

**TESIS DOCTORAL
JOSEFA RUBIO MAÑAS**

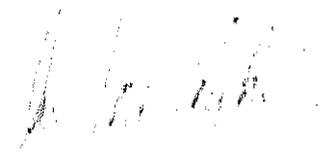
**EFFECTOS DE DIETAS CARENTES EN METIONINA, CISTEÍNA Y ENERGÍA
SOBRE EL METABOLISMO PROTEICO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO DE
RATA.**

DIRECTOR: DR. D. JOSÉ LUIS REY DE VIÑAS RODRIGUEZ.

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

1994

EFFECTOS DE DIETAS CARENTES EN METIONINA, CISTEÍNA Y ENERGÍA SOBRE
EL METABOLISMO PROTEICO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATA.



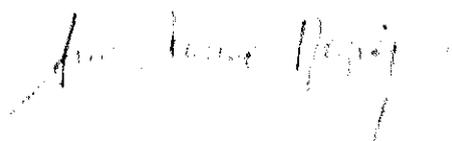
JOSEFA RUBIO MAÑAS
ASPIRANTE AL GRADO DE DOCTORA EN FARMACIA

DIRECTOR



Fdo. De. D. JOSÉ LUÍS REY DE VIÑAS

Vº Bº DEL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO



FDO: Dra. Dña. ANA Mª REQUEJO MARCOS

Este trabajo pertenece al Proyecto N° ID 803 titulado "Índices de malnutrición proteica en algunos órganos de rata por déficit dietario de aminoácidos esenciales", subvencionado por la Comisión Internacional de Ciencia y Tecnología.

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

En primer lugar al Director de la misma, Dr. José Luis Rey de Viñas Rodríguez, por su eficaz dirección, ayuda y comprensión en todo momento.

A la Dra. Ana M^a Requero, Directora del Departamento de Nutrición, por su entusiasmo.

Al Profesor Gregorio Varela por dedicar su esfuerzo a la investigación de la Nutrición.

A las Dras. Emilia Muñoz y M^a Teresa Unzaga, por su colaboración en el proyecto del que forma parte este trabajo. A Angel y a Elvira.

A Santiago Torrado por su ayuda en la determinación del turnover proteico.

Agradezco a Carmen Bravo, Centro de Cálculo de la U.C.M., su asesoramiento estadístico.

A Susana, Ángeles, Mara, M^a Carmen y Manolo, con los que he podido contar en todo momento.

A la Escuela Técnica de Enseñanzas Especializadas, que me ha brindado todas las facilidades para la finalización de este trabajo, y a los amigos y compañeros.

A mis padres, que siempre y sin reservas me han apoyado y ayudado en todos los proyectos que he iniciado en mi vida, aún en los momentos más difíciles.

Por último, quiero dar las gracias de modo especial a José Pascua y a Ricardo Prada por la ayuda y la amistad que me han prestado, especialmente en la impresión de esta tesis.

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

A mis padres y hermanos.

ÍNDICE

1. OBJETO	1
2. SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Turnover proteico. Naturaleza y regulación fisiológica	4
2.1.1. La naturaleza del turnover proteico	4
2.1.2. Síntesis proteica y regulación	4
2.1.2.1. Mecanismos de la síntesis proteica	4
2.1.2.1.1. Naturaleza y formación del aparato sintético de la célula	5
a) RNA mensajero	5
b) Ribosomas	5
c) RNA transferente	5
2.1.2.1.2. Reacciones que incluye la síntesis proteica	6
2.1.2.2. Regulación de la síntesis proteica	7
2.1.2.2.1. Regulación de la síntesis proteica en el músculo	9
2.1.2.2.1.1. Consideraciones generales	9
2.1.2.2.1.2. Regulación de la actividad ribosomal	10
a) Insulina y T ₃	10
b) Glucocorticoides	11
2.1.2.2.1.3. Regulación del contenido en ribosomas	12
2.1.3. Degradación proteica y regulación	13
2.1.3.1. El mecanismo de la degradación proteica	13
2.1.3.1.1. Lisosomas	14
2.1.3.1.1.1. Características generales del sistema lisosomal	14
2.1.3.1.1.2. Actividad proteolítica de los enzimas lisosomales.	
Hidrolasas peptídicas lisosomales	15
2.1.3.1.2. Proteasomas	16
2.1.3.1.3. Calpainas	16
2.1.3.1.4. Ruta mediada por la ubiquitina	17
2.1.3.2. Regulación de la degradación proteica en músculo	18
2.1.3.2.1. Cambios adaptativos en la degradación proteica	18
2.1.3.2.2. Mecanismos de regulación intracelulares	20
2.1.3.2.2.1. Calcio	20
2.1.3.2.2.2. Prostaglandinas	20

2.2. Medida de las tasas de síntesis proteica y de catabolismo	21
2.2.1. Excreción renal de la 3-metil-histidina	22
2.2.1.1. 3-Metil-histidina y turnover proteico muscular	24
2.2.1.2. Derivados de aminoácidos relacionados con el turnover proteico	26
a. No forma el aminoacil-RNAi	27
b. Excreción cuantitativa de 3-metil-histidina por orina	27
c. Distribución de la 3-metil-histidina unida a proteínas	28
2.2.1.3. Aplicaciones de la excreción de 3-metil-histidina al estudio del turnover proteico muscular. Energía dietaria e ingesta de proteínas	30
2.2.1.4. Comparación del catabolismo proteico muscular en ratas y en humanos	32
2.3. Balance de N y equilibrio dinámico	33
2.3.1. Balance de N	34
2.3.2. Equilibrio dinámico	35
2.3.3. Nutrición proteico - energética y balance de nitrógeno	35
2.4. Malnutrición proteico energética	37
2.4.1. Síntomas del marasmo	37
2.4.2. Síntomas del kwashiorkor	38
2.4.3. Desórdenes metabólicos y bioquímicos debidos a la malnutrición proteico-calórica	38
2.4.3.1. Composición corporal	38
2.4.3.2. Metabolismo general	38
2.4.3.3. Metabolismo proteico	40
2.4.3.4. Metabolismo lipídico	40
2.4.3.5. Metabolismo de los hidratos de carbono	40
2.4.3.6. Electrolitos y metabolismo líquido	40
2.4.3.7. Efectos de la malnutrición proteico energética sobre el turnover proteico	41
2.4.3.7.1. Efectos de la malnutrición proteico-energética sobre las tasas de síntesis y catabolismo de la proteína muscular	41
2.4.3.7.2. Cambios en la eliminación de 3-metil-histidina	41

2.4.3.7.3. Cambios en la tasa de síntesis de las fracciones proteicas musculares	42
2.4.3.8. Efecto de la malnutrición sobre el contenido de DNA y sobre la síntesis por unidad de DNA	43
2.4.3.9. Efecto de la malnutrición sobre el contenido de RNA y sobre la síntesis por unidad de RNA	44
2.5. Regulación endocrina del catabolismo proteico muscular	46
2.5.1. Hormona del crecimiento	46
2.5.1.1. Factores que afectan la secreción de la hormona del crecimiento	47
2.5.2. Insulina	48
2.5.2.1. Efectos de la insulina en el hígado	49
2.5.2.2. Efectos de la insulina en el músculo	50
2.5.2.3. Efectos de la insulina en el tejido adiposo	51
2.5.3. Glucagón	51
2.5.3.1. Acción del glucagón	52
2.5.4. Somatostatina	53
2.5.5. Catecolaminas	53
2.5.5.1. Acciones indirectas de las catecolaminas sobre el metabolismo	53
2.5.5.2. Acciones directas de las catecolaminas sobre el metabolismo	54
2.5.6. Corticoides	56
2.5.6.1. Acciones de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los hidratos de carbono	57
2.5.6.2. Acciones de los glucocorticoides sobre el metabolismo del glucógeno	59
2.5.6.3. Acciones de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los lípidos	60
2.5.6.4. Acciones de los glucocorticoides sobre el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos	61
2.5.7. Hormonas tiroideas	62

2.6. Adaptación nutricional	63
2.6.1. Generalidades	63
2.6.2. Adaptaciones metabólicas a dietas alteradas en proteínas y aminoácidos	64
2.6.2.1. Adaptación nutricional celular	64
2.6.2.1.1. Aspectos transcripcionales y traduccionales de la síntesis proteica	66
2.6.2.1.2. Degradación proteica	67
2.6.2.1.3. Oxidación de aminoácidos	68
2.6.2.1.4. Enzimas del ciclo de la urea	69
2.6.3. Aspectos del metabolismo de aminoácidos in vivo	71
2.6.3.1. Mecanismos de adaptación en malnutrición en relación con el metabolismo de aminoácidos	78
2.6.3.1.1. Aminoácidos de cadena ramificada	79
2.6.3.1.2. Producción de alanina en el músculo	80
2.6.3.1.3. Conversión de aminoácidos en glutamina en el músculo	82
 3. MATERIAL Y MÉTODOS	 84
3.1. Diseño experimental	85
3.2. Elaboración de las dietas	87
3.2.1. Ingredientes de las dietas	87
3.2.2. Mezcla mineral	88
3.2.3. Mezcla vitamínica	88
3.2.4. Mezcla de aminoácidos	89
3.3. Toma de muestras	90
3.3.1. Orina y heces	90
3.3.2. Sangre y órganos	90
3.3.2.1. Sangre	90
3.3.2.2. Órganos	90

3.3.3. Preparación de las muestras	91
3.3.3.1. Determinaciones de proteínas y actividades enzimáticas	91
3.3.3.2. Determinaciones en sangre	91
3.4. Técnicas analíticas	91
3.4.1. Balance de nitrógeno	91
3.4.2. Proteínas solubles en homogenado de músculo gastrocnemio	92
3.4.3. Catabolismo miofibrilar	93
3.4.3.1. Proteína miofibrilar	93
3.4.3.2. 3-Metil-histidina en músculo	94
3.4.3.3. 3-Metil-histidina en orina	94
3.4.3.4. Determinación de la ganancia y tasa fraccional de ganancia de la proteína miofibrilar	94
3.4.3.5. Determinación del catabolismo, tasa fraccional catabólica y vida media de la proteína miofibrilar	95
3.4.3.6. Determinación de la síntesis proteica y de la tasa fraccional de síntesis de la proteína miofibrilar	96
3.4.4. Determinación del DNA	96
3.4.5. Determinación del RNA	97
3.4.6. Determinación de la fosfatasa ácida	97
3.4.7. Determinación de la fosfatasa alcalina	98
3.4.8. Determinación de la desoxirribonucleasa ácida	99
3.4.9. Determinación de la ribonucleasa ácida	100
3.4.10. Determinación de β -D-glucuronidasa	101
3.4.11. Determinación de la glutamato-oxalacetato-transaminasa	102
3.4.12. Determinación de la glutamato-piruvato-transaminasa	102
3.4.13. Determinación de urea en plasma	103
3.4.14. Glucosa plasmática	104
3.4.15. Insulina	105
3.4.16. Proteínas totales en plasma	106
3.4.17. Determinación de aminoácidos	106
3.4.17.1. Reactivos y estándar de aminoácidos	107
3.4.17.1.1. Eluyentes	107
3.4.17.1.2. Preparación de la solución derivatizante Ortoptalaldehído / 2-mercaptoetanol	108
3.4.17.1.3. Derivatización de aminoácidos con OPA	108
3.4.17.1.4. Solución estándar de aminoácidos y estándar interno	108
3.4.17.1.5. Soluciones coadyuvantes	109

3.4.17.1.6. Proceso de derivatización	109
3.4.17.1.7. Método del estándar interno	110
3.4.17.2. Sistema cromatográfico	111
3.4.18. Creatinina en orina	112
3.4.19. Tratamiento estadístico	112
4. RESULTADOS	114
5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	203
5.1. Ingesta	203
5.2. Peso corporal	204
5.3. Peso del músculo gastrocnemio	204
5.4. Índice miosomático	206
5.5. Ingesta de nitrógeno	207
5.6. Balance de nitrógeno, urea y creatinina en orina	207
5.7. Masa muscular y porcentaje del músculo respecto al peso corporal	209
5.8. Nitrógeno y proteínas solubles en músculo	209
5.9. % de la proteína miofibrilar, nitrógeno de la proteína miofibrilar, proteína miofibrilar por kg de peso, N miofibrilar/N total	210
5.10. 3-Metil-histidina en músculo y en orina	211
5.11. Síntesis, catabolismo, tasa fraccional de síntesis, tasa fraccional catabólica y vida media de la proteína miofibrilar	212
5.12. Ganancia de la proteína miofibrilar y tasa fraccional de ganancia de dicha proteína/kg de peso	214

5.13. Glucosa e insulina en plasma	215
5.14. Urea y nitrógeno ureico en plasma	216
5.15. Variaciones en el DNA, relación proteínas/DNA, número de núcleos, tamaño celular y actividad DNAsa ácida en músculo gastrocnemio	217
5.16. Variaciones en el RNA (mg/órgano), RNA/DNA, RNA/proteína y actividad RNAsa ácida en músculo gastrocnemio	218
5.17. Actividades enzimáticas de las hidrolasas: fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y B-glucuronidasa en músculo gastrocnemio	219
5.18. Efecto sobre las actividades enzimáticas transaminasas: GPT y GOT	220
5.19. Efecto de la carencia de metionina + cisteína y metionina + cisteína con $\frac{1}{2}$ de energía sobre las concentraciones de aminoácidos libres en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	221
5.19.1. Aminoácidos de cadena ramificada (AAR)	222
5.19.2. Aminoácidos gluconeogénicos	224
5.19.2.1. Ácido aspártico y asparragina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	224
5.19.2.2. Ácido glutámico y glutamina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	226
5.19.2.3. Serina, glicina y treonina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	228
5.19.2.4. Alanina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	229
5.19.3. Aminoácidos aromáticos	232
5.19.3.1. Tirosina	232
5.19.3.2. Triptófano	233
5.19.3.3. Fenilalanina	233

5.19.4. Suma de aminoácidos aromáticos, neutros y relación AAR/AAA en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	234
5.19.4.1. Suma de aminoácidos aromáticos en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	234
5.19.4.2. Suma de aminoácidos neutros en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	235
5.19.4.3. Relación AAR/AAA en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	235
5.19.5. Aminoácidos básicos y azufrados libres en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	235
5.19.5.1. Arginina	235
5.19.5.2. Histidina	236
5.19.5.3. Aminoácidos azufrados	237
5.19.6. Sumas de aminoácidos esenciales, no esenciales y totales en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	237
5.19.7. Relaciones bioquímicas aminoacídicas en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	239
5.19.7.1. Ile/AAN-Ile, Leu/AAN-Leu, Val/AAN-Val en plasma y glóbulos rojos	239
5.19.7.2. Phe/AAN-Phe, Tyr/AAN-Tyr, Phe/Tyr en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	239
5.19.7.3. Ala/tyr, Ala/leu, Ala/AAR en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	240
5.19.7.4. Serina + glicina + alanina/AAR y glicina/valina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio	240
6. CONCLUSIONES Y RESUMEN	241
6.1. Conclusiones	242
6.2. Resumen	246
7. BIBLIOGRAFÍA	247

OBJETO

La dieta deficitaria en un aminoácido esencial suministrada a animales origina pérdida de N corporal y varía según el aminoácido omitido. Así, SAID y HEGSTED (1970) indican que las dietas privadas de aminoácidos azufrados, isoleucina y treonina eran las causantes de la mayor pérdida de nitrógeno corporal, comparable a una dieta privada de proteína. BENDER (1975) incluye también en esta pérdida al aminoácido valina.

Parece ser que la extensión de la pérdida de N corporal debido a una deficiencia de aminoácidos esenciales en la dieta depende de los aminoácidos endógenos limitantes, que son importantes precursores de las proteínas sintetizadas de novo en condiciones deficitarias de los mismos. La metionina y la treonina son los primeros aminoácidos limitantes endógenos y la suplementación a una dieta sin proteína tiene un efecto ahorrador de N, según afirman YOKOGOSHI y YOSHIDA (1976). En contraste a lo estipulado, la menor pérdida de N corporal se produce con dietas carentes en histidina o lisina, como indican PENG (1979) y OUSTERHOUT (1960), respectivamente.

En esta tesis el aminoácido esencial metionina es el que se ha omitido en la dieta, así como la cisteína, ya que reduce los requerimientos de metionina (ROSE, 1955). La metionina es el aminoácido iniciador de la síntesis proteica, por lo que su carencia afectará directamente a la utilización en la síntesis proteica de los demás aminoácidos y a la desviación de los mismos hacia otras rutas metabólicas, actuando de modo similar a una deficiencia proteica. Así mismo, la carencia dietaria de la metionina y la cisteína provocarán una reutilización de estos dos aminoácidos constituyentes de las proteínas corporales, lo que se reflejará en las variaciones del catabolismo y ganancia proteica.

La carencia de los aminoácidos azufrados metionina y cisteína se une con una deficiencia energética y se utiliza como modelo experimental para provocar una malnutrición proteica y proteico-energética.

El objetivo concreto de esta tesis es el estudio del turnover proteico muscular y la posible adaptación del mismo a dietas carentes en metionina y cisteína y esta dieta con la mitad de energía, en relación con algunos parámetros, principalmente aminoácidos libres en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio, para obtener índices de malnutrición proteico-calórica con fines de pronóstico en estados de malnutrición humana subclínica.

**SITUACIÓN
BIBLIOGRÁFICA**

2.1. TURNOVER PROTEICO, NATURALEZA Y REGULACION FISIOLÓGICA.

2.1.1. LA NATURALEZA DEL TURNOVER PROTEICO.

El turnover proteico es la degradación y la reposición continua de las proteínas del organismo. Desde que SCHOENHEIMER (1939) demostró este proceso, se ha avanzado en la investigación de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en él y su regulación.

En todas las células, según MILLWARD y BATES (1981), existe un sistema degradativo, necesario para que se produzcan reacciones que son indispensables para la supervivencia del organismo. Así, se distingue la *degradación específica*, que incluye la degradación de proteínas erróneas en las células procarionticas y eucarióticas, la degradación de proteínas exógenas que se han introducido en las células y la degradación de la proteína en el músculo, necesarias para poder ser utilizadas como fuente energética durante el ayuno; y la *degradación no específica*, que actúa sobre las proteínas que se forman o degradan sin razón justificada y que regula, posiblemente, los procesos específicos anteriormente citados.

Como ejemplo de cómo la regulación del turnover proteico se encuentran el hígado y el músculo (WATERLOW y col., 1978a; MILLWARD, 1980a). Consideran que la degradación y la síntesis proteica en el hígado refleja de forma primaria el estado catabólico o anabólico general del organismo, consecuencia de las modificaciones dietarias. Por el contrario, en el músculo, tanto la síntesis como la degradación proteica pueden ir acompañadas de cambios adaptativos, que se manifiestan, paradójicamente, con un aumento en el catabolismo proteico muscular en una situación anabólica general y con una disminución del mismo en una situación catabólica (MILLWARD, 1980a).

2.1.2. SÍNTESIS PROTEICA Y REGULACIÓN.

2.1.2.1. Mecanismos de la síntesis proteica.

Generalmente se estudia la síntesis proteica en células procarionticas, pero los mecanismos que ocurren en la célula animal son similares. Se distinguen en la síntesis proteica dos etapas: La formación de los componentes del aparato ribosomal para la síntesis de proteínas y las reacciones por las que estos componentes interaccionan para formar proteínas.

2.1.2.1.1. Naturaleza y formación del aparato sintético de la célula.

La síntesis proteica tiene lugar en el citoplasma celular e implica interacciones entre los ribosomas, el RNA mensajero (RNAm), el RNA transferente (RNA_t), de aminoácidos, ATP, GTP, diferentes enzimas y factores. La síntesis de todos los tipos de RNA en las células animales tiene lugar en el núcleo. Después de la síntesis estas moléculas se procesan en mayor o menor grado, antes de ser transportadas al citoplasma para intervenir en la síntesis proteica.

a) RNA mensajero.

Las moléculas de RNA mensajero llevan el mismo código genético del DNA, especificando el orden en que se incorporan los aminoácidos en las proteínas. El RNAm es fabricado en el núcleo de la célula, en la región conocida como nucleoplasma.

Las moléculas de RNAm siempre se encuentran unidas a proteínas *in vivo*, aunque la población de proteínas cambia durante la vida del RNA. No se conoce con detalle la función de ellas (MILLWARD y col., 1983).

b) Ribosomas.

Son orgánulos citoplasmáticos formados por RNA ribosómico y proteínas, y forman una matriz sobre la que se realiza la síntesis de proteínas. Están formados por dos subunidades, una grande (60S) y otra pequeña (40S). En la mayoría de las etapas de la síntesis proteica las dos subunidades están unidas formando un ribosoma monomérico de 80S. Sin embargo, los ribosomas 80S se disocian bajo diferentes condiciones, lo que lleva a un intercambio de subunidades entre ellos.

Los ribosomas se originan en el núcleo, en la región conocida como nucleólo, lugar diferente del que se sintetiza el RNAm.

c) RNA transferente.

El RNA transferente tiene un peso molecular de alrededor de 25000. Todos tienen una estructura básica similar en forma de hoja de trébol, con dos lugares de unión. El primer lugar de unión se halla en el extremo 3' de la molécula, y sólo se unen ahí determinados aminoácidos por enzimas específicos, y el segundo es una secuencia de bases que se une específicamente a la secuencia de tres bases

complementarias del RNAm (conocidas como codon) que dirige la inserción de un aminoácido particular en la proteína (WATSON, 1971).

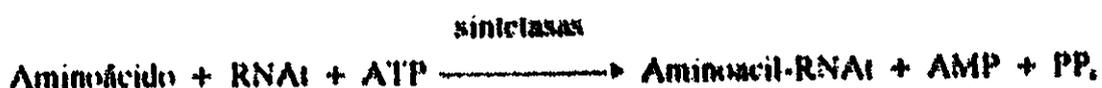
2.1.2.1.2. Reacciones que incluye la síntesis proteica.

La síntesis proteica y su regulación se considera, generalmente, dividida en dos etapas. En primer lugar la transcripción, que es la síntesis de RNA complementario al DNA genético; y en segundo lugar la traducción, que comprende las reacciones de síntesis proteica específica realizadas por el RNA.

La unidad básica de traducción se llama polisoma, que es una molécula de RNAm traducido por un número de ribosomas moviéndose simultáneamente a lo largo de él. La traducción se puede dividir en tres fases:

1. **Iniciación:** Es la unión del ribosoma al RNAm y la preparación para la síntesis del primer péptido.
2. **Elongación:** Movimiento del ribosoma a lo largo de la cadena de RNAm según se van incorporando los aminoácidos en la cadena peptídica que se está formando.
3. **Terminación:** La síntesis se completa, y se separan del RNAm el péptido recientemente sintetizado y el ribosoma.

Además, cada aminoácido debe estar unido a un RNAi específico. Este proceso necesita energía y es llevado a cabo por enzimas específicas, las aminoacil-RNAi-sintetasas, como se indica en la siguiente reacción:



2.1.2.2. Regulación de la síntesis proteica.

Las células y tejidos pueden regular la masa proteica, el contenido en proteínas específicas y la producción de las mismas, al menos en parte, por cambios en la síntesis proteica (MANCHESTER, 1975; MUNRO y col., 1975).

Desde el punto de vista funcional, en la síntesis proteica se deben considerar dos tipos de control principales:

a) *Específico*, que regula los tipos de proteína sintetizada en la célula. Esto implica cambios selectivos en las tasas de síntesis de una o más proteínas, relacionadas con las de otras proteínas de la célula. Los ejemplos más estudiados de este control son la inducción hormonal de enzimas específicos, la diferenciación celular y la producción de enzimas específicos en las células en desarrollo.

b) *General*, que regula la cantidad total de la síntesis proteica en el tejido.

En muchas situaciones de desarrollo actúan los dos tipos de control, con un aumento específico de las tasas de síntesis de enzimas especializadas que marcarán el crecimiento de la célula.

Se cree que los efectos principales sobre la síntesis de proteínas individuales o grupos de proteínas son los que influyen en la regulación de la producción de sus RNAm individuales. Esto es lo que se conoce como "control transcripcional". Por otro lado, cuando se trata de la síntesis general de proteínas, sería lógico que el control fuera realizado por una o varias reacciones comunes a la síntesis de todas las proteínas, más que depender de la disponibilidad de cada RNAm. Parece que esta es la teoría más acertada, como demuestra la evidencia de que la síntesis general de proteínas no está limitada por la disponibilidad de RNAm y puede cambiar rápidamente como respuesta a un estímulo nutricional u hormonal bajo condiciones experimentales en las que se elimina el RNAm. Esta regulación es el "control traduccional".

Se puede resumir el complejo control al que está sujeta la síntesis de proteínas en los siguientes pasos:

1. Síntesis y procesamiento de las subunidades nuevas de ribosomas en el nucléolo.
2. Eliminación de algunas partes de precursores de las subunidades ribosomales recientemente formadas.
3. Liberación de las nuevas subunidades desde el núcleo y transporte al lugar de la síntesis proteica citoplasmática.
4. Síntesis del RNA heterogéneo por la RNA polimerasa nucleoplásmica y procesamiento de esas moléculas para formar el RNAm.
5. Degradación de las moléculas de RNAm nuevas.
6. Modificaciones post-transcripcionales y liberación de las moléculas de RNAm recién formado.
7. Disociación de los ribosomas monoméricos inactivos en las subunidades nativas.
8. Unión del iniciador RNAt (Met-RNAt) a la subunidad 40S ribosomal en presencia de factores de iniciación.
9. Unión del complejo Met-RNAt + subunidad 40S a los lugares de iniciación del RNAm.
10. Unión de la subunidad ribosomal 60S al complejo iniciador.
11. Fijación de los ribosomas, subunidades o polisomas al retículo endoplasmático rugoso. Esto sólo sucede en algunos casos.
12. Aporte de aminoácidos, que pueden provenir de fuera de la célula o del reciclaje de aminoácidos a partir de la degradación de otras proteínas.
13. Aporte de RNAt específicos para cada aminoácido.
14. Aminoacilación del RNAt.
15. Elongación del polipéptido en los ribosomas ligados a la membrana y en los libres.
16. Liberación de la proteína formada, bien en el citoplasma en el caso de los ribosomas libres, bien en la luz del retículo endoplasmático rugoso los que están unidos a él, junto con la separación de los ribosomas del RNAm.
17. Separación de los ribosomas liberados en las subunidades nativas. El pool de subunidades es pequeño y relativamente constante.
18. Degradación citoplasmática del RNAm.
19. Degradación citoplasmática de los ribosomas o de las subunidades nativas.

Todos estos pasos se llevan a cabo por un control enzimático múltiple, unido a los distintos factores moduladores de la síntesis proteica.

2.1.2.2.1. Regulación de la síntesis proteica en el músculo.

2.1.2.2.1.1. Consideraciones generales.

En el adulto normal, la tasa de síntesis proteica es muy rápida (3,6%/día) y el músculo interviene en aproximadamente la mitad de la síntesis proteica total (RENNIE y col., 1982), superando en la rata este valor (MILLWARD y col. 1983).

Principalmente hay dos tipos de factores que afectan la síntesis proteica muscular. Estos son la utilización de la proteína y el estado nutricional.

La mayoría de los cambios en la síntesis proteica, más que en la degradación, son los responsables de la pérdida de masa muscular por inactividad o de hipertrofia por ejercicio. Dado que el aumento de la actividad muscular puede favorecer todos los procesos anabólicos necesarios para el crecimiento (síntesis de DNA, síntesis de RNA, síntesis de proteínas en las células musculares y en las del tejido conectivo formadoras de colágeno), se considera dicha actividad como el mayor favorecedor de la síntesis proteica en el músculo (MILLWARD, 1980b).

El turnover proteico del músculo es heterogéneo, como en la mayoría de los tejidos. El turnover de la actina, por ejemplo, sólo es el 40% del de la miosina. Debido a ésto, cuando cambia el balance en el músculo deben cambiar las tasas de síntesis o de degradación para evitar cambios en la composición, variando más las proteínas con turnover lento que las de turnover más rápido. Entre el 50% y 60% de la proteína muscular es miofibrilar, y en el estado basal su degradación es varias veces más lenta que las proteínas no miofibrilares (BATES y col. 1983).

Esto está muy marcado en el caso de la actina dado que, en ratas jóvenes bien alimentadas, induce un aumento de cinco veces la tasa de síntesis en reposo, comparado con solo un aumento del doble en la síntesis de miosina (BATES y col. 1983). También se ha visto que en respuesta a un tratamiento de corticosterona la tasa de síntesis de la actina, medida como síntesis de 3-metil-histidina, se reduce solo el 4% después de 4 días comparado con disminuciones del 45% para la miosina y el 59% para la fracción de la proteína sarcoplásmica (ODEDRA y col., 1983). Todavía no se sabe cómo se producen estos cambios, pero hay una marcada disminución selectiva de la síntesis de actina, que disminuye solo 1/20 de la de miosina.

En cuanto al efecto de la nutrición, parece ser que la mayoría de las respuestas están mediadas por cambios hormonales inducidos por la dieta (MILLWARD y col., 1976a; WATERLOW y col., 1978a).

2.1.2.2.1.2. Regulación de la actividad ribosomal.

Hay tres hormonas muy importantes en la regulación del balance proteico en el músculo: la insulina, la corticosterona (que es el glucocorticoide activo en la rata) y la triiodotironina (T_3) u hormona tiroidea. Además, otras hormonas como la del crecimiento o su vía activa somatomedina, intervienen en dicha regulación, pero no de forma clara (MILLWARD y col., 1983).

a) *Insulina y T_3*

La insulina tiene un papel muy importante en la regulación del proceso de traducción. En las ratas diabéticas la actividad del RNA está disminuida y tras un tratamiento con insulina vuelve a ser normal (MILLWARD y col., 1976b; ODEIRA y MILLWARD, 1982). Estos efectos se conocen desde que JEFFERSON (1980) sugirió que, probablemente, la insulina actúe en la fase de iniciación. La acción de la insulina en este proceso puede ser modificada por otras hormonas.

La cuestión de si la insulina es esencial surge en los trabajos de MILLWARD y col. (1983) sobre el papel de las hormonas tiroideas. La actividad del RNA en ratas hipofisectomizadas es muy baja debido a la múltiple deficiencia hormonal y a la hipoinsulinemia asociada con la anorexia en este estado. Después del tratamiento con T_3 , la síntesis de proteínas es estimulada en el músculo, en parte debido a la mayor actividad del RNA aunque los niveles de insulina sigan bajos durante el tratamiento (BROWN y col., 1981). Se cree que los altos niveles de T_3 reemplazan a la insulina estimulando la actividad normal del RNA. En experimentos posteriores con ratas tiroidectomizadas, mantenidas con dosis muy altas de T_3 (20 $\mu\text{g}/\text{d}$), se observó que, aunque los niveles de insulina eran muy bajos, las actividades del RNA, aún así, son normales y no están en relación con los niveles de insulina. En contraste con estos resultados, en ausencia de T_3 , la insulina y la actividad del RNA están muy relacionadas. Una interpretación de estos resultados indica que la insulina y la T_3 están implicadas en la regulación de la traducción (BROWN y col., 1981).

MILLWARD y col. (1983) examinan el efecto del tratamiento con T_3 en ratas diabéticas. Después de 7 días de tratamiento con T_3 existe un defecto translacional en el músculo, con disminución de la actividad del RNA. La actividad del RNA en

el hígado no es afectada por la diabetes. Por otro lado, el tratamiento con T₄ restaura parcialmente los bajos niveles de RNA en los animales diabéticos, demostrando así la importancia de la T₄ en la regulación de la síntesis de RNA. Concluyen que la T₄ es la responsable de la estimulación de la actividad del RNA en los casos indicados, siendo este efecto de la T₄ sobre la traducción dependiente de la presencia de alguna cantidad de insulina. Sin embargo, en ausencia de T₄ o en hipotiroidismo severo la insulina puede estimular la traducción independientemente.

Estos resultados sugieren que, mientras que la insulina y la T₄ pueden estar implicadas en la regulación de la traducción, la insulina es primordial, mientras que la T₄ tiene un papel secundario. Esto puede confirmar la suposición de PAIN y CLEMENS (1980) de que la iniciación, lugar de actuación de la insulina, es el paso limitante en la síntesis de proteínas, y la de MATTHEWS y col. (1973) de que la T₄ actúa en la elongación.

b) *Glucocorticoides.*

La acción de la insulina también se puede modificar por las hormonas glucocorticoides. Los efectos catabólicos de estas hormonas sobre el músculo se conocen desde hace mucho tiempo (MUNRO, 1964) y se ha demostrado su acción inhibitoria sobre la síntesis de proteínas. Los mecanismos por los que realizan estas funciones en el músculo se desconocen.

MILLWARD y col. (1981) señalan que la corticosterona, independientemente, puede suprimir la síntesis de proteínas, superando los efectos estimuladores de la insulina. Se ha comprobado que dosis altas de corticosterona inhiben el crecimiento muscular a través de la supresión de la síntesis proteica, aunque los valores de insulina sean elevados. La inhibición de la estimulación de la insulina sobre la actividad RNA en el músculo realizada por la corticosterona está apoyada por el hecho de que para restaurar la síntesis de proteínas en ratas diabéticas se necesita más de 6 horas de administración de insulina (ODEDRA y MILLWARD, 1982). En contraste con esto, las ratas adrenalectomizadas diabéticas tratadas con corticosterona previamente a la administración de insulina responden en 1 hora de administración de insulina. Como el nivel de corticosterona es mayor en estas ratas diabéticas y, dado que también se observa resistencia a insulina en las ratas adrenalectomizadas tratadas con corticosterona antes de la administración de insulina, se ha postulado que la resistencia a la insulina en la diabetes refleja los niveles elevados de corticosterona (ODEDRA y MILLWARD, 1982).

Puede parecer que la corticosterona inhibe el efecto estimulador de la insulina en la síntesis de proteínas en el músculo, pero este es un efecto parcial. La reducción en la actividad de RNA tras el tratamiento con corticosterona nunca es tan importante como la que se observa en las ratas diabéticas (ODEDRA y MILLWARD, 1982). Este efecto es rápidamente reversible. Parece probable que este papel de la corticosterona tenga algún efecto directo sobre la síntesis proteica o un efecto directo inhibitor del estimulador de la insulina.

La acción principal de los glucocorticoides sobre el tejido periférico es la inhibición de la captura de glucosa. Se ha estudiado la inhibición de los efectos estimuladores de la insulina por las hormonas glucocorticoides. MILLWARD y col.(1983) proponen que la corticosterona tiene dos acciones diferentes sobre la síntesis proteica en el músculo. Una es la inhibición del efecto estimulador de la insulina sobre la síntesis proteica y otra es como regulador primario en los niveles de ribosomas, quizás por su acción inhibitoria en la síntesis de RNA ribosómico.

2.1.2.2.1.3. Regulación del contenido en ribosomas.

Se cree que la T₄ y los glucocorticoides tienen un papel primordial en la regulación del contenido ribosómico.

El papel de la T₄ lo indica el que después de una tiroidectomía en la rata hay una pérdida de RNA muscular, previo a cualquier otro cambio aparente. Esta pérdida de RNA muscular es reversible mediante un tratamiento con T₄. Por lo tanto, la T₄ parece regular la capacidad total para la síntesis de proteínas en el músculo (MILLWARD y col., 1983).

Los cambios en el contenido ribosómico del músculo parecen estar regulados por separado de la actividad del RNA, como indican MILLWARD y col.(1983) en sus observaciones del efecto de la T₄ en ratas diabéticas. Este menor contenido en RNA en músculo y en hígado vuelve a los valores normales con el tratamiento de T₄, lo que sugiere que las necesidades de insulina para mantener el RNA muscular son pequeñas. La importancia fisiológica de la hormona tiroidea parece estar relacionada con el nivel de turnover proteico en el músculo y la tasa metabólica total. Por lo tanto, como hay una reducción en la T₄ libre en malnutrición (COX y col., 1984), no sorprende la disminución en la tasa de síntesis proteica. Sin embargo en malnutrición también hay un aumento de glucocorticoides que produce una pérdida de ribosomas. El tratamiento con corticosterona en ratas reduce marcadamente los niveles de RNA por disminución de la tasa de síntesis del RNAr, con lo que la T₄ y

la corticosterona interaccionarán en la regulación de los niveles de RNA en el músculo (ODEDRA y MILLWARD, 1982).

MILLWARD y col. (1983) indican que pueden haber factores reguladores de los niveles de ribosomas en músculo diferentes de la corticosterona y de la T₃, ya que en principio observan que la cortisona suprime y que la T₃ estimula los niveles de RNA. En estudios posteriores con ratas malnutridas tratadas con corticosterona, insulina y T₃, observan que la actividad RNA no está particularmente disminuida por una dieta baja en proteínas y ninguno de los tratamientos induce diferencias importantes, aunque la concentración de RNA disminuye con este tipo de dieta y ninguno de los tratamientos consigue recuperar estos valores. Esto no concuerda con los resultados de los experimentos anteriores. Aunque el tratamiento con insulina no restaura los niveles de T₃, el grupo tratado con T₃ debería haber tenido la combinación hormonal apropiada, ya que los niveles de corticosterona no aumentan en este grupo. Proponen que la regulación de la síntesis de RNA, en contraste con la actividad de RNA, es sensible al aporte de aminoácidos.

2.1.3. DEGRADACIÓN PROTEICA Y REGULACIÓN.

2.1.3.1. Mecanismo de la degradación proteica

En contraste con el conocimiento detallado que existe acerca de la síntesis proteica, se sabe poco sobre el mecanismo de la degradación (GOLDBERG y DICE, 1974).

Se han puesto en evidencia tres sistemas proteolíticos principales en el músculo esquelético:

- . El sistema lisosomal, que es activado por falta de insulina y de aminoácidos.
- . El sistema Ca²⁺-dependiente (Calpainas I y II), que interviene específicamente en la destrucción de las membranas.
- . El sistema ATP-dependiente, especialmente implicado en el catabolismo de las proteínas miofibrilares.

Existe un residual citosólico independiente de ATP que no parece estar afectado por las diferentes situaciones catabólicas. Estos sistemas están en estudio, tanto bioquímica como funcionalmente.

A continuación se describe la degradación proteica enzimática, detallando el sistema lisosomal, ya que interviene en la mayoría de la actividad proteolítica intracelular. Después se estudian los sistemas proteasomas, introduciendo el concepto de calpainas.

2.1.3.1.1. Lisosomas.

La degradación proteica intracelular está mediada por los lisosomas, que contienen una gran cantidad de hidrolasas con un amplio espectro de actividad endo y exopeptidasa para degradar la mayoría de las proteínas celulares.

2.1.3.1.1.1. Características generales del sistema lisosomal.

Los lisosomas son partículas citoplasmáticas rodeadas de membrana que contienen una gran variedad de enzimas hidrolíticos (fosfatasa ácida, β -glucuronidasa, hidrolasas, etc.), son activas a pH ácido. Su actividad in vitro con sustratos añadidos aumenta una vez que sus membranas se disgregan.

El sistema lisosomal es un componente del "vacuoma", que comprende numerosas vesículas o partículas conectadas por canales permanentes o temporales, separadas del citoplasma. Estas vesículas incluyen el retículo endoplasmático rugoso, con los ribosomas unidos, el retículo endoplasmático liso y el aparato de Golgi.

El proceso que tiene lugar en el vacuoma es unidireccional, y se ha comprobado estudiando la síntesis de proteínas en el hígado. Las proteínas que salen de la célula se sintetizan en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso y se descargan a la luz del mismo. Se mueven progresivamente desde el retículo endoplasmático rugoso hacia el aparato de Golgi, donde tiene lugar el último paso del proceso, como es la adición de residuos de ácido siálico (COOK, 1973). Luego se engloban en gránulos secretores maduros y por último se liberan de la célula (PETERS, 1975). El proceso de los lisosomas parece seguir una secuencia similar: los enzimas lisosomales que llegan al aparato de Golgi o a lugares funcionalmente similares se incluyen en pequeñas vesículas que son los *lisosomas primarios*. Estos son vesículas de almacenaje que contienen enzimas lisosomales que no se han utilizado nunca, y son heterogéneos en cuanto a las proporciones relativas de los diferentes enzimas que presentan. La síntesis, transporte y almacén de los lisosomas primarios parece seguir la dirección desde el retículo endoplasmático rugoso al liso, a las lamelas y vesículas del aparato de Golgi. Se ha observado otra ruta secundaria alejada de la zona nuclear, donde no hay complejo de Golgi. En este caso el lisosoma

primario se origina en el retículo endoplásmico liso.

En el vacuoma también hay vesículas que contienen material de origen extracelular, que ha entrado en la célula por endocitosis (fagocitosis o pinocitosis) (GORDON, 1973). Son las vacuolas heterofágicas. Otras vesículas contienen material de origen intracelular, denominadas vacuolas autofágicas. Estos dos tipos de vacuolas se pueden encontrar sin capacidad hidrolítica.

Los lisosomas primarios unidos al sustrato (vacuolas auto y heterofágicas) forman los *lisosomas secundarios*, donde ocurre el proceso de degradación (DE DUVE, 1969).

2.1.1.1.2. Actividad proteolítica de los enzimas lisosomales. Hidrolasas peptídicas lisosomales.

Las catepsinas fueron estudiadas por FRUTON y BERGMAN (1941), que establecieron su especificidad por el sustrato, llamándolas catepsinas A, B y C a la pepsina, tripsina y quimiotripsina. La catepsina D se llamó antes proteinasa 1 y posteriormente sólo catepsina. Se ha descrito también la catepsina E (MILLWARD y col., 1983).

La catepsina A es una carboxipeptidasa, que separa el residuo aminoácido carboxiterminal en los polipéptidos, pero tiene poca actividad en las proteínas intactas.

La catepsina B es una tiolproteinasa que posee, al menos, dos actividades, una endopeptidasa B1 capaz de degradar el colágeno, considerada la proteína principal de los lisosomas, y otra menos definida con actividad B2 (POOLE, 1975).

La catepsina C es una dipeptidil transferasa por su capacidad de transaminar un radical dipéptido desde el nitrógeno terminal de la proteína.

La catepsina D se considera la endopeptidasa más importante en los tejidos animales. Su actividad es similar a la de la pepsina, pero más restringida y selectiva.

La catepsina E es una endopeptidasa con actividad similar a la D pero es más estable a pH ácido.

Se incluye en este grupo la colagenasa, enzima específica para el colágeno nativo (WILDENTHAL, 1975).

2.1.3.1.2. Proteasomas.

Algunas proteínas son resistentes a los extractos lisosomales, pero son degradadas a aminoácidos por la fracción sobrenadante celular, lo que sugiere que las peptidasas citoplasmáticas pueden cooperar con las enzimas lisosomales para conseguir una hidrólisis completa.

Actualmente se considera la existencia de los proteasomas, formados por una masa compleja de proteasas multicatalíticas intracelulares, capaces de degradar proteínas a pequeños péptidos, que han sido aisladas bajo diferentes nombres de una gran variedad de células eucarióticas y tejidos (ORLOWSKI, 1990). Este complejo está compuesto, al menos, por 24 subunidades, donde están incluidos diferentes polipéptidos ordenados en una estructura cilíndrica.

Estos proteasomas juegan un papel esencial en las rutas de turnover proteico intracelular no lisosomales. No están relacionados con otras proteasas conocidas y parece que constituyen una nueva familia de enzimas proteolíticas (RIVETT y KNECHT, 1993).

Los proteasomas hidrolizan las uniones peptídicas por el extremo carboxílico de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada, tienen actividad hidrolítica peptidil-glutamil-péptido y actividad similar a la tripsina (DAILMANN, 1993).

En los últimos años se ha llegado a la conclusión de que el proteasoma también está implicado en la degradación ATP-dependiente de proteínas ligadas a la ubiquitina. Para ello se asocia el proteasoma con otras proteínas, formando complejos.

2.1.3.1.3. Calpaínas.

Las calpaínas son proteasas neutras presentes en el citoplasma activadas por Ca^{2+} . Están implicadas en jugar papeles mediadores en señales en cascada transduccionales intracelulares, reguladas por Ca^{2+} . (GOLL y col., 1990).

En los mamíferos existen dos formas isoenzimas, la μ -calpaína y la m -calpaína, que se diferencian por su sensibilidad a las concentraciones de Ca^{2+} . La

primera requiere niveles μmol de Ca^{2+} para su actividad y la segunda mmol .

La concentración intracelular de Ca^{2+} fluctúa normalmente en niveles submicromolares, por lo que probablemente sea la primera la que actúa "in vivo" (SAIDO y col. 1992).

La acción de las calpains es alterar, más que destruir, las estructuras y funciones de las proteínas sustrato.

Entre los sustratos están las proteínas del citoesqueleto, la fodrina (proteína situada en alineación por debajo de la membrana citoplasmática), y se ha asociado particularmente con diferentes fenómenos, como la estimulación y secreción en las células cromafines adrenérgicas, activación de las plaquetas y neutrófilos, potenciación neuronal a largo plazo y daños en el hipocampo causados por aminoácidos excitatorios (SIMAN y col., 1990).

La fodrina proporciona un gran número de proteínas funcionales, implicadas en las señales transduccionales, con múltiples lugares de interacción. Además, es la proteína que se une principalmente con la calmodulina en cerebro. Actúa como parte de un anclaje para los receptores de membrana, regula los filamentos de actina y sufre fosforilación por la proteinkinasa dependiente del AMPc, proteinkinasa C β y tirosinakinassas (KASUGA y col., 1990).

La proteólisis restringida por la calpaina es un mecanismo único e irreversible para regular la fodrina, que conduce a cambios importantes en la geometría del receptor y en la morfología de la membrana (KOSOWA y GLASER, 1990).

La fodrina sufre otras modificaciones por diferentes proteínas, que afectan a su susceptibilidad a la proteólisis. Estas reacciones están catalizadas por la calpaina, que modifica los parámetros bioquímicos de la fodrina (HARRIS y MORROW, 1990), posiblemente resultando en diferentes señales de transmisión en cascada.

2.1.3.1.4. Ruta mediada por la ubiquitina.

Uno de los sistemas mejor estudiados, implicado en la proteólisis intracelular, es la ruta mediada por la ubiquitina. La ubiquitina es una pequeña proteína activada ATP-dependiente.

La degradación de una proteína por el sistema ubiquitina incluye dos pasos. Inicialmente se unen covalentemente múltiples moléculas de ubiquitina al sustrato proteico por un proceso dependiente de ATP. El conjugado resultante es degradado por un complejo multicatalítico (proteasoma 26S), que contiene muchas proteasas. El proceso produce aminoácidos libres y libera la ubiquitina para su reutilización. Estos procesos requieren ATP.

La unión a ubiquitina que modifica las proteínas no tiene porqué tener finalidad proteolítica (CIECHANOVER, 1993).

Algunas proteínas son resistentes a los extractos lisosomales, pero son degradadas a aminoácidos por la fracción sobrenadante celular, lo que sugiere que las peptidasas citoplasmáticas pueden cooperar con los enzimas lisosomales para conseguir una hidrólisis completa.

2.1.3.2. Regulación de la degradación proteica en músculo.

La degradación proteica en el músculo puede disminuir en los estados catabólicos o aumentar en los estados anabólicos, denominando "anabólicos" a los producidos durante el crecimiento y "catabólicos" a los producidos durante la atrofia. En este sentido se ha encontrado disminución catabólica en niños alimentados con dietas deficientes en proteínas, en ratas malnutridas y en adultos en ayuno, mediante la determinación de la excreción de 3-metil-histidina (MILLWARD y col., 1975).

2.1.3.2.1. Cambios adaptativos en la degradación proteica.

Se sabe que muchos de los cambios adaptativos en la degradación proteica como respuesta al estado nutritivo alterado, es reflejado en el tiroideo. De la misma forma que la T₃ regula la capacidad de la síntesis de proteínas, también regula la capacidad de la proteólisis (MILLWARD, 1980b).

La relación entre la hormona T₃ y la degradación proteica en la malnutrición ha sido demostrada por MILLWARD y col. (1983), en ratas con dietas deficientes en proteína tratadas con diferentes cantidades de corticosterona. El tratamiento con dosis de reemplazamiento de corticosterona no afecta el balance proteico, pero produce unas tasas mayores de turnover que en las ratas malnutridas no tratadas. Estas tasas reflejan los niveles de T₃ elevados. Sin embargo, cuando la síntesis de proteínas se altera por restricción en la ingesta con dietas bajas en proteína o por tratamiento con dosis catabólicas del esteroide, se produce pérdida en la proteína

muscular, aunque la alteración de la síntesis no es tan grande como en las ratas no tratadas. Esta incapacidad de disminuir la degradación es un fallo en el proceso de adaptación, posiblemente importante en las situaciones marginales de malnutrición.

Otra situación donde aparecen cambios adaptativos en la tasa de degradación proteica es en la respuesta a los aumentos de la ingesta. A menudo hay aumentos en la ingesta de alimentos que no producen aumento en el depósito proteico tisular (por ejemplo, como respuesta al frío). Dada la sensibilidad de la síntesis proteica muscular a la ingesta de alimentos, se esperaría un aumento en el depósito proteico del músculo, lo que no ocurre siempre (MILLWARD y col., 1983). En el caso de la respuesta al frío es debido a que la energía de la ingesta se utiliza como fuente de calor y no para la proteosíntesis, proceso en el que interviene la T₃, aumentando el catabolismo proteico a la vez que regula la energía necesaria para mantener la temperatura corporal del animal. Todavía no se ha demostrado por qué, aunque se relaciona con las variaciones en los niveles de T₃ y de otras hormonas.

No sólo se producen cambios adaptativos en la degradación. MILLWARD y col. (1978) demuestran que después de un ayuno prolongado aparece un aumento de la degradación proteica en animales jóvenes, así como en la diabetes como respuesta inicial. Otros autores han observado que aumenta la excreción de la 3-metil-histidina en ratas después de un tratamiento con grandes dosis de glucocorticoides (MUNRO, 1982), aunque otros no han encontrado cambios en la degradación (ODEDRA y MILLWARD, 1982). MILLWARD y col. (1983) han seguido el curso de los cambios en el turnover después del tratamiento con corticosterona (10 mg/día), demostrando que induce un aumento pasajero en la degradación proteica muscular. Con el tiempo (5 días) la tasa vuelve a valores normales y la disminución de la síntesis induce la pérdida.

No se conoce el mecanismo de acción de la corticosterona sobre la degradación proteica, pero sí su efecto sobre la síntesis, ya que la supresión de la misma se mantiene durante todo el tratamiento. Tampoco está claro que el aumento en la degradación después de un ayuno prolongado esté inducido por los niveles elevados de glucocorticoides, ya que el aumento en corticosterona aparece antes que se produzca cualquier cambio en la degradación (MILLWARD y col., 1983).

2.1.3.2.2. Mecanismos de regulación intracelulares.

No se ha determinado en forma detallada el mecanismo por el cual las hormonas producen cambios en la síntesis o en la degradación proteica en el músculo, aparte de los ya mencionados sobre los ribosomas y proteasas lisosomales. Se cree que están implicadas en la regulación de la transcripción de los genes algunas hormonas (ej. las hormonas tiroideas y los glucocorticoides actúan de forma competitiva con los genes del RNAr y las tiroideas además regulan la expresión de los genes de las proteasas). En cuanto a la regulación de la traducción se conoce también poco, pero el sistema de la proteinkinasa podría estar relacionado con el ciclo de la fosforilación y la defosforilación que regula la iniciación (PAIN y CLEMENS, 1980).

2.1.3.2.2.1 Calcio.

Se ha propuesto que los cambios en la concentración del calcio son mediadores de los cambios del turnover proteico en el músculo. Cuando los niveles de calcio intracelular aumentan (por medio de ionóforos en músculo incubado) aumenta el catabolismo neto (LEWIS y col., 1982). Se asume generalmente que los cambios en el turnover proteico inducidos por alteraciones de la homeostasis de calcio están relacionados con estados patológicos pero no que entre los mecanismos fisiológicos de regulación esté el calcio.

Los informes sobre los efectos de los niveles elevados de calcio no coinciden. Mientras que RODEMANN y GOLDBERG (1982) mantienen que el principal resultado es el aumento en la degradación proteica, LEWIS y col. (1982) demuestran que la respuesta catabólica en el músculo está mediada por una disminución de la síntesis sin alterar la degradación. Los cambios discordantes en la síntesis y degradación plantean serios problemas para establecer su importancia fisiológica.

2.1.3.2.2.2. Prostaglandinas.

Se piensa que las prostaglandinas aumentan la degradación proteica, pero hay pocas evidencias que demuestren el efecto de estas sobre la proteosíntesis. La prostaglandina G2 favorece la degradación de la proteína muscular por medio de la estimulación de las proteasas lisosomales. Dado que el calcio aumenta la síntesis de ésta (el paso limitante está regulado por un enzima dependiente de calcio, la fosfolipasa A), a su vez estimula las proteasas lisosomales (WAXMAN, 1982).

2.2. MEDIDA DE LAS TASAS DE SÍNTESIS PROTEICA Y DE CATABOLISMO.

Estudios del balance de nitrógeno indican los cambios que hay en las reservas proteicas corporales, pero sólo miden los resultados de la síntesis y el catabolismo continuo de las proteínas. SCHÖENHEIMER (1946) muestra que, incluso en el equilibrio de nitrógeno, hay una cantidad importante de turnover proteico. Teniendo en cuenta las diferentes vidas medias de diversas proteínas, es lógico que el turnover total observado en el organismo sea el resultado de la síntesis y de la degradación de ellas en los diferentes tejidos, en las diferentes células de un tejido, e incluso en la misma célula. Sin embargo, WATERLOW y col. (1978a) han sugerido que la medida de la tasa total de la síntesis y del catabolismo de proteínas en el organismo nos puede dar bastante información acerca de los mecanismos implicados en procesos patológicos y de malnutrición, así como sobre la medida de la tasa metabólica basal.

Los estudios en animales de experimentación tienen la ventaja de que es posible administrar un aminoácido radiactivo con una actividad específica relativamente alta y en cantidades elevadas, con lo que se obtiene una gran sensibilidad.

También es posible obtener muestras de tejidos para seguir la acumulación de proteínas marcadas, procedimiento que no es posible en humanos generalmente, aunque se han hecho estudios de las tasas de acumulación de la albúmina sérica e incluso de proteínas musculares por medio de muestras obtenidas por biopsias (HALLYDAY y McKERON, 1975).

DUNLOP y col. (1981) demuestran que en el ratón adulto hay dos pools principales en el metabolismo de las proteínas. El mayor de ellos tiene una vida media relativamente larga (alrededor de 9,7 días) y el menor, que es aproximadamente el 3,5% del total, tiene una vida media de 7 horas. Parece que este rápido cambio en el pool proteico está relacionado con la regulación metabólica y la síntesis de neurotransmisores. En contraste con esto, en el ratón joven, donde la tasa de síntesis proteica es mucho mayor que en el adulto, solo aparece un pool, con una vida media de 2 días. La tasa fraccional de la síntesis de proteínas en el cerebro de un ratón joven puede ser alrededor de 2% h⁻¹, comparado con el 0,6% h⁻¹ en el adulto. La acumulación neta de proteína en el cerebro del ratón en desarrollo es sólo de 0,7% h⁻¹ como máximo, y se ha sugerido que el gran turnover que tiene lugar es debido a la gran plasticidad que tiene el cerebro en desarrollo.

También estudian el catabolismo de las proteínas cerebrales y demuestran que la actividad proteolítica del cerebro en desarrollo es mayor que la del adulto, aunque el cerebro del adulto tiene potencialmente una capacidad proteolítica mayor. Demuestran que si se elimina la proteína de la dieta produce una reducción en la acumulación de proteínas en el cerebro adulto e inmaduro de ratón. En el adulto la menor acumulación proteica es el resultado del mayor catabolismo, mientras que en el joven hay una reducción en la síntesis proteica del 33% y una reducción en el catabolismo del 18%, es decir, una reducción en la tasa de turnover proteico así como de la síntesis.

2.2.1. EXCRECIÓN RENAL DE LA 3-METIL-HISTIDINA.

En estudios in vivo es muy útil disponer de un indicador del turnover proteico que se pueda medir por un método fácil, como puede ser un metabolito urinario que sólo provenga del tejido muscular esquelético.

En 1967 se demostró que la 3-metil-histidina es un aminoácido constituyente de las proteínas contráctiles mayoritarias del músculo, la actina y la miosina, (ASATOOR y ARMSTRONG, 1967; JOHNSON y col., 1967), y que está formada por modificación posterior a la síntesis de las cadenas polipeptídicas. YOUNG y col. (1972) demuestran que la 3-metil-histidina radioactiva no se incorpora a las proteínas, que no hay un codon para 3-metil-histidina, ni cargador del aminoácidos para el RNAi. Además, no se ha encontrado ningún RNAi específico para la 3-metil-histidina.

Esto significa que cualquier 3-metil-histidina liberada por el catabolismo de los tejidos proteicos no se utiliza posteriormente para una nueva síntesis proteica, pero se metabolizará o se excretará sin cambios (YOUNG y col., 1972).

ELIA y col. (1979) demuestran que la mayor parte del contenido total del organismo en 3-metil-histidina está en el músculo esquelético, alrededor de 3,3 μmol por Kg de proteína comparado con el contenido en el músculo cardíaco y el liso, que contienen entre 2 y 3 $\mu\text{mol}/\text{Kg}$. Estos constituyen una proporción mucho menor de la proteína corporal total que el músculo esquelético. En tejidos como el hígado y el riñón es menos de 1,1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ y se cree que está en las proteínas contráctiles de los capilares sanguíneos.

Parece probable, por tanto, que la medida de la excreción renal de 3-metil-histidina refleje el turnover de la proteína del tejido muscular esquelético. Esto lo

apoyan varios estudios.

1. Un ayuno de 20 días en sujetos obesos produjo una disminución progresiva en la excreción de la 3-metil-histidina urinaria y una disminución paralela en la excreción total de nitrógeno, sugiriendo que, de acuerdo con otros estudios, hay una adaptación progresiva durante el ayuno prolongado para reducir el catabolismo de las proteínas musculares, mientras que aumenta la concentración de cuerpos cetónicos (YOUNG y col., 1972).

2. Un aumento en la ingesta proteica lleva a un aumento en la excreción de la 3-metil-histidina, lo que sugiere un aumento en la tasa de turnover proteico paralelo al aumento de la ingesta (NISHIZAWA y col., 1977).

3. Ratas en crecimiento alimentadas con una dieta adecuada de proteínas muestran un aumento progresivo en la excreción de 3-metil-histidina renal al mismo tiempo que una ganancia de peso corporal y, por tanto, de masa proteica muscular. Por el contrario, la eliminación de proteína de la dieta disminuye la excreción renal de 3-metil-histidina junto con la pérdida de masa muscular (HAVERBERG y col., 1975a y 1975b).

Estos estudios y otros sugieren que la medida de la 3-metil-histidina urinaria indicará el estado del metabolismo proteico muscular. Sin embargo, al menos en algunas especies, no ocurre esto. HARRIS y MILNE (1981a, 1981b) han demostrado que la excreción renal de 3-metil-histidina marcada radiactivamente en las rexes es casi inmediata, lo que sugiere que, al igual que en los casos citados anteriormente, la excreción de este metabolito debe indicar el metabolismo proteico muscular en la rex. Se ha visto que en cerdos y ovejas la recuperación de la 3-metil-histidina administrada es muy pequeña y se acumula en el músculo en gran parte como el dipéptido balenina (B-alanil-3-metil-histidina).

En estas condiciones, no parece probable que la medida de la excreción de 3-metil-histidina aporte mucha información, ya que el pool del músculo puede ser tan grande que enmascare cualquier cambio en la excreción renal de la 3-metil-histidina debido al turnover proteico.

Los estudios de BATES y MILLWARD (1981) indican que la excreción de 3-metil-histidina en el hombre puede no ser un reflejo tan fiel del metabolismo proteico, pero, como posteriormente se señala, esta afirmación está muy discutida.

