. Fed. Proc., 32:1709-19.
- OUSLANDER, J.G. (1981). Citado por: ROE, D.A. (1984b) *Therapeutic Significance of Drug-Nutrient Interactions in the Elderly*. Pharmacological Reviews. Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther., 36:Suppl.2:109S-22S.
- OXENDER, D. and CHRISTENSEN, H.N. (1963) *Distinct Mediating Systems for the Transport of Neutral Amino Acids by the Ehrlich Cell*. J. Biol. Chem., 238:3686-99.
- PARDRIDGE, W.M. (1977) *Kinetics of Competitive Inhibition of Neural Amino Acid Transport Across the Blood-Brain-Barrier*. J. Neurochem., 28:103-8.
- PARDRIDGE, W.M. (1983) *Brain Metabolism: a Perspective from the Blood-Brain Barrier*. Physiol. Rev., 63:1481-535.
- PARDRIDGE, W.M. and CHOI, T.S. (1986) *Neutral Amino Acid Transport at the Human Blood-Brain Barrier*. Fed. Proc., 45:2073-8.
- PARE, S., BARR, I.S. and ROSS, S.E. (1992) *Effect of Daytime Protein Restriction on Nutrient Intakes of Free-Living Parkinson's Disease Patients*. Am. J. Clin Nutr., 55:701-7.
- PARKE, D.V. and IOANNIDES, C. (1981) *The Role of Nutrition in Toxicology*. Ann. Rev. Nutr., 1:1207-34.
- PARKINSON STUDY GROUP (1989) *DATATOP - Deprenyl and Tocopherol Antioxidant Therapy of Parkinsonism*. Arch. Neurol., 46:1952-60.
- PASCALE, R., GARCEA, R., and DAINO, L. (1984) *The Role of S-Adenosylmethionine in the Regulation of Glutathione pool and Acetaldehyde Production in Acute Ethanol Intoxication*. Research Communications in Substance Abuse, 5:87-96.
- PEARCE, L.A. and WATERBURY, L.D. (1974) *L-Methionine: A Possible Levodopa Antagonist*. Neurology, 24:640-1.
- PEGG, A.E., HIBASAMI, H. MATSUI, I. and BENETT, R.A. (1981) *Formation and Interconversion of Putrescine and Spermidine in Mammalian Cells*. Adv. Enzyme. Regul., 19:427-51.
- PELLET, P.L. and KABA, H. (1972). Citado por: HEGER, J. and FRYDRICH, Z. (1985) *Efficiency of Utilization of Essential Amino Acids in Growing Rats at Different Levels of Intake*. Brit. J. Nutr., 54:499-508.
- PERRY, J. and CHANARIN, I. (1973) *Formylation of Folate as a Step in Physiological Folate Absorption*. Br. Med. J., 2:58-9.
- PERRY, T.L., GODIN, D.V. and HANSEN, S. (1982). Citado por: JENNER, P. (1993) *Altered Mitochondrial Function, Iron Metabolism and Glutathione Levels in Parkinson's Disease*. Acta. Neurol. Scand., 87, Suppl.146:6-13.
- PETERSON, F.J. and KNOPELL, R.G. (1984) *Ascorbic Acid Protects Against Acetaminophen and Cocaine-Induced Hepatic Damage in Mice*. Drug-Nutrient Interact., 3:33-41.