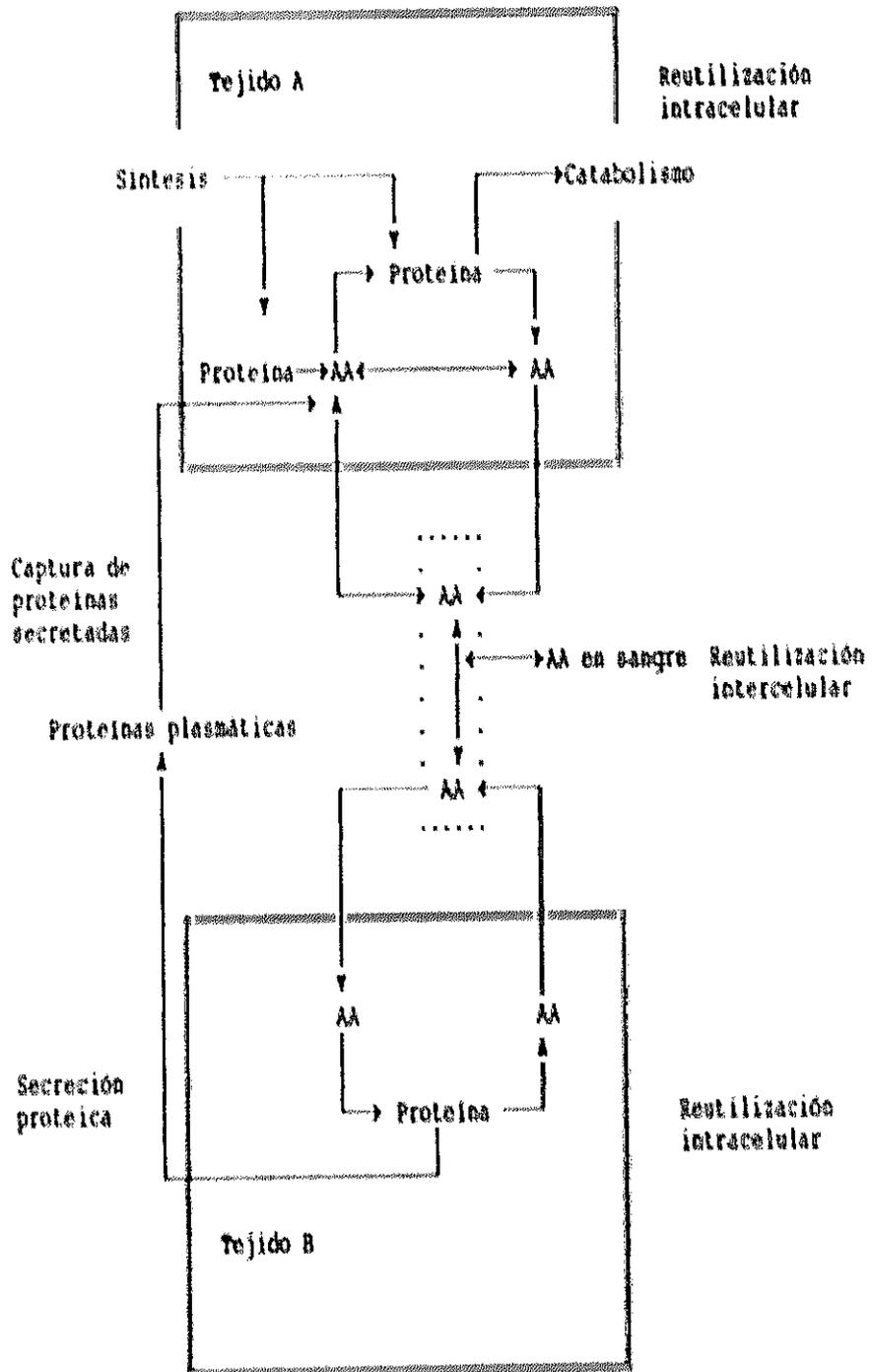
2.2.1.1. 3-metil-histidina y turnover proteico muscular.

El músculo esquelético es el tejido de mayor importancia en el metabolismo proteico total del organismo. Aún así, se dispone de poca información acerca del mecanismo responsable de mantener el contenido proteico en el músculo esquelético y acerca de cómo contribuye el turnover proteico en los músculos al metabolismo de todo el organismo en diferentes condiciones nutricionales, hormonales, nerviosas y de stress (YOUNG y PLUSKAL, 1977).

El principal problema que aparece al estudiar el catabolismo proteico in vivo es la reutilización de los aminoácidos.

Los aminoácidos que se liberan durante el catabolismo intracelular de las proteínas pueden ser reutilizados para la síntesis proteica de la célula, *reciclaje intracelular*, o pueden ser transportados a otros órganos donde entran en las rutas del anabolismo proteico, *reciclaje intercelular*. El reciclaje de aminoácidos es un proceso normal e importante en la economía de los aminoácidos del organismo y varía con el estado nutricional (WATERLOW, 1978a). Este reciclaje hace que los estudios del catabolismo proteico realizados con la administración de aminoácidos marcados y posterior medida de la tasa de pérdida del marcaje en las proteínas tisulares fracase. La reutilización de aminoácidos marcados liberados en el pool tisular prolonga el período de eliminación desde la proteína del aminoácido marcado, lo que hace que aparezcan vidas medias erróneamente largas (SCHIMKE, 1970). Se han propuesto varios métodos intentando que el reciclaje sea el mínimo posible, pero no se ha conseguido una solución satisfactoria para la determinación del catabolismo proteico in vivo.

Por tanto, se necesita un aminoácido que no esté sujeto al diferente catabolismo proteico en los diversos estados fisiológicos y patológicos y que sea aplicable a estudios en humanos. Así se ha estudiado la utilidad potencial de la 3-metil-histidina como indicador del catabolismo proteico muscular in vivo en animales de experimentación y en humanos (YOUNG y MUNRO, 1978).



2.2.1.2. Derivados de aminoácidos relacionados con el turnover proteico.

Para superar los problemas creados por la reutilización de los aminoácidos sería deseable identificar y explotar como marcador de la degradación proteica muscular un aminoácido con las siguientes características:

1. Que sea un aminoácido que se modifique químicamente después de la síntesis proteica.
2. Que el grupo químicamente modificado no cambie una vez que el aminoácido aparece en la proteína.
3. Que se sepa su concentración en la proteína muscular o que ésta permanezca constante.
4. Que ese aminoácido no esté presente en cantidades importantes en otros tejidos.
5. Que se libere de la proteína al mismo tiempo que otros aminoácidos.
6. Que no se reutilice para síntesis proteica.
7. Que no sufra metabolismo posterior en el organismo.
8. Que tenga un umbral renal bajo.
9. Que se excrete cuantitativamente por orina.

Hace años YOUNG y col. (1973), ASATOOR y ARMSTRONG (1967) y REPORTER (1973), sugirieron que uno de los aminoácidos metilados en el músculo podría tener esas características. Hay varios derivados metilados de aminoácidos en el músculo: 1-metilhistidina, mono y trimetil lisinas, y la dimetilarginina.

En el contexto del turnover de la proteína miofibrilar muscular, parece que la 3-metil-histidina ofrece la mejor posibilidad de desarrollar una técnica útil para estudiar el catabolismo proteico en el organismo. TALLAN y col. (1954a) identifican este aminoácido como un componente normal de la orina en humanos y posteriormente se ha demostrado en la rata (HAVERBERG, 1975b), gato (TALLAN y col., 1954b) y conejo (BLOCK y HUBBARD, 1962), entre otras especies.

En 1967 se identificó la 3-metil-histidina como un constituyente de la actina (ASATOOR y ARMSTRONG, 1967) y de la miosina (JOHNSON y col., 1967). La 3-metil-histidina está presente en la cabeza globular de la cadena pesada de miosina (HUSZAR y ELZINGA, 1971) y es el residuo número 73 de la cadena polipeptídica de actina (ELZINGA y col., 1973). Hay un mol de 3-metil-histidina por cada mol de cadena pesada de miosina en las fibras de miosina de contracción rápida (blancas), pero no hay en la miosina del músculo del feto, ni en la del músculo cardíaco, ni en

la de las fibras de contracción lenta o rojas (HUSZAR, 1972a). Por otro lado, el contenido en 3-metil-histidina es constante en la actina aislada de todas las fuentes analizadas, incluyendo las actinas citoplasmáticas de diferentes tipos de células (POLLARD y WEHING, 1974). HUSZARD y col. (1972b) estudian la ausencia de 3-metil-histidina en la miosina del corazón, de las fibras musculares rojas (lentas) y en el feto y, basándose en la secuencia de aminoácidos, proponen que se debe a que el enzima que metila la histidina no aparece en esos tejidos.

Para poder trabajar con la 3-metil-histidina como indicador del catabolismo muscular debemos hacer tres suposiciones:

1. No carga el RNAt y, por tanto, no se reutiliza para la síntesis proteica.
2. Se excreta cuantitativamente por orina en una forma fácilmente identificable.
3. La proporción principal de 3-metil-histidina en el organismo está en el músculo esquelético.

a. No forma el aminoacil-RNAt.

El RNAt no se carga con la 3-metil-histidina (YOUNG y col., 1972) y la administración "in vivo" de 3-metil-histidina marcada no da una radioactividad detectable en el extracto de RNAt a partir de un músculo. Además, la metionina dona su grupo metilo al residuo de histidina en el polipéptido naciente de miosina y de actina y posiblemente después de la liberación del polipéptido desde el polirribosoma (REPORTER, 1973).

b. Excreción cuantitativa de 3-metil-histidina por orina.

El metabolismo de la 3-metil-histidina liberada por catabolismo de la actina y de la miosina ha sido ampliamente estudiado. COWGILL y FREEBURG (1957) observan que la mayoría de la radioactividad después de la administración de (C^{14})-metil-3-metil-histidina a ratas, conejos y pollos aparece en la orina aunque la radioactividad también se recupera en el sobrenadante del músculo soluble en la fase cloroformica (CCl_3COOH). Se ha confirmado que en ratas hay una excreción cuantitativa del aminoácido marcado en orina. En las heces solo aparecen trazas de radioactividad, y no aparece $^{14}CO_2$ en el aire espirado (YOUNG y col., 1972). Estas observaciones se han demostrado en humanos (LONG y col., 1975, 1988).

Los estudios de YOUNG y MUNRO (1978) muestran que los dos componentes principales que intervienen en la radioactividad de la orina son la 3-metil-histidina no cambiada y la N-acetil-3-metil-histidina. La N-acetil-3-metil-histidina es la fracción mayoritaria en la orina de la rata adulta, lo que demuestra que la proporción de estos componentes depende del grado de desarrollo del animal (YOUNG y col., 1972). Contrastando con ello, en el humano adulto este compuesto aparece solo en un 5% o menos (LONG y col., 1975 y 1988). Así se hace innecesario hidrolizar la orina del humano para la determinación total de la excreción de 3-metil-histidina, pero no ocurre lo mismo con la rata.

No se conoce el lugar de acetilación de la 3-metil-histidina, pero se supone que ocurre en el hígado.

Los niveles de 3-metil-histidina en reposo en sangre se pueden alterar por cambios en el riñón (CONDON y ASATOOR, 1971), sin embargo, dado que hay un pool constante de 3-metil-histidina corporal y que el aclaramiento renal es constante durante el período de medida de la 3-metil-histidina, la adición de 3-metil-histidina al pool de aminoácidos libres por el catabolismo de la actina y de la miosina será seguido de su eliminación cuantitativa en orina.

c. Distribución de la 3-metil-histidina unida a proteínas.

Debido a que la actina está presente generalmente en las células eucarióticas (POLLARD y WEHING, 1974), la contribución cuantitativa de la 3-metil-histidina del músculo esquelético al contenido de la orina proviene del músculo esquelético, diafragma, corazón, hígado, estómago, riñón, intestino delgado, bazo, testículos, cerebro y suero, según indican HAVERBERG y col. (1975b).

Este estudio no tiene en cuenta la piel. Sin embargo, la contribución de la piel y de los intestinos se ha estimado en un 10% del pool total corporal de 3-metil-histidina (NISHIZAWA y col., 1977). Este estudio lleva a la conclusión que el turnover proteico en el músculo esquelético es el que aporta la mayor parte de la 3-metil-histidina que aparece en orina.

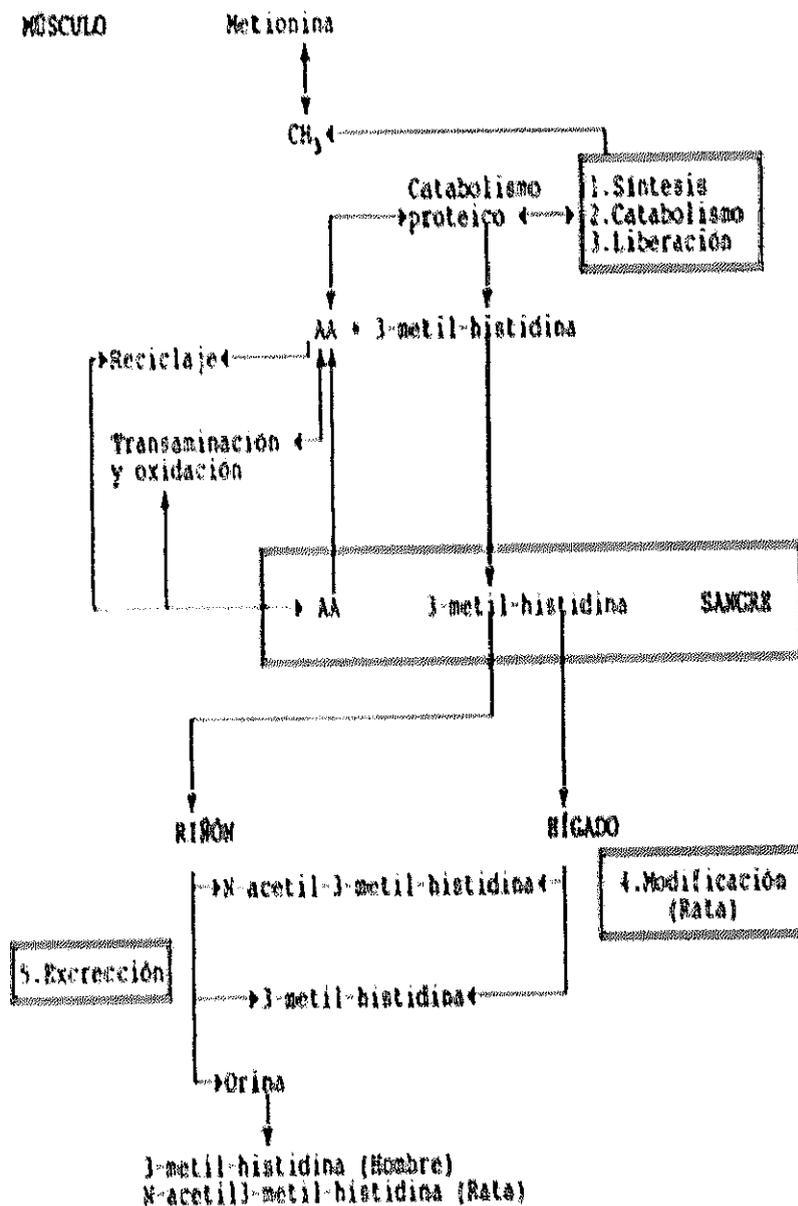
El turnover proteico en otros órganos que contienen este aminoácido y que tienen una contribución importante a la 3-metil-histidina urinaria debería ser alto. Aunque esto parece poco probable, los estudios que comparan el turnover de proteínas del intestino que contienen 3-metil-histidina, de la piel y del músculo, sugieren que el intestino y la piel pueden contribuir aproximadamente en un 17% a

la eliminación total de la 3-metil-histidina por orina (NISHIZAWA y col., 1977). Sin embargo, no se puede asegurar esta afirmación, ya que con la técnica de marcaje utilizada puede haber confusión con la reutilización de la metionina, que es la que cede el grupo marcado a la 3-metil-histidina.

Aún así, para ver la importancia de la contribución de otros tejidos como la piel y el intestino de las ratas con una proteína no adecuada en la dieta, se debe tener en cuenta que los cambios en la eliminación de 3-metil-histidina por orina puede reflejar en parte las alteraciones en la cantidad y en la tasa de catabolismo de la actina en estos tejidos. Sin embargo, se puede esperar que la contribución relativa de la piel a la 3-metil-histidina eliminada por orina debería disminuir con el mayor tamaño del organismo (ley de las áreas de superficie) y, por tanto, en los humanos, los efectos de la piel sobre la eliminación total de 3-metil-histidina son pequeños en relación con la rata.

La metionina cede un grupo CH₃ a la histidina que está formando una proteína nueva (es decir, en la síntesis), o lo cede a histidina que forma ya parte de proteínas sintetizadas (actina y miosina). Cuando se catabolizan éstas se liberan diferentes aminoácidos, entre los que está la 3-metil-histidina. El resto de aminoácidos puede ser reutilizado en la síntesis proteica o pasar por transaminación y oxidación a otras ratas, o salir a sangre desde donde pueden volver al músculo para ser utilizados. La 3-metil-histidina pasa a sangre, desde donde llega al hígado. Aquí se puede modificar a N-acetil-3-metil-histidina sólo en el caso de la rata, o salir como 3-metil-histidina. Estos compuestos son excretados por el riñón y aparecen en orina, en el hombre como 3-metil-histidina y en rata puede aparecer como N-acetil-3-metil-histidina.

El siguiente cuadro resume el metabolismo de la 3-metil-histidina.



2.2.1.3. Aplicaciones de la excreción de 3-metil-histidina al estudio del turnover proteico muscular. Energía dietaria e ingesta de proteínas.

El turnover proteico del músculo de ratas en crecimiento es sensible a las alteraciones de la proteína dietaria (MILLWARD y col., 1976a). Las investigaciones de MILLWARD y col. (1976b), utilizando infusiones continuas de aminoácidos marcados isotópicamente, muestran alteraciones en las tasas de síntesis y de

catabolismo proteico en el músculo como respuesta a los cambios de la proteína en la dieta y del aporte energético, así como alteraciones en el balance hormonal. Esto explica cómo la dieta puede afectar la tasa de eliminación de la 3-metil-histidina.

HAYERBERG y col. (1975a) confirman lo anterior en diferentes experimentos en los que los resultados indican que una dieta restringida en proteína produce un descenso rápido de la pérdida de 3-metil-histidina aumentando después de una realimentación. Las respuestas a la deplección y replección señalan que la proteína muscular se conserva por medio de una disminución del catabolismo muscular durante períodos de ingesta inadecuada de proteínas. Sin embargo, una restricción de energía y proteínas en la ingesta mantiene o incluso aumenta un poco la eliminación de 3-metil-histidina.

YOUNG y MUNRO (1978) observan cómo la combinación de una restricción energética y proteica producen una disminución en la eliminación de 3-metil-histidina cuando las ratas continúan con este régimen, y es mayor la eliminación durante la primera fase de la replección nutricional. Sin embargo, al continuar la rehabilitación aumenta la eliminación del aminoácido.

La excreción renal de 3-metil-histidina en niños con diferentes tipos de malnutrición (kwashiorkor y marasmo) es más baja que en niños bien nutridos de la misma edad. YOUNG y MUNRO (1978) afirman que la recuperación clínica está asociada a la vuelta a la normalidad de los valores de excreción de 3-metil-histidina tras sus estudios de la recuperación en jóvenes con malnutrición proteico-energética. Estos últimos observan que la eliminación de 3-metil-histidina es baja al principio de la recuperación, pero si continúa hay un aumento progresivo en la eliminación, lo que implica mayor turnover proteico muscular. Además, señalan que el catabolismo proteico muscular es menor en los niños con malnutriciones severas y que la rehabilitación nutricional va acompañada de un aumento de la tasa de turnover proteico muscular, concluyendo que, como la síntesis de proteínas está disminuida en animales depleccionados de proteína y, posiblemente, en los niños, la menor tasa de catabolismo proteico muscular en los malnutridos puede tomarse como reflejo de una adaptación del catabolismo proteico muscular favoreciendo el mantenimiento del equilibrio entre la síntesis y el catabolismo en este tejido.

Este mismo grupo determina la eliminación de 3-metil-histidina en mujeres obesas (YOUNG y MUNRO, 1978) sometidas a una dieta de 1.5 g de proteína de huevo/kg de peso corporal, en la que las calorías no proteicas diarias aportan aproximadamente 1.2 veces la tasa metabólica basal durante un período de 7 días.

seguido por un período de dieta sin las calorías no proteicas. La adaptación a la dieta de la segunda fase reduce la eliminación de la 3-metil-histidina (la relación 3-metil-histidina/creatinina) en un 25%, lo que indica una reducción en la tasa fraccional del catabolismo proteico miofibrilar y puede ser debido a la mayor concentración de cuerpos cetónicos en sangre. Los cuerpos cetónicos parecen inhibir el catabolismo proteico y/o la oxidación de los aminoácidos en el músculo.

2.2.1.4. Comparación del catabolismo proteico muscular en ratas y en humanos.

Midiendo el contenido total de RNA en el hígado y en el músculo de varias especies de mamíferos con diferente tamaño corporal, MUNRO y GRAY (1969) demuestran que la cantidad de RNA en el músculo relacionada con la del hígado aumenta con el tamaño de las especies. Suponiendo que el contenido de RNA de un tejido es un índice del turnover proteico, se determina que el músculo podría contribuir de forma importante al turnover proteico corporal en las especies más grandes, como la vaca y el caballo, comparado con mamíferos más pequeños como el conejo y la rata. YOUNG y MUNRO (1978) demuestran que el músculo contribuye en el catabolismo muscular corporal total en los humanos jóvenes (27%) más que en la rata adulta (menos del 10%). Esto apoya las observaciones de MUNRO y GRAY (1969) sobre la importancia del músculo en diferentes especies.

2.3. BALANCE DE N Y EQUILIBRIO DINÁMICO.

En el animal adulto sano hay un equilibrio entre la ingesta y la excreción de compuestos nitrogenados. El nitrógeno se ingiere principalmente como proteínas y se excreta en su mayoría como urea.

En los animales jóvenes en período de crecimiento hay una retención neta de Nitrógeno en el organismo en forma de proteínas. Es decir, la excreción es menor que la ingesta, lo que indica un balance positivo de nitrógeno. En el caso de ayuno prolongado, alimentación con dietas inadecuadas y en algunas patologías hay una pérdida global de nitrógeno en el organismo y una pérdida de las proteínas tisulares. La excreción es mayor que la ingesta, provocando un balance negativo de nitrógeno.

La ingesta adecuada de nitrógeno y los requerimientos de proteínas se hacen en base al aporte proteico de la dieta. Los problemas más importantes en la interpretación de los resultados son los siguientes:

- 1) La existencia de una gran variación individual en los requerimientos proteicos, y del resto de los nutrientes.
- 2) La adaptación a diferentes niveles de ingesta proteica. Uno de los efectos de ésta es el no haber un cambio importante en el balance de nitrógeno con una dieta deficitaria, aunque la pérdida de nitrógeno sea máxima, pero en un período superior el balance se hace cada vez más negativo, después de haberse producido la pérdida máxima.
- 3) MUNRO y YOUNG (1981) indican que es difícil la determinación del nivel preciso de ingesta proteica que proporcione el balance cero de nitrógeno, porque la relación entre la ingesta de N y el balance no es lineal. Con ingesta superior y próxima a la que proporciona un balance cero de N hay una relación lineal, pero al aumentar la ingesta proteica disminuye la eficacia con que el tejido utiliza la proteína y disminuye la síntesis proteica.

2.3.1. BALANCE DE N.

Cuando se habla de N urinario o balance de N nos referimos al N amino, no al N total.

Se dice que un individuo tiene un balance de nitrógeno equilibrado cuando el nitrógeno ingerido en la dieta (I) iguala al eliminado por orina (U), heces (F) y piel (S).

$$I = U + F + S$$

El balance de nitrógeno es negativo cuando su excrección es superior al ingerido en la dieta y es positivo cuando la excrección es menor.

La estimación del balance de nitrógeno se realiza recogiendo la muestra durante varios días. Generalmente es suficiente con 5 días, pero es necesario un período de adaptación si el nitrógeno de la dieta en experimentación es diferente que la que tenía anteriormente.

El nitrógeno urinario y el de las heces se determina a partir de las muestras recogidas durante varios días. El eliminado por la piel es difícil de medir.

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

a) Crecimiento.

Durante este proceso el organismo retiene nitrógeno. Esta retención de nitrógeno está controlada por la hormona del crecimiento y por otras hormonas como la insulina y los andrógenos.

b) Daño físico.

Después de una lesión o una operación quirúrgica se produce una excrección de nitrógeno superior y un balance negativo, producido por una mayor liberación de hormonas adrenocorticales.

c) Ejercicio físico.

Se piensa que las personas que hacen un ejercicio físico duro necesitan gran cantidad de proteína en sus dietas. Para justificar científicamente esta afirmación es necesario demostrar que la actividad muscular aumente el catabolismo proteico, lo que causaría un balance de nitrógeno negativo, pero no está claramente demostrado.

Un atleta entrenando gana peso debido a la hipertrofia muscular con aumento de la síntesis proteica y con un balance positivo de nitrógeno.

d) Flora bacteriana intestinal.

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

2.3.2. EQUILIBRIO DINÁMICO.

En los seres vivos hay una continua destrucción y síntesis de proteínas, algunas de ellas con una vida media muy corta. Un adulto sano metaboliza al día más de 0,35 mg de proteína/Kg de peso, produciendo una cantidad de metabolitos nitrogenados que deben ser excretados. Esto representa la pérdida de nitrógeno endógeno obligatoria, a la que se sumará el nitrógeno procedente de la dieta que no se incorpora a las proteínas. Con la dieta se debe reemplazar la pérdida obligatoria de nitrógeno para mantener el equilibrio. Cualquier factor que altere la síntesis o la degradación proteica afecta al equilibrio de ambos procesos. En este equilibrio intervienen diversas hormonas, cuya acción se explica en el apartado 2.5.

2.3.3. NUTRICIÓN PROTEICO - ENERGÉTICA Y BALANCE DE NITRÓGENO.

Las necesidades corporales más inmediatas requieren metabolitos energéticos y, por tanto, hasta que las necesidades energéticas se cubran, las proteínas serán catabolizadas para proporcionar energía y no para la síntesis proteica.

IYENGAR y col. (1981) estudian las interrelaciones de la proteína y la ingesta energética y los requerimientos para adultos y niños en la India. Señalan que para los adultos es posible conseguir un balance positivo de nitrógeno con una ingesta de solo 1 g de proteína por Kg de peso y por día si la ingesta energética es de 232 Kj por Kg de peso y por día. Sin embargo, al reducir la ingesta energética diaria a 186 Kj por Kg de peso y por día hace que aumenten los requerimientos de proteína para mantener positivo el balance de nitrógeno a 1.2 g de proteína por Kg de peso y por día. Por debajo de esta ingesta energética debe aumentar la ingesta proteica para permitir, al menos, la retención mínima del nitrógeno.

Hasta que la FAO lo indicó en 1973 se solía considerar los requerimientos de energía y de proteínas por separado. Los dos se pueden combinar expresando la calidad de la proteína de una dieta no sólo como la calidad total de la proteína, expresada generalmente como NPU, sino también como la proporción de energía que se deriva de las proteínas. Así se define la proteína diaria neta como la NPU de la proteína de la dieta multiplicada por la energía derivada de las proteínas como proporción de la ingesta total de energía ingerida en la dieta.

2.4. MALNUTRICIÓN PROTEICO ENERGÉTICA.

La malnutrición proteico-energética provoca la aparición de una serie de desórdenes clínicos:

- El marasmo: Producido por una restricción continuada de energía y proteína en la dieta, así como de otros nutrientes.
- El kwashiorkor: Debido a una deficiencia cualitativa y cuantitativa en la ingesta proteica, pero en este caso la ingesta calórica es adecuada.

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

Los dos síndromes se engloban bajo el término malnutrición proteico-calórica desde 1959 (JELLIFE, 1959), debido a la asociación que se suele dar entre ellos.

El marasmo aparece típicamente en niños menores de 1 año, más frecuentemente en las ciudades; el kwashiorkor es una enfermedad propia de las áreas rurales en el segundo año de vida. La malnutrición proteico-calórica es característica de los niños menores de 5 años, en las zonas donde la dieta es pobre en energía y proteínas; en los adultos esta enfermedad es mucho menos frecuente y las manifestaciones clínicas mucho menos severas (McLAREN, 1966).

2.4.1. SÍNTOMAS DEL MARASMO.

Incapacidad de aprendizaje, irritabilidad, alternando con apatía. Diarrea. Muchos niños están hambrientos, pero algunos son anoréxicos. Muy poca grasa subcutánea. A menudo deshidratación. El peso está muy por debajo del correspondiente a su edad. La temperatura puede estar por debajo de lo normal. El abdomen puede estar distendido con gases. Los músculos están atrofiados. La piel y las mucosas pueden estar secas y atóxicas. Se pueden encontrar o no evidencias de carencias vitamínicas.

2.4.2. SÍNTOMAS DEL KWASHIORKOR.

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

2.4.3. DESÓRDENES METABÓLICOS Y BIOQUÍMICOS DEBIDOS A LA MALNUTRICIÓN PROTEICO-CALÓRICA.

Las demostraciones clínicas de la malnutrición proteico-calórica son consecuencia directa o indirecta de un aporte insuficiente de energía y de aminoácidos a los tejidos, necesarios para la síntesis proteica. Como resultado, se originan alteraciones funcionales de diferentes órganos.

2.4.3.1. Composición corporal.

Aumenta el contenido de agua, se pierden las reservas de grasa y de proteína de los músculos y otros tejidos, alterando en gran medida la composición química del organismo, disminuye el peso, y modifica la composición normal de los tejidos.

Se ha analizado los cuerpos de niños que han muerto de malnutrición proteico-calórica (PICOU y col., 1966), observándose que el contenido de la proteína corporal se reduce un 60% con respecto al de los niños sanos, del cual el 42% es colágeno. En un niño normal el colágeno representa un 27% de la proteína total del organismo. La proteína del colágeno se metaboliza muy lentamente, aumentando su proporción en los enfermos, aunque la mayor parte de la proteína celular se pierda.

2.4.3.2. Metabolismo general.

En malnutrición proteico-calórica la tasa metabólica se reduce, pero probablemente no más que la masa celular. No hay evidencia de ningún proceso de ahorro en la utilización de energía en la célula. Sí que se ha encontrado cambios adaptativos en cuanto a la utilización de las proteínas, que se describe más adelante.

Los tejidos tienen la capacidad de utilizar completamente la energía y las proteínas si son aportadas en cantidades suficientes, por lo que si a un enfermo con malnutrición proteico-calórica se le obliga a comer, durante el período de recuperación rápido la utilización de energía es aproximadamente un 40% por encima de lo normal. Los niños no rechazan el alimento hasta que el peso corporal es el normal correspondiente a su edad, lo que es un buen ejemplo de los mecanismos reguladores para controlar el peso corporal. Al final de la recuperación el niño recupera los valores analíticos similares de un niño normal.

2.4.3.3. Metabolismo proteico.

Un aporte alterado de aminoácidos se manifiesta por cambios característicos en el patrón de los aminoácidos plasmáticos (SAUNDERS y col., 1967). Las concentraciones plasmáticas de aminoácidos esenciales, especialmente los aminoácidos de cadena ramificada y de tirosina, son bajas, pero los de algunos aminoácidos no esenciales pueden ser más altos de lo normal. Cuando el aporte de aminoácidos se restablece, aumenta la concentración de aminoácidos en plasma y puede haber aminociduria.

La concentración de albúmina en plasma disminuye, debido a la incapacidad del hígado para mantener la síntesis, y es causa, en parte, del edema que suele aparecer en este tipo de carencias. Un aumento de albúmina en plasma es un signo de recuperación.

La IgG plasmática aumenta durante las infecciones, mientras que otras Ig son normales. La transferrina plasmática disminuye, especialmente en los casos severos, pudiendo ser una base de diagnóstico mejor que la albúmina plasmática. También disminuye el retinol plasmático unido a proteínas, lo que puede ser una causa que contribuye a la queratomalacia.

La concentración de algunas enzimas plasmáticas disminuye, lo que refleja la deplección de estas enzimas en los tejidos y en los órganos. Hay valores bajos de colinesterasa, fosfatasa alcalina, amilasa y lipasa.

La urea en plasma generalmente es baja, lo que refleja disminución del catabolismo proteico. También disminuye la creatinina en orina, lo que representa la disminución de la masa muscular.

2.4.3.4. Metabolismo lipídico.

En el kwashiorkor es frecuente el hígado graso, pero no lo es en el marasmo. El exceso de grasa en el hígado son principalmente triglicéridos. En el kwashiorkor, y no en el marasmo, están bajos los triglicéridos y el colesterol plasmáticos debido a la menor capacidad de las células hepáticas para movilizar los lípidos en forma de lipoproteínas.

En todas las formas de malnutrición proteico-energética tienden a ser elevadas las concentraciones de ácidos grasos libres, lo que probablemente es resultado del ayuno.

2.4.3.5. Metabolismo de los hidratos de carbono.

La glucemia suele ser normal, sin embargo puede aparecer hipoglucemia. La tolerancia a glucosa generalmente es normal, pero puede estar alterada.

2.4.3.6. Electrólitos y metabolismo líquido.

La pérdida por diarrea hace que el potasio y el magnesio disminuyan, mientras que el sodio plasmático se mantiene en valores normales.

El H⁺ plasmático puede estar elevado o disminuido. La acidosis que aparece puede ser debida a la mala circulación y a la consecuente hipoxia tisular. La alcalosis se relaciona con la deplección de potasio y la incapacidad de los riñones para eliminar bicarbonato.

El agua corporal total puede aumentar al 80% del peso corporal, cuando lo normal es 60% (GARROW y col., 1965). Los valores más elevados aparecen en marasmo, cuando la grasa corporal se ha reducido extraordinariamente. El aumento más importante se debe al agua extracelular, pero las células están sobrehidratadas. Esto puede complicarse por la diarrea aguda o crónica, conduciendo a la deshidratación.

2.4.3.7. Efectos de la malnutrición proteico-energética sobre el turnover proteico.

2.4.3.7.1. Efectos de la malnutrición proteico-energética sobre las tasas de síntesis y catabolismo de la proteína muscular.

HEARD y col. (1986) han descrito el efecto de tratamientos que inducen en ratas jóvenes muchas características bioquímicas asociadas con el Marasmo y el Kwashiorkor.

La respuesta general del músculo a la deficiencia dietaria, bien energética o proteica, es una reducción en la tasa de síntesis proteica. Esta respuesta se instaura rápidamente y se hace evidente en tan solo 1 día de privación dietaria. La reducción en la síntesis se acompaña, al menos en las primeras etapas, de una disminución en la tasa catabólica. Dado que la tasa de catabolismo proteico es elevada durante el crecimiento, la disminución de la tasa catabólica cuando se suprime el crecimiento sugiere que es el proceso de crecimiento por sí mismo el que induce la elevada tasa de catabolismo. La reducción del crecimiento impuesta por la deficiencia dietaria establece una tasa catabólica cerca del valor de mantenimiento encontrado en ratas adultas y, algunas veces, inferior (MILLWARD y col., 1983).

Si se mantiene la malnutrición durante varias generaciones el catabolismo es menor. La menor tasa catabólica se considera como una adaptación para posibilitar el crecimiento, aunque disminuya la síntesis. Aún así, la adaptación no es total, ya que el tamaño del músculo es la mitad que el de los animales bien nutridos.

2.4.3.7.2. Cambios en la eliminación de 3-metil-histidina.

Los patrones de cambios en el catabolismo proteico en algunos estudios se basan en la liberación de 3-metil-histidina en ratas (HAVERBERG y col., 1975b) y hombre (YOUNG y col., 1973) durante la privación de energía y proteína.

En ratas con una dieta baja en proteína se produce una reducción en la excreción de 3-metil-histidina por unidad de peso corporal, que es mucho mayor que la disminución observada durante el desarrollo en ratas bien alimentadas (HAVERBERG y col., 1975b). Esto indica una reducción real en la tasa catabólica de las proteínas contráctiles, aunque en realimentación el aumento de 3-metil-histidina es siempre menor que en las ratas controles.

GARLICK y col. (1975) sugieren que estos cambios se deben a una disminución en la tasa de turnover de las proteínas contráctiles durante la deplección proteica.

En ratas con una deficiencia dietaria severa de energía aumenta la liberación de 3-metil-histidina por unidad de peso corporal que en los controles (HAVERBERG, 1975b).

NISHIZAWA y col. (1977) miden la excreción de la 3-metil-histidina en ratas con diferentes ingestas de proteína, del 10 al 60%, comprobando que la excreción de 3-metil-histidina es mayor en las ratas alimentadas con las cantidades mayores de proteína, lo que significa que la tasa fraccional de catabolismo muscular aumenta o que la masa muscular es mayor. Estudiando el contenido de 3-metil-histidina en todo el organismo, no observan cambios en la composición corporal.

Por otro lado, la excreción de creatinina aumenta en la dieta con alto contenido en proteína. Al calcular la tasa de excreción de 3-metil-histidina con relación a la creatinina, no se observan diferencias entre grupos (MILLWARD y col. 1983).

2.4.3.7.3. Cambios en la tasa de síntesis de las fracciones proteicas musculares.

Al diferenciar cómo afecta la deficiencia nutricional a las distintas fracciones proteicas musculares (colágeno, sarcoplásmica y miofibrilar), ANASUYA y RAO, (1970) señalan que el colágeno muscular se acumula en cantidades casi normales, lo que indica que la síntesis de colágeno es mucho menos sensible a deficiencias nutricionales que el resto de las proteínas intracelulares.

YAMAGUCHI y KANDATSU (1967) demuestran pérdidas semejantes de las fracciones proteicas musculares, sarcoplásmica y miofibrilar, en ratas con deficiencia proteica. MILLWARD y col. (1974) no encuentran, en ningún tipo de deficiencia, una alteración en las cantidades relativas de las dos fracciones. El mantenimiento constante de la composición de la masa proteica durante el crecimiento o la atrofia con diferentes tasas de turnover, sólo se puede explicar por cambios en las tasas relativas de síntesis y/o catabolismo de cada proteína (MILLWARD y col., 1983).

MILLWARD y col. (1983) miden las tasas relativas de síntesis de las proteínas sarcoplásmicas y la actomiosina en ratas de diferentes edades en estado de ayuno y pletórico, y sometidas a distintos períodos de deficiencia dietaria. Observan que en período de crecimiento en las adultas es menor el índice S/A tras una noche de ayuno; ya que es mayor el aumento de la síntesis de actomiosina. Cuanto más rápido es el crecimiento, es mayor la diferencia entre las síntesis relativas. Si el período de ayuno es mayor, induce una pérdida de proteínas y aumenta el índice S/A, como resultado de una mayor disminución en la tasa de síntesis de actomiosina. Concluyen que la tasa de síntesis de la fracción que tiene un turnover más lento es más sensible a cambios nutricionales.

2.4.3.8. Efecto de la malnutrición sobre el contenido de DNA y sobre la síntesis por unidad de DNA.

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

En estudios en los que se someten ratas en crecimiento a deficiencia proteica y energética se demuestra (TRENKLE, 1974) que la concentración crítica de la dieta necesaria para el crecimiento del DNA muscular estaba entre 3 y 6% en proteína. Cuando se administran cantidades reducidas de dietas elevadas en proteínas se inhibe marcadamente la acumulación de DNA en músculo, pero no se suprime completamente. TRENKLE (1974) concluye que, tanto la restricción proteica como la energética, inhiben la síntesis de DNA en el músculo, y que la síntesis de DNA es más sensible a esas deficiencias que la acumulación de proteína. Sin embargo, no hay evidencia de que haya pérdida de DNA en esas condiciones.

En ratas malnutridas el aumento de DNA es menor (MILLWARD y col., 1975) que en los controles, lo que conduce a déficit en el DNA total en músculo. La unidad de DNA, sin embargo, no es menor que en control. Las tasas de síntesis proteica por unidad de DNA sólo disminuyen en ratas muy jóvenes. Por tanto, en las ratas en crecimiento se inhibe la proliferación de núcleos, siendo mucho menos activa. Esta menor actividad es resultado de una menor relación RNA/DNA, así

como de una incapacidad para conseguir las tasas de síntesis por unidad de RNA de las ratas bien nutridas. Como las tasas de síntesis proteica por unidad de DNA son normales a otras edades, la limitación de la síntesis proteica responsable del fracaso en el crecimiento del músculo es consecuencia, en último término, de un número insuficiente de núcleos.

En una malnutrición severa (MILLWARD y col., 1973), cuando se suprime el crecimiento y se inducen grandes pérdidas de N proteico, el tamaño de la unidad de DNA disminuye y las tasas de síntesis por unidad de DNA bajan. Por tanto, en este caso, los núcleos que existen son menos activos.

Para cualquier músculo, el determinante del tamaño del músculo es el número de unidades de DNA (contenido de DNA), más que el tamaño de las unidades de DNA (MILLWARD y col., 1983).

2.4.3.9. Efecto de la malnutrición sobre el contenido de RNA y sobre la síntesis por unidad de RNA.

Se asume que el RNA ribosómico es, al menos, un 80% del total. YOUNG y col. (1977), señalan que la concentración de RNAr aumenta de forma paralela con el RNA total del músculo. Los cambios en la concentración de RNA total en el músculo reflejan alteraciones en la concentración de ribosomas. La concentración de ribosomas disminuye en el músculo en ratas con deficiencia proteica y se asocia con una disminución de la actividad ribosómica in vitro.

HOWARTH Y BALDWIN (1971) encuentran una reducción del 60% en la concentración de RNA en el músculo de ratas con dietas restringidas, viendo que la concentración de RNA es muy sensible a la ingesta proteica. Las ratas alimentadas con dietas del 6% de proteína aumentan su proteína muscular, aunque en menor cantidad, pero todas disminuyen el contenido de RNA en el músculo. A mayores concentraciones de proteína dietaria, se acumula más RNA.

En resumen, el RNA muscular responde a cambios agudos de la dieta, pero no se tiene claro si es más sensible a dietas carentes en energía o en proteínas.

HENSHAW y col. (1971) fueron los primeros en medir la relación entre actividad y cambios en la concentración de RNA, concluyendo que la variación en la actividad RNA es el principal factor para controlar la tasa de síntesis proteica muscular. Observan que existe un considerable grado de variabilidad en sus valores

de control para la actividad RNA que estaba entre 1,4 y 1,7 g de proteína sintetizada/g de RNA/día, y en esta medida se relaciona con las tasas de crecimiento de la rata.

Parece que la actividad RNA está deprimida más por deficiencia energética que por falta de proteína (MILLWARD y col., 1976b). La actividad RNA en ratas alimentadas con una dieta del 3,5% de proteína está en el rango de los controles, así como las alimentadas sin proteína. Sólo cuando se restringe la ingesta energética o en ayuno disminuye significativamente la actividad RNA. La concentración de RNA en el músculo es muy sensible a la restricción dietaria, disminuyendo progresivamente con el tiempo.

2.5. REGULACIÓN ENDOCRINA DEL METABOLISMO PROTEICO MUSCULAR.

Las proteínas en el músculo esquelético, como en otras células, están sujetas a un turnover continuo, y la tasa total de catabolismo proteico en este tejido, como la tasa de síntesis, está controlada de forma precisa. La regulación de la proteólisis en el músculo es importante en la homeostasis energética total, en el control de la masa muscular y en el crecimiento corporal, así como en la adaptación del organismo a diferentes situaciones de stress (KETTELHULT y col., 1988).

El metabolismo proteico muscular está controlado por dos tipos de hormonas:

- *Anabólicas*: Originan un aumento de las proteínas musculares. Entre ellas se encuentran la hormona del crecimiento, insulina y andrógenos.

- *Catabólicas*: Causan una pérdida de proteínas musculares. Entre ellas se hallan las hormonas tiroideas, los corticoides y los estrógenos.

Estas hormonas tienen, por lo general, efectos contrarios en el músculo respecto a los que realizan en el resto del organismo.

2.5.1. HORMONA DEL CRECIMIENTO.

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

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

Esta hormona afecta a varios parámetros del metabolismo intermediario de las proteínas, lípidos e hidratos de carbono.

La hormona del crecimiento tiene un papel importante en el metabolismo proteico y en la regulación del crecimiento. Promueve la síntesis de proteínas y la retención de nitrógeno, ya que estimula el paso de los aminoácidos desde el compartimiento extracelular al intracelular y la incorporación de los mismos a proteínas celulares.

La actividad de esta hormona está mediada por un grupo de polipéptidos de bajo peso molecular: las somatomedinas, que son sintetizadas en el hígado a partir de la hormona del crecimiento y pasan a circulación para actuar sobre las células efectoras. También numerosos tejidos son capaces de sintetizar estos péptidos, permitiendo que actúen localmente, estimulando el crecimiento de manera auto y paracrina. Según esto, la GH actuaría como estimulante de la multirrespuesta tisular de fabricación de somatomedinas y de crecimientos locales.

Los efectos más específicos de la hormona del crecimiento son disminuir la utilización de glucosa, incrementar la formación de proteínas y estimular la lipólisis.

Los efectos antagónicos de la hormona del crecimiento sobre la captación de glucosa estimulada por insulina, pueden ser mediados por un cambio en los receptores insulínicos (FLIER y col., 1979). Esta acción provoca un aumento compensatorio en la secreción de insulina, con lo que la tolerancia a glucosa permanece normal.

Sin embargo, si aumenta la hormona del crecimiento, ya sea por secreción pituitaria o por inyección, o si la secreción de insulina disminuye (tendencia génica a diabetes), la concentración de glucosa en sangre se eleva.

Disminuye los niveles sanguíneos de urea y de aminoácidos, lo que refleja menor catabolismo proteico y mayor captación de aminoácidos.

Eleva los niveles de ácidos grasos libres, como consecuencia de la mayor movilización de grasas del tejido adiposo (estimula la lipólisis).

2.5.1.1. Factores que afectan la secreción de la hormona del crecimiento.

Un descenso de la concentración de glucosa en sangre estimula la secreción de la hormona del crecimiento.

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

La ingesta de proteínas y la perfusión intravenosa de aminoácidos dan lugar a la secreción de insulina y de hormona del crecimiento. Esto conduce a una acción concertada de las dos hormonas sobre los niveles de glucosa en sangre y sobre la síntesis de proteínas.

El "stress" provoca la liberación de la hormona del crecimiento.

La insulina y la IGF1 (somatomedina), además de su homología estructural y evolutiva, actúan fisiológicamente de forma concertada: la insulina sería responsable de la regulación aguda de la homeostasis metabólica y de los depósitos energéticos, mientras que la IGF1 se encargaría de la diferenciación celular y de los procesos lentos de crecimiento (TRESQUERRES, 1992).

2.5.2. INSULINA.

Hormona que controla el depósito y metabolismo de glucosa, grasas y aminoácidos. Si su concentración disminuye en sangre, moviliza algunos metabolitos endógenos y reduce la captación de los nutrientes ingeridos.

La insulina actúa en los tejidos hepático, muscular y adiposo. En cada uno de estos tejidos produce efectos, tanto anticatabólicos como anabólicos, que se refuerzan entre sí.

En el hígado los efectos anticatabólicos se traducen en una disminución de la glucogenolisis y cetogénesis, en el tejido adiposo reduce la lipólisis, en el muscular inhibe la proteólisis y la pérdida de aminoácidos.

En cambio, los efectos anabólicos sobre el hígado provocan la síntesis de glucógeno y de ácidos grasos, en el tejido adiposo incrementan la captura de ácidos grasos y la esterificación de los mismos; por último en el músculo incrementan la captación de aminoácidos, la síntesis proteica y la de glucógeno.

2.5.2.1. Efectos de la insulina en el hígado.

Al comparar el hígado con el músculo y el tejido adiposo se observa que estos últimos son menos sensibles a pequeños aumentos en la concentración plasmática de insulina (DE FRONZO y col., 1983). Esta mayor sensibilidad de hígado se debe a que el hepatocito es totalmente permeable a la glucosa, y la captura de ésta no está limitada por su concentración en sangre.

El punto principal de la iniciación del metabolismo de la glucosa radica en la fosforilación de la misma a glucosa-6-fosfato, que está regulada por la hexoquinasa. Mientras que la hexoquinasa hepática se satura a concentraciones fisiológicas de glucosa, la hexoquinasa, en otros tejidos, se satura solamente a la mitad, aún cuando la concentración de glucosa plasmática sea de 180 mg/dl (1,8 g/l). Por lo tanto, esta enzima interviene cuando la concentración de glucosa en sangre es alta, con el fin de disminuirla. Por ello, la sensibilidad del hígado es mayor a los cambios en la concentración de glucosa sanguínea y a los de insulina.

Otro paso crucial en la ruta glucolítica se debe a la fosforilación de la glucosa-6-fosfato por la enzima fosfofructoquinasa I, activada por la fructosa-2,6,-difosfato. Cuando la concentración de insulina es óptima favorece la glucólisis tisular e inhibe la gluconeogénesis.

Por el contrario, una deficiencia de insulina reduce los niveles de fructosa-2,6-difosfato y disminuye la actividad de la fosfofructoquinasa I, activando la fructosadifosfatasa. El efecto neto es invertir el paso de piruvato (alanina) a glucosa, es decir, un efecto catabólico.

Otra acción importante de la insulina sobre la liberación de glucosa desde el hígado es inhibir la gluconeogénesis. La etapa principal en este proceso radica en el paso entre piruvato y fosfoenolpiruvato, que depende de las actividades relativas de la piruvato-carboxilasa y la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa, por un lado, y piruvatoquinasa, por otro. Las actividades de estas dos enzimas se ajustan inversamente, bien por una inhibición rápida por metabolitos específicos, o más lenta por inducción y desinducción insulino-dependiente.

Cuando se altera la disponibilidad de ácidos grasos libres, el hígado produce gluconeogénesis. La insulina disminuye la gluconeogénesis porque reduce la disponibilidad de los aminoácidos precursores de la gluconeogénesis.

La hiperinsulinemia, hiperglucemia y, posiblemente, señales del tracto gastrointestinal, de la vena porta (ISHIDA y col., 1983) y del flujo de substratos glucogénicos contribuyen a la regulación del balance de glucosa hepática.

2.5.2.2. Efectos de la insulina en el músculo.

El efecto más importante que ejerce la insulina en el músculo es el control del transporte de la glucosa plasmática en concentraciones fisiológicas. El producto final mayoritario de la captura de glucosa por el músculo en estado de reposo es el glucógeno. El sistema fosfofructoquinasa en el músculo también está influenciado por la insulina, mediante un mecanismo similar al que tiene lugar en el hígado, con la diferencia de que la reacción para la producción de glucosa es menos importante.

La captura de glucosa por el músculo en ejercicio no depende del aumento en la concentración de insulina.

La insulina aumenta el transporte de la mayoría de los aminoácidos en el músculo, estimula la síntesis de proteínas e inhibe el catabolismo proteico (FELIG y col., 1977). En presencia de cantidades fisiológicas de insulina disminuye la salida de aminoácidos de los tejidos. Este efecto es particularmente importante en los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina, así como los aromáticos tirosina y fenilalanina. La acción de la insulina sobre el intercambio de aminoácidos musculares tiene importancia por disminuir los niveles sistémicos de aminoácidos (HASSELGREN y col., 1987).

En ausencia de cantidades adecuadas de insulina se ha demostrado que aumentan las concentraciones plasmáticas de valina, isoleucina y leucina. La captura de estos aminoácidos por el músculo, después de una ingesta proteica, se reduce si hay escasez de insulina (FELIG y col., 1977).

La acción anabólica total de la insulina consiste en provocar un aumento de la síntesis proteica e inhibir el catabolismo de las proteínas. También inhibe la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada en el tejido muscular. Por lo tanto, la insulina aumenta las reservas corporales de proteína.

Los niveles de aminoácidos en plasma son consecuencia de todos los factores que controlan el flujo de aminoácidos en todo el organismo. En el estado postabsortivo los niveles de aminoácidos plasmáticos reflejan el balance entre su liberación desde el músculo esquelético y su captura por el hígado (FUKAGAWA y

col., 1986).

Se observa un descenso en los niveles plasmáticos de aminoácidos tras la ingesta de glucosa, debido al aumento de insulina (ADIBI y col., 1975). La insulina estimula el transporte de aminoácidos a las células y disminuye la liberación de los aminoácidos libres del músculo.

El efecto de la insulina sobre los aminoácidos es selectiva; los aminoácidos de cadena ramificada son más sensibles a los efectos de la insulina (leucina, isoleucina, valina), pero también actúa sobre la fenilalanina, tirosina, serina y prolina (FELIG y col., 1977).

Después de la absorción se reducen los niveles de leucina, isoleucina y valina, lo que parece deberse a la insulina, que aumenta la captación y disminuye la liberación del músculo (FULKS y col., 1975).

La hiperinsulinemia disminuye los niveles de aminoácidos de cadena ramificada y algunos gluconeogénicos en plasma, excepto alanina y glicina.

2.5.2.3. Efectos de la insulina en el tejido adiposo.

La insulina actúa también en el adipocito, estimulando el transporte de glucosa a través de la membrana celular, afectando a la glucógeno-sintetasa y a la fosfofructoquinasa. El producto final mayoritario del metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo es importante para el almacenaje de grasas porque proporciona al medio el glicerol necesario para la síntesis de triglicéridos.

2.5.3. GLUCAGÓN.

Los estímulos fisiológicos más importantes en la secreción del glucagón son la ingesta de proteínas, perfusión de aminoácidos y ejercicio físico intenso. También aumenta por hipoglucemia, administración de grandes dosis de epinefrina y por hipocorticalismo (UNGER, 1985).

La hipoglucemia puede provocar secreción de glucagón por un mecanismo α -adrenérgico, independiente de la insulina (UNGER, 1985). La secreción de glucagón disminuye tras la ingestión o perfusión de glucosa.

2.5.3.1. Acción del glucagón.

Se sabe que los aumentos fisiológicos en la concentración de glucagón producen un incremento de la concentración plasmática de glucosa, por estimulación de la glucogenólisis hepática. En contraste, una disminución en la concentración de glucagón por debajo de los niveles basales produce una disminución en la producción de glucosa hepática (CHERRINGTON y col., 1976). Sin embargo, cuando el aumento en la concentración de glucagón va acompañado de un pequeño aumento en la concentración de insulina circulante, permanece inalterada la producción de glucosa hepática. Este último fenómeno es importante para estudiar la respuesta a una comida proteica.

En base a las acciones opuestas de la insulina y del glucagón en hígado y dado que la glucosa suprime la secreción de glucagón mientras estimula la secreción de insulina, UNGER (1985) sugiere que es la relación molar insulina/glucagón la que gobierna la homeostasis total de los hidratos de carbono, más que la concentración de ambas hormonas por separado.

El glucagón interviene en la regulación de la cetogénesis. Aumenta la producción de cetonas a partir de los ácidos grasos libres (BERRIDGE, 1984). Los aumentos en la oxidación de los ácidos grasos libres y la cetogénesis son el resultado de su efecto inhibitorio sobre la lipogénesis hepática, disminuyendo la disponibilidad de malonil-coenzima A, más que de la estimulación de la lipólisis periférica.

El primer paso de la acción del glucagón en el hígado es la interacción con un receptor específico de la membrana celular; esto parece ser diferente y más sencillo que la transmisión de la señal de la insulina. La unión del glucagón con su receptor activa una unidad catalítica efectora acoplada, que contiene la enzima adenilciclase, que convierte ATP en AMP, que es el mensajero intracelular del glucagón. La acción de la adenilciclase está mediada por una proteína reguladora, dependiente de GTP (RODBELL, 1985).

RODBELL (1985) sugiere que esta proteína reguladora puede disociarse en moléculas más pequeñas, debido a la activación por GTP y glucagón, y que estas moléculas pueden actuar como mensajeros de la hormona, además del AMP. Al mismo tiempo, el cambio en la proteína reguladora puede disminuir la afinidad del receptor por el glucagón. El aumento en la concentración de AMP, inicia algunas reacciones de fosforilación, resultando de ello una activación de la glucógeno-fosforilasa y una inhibición de la glucógeno-sintetasa. Esta acción es antagonizada

por la insulina, que reduce la actividad de la proteinquinasa dependiente de AMP_c (MATO y col., 1987) y aumenta la actividad de la fosfodiesterasa, responsable de la degradación del AMP_c.

Los pasos en el control de la fuente de energía sensibles a glucagón, mediados por AMP_c, van en dirección a la gluconeogénesis, situados a nivel de la conversión del piruvato a fosfoenolpiruvato por inducción de la síntesis de la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa y la fructosa-difosfatasa 2.

Se ha observado que, a dosis farmacológicas, el glucagón disminuye la secreción gástrica y de enzima pancreática, aumenta la concentración sérica de la hormona del crecimiento y la contractibilidad del miocardio.

2.5.4. SOMATOSTATINA.

La somatostatina inhibe la liberación de la hormona del crecimiento. Es un factor inhibitorio de la secreción de insulina y de la de glucagón.

También actúa inhibiendo varias hormonas gastrointestinales, como gastrina y secretina (GERICH y col., 1978). Esto produce una disminución en la absorción de glucosa y de aminoácidos.

2.5.5. CATECOLAMINAS

Las catecolaminas producen efectos metabólicos múltiples, con acciones indirectas y directas.

2.5.5.1. Acciones indirectas de las catecolaminas sobre el metabolismo.

Son el resultado de cambios inducidos por las catecolaminas sobre la secreción de hormonas que regulan los procesos metabólicos. Por ejemplo, suprimen (por mecanismos α_1) y estimulan (por mecanismos β_2) la secreción de insulina, predominando generalmente el efecto supresor. También estimulan el glucagón y la hormona del crecimiento.

Hay evidencia de una modulación adrenérgica de la secreción de la mayoría de las hormonas.

2.5.5.2. Acciones directas de las catecolaminas sobre el metabolismo.

Las acciones directas de las catecolaminas incluyen la estimulación de diferentes procesos:

- Producción de glucosa hepática (glucogenolisis y gluconeogénesis), liberación de glucosa y limitación de la utilización de glucosa por el Sistema Nervioso Periférico (β_2) (CLUTTER y COL., 1980; DEIBERT y DE FRONZO., 1980; RIZZA y COL., 1980a y 1980b).
- Glucogenolisis y glucolisis, produciendo mayor liberación de lactato y piruvato desde los tejidos (β_2).
- Liberación de algunos aminoácidos desde el músculo (β_1), como alanina.
- Lipolisis (β_1), con aumento en la liberación de glicerol y ácidos grasos, que predomina sobre la inhibición α_1 de la lipolisis.
- Cetogénesis hepática y liberación de los ácidos grasos hacia el hígado.
- Cambios de potasio (K) y fosfato en las células, causando hipopotasemia e hipofosfatemia (BODY y col., 1983).
- Termogénesis (LANDSBERG y col., 1984).

La inhibición en la secreción de insulina causada por las catecolaminas tiene un efecto hiperglucemiante (CLUTTER y col., 1980). El bloqueo α -adrenérgico evita este efecto (RIZZA y col., 1980a y 1980b). Por otro lado, hay cierta secreción de insulina cuando se producen elevaciones constantes de epinefrina (CLUTTER y col., 1980; RIZZA y col., 1980a y 1980b). Esto es fisiológicamente importante, ya que hay una inhibición frente a la respuesta glucémica de la epinefrina (BERK y col., 1985).

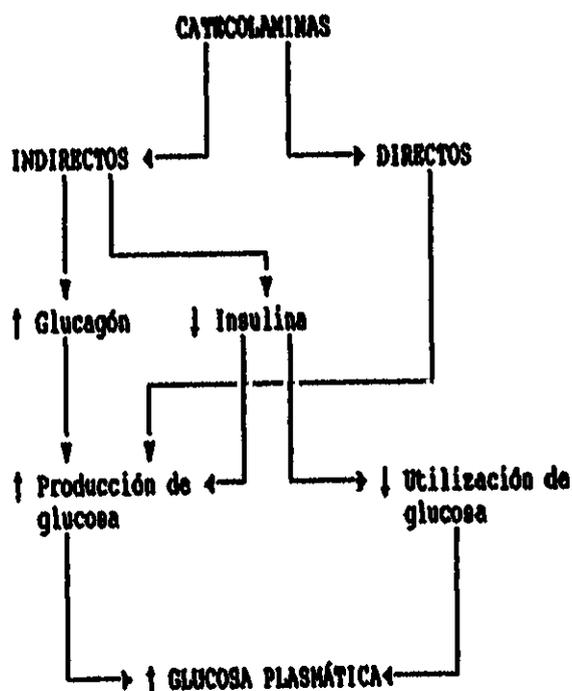
El papel de la secreción de glucagón estimulada por adrenalina está menos claro. Se ha demostrado, en diferentes estudios, aumentos de glucagón plasmático durante perfusiones de epinefrina, mientras que en otros estudios estos aumentos son menos evidentes.

Además de estimular el metabolismo del glucógeno, la epinefrina interfiere con la captación de glucosa mediada por insulina (DEIBERT y DE FRONZO, 1980). Un aumento de epinefrina plasmática produce una disminución en las reservas de glucosa, inducido por el aumento de insulina en plasma posterior a una ingesta. Este efecto está mediado por receptores β -adrenérgicos.

La epinefrina es un potente agente lipolítico, por su capacidad de estimular la lipasa AMP, dependiente del tejido adiposo. la disminución de la captura de glucosa, inducida por la epinefrina, también limita la disponibilidad del glicerol-3-fosfato para la reesterificación.

En contraste con sus efectos inhibitorios sobre la secreción de insulina, la epinefrina estimula la secreción de glucagón. La hiperglucemia que aparece después de la administración de epinefrina, representa un efecto mediado por dos hormonas, que se impide cuando se evita la hiperglucemia por administración de somatostatina y persiste cuando se administra glucagón en dosis de reemplazamiento, sugiriendo que la somatostatina puede bloquear la respuesta hepática a la epinefrina, independientemente de la disponibilidad de glucagón (SACCA y col., 1979).

Los estímulos principales que aumentan la actividad del Sistema Nervioso Simpático y la secreción de catecolaminas son el ejercicio, trauma, fiebre, cirugía e hipoglucemia, siendo la influencia proporcional al aumento del estímulo.



2.5.6. CORTICOIDES.

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

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

La adrenalectomía aumenta la actividad de las catepsinas libres en los tejidos, y se ha sugerido que una de las funciones de las hormonas corticosteroides es mantener la estabilidad de la membrana lisosomal. BIRD y col. (1968) muestran que una restricción en la ingesta del 25% con respecto a la normal aumenta la actividad total de catepsina en los tejidos, sin cambiar la fracción libre, y sugieren que se debe al stress provocado por la restricción alimentaria, que estimula la secreción de corticosteroides.

OBLED y col. (1980) demuestran que la actividad de la catepsina es independiente de la ingesta de alimentos en experimentación animal. En la rata, que se alimenta por la noche, esta actividad es máxima al amanecer, ya que necesita catabolizar las reservas disponibles de proteínas como fuente de metabolitos que le proporcionen energía, dado que no se alimenta durante el día.

Sin embargo, el cortisol parece no tener efecto, o un efecto contrario, sobre la actividad de las catepsinas. La principal respuesta metabólica a los corticoides a nivel molecular es la formación de dos enzimas hepáticas, la triptófano-oxigenasa y la tirosina-aminotransferasa. El aumento en la actividad de estas dos enzimas lleva a una deplección de las reservas hepáticas de tirosina y de triptófano, además de la captura de estos aminoácidos por la circulación. Esto significa que la disponibilidad de tirosina y triptófano es un factor limitante para la síntesis proteica, y en este caso se reduce.

El concepto de equilibrio dinámico entre las tasas de síntesis y catabolismo es importante cuando se considera las acciones de las hormonas glucocorticoides (cortisol en el hombre y corticosterona en la rata). Desde el punto de vista de la fisiología de todo el organismo, la respuesta a la mayor secreción o administración de estas hormonas es un catabolismo de las proteínas musculares y un aumento en la gluconeogénesis en el hígado. En este caso predomina el catabolismo sobre la síntesis, favoreciendo el catabolismo total de las proteínas tisulares. Los aminoácidos que provienen de este catabolismo no se puede utilizar para la síntesis de otras proteínas debido a la escasez de triptófano y de tirosina, y se metabolizan por la misma ruta que otros aminoácidos, como desaminación, para ser utilizados como sustrato energético o síntesis de glucosa, según las necesidades en ese momento.

2.5.6.1. Acciones de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los hidratos de carbono.

Los glucocorticoides en exceso aumentan la producción de glucógeno hepático y de glucosa y disminuyen la captación y utilización de esta última en los tejidos periféricos (LENZEN y BAILEY, 1984). Esto da como resultado una tendencia a la hiperglucemia y una disminución en la tolerancia a los hidratos de carbono.

Los glucocorticoides aumentan la producción de glucosa, por mejorar la capacidad del hígado para la gluconeogénesis, a partir de sustratos gluconeogénicos de los tejidos periféricos y por incrementar la capacidad de otras hormonas para llevarla a cabo (EXTON, 1979).

Los glucocorticoides son necesarios para la respuesta a la gluconeogénesis en animales en ayuno y deficientes en insulina, pero no para la gluconeogénesis basal en estado alimentado.

Se ha discutido si los distintos pasos de la gluconeogénesis aumentan por los glucocorticoides. Estos esteroides aumentan la síntesis total de proteínas hepáticas y varias transaminasas, principalmente la alanina-aminotransferasa (COUFALIK y MONDER, 1981). Sin embargo, tiene mayor influencia sobre la gluconeogénesis en los pasos distales de la transaminación.

Los glucocorticoides aumentan la actividad de la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (COUFALIK y MONDER, 1981), que es inhibida por la glucosa y, probablemente, de la glucosa-6-fosfatasa. También aumentan la sensibilidad del hígado al glucagón y catecolaminas (GOLDBERG y col., 1980).

Estos efectos se pueden observar en ausencia de insulina y de glucógeno plasmáticos (SIMMONS y col., 1984). Con el tiempo, los glucocorticoides producen hiperinsulinismo por efecto secundario, que puede atenuar la degradación proteica (ODEDRA y MILLWARD, 1982).

Por otra parte, los glucocorticoides producen mayor liberación del sustrato gluconeogénico desde los tejidos periféricos (ODEDRA y MILLWARD, 1982). Disminuyen la síntesis de proteínas y pueden aumentar su catabolismo en varios tejidos, como el muscular, adiposo y linfoide, lo que induce una mayor liberación de aminoácidos (SIMMONS y col., 1984). Esto va acompañado de una mayor excreción urinaria de 3-Metil-Histidina, nitrógeno y aminoácidos, principalmente valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina e histidina (SHAMOON y col., 1980), aminoácidos que son precursores gluconeogénicos. También aumentan la conversión de leucina a alanina y la concentración plasmática de piruvato, así como mejoran los niveles de aminoácidos gluconeogénicos disponibles, por bloqueo de los efectos estimuladores de la insulina sobre la captura de aminoácidos en tejidos periféricos y síntesis de proteínas (EXTON, 1979).

En humanos, el exceso de glucocorticoides incrementa los niveles de varios aminoácidos (SHAMOON y col., 1980), persistiendo la concentración elevada de alanina en estado postprandial. Esto puede ser debido a la conversión de otros aminoácidos a alanina, que es el precursor gluconeogénico más importante, por transaminación con el piruvato.

Los glucocorticoides aumentan la liberación de glicerol de las células grasas, por estímulo de la lipólisis, unido a una liberación mayor de lactato por el músculo, contribuyendo así a una disponibilidad mayor de sustratos gluconeogénicos (EXTON, 1979). El aumento de la lipólisis produce también ácidos grasos libres que, aunque no contribuyen directamente al aumento de la glucogenólisis, pueden suministrar energía para este proceso y reservar otros sustratos, que pueden ser convertidos en glucosa.

Otro tipo de efectos de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los hidratos de carbono resulta de la inhibición que producen en la captura de glucosa y en su utilización por tejidos periféricos. Inhiben directamente la captación de glucosa por el tejido adiposo, fibroblastos y células grasas. Incluso, en el músculo, pueden disminuir la captura de glucosa relativa a su concentración en sangre, aunque no se ha demostrado este efecto (CARTER-SU y OKAMOTO, 1985).

Tienen efectos complejos sobre la liberación de insulina y su acción (LENZEN y BAILEY, 1984) y originan un nivel mayor de insulina basal y de insulina estimulada por glucosa, llegando a hiperplasia de las células B pancreáticas a largo plazo. Estos efectos se deben, principalmente, a la hiperglucemia inducida por los glucocorticoides.

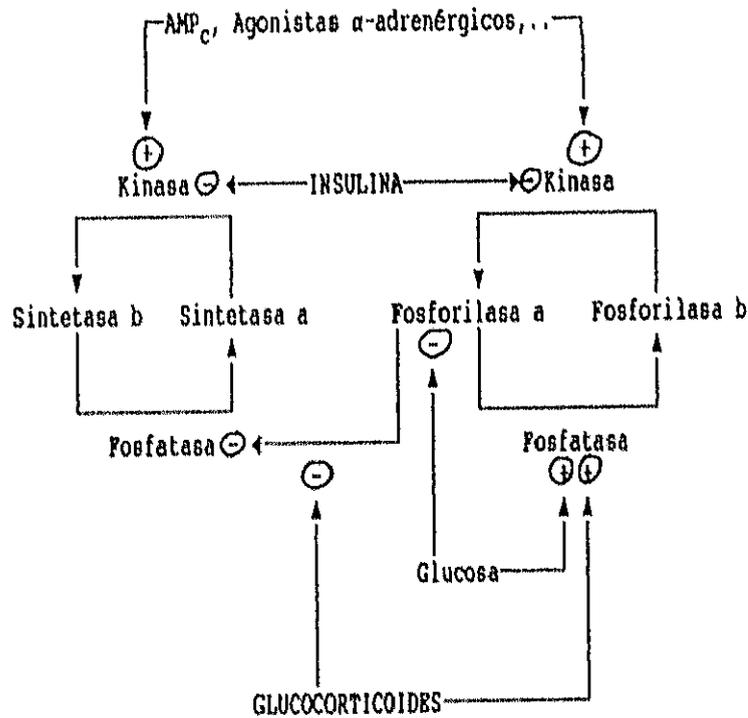
Dado que aumentan los niveles plasmáticos de insulina y de glucosa, aparece resistencia a la insulina cuando hay exceso de glucocorticoides. Esto se debe a las acciones de los glucocorticoides, que actúan como antagonicas a la insulina a nivel post-receptor. Se cree que los glucocorticoides pueden aumentar, disminuir o no afectar los niveles de receptores de insulina, disminuir la afinidad insulina-receptor y estimular la degradación de insulina, aunque la contribución total de estas acciones no se ha aclarado (LENZEN y BAILEY, 1984).

2.5.6.2. Acciones de los glucocorticoides sobre el metabolismo del glucógeno.

Los glucocorticoides aumentan el glucógeno depositado en el hígado de los animales, alimentados o no (STALMANS y LALOUX, 1979). En este caso, los glucocorticoides tienen una acción similar a la de la insulina, actuando como protectores frente al ayuno prolongado, por favorecer el almacenamiento del glucógeno, mientras que la insulina es más importante a corto plazo, por disminuir la concentración de glucosa en sangre, por conversión de ésta en glucógeno.

El mecanismo por el cual los glucocorticoides favorecen el almacén de glucógeno es por activación de la enzima glucógeno-sintetasa, favoreciendo la conversión de la forma inactiva, glucógeno-sintetasa "b", a la forma activa, glucógeno-sintetasa "a". Esto puede ser el resultado de una estimulación de la glucógeno-sintetasa-fosfatasa que activa la glucógeno-sintetasa por bloqueo de la acción de la glucógeno-fosforilasa "a", que inhibe la fosfatasa.

El mecanismo por el cual los glucocorticoides favorecen el almacén de glucógeno se señala en el siguiente esquema:



Un efecto secundario de los glucocorticoides puede ser la inhibición del catabolismo del glucógeno por inactivación de la fosforilasa "a", que puede ocurrir por estímulo de su conversión en fosforilasa "b" (inactiva), mediada por mecanismos desconocidos (STALMANS y LALOUX, 1979). Esto puede suceder porque la fosfatasa (activada por glucocorticoides) estimula la glucógeno-sintetasa y también inactiva la enzima que convierte la fosforilasa "b" a fosforilasa "a". Este efecto puede producir una disminución en la cantidad de fosforilasa "a". Todo esto, unido a la estimulación de forma indirecta de la secreción de insulina por los glucocorticoides, lleva a mayor acumulación de glucógeno en el hígado (SACCA y col., 1979).

2.5.6.3. Acciones de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los lípidos.

Los glucocorticoides aumentan la lipólisis y, por tanto, el nivel de ácidos grasos libres en plasma (FAIN, 1979). Esta acción aumenta como consecuencia de la menor captura de glucosa y metabolitos, inducida por glucocorticoides, que disminuye la producción de glicerol, necesario para la reesterificación de los ácidos grasos libres. A esto se suma una serie de acciones permisivas de los

glucocorticoides, que aumentan la eficiencia de otros factores lipolíticos, como las catecolaminas (FAIN, 1979). El aumento de ácidos grasos libres y el posible aumento de la conversión hepática de éstos a cetonas, causado por glucocorticoides, produce una tendencia a cetosis que favorece la liberación de insulina y la gluconeogénesis.

En estados de exceso de glucocorticoides hay un aumento de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL), con la consecuente elevación de los triglicéridos totales y niveles de colesterol en plasma (TASKINEN y col., 1983). Los mecanismos para estos cambios son, probablemente, multifactoriales, con la influencia sobre la síntesis de VLDL, producción de ácidos grasos libres, actividad de la lipasa endotelial hepática y de otros componentes.

2.5.6.4. Acciones de los glucocorticoides sobre el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos.

Los glucocorticoides afectan al metabolismo de DNA y de RNA (BAXTER, 1979). Estimulan la síntesis en el hígado, inhiben la síntesis y estimulan el catabolismo en muchos tejidos periféricos como músculo, piel, tejido adiposo, linfoide y fibroblastos.

El efecto general sobre la síntesis de DNA es inhibitorio, aunque hay varias circunstancias que estimulan la síntesis de DNA y, raramente, su catabolismo. Esto se puede interpretar como un intento general del organismo para proveer de substratos a la gluconeogénesis hepática desde tejidos menos esenciales, como el músculo, y para disminuir otros tipos de substratos utilizados, mientras se almacenan en otros tejidos críticos, como el cerebro y el corazón.

En el hígado los glucocorticoides estimulan la síntesis de proteínas y de RNA. Estos efectos son selectivos, favoreciendo más unas proteínas, como la tirosina-aminotransferasa, que otras (BAXTER, 1979).

Los efectos en el músculo son también selectivos, con mayor influencia sobre las fibras blancas glucolíticas tipo II que sobre las I (CLARK y VIGNOS, 1979).

Los corticoides mejoran la proteólisis y disminuyen la síntesis proteica muscular. La influencia sobre la proteólisis es, probablemente, el efecto más importante y está asociado con aumentos en algunos enzimas proteolíticos (CLARK y VIGNOS, 1981)

2.5.7. HORMONAS TIROIDEAS.

Las hormonas tiroideas tienen acciones importantes sobre el gasto energético y sobre la regulación del turnover proteico en músculo.

La T₃ influye directamente sobre la degradación proteica, activando tanto el mecanismo lisosomal como el no lisosomal dependiente de ATP. También influye sobre la síntesis proteica mediante la regulación en la producción de ribosomas. Sólo cuando la citada hormona está presente en cantidades elevadas predominan sus efectos catabólicos (KETTELHULT y col., 1988c).

Se ha asociado la disminución plasmática en T₃ en ratas con deficiencia proteica con la disminución de la síntesis y del catabolismo proteico, así como con la regulación del balance energético, especialmente si existen relaciones bajas proteína/energía (COX y col., 1984).

MILLWARD y col. (1985) sugieren que la disminución en la proteólisis es una adaptación mediada por la T₃ para reducir el efecto de la alteración de la síntesis proteica sobre el crecimiento. Esto está cuestionado por JEPSON y col. (1988), que no han podido diferenciar la influencia de la insulina y de la T₃ sobre la proteólisis, con lo que no comparten la sugerencia de la adaptación específica mediada por T₃.

JEPSON y col. (1988) indican que la disminución de T₃ en carencias proteicas sería en parte responsable de la disminución de la síntesis y el catabolismo proteico, lo que permitiría el crecimiento. Otros autores (SAWAYA y LUNN, 1985) señalan un estado hipertiroideo en la deficiencia proteica que hace que disminuya el crecimiento, afirmando que la glándula tiroidea se adapta a situaciones de ingesta energética excesiva consiguiendo así mantener el crecimiento en dietas hipoproteicas. JEPSON y col. (1988) señalan a este respecto que la situación tiroidea refleja más la ingesta proteica que la energética.

2.6. ADAPTACIÓN NUTRICIONAL.

2.6.1. GENERALIDADES.

Todos los animales y plantas están adaptados a su entorno. De otra manera no podrían sobrevivir y reproducirse.

El propósito de una adaptación es mantener el estado funcional del organismo dentro de unos límites aceptables, como respuesta a un cambio ambiental o a un stress y, una vez alcanzado, mantenerlo (WATERLOW, 1990).

HENRY y col.(1953) estudian la relación entre la masa proteica hepática y la ingesta proteica en rata. Observan un aumento exponencial, teniendo cada aumento sucesivo de ingesta proteica menor efecto sobre la proteína hepática. Suponen que, al no observar un cambio importante en el contenido proteico, las variaciones están reguladas por la cantidad de proteína y por el DNA en las células hepáticas, ya que es improbable que el contenido de DNA se altere con la ingesta proteica.

Si a un adulto se le expone a niveles bajos de ingesta energética (WATERLOW, 1990), la respuesta inevitable es una disminución del peso corporal. Como hay muchos factores que influyen en el gasto energético en relación con el peso corporal, si la ingesta energética es demasiado baja, el balance energético se renueva tras alcanzar el nuevo peso. La FAO (1987) ha llamado a este hecho "Adaptación biológica sin esfuerzo", sin determinar cuánto puede disminuir, hasta qué punto y a qué coste.

Para conseguir una adaptación a bajas ingestas proteicas, la primera defensa del organismo es disminuir la excreción de urea, por medio de importantes cambios en la actividad y cantidad de los enzimas del ciclo de la urea. Así se produce una reducción de las enzimas aminotransferasas y deshidrogenasas que ayudan a la transferencia de nitrógeno al ciclo (aminotransferasas) y a la reducción (deshidrogenasas) (DAS y WATERLOW, 1974). Este ajuste es de pocos días, hasta que el sujeto vuelve al nuevo balance de N, e implica una pérdida muy pequeña de nitrógeno corporal total. Parece improbable que esta pequeña pérdida pueda tener un significado funcional (BEGGS y col., 1987). Por tanto, en el rango de esta primera línea de defensa que mantiene el balance de nitrógeno, no hay déficits funcionales. Si esta línea de defensa no es suficiente, habrá un balance negativo y pérdida de nitrógeno corporal. Sin embargo, a no ser que la ingesta de nitrógeno sea mucho

mayor que la pérdida obligatoria de nitrógeno, el sujeto alcanzará de nuevo el balance con menor masa corporal (WATERLOW, 1990).

2.6.2. ADAPTACIONES METABÓLICAS A DIETAS ALTERADAS EN PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS.

Las ingestas alteradas de proteína y aminoácidos modulan las tasas de los sistemas principales responsables del mantenimiento de la proteína orgánica y corporal y de la homeostasis de aminoácidos (síntesis proteica, degradación proteica, oxidación de aminoácidos) .

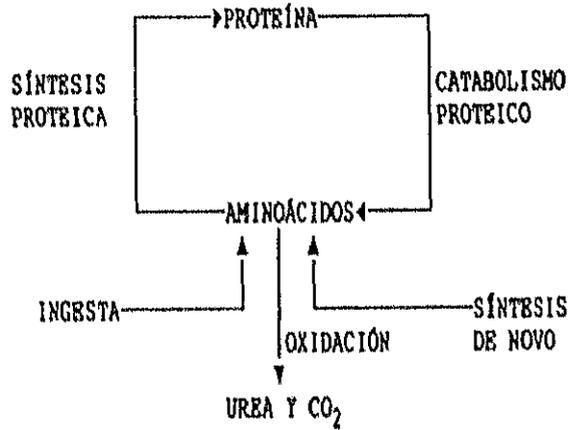
En 1905, FOLIN (1905a) estudió los efectos de ingestas bajas y altas en proteína sobre la composición química de la orina. Observó que al reducir la ingesta de nitrógeno disminuye la eliminación de urea, pero altera poco otros constituyentes de la orina, como creatinina, azufre neutro y ácido úrico. De estas observaciones desarrolló su teoría del metabolismo proteico (FOLIN, 1905b), que dividió en endógeno y exógeno. Desde entonces ha variado mucho el concepto de modulación nutricional del metabolismo del nitrógeno, proteínas y aminoácidos. Basándose en todos los estudios realizados, WATERLOW (1990) establece que "Los mecanismos para reducir la pérdida de nitrógeno con bajas ingestas proteicas están razonablemente bien definidos. Lo que no está claro es hasta qué punto la adaptación a largo plazo puede disminuir la pérdida de nitrógeno".

Así mismo, indica que "Hay muchos factores que complican el llegar a una conclusión conveniente y relativamente simple. Estos factores incluyen, en particular, el tipo de tejido y de células, los genes y productos genéticos de interés, la nutrición específica, los aminoácidos esenciales y no esenciales que se consideren, el período de tiempo que implica el cambio y los efectos de otros factores dietarios no proteicos, así como la especie animal".

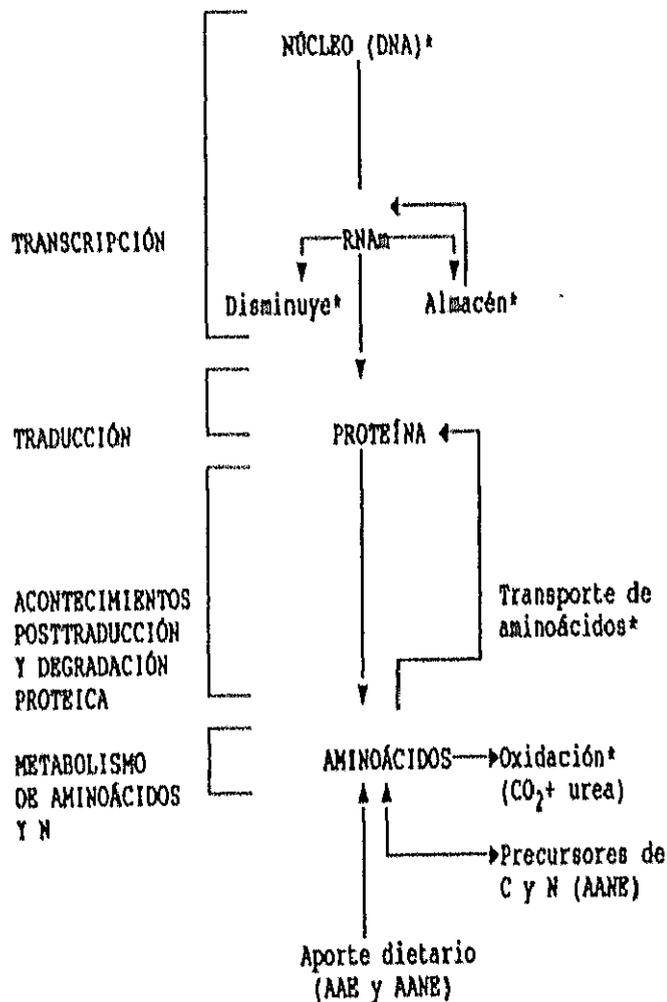
2.6.2.1. Adaptación nutricional celular.

Los sistemas principales para mantener la homeostasis de proteínas y de aminoácidos son la síntesis proteica, la degradación proteica, la oxidación de aminoácidos y la síntesis de aminoácidos no esenciales. Los cambios en las tasas de estos sistemas permite un ajuste del balance de nitrógeno, que estará en equilibrio o será negativo según el grado de deficiencia en que se encuentre la ingesta proteica.

El siguiente esquema señala los destinos y procedencias principales de los aminoácidos, así como su intervención en el turnover proteico.



A continuación se indican los pasos de la síntesis proteica y del catabolismo proteico que pueden estar alterados adaptativamente por cambios en el aporte de aminoácidos a las células, señalados por (*).



2.6.2.1.1. Aspectos transcripcionales y traduccionales de la síntesis proteica.

El hígado y el músculo esquelético contribuyen de manera importante a las tasas de síntesis proteica corporal total y de catabolismo (GARLICK y col., 1980).

Estos tejidos sufren mecanismos de adaptación con ingestas alteradas en proteínas y aminoácidos. Los efectos de estas dietas sobre la síntesis proteica en músculo e hígado han sido ampliamente revisadas (WATERLOW y col., 1978b; GARLICK y col., 1980; MILLWARD, 1980a). Si a un animal se le administra una dieta libre en proteína se produce una disminución inmediata en la síntesis proteica, debido a cambios en la eficacia de la traducción del RNAm. Sin embargo, si esta dieta se prolonga, se produce una disminución total de la capacidad de síntesis proteica del músculo. En el hígado, según GARLICK y col. (1975), en estas condiciones experimentales la tasa de síntesis proteica cambia poco al principio, a continuación de incrementa durante un tiempo antes de disminuir cuando se prolonga el tiempo de suministro de esta dieta. Esto se debe, en ambos tejidos, a una disminución en la fase traduccional de la síntesis de polipéptidos.

Las últimas investigaciones que se han realizado en hepatocitos aislados de rata han puesto de manifiesto que la disminución de la síntesis proteica va acompañada de una marcada disgregación de los polisomas y de una disminución de la formación de los complejos de iniciación 43S. Esta disminución está asociada con un aumento de la fosforilación de la subunidad α de los factores de iniciación de las células eucarióticas eIF2. Por tanto, se considera que la privación de aminoácidos incrementa la actividad de la kinasa eIF2 α (o inhibe una fosfatasa) y hay una disminución en el factor GEF (Factor de intercambio del nucleótido guanina), que de esta forma inhibe en menor medida la fosforilación, impidiendo la síntesis proteica (WATERLOW, 1990).

MILLWARD y col. (1976a), en ratas alimentadas con dieta sin proteínas, observan una disminución inmediata en la síntesis proteica al medir la actividad RNA (síntesis proteica / unidad de RNA celular) debido a un cambio en la eficiencia de la traducción de RNAm. Sin embargo, con la ingestión continua de una dieta inadecuada se produce una disminución en la capacidad total de la célula muscular, o unidad nuclear, para promover la síntesis de proteínas en este tejido (disminuye la síntesis y el catabolismo). La disminución inicial, producida por la ingesta de una dieta baja en proteínas, de la síntesis proteica en el músculo y, probablemente en el hígado, puede ser debido a acontecimientos citoplasmáticos y, específicamente, a una alteración en la fase traduccional de la síntesis de polipéptidos. La fase de iniciación

parece ser el lugar principal de los cambios agudos, según la disponibilidad de aminoácidos (MOLDAVE, 1985).

Si continúa el aporte inadecuado de aminoácidos, los acontecimientos citoplasmáticos que afectan el estado de la maquinaria sintética de proteínas van acompañados de alteraciones en la fase transcripcional de la síntesis proteica, ya que disminuye el RNAm (YOUNG Y MARCHINI, 1990). Sin embargo, la realimentación parece producir cambios más lentos en las concentraciones de RNAm que los que producen los cambios en las tasas de síntesis proteica (DE JONG Y SCHREIBER, 1987).

También hay estudios que muestran que los factores nutricionales, especialmente los aminoácidos, afectan la función y estructura de los genes. Por ejemplo, las tasas de transcripción del RNA nucleolar se reducen en células de ratón cuando se privan de aminoácidos (GRUMMT Y col., 1976); la actividad de la RNA polimerasa hepática se reduce cuando las ratas se someten a una dieta sin lisina. (ASTROM y VON DER DECKEN, 1983). De hecho, las menores cantidades de RNAr en hígado y músculo con ingestas bajas en proteínas podrían reflejar estos cambios (GARLICK y col., 1980; MILLWARD, 1980a).

2.6.2.1.2. Degradación proteica.

La alimentación de ratas con una dieta proteica inadecuada disminuye la tasa de catabolismo proteico muscular (GARLICK y col., 1975; MILLWARD y col., 1976b). En contraste con ello, la tasa de catabolismo proteico en el hígado puede aumentar al inicio de la restricción de la disponibilidad de aminoácidos, pero disminuye después, cuando continúa la ingesta deficiente en aminoácidos (GARLICK y col., 1975). Estas observaciones confirman que la composición proteica de tejidos y órganos está determinada por las tasas relativas de catabolismo proteico. Estas tasas están influidas por hormonas y factores nutricionales, entre otros.

De acuerdo con las consecuencias del menor aporte de aminoácidos, parece que la tasa de catabolismo proteico en el hígado está regulada, en principio, por los aminoácidos (YOUNG Y MARCHINI, 1990).

MORTIMORE y PÖSÖ (1987) demuestran que las mezclas completas de aminoácidos plasmáticos pueden inducir respuestas catabólicas aceleradas en ausencia de hormonas como insulina y glucagón. No todos los aminoácidos tienen la misma importancia para disminuir el catabolismo proteico: leucina, tirosina, fenilalanina,

glutamina, prolina, histidina, triptófano y metionina son particularmente efectivos, y entre ellos la leucina parece ser el inhibidor más efectivo del catabolismo proteico y la alanina parece actuar como corregulador en la expresión de la actividad inhibidora de estos aminoácidos.

YANG y col. (1986) señalan una elevación en la concentración plasmática y tisular de alanina cuando se consumen dietas bajas en proteínas, lo que puede tener un papel causal en la reducción de la tasa de catabolismo hepático.

MILLWARD (1980b), revisó los posibles mecanismos implicados en la degradación normal y la degradación acelerada de proteínas musculares, sin llegar a ninguna conclusión. Posteriormente, consideró la posibilidad de que las menores concentraciones de T_3 (triyodotironina) puede ser importante, pero no determinó si éstas suceden tan pronto como los cambios en el catabolismo proteico muscular tras la ingesta de una dieta baja en energía (MILLWARD y col., 1981).

Parece estar clara la importancia de los cambios que produce la ingesta de una dieta alterada en proteínas y en aminoácidos sobre el catabolismo proteico y sobre las respuestas adaptativas. Sin embargo, se necesita profundizar más antes de establecer los mecanismos responsables de estos cambios.

2.6.2.1.3. Oxidación de aminoácidos.

La oxidación de los aminoácidos tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los aminoácidos corporales (HARPER, 1986).

HARPER (1986) indica que las ratas que consumen dietas bajas en aminoácidos esenciales específicos, como histidina, leucina o treonina, tienen menor tasa de oxidación de aminoácidos y se mantiene hasta que se supere la ingesta del aminoácido necesario para cubrir las necesidades de crecimiento máximo.

En humanos se ha demostrado que dietas bajas en proteínas (MOTIL y col., 1981), o en aminoácidos esenciales como leucina, valina (MEGUID y col., 1986), lisina (MEREDITH y col., 1986) y treonina (ZHAO y col., 1986) conducen a una conservación de aminoácidos asociada con una tasa menor del catabolismo de los mismos. Esta conservación se debe, en parte, a la disminución en las concentraciones de aminoácidos, ya que las K_m para varias enzimas que degradan aminoácidos son relativamente altas (HARPER, 1986), y se saturan raramente en los rangos fisiológicos de concentraciones de aminoácidos en plasma y tejidos. En cambio, las

K_m de las aminoacil-t-RNA-sintetasas son bajas (HARPER, 1986).

Por tanto, se espera que estas enzimas funcionen a altas tasas y que sus RNAt estén cargados completamente aunque sean bajas las ingestas de aminoácidos. El efecto de estas diferencias es que los aminoácidos se canalizan más fácilmente a rutas de síntesis y la eficacia de la retención de aminoácidos dietarios y endógenos aumentará cuando la ingesta se reduzca.

La reducción en la oxidación de aminoácidos a bajas ingestas de los mismos producirá cambios paralelos en la concentración plasmática de aminoácidos. YOUNG y col. (1985) demuestran este hecho en adultos alimentados con dietas carentes en leucina o en lisina.

HARPER (1986) concluye que las actividades de los enzimas que intervienen en la degradación de algunos aminoácidos varían paralelos con los cambios en la ingesta proteica. Estos cambios se pueden deber a mecanismos alostéricos, a alteraciones en la cantidad del enzima y a cambios en la proporción de enzima en forma activa o inactiva.

Según YOUNG y MARCHINI (1990), la oxidación de aminoácidos varía rápidamente como consecuencia de una ingesta alterada de los mismos. Los cambios en la disponibilidad del sustrato parecen ser el determinante principal, al menos inicialmente.

Las enzimas de la degradación de los aminoácidos también están alterados, tanto en su actividad específica como en la cantidad presente, cuando la ingesta de proteínas y de aminoácidos varía. El efecto neto de estos factores es la conservación de aminoácidos y de nitrógeno cuando la ingesta es baja y, por el contrario, se pierden cantidades altas de nitrógeno proteico y carbono cuando las ingestas son abundantes.

2.6.2.1.4. Enzimas del ciclo de la urea.

Es necesario considerar el papel del ciclo de la urea como un medio para ajustar la tasa de pérdida de nitrógeno y aminoácidos cuando se alteran las ingestas.

Las enzimas del ciclo de la urea son una ruta metabólica para la conversión del amonio potencialmente tóxico, eliminar el exceso de aminoácidos por vía oxidativa, transferir el nitrógeno a arginina y, en último término, a urea cuando las

ingestas proteicas son elevadas. Alternativamente, la ruta podría facilitar la conservación de nitrógeno cuando las ingestas son bajas.

Estas enzimas están compartimentalizados en el hígado y algunas de ellas se encuentran en la mitocondria de la mucosa intestinal y en la fracción extramitocondrial del riñón.

Los estudios de SCHIMKE (1970), muestran que las adaptaciones metabólicas a diferentes cantidades de proteína se asocian con cambios paralelos en las actividades de los enzimas del ciclo de la urea en el hígado. Observa que estos cambios se deben a diferencias en el contenido de la proteína específica más que a cambios en la actividad específica, aunque esta respuesta no se produce en todos los mamíferos.

La alteración paralela en la actividad de las enzimas del ciclo de la urea y la liberación de nitrógeno no es, sin embargo, una relación simple de causa y efecto (DAS y WATERLOW, 1974). Por ejemplo, la capacidad in vitro de la enzima limitante, la arginino-succinato-sintetasa, en el hígado de ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas, está en exceso considerable en relación con la actividad que teóricamente se necesita para mantener el flujo de nitrógeno en el ciclo de la urea. Por supuesto, esta capacidad enzimática a una ingesta baja en proteínas podría ofrecer al animal un mecanismo de protección cuando la ingesta proteica sea de nuevo abundante.

De todos modos, YOUNG Y MARCHINI (1990) no aprecian totalmente cómo el proceso de producción de urea dirige la eliminación de aminoácidos cuando se consumen en exceso de las necesidades o disminuyen sus tasas de pérdida cuando las ingestas no son adecuadas.

DAS y WATERLOW (1974) demuestran un cambio lineal entre las aminotransferasas, así como los enzimas del ciclo de la urea con la ingesta de proteína dietaria. Por el contrario, la actividad de la deshidrogenasa de los cetoácidos de cadena ramificada permanece baja y relativamente constante por encima del rango de la ingesta de leucina de la dieta, que está por debajo del nivel de requerimiento para el crecimiento máximo.

Un ejemplo del último mecanismo es la regulación de la actividad de la segunda enzima en la ruta catabólica de los aminoácidos de cadena ramificada, la deshidrogenasa de los cetoácidos de cadena ramificada (RANDLE y col., 1987).

Se está investigando la regulación dietaria y hormonal de la deshidrogenasa de los cetoácidos de cadena ramificada. Este área ayudará a comprender cómo se regulan las concentraciones de aminoácidos plasmáticos y tisulares y producen un patrón aminoacídico característico de un estado nutricional particular.

En resumen, la oxidación de aminoácidos cambia rápidamente como respuesta a una ingesta alterada de aminoácidos. Los cambios en la disponibilidad de sustratos parece ser el determinante primario, al menos inicialmente. Las enzimas degradantes de aminoácidos también están afectadas, con alteraciones en su actividad específica, así como en la cantidad presente cuando varía la ingesta de proteínas y de aminoácidos. El efecto neto de estos factores es una conservación de los aminoácidos y del nitrógeno cuando la ingesta es baja y, por el contrario, mayores pérdidas de N aminoacídico y carbono cuando las ingestas son más abundantes.

2.6.3. ASPECTOS DEL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS IN VIVO.

Los aminoácidos se han dividido en tres tipos:

- Los *aminoácidos esenciales*: no se pueden sintetizar en el organismo y son necesarios para mantener el balance de N en adultos y el crecimiento en animales jóvenes. Incluye a los que se pueden sintetizar en el organismo hasta cierto punto, en cantidades insuficientes para permitir el crecimiento completo, como son arginina e histidina.

- Los *aminoácidos no esenciales*: se pueden sintetizar en cantidades aparentemente adecuadas si existe una fuente de N disponible, es decir, si la ingesta total de aminoácidos es adecuada. Son necesarios para el organismo, pero no hay requerimientos dietarios para ellos, porque se pueden formar a partir de intermedios metabólicos.

- Hay dos aminoácidos que ocupan una situación ambigua entre los que son esenciales y los que no lo son: *Cisteína y tirosina*. Estos se pueden sintetizar en el organismo en condiciones normales, sólo a partir de aminoácidos esenciales: metionina para cisteína y fenilalanina para tirosina. Esto significa que, aunque ninguno de los dos aminoácidos es esencial por sí mismo, su presencia en la dieta reserva los aminoácidos precursores, lo que es especialmente importante en el caso de metionina y cisteína, ya que la disponibilidad de metionina es un factor limitante en la utilización de los aminoácidos de la dieta.

Las principales rutas de síntesis de los aminoácidos no esenciales son las siguientes:

Transaminación del piruvato	→	Alanina.
Ciclo de la urea	→	Arginina.
Transaminación del oxalacetato	→	Ác. aspártico.
Transulfuración de metionina	→	Cisteína.
Transaminación del α -Cetoglutarato	→	Ácido glutámico.
Transmetilación de serina	→	Glicina.
De glutámico o de ornitina	→	Prolina.
Transaminación de hidroxipiruvato	→	Serina.
Hidroxilación de fenilalanina	→	Tirosina.

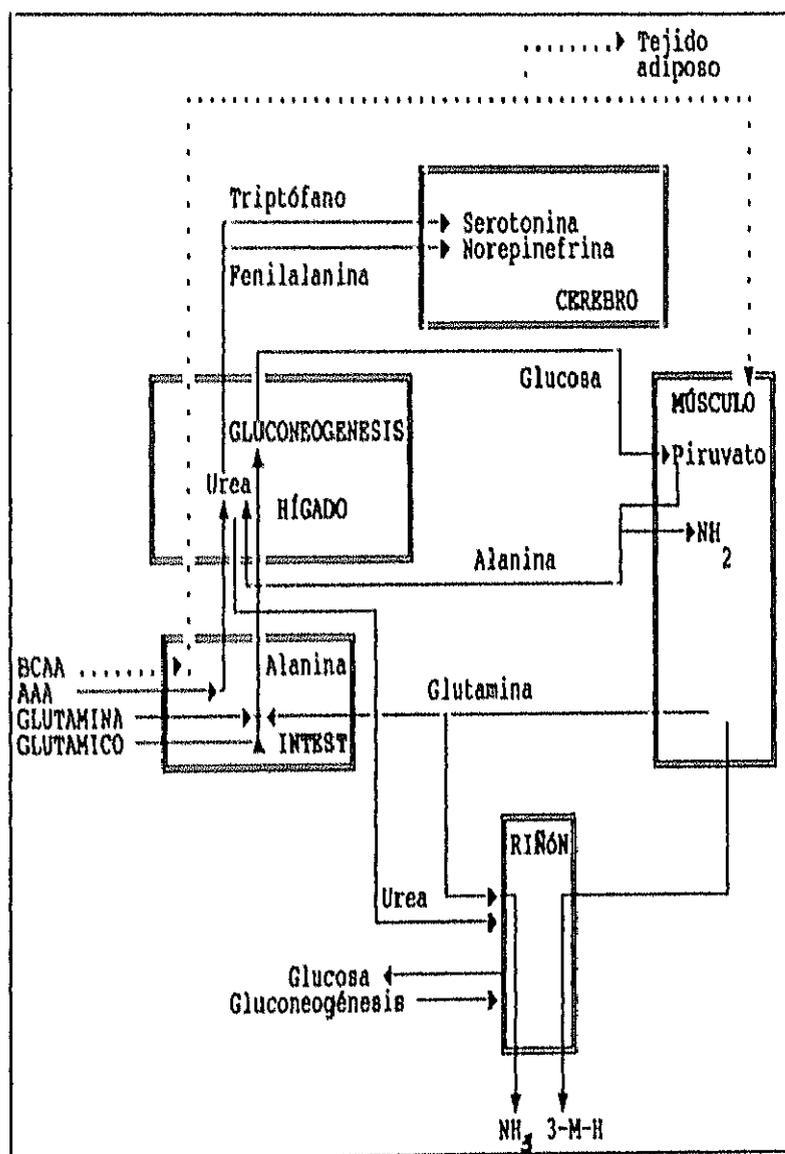
Cuando el aporte de aminoácidos a las células y órganos es menor, el organismo se adapta mediante relaciones reguladoras y metabólicas entre las células y entre diferentes órganos, por lo que es necesario integrar los cambios bioquímicos y mecanismos responsables de éstos. Es decir, situarlos en el contexto de la respuesta del organismo como un todo (MUNRO, 1983).

BIER (1989) estudia en humanos el transporte de aminoácidos específicos desde el plasma señalando que no sólo existen diferencias según el aminoácido específico de que se trate, sino que su regulación parece estar sometida a diferentes controles. De hecho, CHRISTENSEN (1986) afirma que los flujos de aminoácidos no son simplemente consecuencia de un transporte indiscriminado e intermitente de aminoácidos que llegan desde los alimentos proteicos, sino que está regulado en lugares específicos de los órganos y por varios mecanismos.

Es necesario comprender estos mecanismos in vivo y los puntos de control del flujo de aminoácidos específicos en sujetos sometidos a diferentes condiciones alimentarias para definir la naturaleza de la adaptación a dietas alteradas en proteínas y aminoácidos. YOUNG Y MARCHINI (1990) han estudiado los posibles mecanismos de que dispone el organismo para conseguir menores pérdidas de nitrógeno y mejorar la utilización de aminoácidos cuando no son adecuadas las ingestas. Según señala HARPER (1986), los cambios en la síntesis proteica hepática y la oxidación de aminoácidos tisulares se deben observar como una respuesta adaptativa en el sentido de que, cuando se consumen dietas bajas en proteínas, la región esplénica no hará una llamada desproporcionada causada por el aporte limitado de aminoácidos exógenos. De esta forma, los aminoácidos también estarán

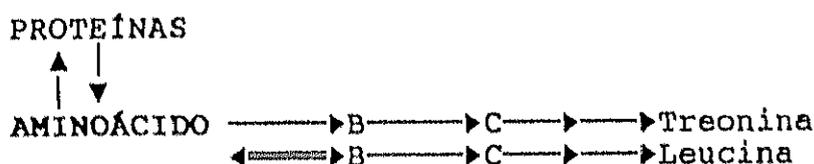
disponibles para cubrir los requerimientos metabólicos desde los tejidos periféricos. De acuerdo con esta hipótesis, tras la ingesta de una dieta baja en proteínas no sólo habría menor captación de aminoácidos esenciales en forma global en la región esplácnica, sino que también variará poco la proporción de un aminoácido específico ingerido (absorbido) que circula con propósitos metabólicos en esta zona.

En el siguiente cuadro se representan las rutas principales del metabolismo de aminoácidos en todo el organismo, así como la implicación de glutamina y alanina y las interrelaciones con los aminoácidos de cadena ramificada esenciales en la economía de todo el organismo (MUNRO, 1983).

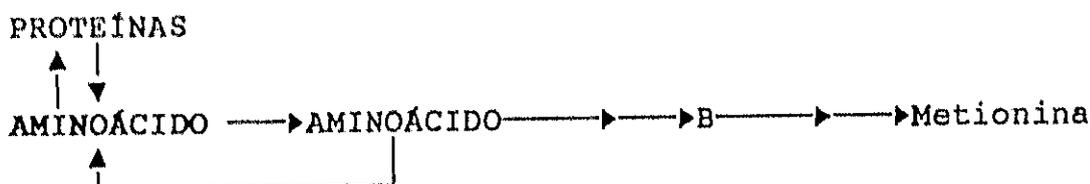


Otro aspecto "in vivo" corresponde a los papeles del turnover proteico y del metabolismo de aminoácidos en la conservación de aminoácidos y de nitrógeno cuando se restringen la proteína o los aminoácidos. YOUNG y MARCHINI (1990) han organizado los aminoácidos en cuatro clases diferentes, según la estructura de su ruta principal de metabolismo.

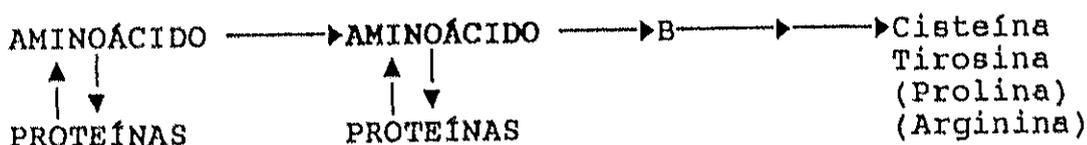
- Los aminoácidos de la clase 1 se metabolizan por vía de una serie de pasos consecutivos, algunos de ellos irreversibles (ej: treonina). Los aminoácidos de cadena ramificada siguen una secuencia similar, excepto el paso inicial, que incluye una transaminación reversible.



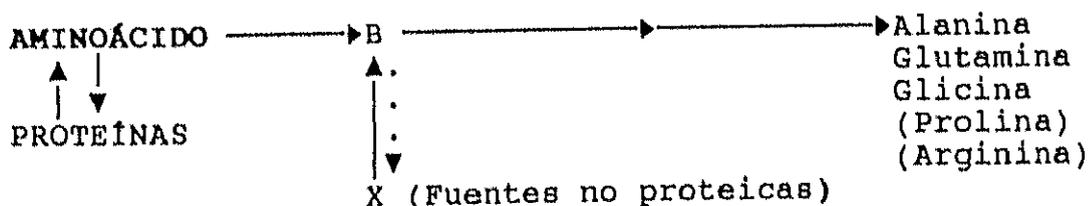
- Los aminoácidos de la clase 2 (ej: metionina) se convierten en otro aminoácido que puede, o bien sufrir una transformación irreversible en diferentes metabolitos, o ser transformado en el aminoácido inicial.



- Los aminoácidos de la clase 3 derivan, en parte, de otros aminoácidos (ej: cisteína de metionina, tirosina de fenilalanina). Se incluye aquí la prolina, aunque su metabolismo es más complejo.



- Los aminoácidos de la clase 4 se pueden fabricar a partir de fuentes no aminoacídicas (ej: alanina, glutamina).



En las cuatro clases de aminoácidos se debería reconocer que el turnover proteico es una contribución importante al flujo de los mismos. Por tanto, se debería esperar que los cambios en el turnover proteico tuvieran una influencia importante en el flujo, la tasa metabólica y los requerimientos nutricionales de aminoácidos. De hecho, los estudios de Young y col. (YOUNG y col., 1985) apoyan esta hipótesis por la observación de la existencia de un paralelismo general entre los cambios de las tasas del turnover proteico y las necesidades dietarias para todos los aminoácidos durante el crecimiento y desarrollo de un individuo sano. Aproximadamente se necesita 1 g de proteína dietaria para cubrir las necesidades de la síntesis de 5 g de proteína corporal tanto en el niño como en el adulto. Según esto, se debería esperar un aumento en las tasas de síntesis proteica o turnover proteico para aumentar las necesidades dietarias; por el contrario, la disminución en las tasas de turnover requerirían menor cantidad de un aminoácido exógeno para mantener el balance de aminoácidos y de proteínas.

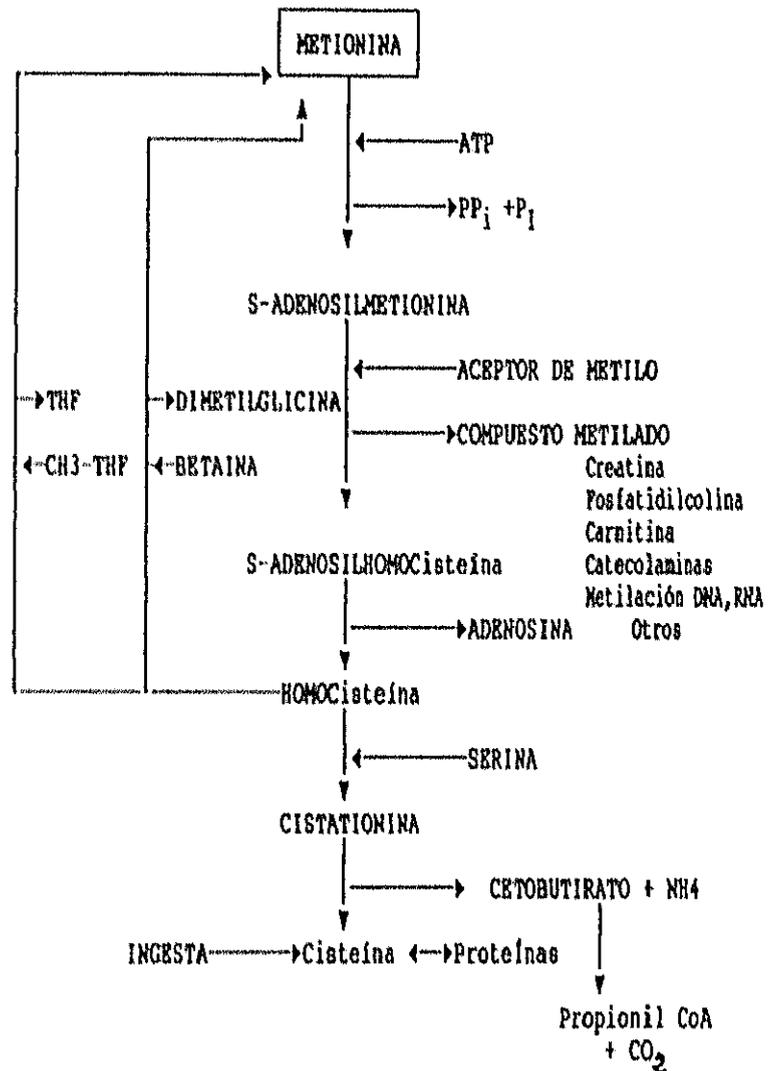
La adaptación y conservación corporal de los aminoácidos a bajas ingestas, los cambios y el control de la oxidación de los aminoácidos esenciales se pueden ilustrar con la metionina.

La metionina juega papeles en diferentes procesos metabólicos, además de la síntesis proteica.

- Es un intermediario en las reacciones de transmetilación.
- Es un regulador intermediario en las reacciones de cesión de metilo por el metil-tetrahidrofolato, por medio de la reacción de la metionina-sintetasa, que actúa sobre la homocisteína, metilándola para formar metionina.
- Es intermediario obligatorio en la ruta catabólica de la colina.
- Es un precursor de otros aminoácidos azufrados, especialmente la cisteína y la taurina.

El metabolismo de la metionina incluye una serie de rutas relacionadas, entre las que se encuentra un ciclo en el cual cede su grupo metilo a un aceptor. El derivado demetilado, homocisteína, puede ser reciclado o sufrir una transsulfuración irreversible a cistationina, lo que conduce a la formación de cisteína y su posterior oxidación. YOUNG y MARCHINI (1990) indican que el flujo de metionina está regulado por en dos lugares o puntos de ramificación en el metabolismo de la metionina, que llaman locus de síntesis de metionina-proteína (tiene lugar con la entrada de metionina en las proteínas y/o en la ruta de la transmetilación con la formación de s-adenosil-metionina) y locus de homocisteína (punto donde la

homocisteína puede o bien ser remetilada para formar metionina y/o convertida a cistationina).

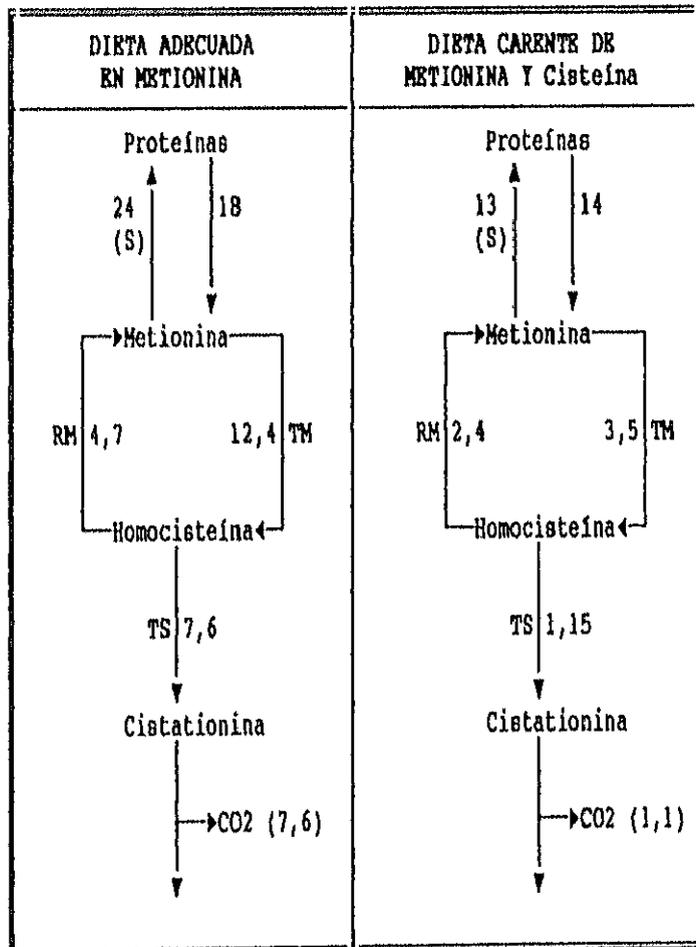


El primer paso en el metabolismo de la metionina es la formación de un compuesto rico en energía, la s-adenosil metionina, que es el donador para la transmetilación, y el precursor del derivado descarboxilado, que dona su grupo aminopropilo para la síntesis de poliaminas. La metionina-adenosin transferasa cataliza la formación de s-adenosil metionina por transferencia del grupo adenosilo desde al ATP al átomo de azufre de la metionina. La s-adenosil-metionina es donador de metilo para casi todas las reacciones de metilación biológicas (excepto la de la homocisteína). El co-producto de la transmetilación, la s-adenosilcisteína, se hidroliza

para dar homocisteína, que se puede remetililar a metionina o ser condensada con serina para formar cistationina

Cuando las ingestas de metionina son bajas, ésta se conserva (disminuye su tasa de oxidación) por reducción de la tasa en la que entra el aminoácido en los mecanismos de síntesis proteica (locus de síntesis de metionina-proteína). La menor tasa de oxidación de metionina se consigue por vía de un reciclaje más eficaz de homocisteína, relacionado con la oxidación de la homocisteína por transulfuración (locus de homocisteína). La cooperación entre estos dos loci son críticos en el mantenimiento de la homeostasis de metionina.

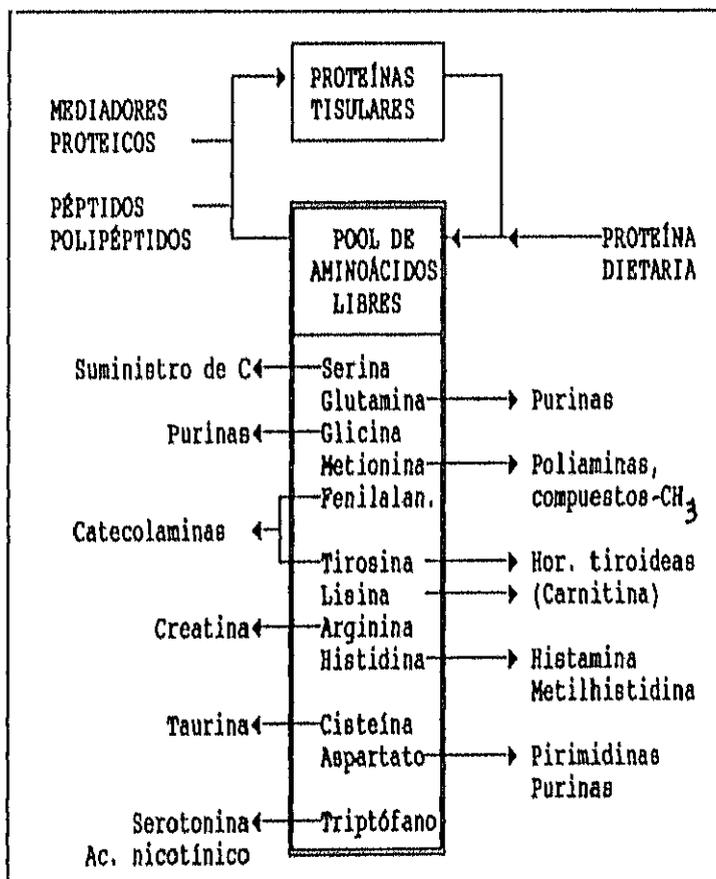
En el siguiente esquema se indican los cambios en los componentes del ciclo de la metionina in vivo en humanos adultos cuando ingieren dietas adecuadas y carentes en metionina y cisteína. Los valores de los componentes se muestran en $\mu\text{moles.Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ siendo S la incorporación de metionina a las proteínas; TM transmetilación, TS transulfuración y RM remetilación (YOUNG y MARCHINI, 1990).



Como se puede observar, en el caso de la dieta carente en aminoácidos azufrados las reacciones implicadas en las rutas del metabolismo de la metionina alteran sus actividades de forma que se intenta mantener la mayor cantidad de metionina en el organismo disminuyendo su catabolismo. Así, la liberación e incorporación de metionina a las proteínas en esta dieta es muy similar (13 y 14 respectivamente, es decir, se recicla al máximo la metionina disponible), es menor la tasa de transmetilación a homocisteína y la transulfuración de ésta a cistationina que en la dieta adecuada, con la consiguiente menor producción de CO₂ a partir de la metionina. En cambio, en condiciones adecuadas de ingesta de metionina, la remetilación es proporcionalmente más baja y mayor la formación de cistationina por el mecanismo de transulfuración.

2.6.3.1. Mecanismos de adaptación en malnutrición en relación con el metabolismo de aminoácidos.

En el siguiente esquema se muestran algunos ejemplos de las rutas alternativas de utilización de los aminoácidos que entran en el pool después de su liberación a partir de las proteínas.



El catabolismo de los aminoácidos se realiza fundamentalmente en el hígado, y el músculo sólo es esencial para la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada.

Los aminoácidos se degradan a esqueletos carbonados y grupos amino.

Los esqueletos carbonados se oxidan a compuestos que se pueden incorporar al ciclo tricarboxílico por medio de cinco rutas.

Los grupos amino se eliminan en la mayoría de los aminoácidos por transaminación del piruvato, oxalacetato u oxoglutarato para dar finalmente glutamato. El resto lo hace por desaminación oxidativa. Estos grupos amino tienen un final común en los vertebrados, la formación de urea, ácido úrico o amoníaco, según la especie animal.

2.6.3.1.1. Aminoácidos de cadena ramificada.

Como ya se ha indicado, la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada es mayor en el músculo que en el hígado (GOLDBERG y ODESSEY, 1972). Además, como el músculo esquelético representa más del 40% de la masa muscular, este tejido es el lugar principal para el catabolismo de estos aminoácidos (HARPER y col., 1984).

La privación de alimentos aumenta la capacidad del músculo para oxidar leucina, isoleucina y valina, efecto que puede hacerse reversible por la alimentación. En estas condiciones no aparecen cambios en la oxidación de otros aminoácidos en el músculo. Esta adaptación al ayuno implica un aumento en la afinidad de los sistemas degradativos del músculo para los aminoácidos de cadena ramificada.

Los pasos enzimáticos que se aceleran en situación de ayuno han sido identificados por GOLDBERG y ODESSEY (1972).

Los aminoácidos de cadena ramificada tienen una elevada capacidad para promover un balance positivo de proteínas en el músculo (BUSE y col., 1973), ya que disminuyen la proteólisis y promueven la síntesis proteica en las células y músculo de rata con un balance negativo de nitrógeno. La leucina por sí misma puede causar este efecto en el músculo esquelético y cardíaco, lo que puede ser importante para regular la masa muscular (BUSE y col., 1973). Isoleucina y valina juntos, pero no por separado, promueven también el balance positivo de proteínas, pero pueden

actuar indirectamente por aumento del nivel de leucina en músculo.

El catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en el músculo genera grupos amino cuya acumulación en el organismo puede ser tóxica, ya que el músculo carece de los enzimas necesarios para eliminar el amonio en forma de urea. FELIG y col. (1970) observan que los aminoácidos liberados del músculo en el estado postabsortivo o durante el ayuno no representan el hidrolizado de la proteína muscular, ya que la alanina y la glutamina se liberan en cantidades mucho mayores que las que se esperarían a partir del catabolismo de las proteínas musculares. Estos dos aminoácidos se sintetizan de novo en el músculo, proceso que utiliza los grupos amino generados por la degradación de aminoácidos. En estas situaciones el músculo libera leucina, isoleucina, valina y ácido aspártico en menores cantidades que las que se esperarían de su presencia en la proteína tisular, lo que refleja una rápida degradación de estos aminoácidos en el músculo (GOLDBERG y CHANG, 1978).

2.6.3.1.2. Producción de alanina en el músculo.

La producción de alanina en el músculo parece tener un papel importante en el mantenimiento de la glucemia. En el hígado éste es el aminoácido gluconeogénico principal.

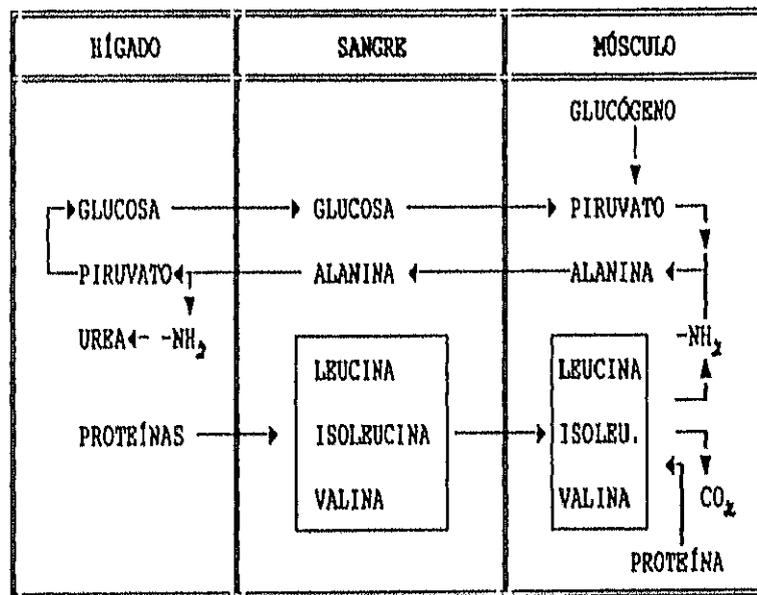
FELIG (1975) propone la existencia del ciclo glucosa-alanina, en el que la alanina aporta grupos amino derivados del metabolismo de aminoácidos en el músculo y piruvato al hígado para la conversión en urea y glucosa. La glucosa sintetizada en el hígado puede ser capturada de nuevo por el músculo y el piruvato originado de la misma se convierte en alanina. La producción de alanina en el músculo está acoplada con la degradación de aminoácidos de cadena ramificada, ya que la adición de cualquiera de estos aminoácidos estimula la producción de alanina y de glutamina. En ayuno aumenta la capacidad muscular para la degradación de estos aminoácidos y la liberación de alanina (GOLDBERG y ODESSEY, 1972).