- PETERSON, F.J., HOLLOWAY, D.E. and ERICKSON, R.R. (1980) *Ethanol Induction of Acetaminophen Toxicity and Metabolism*. *Life Sci.*, 27:1705-11.
- PETERSON, F.J., LINDEMANN, N.J., DUQUETTE, P.H. and HOLTZMAN, J.L. (1992) *Potential of Acute Acetaminophen Lethality by Selenium and Vitamin E Deficiency in Mice*. *J. Nutr.*, 122:74-81.
- PLACKE, M.E., GINSBERG, G.L., WYAND, D.S. and COHEN, S.D. (1987) *Ultrastructural Changes During Acute Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in the Mouse: a Time and Dose Study*. *Toxicol. Pathol.*, 15:431-8.
- PLUM, F. y POSNER, J.B. (1988) *Neurología*. En: *FISIOPATOLOGÍA. Principios Biológicos de la Enfermedad*. (SMITH, LL.H., THIER, S.O. Eds.) 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México, Sao Paulo. p. 909-1061.
- PONSODA, X., JOVER, R., GOMEZ-LECHON, M.J., FEBRA, R., TRULLENQUE, R. and CASTELL, J.V. (1991) *Intracellular Glutathione in Human Hepatocytes Incubated with S-Adenosyl-L-Methionine and GSH-depleting Drugs*. *Toxicology*, 70:293-302.
- PORUBEK, D.J., RUNDGREN, M., HARVISON, P.J., NELSON, S.D. and MOLDEUS, P. (1987) *Investigation of Mechanisms of Acetaminophen Toxicity in Isolated Rat Hepatocytes with the Acetaminophen Analogues 3,5-dimethylacetaminophen and 2,6-dimethylacetaminophen*. *Mol. Pharmacol.*, 31:647-53.
- POTTER, W.Z., THORGEIRSSON, S.S., JOLLOW, D.J. and MITCHELL, J.R. (1974) *Acetaminophen-induced Hepatic Necrosis: V. Correlation of Hepatic Necrosis, Covalent Binding and Glutathione Depletion in Hamster*. *Pharmacology*, 12:129-43.
- PRESCOTT, L.F., NEWTON, R.W., SWAINSON, C.P., WRIGHT, N., FORREST, A.R.W. and MATTHEW, H. (1974) *Successful Treatment of Paracetamol Overdose with Cysteamine*. *Lancet*, 1:588-92.
- PRESCOTT, L.F., ILLINGWORTH, R.N., CRITCHELEY, J.A.J.H., STEWART, M.J., ADAM, R.D. and PROUDFOOT, A.T. (1979) *Intravenous N-acetylcysteine: the Treatment of Choice for Paracetamol Poisoning*. *Brit. Med. J.*, 2:1097-100.
- PRICE, V.F. and JOLLOW, D.J. (1989) *Effects of Sulfur-Amino Acid-Deficient on Acetaminophen Metabolism and Hepatotoxicity in Rats*. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 101:356-69.
- PRIEST, D.G., HAPPEL, K.K. and DOIG, M.T. (1980). Citado por: VARELA-MOREIRAS, G., SEYOUM, E. and SELHUB, J. (1991) *Combined Affinity and Ion Pair Liquid Chromatographies for the Analysis of Folate Distribution in Tissues*. *J. Nutr. Biochem.*, 2:44-53.
- PRIEST, D.G., HAPPEL, K.K., MAGNUM, M. BEDNAREK, J.M., DOIG, M.T. and BAUGH, C.M. (1981) *Tissue Folylpolyglutamate Chain-length Characterization by Electrophoresis as Thymidylate Synthetase-fluorodeoxyuridylate Ternary Complexes*. *Anal. Biochem.*, 115:163-9.
- PRIMROSE, M.F. and BURR, G.O. (1955). Citado por: DEUEL, J.R. En: *The Lipids*. Vol. 2. Biochemistry. Ed. Interscience Publishers. New York.
- QUENEAU, P., DECOUSUS, H. and JOURLIN, M. (1984). Citado en: MENARD, G., ALLAIN, H., LE ROHO, S., MOREL, G. et BENETON, C. (1993) *Enquête d'un jour en officine sur la consommation d'antalgiques et d'antipyrétiques*. *Thérapie*, 48:263-7.

- RAHEJA, K.L., TURKKY, P.R., LINSCHER, W.G. and CHO, CH. (1983) *Effect of Riboflavin Status on Acetaminophen Toxicity in the Rat*. *Drug-Nutrient Interac.*, 2:183-91.
- RAINSFORD, K. (1984). Citado por: MENARD, G., ALLAIN, H., LE ROHO, S., MOREL, G. et BENETON, C. (1993) *Enquête d'un jour en officine sur la consommation d'antalgiques et d'antipyrétiques*. *Thérapie*, 48:263-7.
- RAO, A.M., DRAKE, M.R. and STIPANUK, M.H. (1990) *Role of the Transsulfuration Pathway and of τ -Cystathionase Activity in the Formation of Cysteine and Sulfate form in Rat Hepatocytes*. *J. Nutr.*, 120:837-45.
- RECHES, A. and FAHN, S. (1982) *3-O-Metildopa Blocks Dopa Metabolism in Rat Corpus Striatum*. *Ann. Neurol.*, 12:267-71.
- REED, D.J., BRODIE, A.E. and MEREDITH, N.J. (1983) *Cellular Heterogeneity in the Status and Functions of Cysteine and Glutathione*. En: *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects. Vol. I*. (LARSSON, A., HOLMGREN, A., ORRENIUS, S. and MANNEVICK Eds.) New York, Raven Press. p. 39-49.
- REICKS, M. and HATHCOCK, J.N. (1984) *Effects of Dietary Methionine and Ethanol on Acetaminophen Hepatotoxicity in Mice*. *Drug-Nutrient Interact.*, 3:572-9.
- REICKS, M. and HATHCOCK, J.N. (1988a) *Effects of Methionine and other Sulfur Compounds on Drug Conjugations*. *Pharmacol. Therap.*, 37:67-79.
- REICKS, M. and HATHCOCK, J.N. (1988b) *Effects of Prolonged Acetaminophen Ingestion on the Growth Requirement in Weanling Mice*. *The FASEB Journal*, 2:A1573. (Abstract).
- REICKS, M. and HATHCOCK, J.N. (1989) *Prolonged Acetaminophen Ingestion in Mice: Effects on the Availability of Methionine for Metabolic Functions*. *J. Nutr.*, 119:1042-9.
- REICKS, M., CALVERT, R.J. and HATHCOCK, J.N. (1987) *Effects of Chronic Acetaminophen on Glutathione Functions in Mice*. (Abstr.) *Fed. Proc.*, 46, p. 959.
- REICKS, M., CALVERT, R.J. and HATHCOCK, J.N. (1988) *Effects of Prolonged Acetaminophen Ingestion and Dietary Methionine on Mouse Liver Glutathione*. *Drug Nutr. Interact.*, 5:351-63.
- REICKS, M., FULLERTON, F.R., POIRIER, L.A., WHITTAKER, P. and HATHCOCK, J.N. (1992) *Prolonged Acetaminophen Ingestion by Mice Fed a Methionine-Limited Diet does not Affect Iron-Induced Liver Peroxidation or S-Adenosylmethionine*. *J. Nutr.*, 122:1738-43.
- REVESZ, L. and MODIG, H. (1965) *Cysteamine-induced Increase of Cellular Glutathione Level: a new Hypothesis of the Radioprotective Mechanism*. *Nature*, 207:430-1.
- REYNOLDS, E.S. (1963). Citado por: SJÖSTRAND, F.S. (1967) *The Preparing of thin Specimens*. En: *Electron Microscopy of Cells and Tissues*. Volume I. Academic Press. New York and London. p. 297-309.
- REYNOLDS E.H. (1976) *Neurological Aspects of Folate and Vitamin B₁₂ Metabolism*. *Clin. Haematol.*, 5:661-96.
- RHODIN, J. (1954). Citado por: PEASE, D.C. (1964) *Fixation*. En: *Histological Techniques for Electron Microscopy*. Segunda Ed. Academic Press. New York and London. p. 34-81.