Hay varios estudios que demuestran que la alanina y la glutamina se forman a partir de los aminoácidos de cadena ramificada por transaminación. Esta transaminación tiene lugar casi exclusivamente con el α -Cetoglutarato para formar glutamato, que puede donar su grupo amino al piruvato para formar alanina.

Cuando a un músculo se aportan aminoácidos de cadena ramificada aumenta el nivel de glutamina y, por tanto, se estimula la producción de alanina. Las cantidades relativas que se producen de glutamina y de alanina dependen de la

concentración de amonio en el tejido, de forma que cuando aumenta el amonio, se incrementa la producción de glutamina y disminuye la de alanina. Este amonio procede de la degradación de purinas y de aminoácidos (LOWENSTEIN y GOODMAN, 1978).

La relación entre la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada y el ciclo glucosa - alanina se esquematiza en el siguiente cuadro.



Se han propuesto dos modelos para explicar el aumento de alanina en estas condiciones:

. Los aminoácidos de cadena ramificada contribuyen sólo con el grupo amino para la formación de alanina, mientras que la glucosa o el glucógeno muscular proveen el piruvato (CHANG y GOLDBERG, 1978). Si la alanina se deriva de la glucosa preexistente, la gluconeogénesis a partir de esta alanina no representa una fuente nueva de glucosa para el organismo en ayuno.

. Los carbonos de la alanina proceden de otros aminoácidos, producidos por catabolismo proteico. Según este modelo, la producción de alanina en ayuno puede contribuir a la producción de glucosa.

GOLDBERG y CHANG (1978) han llegado a la conclusión por diferentes experiencias, de que la mayoría de los carbonos liberados por el músculo para la formación de alanina, piruvato y lactato (95%) derivan de glucosa exógena y no de los aminoácidos aportados por la degradación proteica.

Los aminoácidos isoleucina, valina, aspártico, asparragina y glutámico pueden ser convertidos en intermediarios del ciclo tricarboxílico o en piruvato en el músculo, aportando los esqueletos carbonados para la síntesis de glutamina y alanina. La leucina es puramente cetogénico y su esqueleto carbonado se puede degradar a Acetil CoA, pero no ser convertido en intermediarios del ciclo tricarboxílico o a piruvato en los mamíferos (GOLDBERG y DICE, 1974). Se ha comprobado que la leucina, isoleucina y valina son igual de efectivos para estimular la producción de alanina en músculo.

2.6.3.1.3. Conversión de aminoácidos en glutamina en el músculo.

El músculo esquelético libera cantidades comparables de glutamina y de alanina, en ocasiones mayores de la primera, siendo en el músculo cardíaco mayor la liberación de glutamina. CHANG y GOLDBERG (1978) establecen que cuando se incuba diafragma de rata libera menor cantidad de los aminoácidos valina, isoleucina, aspártico, asparragina y glutámico (aminoácidos que entran en el ciclo tricarboxílico tras su liberación por proteólisis muscular) que la que se esperaría por su presencia en el músculo. Esa cantidad es equivalente a la de glutamina sintetizada de novo por el músculo, lo que sugiere que los esqueletos carbonados de los citados aminoácidos se convierten en glutamina.

Experimentos como los de CHANG y GOLDBERG (1978) indican que los aminoácidos capturados por la sangre después de una comida o generados por el catabolismo de la proteína muscular en ayuno pueden repleccionar los pools de intermediarios del ciclo tricarboxílico. Este mismo equipo demostró que más del 50% de las cadenas carbonadas del ácido aspártico, asparragina, isoleucina, glutámico y valina que entran en el ciclo tricarboxílico se convierten en glutamina, y el resto se transforma por vía del piruvato a CO₂ produciendo energía (aproximadamente el 20%), a lactato (alrededor del 30%) y a alanina (menos del 2%), que se liberan desde el músculo.

Como resumen, podemos establecer que los aminoácidos generados por el catabolismo proteico en ayuno pueden tener diferentes destinos en el músculo GOLDBERG y CHANG (1978).

- Los aminoácidos que no entran en el ciclo tricarboxílico parecen ser liberados del tejido intactos o como α -cetoácidos para ser utilizados en otros tejidos (glicina, cisteína, serina, treonina, metionina, prolina, lisina, arginina, histidina, fenilalanina, triptófano).

- Los cinco aminoácidos que entran en el ciclo tricarboxílico se convierten preferentemente en glutamina, previamente a su liberación desde el músculo (Aspártico, asparragina, glutámico, valina, isoleucina).

- La glutamina y la alanina liberadas del músculo tienen diferentes destinos. Aparentemente la glutamina puede ser capturada por el riñón donde es precursor del amonio urinario, mientras que su esqueleto carbonado se utiliza para la gluconeogénesis o para la producción de energía.

- La leucina se utiliza como fuente energética para el músculo durante el ayuno, inhibiendo la oxidación de glucosa y promoviendo la liberación del lactato desde el músculo. La leucina parece inhibir la descarboxilación del piruvato o el transporte de piruvato a la mitocondria. Durante el ayuno la concentración de leucina aumenta a niveles elevados en sangre y músculo y también la capacidad del músculo para oxidar leucina aumenta, siendo un mecanismo de reserva de los precursores gluconeogénicos esenciales durante el ayuno.

**MATERIAL
Y MÉTODOS**

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para el estudio de los efectos de dietas carentes de metionina y cisteína, y esta dieta con 1/2 de energía se han utilizado tres lotes de ratas macho Wistar, en período de crecimiento con un peso medio de $87 \pm 6,9$ g procedentes del animalario del Departamento de Nutrición y Bromatología I de la Facultad de Farmacia (U.C.M.).

Después del destete fueron alimentadas con dieta stock de laboratorio hasta alcanzar el peso medio citado. Posteriormente fueron alimentadas en jaulas individuales de metabolismo con una dieta control del 10% de caseína $\pm 0,02\%$ DL-metionina y agua "ad libitum" en una habitación termorregulada a 23°C con un 50 % de humedad y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas respectivamente, con la finalidad de ser adaptadas a dicho entorno.

Tras 3 días de adaptación a la dieta control se separaron en 3 lotes para suministrarles las dietas experimentales.

LOTE I. DIETA CONTROL.

Formado por 26 ratas con un peso inicial aproximado de $87 \pm 6,9$ g, a las cuales se le administró una dieta control balanceada con un 10% de proteína (caseína + DL-metionina 0,02%).

El experimento se desarrolló durante 14 días, sacrificando las ratas los días 4, 8 y 14 del experimento. Tanto el control de peso como de ingesta se llevó a cabo diariamente y la recogida de orina y heces cada 3 días.

El día del sacrificio se recogió la sangre de la carótida y se extirparon ambos músculos gastrocnemios.

LOTE II. DIETA CARENTE EN METIONINA + CISTEINA.

Constituido por 26 ratas con un peso inicial de $87 \pm 6,9$ g al que se le suministró una dieta con el 10% de proteína formada por aminoácidos cristalinos en la proporción indicada por el NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978) y carente en metionina + cisteína, los cuales fueron sustituidos por una mezcla de aminoácidos no esenciales en proporción adecuada.

Los animales fueron sacrificados los mismos días que el lote anterior, la toma de muestras se obtuvo de igual forma.

LOTE III. DIETA CARENTE EN MET+CISTEINA Y CON LA MITAD DE ENERGÍA.

Grupo formado por 26 ratas , con un peso inicial de $87 \pm 6,9$ g, al que se le suministró la dieta III preparada al 20% de proteína (aminoácidos cristalinos) y doble cantidad de minerales y vitaminas y equilibrando con grasa e hidratos de carbono como se describe en la preparación de la misma.

Esta dieta se administró a la mitad y "pair-fed" con respecto al lote II.

3.2. ELABORACIÓN DE LAS DIETAS.

Dieta I: Dieta control, con caseína al 10% + DL metionina al 0,02%.

Dieta II: Carente en metionina + cisteína, con aminoácidos cristalinos al 10% en sustitución de la caseína.

Dieta III: Carente en metionina + cisteína, con la mitad de energía respecto de la dieta II.

El almidón, sacarosa, minerales, vitaminas, colina y aceite de oliva se ponen en las proporciones adecuadas, según HAVERBERG y col. (1975a).

3.2.1. Ingredientes de las dietas.

(1). HEGER y FRYDRICH (1985)

(2). ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (1970).

(3). NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978)

	Dieta I (g/Kg)	Dieta II (g/Kg)	Dieta III (g/Kg)
Aceite de oliva (1)	50,00	50,00	25,00
Almidón (1)	200,00	200,00	200,00
Celulosa (1)	55,40	55,40	150,00
Mezcla mineral (2)	50,00	50,00	100,00
Sacarosa (1)	534,60	534,60	534,60
Vitaminas (2)	10,00	10,00	20,00
Proteína (1) caseína + D-L metionina	100,00 (98+2)	105,40	210,80
Mezcla de aminoácidos (3)		105,40	210,80

3.2.2. Mezcla mineral (g/Kg mezcla mineral).

	Dicta I	Dicta II	Dicta III
Cl ₂ Co. 6H ₂ O	0,023	0,023	0,046
ClNa	139,30	139,30	378,60
CO ₃ Ca	381,40	381,40	762,80
IK	0,79	0,79	1,58
PO ₄ H ₂ K	389,00	389,00	778,00
SO ₄ Cu. 5H ₂ O	0,477	0,477	0,954
SO ₄ Fe. 7H ₂ O	27,00	27,00	54,00
SO ₄ Mg	57,30	57,30	114,60
SO ₄ Mn. 1H ₂ O	4,01	4,01	8,02
SO ₄ Zn. 7H ₂ O	0,548	0,548	1,096

3.2.3. Mezcla vitamínica (Cantidad/Kg de dicta).

	Dicta I	Dicta II	Dicta III
Vitamina A (U.I.)	20000	20000	40000
Vitamina D (U.I.)	2000	2000	4000
Vitamina E (U.I.)	100	100	200
Menadiona (mg)	5	5	10
Colina (mg)	2000	2000	4000
PABA (mg)	100	100	200
Inositol (mg)	100	100	200
Niacina (mg)	40	40	80
Pantotenato Ca (mg)	40	40	80
Riboflavina (mg)	8	8	16
Tiamina ClH (mg)	5	5	10
Piridoxina ClH (mg)	5	5	10
Ac. fólico (mg)	2	2	4
Biotina (mg)	0,4	0,4	0,8
Vitamina B ₁₂ (mg)	0,03	0,03	0,06
Glucosa c.s.p.	10 g	10 g	20 g

3.2.4. Mezcla de aminoácidos (g/Kg de dieta).

<i>Esenciales</i>	Dieta II	Dieta III
Arginina CIH	7,3	14,6
L-Fenilalanina	5	10
L-Histidina	3	6
L-Isoleucina	5	10
L-Leucina	7,5	15
L-Lisina	8,7	17,4
L-Tirosina	3	6
L-Treonina	5	10
L-Triptófano	1,5	3
L-Valina	3	6
g/Kg de dieta	$47,4+6= 53,4$	$53,4 \times 2 = 116,8$

<i>No esenciales</i>	Dieta II	Dieta III
Ác. L-Aspártico	3,471	6,942
Ác. L-Glutámico	1,335	2,670
L-Alanina	3,471	6,942
L-Asparragina	4,539	9,078
L-Glutamina	1,2816	2,563
L-Serina	3,471	6,942
Glicina	14,151	28,302
Prolina	1,0146	2,0292

3.3. TOMA DE MUESTRAS.

3.3.1. Orina y heces.

Se recoge orina y heces de tres días consecutivos. La orina se filtra y recoge en matraces aforados de 250 cc, enrasando en presencia de una solución de timol 1%. (p/v), utilizado como antiséptico. Alícuotas de esta orina se conservan a -20°C hasta su análisis.

Las heces se pesan y guardan en papeles de aluminio a la misma temperatura.

3.3.2. Sangre y órganos.

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con pentobarbital sódico a la dosis de 30 mg de pentobarbital/Kg de peso corporal.

La mezcla anestésica está constituida por:

Pentobarbital sódico.....	30 g
Propilenglicol.....	200 ml
Etanol.....	100 ml
Agua destilada.....	csp 1000 ml

3.3.2.1. Sangre.

Se obtiene por canulación de la arteria carótida, y se recoge en tubos de hemólisis heparinizados (4 mg de heparina/ml de sangre).

3.3.2.2. Órganos.

Ambos músculos gastrocnemios se extirpan, pesan y congelan rápidamente por inmersión en Nitrógeno líquido en vaso Dewar a una temperatura de -130°C.

3.3.3. Preparación de las muestras.

3.3.3.1. Determinaciones de proteínas y actividades enzimáticas.

Se pesa una alícuota de tejido y se suspende en una solución tampón de ClNa 0,1 M y CO_3HNa 0,005 M al 20% (p/v) pH=7,4 a 0°C. A continuación se homogeniza con un aparato ultraturrax a 20000 rpm bajo hielo durante 14 segundos. El homogenado se centrifuga a 550 G durante 15 minutos en refrigeración a 4°C. Se separa el sobrenadante y en él se realizan las determinaciones enzimáticas.

3.3.3.2. Determinaciones en sangre.

La sangre se centrifuga a 700 G durante 15 minutos, separando así el plasma de las células sanguíneas.

El plasma se trata con metanol (0:1/2, v:v), con lo que precipitan las proteínas del plasma y se extraen los aminoácidos en el alcohol. Se centrifuga a 700 G durante 10 minutos y se conserva el sobrenadante a -20°C para la determinación de los aminoácidos libres por H.P.L.C..

Lo mismo se hace con los glóbulos rojos previa sonicación para su hemólisis.

3.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

3.4.1. Balance de nitrógeno.

Tanto en las dietas como en orina, heces y órganos se determina el nitrógeno mediante el método de KJELDAHL (1975). Para ello el material biológico se digiere por calor con ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador (SO_4K_2 y HgO). El Nitrógeno en forma de grupos $-\text{NH}_3$ pasa a sulfato amónico. En exceso de NaOH libera NH_4 y éste se destila en un Destilador Buchi sobre una solución indicadora que contiene ácido bórico, rojo de metilo y verde de bromocresol, valorándolo posteriormente con ácido clorhídrico 0,01 N.

La solución indicadora está compuesta por:

	Solución parcial	Solución final
Ácido bórico	2%	50,00 ml
Rojo de metilo	0,1% en etanol 96°	2,00 ml
Verde de bromocresol	0,2% en etanol 96°	1,50 ml
Agua destilada		csp 100,00 ml

A partir de los datos del contenido de Nitrógeno se calcula el contenido proteico multiplicando los gramos de Nitrógeno por el factor 6,25.

3.4.2. Proteínas solubles en homogenado de músculo gastrocnemio.

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

3.4.2.1. Fundamento.

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

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

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

3.4.2.2. Técnica.

A 0,1 ml de homogenado diluido al 1/10 (v/v), se añaden 5 ml de reactivo cupro-alcalino (CO_3Na al 2 % en NaOH 0,1 N y SO_4Cu al 0,5 % en tartrato sódico-potásico al 1 %).

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

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

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

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

3.4.3. Catabolismo miofibrilar.

Se determina por el método de RIKIMARU y col. (1980).

3.4.3.1. Proteína miofibrilar.

La proteína miofibrilar se analiza por el método de GOLDBERG modificado (1968).

Se tritura y homogeniza una muestra del músculo gastrocnemio en un tampón fosfato 0,01 M; pH = 7,4 (de baja carga iónica) en un homogenizador con pistón de teflón, en la proporción 350 mg de músculo: 10 ml de buffer. El homogenado se centrifuga a 700 G durante 20 minutos. Así se separa la fracción soluble, que contiene los aminoácidos libres y la proteína sarcoplasmática, de la fracción insoluble, que contiene la proteína miofibrilar y la proteína del tejido conectivo.

La fracción insoluble se mezcla con 7 ml de NaOH 0,3N y se deja incubar durante una noche. Posteriormente se centrifuga para separar la proteína miofibrilar, que queda en el sobrenadante, de la proteína del tejido conectivo, que está en el precipitado.

En el sobrenadante se determina la proteína miofibrilar total por método de KJELDAHL (1975), y la 3-metil-histidina por autoanalizador cromatográfico.

3.4.3.2. 3-Metil-histidina en músculo.

La determinación de la 3-metil-histidina en músculo gastrocnemio se realiza previa hidrólisis con HCl 6N a 110°C durante 24 horas. Una porción del hidrolizado desecado al vacío a una temperatura menor de 40°C, se disuelve en metanol-agua (v:v) y se valora por cromatografía líquida de alta resolución en autoanalizador cromatográfico de aminoácidos.

3.4.3.3. 3-Metil-histidina en orina.

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

3.4.3.4. Determinación de la ganancia y de la tasa fraccional de ganancia de la proteína miofibrilar.

La ganancia miofibrilar se calcula a partir de los pesos corporales de los días de sacrificio primero y último (PC_1 , PC_2); la relación de la masa muscular* al peso corporal (MM/PC) y la concentración de la proteína miofibrilar en el músculo (PMF/MM):

$$G = \frac{(PC_2 - PC_1) \times (MM/PC) \times (PMF/MM)}{\text{Diferencia entre días}}$$

G = Ganancia de la proteína miofibrilar (mg N/día).

PC_1 = Peso corporal día 1º del experimento.

PC_2 = Peso corporal día último del experimento.

MM = Peso del músculo (masa muscular) (g).

MM/PC = Peso del músculo/ peso corporal (Masa muscular en %) el último día del experimento.

PMF = Proteína miofibrilar en el músculo (mg N/ g de músculo).

PMF/MM = Concentración de la proteína miofibrilar en masa muscular total (mg N/g músculo) el último día del experimento.

La relación $PC \times (PM/PC) \times (PMF/MM)$ es la Proteína miofibrilar total (PMT) y se expresa como mg N/Kg rata.

* Denominamos masa muscular al peso del músculo del animal, diferenciando así este término del peso del músculo gastrocnemio.

La tasa fraccional de ganancia se calcula como porcentaje de la ganancia de la proteína miofibrilar con respecto a la proteína miofibrilar total del día 1º del experimento (%).

3.4.3.5. Determinación del catabolismo, tasa fraccional de catabolismo y vida media de la proteína miofibrilar.

La tasa catabólica de la proteína miofibrilar se calcula a partir de la excreción urinaria de la 3-metil-histidina (U-3-MH) y la concentración de la 3-metil-histidina en la proteína miofibrilar (3-M-H/PMF), según la siguiente ecuación (RIKIMARU, 1980):

$$C = \frac{0,8 \cdot U-3-MH}{3-MH/PMF}$$

El coeficiente 0,8 representa la contribución de la 3-metil-histidina muscular a la 3-metil-histidina total urinaria (NISHIZAWA y col., 1977).

El catabolismo se expresa en mg N/día.

La tasa fraccional catabólica es el porcentaje del catabolismo con respecto a la proteína miofibrilar total del primer día del experimento (%).

La vida media se expresa en días. Es el tiempo necesario para reemplazar o transferir la mitad de las moléculas originalmente presentes, independientemente de la cantidad inicial. Si un pool se marca inicialmente con un isótopo, después de que transcurra el tiempo de una vida media la cantidad del isótopo disminuye a la mitad de su valor inicial. Esta reacción presenta una cinética de primer orden, y se relaciona con la tasa fraccional de catabolismo por la fracción indicada por RIKIMARU y col. (1980):

$$V_m = \frac{\ln 2}{\text{TFC}} = \frac{0,693}{\text{Tasa fraccional de catabolismo}}$$

3.4.3.6. Determinación de la síntesis proteica y de la tasa fraccional de síntesis de la proteína miofibrilar.

Dado que la ganancia es la diferencia entre la síntesis y el catabolismo, *la síntesis de la proteína miofibrilar* se calcula por la suma del catabolismo y ganancia obtenidas en los puntos anteriores. Se expresa en mg N/día.

$$\text{Síntesis} = \text{Ganancia} + \text{catabolismo}$$

La tasa fraccional de síntesis de la proteína miofibrilar se calcula como porcentaje de la síntesis en relación con la proteína miofibrilar total del primer día.

3.4.4. Determinación del DNA.

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

3.4.4.1. Fundamento.

Al añadir difenilamina al DNA se origina una coloración como consecuencia de la reacción de la desoxiribosa con el ácido nucleico, presentando una absorbancia proporcional a la cantidad de DNA.

3.4.4.2. Técnica.

Una alícuota de tejido homogenizado se trata con 2,5 volúmenes de ácido tricloroacético del 20% para precipitar las proteínas. Se centrifuga y se desechan los sobrenadantes. Se lava el precipitado con el mismo volumen de ácido tricloroacético al 2%. Se desecha el sobrenadante y se suspende el precipitado con 5 volúmenes de alcohol etílico del 95%. Se repite este paso otra vez y el precipitado se disuelve en 1,3 volúmenes de agua y 1,3 volúmenes de ácido tricloroacético al 10%. Se calienta 15 minutos a 100°C agitando frecuentemente, se enfría y centrifuga. En el sobrenadante se encuentra el extracto de ácidos nucleicos.

El DNA se estima por la reacción que da con el reactivo de difenilamina, preparando un blanco con agua destilada y en presencia de una curva estándar de DNA tipo I a distintas concentraciones. Se calienta a 100°C durante 10 minutos y se mide el color desarrollado a 600 nm.

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

3.4.5. Determinación del RNA.

El método utilizado es el de DISCHE (1930).

3.4.5.1. Fundamento.

Se basa en la adición al RNA de orcinol y cloruro férrico, lo que produce una coloración verde de la ribosa existente en el ácido nucleico, proporcional al contenido en RNA de la muestra.

3.4.5.2. Técnica.

Una alícuota de tejido se trata con ácido tricloroacético. Al extracto se le añade Cl_3Fe al 0.1 % (p/v) en ClH concentrado y el reactivo de orcinol al 10 % en etanol. Después de incubar a 100°C durante 40 minutos, se mide la absorbancia del color desarrollado a 670 nm. Los resultados se llevan a una curva patrón de RNA.

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

3.4.6. Determinación de la fosfatasa ácida. (Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa E.C.3.1.3.2.).

El método utilizado para su determinación es el de ANDERSCH y col. (1947), modificado por FISHMAN y col. (1953).

3.4.6.1. Fundamento.

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

liberación del para-nitrofenol es proporcional a la concentración de fosfatasa.

3.4.6.2. Técnica.

Una alícuota del tejido se homogeniza con solución salina bicarbonatada. Al extracto se añade la sal sódica de paranitrofenilfosfato $5,5 \mu\text{mol/l}$, trabajando en un tampón de citrato $50 \mu\text{mol/l}$ $\text{pH}=4,8$ y tartrato sódico 200 mmol/l , incubándose a 37°C durante 30 minutos.

El color obtenido se mide a una longitud de onda de 400-420 nm.

Cada muestra se lee paralela a un blanco correspondiente en el que no se ha dejado actuar al enzima, y el valor obtenido se compara con una curva de referencia.

La actividad específica del enzima se expresa en microunidades de paranitrofenol liberado por minuto después de la adición de NaOH $0,02 \text{ M}$.

3.4.7. Determinación de la fosfatasa alcalina. (Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa E.C.3.1.3.1.)

Se utiliza el "Método estándar optimado" de la DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE (1970 y 1972).

3.4.7.1. Fundamento.

Conversión del paranitrofenilfosfato, substrato utilizado, en paranitrofenol más fosfato. El paranitrofenol es un compuesto coloreado.

La fosfatasa hidroliza el substrato en medio alcalino y al separarse el grupo fosfato se mide por colorimetría el paranitrofenol liberado, cuyo color es proporcional a la actividad de la fosfatasa.

3.4.7.2. Técnica.

Se añade a la muestra un volumen de paranitrofenilfosfato $5,5 \mu\text{M}$ en tampón glicina 50 mM , $\text{pH} = 10,5$; a una temperatura de 37°C . La actividad enzimática específica se expresa en μmol . de paranitrofenol liberado por minuto después de la adición de NaOH $0,2\text{M}$.

3.4.8. Determinación de la desoxirribonucleasa ácida. (Deoxirribonucleato 3'Nucleótido Hidrolasa E.C. 3.1.4.6.).

Se utiliza el método de McDONALD modificado (1955).

3.4.8.1. Fundamento.

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

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

3.4.8.2. Técnica.

Se prepara una solución tampón de acetato sódico 0,1M pH=5 mezclando 70,5 volúmenes de acetato sódico 0,1M, así como una solución de SO_4Mg 2M.

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

Es necesaria una suspensión enzimática de desoxirribonucleasa ácida tipo I (SIGMA) 2,18 Uk/ml disuelta en solución salina bicarbonatada (solución stock de ClNa 0,15M y CO_3HNa 0,005M pH= 7,4). Con ella se construye la curva de calibración en presencia de la solución sustrato de DNA.

La reacción entre la solución sustrato de DNA y el homogenado problema se realiza a 37°C durante 45 minutos. Esta reacción se detiene con adición de 0,5 ml de acetato de uranilo al 0,25% y conservación durante 20 minutos a 4°C. Seguidamente se centrifugan las muestras a 7000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se lee a 260 nm frente al blanco. Esta lectura se lleva a una curva de calibración realizada con una solución patrón de DNAsa ácida.

Los resultados se expresan por órgano y por mg de proteína.

*Uk = Unidad Kunitz: Actividad enzimática que produce un incremento de la densidad óptica de 0,001 en las condiciones de ensayo.

3.4.9. Determinación de la ribonucleasa ácida. (Ribonucleato piridin-nucleótido-2'transferasa ciclizante E.C. 2.7.7.16).

El método utilizado es el de LAZZARI y col. modificado (1970).

3.4.9.1.- Fundamento.

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

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

3.4.9.2.- Técnica.

A 0,2 ml del homogenado de la muestra en tampón de acetato sódico 0,1 M a pH=5. se añade 0,5 ml de sustrato de RNA al 1% (p/v), en solución tampón de acetato sódico 0,1 M a pH=5. El volúmen se completa a 1 ml con tampón acetato 0,1 M pH=5. La reacción se realiza a 37°C.

El RNA no digerido se precipita con 1 ml de acetato de uranilo al 0,25%, manteniéndolo a 0°C durante 2 horas. Posteriormente se centrifuga durante 20 minutos a 7000 rpm.

Las muestras patrones se diluyen 1/10 con solución stock y se determina la absorbancia de los oligonucleótidos liberados por espectrofotometría a 260 nm.

Los resultados se llevan a una curva de calibración construida con soluciones patrón de ribonucleasa ácida con 0,05-0,005 Unidades Kunitz por tubo.

La actividad específica del enzima se expresa en Unidades Internacionales por órgano y en mUI por mg de proteína.

3.4.10. Determinación de Beta-D-Glucuronidasa. (β -D-Glucurónido-glucuronohidrolasa E.C.3.2.1.3.1.)

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

3.4.10.1. Fundamento.

El enzima β -D-glucuronidasa actúa sobre el 4-naftil-beta-D-glucurónido, desdoblándolo en ácido glucurónico y paranitrofenol. Este último se determina por colorimetría a pH básico.

El aumento de paranitrofenol formado por unidad de tiempo indica la actividad de la β -D-glucuronidasa.

3.4.10.2. Técnica.

Se añade a la muestra 0,8 ml de acetato buffer 0,2M a pH=3,8 y con 0,1 ml de ácido 4-nitrofenil-glucopiranosidurónico 0,1 M en agua destilada, manteniéndolo a 38°C durante 30 minutos. A continuación se trata la mezcla con 1 ml de NaOH 1 N, completando el volumen hasta 5 ml con agua destilada. La absorbancia se lee a 405 nm.

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

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

La actividad específica del enzima se expresa en Unidades Internacionales, por órgano y por mg de proteína.

3.4.11. Determinación de la glutamato-oxalacetato-transaminasa.
(L-Aspartato:2-oxoglutarato amino-transferasa E.C.2.6.1.1.) (GOT)

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

3.4.11.1. Fundamento.

El enzima actúa sobre un sustrato de L-Cetoglutarato y L-Aspartato, formando por transaminación glutamato y oxalacetato. El oxalacetato en medio alcalino forma hidrazonas con la dinitrofenilhidrazina, desarrollando una coloración proporcional a la actividad enzimática.

3.4.11.2. Técnica.

Sobre 1 ml de solución que contiene 0,1 mmol de L-Aspartato, 2 μ mol de L-cetoglutarato y 0,1 mmol de tampón fosfato a pH=7,4 se añade 0,2 ml de la muestra y se incuba durante 1 hora a 37°C. A continuación se añade 1 μ mol de 2,4,-dinitrofenil hidrazina, y se mide la absorbancia a 546 nm.

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

La actividad específica del enzima se expresa en U.I. por órgano y por mg de proteína.

3.4.12. Determinación de la glutamato-piruvato-transaminasa.
(L-Alanina:2-oxo-glutarato aminotransferasa E.C.2.6.1.2.) (GPT).

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

3.4.12.1. Fundamento.

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

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

3.4.12.2. Técnica.

A 0,2 ml de la muestra problema se añade 1 ml de una solución que contiene 0,2 mmol de D-L-Alanina, 2 μ mol de alfa-cetoglutarato y 0,1 mmol de fosfato ph=7,4. La mezcla se incuba a 37°C durante 30 minutos. A continuación se añade 1 μ mol de 2,4,-dinitrofenilhidrazina y de NaOH 0,4 M y se mide la absorbancia.

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

La actividad específica del enzima se expresa en U.I. por órgano y por mg de proteína.

3.4.13. Determinación de Urea en plasma.

El método utilizado es el de desdoblamiento con ureasa, o reacción de Berthelot (FAWCETT y SCOTT, 1960).

3.4.13.1. Fundamento.

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

3.4.13.2. Técnica.

Se trata 0,01 ml de plasma con 0,05 ml de solución tampón ureasa (tampón fosfato 50 mmol/l y ureasa \geq 0,2 U/ml) y se incuban a 37°C. A continuación se añade 2,5 ml de solución fenol (fenol 0,106 mmol/l y nitroprusiato sódico 0,17 mmol/l) y 2,5 ml de solución hipoclorito sódico (11mM y NaOH 0,125 N), llevándose inmediatamente a baño a 37°C durante 15 minutos.

A continuación se mide las extinciones de muestras y estándares en fotocolorímetro a 546 nm. Los resultados se llevan a una curva patrón de urea, expresándose en mg/100 ml de plasma.

El nitrógeno ureico se calcula según la fórmula:

$$C = 14 \text{ Ext (prueba) / Ext (estandar)}$$

Se expresa en mg/100 ml de plasma.

3.4.14. Glucosa plasmática.

Se emplea el método de TRINDER (1969).

3.4.14.1. Fundamento.

La glucosa en presencia de O_2 y H_2O se oxida mediante la enzima glucosa oxidasa, formando agua oxigenada, que origina un compuesto coloreado al reaccionar con la 4-aminofenazona y fenol.

3.4.14.2. Técnica.

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

Tampón trifosfato	180 mmol/l
Fenol	11 mmol/l
3-4-Diclorofenol	2,1 mmol/l
Eter poliglicólico de alcohol graso	0,24 %
4-aminofenazona	0,8 mmol/l
Peroxidasa	0,9 UI/ml
Glucosa oxidasa	15 UI/ml

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

Los resultados se llevan a una curva patrón realizada con una solución patrón de glucosa, tomando como blanco la solución reactiva. Los resultados se expresan en mmol/l de plasma.

3.4.15. Insulina.

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

3.4.15.1. Fundamento.

La insulina de la muestra, fría, reacciona competitiva-mente con una cantidad constante de insulina marcada con 125I para combinarse con un anticuerpo específico para ambas.

La combinación de la insulina marcada con el anticuerpo se determina midiendo la reactividad de la fracción de insulina libre. Este parámetro está influido por la concentración de insulina fría.

3.4.15.2. Cálculos.

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

$$C'/I' = B/F$$

C' = Concentración de la hormona marcada ligada al anticuerpo.

I' = Concentración de la hormona marcada libre.

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

I = Concentración de la hormona no marcada libre.

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

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

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

Con esta curva se calcula la relación entre la insulina marcada ligada al anticuerpo C' y la insulina fría total de las muestras IO.

3.4.16. Proteínas totales en plasma.

EL método utilizado es el BIURET (WELCHSELBANM, 1946).

3.4.16.1. Fundamento.

Las proteínas forman en solución alcalina un complejo coloreado con los iones de cobre.

3.4.16.2. Técnica.

Se añade 1,25 ml de reactivo de Biuret a 25 μ l de plasma, incubándose a 37°C durante 30 minutos.

Se mide la extinción en espectrofotómetro a 550 nm, obteniéndose la concentración de proteínas de la muestra al comparar con la concentración y extinción del estándar. El resultado se expresa en g/100 ml de plasma.

3.4.17. Determinación de aminoácidos.

Por cromatografía líquido-líquido de alta resolución (H.P.L.C.) se han realizado las determinaciones de los siguientes aminoácidos:

-Aminoácidos gluconeogénicos:

- . Alanina.
- . Ácido glutámico.
- . Glicina.
- . Glutamina.
- . Ornitina.
- . Serina.
- . Treonina.

-Aminoácidos básicos:

- . Arginina.
- . Histidina.
- . Lisina.

-Aminoácidos de cadena ramificada (AACR):

- . Isoleucina.
- . Leucina.
- . Valina.

-Aminoácidos aromáticos (AAA):

- . Fenilalanina.
- . Tirosina.
- . Triptófano.

-Aminoácidos neutros (AAN) se considera al conjunto de aminoácidos de cadena ramificada (AACR) y aminoácidos aromáticos (AAA).

$$\text{AAN} = \text{AACR} + \text{AAA}$$

-Aminoácidos azufrados:

- . Cisteína.
- . Metionina.

Por medio de esta técnica se ha determinado también la 3-metil-histidina.

3.4.17.1. Reactivos y estándar de aminoácidos.

3.4.17.1.1. *Eluyentes.*

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

- Solución A: Formada por una mezcla de Acetato sódico 0,05 M (pH=6,7), Metanol (H.P.L.C.) y Tetrahidrofurano (A.R.) en las proporciones de 800:190:10 (v:v:v) respectivamente.

- Solución B: Formada por una mezcla de Acetato sódico 0,05 M (pH=6,7) y Metanol (H.P.L.C.) en la proporción de 200:800 (v:v), respectivamente.

Ambas soluciones se filtran a vacío, a través de filtros Millipore de celulosa, tipo HULP, con poro de 0,45 micrometros. Seguidamente se sonicán durante 10-15 minutos con el fin de eliminar las burbujas de aire, que impiden el correcto funcionamiento de las bombas para crear el gradiente adecuado.

3.4.17.1.2. *Preparación de la solución derivatizante Ortoptalaldehido / 2-mercaptoetanol.*

Se ha seguido la metódica propuesta por JONES y col. (1981), que consiste en disolver 25 mg de ortoptalaldehido (O.P.A.) en 0,63 ml de metanol absoluto (H.P.L.C.), añadiendo 25 μ l de 2-mercaptoetanol y 5,6 ml de Borato sódico 0,4M (pH=9,5).

Para la conservación de esta mezcla se le hace fluir Nitrógeno gaseoso mediante una Pipeta Pasteur durante 10 minutos, para desalojar el Oxígeno y conservarla en atmósfera inerte, dejándola reposar 24 horas antes de usarla.

Para evitar contaminaciones y oxidaciones se prepara de nuevo cada 7 días.

3.4.17.1.3. *Derivatización de aminoácidos con OPA.*

La metodología propuesta por JONES y col.(1981) como método derivatizante precolumna para los aminoácidos es la reacción con ortoptalaldehido, en presencia de un tiol para dar lugar a un compuesto que es un isoindol tiosustituido, altamente fluorescente. Este compuesto es detectable por las técnicas analíticas usuales.

3.4.17.1.4. *Solución estándar de aminoácidos y estándar interno.*

La solución estándar se prepara con 22 aminoácidos, a una concentración de 6,9 pmol/ μ l cada uno de ellos. Se disuelven en una mezcla metanol:agua (v:v). Algunos aminoácidos, como la tirosina, se disuelven con dificultad y es necesario disolverlos previamente por sonicación.

El estándar interno elegido es el ácido alfa-aminobutírico (α -ABA). Este se prepara a una concentración de 8 pmol/ μ l.

Estas dos soluciones se conservan a -20°C .

3.4.17.1.5. *Soluciones coadyuvantes.*

Intensifican la fluorescencia y estabilidad de los aminoácidos derivatizados.

Preparamos una solución de Dodecil sulfato sódico (SDS) al 2% en Borato sódico 0,4M pH=9,5, y una solución de Brij-35 al 2% en Borato sódico 0,4M pH=9,5, que tiene la propiedad de resaltar la fluorescencia de determinados aminoácidos, cuya reacción de derivatización es baja.

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

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

3.4.17.1.6. *Proceso de derivatización.*

A 8 ml de la solución estándar de aminoácidos ($10\text{ pmol}/\mu\text{l}$) se añade 1,25 ml de Sodio Dodecil Sulfato al 2% en Borato Sódico 0,4M a pH=9,5; 1,25 ml de Brij-35 al 2% en Borato Sódico 0,4 M a pH=9,5; 1 ml de la solución de α -aminobutírico, estándar interno ($100\text{ pmol}/\text{ml}$). Se agita la mezcla y se agrega 1 ml de Fosfato sódico 0,1 M pH=4.

Por otra parte se prepara la muestra problema. Para ello se mezclan previamente 5 ml de Dodecil Sulfato Sódico al 2% en Borato Sódico 0,4 M pH=9,5, 5 ml de Brij-35 al 2% en Borato Sódico 0,4 M pH=9,5 y 4 ml de la solución estándar interno α -ABA ($100\text{ pmol}/\text{ml}$). Se agita y se añade 4 ml de Fosfato sódico 0,1 M pH=4.

De esta mezcla se toma 0,45 ml, a los que se agrega 0,8 ml de la mezcla estándar de aminoácidos, previamente preparada. Por ser el analizador de aminoácidos automático recoge $20\ \mu\text{l}$ del estándar de aminoácidos y $20\ \mu\text{l}$ de la solución derivatizante mediante una jeringa. Ambos volúmenes son dirigidos a la precolumna donde, al mezclarse, se derivatizan los aminoácidos, que son transportados a través de la columna cromatográfica Si-C₁₈, eluyendo según su afinidad por ésta.

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

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

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

3.4.17.1.7. Método del estándar interno.

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

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

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

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

3.4.17.2. Sistema cromatográfico.

El sistema cromatográfico consta de los siguientes elementos:

- . Depósito del disolvente: Se emplean dos botellas de 5 litros de capacidad, donde están los disolventes A y B, ya descritos, que constituyen la fase móvil del sistema.
- . Bombas de alta presión: Se utilizan dos bombas de la casa WATERS modelo 6000A, cuya estructura electrónica está descrita en los manuales de instrucciones correspondientes. Son bombas hidráulicas que impulsan el disolvente a una presión y flujo constantes.
- . Inyector automático: El modelo empleado es el WISP 710B de la casa WATERS. La descripción de su mecánica y estructura electrónica están descritas en los manuales de instrucciones correspondientes. Consta de un manómetro, que regula la presión del sistema a 30 P.S.I., con objeto de captar un volumen adecuado de solución estándar, muestras y solución derivatizante. Estos volúmenes son inyectados al principio de la columna mediante una jeringa regulada automáticamente. También se compone de un sistema portador de muestras, autorregulado.
- . Columna: Se utiliza el modelo R 1362 HYPERSIL ODS 5 μ de acero inoxidable, cuya misión es separar los distintos componentes de la muestra de aminoácidos según el coeficiente de partición entre el hidrocarburo de la columna y la mezcla de eluyentes.
- . Detector: Es un espectrofluorímetro, que mide la fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con la mezcla de Ortoptalaldehído y 2- mercaptoetanol. Transmite automáticamente a la aguja inscriptora una señal proporcional a la concentración de dichos aminoácidos.
- . Procesador de datos: El modelo utilizado es el "DATA MODULE" de la casa WATERS. Lleva un registrador termoelectrónico, que inscribe las señales emitidas por el detector, traducidas electrónicamente y amplificadas. Dichas señales son inscritas en forma de picos cuyas áreas son proporcionales a la cantidad de aminoácido presente en la muestra. Estas áreas son calculadas mediante un integrador automático que cuantifica los aminoácidos objeto de estudio.

. Controlador programable: Todos los aparatos descritos están conectados al sistema Controlador programable, modelo 721 de WATERS, que es un microprocesador capaz de controlar las funciones del cromatógrafo líquido de alta resolución (Sistema H.P.L.C.).

3.4.18. Creatinina en orina.

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

3.4.18.1. Fundamento.

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

3.4.18.2. Técnica.

Se tratan 0,5 ml de la solución de orina con 0,5 ml de ácido tricloroacético 1,2 M y 1 ml de una solución formada por ácido pícrico (35mmol/ml) y NaOH (0,32 mol/l).

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

Los resultados se llevan a una curva patrón de creatinina. Se expresa en mg/día.

3.4.19. Tratamiento estadístico.

El estudio estadístico de los datos se realizó por análisis de la distribución de las distintas variables de la muestra.

A pesar del reducido tamaño de los grupos de análisis, cada una de las variables sigue una distribución próxima a lo normal, por lo que se han adoptado pruebas paramétricas, asumiendo la normalidad en los grupos.

En el tratamiento estadístico de las observaciones se ha realizado un análisis de la varianza (JOHNSON y BHATTACHARYA, 1987) en cada uno de los tratamientos. Las comparaciones entre pares de grupos se ha realizado mediante el test de Duncahn.

Se ha establecido como nivel mínimo de significación el 5%.

La codificación de los datos se ha realizado en un ordenados IBM 370 y el cálculo estadístico con ayuda de los programas de la serie SAS, versión S.18 (SAS INSTITUTE NORTH CAROLINA, 1988).

RESULTADOS

TABLA 1

INGESTA (g/día), PESO CORPORAL (g), PESO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO (g) E ÍNDICE MIOSOMÁTICO.

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
INGESTA (g/día).			
CONTROL	13.25± 0.56 ^{a,1}	13.87± 0.53 ^{a,1}	14.35± 0.71 ^{a,1}
LOTE II	6.58± 0.33 ^{b,1}	7.99± 0.52 ^{b,1,2}	9.02± 0.60 ^{b,1}
LOTE III	3.44± 0.24 ^{c,1}	3.90± 0.02 ^{c,1}	---
PESO CORPORAL (g).			
CONTROL	109.60±10.86 ^{a,1}	123.03± 8.20 ^{a,1}	140.95±13.92 ^{a,2}
LOTE II	90.70± 5.19 ^{b,1}	78.81±39.53 ^{b,2}	71.66± 8.40 ^{b,2}
LOTE III	77.60±10.53 ^{b,1}	74.90± 4.48 ^{b,1}	---
PESO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO (g)			
CONTROL	0.45±0.079 ^{a,1}	0.621± 0.08 ^{a,2}	0.78± 0.07 ^{a,3}
LOTE II	0.55±0.100 ^{a,1}	0.420± 0.05 ^{b,2}	0.41± 0.05 ^{b,2}
LOTE III	0.40±0.120 ^{a,1}	0.390± 0.08 ^{b,1}	---
ÍNDICE MIOSOMÁTICO (g músculo/100 g peso corporal).			
CONTROL	0.41± 0.06 ^{a,1}	0.50± 0.04 ^{a,2}	0.55± 0.08 ^{a,2}
LOTE II	0.61± 0.01 ^{a,b,1}	0.53± 0.06 ^{a,1}	0.59± 0.03 ^{a,1}
LOTE III	0.50± 0.09 ^{a,1}	0.51± 0.09 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

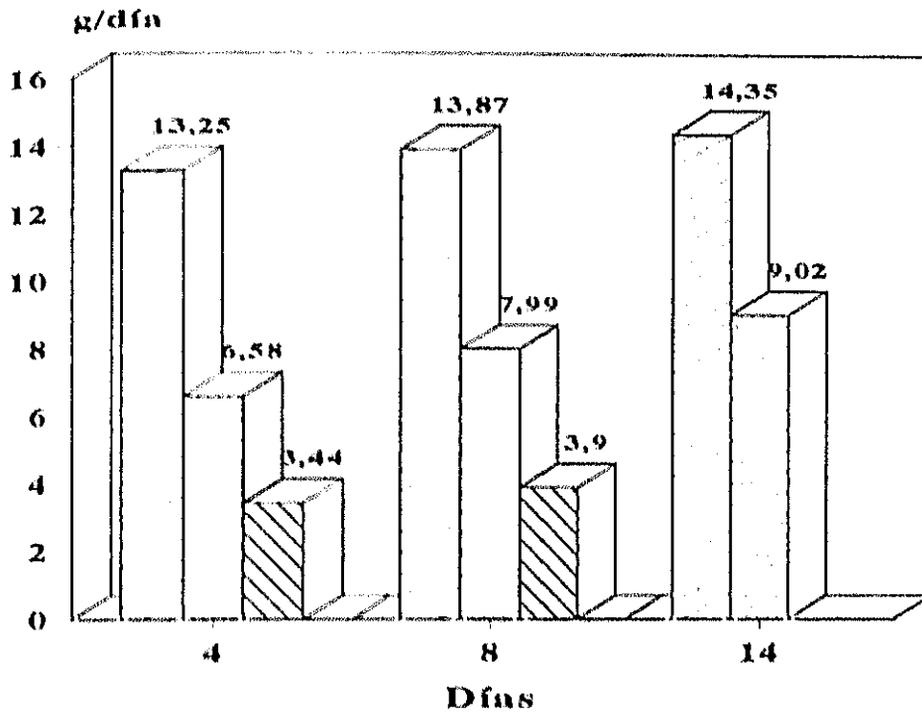
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P < 0.05) entre días.

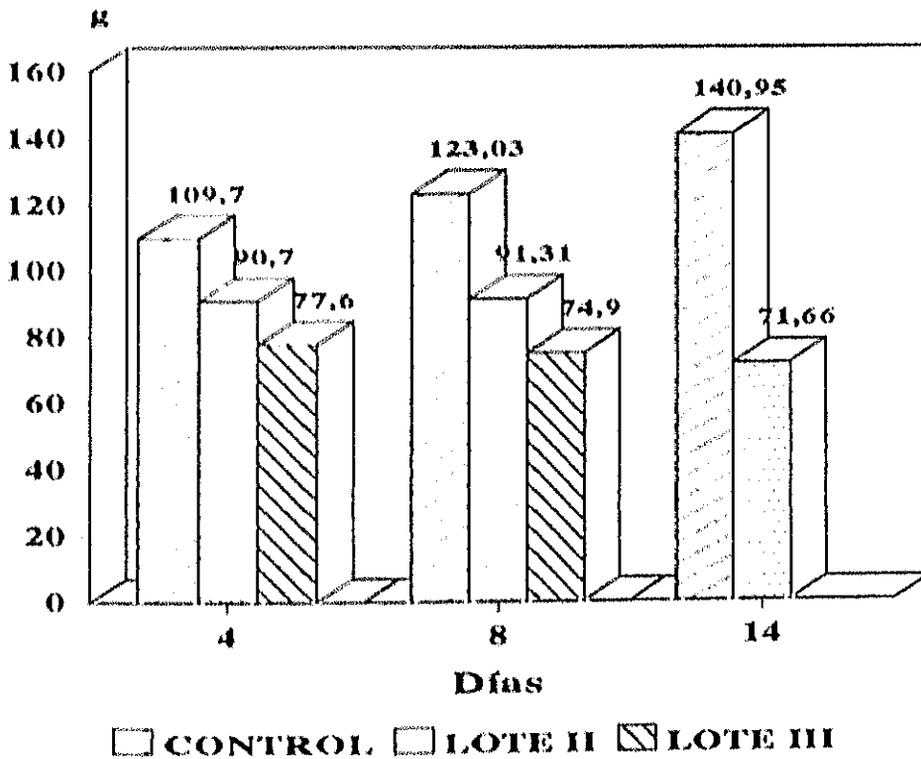
--- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA I.- INGESTA Y PESO CORPORAL

INGESTA

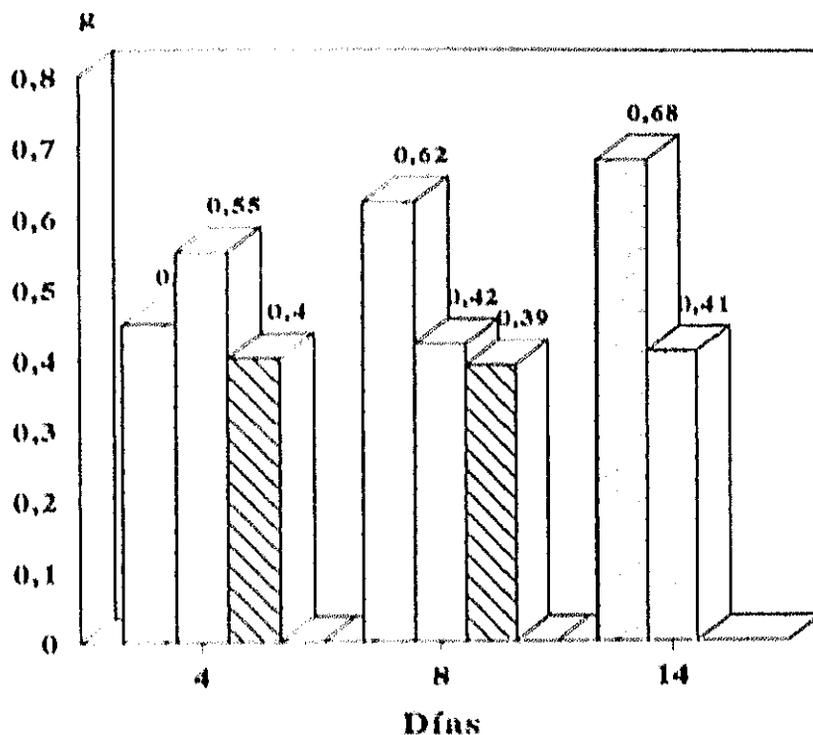


PESO CORPORAL



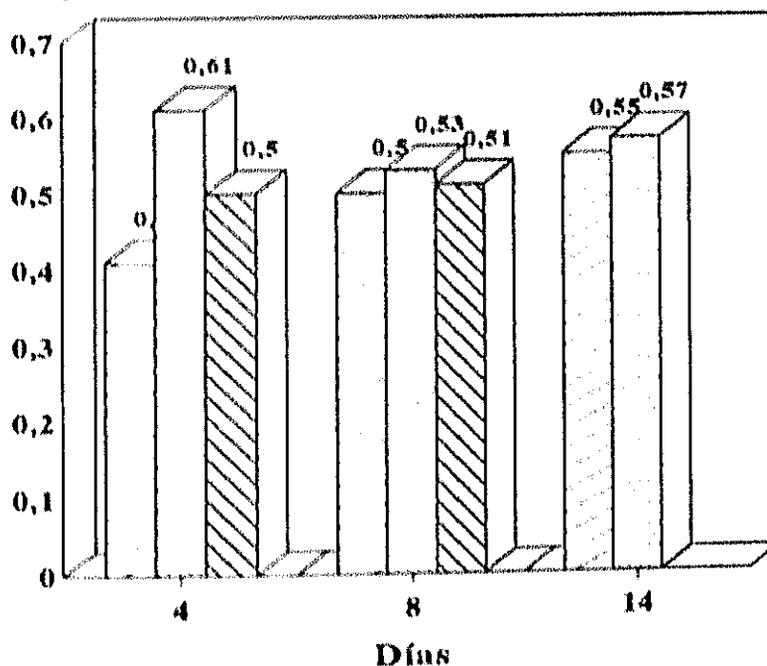
GRÁFICA II.- PESO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO E ÍNDICE MIOSOMÁTICO

PESO DEL MÚSCULO



ÍNDICE MIOSOMÁTICO

g de músculo/100g de peso corporal



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 2

INGESTA DE NITRÓGENO, BALANCE DE NITRÓGENO, UREA (mg/día) Y CREATININA (mg/día) EN ORINA.

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
INGESTA DE NITRÓGENO (mg).			
CONTROL	208.93±31.71 ^{a,1}	228.00±26.12 ^{a,1}	224.38±28.14 ^{a,1}
LOTE II	100.69±10.77 ^{b,1}	128.68±29.98 ^{b,1}	141.02±22.77 ^{b,1}
LOTE III	115.74± 5.58 ^{b,1}	110.68±13.90 ^{b,1}	---
BALANCE DE NITRÓGENO (mg)			
CONTROL	149.06±26.67 ^{a,1}	169.90±22.95 ^{a,1}	166.52±27.58 ^{a,1}
LOTE II	45.39± 9.57 ^{b,1,2}	24.99±33.83 ^{b,1}	68.47±17.57 ^{b,2}
LOTE III	44.30± 5.14 ^{b,1}	-42.42±16.08 ^{a,2}	---
UREA (mg/día) EN ORINA			
CONTROL	39.80± 6.84 ^{a,1}	71.86±11.04 ^{a,1,2}	80.06± 9.53 ^{a,2}
LOTE II	76.18±10.88 ^{a,b,1}	266.72±55.03 ^{b,2}	135.14±13.06 ^{b,1}
LOTE III	127.50±30.19 ^{b,1}	273.49±76.09 ^{b,1}	---
CREATININA (mg/día) EN ORINA.			
CONTROL	0.69± 0.11 ^{a,1}	2.13± 0.12 ^{a,2}	1.48±0.14 ^{a,3}
LOTE II	0.66± 0.11 ^{a,1}	1.47± 0.23 ^{a,2}	0.85±0.07 ^{b,1,2}
LOTE III	0.76± 0.13 ^{a,1}	1.30± 0.43 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

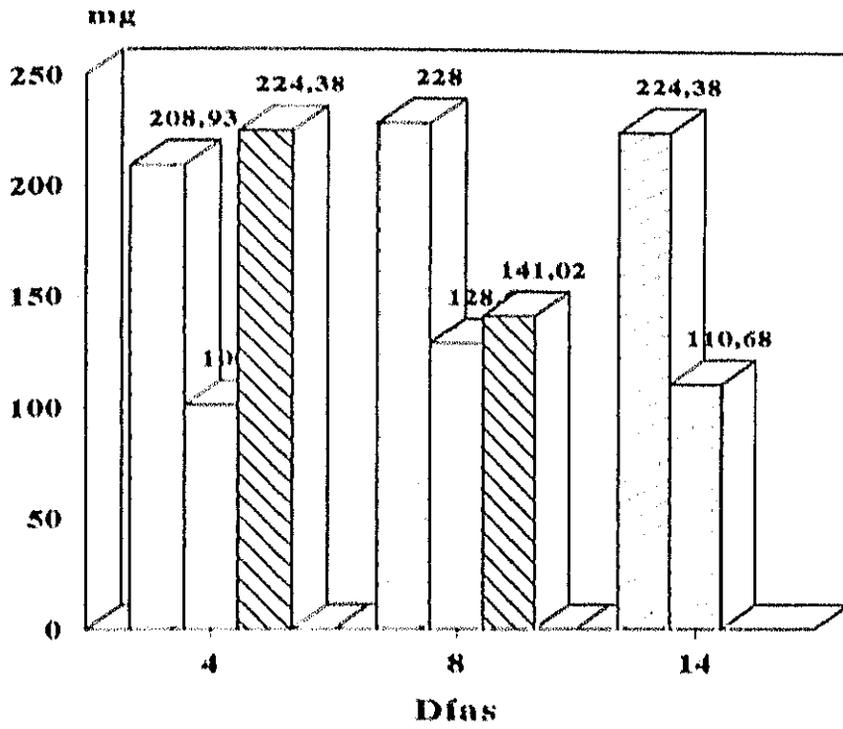
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) entre días.

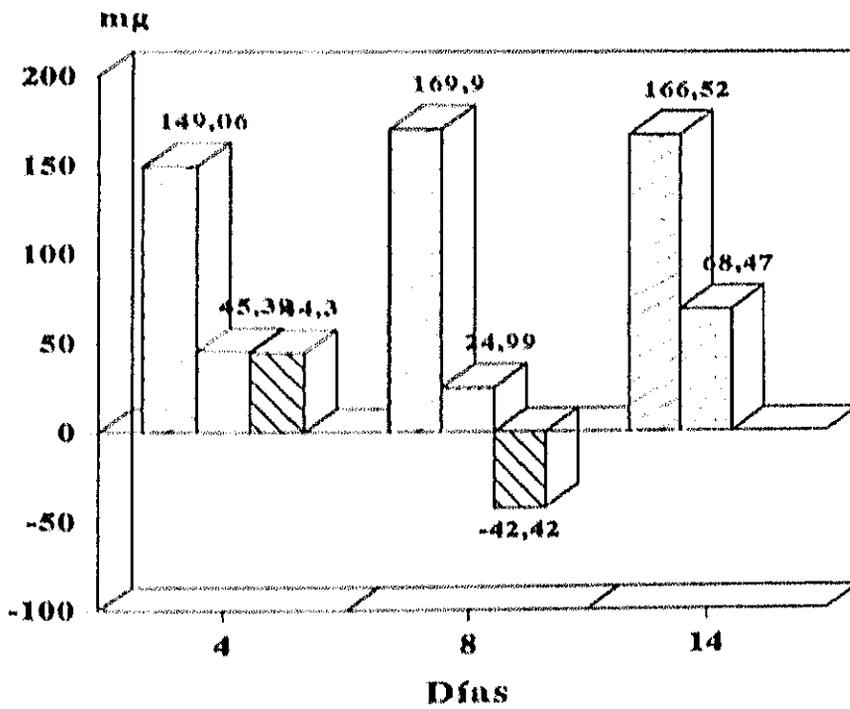
--- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA III.- INGESTA Y BALANCE DE NITRÓGENO

INGESTA DE NITRÓGENO



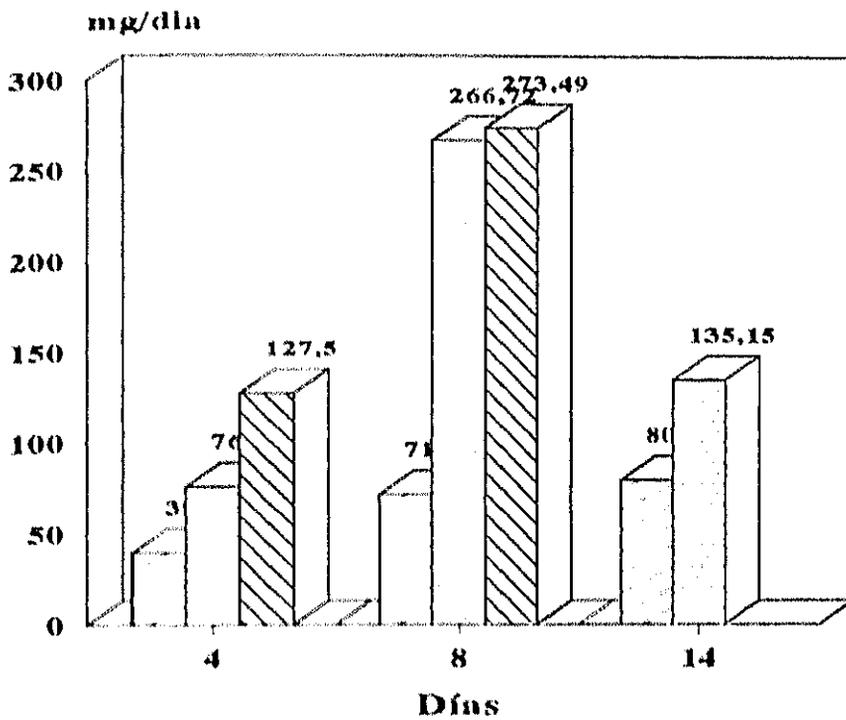
BALANCE DE NITRÓGENO



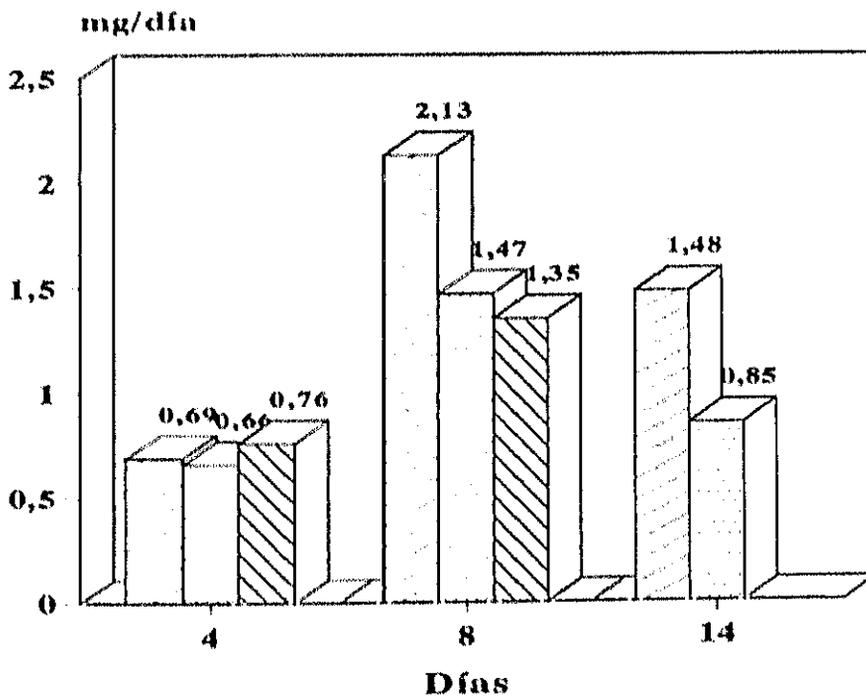
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA IV.- UREA Y CREATININA EN ORINA

UREA EN ORINA



CREATININA EN ORINA



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 3

MASA MUSCULAR (g), PORCENTAJE MUSCULAR, NITRÓGENO EN MÚSCULO, PROTEÍNAS SOLUBLES EN MÚSCULO.