- RICHTER, J.J. and WAINER, A. (1971) *Evidence for Separate Systems for the Transport for Neutral and Basic Amino Acids Across the Blood-Brain Barrier* J. Neurochem., 18:613.
- RIEDERER, P., SOFIC, E. and RAUSCH, W-D. (1989). Citado por: JENNER, P. (1993) *Altered Mitochondrial Function, Iron Metabolism and Glutathione Levels in Parkinson's Disease*. Acta. Neurol. Scand., 87, Suppl.146:6-13.
- RILEY, D. and LANG, A.E. (1988) *Practical Application of a Low Protein Diet for Parkinson's Disease*. Neurology, 387:1052-60.
- ROE, D.A. (1984a) *Food, Formula and Drug Effects on the Disposition of Nutrients*. Wld. Rev. Nutr. Diet., 43:80-94.
- ROE, D.A. (1984b) *Therapeutic Significance of Drug-Nutrient Interactions in the Elderly*. Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther., 36:109S-122S.
- ROE, D.A. (1985) *Drug Effects on Nutrient Absorption, Transport, and Metabolism*. Drug-Nutrient Interact., 4, p. 117-35.
- ROE, D.A. (1989) *Preface*. En: *Diet and Drug Interactions*. (ROE, D.A., Ed.) AVI. New York. p. 1.
- ROGERS, Q.R. and LEUNG, M.B., (1973) *The Influence of Amino Acids on the Neuroregulation of Food Intake*. Fed. Proc., 32:1709-19.
- ROSE, W.C. (1931). Citado por: ROGERS, Q.R. and LEUNG, M.B., (1973) *The Influence of Amino Acids on the Neuroregulation of Food Intake*. Fed. Proc., 32:1709-19.
- ROSE, R.C., KOCH, M.J. and NAHRWOLD, D.L. (1978) *Folic Acid Transport by Mammalian Small Intestine*. Am. J. Physiol., 235:E678-E685.
- ROSENBERG, I.H. (1976) *Absorption and Malabsorption of Folates*. Clin. Haematol., 5:589-617.
- ROSENBERG, I.H. (1981) *Intestinal Absorption of Folate*. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. JOHNSON, L. (Ed). Raven, New York. p. 1221-30.
- ROSENBERG, I.H., SELHUB, J. and DHAR, G.J. (1979) *Absorption y Malabssorption of Folates*. En: *Folic Acid in Neurology, Psychiatry and Internal Medicine*. (BOTEZ, M.I. and REYNOLDS, E.H., Eds.) Raven, New York, p. 95-111.
- RUBIN, R.A., ORDOÑEZ, L.A. and WURTMAN, R.J. (1974). Citado por: BALDESSARINI, R.J. (1975) *Biological Transmethylation Involving S-Adenosylmethionine: Development of Assay Methods and Implications for Neuropsychiatry*. Int. Rev. Neurobiol., 18:41-67.
- RUIZ-ROSO CALVO DE MORA, B. (1983) *Influencia del Sistema CFR (Fritura-Congelación-Recalentamiento) sobre la Calidad Nutritiva de Proteína de Algunos Alimentos de Origen Animal*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- RUNCIE, J. (1979) *Folate Deficiency in the Elderly*. En: *Folates and Cobalamins*. (ZITTOUN, J.A. and COOPER, B.A., Eds.) (1989) Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong. p. 145-59.
- RUSSEK, M. (1971) *Hepatic Receptors and the Neurophysiological Mechanisms Controlling Feeding Behaviour*. Neurosci. Res., 4:213-82.