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
MASA MUSCULAR (g).			
CONTROL	40.98±4.13 ^{a,1}	46.32± 6.01 ^{a,1}	53.35±5.43 ^{a,2}
LOTE II	35.19±6.99 ^{b,1}	28.91± 2.83 ^{b,2}	29.36±3.41 ^{b,2}
LOTE III	29.56±6.93 ^{b,1}	27.40± 5.53 ^{b,1}	---
PORCENTAJE DE MÚSCULO RESPECTO DEL PESO TOTAL (%).			
CONTROL	37.38±0.61 ^{a,1}	37.61± 3.79 ^{a,1}	37.65±3.70 ^{a,1}
LOTE II	41.16±3.18 ^{a,1}	36.92± 3.74 ^{a,1}	40.99±2.55 ^{a,1}
LOTE III	37.75±4.55 ^{a,1}	36.55± 6.84 ^{a,1}	---
NITRÓGENO TOTAL EN MÚSCULO (mg N/g de músculo)			
CONTROL		36.34± 6.86 ^{a,1}	39.84±7.03 ^{a,1}
LOTE II		44.17±19.23 ^{b,1}	38.15±4.91 ^{a,1}
LOTE III		70.64± 4.48 ^{c,1}	---
PROTEÍNAS SOLUBLES EN MÚSCULO (mg de protefna/g de músculo)			
CONTROL	8.10±0.82 ^{a,1}	10.01± 0.91 ^{a,1}	11.05±0.82 ^{a,1}
LOTE II	9.12±0.94 ^{a,1}	5.90± 0.66 ^{b,2}	5.28±0.37 ^{b,2}
LOTE III	7.28±0.70 ^{a,1}	6.71± 1.17 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) en el día.

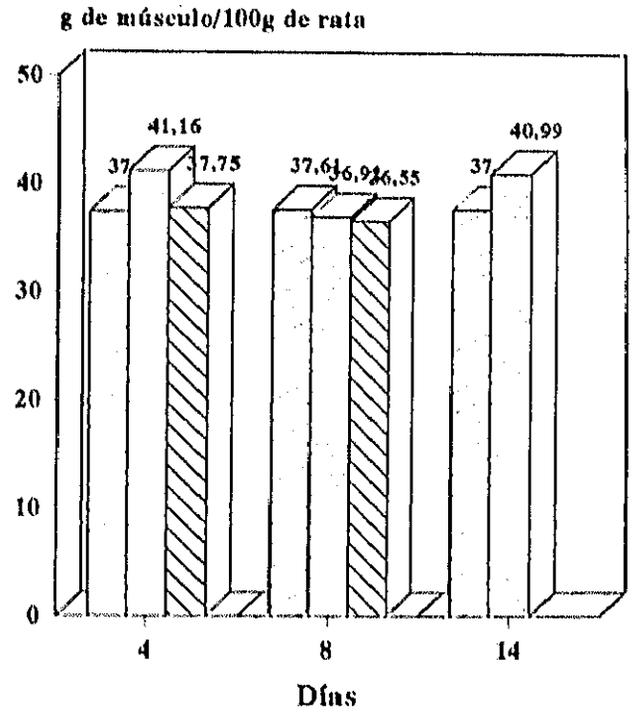
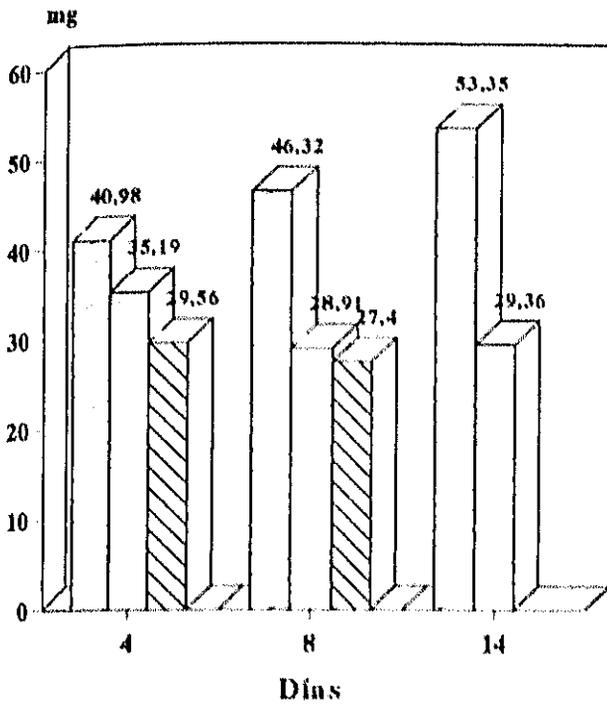
Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P < 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

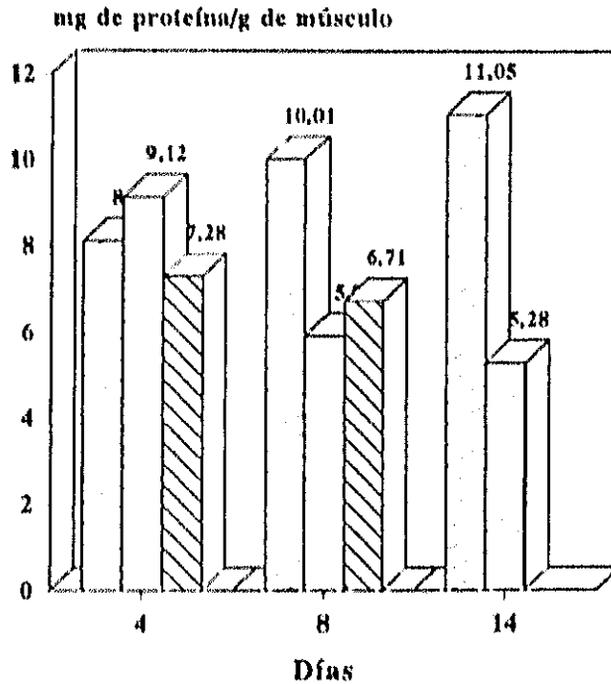
GRÁFICA V.- MASA MUSCULAR, PORCENTAJE DEL MÚSCULO RESPECTO AL PESO TOTAL Y PROTEÍNAS SOLUBLES EN MÚSCULO GASTROCNEMIO

MASA MUSCULAR

PORCENTAJE DEL MÚSCULO



PROTEÍNAS SOLUBLES EN MÚSCULO



□ CONTROL □LOTE II ▨LOTE III

TABLA 4

PORCENTAJE DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR, NITRÓGENO MIOFIBRILAR ,PROTEÍNA MIOFIBRILAR POR Kg DE PESO Y NITRÓGENO MIOFIBRILAR/NITRÓGENO MUSCULAR.

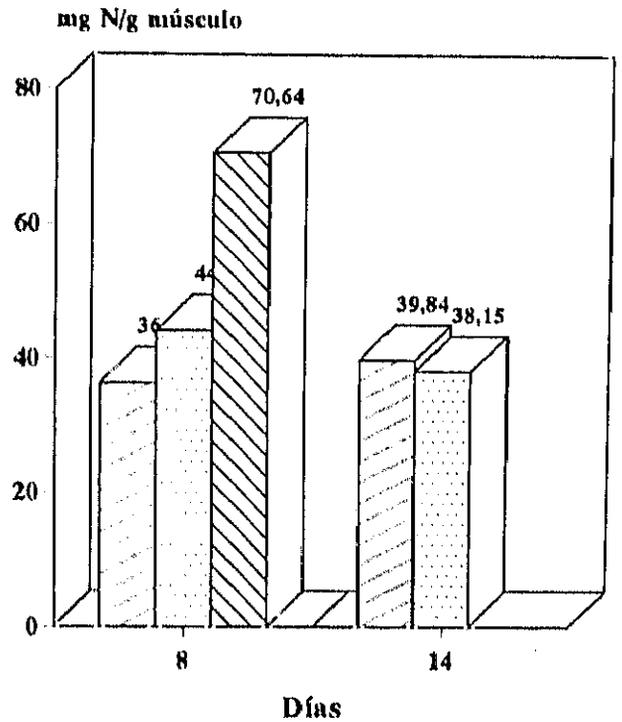
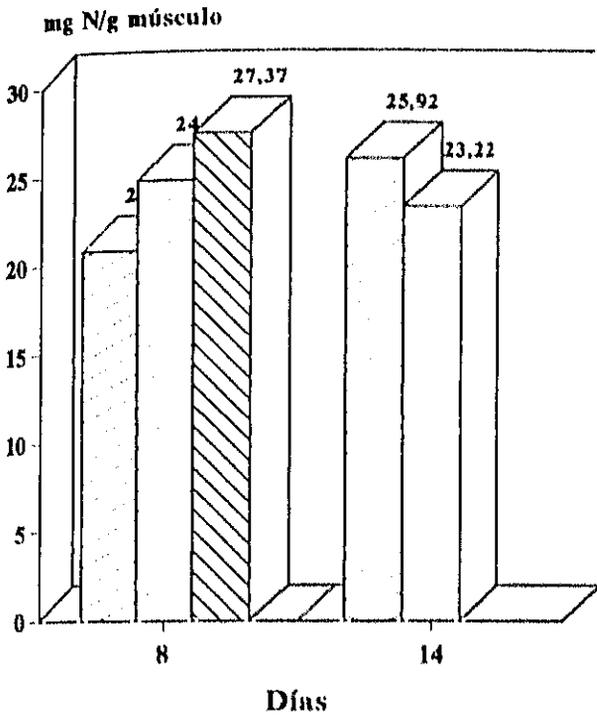
	DÍA 8	DÍA 14
PORCENTAJE DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR RESPECTO A LA MASA MUSCULAR(%)		
CONTROL	57.40± 3.94 ^{a,1}	64.58± 6.83 ^{a,1}
LOTE II	58.64± 9.51 ^{a,1}	61.00±13.74 ^{a,1}
LOTE III	51.40±17.91 ^{a,1}	---
NITRÓGENO DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR (mg N/g de músculo).		
CONTROL	20.80± 3.78 ^{a,1}	25.92± 6.56 ^{a,1}
LOTE II	24.73± 7.75 ^{a,1}	23.22± 2.04 ^{a,1}
LOTE III	27.37±12.65 ^{a,1}	---
PROTEÍNA MIOFIBRILAR (mg de N) POR Kg DE PESO		
CONTROL	0.96± 0.37 ^{a,1}	1.37± 0.18 ^{a,1}
LOTE II	0.77± 0.13 ^{b,1}	0.67± 0.12 ^{b,1}
LOTE III	0.99± 0.36 ^{a,1}	---
NITRÓGENO MIOFIBRILAR / N MUSCULAR (mg de N PMF/mg de N músculo).		
CONTROL	0.57± 0.04 ^{a,1}	0.64± 0.07 ^{a,1}
LOTE II	0.63± 0.16 ^{a,1}	0.61± 0.14 ^{a,1}
LOTE III	0.51± 0.18 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.
 Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas
 (P < 0.05) en el día.
 Números diferentes en filas indican diferencias significativas
 (P < 0.05) entre días.
 --- Efecto letal de la dieta.

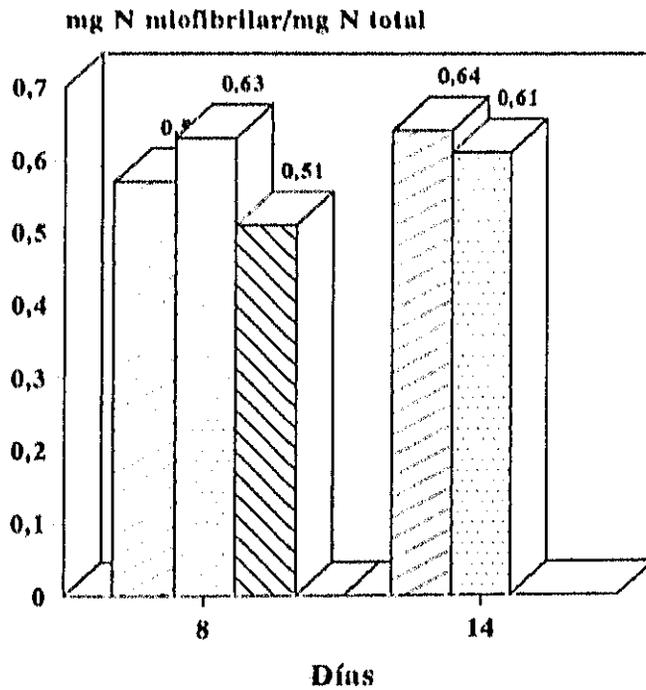
GRÁFICA VI.- N DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR, N MUSCULAR Y RELACIÓN ENTRE AMBOS

N PROTEÍNA MIOFIBRILAR

NITRÓGENO TOTAL EN MÚSCULO



N MIOFIBRILAR/N TOTAL

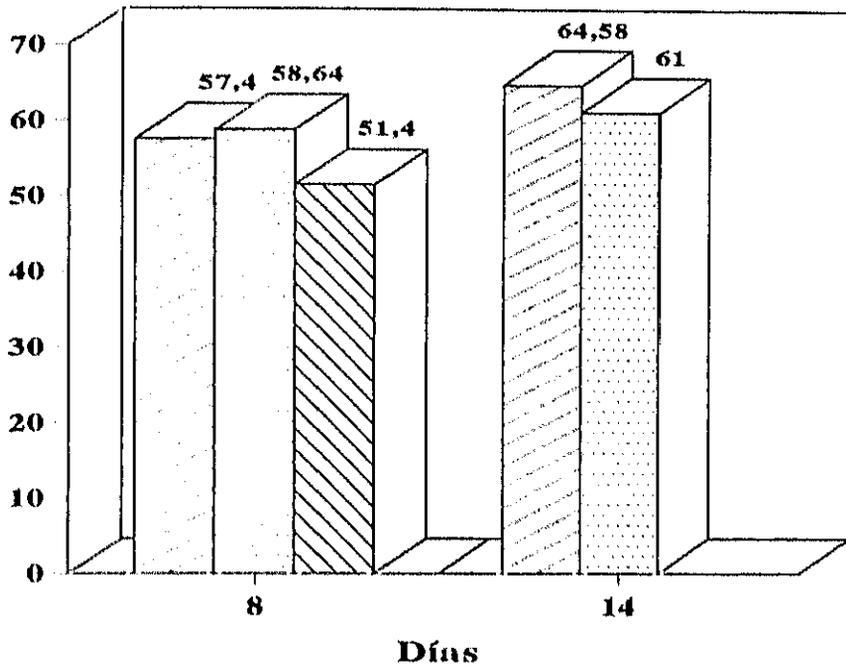


□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA VII.- PROTEÍNA MIOFIBRILAR: PORCENTAJE RESPECTO A LA PROTEÍNA TOTAL Y A 1 Kg DE PESO CORPORAL

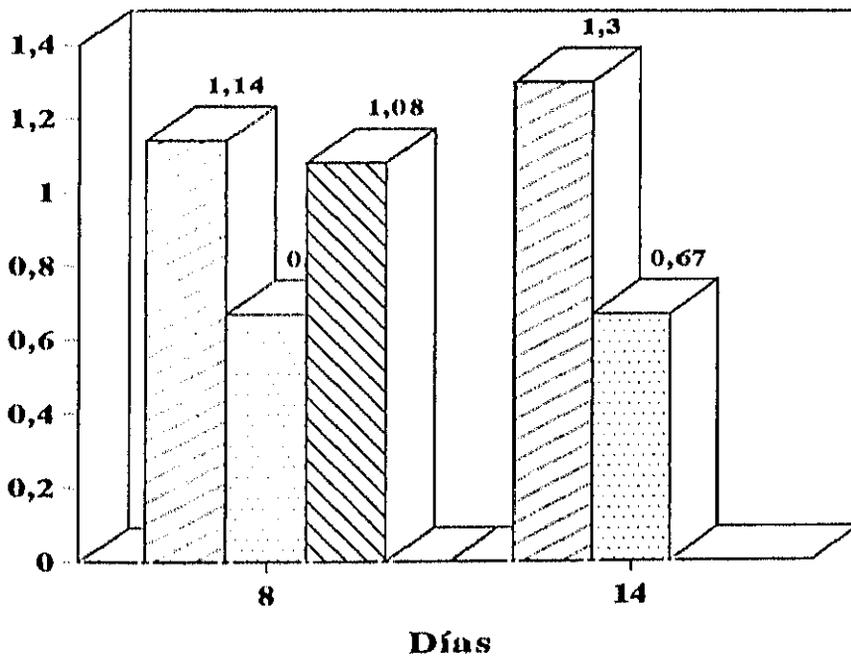
% PROTEÍNA MIOFIBRILAR

mg protefna miofibrillar/100 g masa muscular



PROTEÍNA MIOFIBRILAR/Kg PESO

mg protefna miofibrillar/1 Kg peso



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 5

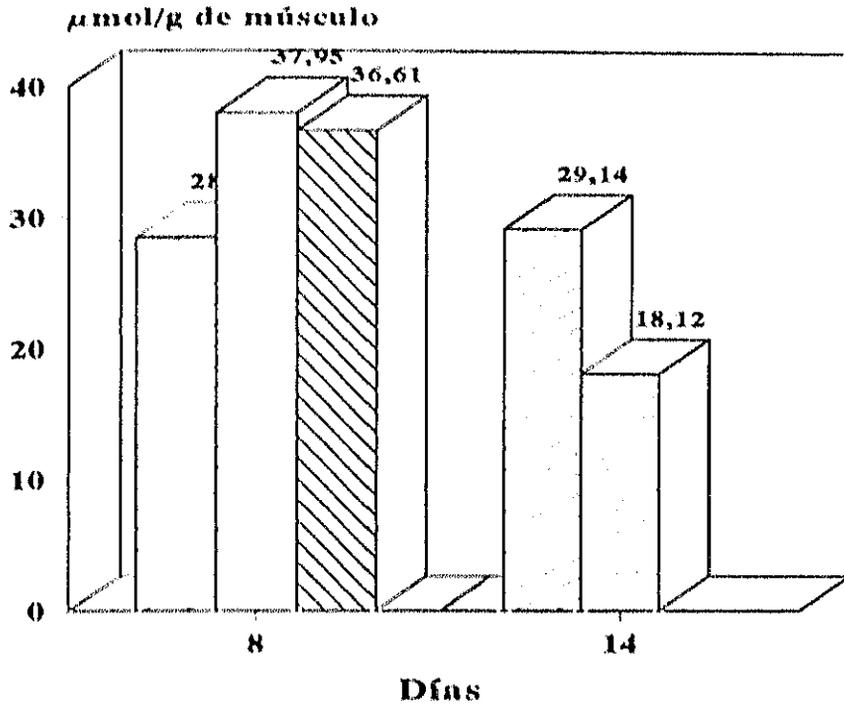
CONCENTRACIÓN DE 3-METIL-HISTIDINA EN MÚSCULO Y EN ORINA.

	DÍA 8	DÍA 14
3-METIL-HISTIDINA EN MÚSCULO ($\mu\text{mol/g}$ de músculo)		
CONTROL	28.49 \pm 3.32 ^{a,1}	29.14 \pm 16.81 ^{a,1}
LOTE II	37.95 \pm 8.30 ^{a,1}	18.12 \pm 5.58 ^{a,1}
LOTE III	36.61 \pm 6.88 ^{a,1}	---
3-METIL-HISTIDINA EN ORINA ($\mu\text{mol/orina}$ de 24 horas)		
CONTROL	4.83 \pm 0.23 ^{a,1}	2.77 \pm 0.42 ^{a,1}
LOTE II	1.31 \pm 0.83 ^{b,1}	0.62 \pm 0.07 ^{b,1}
LOTE III	0.94 \pm 0.19 ^{b,1}	---

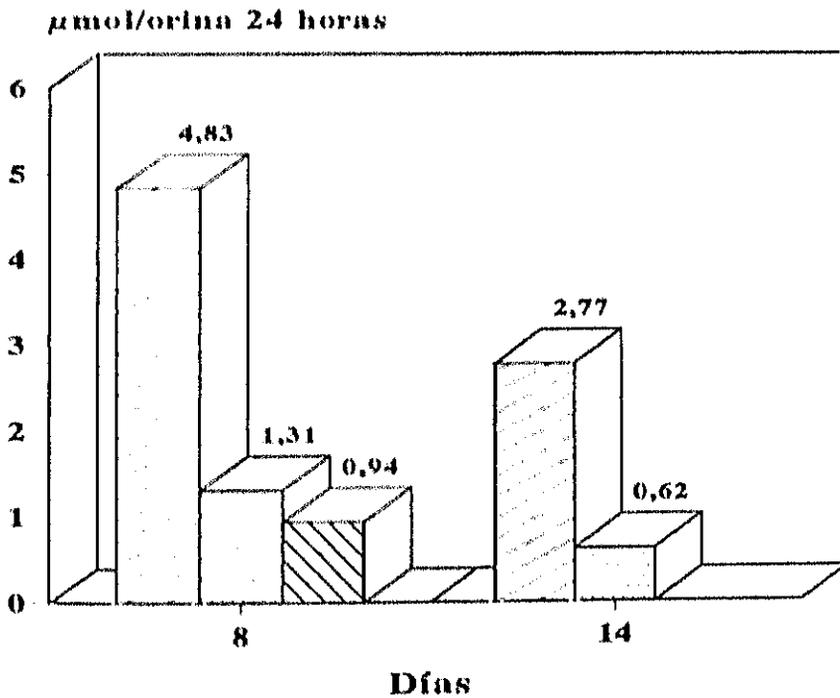
Valores medios de 4 animales \pm ESM.
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas
($P < 0.05$) en el día.
Números diferentes en filas indican diferencias significativas
($P < 0.05$) entre días.
--- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA VIII.- 3-METIL-HISTIDINA EN MÚSCULO Y EN ORINA

3-METIL-HISTIDINA EN MÚSCULO



3-METIL-HISTIDINA EN ORINA



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 6

PROTEÍNA MIOFIBRILAR: CATABOLISMO (mg N/día), TASA FRACCIONAL CATABÓLICA (%), VIDA MEDIA (días). SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO (mg N/día) Y TASA FRACCIONAL DE SÍNTESIS.

	DÍA 8	DÍA 14
CATABOLISMO (mg N/día) (1).		
CONTROL	130.40±16.75 ^{a,1}	132.90±4.84 ^{a,2}
LOTE II	20.46± 3.79 ^{b,1}	17.73±5.14 ^{b,1}
LOTE III	16.13± 2.02 ^c	---
TASA FRACCIONAL CATABÓLICA (%) (2).		
CONTROL	13.91± 0.99 ^{a,1}	11.26±4.37 ^{a,2}
LOTE II	2.63± 0.51 ^{b,1}	2.53±0.62 ^{b,1}
LOTE III	1.78± 0.21 ^b	---
VIDA MEDIA (días) (3).		
CONTROL	5.07± 0.32 ^{a,1}	9.70±2.59 ^{a,2}
LOTE II	30.56± 4.65 ^{b,1}	36.21±9.76 ^{b,1}
LOTE III	40.01± 4.69 ^b	---
SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA (mg N/día) EN MÚSCULO GASTROCNEMIO.		
CONTROL	201.84±15.55 ^a	
LOTE II	1.51± 0.40 ^b	
LOTE III	---	
TASA FRACCIONAL DE SÍNTESIS (%)		
CONTROL	16.73±1.37 ^a	
LOTE II	0.22±0.02 ^b	
LOTE III	---	

Valores medios de 4 animales ± ESM.
 Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) en el día.
 Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) entre días.
 --- Efecto letal de la dieta.

(1) Catabolismo calculado mediante la división de la 3-metil-histidina urinaria (*) y la concentración de 3-metil-histidina en la proteína miofibrilar.

$$\text{Catabolismo} = \frac{0,8 \times 3\text{-M-H orina} (*)}{3\text{-M-H Prot. Miof.}}$$

(*) Los valores se han calculado asumiendo que el 80% de la 3-M-H urinaria deriva del catabolismo de la proteína miofibrilar del músculo esquelético.

(2) Catabolismo de la proteína miofibrilar como porcentaje de la proteína miofibrilar total del músculo gastrocnemio el día 8.

$$\text{Tasa fraccional catabólica} = \frac{\text{Catabolismo} \times 100}{\text{Proteína miofibrilar día 8}}$$

$$(3) \text{ Vida media} = \frac{0,693}{\text{Tasa fracc. catab.}}$$

TABLA 7

GANANCIA DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR DESDE EL DÍA 8 AL 14
(mg N/día) Y TASA FRACCIONAL DE GANANCIA (%).

	CONTROL	LOTE II
(1) GANANCIA	68.24± 0.62	-16.23±-0.24
(2) TASA FRACCIONAL DE GANANCIA	7.63± 1.10	-2.09±-0.89

- (1) Se calcula por la diferencia entre el contenido en proteína miofibrilar por Kg de rata en los días 8 y 14. La proteína miofibrilar por Kg de rata se obtiene multiplicando el peso corporal de la rata por el porcentaje del peso del músculo respecto al peso corporal y por la concentración de la proteína miofibrilar.

$$\text{Ganancia} = \frac{\text{Prot./Kg de rata día 14} - \text{Prot./Kg de rata día 8}}{\text{Nº de días}}$$

$$\text{Prot./Kg de rata} = \frac{\text{P.C.} \times \% \text{ P.M.} \times \text{C.P.M.}}{10000 \times 100}$$

P.C. = Peso corporal

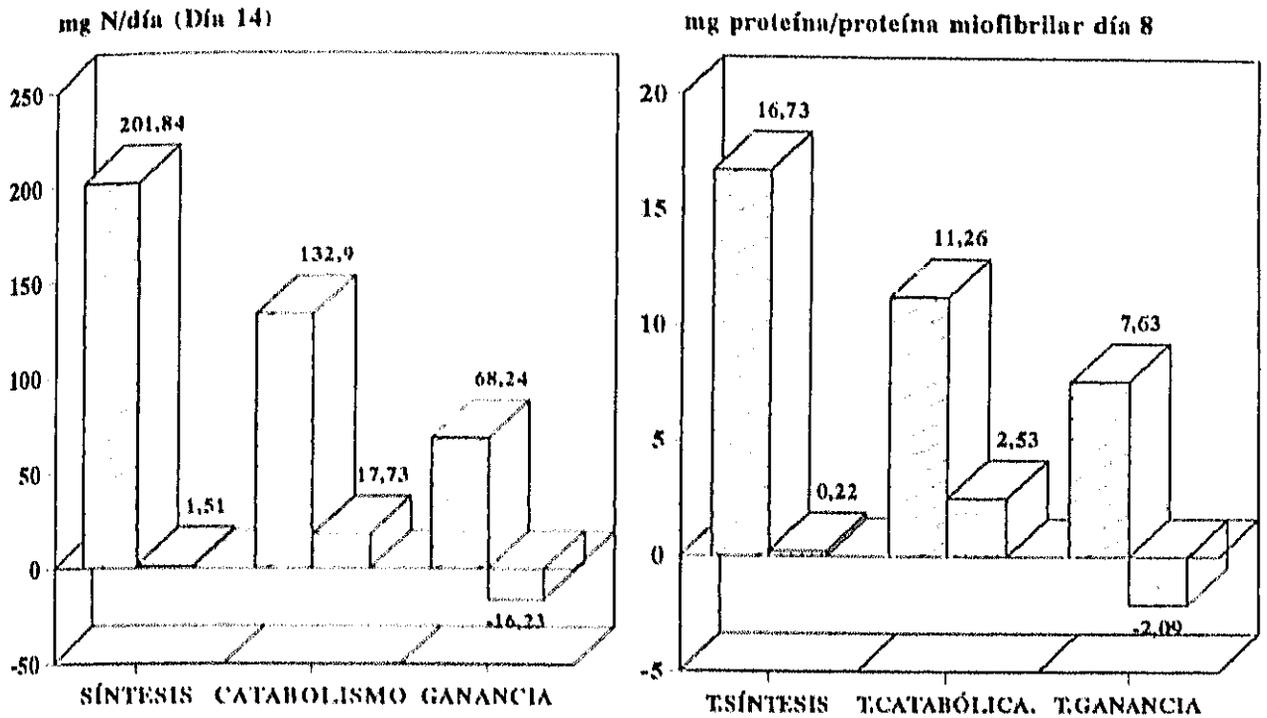
P.M. = Peso del músculo gastrocnemio

C.P.M. = Concentración de la proteína miofibrilar
(mg N miof./1g de músculo gastrocnemio)

- (2) Ganancia diaria de la proteína miofibrilar expresada como porcentaje de la proteína miofibrilar total del día 8.

GRÁFICA IX.- TURNOVER, TASAS FRACCIONALES DE TURNOVER Y VIDA MEDIA DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR

URNOVER PROT. MIOFIBRILAR TASA FRACC. DE TURNOVER (Día 14)



VIDA MEDIA PROT. MIOFIBRILAR

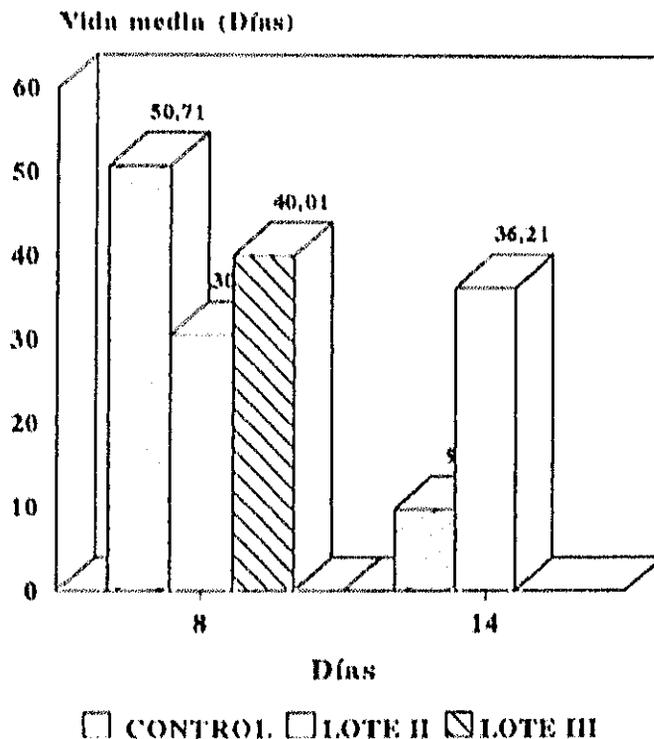


TABLA 8

GLUCOSA (mmol/100 ml), INSULINA (μ UI/ml), UREA (mg/100ml) Y NITRÓGENO UREICO (mg/100 ml) EN PLASMA.

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
GLUCOSA			
CONTROL	8.70 \pm 0.48 ^{a,1}	8.34 \pm 1.67 ^{a,1}	7.98 \pm 1.88 ^{a,1}
LOTE II	9.05 \pm 0.08 ^{a,1}	6.20 \pm 0.66 ^{a,1}	8.09 \pm 2.92 ^{a,1}
LOTE III	8.86 \pm 0.17 ^{a,1}	5.54 \pm 1.02 ^{a,2}	---
INSULINA			
CONTROL	83.39 \pm 14.50 ^{a,1}	103.19 \pm 21.60 ^{a,1}	201.58 \pm 19.63 ^{a,1}
LOTE II	84.79 \pm 10.19 ^{a,1}	37.20 \pm 2.39 ^{b,2}	91.19 \pm 1.20 ^{b,1}
LOTE III	55.35 \pm 18.19 ^{a,1}	18.39 \pm 1.04 ^{a,1}	---
UREA (mg/100 ml) EN PLASMA.			
CONTROL	15.46 \pm 1.00 ^{a,1}	16.21 \pm 1.46 ^{a,1,2}	20.32 \pm 1.10 ^{a,2}
LOTE II	36.38 \pm 3.30 ^{b,1,2}	40.86 \pm 1.03 ^{b,1}	29.72 \pm 0.80 ^{b,2}
LOTE III	32.40 \pm 5.43 ^{b,1}	67.99 \pm 9.50 ^{a,2}	---
NITRÓGENO UREICO (mg/100ml) EN PLASMA			
CONTROL	7.21 \pm 0.47 ^{a,1}	7.56 \pm 0.68 ^{a,1,2}	9.55 \pm 0.48 ^{a,2}
LOTE II	17.35 \pm 1.25 ^{b,1}	19.06 \pm 0.48 ^{b,1}	13.86 \pm 0.37 ^{b,2}
LOTE III	17.62 \pm 1.76 ^{b,1}	31.73 \pm 4.44 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

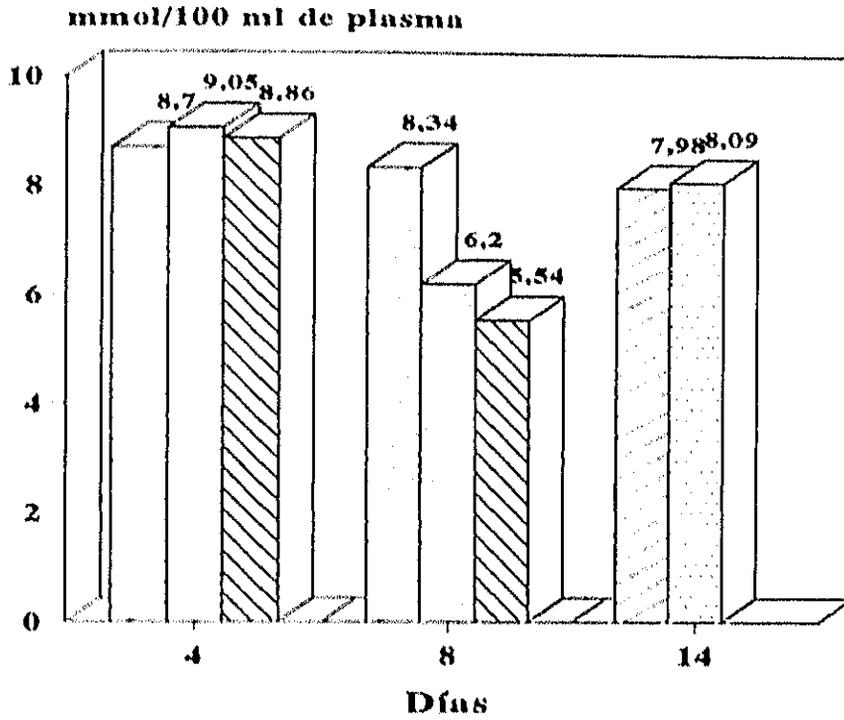
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P \leq 0.05) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P \leq 0.05) entre días.

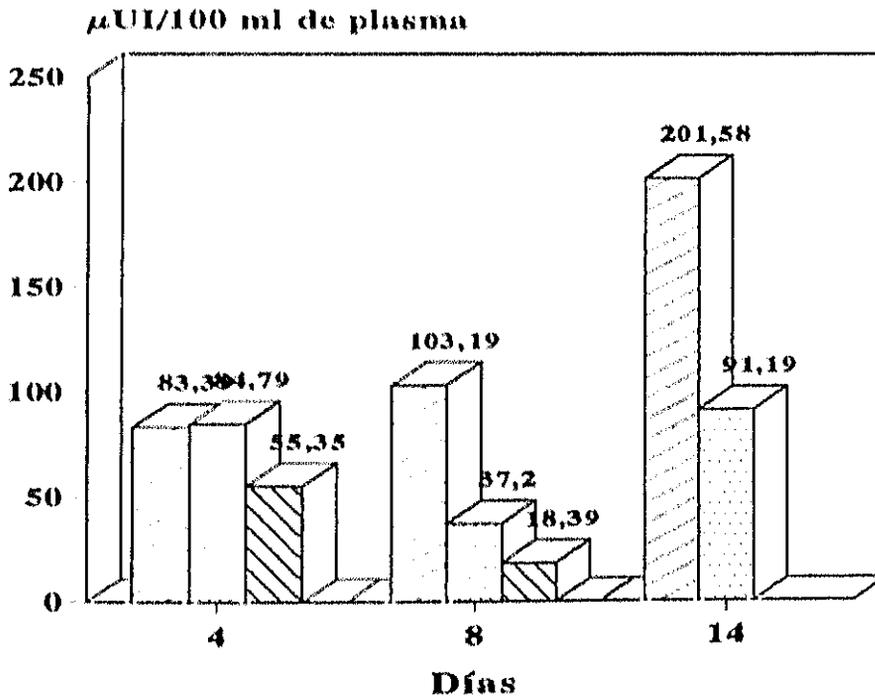
--- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA X.- GLUCOSA E INSULINA EN PLASMA

GLUCOSA EN PLASMA



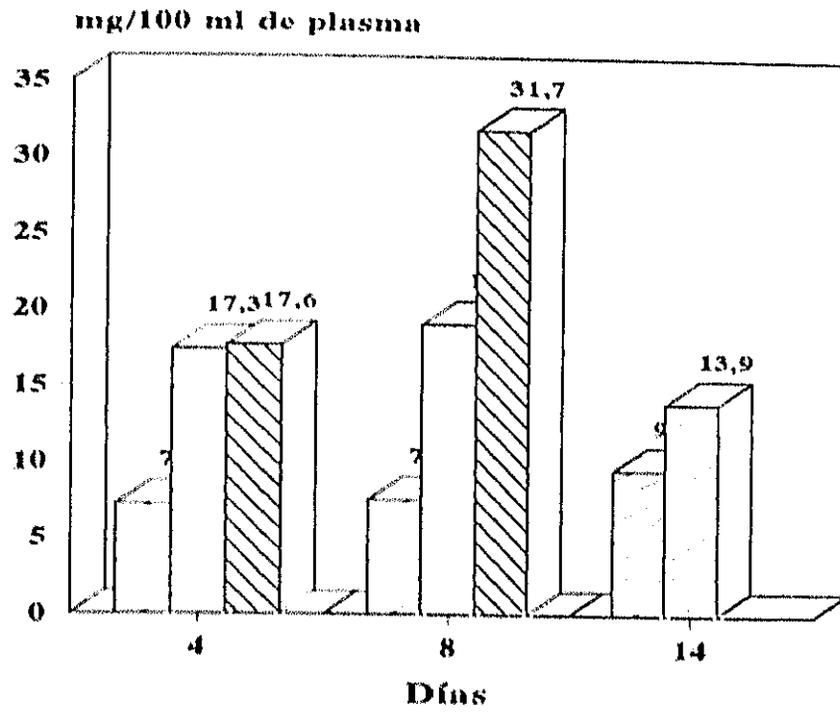
INSULINA EN PLASMA



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XI.- N UREICO Y UREA EN PLASMA

NITRÓGENO UREICO EN PLASMA



UREA EN PLASMA

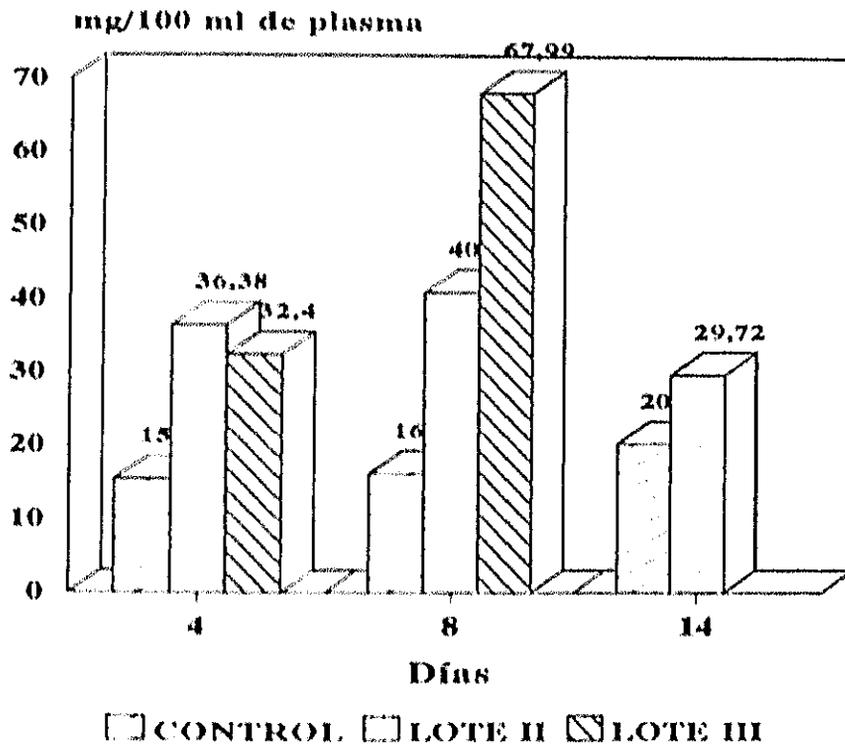


TABLA 9

DNA (mg/órgano), PROTEÍNA /DNA , TAMAÑO CELULAR (ng) Y NUMERO DE NÚCLEOS (millones) EN MÚSCULO GASTROCNEMIO.

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
DNA			
CONTROL	0.16±0.00 ^{a,1}	0.22±0.03 ^{a,1,2}	0.24±0.02 ^{a,2}
LOTE II	0.22±0.05 ^{b,1}	0.20±0.01 ^{a,1}	0.34±0.06 ^{b,1}
LOTE III	0.38±0.07 ^{b,1}	0.35±0.04 ^{b,1}	---
PROTEÍNA/DNA			
CONTROL	50.63±4.22 ^{a,1}	47.06±3.48 ^{a,1}	46.64±5.89 ^{a,1}
LOTE II	27.32±3.79 ^{b,1}	26.97±2.55 ^{b,1}	19.49±5.78 ^{b,1}
LOTE III	22.00±3.91 ^{b,1}	18.70±2.18 ^{b,1}	---
TAMAÑO CELULAR (1)			
CONTROL	17.93±1.26 ^{a,1}	18.10±1.49 ^{a,1}	20.65±1.07 ^{a,1}
LOTE II	10.41±1.33 ^{b,1}	12.81±0.64 ^{b,1}	8.75±2.16 ^{b,1}
LOTE III	7.62±1.53 ^{b,1}	7.02±0.49 ^{b,1}	---
NUMERO DE NÚCLEOS (2)			
CONTROL	25.12± 0.31 ^{a,1}	35.07±4.23 ^{a,1,2}	39.20±2.46 ^{a,2}
LOTE II	56.65± 8.24 ^{b,1}	31.78±2.10 ^{a,1}	55.04±9.71 ^{a,1}
LOTE III	31.49±11.84 ^{b,1}	56.65±6.63 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P < 0.05) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P < 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) (Peso del músculo gastrocnemio/nº de núcleos) x 1000

(2) (DNAx1000)/6,2

TABLA 10

ACTIVIDAD DNAsa ÁCIDA (U.I.) EN MÚSCULO GASTROCNEMIO.

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
DNAsa/ÓRGANO			
CONTROL	32.07± 3.26 ^{a,1}	24.36±2.45 ^{a,1}	32.03±0.76 ^{a,1}
LOTE II	14.38± 1.21 ^{b,1}	8.97±1.28 ^{b,2}	10.60±0.30 ^{b,1}
LOTE III	7.08± 0.88 ^{b,1}	6.81±1.27 ^{b,1}	---
DNAsa/mg PROTEÍNA			
CONTROL	4.04± 0.42 ^{a,1}	2.45±0.17 ^{a,2}	2.95±0.17 ^{a,2}
LOTE II	1.50± 0.09 ^{b,1}	1.66±0.10 ^{b,1}	2.03±0.09 ^{b,2}
LOTE III	0.97± 0.10 ^{b,1}	1.20±0.35 ^{b,1}	---
DNAsa/DNA			
CONTROL	205.18±18.87 ^{a,1}	117.10±15.66 ^{a,2}	133.80± 8.90 ^{a,2}
LOTE II	40.99± 5.70 ^{b,1}	44.37± 4.09 ^{b,1}	39.28±11.81 ^{b,1}
LOTE III	22.57± 5.27 ^{b,1}	21.28± 5.02 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) en el día.

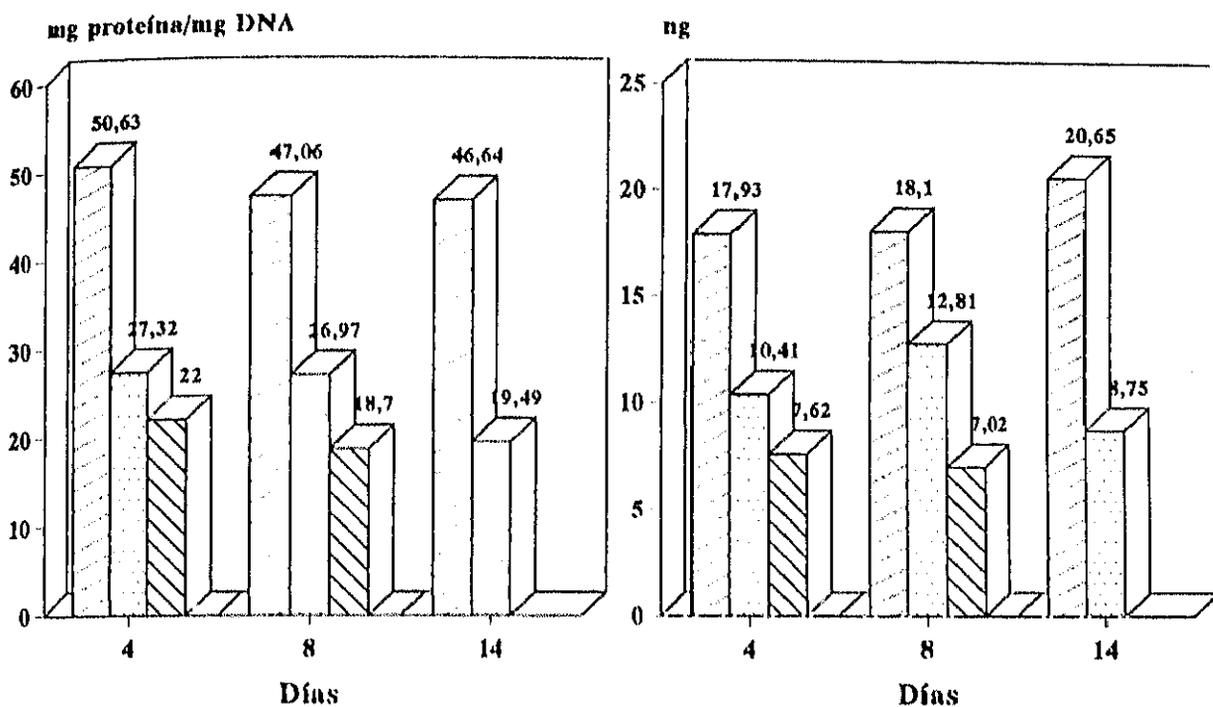
Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

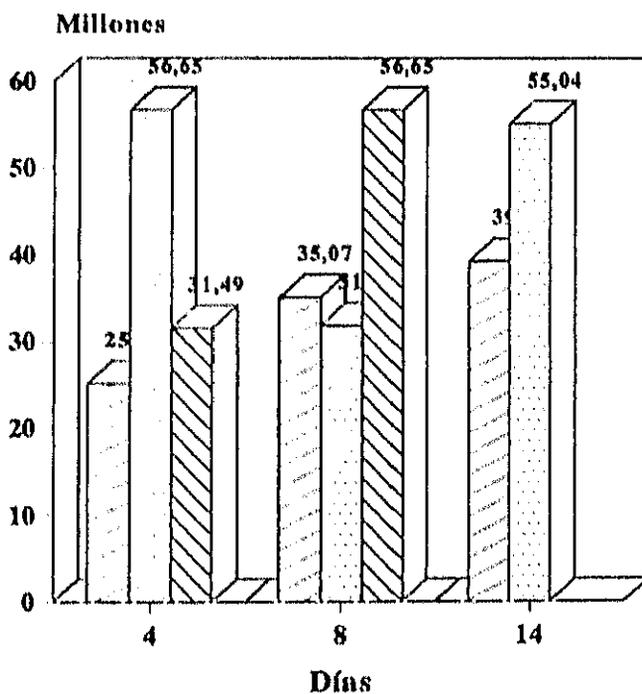
GRÁFICA XII.- PROTEÍNA/DNA, TAMAÑO CELULAR Y NÚMERO DE NÚCLEOS EN MÚSCULO GASTROCNEMIO

PROTEÍNA/DNA

TAMAÑO CELULAR



NÚMERO DE NÚCLEOS

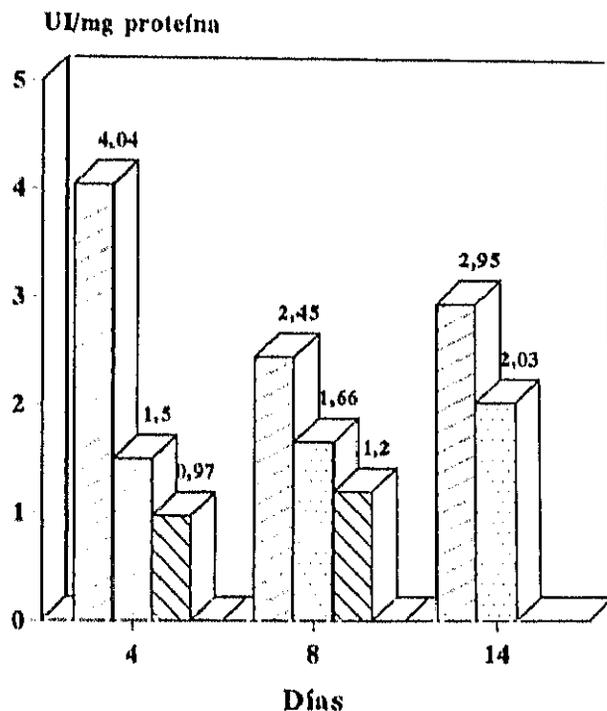
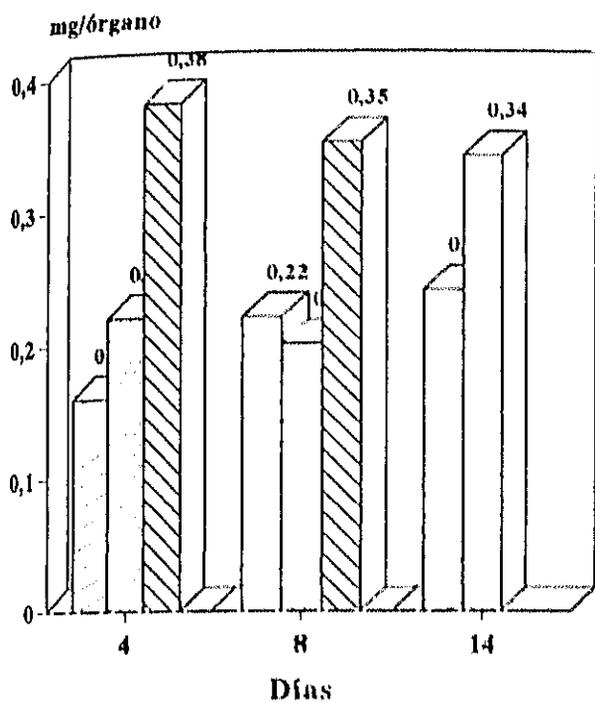


□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

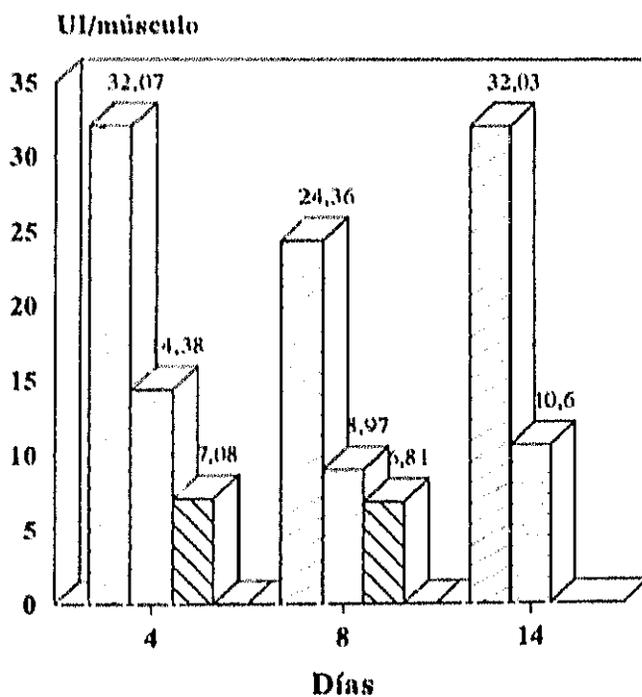
GRÁFICA XIII.- CONTENIDO EN DNA Y ACTIVIDAD DNAsa EN MÚSCULO GASTROCNEMIO

DNA

DNAsa/mg PROTEÍNA



DNAsa/MÚSCULO



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 11

RNA (mg/órgano), RNA/DNA Y RNA/PROTEÍNA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
RNA/ÓRGANO			
CONTROL	0.64± 0.12 ^{a,1}	1.02± 0.09 ^{a,2}	1.38±0.04 ^{a,3}
LOTE II	0.76± 0.02 ^{a,1}	0.45± 0.04 ^{b,2}	0.31±0.06 ^{b,2}
LOTE III	0.58± 0.08 ^{a,1}	0.51± 0.04 ^{b,1}	---
RNA/DNA			
CONTROL	4.12± 0.78 ^{a,1}	4.94± 0.73 ^{a,1}	5.75±0.32 ^{a,1}
LOTE II	2.31± 0.27 ^{a,b,1}	2.31± 0.22 ^{b,1}	1.03±0.22 ^{b,2}
LOTE III	1.82± 0.38 ^{b,1}	1.49± 0.09 ^{b,1}	---
RNA/PROTEÍNA			
CONTROL	90.00±10.00 ^{a,1}	100.00±10.00 ^{a,1}	130.00±10.00 ^{a,1}
LOTE II	90.00±10.00 ^{a,1}	70.00± 4.00 ^{b,1}	60.00±20.00 ^{b,1}
LOTE III	80.00±10.00 ^{a,1}	80.00±10.00 ^{a,b,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P < 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 12

ACTIVIDAD RNAsa ÁCIDA (U.I.) EN MÚSCULO GASTRONEMIO

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
RNAsa/ÓRGANO			
CONTROL	0.14±0.01 ^{a,1}	0.31±0.01 ^{a,2}	0.41±0.05 ^{a,2}
LOTE II	0.09±0.01 ^{b,1}	0.01±0.005 ^{b,2}	0.01±0.0046 ^{b,2}
LOTE III	0.08±0.01 ^{b,1}	0.09±0.01 ^{c,1}	---
RNAsa/ mg PROTEÍNA			
CONTROL	18.30±2.07 ^{a,1}	31.78±1.76 ^{a,2}	36.99±4.76 ^{a,2}
LOTE II	10.38±0.78 ^{b,1}	1.71±0.60 ^{b,2}	2.55±0.95 ^{b,2}
LOTE III	10.36±0.83 ^{b,1}	14.03±2.82 ^{c,1}	---
RNAsa/RNA			
CONTROL	0.25±0.04 ^{a,1}	0.31±0.02 ^{a,1}	0.29±0.03 ^{a,1}
LOTE II	0.12±0.01 ^{b,1}	0.02±0.01 ^{b,2}	0.04±0.01 ^{b,2}
LOTE III	0.13±0.01 ^{b,1}	0.17±0.02 ^{c,1}	---
RNAsa/DNA			
CONTROL	0.93±0.08 ^{a,1}	1.51±0.18 ^{a,2}	1.67±0.19 ^{a,2}
LOTE II	0.29±0.05 ^{b,1}	0.05±0.02 ^{b,2}	0.03±0.01 ^{b,2}
LOTE III	0.23±0.05 ^{b,1}	0.25±0.03 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

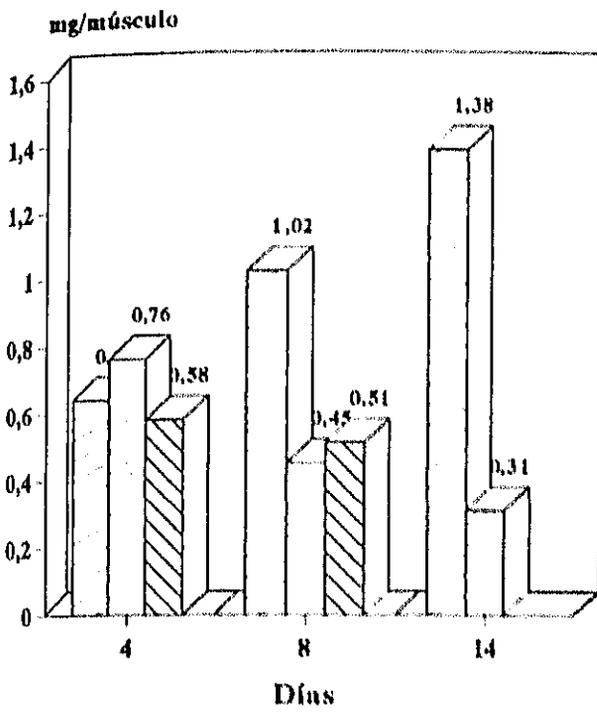
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P < 0.05) entre días.