- RYTER, A. and KELLENBERGER, E. (1958). Citado por: SJÖSTRAND, F.S. (1967) *Embedding of Chemically Fixed Material*. En: *Electron Microscopy of Cells and Tissues*. Volume I. Academic Press. New York and London. p. 177-187.
- SABATINI, D.D., BENSCH, K. and BARNETT, R.J. (1963). Citado por: PEASE, D.C. (1964) *Fixation*. En: *Histological Techniques for Electron Microscopy*. Segunda Ed. Academic Press. New York and London. p. 34-81.
- SABRY, Z.I., SHADAREVIAN, S.B., COWAN, J.W. and CAMPBELL, J.A. (1965). Citado por: HATHCOCK, J.N. (1990) *Nutritional Modulation of Xenobiotic Metabolism; Metabolic Depletion of Nutrients by Drugs*. *J. Nutr. Biochem.*, 1:400-2.
- SAID, A.K. and HEGSTED, D.M. (1970) *Evaluation of Dietary Protein Quality in Adult Rats*. *J. Nutr.*, 100:1363-73.
- SAID, A.K., HEGSTED, D.M. and HAYES, K.C. (1974) *Response of Adults Rats to Deficiencies of Different Essential Amino Acids*. *Brit. J. Nutr.*, 31:47-57.
- SALVATORE, F., UTILI, R. and ZAPPIA, V. (1971). Citado por: BALDESSARINI, R.J. (1975) *Biological Transmethylation Involving S-Adenosylmethionine; Development of Assay Methods and Implications for Neuropsychiatry*. *Int. Rev. Neurobiol.*, 18:41-67.
- SAN FELIU, P. (1983) *Estudio Comparativo de la Digestibilidad de Grasas Culinarias Procedentes de Frituras Repetidas*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (Tesina).
- SANCHEZ BARCO, M.J. (1990) *Indices Bioquímicos en Sangre y Músculo Gastrocnemio de Ratas Sometidas a Dietas Carentes de Metionina + Cisteína y con Déficit Energético*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- SANCHEZ-JIMENEZ, F. y NUÑEZ DE CASTRO, I. (1991) *Fuentes de Aminoácidos: Transporte y Vías Centrales del Metabolismo de Aminoácidos*. En: *BIOQUÍMICA. Aspectos Estructurales y Vías Metabólicas*. Vol. I. (HERRERA, E. Ed.) Interamericana-McGraw-Hill. p.823-827.
- SARWAR, G. (1987) *Digestibility of Protein and Bioavailability of Amino Acids in Foods*. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 54:26-70.
- SATO, C. and IZUMI, N. (1989) *Mechanism of Increased Hepatotoxicity of Acetaminophen by the Simultaneous Administration of Caffeine in the Rat*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 248:1243-7.
- SAUNDERSON, L. and MACKINLAY, J. (1990) *Changes in Body-Weight, Composition and Hepatic Enzyme Activities in Response to Dietary Methionine, Betaine and Choline Levels in Growing Chicks*. *Br. J. Nutr.*, 63:339-49.
- SCHACHTER, D., (1984). Citado por: CORRALES IZQUIERDO, F. (1992) *Función de los Grupos Sulfidrilo en el Mantenimiento de la Estructura y la Actividad de la SAM en Hígado de Rata*. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.M.-Instituto de investigaciones Biomédicas, C.S.I.C., Madrid.
- SCHANNE, F.A.X., KANE, A.B., YOUNG, E.E. and FARBER, J.L. (1979) *Calcium Dependence of Toxic Cell Death: a Final Common Pathway*. *Science*, 206:700-2.