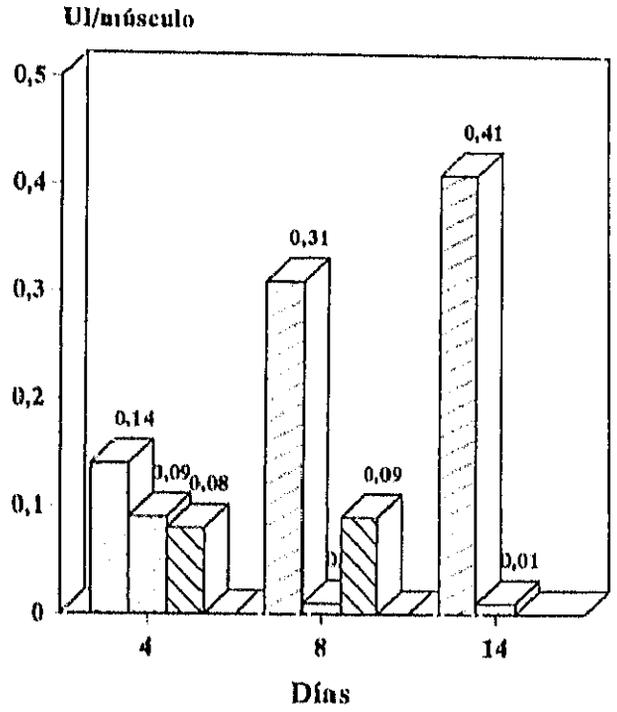
--- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA XIV.- CONTENIDO EN RNA Y ACTIVIDAD RNAsa EN MÚSCULO GASTROCNEMIO

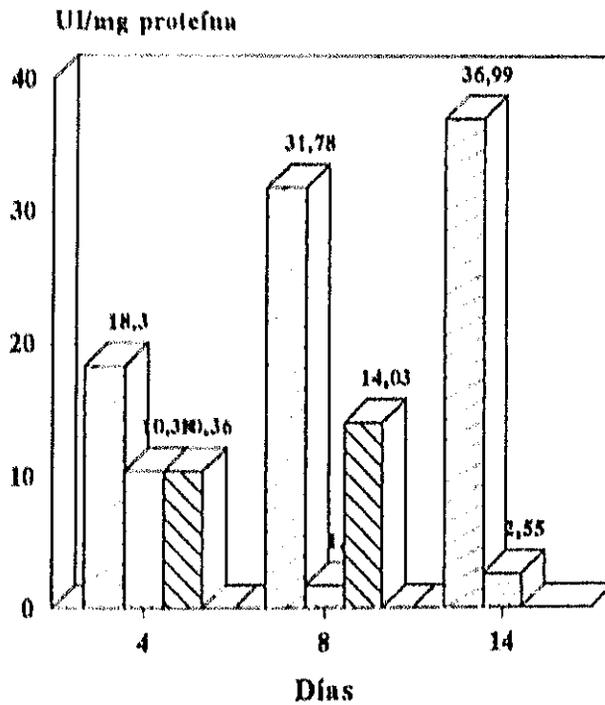
RNA/MÚSCULO



RNAsa/MÚSCULO



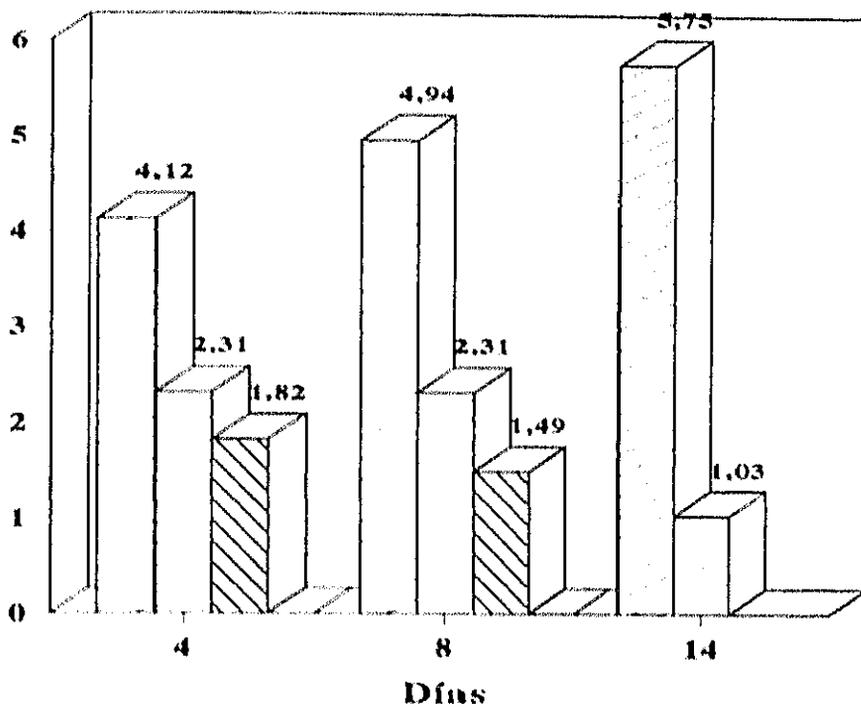
RNAsa/PROTEÍNA



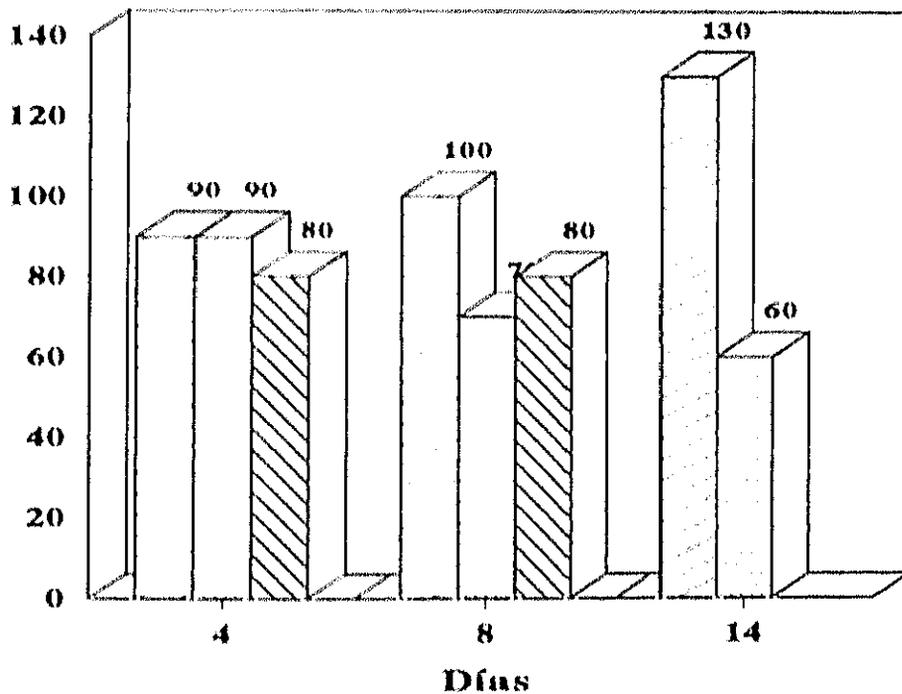
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

**GRÁFICA XV.- RELACIONES RNA/DNA (NUCLEÓTIDO/CÉLULA)
Y RNA/PROTEÍNA (CAPACIDAD DE SÍNTESIS PROTEICA)
EN MÚSCULO GASTROCNEMIO**

RNA/DNA



RNA/PROTEÍNA



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 13

ACTIVIDADES DE FOSFATASA ÁCIDA (U.I.), FOSFATASA ALCALINA (U.I.) Y B-D-GLUCURONIDASA (U.I.) EN MÚSCULO GASTROCNEMIO

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
FOSFATASA ÁCIDA/ÓRGANO			
CONTROL	12.79±1.79 ^{a,1}	20.56±2.07 ^{a,2}	29.78±1.22 ^{a,3}
LOTE II	13.23±0.95 ^{a,1}	13.52±1.31 ^{b,1}	9.09±1.12 ^{b,1}
LOTE III	8.50±0.79 ^{a,1}	7.97±1.64 ^{b,1}	---
FOSFATASA ALCALINA/ÓRGANO			
CONTROL	1.05±0.11 ^{a,1}	1.50±0.11 ^{a,2}	1.07±0.06 ^{a,1}
LOTE II	3.72±0.28 ^{b,1}	2.85±0.25 ^{b,2}	1.57±0.08 ^{b,1}
LOTE III	1.67±0.23 ^{a,1}	1.90±0.15 ^{a,1}	---
B-D-GLUCURONIDASA/ÓRGANO			
CONTROL	0.43±0.02 ^{a,1}	0.56±0.04 ^{a,1,2}	0.78±0.14 ^{a,2}
LOTE II	1.14±0.10 ^{b,1}	0.76±0.02 ^{b,1}	0.79±0.13 ^{a,2}
LOTE III	0.19±0.01 ^{a,1}	0.24±0.02 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P < 0.05) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P < 0.05) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 14

FOSFATASA ÁCIDA, FOSFATASA ALCALINA Y B-GLUCURONIDASA POR mg DE PROTEÍNA U.I./mg) EN MÚSCULO GASTROCNEMIO.

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
FOSFATASA ÁCIDA/mg DE PROTEÍNA			
CONTROL	1.56±0.10 ^{a,1}	2.05±0.07 ^{a,1}	2.76±0.26 ^{a,2}
LOTE II	1.48±0.10 ^{a,b,1}	2.57±0.27 ^{a,2}	1.71±0.14 ^{b,1}
LOTE III	1.18±0.07 ^{b,1}	1.23±0.15 ^{b,1}	---
FOSFATASA ALCALINA/mg DE PROTEÍNA			
CONTROL	0.13±0.01 ^{a,1}	0.15±0.01 ^{a,2}	0.10±0.003 ^{a,3}
LOTE II	0.42±0.03 ^{b,1}	0.54±0.03 ^{b,2}	0.30±0.02 ^{b,3}
LOTE III	0.23±0.02 ^{c,1}	0.33±0.07 ^{c,1}	---
B-GLUCURONIDASA/mg DE PROTEÍNA			
CONTROL	0.11±0.01 ^{a,1}	0.12±0.01 ^{a,1}	0.18±0.03 ^{a,1}
LOTE II	0.25±0.01 ^{b,1}	0.30±0.05 ^{b,1}	0.34±0.02 ^{b,1}
LOTE III	0.06±0.01 ^{c,1}	0.08±0.01 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

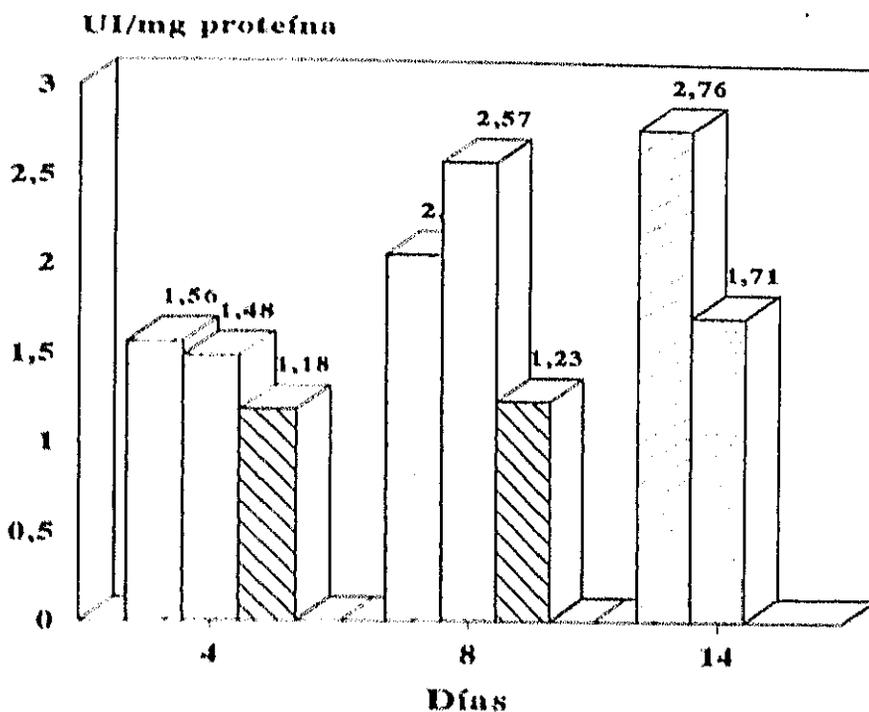
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P ≤ 0.05) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P < 0.05) entre días.

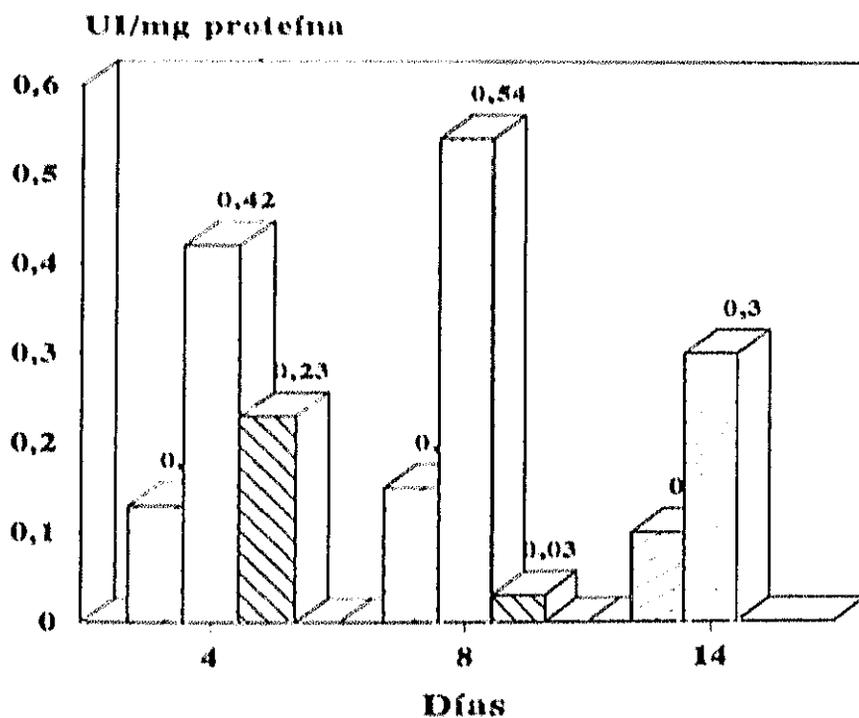
--- Efecto letal de la dieta.

**GRÁFICA XVI.- ACTIVIDAD HIDROLÁSICA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO:
FOSFATASAS ÁCIDA Y ALCALINA POR mg DE PROTEÍNA**

FOSFATASA ÁCIDA/mg PROTEÍNA



FOSFATASA ALCALINA/mg PROTEÍNA



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 15

ACTIVIDADES DE GPT Y GOT (UI) EN MÚSCULO GASTROCNEMIO.

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
GPT/ÓRGANO			
CONTROL	0.91±0.14 ^{a,1}	0.96±0.24 ^{a,1}	0.80±0.02 ^{a,1}
LOTE II	0.81±0.05 ^{a,1}	0.55±0.09 ^{a,b,2}	0.39±0.06 ^{b,2}
LOTE III	0.53±0.12 ^{a,1}	0.36±0.03 ^{b,1}	---
GPT/mg PROTEÍNA			
CONTROL	0.22±0.02 ^{a,1}	0.19±0.030 ^{a,1}	0.15±0.007 ^{a,1}
LOTE II	0.09±0.01 ^{b,1}	0.11±0.030 ^{a,b,1}	0.08±0.020 ^{b,1}
LOTE III	0.07±0.01 ^{b,1}	0.06±0.008 ^{c,2}	---
GOT/ÓRGANO			
CONTROL	12.82±1.27 ^{a,1,2}	17.50±1.38 ^{a,1}	11.21±1.94 ^{a,2}
LOTE II	9.52±1.19 ^{a,1}	11.42±0.86 ^{b,1}	3.42±0.45 ^{b,2}
LOTE III	2.44±0.35 ^{b,1}	3.15±0.27 ^{a,1}	---
GOT/mg PROTEÍNA			
CONTROL	1.61±0.15 ^{a,1}	1.78±0.12 ^{a,1}	0.97±0.09 ^{a,2}
LOTE II	1.06±0.10 ^{b,1}	2.17±0.13 ^{a,2}	0.54±0.12 ^{a,3}
LOTE III	0.31±0.03 ^{c,1}	0.58±0.16 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

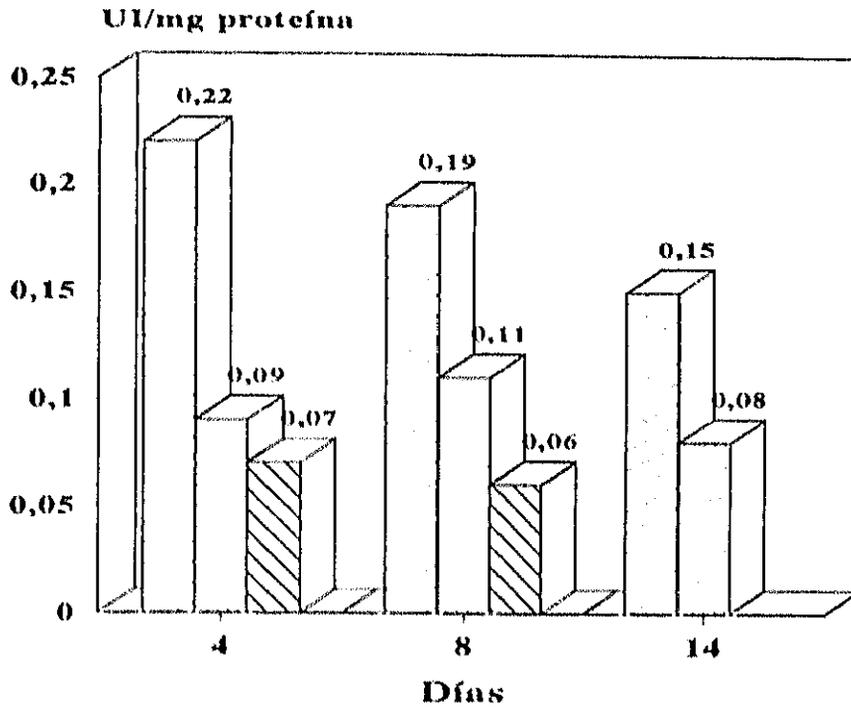
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P < 0.05) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas (P < 0.05) entre días.

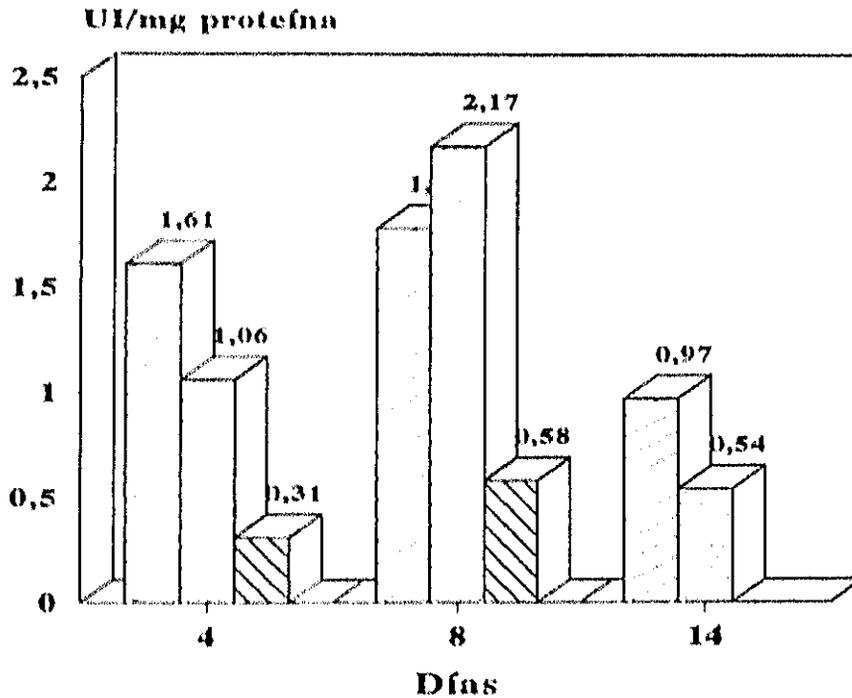
--- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA XVII.- ACTIVIDAD TRANSAMINÁSICA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO: GPT Y GOT POR mg DE PROTEÍNA

GPT/mg PROTEÍNA



GOT/mg PROTEÍNA



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 16

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

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ISOLEUCINA			
CONTROL	100.41±12.37 ^{a,1}	83.56± 4.91 ^{a,1}	87.08± 3.61 ^{a,1}
LOTE II	56.47± 4.90 ^{b,1}	77.00± 3.47 ^{a,2}	51.78± 1.83 ^{b,1}
LOTE III	55.61± 1.81 ^{b,1}	71.39±20.26 ^{a,1}	---
LEUCINA			
CONTROL	140.17±20.03 ^{a,1}	128.79± 9.60 ^{a,1}	130.16± 7.56 ^{a,1}
LOTE II	95.88± 2.17 ^{a,b,1}	113.24± 1.80 ^{a,2}	77.35± 4.26 ^{b,3}
LOTE III	67.90± 1.80 ^{b,1}	92.73±26.24 ^{a,1}	---
VALINA			
CONTROL	194.44±20.23 ^{a,1}	158.46± 9.89 ^{a,1}	165.95±13.81 ^{a,1}
LOTE II	126.08± 1.58 ^{b,1}	165.31±13.79 ^{a,2}	87.35± 3.87 ^{b,3}
LOTE III	96.28± 7.49 ^{b,1}	145.90±24.23 ^{a,1}	---
AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA (Ile+Leu+Val)			
CONTROL	435.02±51.59 ^{a,1}	370.81±20.55 ^{a,1}	383.18±23.81 ^{a,1}
LOTE II	278.42± 8.07 ^{b,1}	355.56±12.13 ^{a,2}	216.48± 9.30 ^{b,3}
LOTE III	219.79±10.32 ^{b,1}	310.02±66.32 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 17

AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ISOLEUCINA			
CONTROL	42.11 \pm 1.71 ^{a,1}	55.09 \pm 4.12 ^{a,2}	64.70 \pm 3.46 ^{a,2}
LOTE II	33.86 \pm 4.49 ^{a,1}	41.27 \pm 3.70 ^{a,1}	47.21 \pm 1.64 ^{b,1}
LOTE III	33.56 \pm 1.83 ^{a,1}	100.19 \pm 4.39 ^{b,2}	---
LEUCINA			
CONTROL	51.03 \pm 1.69 ^{a,1}	62.21 \pm 4.34 ^{a,1}	77.27 \pm 2.64 ^{a,2}
LOTE II	52.60 \pm 5.92 ^{a,1}	76.75 \pm 4.00 ^{a,2}	67.53 \pm 3.59 ^{b,1,2}
LOTE III	39.42 \pm 1.11 ^{a,1}	169.02 \pm 5.96 ^{b,2}	---
VALINA			
CONTROL	114.60 \pm 3.43 ^{a,1}	107.20 \pm 8.58 ^{a,1}	122.37 \pm 8.05 ^{a,1}
LOTE II	64.86 \pm 4.28 ^{b,1}	102.65 \pm 6.05 ^{a,2}	90.00 \pm 4.59 ^{b,2}
LOTE III	57.54 \pm 1.70 ^{b,1}	169.31 \pm 5.98 ^{b,2}	---
AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA (Ile+Leu+Val)			
CONTROL	207.74 \pm 4.78 ^{a,1}	224.50 \pm 14.38 ^{a,1}	264.34 \pm 10.70 ^{a,2}
LOTE II	151.32 \pm 14.26 ^{b,1}	220.68 \pm 11.80 ^{a,2}	204.74 \pm 8.77 ^{b,2}
LOTE III	130.52 \pm 0.42 ^{b,1}	438.53 \pm 15.74 ^{b,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 18

AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA LIBRES EN MÚSCULO GASTROCNEMIO
($\mu\text{mol/g}$ de músculo).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ISOLEUCINA			
CONTROL	0.15±0.03 ^{a,1}	0.18±0.06 ^{a,1}	0.26±0.007 ^{a,1}
LOTE II	0.27±0.07 ^{a,b,1}	0.12±0.05 ^{a,2}	0.21±0.02 ^{a,b,1}
LOTE III	0.30±0.03 ^{b,1}	0.17±0.03 ^{a,2}	---
LEUCINA			
CONTROL	0.24±0.06 ^{a,1,2}	0.17±0.01 ^{a,1}	0.36±0.01 ^{a,2}
LOTE II	0.49±0.03 ^{b,1}	0.18±0.02 ^{a,2}	0.35±0.04 ^{a,3}
LOTE III	0.75±0.07 ^{c,1}	0.26±0.04 ^{a,2}	---
VALINA			
CONTROL	0.24±0.05 ^{a,1}	0.19±0.02 ^{a,b,1}	0.17±0.06 ^{a,1}
LOTE II	0.34±0.05 ^{a,1}	0.14±0.002 ^{a,2}	0.28±0.008 ^{a,1}
LOTE III	0.65±0.11 ^{b,1}	0.25±0.03 ^{b,2}	---
AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA (Ile+Leu+Val)			
CONTROL	0.64±0.14 ^{a,1}	0.54±0.06 ^{a,1}	0.79±0.05 ^{a,1}
LOTE II	1.10±0.11 ^{b,1}	0.43±0.02 ^{a,2}	0.84±0.06 ^{a,1}
LOTE III	1.71±0.18 ^{b,1}	0.68±0.10 ^{a,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas
($P < 0.05$) en el día.

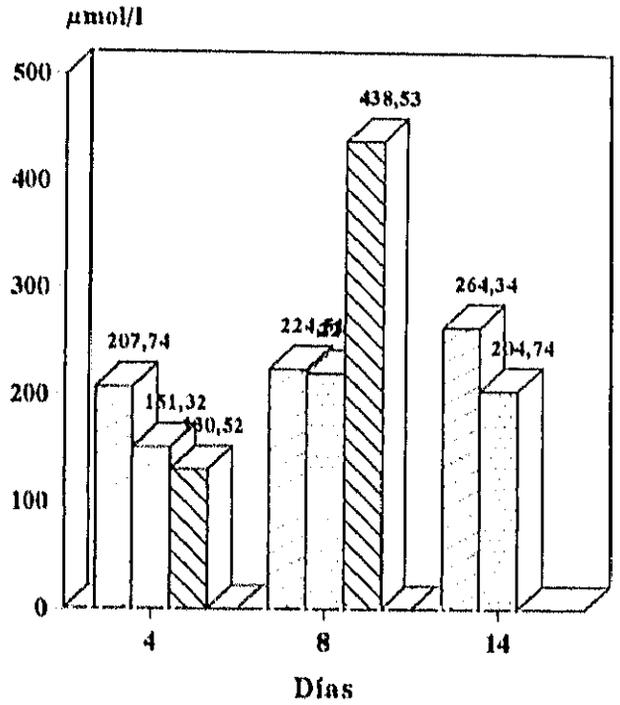
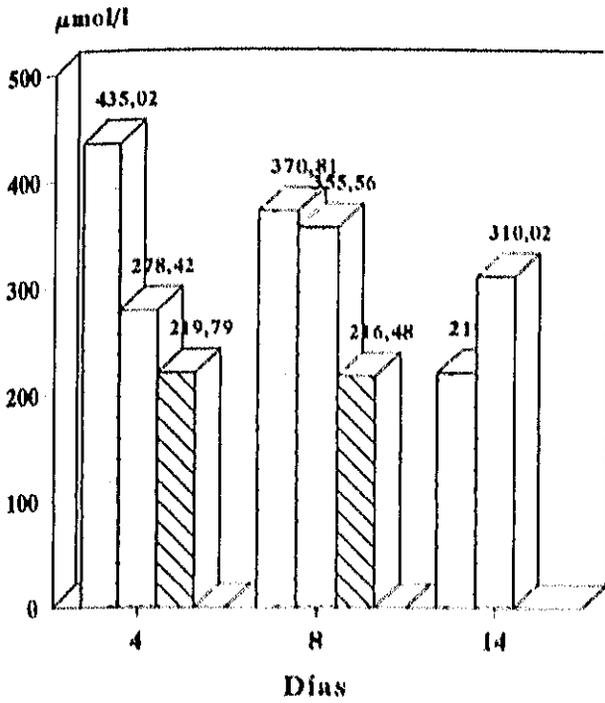
Números diferentes en filas indican diferencias significativas
($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

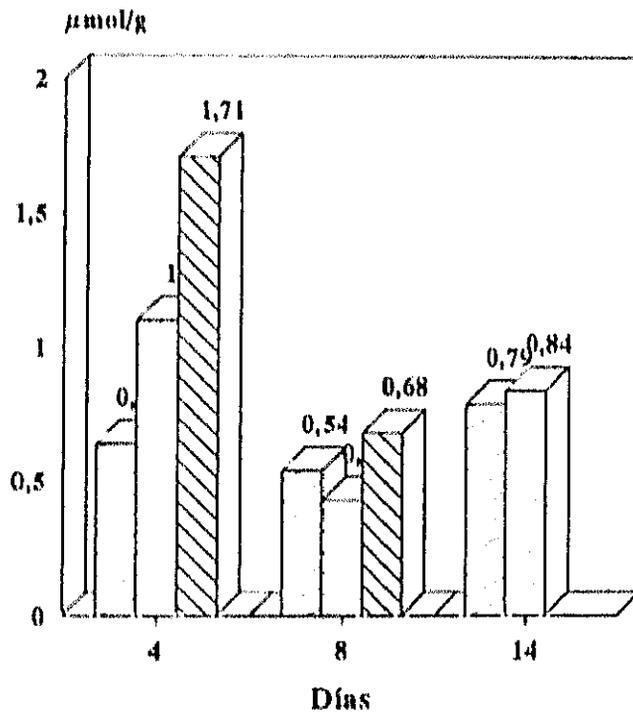
GRÁFICA XVIII.- SUMA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

PLASMA

GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 19-1

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

	DÍA 4		DÍA 8		DÍA 14
ÁCIDO ASPÁRTICO					
CONTROL	36.53±	4.41 ^{a,1}	45.23±	0.4 ^{a,1,2}	53.75±1.9 ^{a,2}
LOTE II	36.43±	2.76 ^{a,1}	46.80±	3.6 ^{a,1}	48.25±4.3 ^{a,1}
LOTE III	24.78±	2.22 ^{a,1}	29.86±	3.2 ^{b,1}	---
ÁCIDO GLUTÁMICO					
CONTROL	95.24±	7.12 ^{a,1}	144.03±	14.40 ^{a,1}	211.78±30.04 ^{a,2}
LOTE II	86.20±	2.65 ^{a,1}	156.66±	12.48 ^{a,2}	462.06±10.39 ^{b,3}
LOTE III	46.30±	0.99 ^{b,1}	82.25±	5.93 ^{b,2}	---
ASPARRAGINA					
CONTROL	76.71±	5.12 ^{a,1}	76.10±	3.97 ^{a,1}	46.95±2.03 ^{a,2}
LOTE II	45.02±	1.91 ^{b,1,2}	53.03±	3.12 ^{b,1}	37.06±1.40 ^{b,3}
LOTE III	30.72±	1.14 ^{c,1}	39.28±	4.42 ^{b,1}	---
GLUTAMINA					
CONTROL	1270.41±	118.7 ^{a,1}	1203.92±	30.7 ^{a,1}	1324.90±81.5 ^{a,1}
LOTE II	820.72±	3.6 ^{b,1}	608.11±	39.5 ^{b,2}	466.89± 3.6 ^{b,3}
LOTE III	574.11±	31.5 ^{a,1}	508.76±	31.1 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 19-2

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

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
SERINA			
CONTROL	439.64±35.3 ^{a1}	225.69± 14.7 ^{a2}	200.56± 4.7 ^{a2}
LOTE II	641.18±62.1 ^{b1}	830.55± 13.6 ^{b1}	1362.18±145.7 ^{b2}
LOTE III	301.20±33.5 ^{a1}	206.46± 23.5 ^{a1}	---
GLICINA			
CONTROL	244.46± 7.3 ^{a1}	197.01± 18.9 ^{a1}	228.30± 6.9 ^{a1}
LOTE II	903.74±31.0 ^{b1}	725.25± 41.1 ^{b2}	620.10±15.3 ^{b2}
LOTE III	468.85±34.1 ^{c1}	320.94± 16.8 ^{c2}	---
TREONINA			
CONTROL	221.79±17.5 ^{a1}	127.72± 29.5 ^{a2}	254.92±10.9 ^{a1}
LOTE II	542.69±59.7 ^{b1}	933.61± 83.1 ^{b2}	1262.19±92.0 ^{b3}
LOTE III	265.55±26.8 ^{a1}	282.09± 18.6 ^{a1}	---
ALANINA			
CONTROL	776.47±21.6 ^{a1}	810.37±133.4 ^{a1}	509.81±22.8 ^{a1}
LOTE II	568.20±14.6 ^{b1}	642.57± 26.3 ^{a1}	457.21±76.7 ^{a1}
LOTE III	244.81±17.6 ^{c1}	265.47± 8.5 ^{a1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 20-1

AMINOÁCIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4		DÍA 8		DÍA 14	
ÁCIDO ASPÁRTICO.						
CONTROL	36.44±	1.99 ^{a,1}	48.23±	2.45 ^{a,2}	55.53±	1.53 ^{a,2}
LOTE II	46.47±	1.89 ^{b,1}	26.48±	0.96 ^{b,2}	21.58±	1.54 ^{b,2}
LOTE III	27.89±	0.92 ^{c,1}	63.11±	4.20 ^{c,2}	---	
ÁCIDO GLUTÁMICO.						
CONTROL	585.12±	7.12 ^{a,1}	667.91±	28.62 ^{a,1}	482.95±	18.01 ^{a,2}
LOTE II	623.17±	6.91 ^{b,1}	1112.57±	22.66 ^{b,2}	961.04±	69.95 ^{b,2}
LOTE III	585.27±	13.99 ^{a,1}	719.33±	30.47 ^{a,2}	---	
ASPARRAGINA.						
CONTROL	89.48±	2.46 ^{a,1}	75.67±	2.04 ^{a,2}	73.02±	3.18 ^{a,2}
LOTE II	48.08±	2.26 ^{b,1}	59.92±	6.36 ^{a,1}	48.43±	4.70 ^{b,1}
LOTE III	36.37±	0.90 ^{c,1}	118.38±	10.32 ^{b,1}	---	
GLUTAMINA.						
CONTROL	731.94±	7.58 ^{a,1}	1229.41±	74.68 ^{a,2}	1249.33±	8.70 ^{a,2}
LOTE II	1109.49±	59.04 ^{b,1}	750.15±	136.47 ^{b,1}	841.33±	103.16 ^{b,1}
LOTE III	1269.06±	154.08 ^{b,1}	1128.35±	90.08 ^{a,1}	---	

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 20-2

AMINOÁCIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
SERINA.			
CONTROL	122.66 \pm 7.83 ^{a,1}	118.22 \pm 12.01 ^{a,1}	131.75 \pm 9.14 ^{a,1}
LOTE II	250.95 \pm 28.55 ^{b,1}	841.41 \pm 48.63 ^{b,2}	1043.53 \pm 128.00 ^{b,2}
LOTE III	140.47 \pm 3.65 ^{a,1}	284.05 \pm 28.32 ^{c,2}	---
GLICINA.			
CONTROL	221.95 \pm 10.57 ^{a,1}	169.87 \pm 10.56 ^{a,2}	208.75 \pm 13.57 ^{a,1,2}
LOTE II	610.66 \pm 89.31 ^{b,1}	497.61 \pm 2.87 ^{b,1}	396.92 \pm 48.06 ^{b,1}
LOTE III	317.75 \pm 14.93 ^{a,1}	374.66 \pm 31.37 ^{c,1}	---
TREONINA.			
CONTROL	128.55 \pm 2.00 ^{a,1}	114.45 \pm 6.99 ^{a,1}	217.26 \pm 2.27 ^{a,2}
LOTE II	282.68 \pm 42.59 ^{b,1}	555.82 \pm 21.13 ^{b,2}	792.43 \pm 14.43 ^{b,3}
LOTE III	154.52 \pm 10.53 ^{a,1}	308.80 \pm 27.54 ^{c,2}	---
ALANINA.			
CONTROL	356.88 \pm 26.09 ^{a,1}	383.16 \pm 32.93 ^{a,1}	358.27 \pm 17.91 ^{a,1}
LOTE II	259.75 \pm 13.43 ^{b,1}	332.44 \pm 21.73 ^{a,1}	325.95 \pm 20.61 ^{a,1}
LOTE III	212.33 \pm 7.30 ^{b,1}	300.28 \pm 5.89 ^{a,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 21-1

AMINOÁCIDOS GLUCONEOGENÉTICOS LIBRES EN MÚSCULO GASTROCNEMIO ($\mu\text{mol/g}$ de músculo).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ÁCIDO ASPÁRTICO			
CONTROL	0.85±0.10 ^{a,1}	0.89±0.07 ^{a,1}	0.76±0.05 ^{a,1}
LOTE II	1.02±0.13 ^{a,1}	0.78±0.05 ^{a,1}	0.77±0.03 ^{a,1}
LOTE III	1.30±0.26 ^{a,1}	1.01±0.19 ^{a,1}	---
ÁCIDO GLUTÁMICO			
CONTROL	1.49±0.15 ^{a,1}	1.69±0.18 ^{a,1}	1.74±0.14 ^{a,1}
LOTE II	1.13±0.11 ^{a,1}	0.68±0.02 ^{b,2}	0.70±0.07 ^{b,2}
LOTE III	1.11±0.05 ^{a,1}	0.60±0.02 ^{b,2}	---
ASPARRAGINA			
CONTROL	0.38±0.03 ^{a,1}	0.36±0.02 ^{a,1}	0.31±0.03 ^{a,1}
LOTE II	0.34±0.01 ^{a,1,2}	0.25±0.03 ^{b,1}	0.42±0.06 ^{b,2}
LOTE III	0.52±0.07 ^{b,1}	0.23±0.04 ^{b,2}	---
GLUTAMINA			
CONTROL	0.52±0.08 ^{a,1}	0.53±0.06 ^{a,1}	0.81±0.07 ^{a,2}
LOTE II	0.53±0.07 ^{a,1}	0.24±0.11 ^{b,1}	0.66±0.07 ^{a,1}
LOTE III	0.91±0.08 ^{b,1}	0.89±0.09 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 21-2

AMINOÁCIDOS GLUCONEOGENICOS LIBRES EN MÚSCULO GASTROCNÉMIO ($\mu\text{mol/g}$ de músculo).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
SERINA			
CONTROL	1.41±0.15 ^{a,1}	1.45±0.19 ^{a,1}	1.61±0.23 ^{a,1}
LOTE II	1.98±0.15 ^{a,1}	4.28±0.31 ^{b,2}	3.94±0.56 ^{b,2}
LOTE III	2.05±0.20 ^{a,1}	1.43±0.27 ^{a,1}	---
GLICINA			
CONTROL	2.91±0.40 ^{a,1}	2.49±0.35 ^{a,1}	2.32±0.29 ^{a,1}
LOTE II	6.22±0.15 ^{b,1}	8.54±1.94 ^{b,1}	5.92±1.54 ^{a,1}
LOTE III	8.30±1.07 ^{b,1}	3.79±0.66 ^{a,1}	---
TREONINA			
CONTROL	1.04±0.05 ^{a,1}	0.85±0.07 ^{a,1}	0.99±0.13 ^{a,1}
LOTE II	1.33±0.07 ^{b,1}	1.99±0.13 ^{b,1,2}	2.92±0.60 ^{b,2}
LOTE III	1.34±0.02 ^{b,1}	1.12±0.23 ^{a,1}	---
ALANINA			
CONTROL	4.16±0.43 ^{a,1}	6.69±0.84 ^{a,2}	6.09±0.48 ^{a,1,2}
LOTE II	3.55±0.43 ^{a,1}	2.89±0.19 ^{b,1}	2.35±0.34 ^{b,1}
LOTE III	3.21±0.07 ^{a,1}	2.61±0.43 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

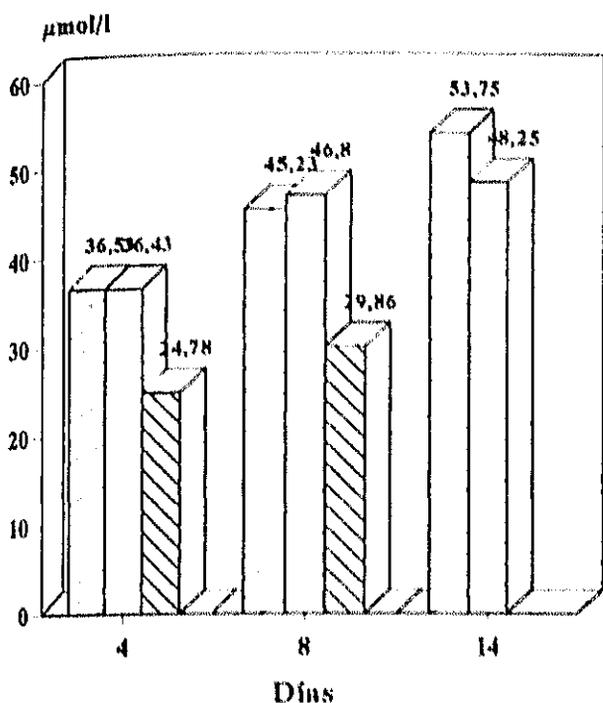
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

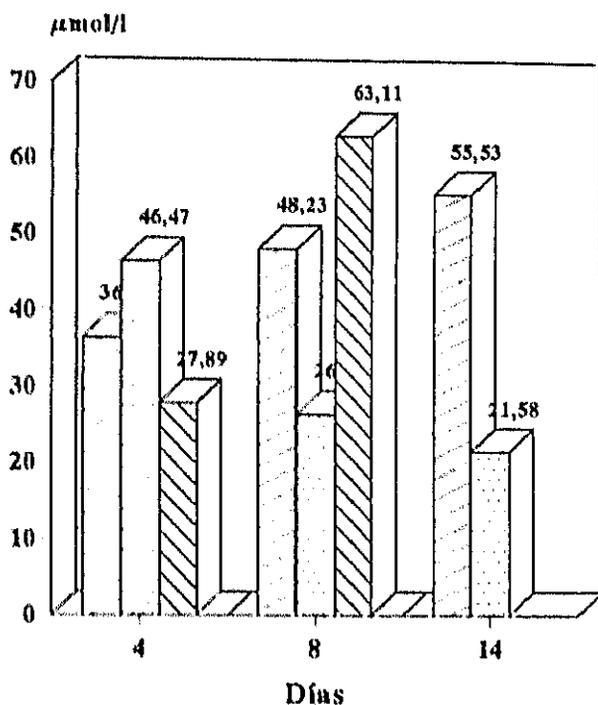
--- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA XIX.- CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASPÁRTICO LIBRE EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

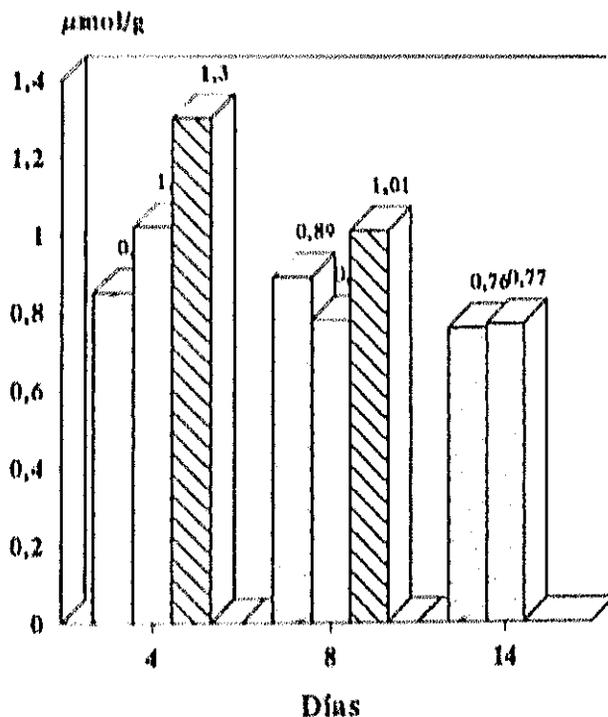
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



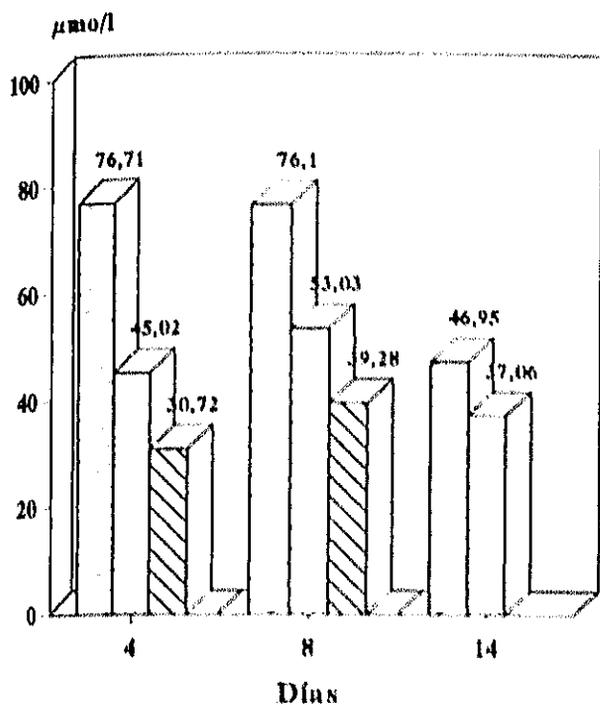
MÚSCULO GASTROCNEMIO



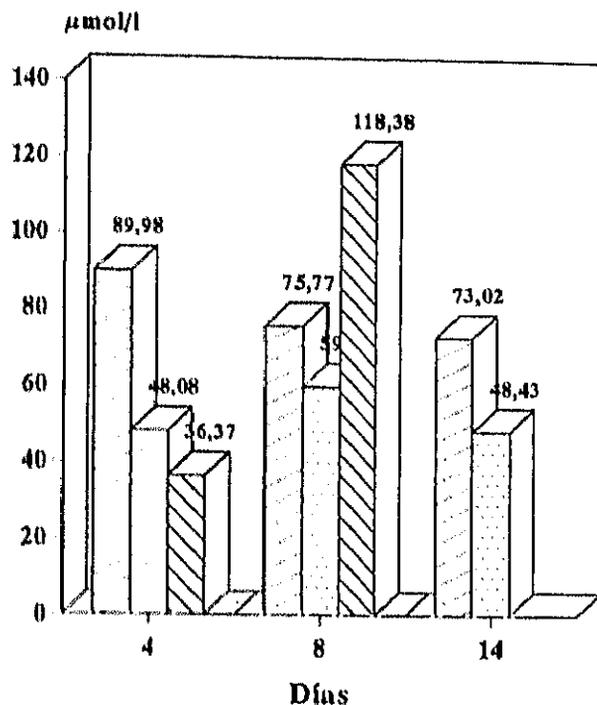
□ CONTROL. ▨ LOTE II ▩ LOTE III

GRÁFICA XX.- CONCENTRACIÓN DE ASPARRAGINA LIBRE EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

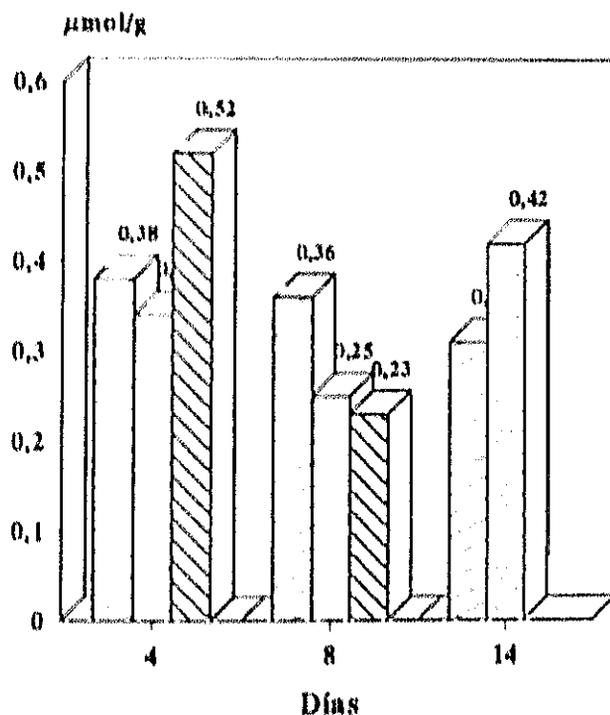
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



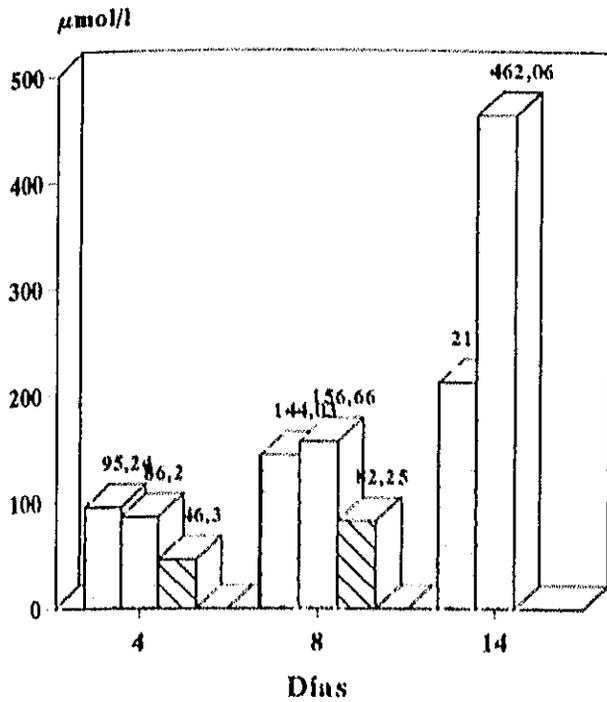
MÚSCULO GASTROCNEMIO



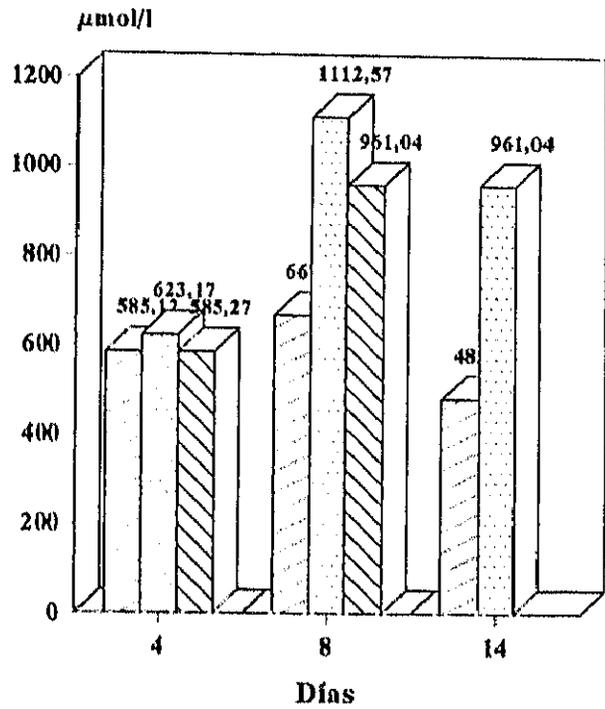
□ CONTROL. □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXI.- CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

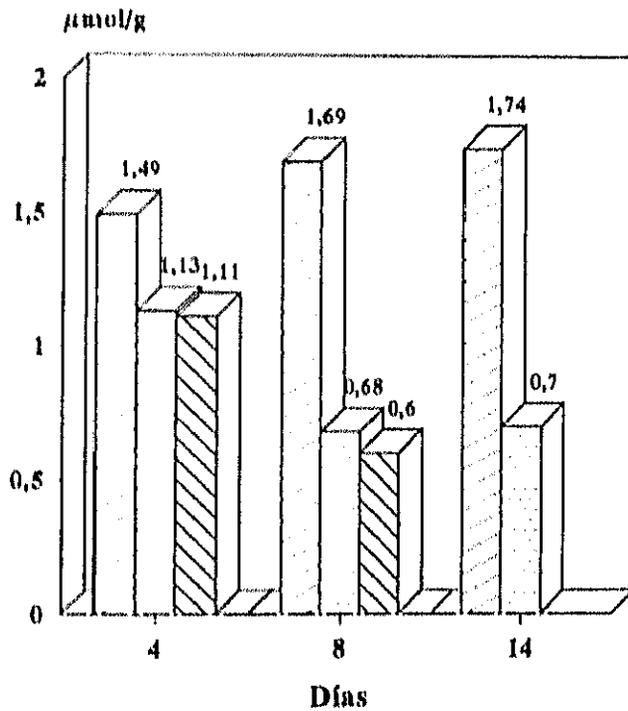
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



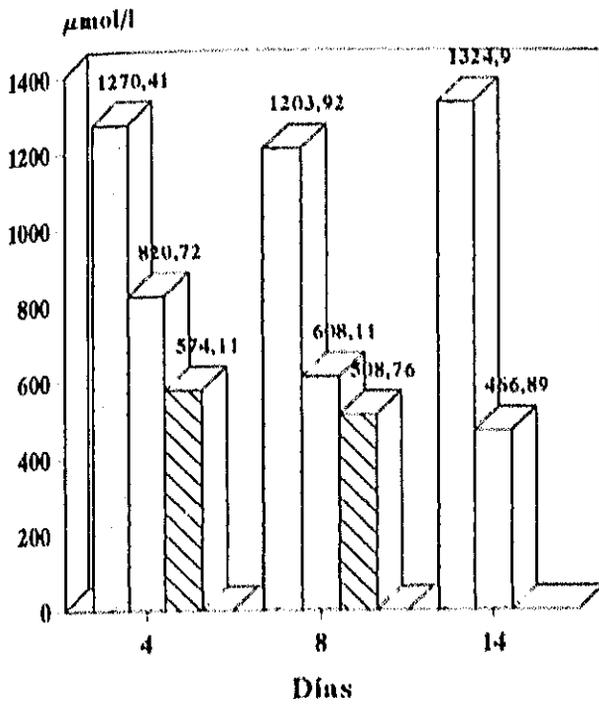
MÚSCULO GASTROCNEMIO



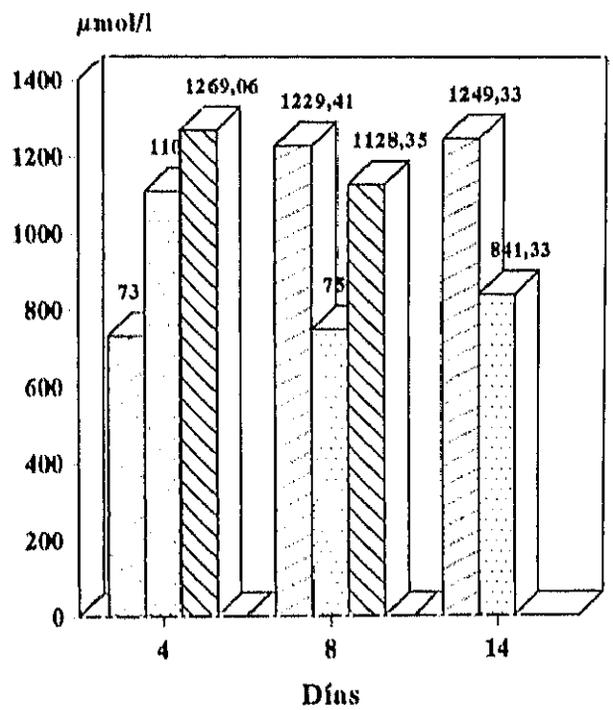
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXII.- CONCENTRACIÓN DE GLUTAMINA LIBRE EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

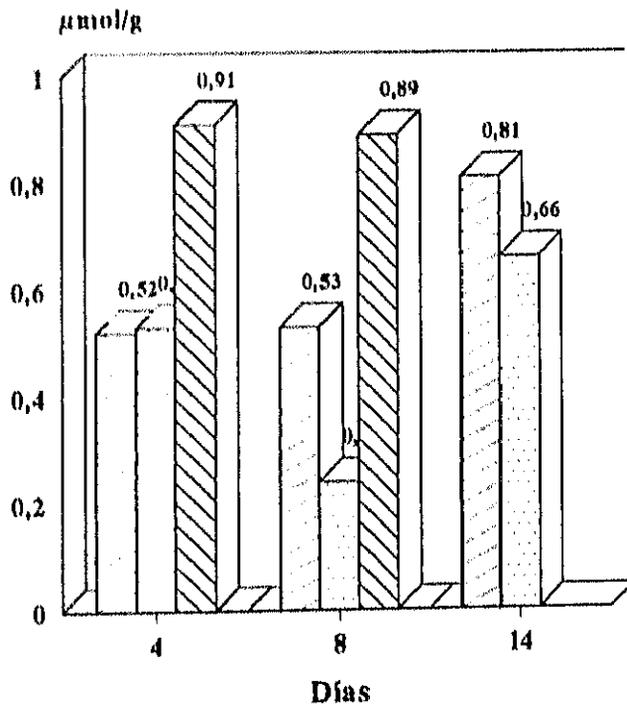
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



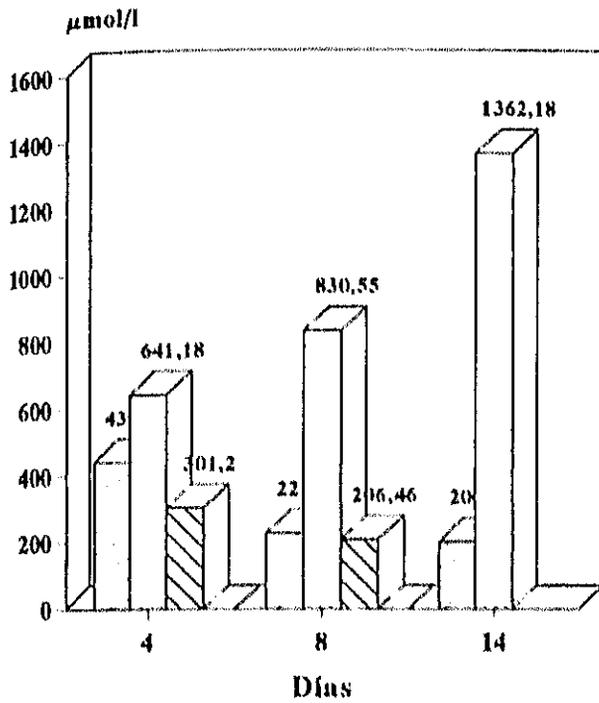
MÚSCULO GASTROCNEMIO



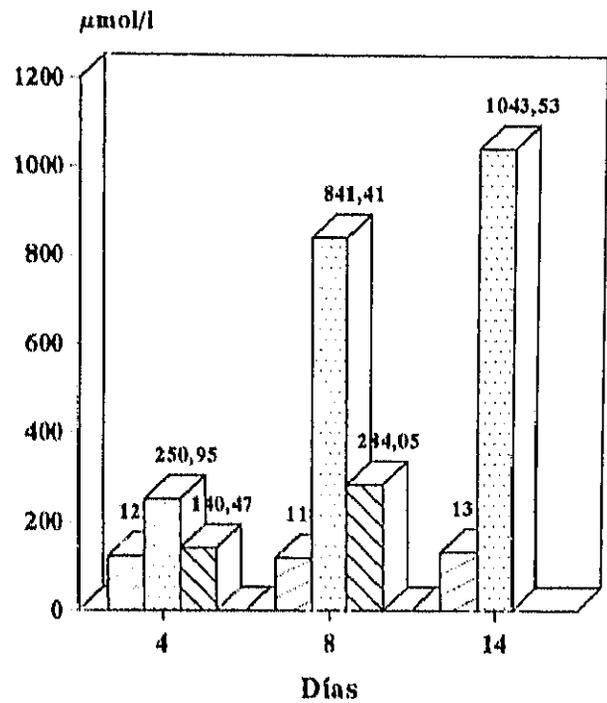
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXIII.- CONCENTRACIÓN DE SERINA LIBRE EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

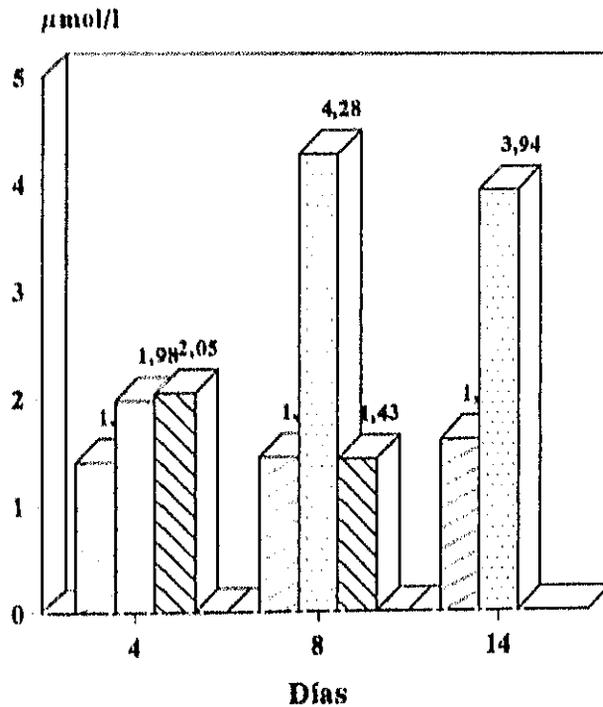
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



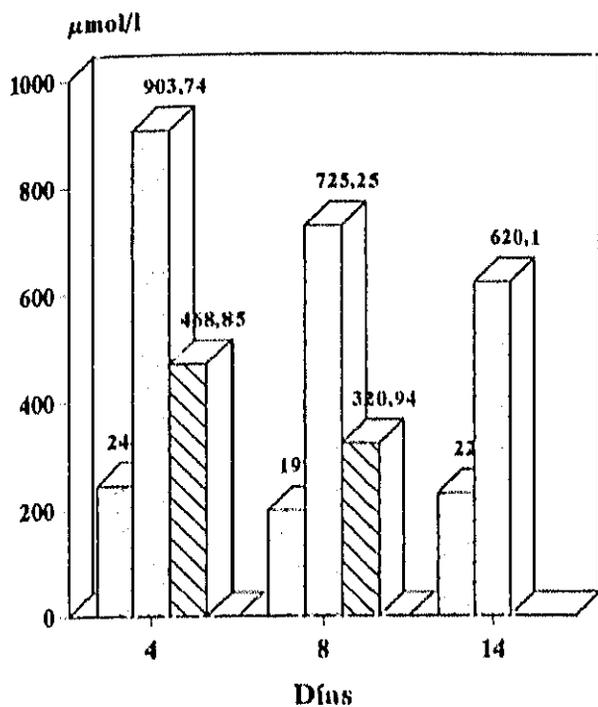
MÚSCULO GASTROCNEMIO



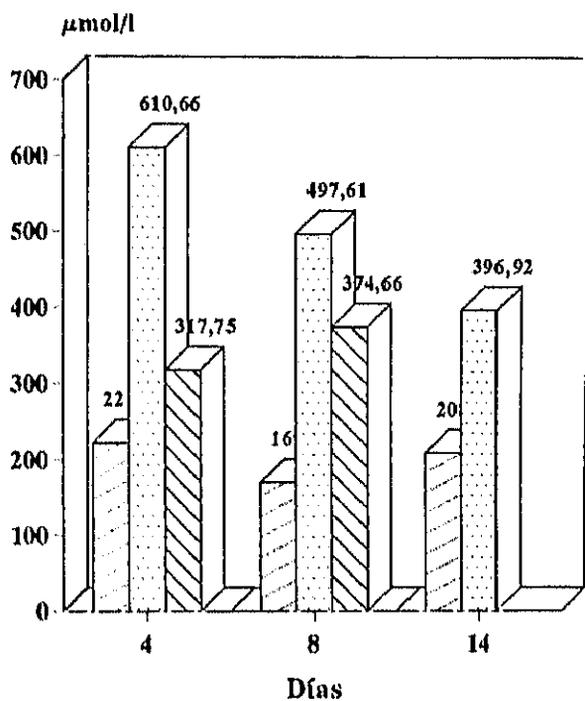
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXIV.- CONCENTRACIÓN DE GLICINA LIBRE EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

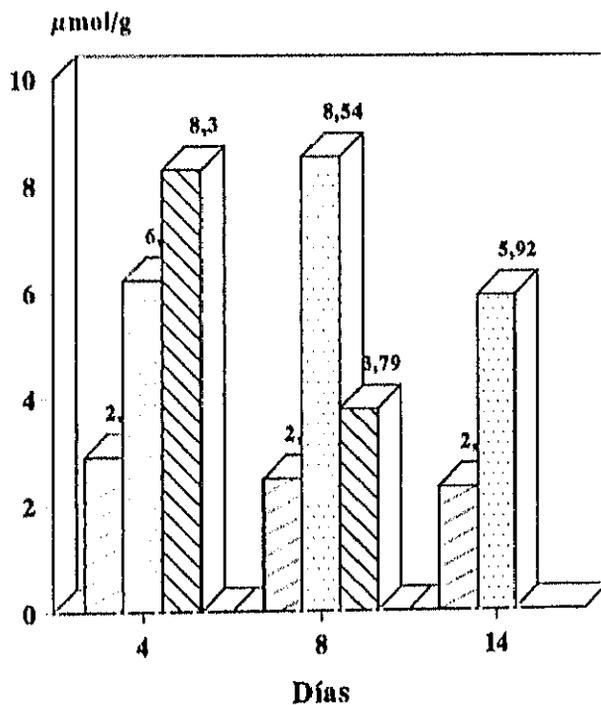
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