- SCHATZ, R.A. and SELLINGER, O.Z. (1975). Citado por: BALDESSARINI, R.J. (1975) *Biological Transmethylation Involving S-Adenosylmethionine: Development of Assay Methods and Implications for Neuropsychiatry*. Int. Rev. Neurobiol., 18:41-67.
- SCHLENK, F. (1983) *Metilthioadenosine*. Adv. Enzymol., 54:195-265.
- SCHULTZ, S.G. and CURRAN, P.F. (1970) *Coupled Transport of Sodium and Organic Solutes*. Physiol. Rev., 50:637-718.
- SELHUB, J. (1989) *Determination of Tissue Folate Composition by Affinity Chromatography Followed by High Pressure Ion Pair Liquid Chromatography*. Anal. Biochem., 182:84-93.
- SELHUB, J., BRIN, H. and GROSSOWICK, N. (1973) *Uptake and Reduction of Radiative Folate by Everted Sacs of Rats Small Intestine*. Eur. J. Biochem., 33:433-8.
- SELHUB, J., OSMAN, A. and ROSENBERG, I.H. (1980) *Preparation and Use of Affinity Columns with Bovine Milk Folate Binding Protein (FBP) Covalently Linked to Sepharose 4B*. Meth. Enz., 66:686-90.
- SELHUB, J., DHAR, G.J. and ROSENBERG, I.H. (1983) *Gastrointestinal Absorption of Folates and Antifolates*. Pharmacol. Ther., 20:397-418.
- SELHUB, J., DARCY-VRILLON, B. and FELL, D. (1988) *Affinity Chromatography of Naturally Occurring Folates*. Anal. Biochem., 168:247-51.
- SERRANO MOLINA, J.S. (1981) *Fármacos antitérmicos-analgésicos y antiinflamatorios*. En: *Farmacología y su proyección a la clínica*. (LORENZO-VELAZQUEZ, B. Ed.) Oteo, Madrid (13ª Ed.) p. 430.
- SHEN, W., KAMEDULIS, L.M., RAY, S.D., and CORCORAN, G.B. (1992) *Acetaminophen-induced Cytotoxicity in Cultured Mouse Hepatocytes: Correlation of Nuclear Ca²⁺ Accumulation and early DNA Fragmentation with Cell Death*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 111:242-54.
- SHEVCHUK, O.A. and ROE, D.A. (1985) *Effects of Aspirin Ingestion Upon Blood and Urina Folate Concentrations and Plasma Folate Binding*. Nutritional Pharmacology and Toxicology II. (Abstract).
- SHILS, M.E. and YOUNG, V.R. (1988). *Diet, Nutrition and Drug Reactions*. En: *Modern Nutrition in Health and Disease*. Septima Ed. p. 630-45.
- SHIM, K.F. and LEE, T.K. (1988) *Influence of Supplemented Methionine in Practical Rations for Young Growing Japanese Quail*. Nutr. Rep. Internat., 38.
- SHINDO, H., KOMAI, T. and KAWAI, K. (1977) *Mechanism of Intestinal Absorption and Brain Uptake of L-5-Hydroxytryptophan in Rats, as Compared to Those of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine*. Chem. Pharm. Bull., 25:1417-25.
- SHIVARPURKAR N. and POIRIER, L.S. (1983) *Tissue Levels of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine in Rats fed Methyl-Deficient, Amino acid-Defined Diets for One to Five Weeks*. Carcinogenesis, 4:1051-7.
- SHOTWELL, M.A., MATTES, P.M., JAYME, D.W. and OXENDER, D.L. (1982) *Regulation of Amino Acid Transport System L in Chinese Hamster Ovary Cells*. J. Biol. Chem., 257:2974-80.

- SIDRANSKY, H. and 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., 78:134-48.
- SIES, H., BRIGELIUS, R. and AKERBOOM, T.P.M. (1983). *Intrahepatic Glutathione Status*. En: *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects. Vol. I*. (LARSSON, A., HOLMGREN, A., ORRENIUS, S. and MANNEVICK Eds.) New York, Raven Press.
- SILVERMAN, M., LAW, L.W. and KAUFMAN, B. (1961). Citado por: VARELA-MOREIRAS, G., SEYOUM, E. and SELHUB, J. (1991) *Combined Affinity and Ion Pair Liquid Chromatographies for the Analysis of Folate Distribution in Tissues*. J. Nutr. Biochem., 2:44-53.
- SINGER, T.P. (1975) *Oxidative Metabolism of Cysteine and Cystine in Animal Tissues*. En: *Metabolic Pathways, Metabolism of Sulfur Compounds*. (GREENBERG, D.M., Ed) Vol. 7, Tercera Edición, Academic Press, New York., p. 535-46.
- SKOGLUND, L.A., INGEBRIGTSEN, K., NAFSTAD, I. and AALEN, O. (1986) *Efficacy of Paracetamol-Esterified Methionine Versus Cysteine or Methionine on Paracetamol-Induced Hepatic GSH Depletion and Plasma ALAT Level in Mice*. Biochem. Pharmacol., 35:3071-5.
- SMITH, C.V. and MITCHELL, J.R. (1989) *Pharmacological Aspects of Glutathione in Drug Metabolism*. En: *COENZYMES AND COFACTORS VOLUME III. GLUTATHIONE. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part B*. (DOLPHIN, D., POULSON, R. and AVRAMOVIC Eds.). Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 1-43.
- SOBEL, BESMAN and KRAMER (1949). Citado por: ALFIN-SLATER, R.B. and AFTERGOOD, L. (1987) *Lípidos*. En: *La Nutrición en la Salud y la Enfermedad. Conocimientos Actuales*. (GOODHART, R.S. and SHILLS, M.E. Ed.) Salvat Editores, S.A. Barcelona. p. 102-129.
- SOLM, A. y MENDEN, B. (1983) *Efectos de los Medicamentos sobre la Biodisponibilidad de los Nutrientes*. Información sobre Vitaminas-Actualización Médica. Roche, S.A.
- STEINBERG, S.E. (1984). Citado por: GREGORY III, J.F. (1989) *Chemical and Nutritional Aspects of Folate Research: Analytical Procedures, Methods of Folate Synthesis, Stability, and Bioavailability of Dietary Foliates*. En: *Advances in Food and Nutrition Research*. (KINSELLA, J.E., Ed.), Vol. 33, Academic Press, Inc., San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 1-101.
- STIPANUK, M.H. (1986) *Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids*. Ann. Rev. Nutr., 6:179-209.
- STRAMENTINOLI, G., PEZZOLI, C. and GALLI-KENLE, M. (1987) *Protective Role of S-Adenosyl-L-Methionine against Acetaminophen Induced Mortality and Hepatotoxicity in Mice*. Biochem. Pharmacol., 28:3567-71.
- STRUM, W.B. (1979) *Enzymatic Reduction and Methylation of Folate Following pH-dependent, Carrier-mediated Transport in Rat Jejunum*. Biochim. Biophys. Acta., 554:249-57.
- STRUM, W.B. (1981) *Characteristics of the Transport of Pteroylglutamate and Amethopterin in Rat Jejunum*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 216:329-33.
- SULLIVAN, D.M. and HOFFMAN, J.L. (1983) *Fractionation and Kinetic Properties of Rat Liver and Kidney Methionine Adenosyltransferase Isozymes*. Biochemistry, 22:1641-5.