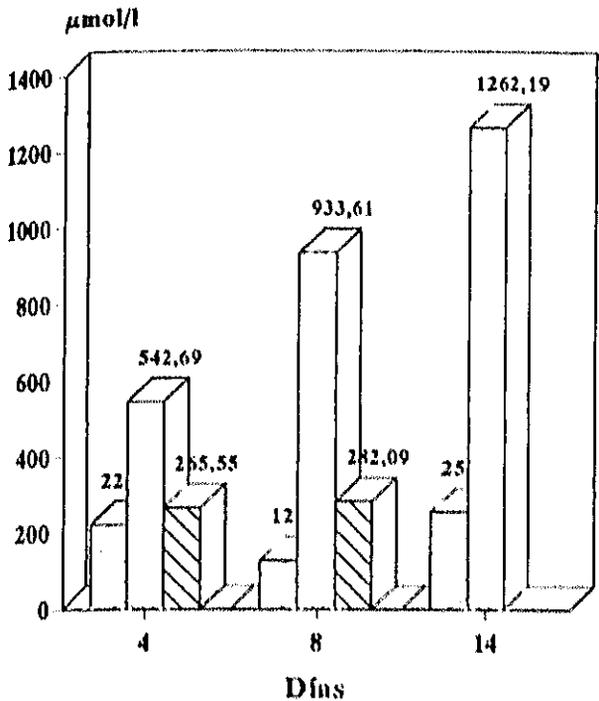
MÚSCULO GASTROCNEMIO



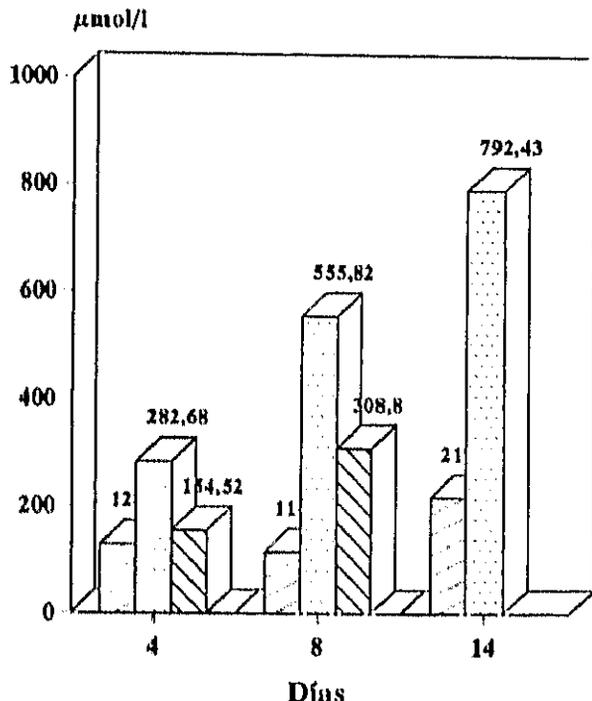
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXV.- CONCENTRACIÓN DE TREONINA LIBRE EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

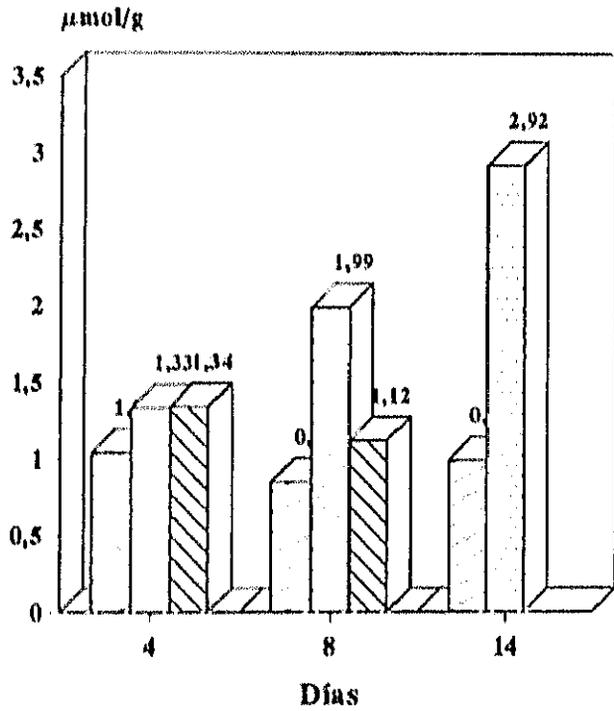
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



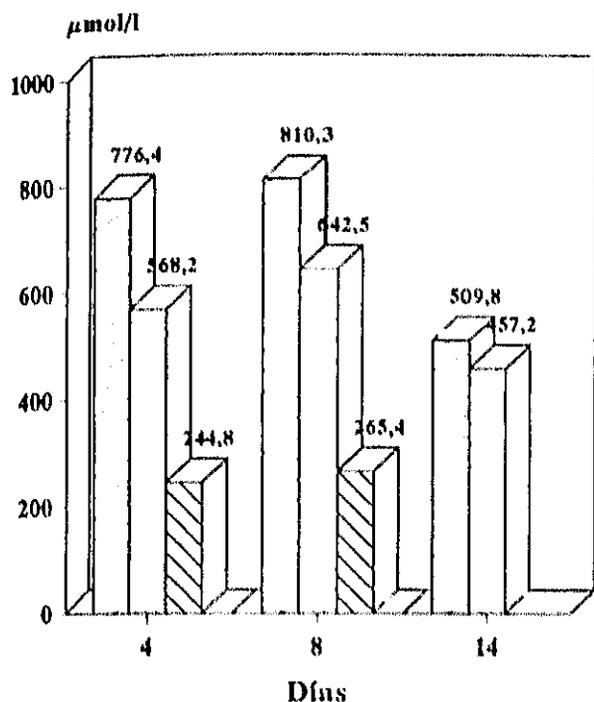
MÚSCULO GASTROCNEMIO



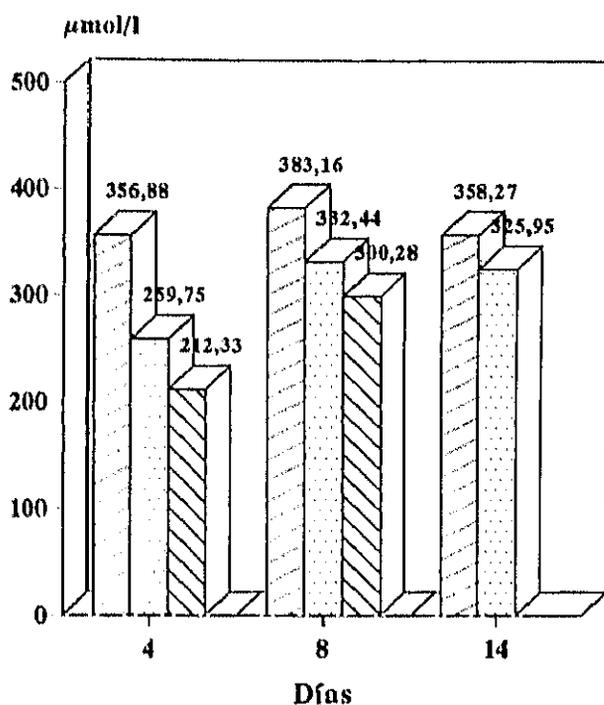
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXVI.- CONCENTRACIÓN DE ALANINA LIBRE EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

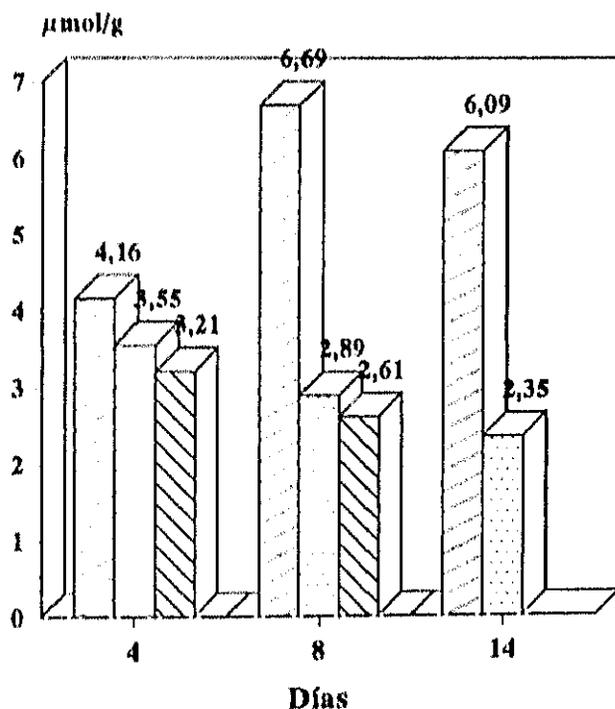
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 22

AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS LIBRES EN PLASMA ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
TIROSINA			
CONTROL	123.09 \pm 12.36 ^{a,1}	103.77 \pm 2.93 ^{a,1}	92.06 \pm 7.10 ^{a,1}
LOTE II	90.96 \pm 4.66 ^{b,1}	84.67 \pm 1.88 ^{b,1}	48.63 \pm 8.91 ^{b,2}
LOTE III	41.50 \pm 1.72 ^{c,1}	78.30 \pm 6.50 ^{b,2}	---
TRIPTÓFANO			
CONTROL	112.31 \pm 13.12 ^{a,1}	96.28 \pm 5.79 ^{a,1}	90.39 \pm 0.93 ^{a,1}
LOTE II	22.28 \pm 2.02 ^{b,1}	28.47 \pm 2.22 ^{b,1}	24.90 \pm 3.38 ^{b,1}
LOTE III	25.59 \pm 3.37 ^{b,1}	23.15 \pm 2.64 ^{b,1}	---
FENILALANINA			
CONTROL	63.94 \pm 4.17 ^{a,1}	53.39 \pm 3.95 ^{a,1}	51.11 \pm 3.95 ^{a,1}
LOTE II	41.75 \pm 4.79 ^{b,1}	46.45 \pm 2.65 ^{a,1}	36.19 \pm 2.05 ^{b,1}
LOTE III	40.90 \pm 5.67 ^{b,1}	45.34 \pm 3.41 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 23

AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
TIROSINA.			
CONTROL	82.82 \pm 0.58 ^{a,1}	105.17 \pm 2.91 ^{a,2}	103.71 \pm 1.96 ^{a,2}
LOTE II	67.03 \pm 0.05 ^{b,1}	103.98 \pm 4.61 ^{a,2}	113.66 \pm 9.08 ^{a,2}
LOTE III	75.68 \pm 5.59 ^{a,b,1}	161.34 \pm 10.10 ^{b,2}	---
TRIPTÓFANO.			
CONTROL	70.08 \pm 4.95 ^{a,1}	138.28 \pm 13.17 ^{a,2}	100.70 \pm 2.62 ^{a,3}
LOTE II	36.06 \pm 0.34 ^{b,1}	22.74 \pm 1.93 ^{b,2}	62.88 \pm 5.18 ^{b,3}
LOTE III	36.33 \pm 1.31 ^{b,1}	169.18 \pm 8.92 ^{a,2}	---
FENILALANINA.			
CONTROL	28.59 \pm 3.41 ^{a,1}	30.97 \pm 4.06 ^{a,1}	30.78 \pm 2.81 ^{a,1}
LOTE II	17.27 \pm 0.26 ^{b,1}	31.95 \pm 1.80 ^{a,2}	27.37 \pm 0.26 ^{b,3}
LOTE III	26.12 \pm 0.14 ^{a,1}	86.94 \pm 3.97 ^{b,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 24

AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS LIBRES EN MÚSCULO GASTROCNEMIO ($\mu\text{mol/g}$ de músculo) (1).

	DIA 4	DIA 8	DIA 14
TIROSINA			
CONTROL	0.17±0.04 ^{a,1}	0.22±0.04 ^{a,b,1}	0.24±0.06 ^{a,1}
LOTE II	0.27±0.01 ^{a,1}	0.14±0.02 ^{a,2}	0.24±0.02 ^{a,1}
LOTE III	0.52±0.08 ^{b,1}	0.31±0.03 ^{b,1}	---
FENILALANINA			
CONTROL	0.12±0.02 ^{a,1}	0.16±0.01 ^{a,1}	0.25±0.04 ^{a,1}
LOTE II	0.15±0.03 ^{a,1}	0.14±0.01 ^{a,1}	0.15±0.02 ^{a,1}
LOTE III	0.33±0.02 ^{b,1}	0.14±0.01 ^{a,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

(1) No se incluye el triptófano.

TABLA 25

SUMA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS, DE AMINOÁCIDOS NEUTROS Y RELACIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS LIBRES EN PLASMA ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS (Tyr+Phe)			
CONTROL	187.03±14.52 ^{a,1}	157.16± 5.47 ^{a,1}	143.17±11.04 ^{a,1}
LOTE II	132.71± 6.10 ^{b,1}	131.12± 1.22 ^{b,1}	84.82±10.80 ^{b,2}
LOTE III	82.40± 6.02 ^{c,1}	123.64± 9.76 ^{b,2}	---
AMINOÁCIDOS NEUTROS (AAR+AAA)			
CONTROL	622.04±65.35 ^{a,1}	527.97±22.86 ^{a,1}	526.35±30.17 ^{a,1}
LOTE II	411.13±13.81 ^{b,1}	486.68±13.09 ^{a,2}	301.30±19.26 ^{b,3}
LOTE III	302.19± 9.93 ^{b,1}	433.67±75.10 ^{a,1}	---
AAR/AAA			
CONTROL	2.31± 0.11 ^{a,1}	2.37± 0.14 ^{a,1}	2.71± 0.19 ^{a,1}
LOTE II	2.10± 0.05 ^{a,1}	2.71± 0.07 ^{a,1}	2.73± 0.35 ^{a,1}
LOTE III	2.74± 0.29 ^{a,1}	2.43± 0.34 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.
 Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas
 ($P < 0.05$) en el día.
 Números diferentes en filas indican diferencias significativas
 ($P < 0.05$) entre días.
 --- Efecto letal de la dieta.

TABLA 26

SUMA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS, DE AMINOÁCIDOS NEUTROS Y RELACIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS (Tyr+Phe).			
CONTROL	111.41 \pm 3.23 ^{a1}	136.13 \pm 6.66 ^{a2}	134.49 \pm 3.23 ^{a2}
LOTE II	84.30 \pm 0.31 ^{b1}	135.93 \pm 5.46 ^{a2}	141.03 \pm 9.04 ^{a2}
LOTE III	101.80 \pm 5.47 ^{a2}	248.28 \pm 6.31 ^{b2}	---
AMINOÁCIDOS NEUTROS (AAR+AAA).			
CONTROL	319.15 \pm 7.54 ^{a1}	360.63 \pm 20.29 ^{a12}	398.83 \pm 13.80 ^{a2}
LOTE II	235.62 \pm 14.18 ^{b1}	356.61 \pm 14.71 ^{a2}	345.77 \pm 16.61 ^{a2}
LOTE III	232.32 \pm 5.34 ^{a1}	686.81 \pm 20.83 ^{b2}	---
AAR/AAA.			
CONTROL	1.87 \pm 0.03 ^{a2}	1.65 \pm 0.06 ^{a2}	1.96 \pm 0.04 ^{a1}
LOTE II	1.80 \pm 0.17 ^{a1}	1.63 \pm 0.08 ^{a1}	1.47 \pm 0.06 ^{b1}
LOTE III	1.30 \pm 0.07 ^{b1}	1.77 \pm 0.04 ^{a2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 27

SUMA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS, DE AMINOÁCIDOS NEUTROS Y RELACIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS LIBRES EN MÚSCULO GASTROCNEMIO ($\mu\text{mol/g}$ de músculo).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS (Tyr+Phe)			
CONTROL	0.29±0.05 ^{a1}	0.28±0.04 ^{a1}	0.49±0.06 ^{a2}
LOTE II	0.42±0.02 ^{a1}	0.28±0.03 ^{a2}	0.40±0.01 ^{a1}
LOTE III	0.84±0.07 ^{a2}	0.45±0.03 ^{a2}	---
AMINOÁCIDOS NEUTROS (AAR+AAA)			
CONTROL	0.93±0.17 ^{a12}	0.82±0.07 ^{a1}	1.29±0.08 ^{a2}
LOTE II	1.52±0.13 ^{a1}	0.71±0.02 ^{a2}	1.24±0.07 ^{a1}
LOTE III	2.55±0.15 ^{a1}	1.13±0.12 ^{a2}	---
AAR/AAA			
CONTROL	2.34±0.37 ^{a1}	2.01±0.27 ^{a1}	1.68±0.19 ^{a1}
LOTE II	2.62±0.14 ^{a1}	1.63±0.20 ^{a2}	2.11±0.11 ^{a1,2}
LOTE III	2.12±0.34 ^{a1}	1.49±0.13 ^{a1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

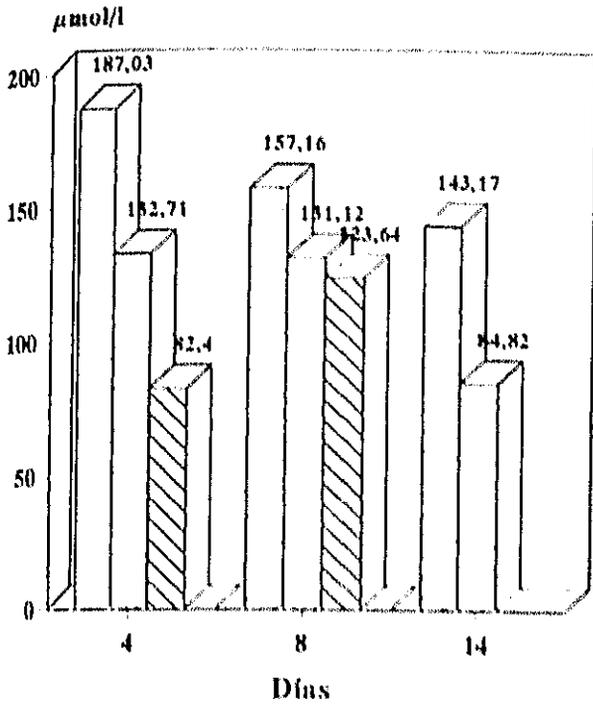
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

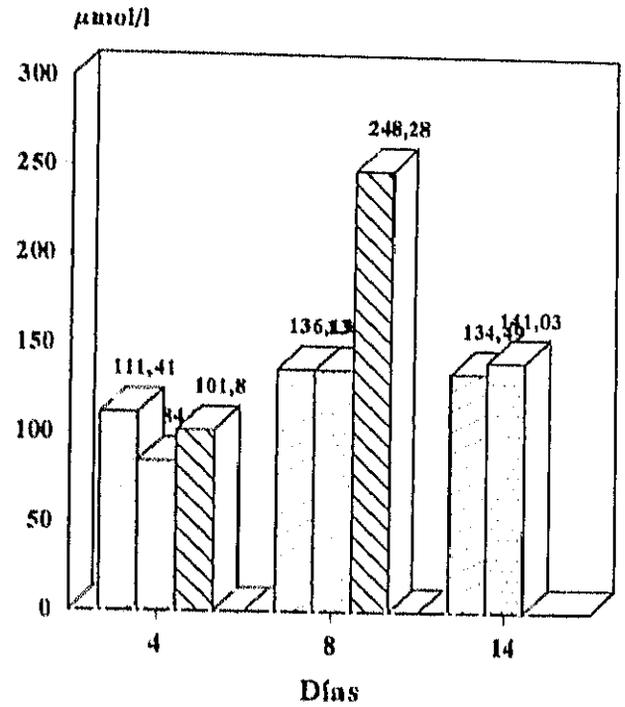
--- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA XXVII.- SUMA DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

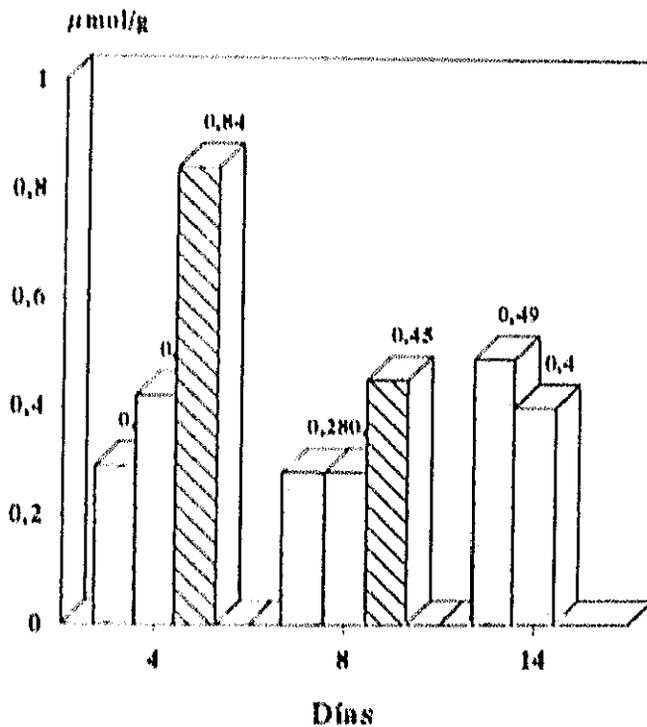
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO

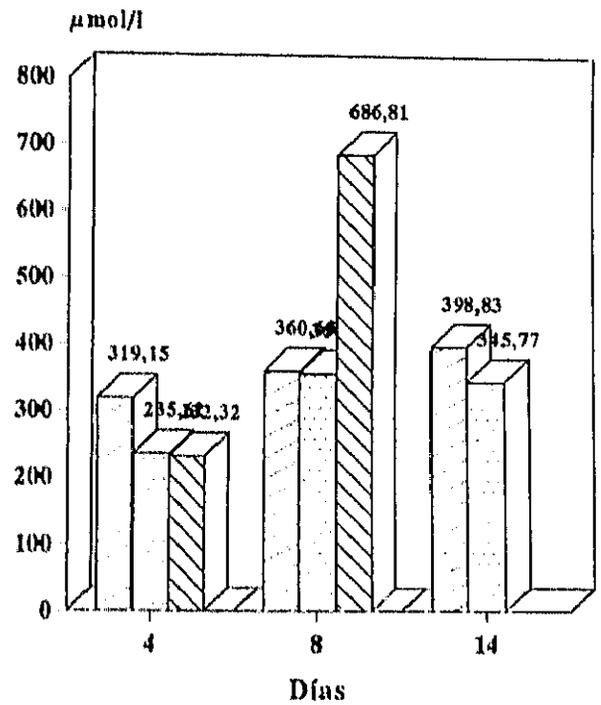
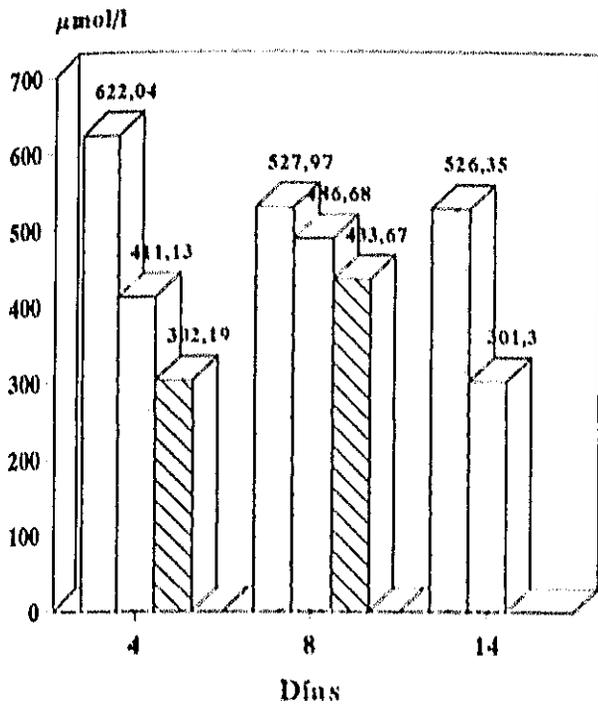


□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

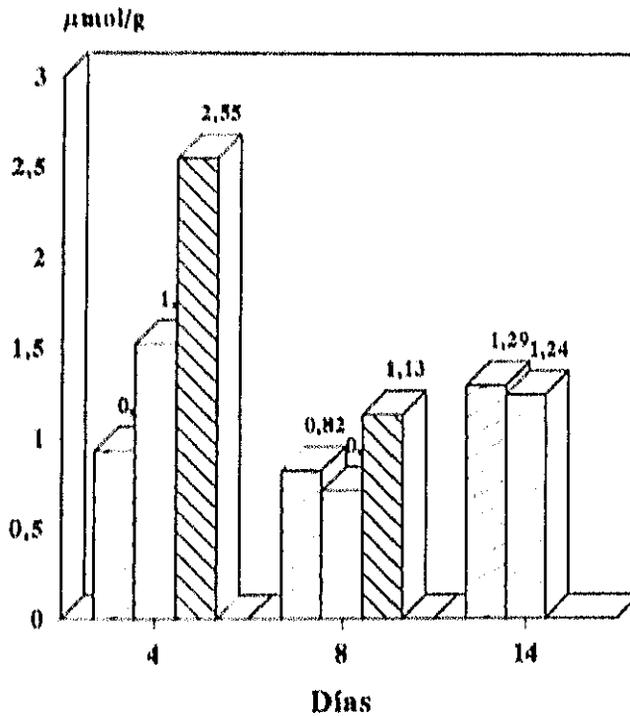
GRÁFICA XXVIII.- SUMA DE AMINOÁCIDOS NEUTROS EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

PLASMA

GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 28

AMINOÁCIDOS BÁSICOS LIBRES EN PLASMA ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ARGININA			
CONTROL	33.97 \pm 2.69 ^{a,1}	38.09 \pm 2.00 ^{a,1,2}	43.73 \pm 0.44 ^{a,2}
LOTE II	25.51 \pm 2.00 ^{a,1}	54.54 \pm 3.30 ^{b,2}	13.77 \pm 0.38 ^{b,3}
LOTE III	22.64 \pm 4.03 ^{a,1}	21.40 \pm 2.08 ^{c,1}	---
HISTIDINA			
CONTROL	76.26 \pm 7.79 ^{a,1}	66.70 \pm 1.15 ^{a,1}	76.54 \pm 4.71 ^{a,1}
LOTE II	59.96 \pm 2.68 ^{a,1}	53.78 \pm 3.50 ^{b,1}	12.20 \pm 0.14 ^{b,2}
LOTE III	36.53 \pm 1.78 ^{b,1}	30.77 \pm 1.88 ^{c,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 29

AMINOÁCIDOS BÁSICOS LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ARGININA			
CONTROL	34.45 \pm 1.57 ^{a,1}	37.52 \pm 0.26 ^{a,1}	58.25 \pm 5.59 ^{a,2}
LOTE II	53.89 \pm 8.50 ^{a,b,1}	76.03 \pm 0.56 ^{b,1}	68.97 \pm 9.26 ^{a,1}
LOTE III	57.17 \pm 3.56 ^{b,1}	134.27 \pm 12.44 ^{c,2}	---
HISTIDINA			
CONTROL	560.88 \pm 5.81 ^{a,1}	942.09 \pm 57.23 ^{a,1}	957.35 \pm 6.67 ^{a,2}
LOTE II	850.16 \pm 45.25 ^{b,1}	650.23 \pm 118.29 ^{b,1}	569.32 \pm 69.61 ^{b,1}
LOTE III	435.10 \pm 52.83 ^{a,1}	421.14 \pm 30.88 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 30

AMINOÁCIDOS BÁSICOS LIBRES (1) Y AZUFRADOS EN MÚSCULO GASTROCNEMIO ($\mu\text{mol/g}$ de músculo).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ARGININA.			
CONTROL	0.33±0.004 ^{a,1}	0.22±0.03 ^{a,2}	0.43±0.03 ^{a,2}
LOTE II	0.62±0.03 ^{b,1}	0.43±0.03 ^{b,2}	0.55±0.02 ^{b,1}
LOTE III	0.81±0.04 ^{c,1}	0.54±0.06 ^{b,2}	---
HISTIDINA.			
CONTROL	0.09±0.003 ^{a,1}	0.09±0.01 ^{a,1}	0.09±0.008 ^{a,1}
LOTE II	0.09±0.012 ^{a,1}	0.09±0.02 ^{a,1}	0.18±0.050 ^{b,1}
LOTE III	0.09±0.010 ^{a,1}	0.15±0.02 ^{a,2}	---
TAURINA.			
CONTROL	9.96±2.15 ^{a,1}	10.22±1.56 ^{a,1}	13.57±2.25 ^{a,1}
LOTE II	9.60±1.47 ^{a,1}	8.64±0.49 ^{a,1}	11.04±1.80 ^{a,1}
LOTE III	15.40±1.64 ^{a,1}	12.41±0.83 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

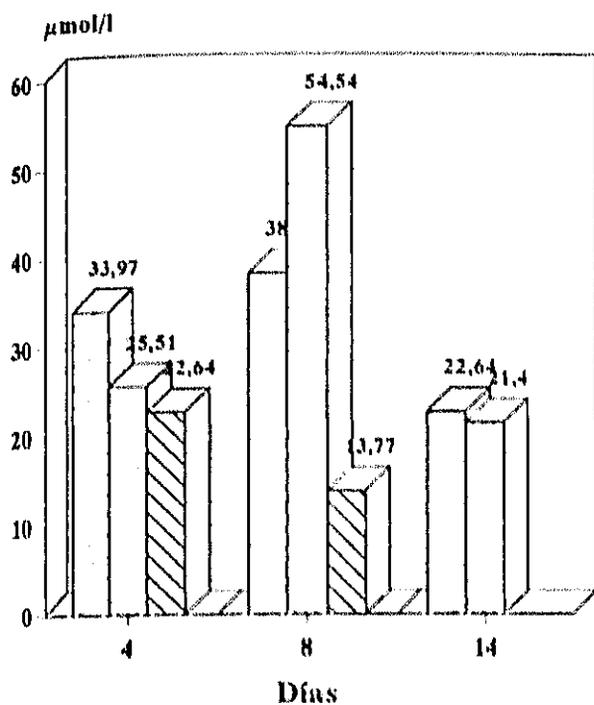
Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

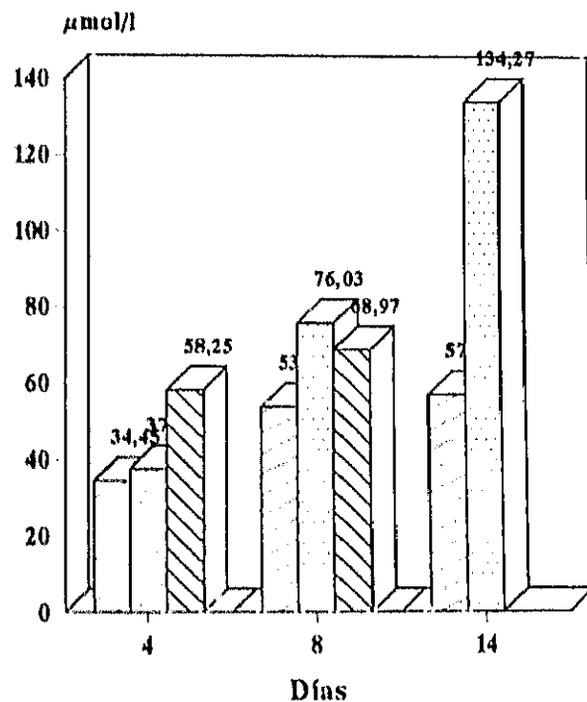
(1) Excepto lisina.

GRÁFICA XXIX.- CONCENTRACIÓN DE ARGININA LIBRE EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

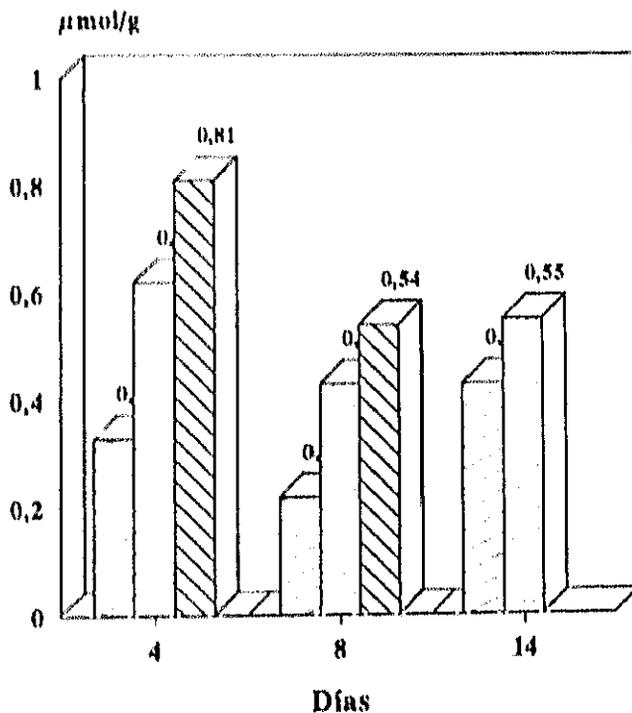
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 31

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

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
METIONINA			
CONTROL	67.14 \pm 5.20 ^{a,1}	59.27 \pm 8.27 ^{a,1}	58.50 \pm 0.60 ^{a,1}
LOTE II	62.52 \pm 0.78 ^{a,1}	60.66 \pm 5.34 ^{a,1}	58.62 \pm 0.92 ^{a,1}
LOTE III	52.04 \pm 4.05 ^{a,1}	67.89 \pm 7.72 ^{a,1}	---
TAURINA			
CONTROL	156.90 \pm 17.72 ^{a,1}	133.41 \pm 5.91 ^{a,1}	292.54 \pm 20.95 ^{a,2}
LOTE II	100.25 \pm 10.89 ^{a,1}	194.45 \pm 15.01 ^{b,2}	135.41 \pm 22.49 ^{b,1}
LOTE III	176.73 \pm 35.75 ^{a,1}	134.87 \pm 5.09 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 32

SUMA DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES, DE AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES, RELACIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS ESENCIALES Y NO ESENCIALES. SUMA DE AMINOÁCIDOS TOTALES LIBRES EN PLASMA ($\mu\text{mol/l}$)

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
AMINOÁCIDOS ESENCIALES (AAE=Arg+His+Ile+Leu+Phe+Thr+Val)			
CONTROL	830.98± 73.6 ^{a,1}	656.72± 5.4 ^{a,1}	809.48± 35.1 ^{a,1}
LOTE II	948.33± 63.3 ^{a,1}	1443.93± 75.8 ^{b,2}	1540.83± 94.3 ^{b,2}
LOTE III	585.41± 36.4 ^{b,1}	689.63± 52.7 ^{a,1}	---
AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES (AANE=Ala+Asp+Glu+Gln+Gly+Ser+Tyr)			
CONTROL	2985.84±175.6 ^{a,1}	2730.01±159.2 ^{a,1}	2691.17±146.6 ^{a,1}
LOTE II	3141.41±106.0 ^{a,1}	3394.61± 49.0 ^{b,1}	3465.32±226.8 ^{a,1}
LOTE III	1701.55± 78.2 ^{b,1}	1492.04± 61.3 ^{a,1}	---
AAE/AANE			
CONTROL	0.28± 0.01 ^{a,1,2}	0.24± 0.02 ^{a,2}	0.31± 0.02 ^{a,1}
LOTE II	0.30± 0.01 ^{b,1}	0.43± 0.03 ^{b,2}	0.45± 0.01 ^{b,2}
LOTE III	0.34± 0.01 ^{b,1}	0.47± 0.05 ^{b,1}	---
AMINOÁCIDOS TOTALES (AAT=AAE+AANE)			
CONTROL	3861.81±246.1 ^{a,1}	3386.73±170.5 ^{a,1}	3430.65±159.1 ^{a,1}
LOTE II	4095.74±159.7 ^{a,1}	4838.54± 45.4 ^{b,1,2}	5006.15±320.0 ^{b,2}
LOTE III	2286.96±109.3 ^{b,1}	2181.67± 64.1 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 33

SUMA DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES, DE AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES, RELACIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS ESENCIALES Y NO ESENCIALES. SUMA DE AMINOÁCIDOS TOTALES LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
AMINOÁCIDOS ESENCIALES (AAE=Arg+His+Ile+Leu+Phe+Thr+Val)			
CONTROL	960.21± 4.8 ^{a,1}	1347.53± 78.7 ^{a,2}	1527.98± 16.3 ^{a,3}
LOTE II	1355.32± 68.9 ^{b,1}	1534.71±131.0 ^{a,1}	1662.82± 69.1 ^{a,1}
LOTE III	803.43± 49.3 ^{a,1}	1389.67± 32.9 ^{a,2}	---
AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES (AANE=Ala+Asp+Glu+Gln+Gly+Ser+Tyr)			
CONTROL	2137.82± 10.5 ^{a,1}	2722.38±143.4 ^{a,2}	2590.29± 44.5 ^{a,2}
LOTE II	2967.83± 98.0 ^{b,1}	3664.64±176.2 ^{b,2}	3704.02±166.9 ^{b,2}
LOTE III	2628.45±157.1 ^{b,1}	3131.13± 76.2 ^{a,2}	---
AAE/AANE			
CONTROL	0.45±0.003 ^{a,1}	0.50± 0.01 ^{a,2}	0.59± 0.01 ^{a,1}
LOTE II	0.46± 0.01 ^{a,1}	0.42± 0.02 ^{b,1}	0.45± 0.02 ^{b,1}
LOTE III	0.31±0.004 ^{b,1}	0.44± 0.01 ^{b,2}	---
AMINOÁCIDOS TOTALES (AAT=AAE+AANE)			
CONTROL	3098.81± 12.2 ^{a,1}	4071.91±218.2 ^{a,2}	4118.28± 58.1 ^{a,2}
LOTE II	4323.15±159.8 ^{b,1}	5199.35±306.1 ^{b,2}	5366.84±195.5 ^{b,2}
LOTE III	3431.88±205.8 ^{a,1}	4520.80±104.8 ^{a,b,2}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 34

SUMA DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES, DE AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES, RELACIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS ESENCIALES Y NO ESENCIALES, SUMA DE AMINOÁCIDOS TOTALES LIBRES EN MÚSCULO GASTROCNEMIO ($\mu\text{mol/g}$ de músculo).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
AMINOÁCIDOS ESENCIALES (AAE=Arg+His+Ile+Leu+Phe+Thr+Val)			
CONTROL	2.21±0.19 ^{a,1}	1.77±0.13 ^{a,1}	2.56±0.17 ^{a,2}
LOTE II	3.28±0.21 ^{b,1}	3.09±0.15 ^{b,1}	5.01±0.65 ^{b,2}
LOTE III	4.28±0.21 ^{c,1}	2.64±0.13 ^{b,2}	---
AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES (AANE=Ala+Asp+Glu+Gln+Gly+Ser+Tyr)			
CONTROL	11.51±0.30 ^{a,1}	13.95±1.46 ^{a,b,1}	13.57±0.73 ^{a,1}
LOTE II	14.69±0.60 ^{b,1}	17.86±2.15 ^{a,1}	14.58±2.16 ^{b,2}
LOTE III	17.39±1.11 ^{b,1}	10.65±1.09 ^{b,2}	---
AAE/AANE			
CONTROL	0.19±0.01 ^{a,1}	0.13±0.02 ^{a,2}	0.19±0.01 ^{a,1}
LOTE II	0.23±0.02 ^{a,1}	0.18±0.02 ^{a,1}	0.35±0.02 ^{b,2}
LOTE III	0.25±0.02 ^{a,1}	0.25±0.02 ^{b,1}	---
AMINOÁCIDOS TOTALES (AAT=AAE+AANE)			
CONTROL	13.73±0.44 ^{a,1}	15.71±1.54 ^{a,b,1}	16.12±0.83 ^{a,1}
LOTE II	17.98±0.60 ^{b,1}	20.94±2.25 ^{a,1}	19.60±2.80 ^{a,1}
LOTE III	21.67±1.11 ^{a,1}	13.28±1.19 ^{b,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

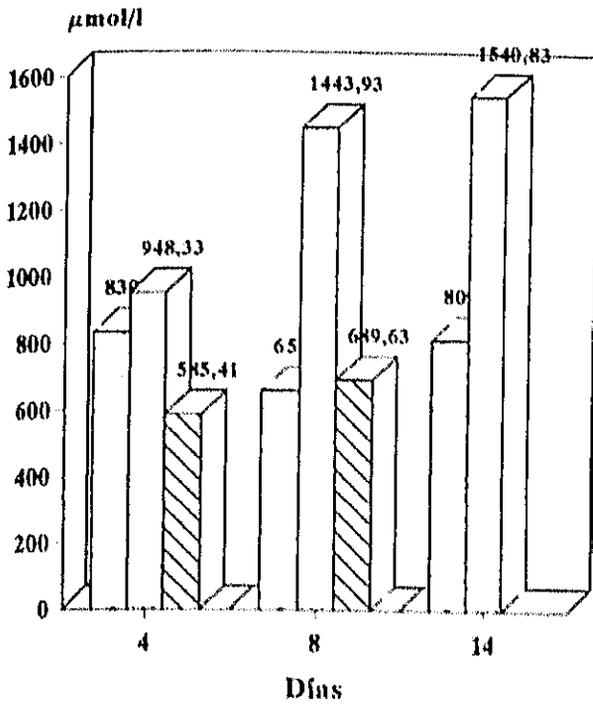
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

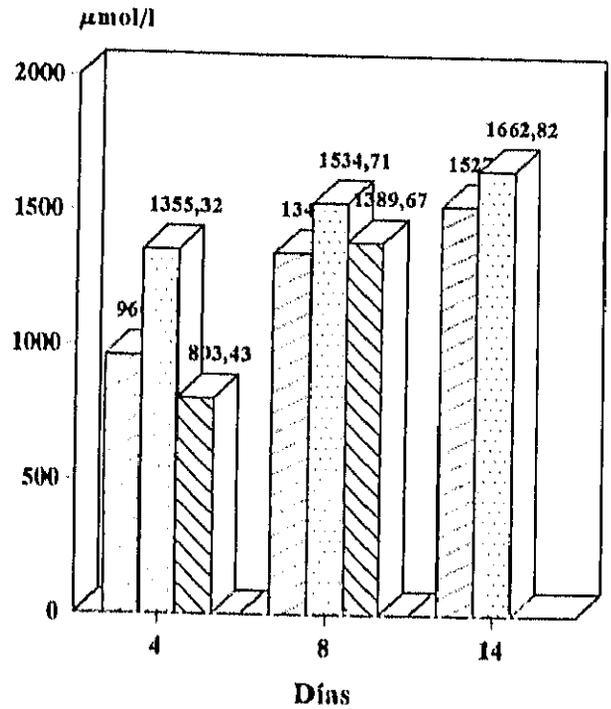
--- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA XXX.- SUMA DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

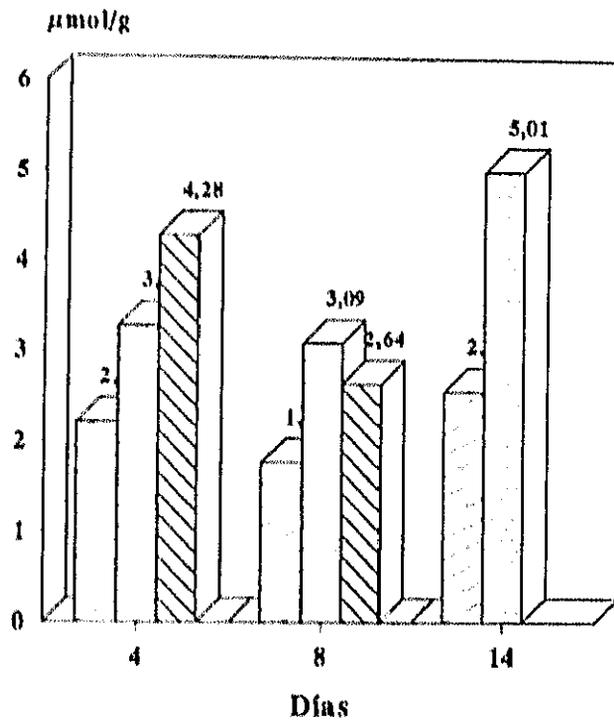
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



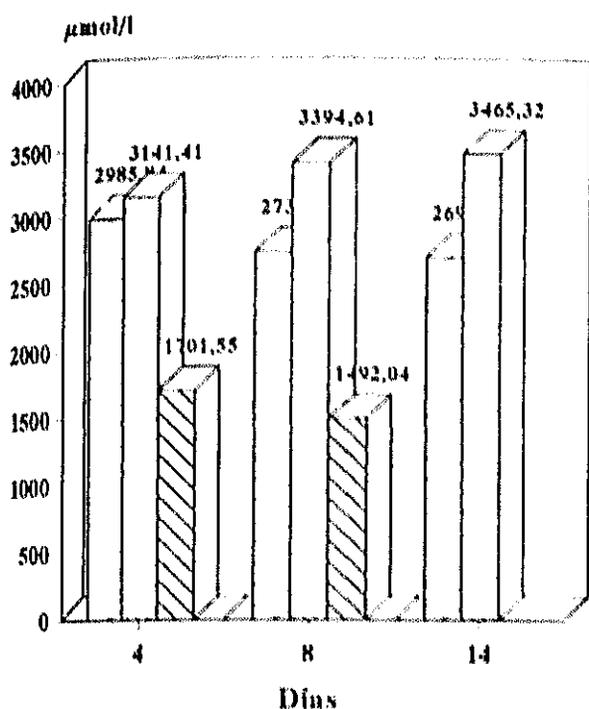
MÚSCULO GASTROCNEMIO



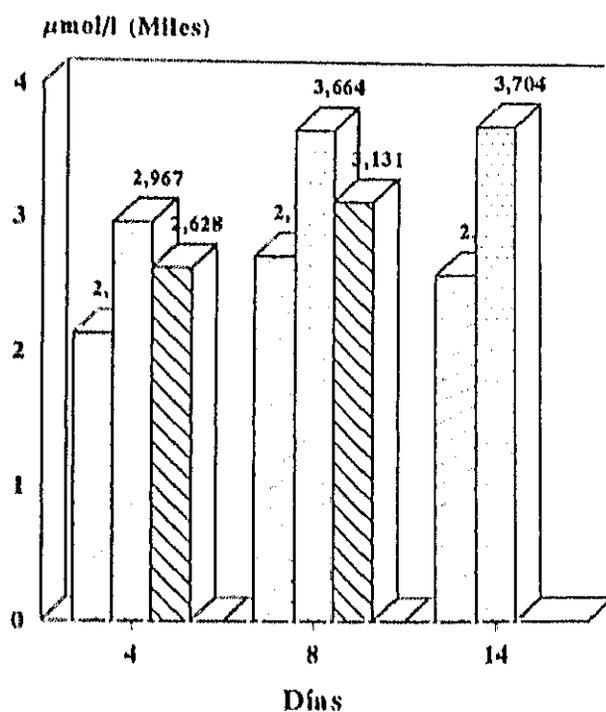
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXXI.- SUMA DE AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

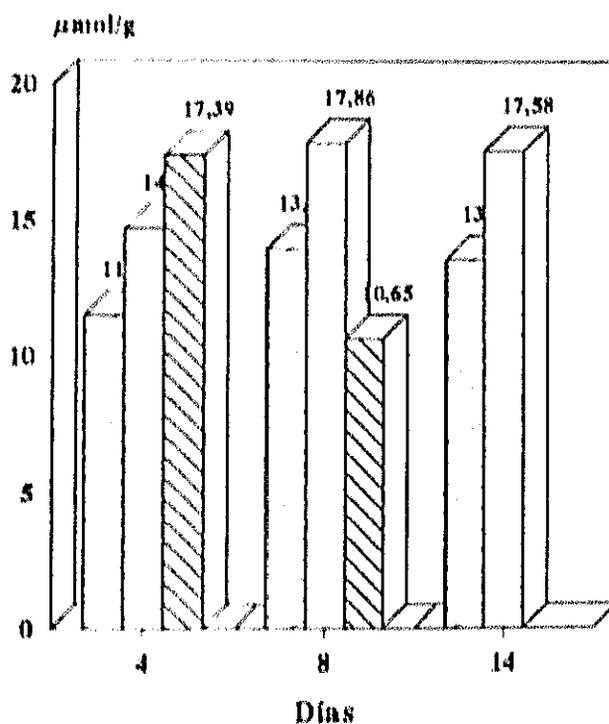
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO

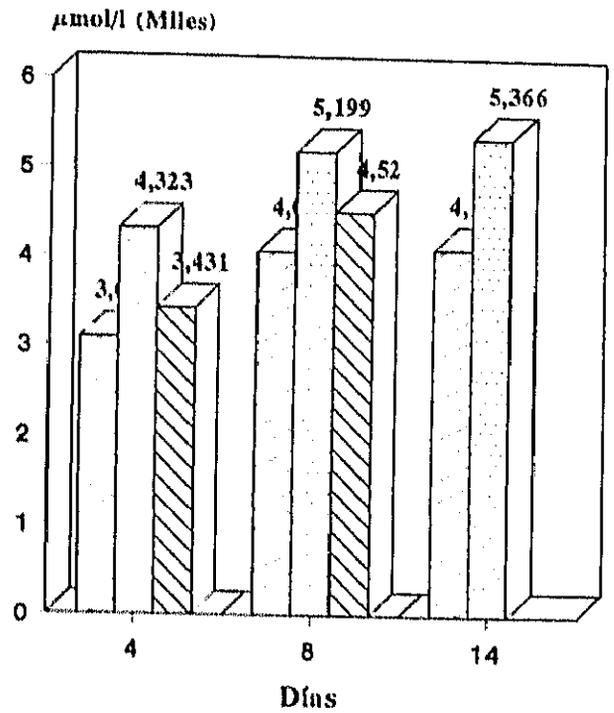
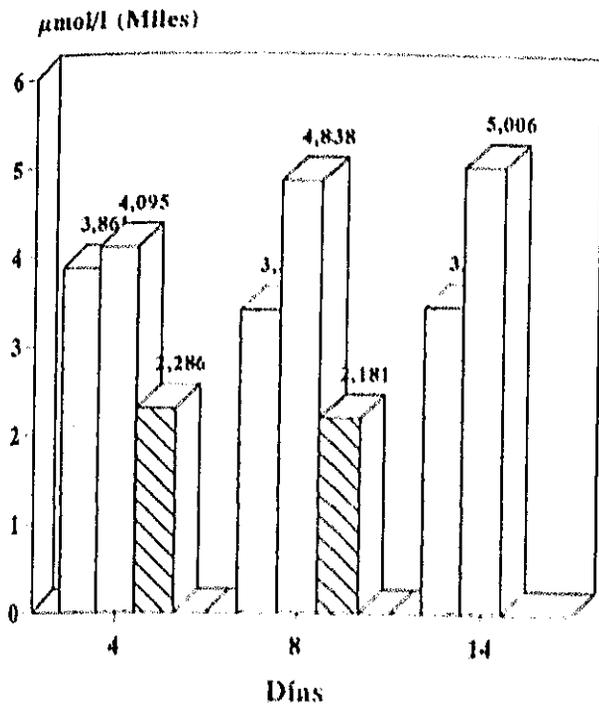


□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

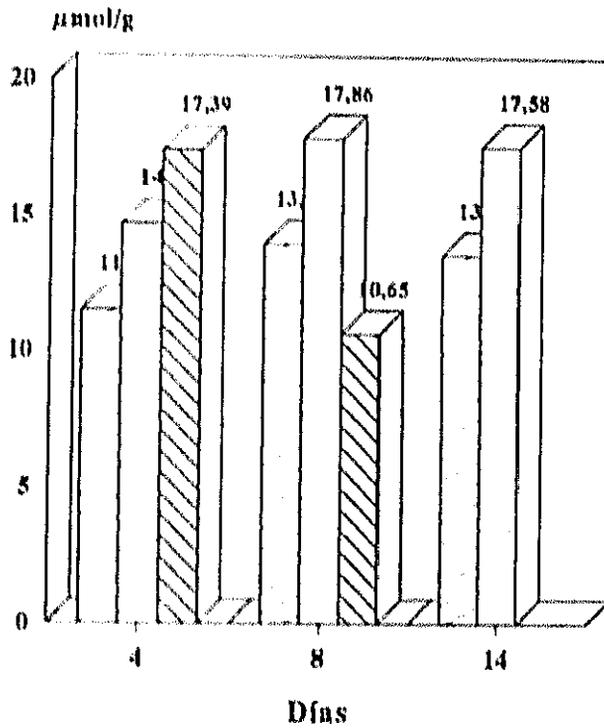
GRÁFICA XXXII.- SUMA TOTAL DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

PLASMA

GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO

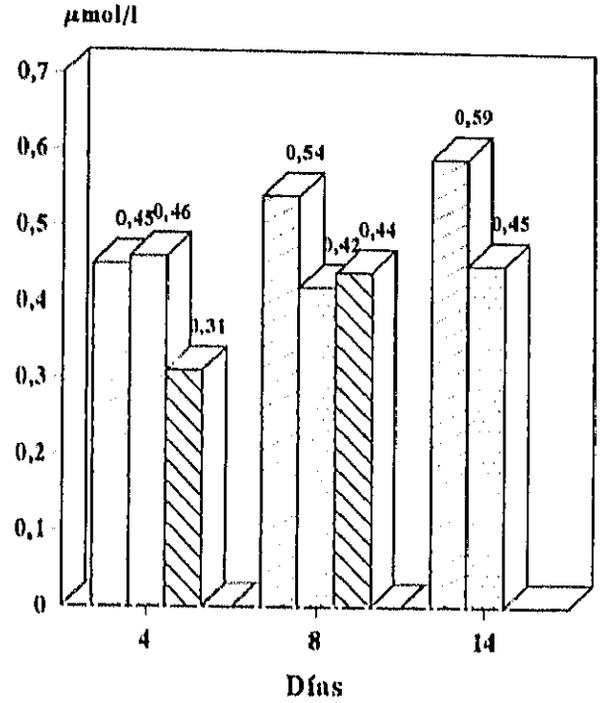
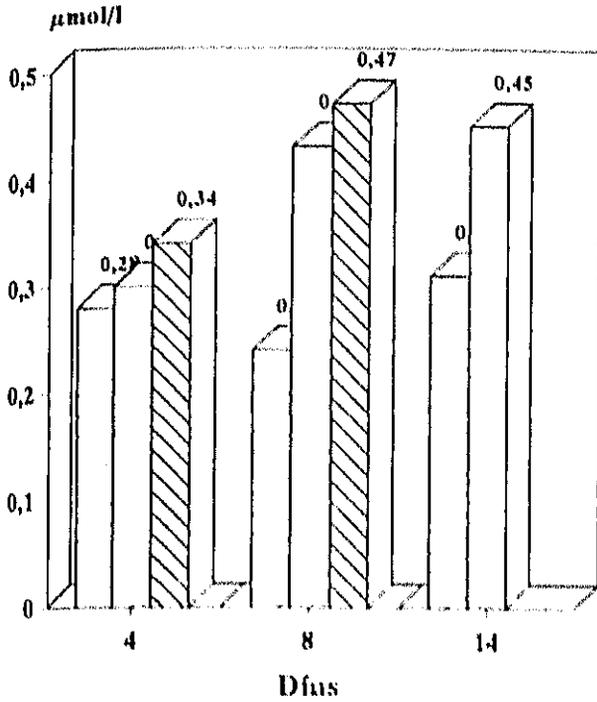


□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

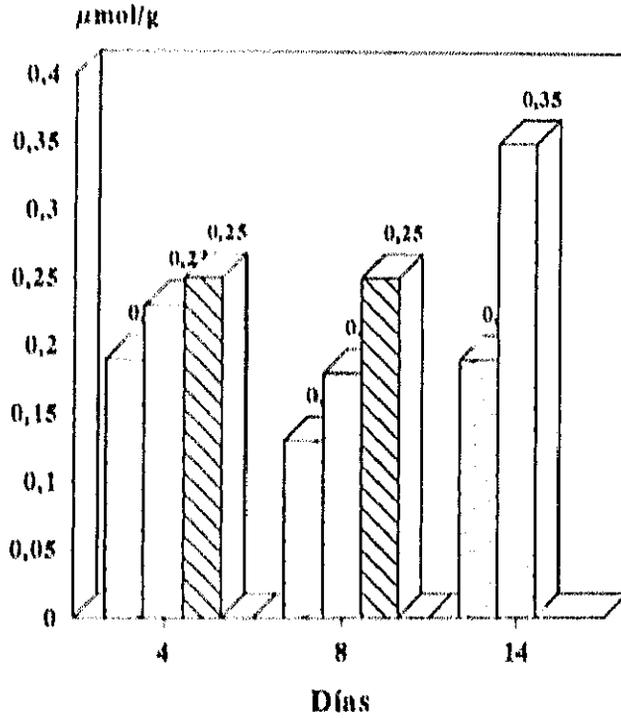
GRÁFICA XXXIII.- RELACIÓN AAE/AANE EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

PLASMA

GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 35

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN PLASMA ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ISOLEUCINA/AAN-ISOLEUCINA			
CONTROL	0.19±0.003 ^{a,1}	0.19±0.01 ^{a,1}	0.20±0.01 ^{a,1}
LOTE II	0.16±0.01 ^{a,1}	0.19±0.01 ^{a,1,2}	0.21±0.01 ^{a,2}
LOTE III	0.23±0.01 ^{a,1}	0.19±0.04 ^{a,1}	---
LEUCINA/AAN-LEUCINA			
CONTROL	0.29±0.02 ^{a,1}	0.32±0.02 ^{a,1}	0.33±0.01 ^{a,1}
LOTE II	0.30±0.01 ^{a,1}	0.30±0.01 ^{a,1}	0.35±0.02 ^{a,1}
LOTE III	0.29±0.01 ^{a,1}	0.26±0.04 ^{a,1}	---
VALINA/AAN-VALINA			
CONTROL	0.46±0.01 ^{a,1}	0.43±0.02 ^{a,1}	0.46±0.03 ^{a,1}
LOTE II	0.44±0.01 ^{a,1}	0.51±0.04 ^{a,1}	0.41±0.02 ^{a,1}
LOTE III	0.47±0.04 ^{a,1}	0.53±0.08 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 36

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ISOLEUCINA/AAN-ISOLEUCINA			
CONTROL	0.15±0.005 ^{a,1}	0.18±0.005 ^{a,2}	0.19±0.006 ^{a,2}
LOTE II	0.17±0.01 ^{a,1}	0.13±0.01 ^{b,1}	0.16±0.004 ^{b,1}
LOTE III	0.17±0.006 ^{a,1}	0.17±0.003 ^{a,1}	---
LEUCINA/AAN-LEUCINA			
CONTROL	0.19±0.01 ^{a,1}	0.21±0.02 ^{a,1}	0.24±0.01 ^{a,1}
LOTE II	0.28±0.02 ^{b,1}	0.27±0.01 ^{b,1}	0.24±0.01 ^{a,1}
LOTE III	0.21±0.01 ^{a,1}	0.33±0.01 ^{c,2}	---
VALINA/AAN-VALINA			
CONTROL	0.56±0.01 ^{a,1}	0.42±0.02 ^{a,2}	0.44±0.02 ^{a,2}
LOTE II	0.38±0.01 ^{b,1,2}	0.40±0.01 ^{a,1}	0.35±0.004 ^{b,2}
LOTE III	0.33±0.02 ^{b,1}	0.33±0.003 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre días.

--- Efecto letal de la dieta.

TABLA 37

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN PLASMA ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
FENILALANINA/AAN-FENILALANINA			
CONTROL	0.12±0.01 ^{a,1}	0.11±0.01 ^{a,1}	0.11±0.01 ^{a,1}
LOTE II	0.11±0.01 ^{a,1,2}	0.11±0.01 ^{a,1}	0.14±0.01 ^{b,2}
LOTE III	0.16±0.02 ^{a,1}	0.13±0.01 ^{a,1}	---
TIROSINA/AAN-TIROSINA			
CONTROL	0.25±0.02 ^{a,1}	0.25±0.01 ^{a,1}	0.21±0.01 ^{a,1}
LOTE II	0.29±0.02 ^{a,1}	0.21±0.01 ^{a,1,2}	0.19±0.03 ^{a,2}
LOTE III	0.16±0.01 ^{b,1}	0.24±0.03 ^{a,1}	---
FENILALANINA/TIROSINA			
CONTROL	0.54±0.07 ^{a,1}	0.51±0.01 ^{a,1}	0.56±0.03 ^{a,1}
LOTE II	0.46±0.06 ^{a,1}	0.55±0.04 ^{a,1}	0.90±0.22 ^{a,1}
LOTE III	0.99±0.14 ^{b,1}	0.58±0.02 ^{a,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

----- Efecto letal de la dieta.