- SURTEES, R. and HYLAND, K. (1990) *L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (Levodopa) Lowers Central Nervous System S-Adenosylmethionine Concentrations in Humans*. J. Neurol. Neurosurg. Psych., 53:569-72.
- SWAINGOOD, H.A. and CATIGNANI, G.L. (1991) *Protein Digestibility: In vitro Methods of Assessment*. Adv. Food Nutr. Res., 35:185-236.
- SWEDISH DRUG STATISTIC (1987). Citado por: EGGEN, A.E. (1993) *The Tromsø Study: Frequency and Predicting Factors of Analgesic Drug Use in Free-Living Population (12-56 Years)*. J. Clin. Epidemiol., 46:1297-304.
- SWEET, R.D. and McDOWELL, F.H. (1975). Citado por: CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. (1991) *Fármacos para la Enfermedad de Parkinson, Espasticidad y Espasmos Musculares Agudos*. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición. (GOODMAN and GILMAN Eds.) Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Buenos Aires, Caracas, Madrid, Santiago de Chile, Sao Paulo. p. 458-78.
- SZANTAY (1971). Citado en: GALIANA, A. (1987) *Situación actual en el Tratamiento Farmacológico de las Hepatopatías*. En: *Aspectos Bioquímicos y Farmacológicos en Disfunciones Hepáticas*. Curso Monográfico. (CASCALES, M. y FERRANDIZ, F.) Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. p. 59-84.
- TABOR, C.W. and TABOR, H., (1984) *Polyamines*. Ann. Rev. Biochem., 53:749-90.
- TANIGUCHI, M., HIRAYAMA, K., YAMAGUCHI, K., TATEISHI, N. and SUZUKI, M. (1989) *Nutritional Aspects of Glutathione Metabolism and Function*. En: *COENZYMES AND COFACTORS VOLUME III. GLUTATHIONE. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part B*. (DOLPHIN, D., POULSON, R. and AVRAMOVIC Eds.). Wiley Interscience. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 645-727.
- TANNER, C., GOETZ, D. and KLANANAS, H. (1987). *Autonomic Nervous System Disorders*. En: *Handbook of Parkinson's Disease*. Ed. W Koller, New York:Marcel Dekker. p. 152-69.
- TAUFEEK, H.R. and BONE, A.H. (1980) *Influence of Exogenous L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-dopa) on the Methionine and S-Adenosylmethionine Concentrations in the Brain and Other Tissues*. Biochem. Soc. Trans., 8:62-3.
- THURSTON, J.H., POLLOCK, P.G. and WARREN, S.K. (1970) *Reduced Brain Glucose with Normal Plasma Glucose in Salicylate Poisoning*. J. Clin. Invest., 49:2139.
- TOMARELLI, MEYER, WAEBER and BERNHART (1968). Citado por: ALFIN-SLATER, R.B. and AFTERGOOD, L. (1987) *Lípidos*. En: *La Nutrición en la Salud y la Enfermedad. Conocimientos Actuales*. (GOODHART, R.S. and SHILLS, M.E. Ed.) Salvat Editores, S.A. Barcelona. p. 102-129.
- UITTI, R.J., AHLKOG, J.E., MARAGANORE, D.M., MUEENTER, M.D., ATKINSON, E.J., CHA, R.H. and O'BRIEN, P.C. (1993) *Levodopa Therapy and Survival in Idiopathic Parkinson's Disease: Olmsted County Project*. Neurology, 43:1918-26.
- UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES UNIDAS (1980). *Nutritional Evaluation of Protein Foods*. (PETER, L. and YOUNG, V.R., Eds.). Tokio.

- VALE, J.A., MEREDITH, T.J. and GOULDING, R. (1981). En: MEREDITH, T.J., PRESCOTT, L.F. and VALE, J.A. (1986) *Why Do Patients Still Die From Paracetamol Poisoning?* Br. Med. J. [Clinical Res], 293:345-6.
- VARDI, J., OBERMAN, Z., REBEY, I., STEIFER, M., AYALON, D. and HERABERG, M. (1976) *Weight Loss in Patients Treated with Long Term Levodopa* J. Neurol. Sci., 30:33-40.
- VARELA, G. (1963) *Estudio Comparativo de la Digestibilidad Verdadera del Aceite de Oliva con otras Grasas*. Ars. Pharma., III, p. 1-12.
- VARELA, G. y MURILLO, A. (1975) *Repercusiones del Aceite de Oliva y otras Grasas Alimentarias sobre el Proceso que Determina su Utilización Digestiva*. Libro del II Congreso Internacional sobre el Valor Biológico del Aceite de Oliva. Torremolinos (Málaga).
- VARELA, G., MOREIRAS-VARELA, O., RUIZ-ROSO, B. and CONDE, R. (1986) *Influence of Repeated Frying on the Digestive Utilization of Various Fats*. J. Sci. Food Agric., 37:487-90.
- VARELA, G., BOZA, J. y MURILLO, A. (1970) *Factores que Afectan a la Utilización Nutritiva de la Proteína*. Cuad. Nutr. Granada, 1:7-52.
- VARELA-MOREIRAS, G. (1989) *Influencia del Consumo Crónico de Paracetamol sobre algunos Aspectos de la Utilización Nutritiva de la Dieta en Ratas Normales y con Desnutrición Proteica Experimental*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- VARELA-MOREIRAS, G.; RUIZ-ROSO, B. y VARELA, G. (1988) *Influencia del Consumo Crónico de Paracetamol sobre algunos Parámetros Nutricionales en la Rata*. Nutr. Clin. 8:144-50.
- VARELA-MOREIRAS, G., RUIZ-ROSO, B. y VARELA, G. (1990a) *Interacción del Paracetamol Consumido Crónicamente con la Utilización Nutritiva de la Proteína en Ratas: Influencia de dos Niveles Dietéticos de Proteína*. Nutr. Clin., 10:8-14.
- VARELA-MOREIRAS, G.; RUIZ-ROSO, B. y VARELA, G. (1990b) *Utilización Digestiva de la Grasa y Consumo Crónico de Paracetamol en Ratas: Influencia de dos niveles dietéticos de proteína*. Farm. Clin., 7, p. 51-54.
- VARELA-MOREIRAS, G., RUIZ-ROSO, B. and VARELA, G. (1991a) *Effects of Long-Term Administration of Acetaminophen on the Nutritional Utilization of Dietary Protein*. Ann. Nutr. Metabol., 35:303-8.
- VARELA-MOREIRAS, G., SEYOUM, E. and SELHUB, J. (1991b) *Combined Affinity and Ion Pair Liquid Chromatographies for the Analysis of Folate Distribution in Tissues*. J. Nutr. Biochem., 2, p. 44-53.
- VARELA-MOREIRAS, G. and SELHUB, J. (1992) *Long-Term Folate Deficiency Alters Folate Content and Distribution Differentially in Rat Tissues*. J. Nutr., 122:986-91.
- VARELA-MOREIRAS, G., SELHUB, J., DACOSTA, K.A. and ZEISEL, S.H. (1992) *Effect of Chronic Choline Deficiency in Rats on Liver Folate Content and Distribution*. J. Nutr. Biochem., 3:519-22.
- VELU, J. G., SCOTT, H.M. and 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., 102:741-8.

- VENERO, J.L., HERRERA, A.J., MACHADO, A. and CANO, J. (1992) *Changes in Neurotransmitter Levels Associated with the Deficiency of some Essential Amino Acids in the Diet*. Brit. J. Nutr., 68:409-20.
- VIÑA, J., SAEZ, G.T., RODRIGUEZ, A., PEREZ, C. and VIÑA, J.R. (1986) *Prevention of Paracetamol Hepatotoxicity in Rats and Mice; Effect of Small Amounts of Methionine*. J. Clin. Nutr. Gastroenterol., 1:217-20.
- WAGNER, C. (1985) *Folate-binding Proteins*. Nutr. Rev., 43:293-99.
- WALDMANN, T.A. (1977). Citado por: LINDER, M.C. (1988a) *Nutrición y Metabolismo de las Proteínas*. En: *Nutrición. Aspectos Bioquímicos, Metabólicos y Clínicos*. (LINDER, M.C. Ed.) EUNSA. Pamplona, p. 81-100.
- WALTER-SACK, I. (1987a) *The Influence of Nutrition on the Systemic Availability of Drugs. Part I: Drug Absorption*. Klin. Wochenschr., 65:927-35.
- WALTER-SACK, I. (1987b) *The Influence of Nutrition on the Systemic Availability of Drugs. Part I: Drug Metabolism and Renal Excretion*. Klin. Wochenschr., 65:1062-72.
- WATSON (1958). Citado por: PEASE, D.C. (1964) *Staining*. En: *Histological Techniques for Electron Microscopy*. Segunda Ed. Academic Press. New York and London. p. 234-5.
- WAXMAN, M., DURFEE, D., MOORE, M., MORANTZ, R. and KOLLER, W. (1990) *Nutritional Aspects and Swallowing Function of Patients with Parkinson's Disease*. Nutr. Clin. Pract., 5:196-9.
- WEISSBACH, L., HANDLOGTEN, M.E., CHRISTENSEN, H.N. and KILLBERG, M. (1982) *Evidence for two Sodium-Independent Neutral Amino Acid Transport Systems in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. Time-Dependent Changes in Activity*. J. Biol. Chem., 257:12006-11.
- WELLING, P.G. (1977) *Influence of Food and Diet on Gastrointestinal Drug Absorption: A Review*. J. of Pharmacok. Biopharm., 5:291-334.
- WELLING, P.G. (1985) *Nutrient Effects on Drug Metabolism and Action in the Elderly*. Drug-Nutrient Interact., 4:173-207.
- WHITTAM, R. and WHEELER, K.P. (1970) *Transport Across Cell Membranes* Annu. Rev. Physiol., 32:21-60.
- WILLIAMS, R.T. (1978) *Nutrient in Drug Detoxification Reactions*. En: *Nutrition and Drug Interrelations*. (HATHCOCK, J.N. and COON, J. Eds.) Academic Press. New York, San Francisco, Londres. p. 303-18.
- WONG, B.K. and CORCORAN, G.B. (1987) *Effects of Esterase Inhibitors and Buthionine Sulfoximine on the Prevention of Acetaminophen Hepatotoxicity by N-Acetylcysteine*. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 55:397-408.
- WONG, L.T., WHITEHOUSE, L.W., SOLOMONRAJ, G. and PAUL, C.J. (1981) *Pathways of Disposition of Acetaminophen Conjugates in the Mouse*. Toxicol. Lett., 9:145-51.
- WOODCOCK, B.G. and WOOD, G.C. (1971). En: *Modern Nutrition in Health and Disease*. (SHILS, M.E. and YOUNG, V.R., Eds.) Septima Ed. p. 630-45.

- WURTMAN, R.J. and ROSE, C.M. (1970) *L-Dihydroxyphenylalanine: Effect on S-Adenosylmethionine in Brain*. Science, 169:395-7.

- WURTMAN, R.J., CHOU, C. and ROSE, C.M. (1970a). Citado por: ORDOÑEZ, L.A. and WURTMAN, R.J. (1974) *Folic Acid Deficiency and Methyl Group Metabolism in Rat Brain: Effects of L-Dopa*. Arch. Biochem. Biophys., 160:372-6.

- WURTMAN, R.J., ROSE, C.M., MATTHYSSE, S., STEPHENSON, G. and BALDESSARINI, R. (1970b). Citado por: ORDOÑEZ, L.A. and WURTMAN, R.J. (1974) *Folic Acid Deficiency and Methyl Group Metabolism in Rat Brain: Effects of L-Dopa*. Arch. Biochem. Biophys., 160:372-6.

- YAHR, M.D. (1978). Citado por: CEBARDAUM, J.M. y SCHLEIFER, L.S. (1991) *Fármacos para la Enfermedad de Parkinson, Espasticidad y Espasmos Musculares Agudos*. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición. (GOODMAN and GILMAN Eds.) Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Buenos Aires, Caracas, Madrid, Santiago de Chile, Sao Paulo. p. 458-78.

- YAMASHITA, K. and ASHIDA, K. (1969). Citado por: SAID, A.K., HEGSTED, D.M. and HAYES, K.C. (1974) *Response of Adults Rats to Deficiencies of Different Essential Amino Acids*. Brit. J. Nutr., 31:47-57.

- YOSHIKAWA, T. (1993) *Free Radicals and Their Scavengers in Parkinson's Disease*. Eur. Neurol., 33 (Suppl. 1):60-8.

- YOUNG, V.R. and PELLET, P.L. (1987) *Protein Intake and Requirements with Reference to Diet and Health* Am. J. Clin. Nutr., 45:1323-43.

- YOUNG, V.R., WAGNER, D.A., BURINI, R. and STORCH, K.J. (1991) *Methionine Kinetics and Balance at the 1985 FAO/WHO/UNU Intake Requirements in Adult Men Studied with L- 3 H $_3$ -Methyl-1- 13 C]Methionine as a Tracer*. Am. J. Clin. Nutr., 54:377-85.

- ZAMENHOF, S., HALL, S.M., GRAUEL, L., VAN MARTHENS, E. and DONAHUE, M.J. (1974) *Deprivation of Amino Acids and Prenatal Brain Development in Rats*. J. Nutr., 104:1002-7.

- ZIMMERMAN, J., SELHUB, J. and ROSENBERG, I.H. (1985) *Drug-folate Interactions in Intestinal Folate Absorption: Comparison of Sulfasalazine, Phenytoin and Salicylates*. Gastroenterology, 88:1643. (Abstr).

Presidente:

Dr. G. Varela

Vocales:

Dr. A. Repetto

Dr. L. Zamboni

Dr. C. Albano

Secretario:

Dr. E. Palacios

Resolvido, en el día de hoy, el Tribunal que al

momento se compone, para juzgar este tema doctoral,

acordó por unanimidad el calificarla

de Apto. con la nota

Madrid, 27 de Junio de 1996,

El Secretario del Tribunal:

[Firma]