TABLA 38

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
FENILALANINA/AAN-FENILALANINA			
CONTROL	0.10±0.01 ^{a,1}	0.09±0.01 ^{a,1}	0.08±0.01 ^{a,1}
LOTE II	0.08±0.01 ^{a,1}	0.10±0.003 ^{a,1}	0.09±0.004 ^{b,2}
LOTE III	0.13±0.003 ^{a,1}	0.15±0.01 ^{b,1}	---
TIROSINA/AAN-TIROSINA			
CONTROL	0.35±0.01 ^{a,1}	0.42±0.02 ^{a,1}	0.35±0.02 ^{a,1}
LOTE II	0.41±0.03 ^{a,b,1}	0.41±0.02 ^{a,1}	0.49±0.03 ^{b,1}
LOTE III	0.48±0.04 ^{b,1}	0.31±0.02 ^{b,2}	---
FENILALANINA/TIROSINA			
CONTROL	0.35±0.04 ^{a,1}	0.29±0.03 ^{a,1}	0.30±0.03 ^{a,1}
LOTE II	0.26±0.003 ^{a,1,2}	0.31±0.02 ^{a,1}	0.25±0.02 ^{a,2}
LOTE III	0.35±0.03 ^{a,1}	0.56±0.07 ^{b,2}	---

Valores medios de 4 animales ± ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

----- Efecto letal de la dieta.

TABLA 39

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN PLASMA ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ALANINA/TIROSINA			
CONTROL	6.60±0.77 ^{a,1}	7.76±1.16 ^{a,1}	5.59±0.23 ^{a,1}
LOTE II	6.30±0.34 ^{a,1}	11.17±0.50 ^{b,1}	12.76±4.68 ^{a,1}
LOTE III	5.96±0.57 ^{a,1}	3.52±0.40 ^{c,2}	---
ALANINA/LEUCINA			
CONTROL	5.86±0.56 ^{a,1,2}	6.18±0.67 ^{a,b,1}	3.93±0.13 ^{a,2}
LOTE II	5.94±0.27 ^{a,1}	8.34±0.34 ^{a,1}	5.93±0.93 ^{a,1}
LOTE III	3.62±0.29 ^{b,1}	3.99±1.08 ^{b,1}	---
ALANINA/AAR			
CONTROL	1.86±0.16 ^{a,1,2}	2.14±0.24 ^{a,1}	1.34±0.06 ^{a,2}
LOTE II	2.05±0.12 ^{a,1}	2.67±0.14 ^{a,1}	2.12±0.34 ^{a,1}
LOTE III	1.21±0.09 ^{b,1}	1.02±0.20 ^{b,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

----- Efecto letal de la dieta.

TABLA 40

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ALANINA/TIROSINA			
CONTROL	4.30 \pm 0.29 ^{a,1}	3.62 \pm 0.23 ^{a,1}	3.45 \pm 0.12 ^{a,1}
LOTE II	3.88 \pm 0.20 ^{a,1}	3.25 \pm 0.33 ^{a,1}	2.93 \pm 0.28 ^{a,1}
LOTE III	2.84 \pm 0.12 ^{b,1}	1.89 \pm 0.12 ^{b,2}	---
ALANINA/LEUCINA			
CONTROL	6.98 \pm 0.39 ^{a,1}	6.20 \pm 0.50 ^{a,1}	4.63 \pm 0.13 ^{a,1}
LOTE II	5.09 \pm 0.38 ^{b,1}	4.40 \pm 0.43 ^{b,1}	4.82 \pm 0.06 ^{a,1}
LOTE III	5.43 \pm 0.30 ^{b,1}	1.78 \pm 0.03 ^{c,2}	---
ALANINA/AAR			
CONTROL	1.71 \pm 0.09 ^{a,1}	1.70 \pm 0.07 ^{a,1}	1.36 \pm 0.08 ^{a,2}
LOTE II	1.74 \pm 0.08 ^{a,1}	1.52 \pm 0.14 ^{a,1}	1.59 \pm 0.07 ^{a,1}
LOTE III	1.63 \pm 0.06 ^{a,1}	0.69 \pm 0.01 ^{b,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

----- Efecto letal de la dieta.

TABLA 41

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN MÚSCULO GASTROCNEMIO ($\mu\text{mol/g}$ de músculo).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
ALANINA/TIROSINA			
CONTROL	35.43±8.76 ^{a,1}	34.06±6.20 ^{a,1}	38.25±13.55 ^{a,1}
LOTE II	13.15±1.12 ^{a,1}	21.88±2.86 ^{a,b,2}	9.51± 1.11 ^{b,1}
LOTE III	6.97±1.22 ^{a,1}	9.31±2.65 ^{b,1}	---
ALANINA/LEUCINA			
CONTROL	23.05±6.42 ^{a,1,2}	39.94±5.42 ^{a,1}	17.03±1.04 ^{a,2}
LOTE II	7.32±0.80 ^{b,1}	17.40±2.88 ^{b,2}	7.22±1.36 ^{b,1}
LOTE III	4.37±0.33 ^{b,1}	12.71±4.43 ^{b,1}	---
ALANINA/AAR			
CONTROL	8.42±2.20 ^{a,1}	12.47±1.08 ^{a,1}	7.95±1.03 ^{a,1}
LOTE II	3.46±0.72 ^{b,1}	6.83±0.81 ^{b,2}	2.87±0.46 ^{b,1}
LOTE III	1.94±0.16 ^{b,1}	4.32±1.15 ^{b,1}	---
FENILALANINA/TIROSINA			
CONTROL	0.80±0.11 ^{a,1}	0.35±0.07 ^{a,1}	1.59±0.61 ^{a,1}
LOTE II	0.57±0.11 ^{a,1}	1.03±0.16 ^{b,1}	0.66±0.12 ^{a,1}
LOTE III	0.73±0.16 ^{a,1}	0.48±0.08 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

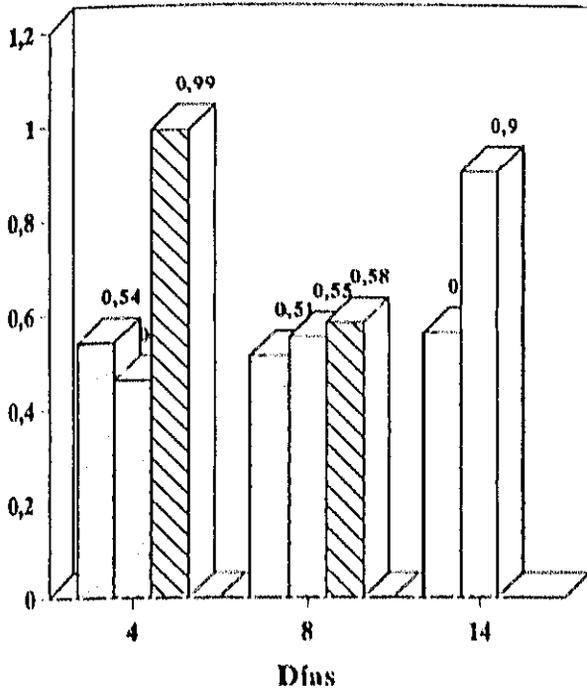
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

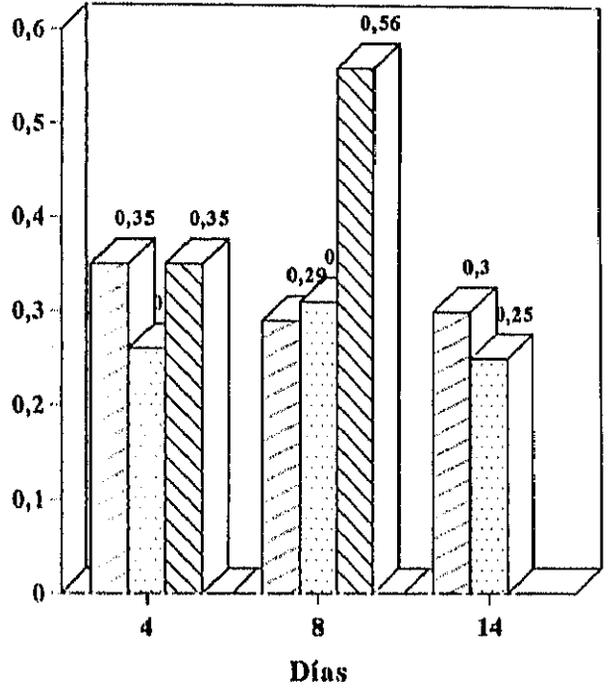
---- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA XXXIV.- RELACIÓN PHE/TYR EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

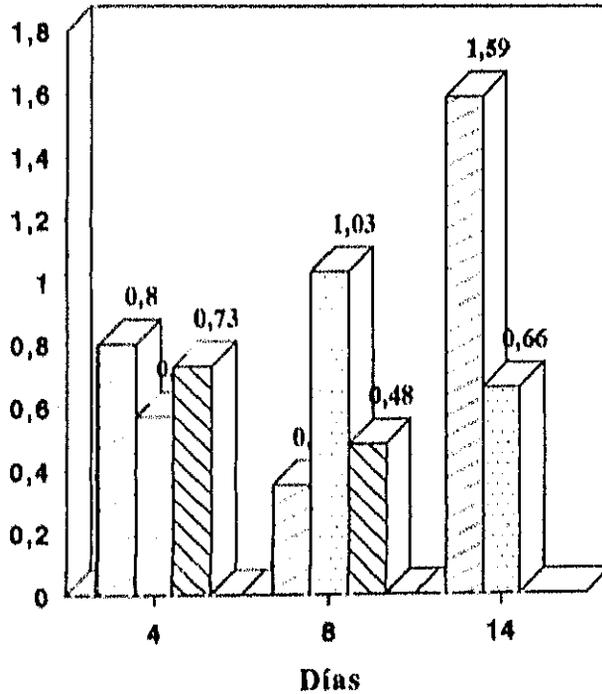
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



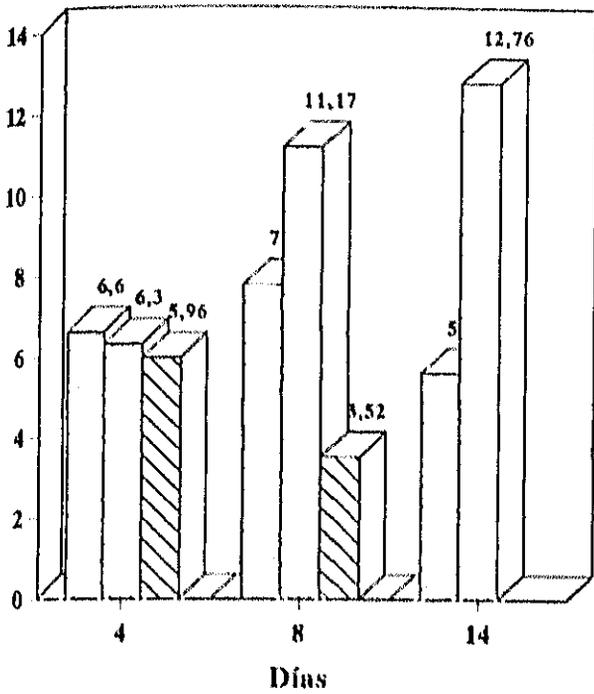
MÚSCULO GASTROCNEMIO



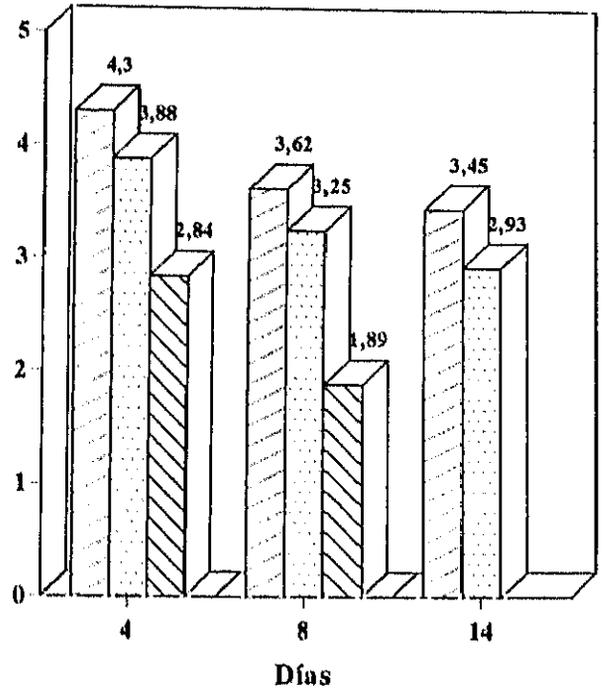
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXXV.- RELACIÓN ALA/TYR EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

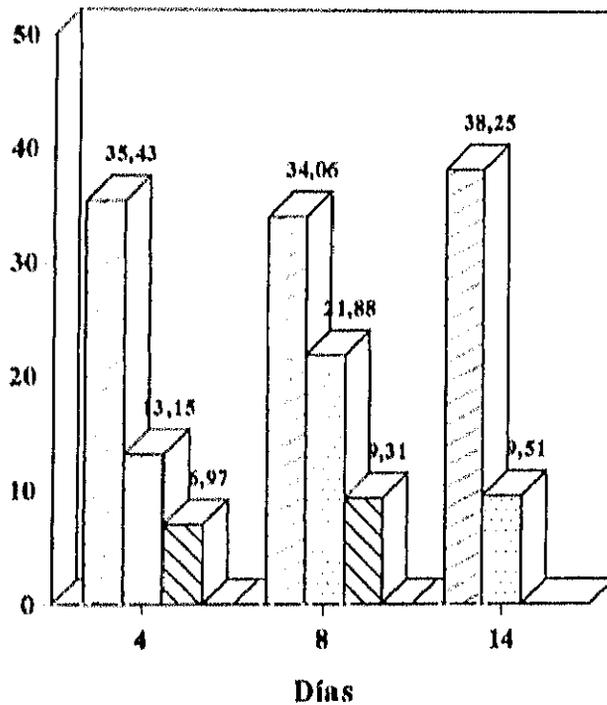
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



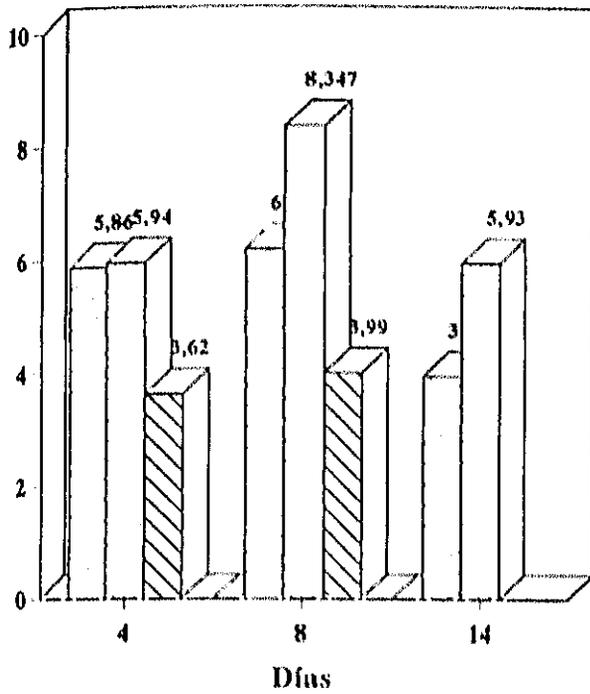
MÚSCULO GASTROCNEMIO



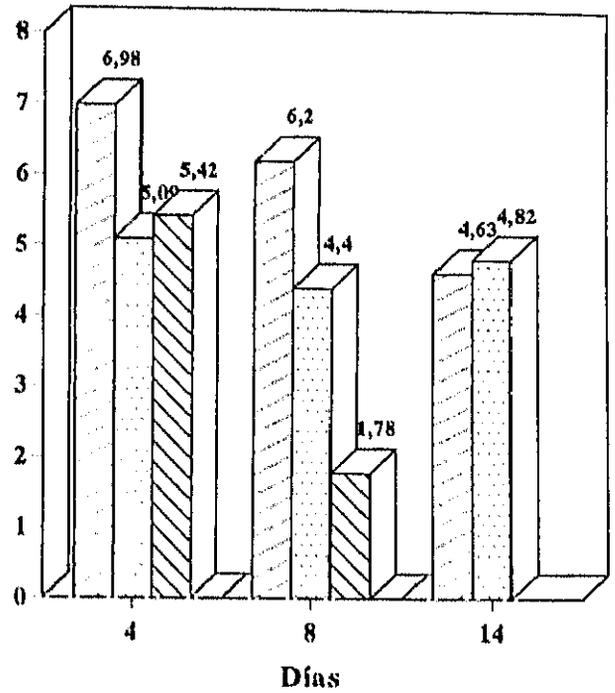
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXXVI.- RELACIÓN ALA/LEU EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

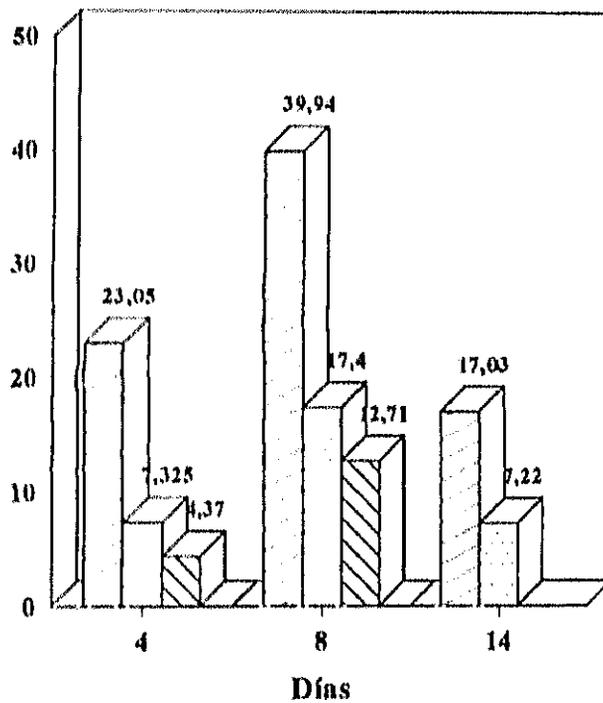
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



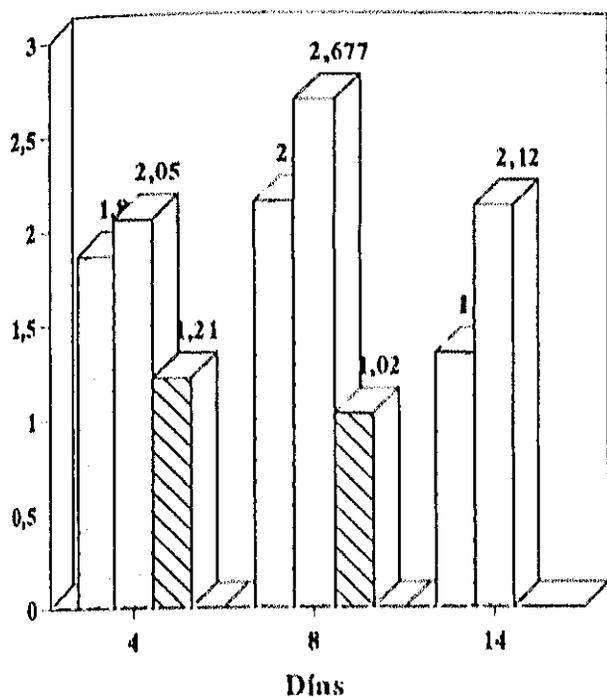
MÚSCULO GASTROCNEMIO



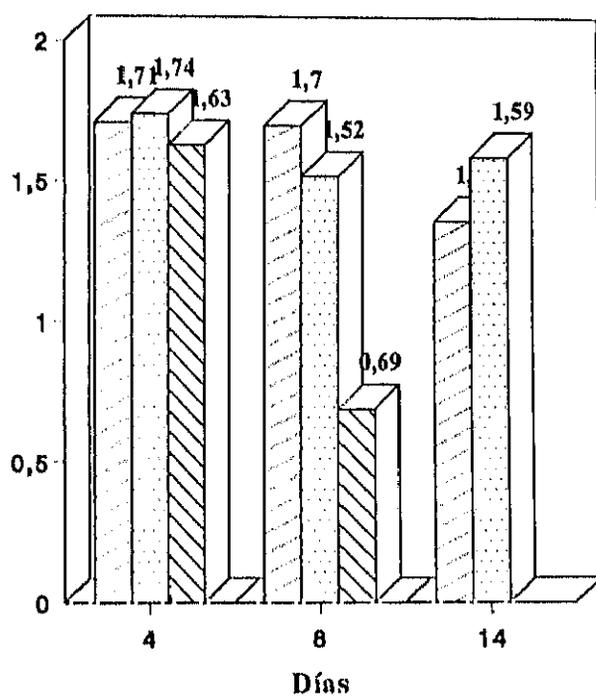
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXXVII.- RELACIÓN ALA/AACR EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

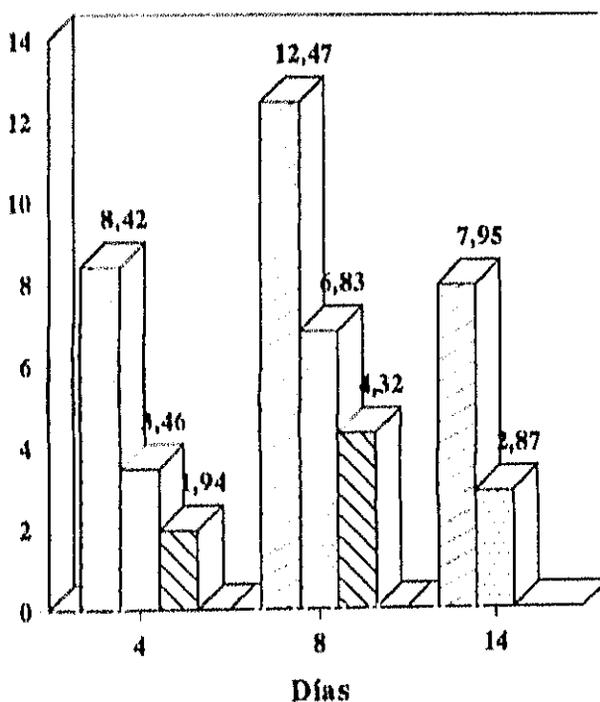
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

TABLA 42

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN PLASMA ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
SERINA+GLICINA+ALANINA/AAR			
CONTROL	3.48±0.29 ^{a,1}	3.29±0.24 ^{a,1,2}	2.47±0.13 ^{a,2}
LOTE II	7.62±0.49 ^{b,1}	7.07±0.31 ^{b,1}	11.28±0.88 ^{b,2}
LOTE III	4.62±0.21 ^{a,1}	3.05±0.59 ^{a,1}	---
GLICINA/VALINA			
CONTROL	1.31±0.15 ^{a,1}	1.28±0.18 ^{a,1}	1.41±0.14 ^{a,1}
LOTE II	7.17±0.23 ^{b,1}	4.52±0.49 ^{b,2}	7.16±0.38 ^{b,1}
LOTE III	4.94±0.04 ^{c,1}	2.46±0.40 ^{a,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

----- Efecto letal de la dieta.

TABLA 43

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN GLÓBULOS ROJOS ($\mu\text{mol/l}$).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
SERINA+GLICINA+ALANINA/AAR			
CONTROL	3.37±0.12 ^{a,1}	2.99±0.15 ^{a,1,2}	2.65±0.10 ^{a,2}
LOTE II	7.37±0.20 ^{b,1}	7.64±0.42 ^{b,1}	8.64±0.79 ^{b,1}
LOTE III	5.14±0.10 ^{c,1}	2.19±0.12 ^{a,1}	---
GLICINA/VALINA			
CONTROL	1.93±0.03 ^{a,1}	1.60±0.09 ^{a,1}	1.74±0.16 ^{a,1}
LOTE II	9.33±1.11 ^{b,1}	4.91±0.25 ^{b,2}	4.51±0.64 ^{b,2}
LOTE III	5.51±0.11 ^{c,1}	2.22±0.18 ^{a,2}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

----- Efecto letal de la dieta.

TABLA 44

RELACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN MÚSCULO GASTROCNEMIO ($\mu\text{mol/g}$ de músculo).

	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 14
SERINA+GLICINA+ALANINA/AAR			
CONTROL	16.22±3.51 ^{a,1}	19.82±1.49 ^{a,1}	12.96±1.28 ^{a,1}
LOTE II	11.20±1.39 ^{a,1}	37.32±6.72 ^{b,2}	14.53±2.05 ^{a,1}
LOTE III	8.34±1.27 ^{a,1}	12.93±3.24 ^{a,1}	---
GLICINA/VALINA			
CONTROL	14.24±3.54 ^{a,1}	13.45± 1.85 ^{a,1}	18.67±4.38 ^{a,1}
LOTE II	19.61±2.94 ^{a,1}	62.64±14.93 ^{b,2}	20.52±4.75 ^{a,1}
LOTE III	14.39±3.35 ^{a,1}	15.83± 3.48 ^{a,1}	---

Valores medios de 4 animales \pm ESM.

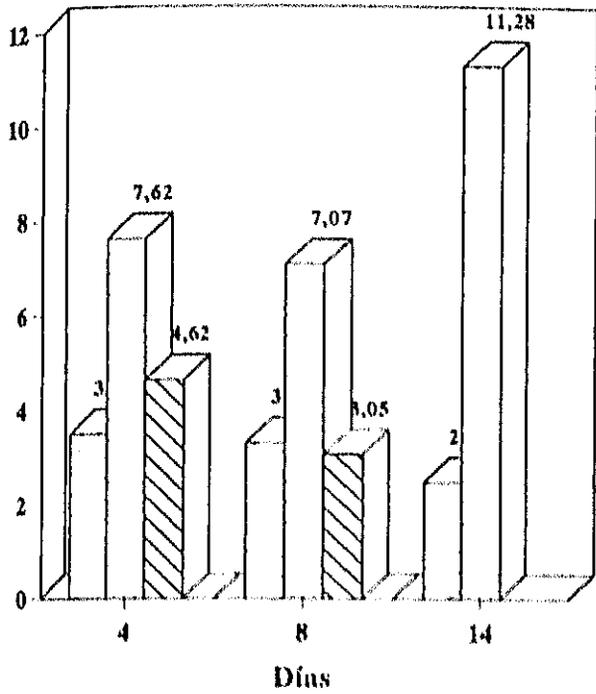
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el día.

Números diferentes en filas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre días.

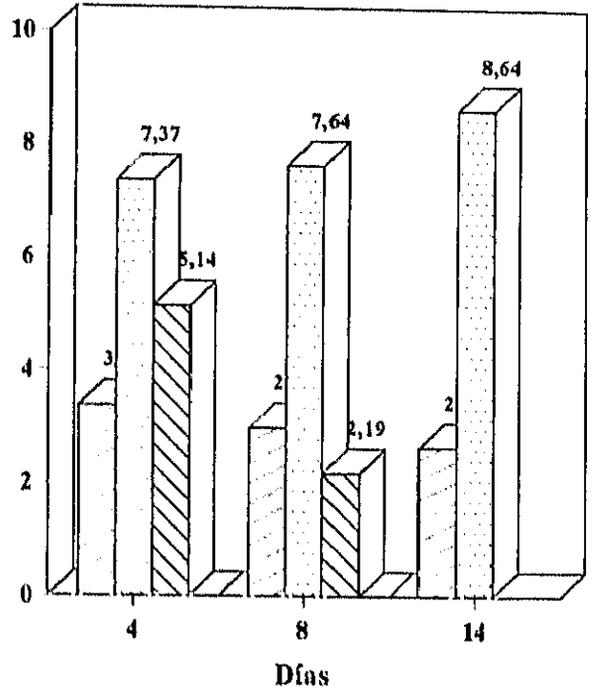
---- Efecto letal de la dieta.

GRÁFICA XXXVIII.- RELACIÓN SER+GLY+ALA/AACR EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

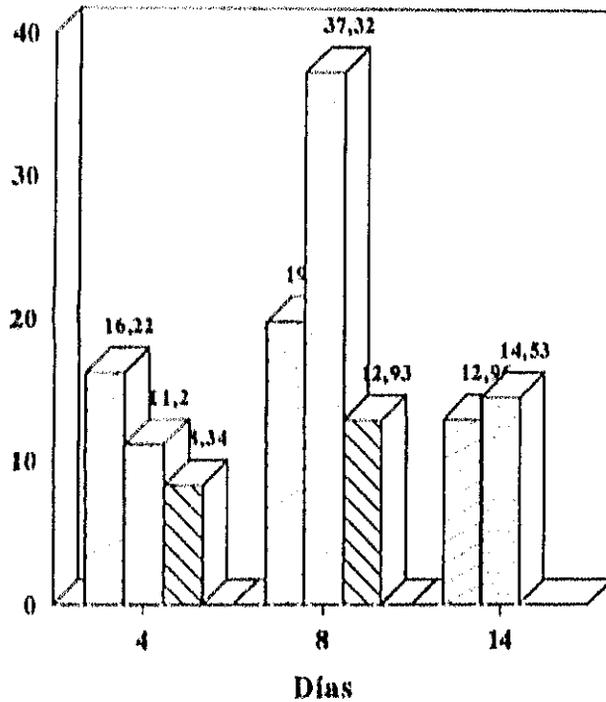
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



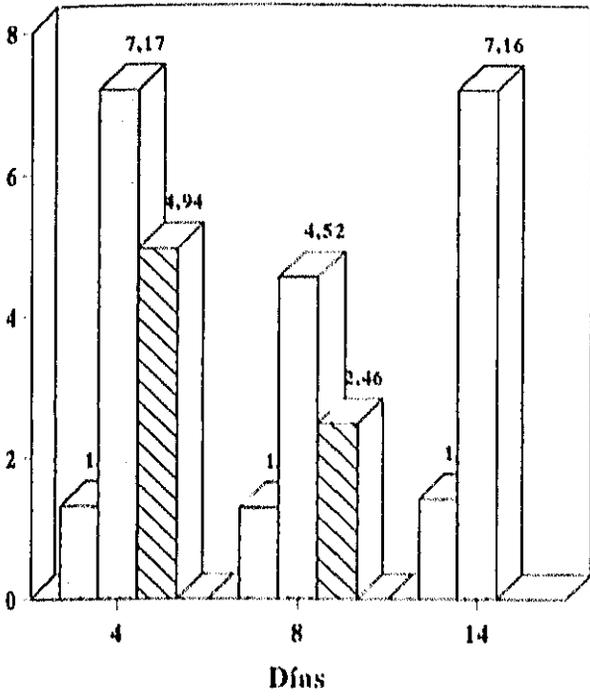
MÚSCULO GASTROCNEMIO



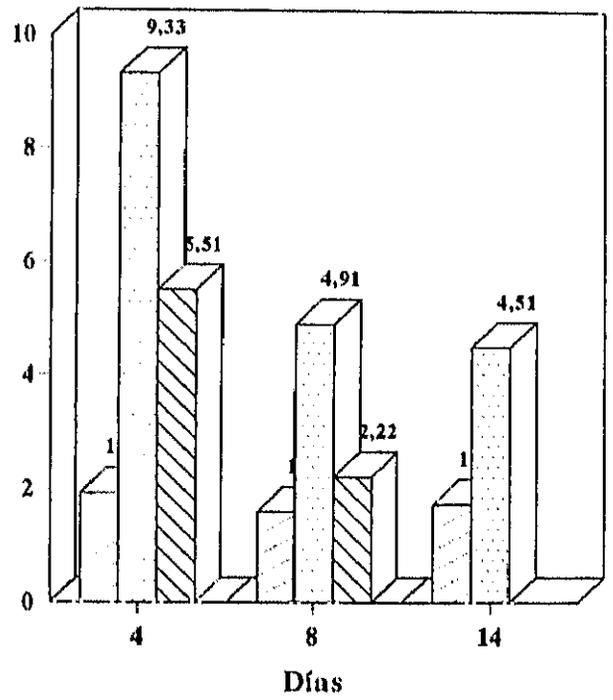
□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

GRÁFICA XXXIX.- RELACIÓN GLICINA/VALINA EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

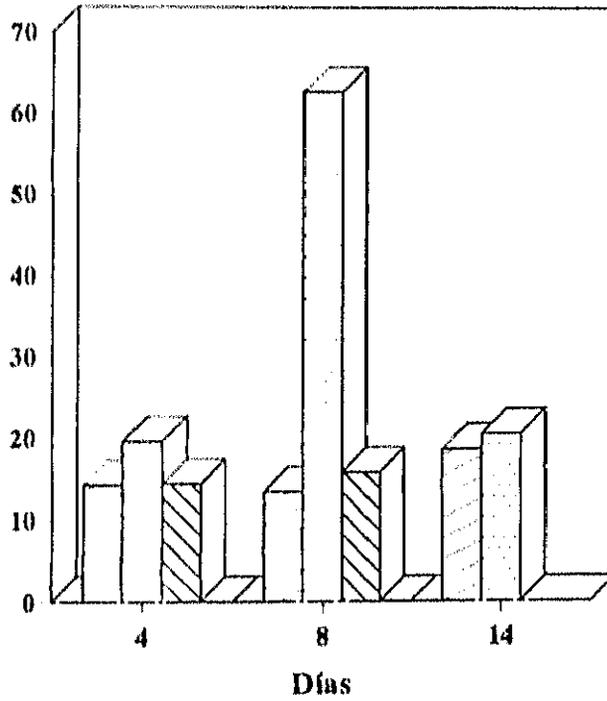
PLASMA



GLÓBULOS ROJOS



MÚSCULO GASTROCNEMIO



□ CONTROL □ LOTE II ▨ LOTE III

**DISCUSIÓN
DE RESULTADOS**

5.1. INGESTA (Tabla 1, Gráfica 1).

La ingesta de alimentos se ve reducida con dietas con alto contenido proteico, pobres en proteínas o carentes en aminoácidos esenciales (PENG y col., 1974).

Si los animales son sometidos a una dieta carente en metionina + cisteína disminuyen su ingesta con respecto a los controles (-50%, -42% y -37% los días 4, 8, y 14, respectivamente). El lote con una dieta carente en metionina + cisteína y con $\frac{1}{2}$ de energía recibe la mitad de lo ingerido por el lote 2, consumiéndola íntegramente, por lo que en este lote no se evalúa este parámetro.

El mismo efecto se ha observado al administrar parenteralmente a ratas mezclas de aminoácidos exentas de histidina o de treonina (LEUNG y ROGERS, 1969), y al someter a ratas a dietas carentes en proteína (PENG y col., 1974).

Los aminoácidos juegan un papel importante en la regulación de la ingesta mediante la síntesis de neurotransmisores. Una proteína de baja calidad provoca una disminución en la síntesis proteica cerebral, siendo el cerebro más vulnerable en la fase de desarrollo que el del adulto (LAJTHA y col., 1987; CHEREL y LE MAHO, 1991). Se ha relacionado la menor ingesta proteica con una disminución en la concentración de aminoácidos en cerebro (PETERS y HARPER, 1987), lo que conduce a una alteración en la ingesta por mecanismos asociados al menor contenido en aminoácidos cerebrales (HARPER y col., 1970). HARPER y PETERS (1989) indican que, posiblemente, exista en el cerebro un mecanismo que responda a las variaciones en la proporción de aminoácidos esenciales de la misma, ya que ésta se refleja en un descenso en la concentración en cerebro del aminoácido limitante de la dieta para el crecimiento, y se manifiesta con un descenso de la ingesta. Así mismo, concluyen que existe un control de la ingesta para mantener la concentración de aminoácidos esenciales en el cerebro entre 1,5 y 2,3 nmol/g (PETERS y HARPER, 1985).

BEVERLY y col. (1991) indican que existe un código específico del genoma que transcribe un RNAm capaz de traducir determinadas proteínas que impiden la aversión a una dieta. El desequilibrio de una dieta en aminoácidos esenciales afecta al genoma, impidiendo la formación de las proteínas codificadas por el citado RNAm y, por consiguiente, provocando un rechazo a la dieta.

5.2. PESO CORPORAL (Tabla 1, Gráfica I).

Si un animal adulto es expuesto a un nivel bajo de energía disminuye su peso corporal (WATERLOW, 1990), siendo las variaciones del mismo una de las manifestaciones más importantes de la adaptación a cambios en la dieta y un indicador del estado nutricional (JOLLES y col., 1988).

El crecimiento se debe a que prevalecen los procesos anabólicos sobre los catabólicos (MILLWARD y col., 1975). La privación de aminoácidos esenciales en la dieta provocará una pérdida de peso como consecuencia de la disminución de la síntesis proteica (CARMONA DA MOTA y col., 1990).

Los lotes 2 y 3 presentan una reducción en el peso corporal con respecto al control, como consecuencia de la reducción de la ingesta de -53% en el lote 2 el día 14 y -42% en el lote 3 el día 8, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos por CARMONA DA MOTA y col. (1990), RANA y MEHTA (1991) y SINGH y col. (1990).

La falta de energía en la dieta del lote 3 tiende a reducir más el peso corporal, pero no se diferencia significativamente del lote 2. Estos resultados están de acuerdo con los de JABLONSKI y RAFALSKI (1984) y con los de JEPSON y col. (1988).

Como se puede observar, la disminución de energía no influye demasiado en la disminución de peso. McDONALD (1990) indica que no hay una relación lineal entre la falta de energía de la dieta y la pérdida de peso.

Esta apreciación coincide con la de SOARES y SHETTY (1991), que indican que los animales sometidos a carencias energéticas disminuyen su metabolismo basal para así ahorrar energía, mediante un proceso de adaptación.

5.3. PESO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO (Tabla 1, Gráfica II).

La deficiencia dietaria de proteína y de energía influye sobre el peso del animal, dependiendo de la edad, calidad de la proteína y el tiempo de la administración de la dieta (CHEREL y LE MAHO, 1991), de forma que cuanto menor sea la edad del animal, mayor será el efecto de la alteración nutricional en su organismo.

Los estudios de MERTZ (1972) indican que, en caso de malnutrición, el organismo reserva los tejidos con mayor tasa metabólica (tejidos viscerales excepto el hígado, en el que disminuye el contenido proteico aún teniendo un alto metabolismo), degradando con mayor rapidez los tejidos con una tasa metabólica lenta, como son el músculo y la piel, que al mismo tiempo son los más abundantes (MURILLO y col., 1991).

El crecimiento se produce en una primera fase por aumento de la síntesis de DNA y de proteínas, lo que representa mayor división celular y aumento en el número de células. El tamaño de estas células se mantiene constante, denominándose a este proceso hiperplasia. En la siguiente fase las células se dividen más lentamente, reflejando una disminución en la síntesis de DNA. Las proteínas se siguen formando en una proporción más elevada, aumentando el volumen de la célula; a esta fase se denomina hipertrofica, en ella la relación proteína/DNA aumenta. En la rata esta hipertrofia aparece a partir del día 90. Las células satélites del músculo pueden sufrir hiperplasia e hipertrofia aún en la edad adulta (MUNRO, 1964).

Si durante la hiperplasia se administra una dieta carente, el número de células se reduce, ya que la división celular es más lenta. En consecuencia, se produce una disminución en el contenido de DNA, RNA, enzimas, síntesis proteica, tamaño celular y peso del órgano (SINGH y col., 1990). Estas alteraciones son irreversibles, aún con el suministro posterior de una dieta adecuada. Si la dieta carente se administra en la fase hipertrofica, es decir, tras los primeros 90 días de vida de la rata, se recupera el crecimiento con una dieta adecuada.

La administración de dietas carentes en metionina y cisteína y con $\frac{1}{2}$ de energía produce una disminución del peso muscular con respecto al control, debido a una disminución en la síntesis proteica (TABLA 6), principalmente si el aminoácido carente es la metionina (MARTÍNEZ y col., 1987). En este caso el animal responde igual que ante una dieta con proteína de baja calidad (RIKIMARU y col., 1980).

En el lote control se observa un incremento del peso del músculo gastrocnemio desde el día 4 al 14, siendo del orden del 35,55% y del 77,77% en los días 8 y 14 con respecto al día 4. En cambio, el suministro de dietas carentes de metionina + cisteína y con $\frac{1}{2}$ de energía provoca una reducción del peso muscular que es de -27,27% los días 8 y 14 con respecto al día 4 y de -2,5%, respectivamente.

Si se compara los lotes 2 y 3 con el lote control, se observa una disminución del -34,42% y de -50% el día 8 y 14 respectivamente para el lote 2 y para el 3 un descenso de -36,06% el día 8.

El aumento de peso muscular del lote control a lo largo de la experiencia se debe a que son ratas en período hipertrófico. Además, el crecimiento muscular está relacionado con modificaciones en la síntesis y degradación proteica, predominando la primera en relación con las variaciones paralelas en las concentraciones libres de insulina y de triyodotironina (T_3) (JEPSON y col., 1988).

Como se puede observar, la ingesta energética no tiene una clara influencia en el crecimiento muscular, que es estimulado por el contenido proteico de la dieta, con incremento del contenido de RNA, de acuerdo con los datos de JEPSON y col. (1988). Tanto la insulina como la T_3 tienen un efecto positivo en el turnover proteico muscular, porque la insulina estimula la actividad del RNA. Bajos niveles de T_3 estimulan el contenido de RNA y altos niveles incrementan la proteolisis.

Estos datos coinciden con los de Martínez y col. (MARTÍNEZ y col., 1987), que encuentran una disminución en el peso del músculo gastrocnemio en ratas alimentadas con proteína de baja calidad, debido a una síntesis proteica menor. Esta disminución en la síntesis proteica se debe a la reducción de la actividad del RNA muscular (proteína/RNA) más que al aumento del catabolismo de la proteína miofibrilar (FONG y col. 1989).

5.4. ÍNDICE MIOSOMÁTICO (Tabla 1, Gráfica II).

La relación Peso del músculo/100 g peso corporal o índice miosomático se utiliza como un indicador de los cambios del crecimiento muscular respecto a 100 g de peso corporal. JEPSON y col. (1988) señalan que el aumento de este índice está relacionado con la edad.

Este aumento es evidente en el lote control que es del 31,70% el día 14 con respecto al día 4, mientras que en los lotes carentes 2 y 3 no se observan variaciones significativas a lo largo de la experiencia, ni en los días 8 y 14 comparados con el lote control. Estos datos confirman los resultados de SANTIDRIÁN (1981), quien señala que la disminución del tamaño muscular está relacionada con la disminución del peso corporal, de aquí que la relación no varíe.

5.5. INGESTA DE NITRÓGENO (Tabla 2, Gráfica III).

No varía la ingesta de nitrógeno a lo largo de la experiencia en los tres lotes experimentales. Sí disminuye en el lote 2 con respecto al control y es del mismo nivel que la del lote 3 por las condiciones experimentales diseñadas. La falta de metionina + cisteína en la dieta, por ser la metionina un aminoácido esencial, provoca una reducción de la ingesta y ésta conlleva el aporte deficitario de nitrógeno que es del -51,80%, -43,56% y -37,15% los días 4, 8 y 14 con respecto al control, respectivamente.

5.6. BALANCE DE NITRÓGENO, UREA Y CREATININA EN ORINA (Tabla 2, Gráficas III y IV).

El balance de nitrógeno tiene como finalidad mantener un equilibrio entre la ingesta proteica y energética y el contenido proteico del animal, según su ontogénesis. La respuesta adaptativa a dietas bajas en proteínas hace que la pérdida de nitrógeno sea menor, con el objeto de mantener la masa proteica corporal (WATERLOW, 1986). Si la ingesta es demasiado baja, el animal es incapaz de adaptarse, por lo que perece.

El balance de nitrógeno disminuye con dietas deficitarias en aminoácidos esenciales.

Las pérdidas más altas de N corporal se han encontrado en ratas alimentadas con dietas carentes de aminoácidos azufrados, seguidas, en orden decreciente, por dietas carentes en valina, treonina, isoleucina, triptófano, aminoácidos aromáticos, leucina y lisina (HEGER y FRYDRYCH, 1985).

Se indica en varios estudios con deficiencia de metionina en la dieta (AGUILAR y col., 1972) que es necesaria una cantidad adecuada de la misma para mantener su acción metilante para la síntesis de ácidos nucleicos, colina, creatina, metilhistidina y otros compuestos esenciales y como fuente de azufre para la formación de cisteína, taurina y sulfato.

Se observa en este experimento que las ratas sometidas a una dieta carente en aminoácidos azufrados pierden el último día menor cantidad de nitrógeno que el 8 (GRÁFICA III), lo que puede deberse al ajuste metabólico que se produce para

conservar el nitrógeno corporal, disminuyendo la actividad y cantidades de enzimas del ciclo de la urea (DAS y WATERLOW, 1974). Esto mismo observan YOUNG y col. (1971), tras un ayuno de 20 días en sujetos obesos, en que hay una adaptación progresiva durante el ayuno prolongado para reducir el catabolismo de las proteínas musculares y disminución paralela en la excrección de nitrógeno.

IYENGAR y col. (1981) señalan que al reducir la ingesta energética es necesario aumentar la proteica para evitar un balance negativo de nitrógeno.

La ingesta energética tiene más influencia sobre el balance de nitrógeno que la proteica (CHEREL y LE MAHO, 1991). Así, en el lote 3, el balance de nitrógeno se hace negativo al no disponer de la energía necesaria para la síntesis proteica (GRÁFICA III).

La eliminación de urea es mayor en el lote 3 que en el 2, lo que corrobora que el balance de nitrógeno sea negativo en dicho lote el día 8. En cambio, la adaptación que se observa en el lote 2 el día 14 con respecto al 8 hace que la excrección de urea sea menor mediante cambios en la actividad y cantidad de los enzimas del ciclo de la urea (GRÁFICA IV).

La creatinina se sintetiza en el hígado a partir de la creatina, para ser eliminada como creatinina después de actuar en el músculo como molécula energética (creatinofosfato).

La excrección de creatinina varía dependiendo de la masa muscular. Si esta masa disminuye en estados de malnutrición, infección o trauma (SANTIDRIÁN, 1981), es menor la excrección renal de creatinina.

En este experimento no se modifica la excrección de creatinina en ambos lotes carentes los días 4 y 8, de acuerdo con los trabajos de HOFFER (1990) en diferentes condiciones dietarias. En cambio, se aprecia una disminución el día 14 en el lote 2 de -42,6% (TABLA 3, GRÁFICA IV). Este resultado supone un mecanismo de adaptación, corroborado por los dos parámetros anteriormente estudiados en ese día, ya que tiende a disminuir el catabolismo proteico muscular.

Como resumen se puede establecer que, a pesar de disminuir el catabolismo general en el lote 2, la pérdida de nitrógeno es evidente y la falta energética hace que esta pérdida sea superior, a pesar de que la creatinina excretada sea más reducida, por la escasa masa muscular en estos lotes. Por ello, los aminoácidos dietarios no se

utilizan en la síntesis proteica, por estar ésta disminuida, y sirven como fuente energética con el fin de reducir el catabolismo de las proteínas musculares (SANTIDRIÁN, 1981).

5.7. MASA MUSCULAR Y PORCENTAJE DEL MÚSCULO RESPECTO AL PESO CORPORAL (Tabla 3, Gráfica V).

En el lote control se observa un aumento de la masa muscular a lo largo de la experiencia, que se hace patente el día 14, del orden del 30.18% con respecto al día 4 y del 15.18% con respecto al 8; mientras que en los lotes carentes se observa una disminución de la misma a lo largo de la experiencia, siendo en el lote 2 los días 8 y 14 aproximadamente de -16.57% respecto al 4. En el lote 3, durante el período experimental, no varía.

Si comparamos ambos lotes carentes con el control se observa una reducción del mismo nivel en los días señalados.

La disminución de masa muscular encontrada en ambos lotes carentes es debida a la falta de metionina, que impide la iniciación de la síntesis proteica, por lo que la masa muscular se reduce, como se puede comprobar en la TABLA 7.

Estos resultados también apoyan las variaciones de la excrección de urea, de creatinina y el balance de nitrógeno.

En cuanto al porcentaje de músculo respecto al peso total, no existen variaciones significativas a lo largo de la experiencia en ninguno de los tres lotes, así como tampoco comparando los carentes con el control cada día del experimento, debido a la disminución del peso del animal y del peso del músculo.

5.8. NITRÓGENO Y PROTEÍNAS SOLUBLES EN MÚSCULO (Tabla 3, Gráfica VI).

A lo largo de la experiencia no se observan variaciones significativas en el nitrógeno muscular en los lotes 1 y 2. Si comparamos los lotes 2 y 3 con el control se encuentra un aumento mayor en el lote con déficit energético. Este aumento en la concentración de nitrógeno muscular se debe a una pérdida de ácidos grasos, glucógeno y agua causados por la malnutrición.

El contenido proteico soluble muscular aumenta en el lote control y disminuye en los lotes carentes, siendo en el lote 2 de -6.3% los días 8 y 14 con respecto al 4 y en el lote 3 de -7.8% el día 8 con respecto al 4. No se observan variaciones de los lotes carentes con respecto al control el día 4, pero sí el día 8 siendo de -62,9 para ambos, y del mismo nivel para el lote 2 el día 14. GOENA y col. (1988) también observan una disminución de la proteína muscular en ratas alimentadas con dietas pobres en aminoácidos azufrados. Al carecer de metionina, aminoácido iniciador de la síntesis proteica, se produce un estado de deficiencia proteica, ya que el resto de los aminoácidos dietarios no pueden seguir esta vía.

Observamos que la administración de la dieta con $\frac{1}{2}$ de energía el animal reserva la proteína soluble en músculo, haciendo que la pérdida no sea mayor que en el lote sometido sólo a carencia de metionina + cisteína. Esto muestra de nuevo la adaptación del metabolismo proteico en animales alimentados con dietas carentes (YOUNG y MARCHINI, 1990).

5.9. % DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR, NITRÓGENO DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR, PROTEÍNA MIOFIBRILAR POR Kg DE PESO, N MIOFIBRILAR/N TOTAL (Tabla 4, Gráficas VI y VII).

En este estudio se observa que tanto el porcentaje de la proteína miofibrilar respecto a la masa muscular, como el nitrógeno de la proteína miofibrilar por gramo de músculo no presentan variaciones significativas en los tres lotes estudiados a lo largo de la experiencia, así como tampoco al comparar los lotes carentes con el control en los distintos días. Por el contrario, la proteína miofibrilar expresada en mg de nitrógeno por kilogramo de peso corporal disminuye en el lote 2 los días 8 y 14 en un -19% y -51.1% frente al control, respectivamente (GRÁFICA VII).

Estos datos concuerdan con los obtenidos por YOUNG y col. (1971), aunque la falta de metionina y cisteína en la dieta provoca una disminución de la proteína miofibrilar/Kg de peso corporal (-19.8% respecto al control el día 8 y -51.1% el día 14). Esta disminución en la proteína miofibrilar/Kg de peso es debida, posiblemente, a una inhibición de la síntesis más que a un aumento del catabolismo, ya que si se observa los valores de 3-metil-histidina en orina (TABLA 5) se comprueba una disminución que refleja el menor catabolismo en ese lote durante los días señalados. Esta disminución de la síntesis se refleja por un menor contenido de RNA muscular (TABLA 11) a pesar de la inhibición de la actividad RNAsa.

La variación del peso corporal es mayor en relación con el contenido de la proteína miofibrilar, por ello la fracción disminuye en el lote 2. Este descenso se debe a que el peso del cerebro y de algunos órganos vitales no sufren variaciones tan importantes como ocurre con la proteína miofibrilar del músculo.

La invariabilidad obtenida en la relación N miofibrilar/ N muscular (GRÁFICA VI) está de acuerdo con los estudios de YAMAGUCHI y KANDATSU (1967), que refieren pérdidas semejantes de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares en ratas con deficiencia proteica. MILLWARD y col. (1974) no encuentran, en ningún tipo de deficiencia dietaria, alteración en las cantidades relativas de las dos fracciones. Es decir, la fracción N miofibrilar/N muscular no se altera al variar los dos parámetros de forma paralela en cada uno de los lotes.

5.10. 3-METIL-HISTIDINA EN MÚSCULO Y EN ORINA (Tabla 5, Gráfica VIII).

La 3-metil-histidina es un aminoácido constituyente de las proteínas contráctiles mayoritarias del músculo, la actina y la miosina (ASATOOR y AMSTRONG, 1967; JOHNSON y col., 1967), y se forma por modificación posterior a la síntesis de las cadenas polipeptídicas. La 3-metil-histidina liberada por el catabolismo de los tejidos proteicos no se recicla en una nueva síntesis proteica, sino que se excreta sin cambios por el riñón.

La mayor parte del contenido total del organismo en 3-metil-histidina está en el músculo esquelético (ELIA y col., 1979). Por tanto, si no hay una variación en el turnover de la proteína miofibrilar en el organismo, tampoco habrá cambios en el contenido de 3-metil-histidina, como se comprueba en este experimento, que concuerda con los estudios de RIKIMARU y col. (1980).

La medida de la excreción renal de 3-metil-histidina refleja el turnover de la proteína del tejido muscular esquelético. Algunos autores no están de acuerdo, pero las razones que proponen no son suficientes para invalidar el método (FUNABIKI y col., 1976; YOUNG y MUNRO, 1978; BILMAZES y col., 1978; RIKIMARU y col., 1980; HARRIS y MILNE, 1981a; LONG y col., 1988; HOFFER, 1990).

En este trabajo se observa disminución de la 3-metil-histidina excretada por orina en los lotes 2 y 3 con respecto al control de -73% y -84% el día 8 respectivamente, y -67,72% el lote 2 el día 14.

Estos resultados concuerdan con los de YOUNG y col. (1972), obtenidos en individuos en ayuno, con una disminución progresiva en la excrección renal de la 3-metil-histidina, sugiriendo que, de acuerdo con otros estudios, hay una adaptación progresiva durante el ayuno para reducir el catabolismo de las proteínas musculares (YOUNG y col., 1972). También con los de HAVERBERG y col. (1975a, 1975b), que estudian ratas en período de crecimiento con una dieta adecuada en proteínas, encontrando un aumento progresivo en la excrección renal de 3-metil-histidina al mismo tiempo que una ganancia de peso corporal que corresponde a un aumento en el contenido proteico muscular. En estudios con ratas carentes de proteína en la dieta, observan una disminución de la excrección renal de 3-metil-histidina, junto con la pérdida de masa muscular.

YOUNG y MUNRO (1978) muestran que la restricción combinada de energía y proteína producen una disminución en el tiempo de la excrección renal de 3-metil-histidina, que se recupera con la realimentación.

En nuestro caso los datos obtenidos tanto de la 3-metil-histidina urinaria como de la masa muscular concuerdan con los trabajos anteriormente citados.

5.11. SÍNTESIS, CATABOLISMO, TASA FRACCIONAL DE SÍNTESIS, TASA FRACCIONAL CATABÓLICA Y VIDA MEDIA DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR (Tabla 6, Gráfica IX).

Las observaciones de WATERLOW y col. (1978c) muestran que el turnover proteico muscular en ayuno presenta tres etapas. La primera es una respuesta inmediata a la restricción de proteína y de energía de la dieta y persiste varios días. Manifiesta una reducción en la tasa fraccional de síntesis sin variación en la tasa catabólica. En esta etapa se suprime el crecimiento en la rata joven. La segunda se presenta si el periodo de restricción es mayor; en ella se produce una disminución mayor de la tasa fraccional de síntesis y una pequeña disminución de la catabólica con respecto a los controles, acompañada por la disminución en la excrección renal de 3-metil-histidina. La tercera etapa aparece por carencia combinada de proteína y energía; en ella aumenta la tasa fraccional catabólica y la de síntesis permanece baja. (HAVERBERG y col., 1975a y 1975b). En la etapa segunda se observa una

adaptación, mientras que en la tercera se produce un fracaso a la misma, ya que en este caso las proteínas musculares se utilizan para obtener energía.

La tasa catabólica en este trabajo se hace menor en los lotes 2 y 3 con respecto al control, pero es de mayor cuantía que la de síntesis en el lote 2. Estos resultados concuerdan con los de GARLICK y col. (1975) y con los de MILLWARD y col. (1975).

Los resultados muestran que la tasa catabólica no se suprime totalmente en restricción proteica (MILLWARD y col., 1975; HAVERBERG y col., 1975a y 1975b; GARLICK y col., 1975; FUNABIKI y col., 1976), ya que para evitar la pérdida proteica sería necesario suprimir el catabolismo. Sin embargo, el mantener cierto grado de tasa catabólica puede ser positivo para la homeostasis de los aminoácidos, ya que el catabolismo de la proteína muscular puede contribuir al mantenimiento de los aminoácidos plasmáticos, concretamente metionina y cisteína, y de la glucosa en circulación (DANIEL y col., 1977). DANIEL y col. (1977) observan que en niños con deficiencia proteica el nivel de proteasas es generalmente el mismo que en niños normales. Cuando estos niños contraen una enfermedad infecciosa aumenta la inhibición de la proteasa, con lo que disminuye la tasa catabólica de proteínas. Esto reduce el aporte de aminoácidos y de energía para mantener la homeostasis y aparecen síntomas de malnutrición, como sucede en el kwashiorkor y el marasmo.

De acuerdo con lo anterior, el hecho de que la tasa catabólica no desaparezca en condiciones de malnutrición parece favorecer la homeostasis durante la restricción proteico-calórica.

RIKIMARU y col. (1980) encuentran que la tasa de síntesis de la proteína miofibrilar aumenta con la mayor ingesta proteica, al igual que sucede en este trabajo (TABLA 6). Esto concuerda también con los datos de YOUNG y col. (1971), MILLWARD y col. (1975) y WATERLOW y col. (1978b).

Algunos autores indican que el aumento en la tasa de síntesis se debe a la mayor actividad ribosomal o al aumento en la concentración de RNA (DECKEN y OMSTED, 1970).

GARLICK y col. (1978) sugieren que la reutilización de aminoácidos aumenta en condiciones de restricción proteica, lo que es favorable para evitar pérdidas de nitrógeno.

Como compendio de lo anterior, la síntesis proteica disminuye con dietas carentes en proteína más que el catabolismo, lo que refleja una adaptación del metabolismo proteico muscular para mantener el contenido proteico muscular y asegurar la supervivencia, según GARLICK y col. (1975), HAVERBERG y col. (1975a y 1975b), YOUNG y MUNRO (1978) y YOUNG y MARCHINI (1990).

La vida media es el tiempo necesario para reemplazar o transferir la mitad de las moléculas originalmente presentes, independientemente de la cantidad inicial. La vida media de la proteína miofibrilar aumenta en ambos lotes carentes con respecto al control, siendo el día 8 para el lote 2 de +602,76% y para el lote 3 de +189%, y el día 14 para el lote 2 de +373%. Estos valores reflejan que el turnover de la proteína miofibrilar es más lento en los lotes carentes.

5.12. GANANCIA DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR Y TASA FRACCIONAL DE GANANCIA DE DICHA PROTEÍNA/Kg DE PESO (Tabla 7, GRÁFICA IX).

La ganancia de la proteína miofibrilar entre los días 8 y 14 se indica en la TABLA 7. En ella se observa una disminución de la misma en el lote 2 con respecto al control de tal modo que se hace negativa. Así mismo, disminuye la tasa fraccional de ganancia (% de ganancia con respecto a la proteína miofibrilar por kilogramo de ratu del primer día), que también es negativa en el lote 2. Cuanto mayor es la restricción dietaria, menor es la ganancia miofibrilar, lo que concuerda con las observaciones de RIKIMARU y col. (1980).

La ganancia de la proteína tisular es el resultado de diferencia entre la síntesis y el catabolismo. En este estudio las ratas pierden proteína miofibrilar cuando la dieta es carente en metionina + cisteína, debido a que la tasa catabólica es mayor que la de síntesis (TABLA 6, GRÁFICA IX). Sin embargo, la diferencia entre la tasa catabólica del lote 2 respecto del control, aunque es elevada, no llega a ser tanto como para ser responsable de la disminución tan importante de la ganancia, por lo que ésta debe depender más de los cambios en la síntesis. Es decir, la tasa de síntesis se altera más que la catabólica en deficiencias dietarias (YOUNG y col., 1971, MILLWARD y col., 1975; HAVERBERG y col., 1975a y 1975b; GARLICK y col., 1975; FUNABIKI y col., 1976).

5.13. GLUCOSA E INSULINA EN PLASMA (Tabla 8, Gráfica X).

Tanto la glucosa como la insulina disminuyen en sangre en una malnutrición o en ayuno (PUGLIESE, 1990).

En este experimento se observa que la homeostasis de la glucosa no varía a lo largo de la experiencia en el lote control y en el lote carente de metionina y cisteína. En cambio, en el carente de energía (lote 3) se observa una reducción de -37,47% el día 8 respecto al día 4.

En el lote 2 el mantenimiento de los niveles de glucosa sanguínea se debe a la glucogenólisis de las reservas del glucógeno hepático y muscular y a la movilización de los aminoácidos de cadena ramificada en el músculo esquelético, además de un mayor contenido de hidratos de carbono y grasas en la dieta en este lote.

En el lote carente de energía, el mantenimiento de los niveles de glucosa se debe a la formación de alanina a partir del piruvato y de los aminoácidos gluconeogénicos de la dieta y los liberados por el músculo, que constituye el aminoácido precursor de la gluconeogénesis en el hígado (FELIG y col., 1970). La falta de recuperación en este lote hace que la viabilidad de los animales sea escasa. A este respecto PUGLIESE (1990) señala un estado terminal de malnutrición cuando la hipoglucemia es severa.

Estos datos concuerdan con los de BUSE y col. (1973), que en estudios con ratas en ayuno y ratas diabéticas ven que la liberación de aminoácidos de cadena ramificada se ve potenciada.

En cuanto a la insulina se observa en ambos lotes carentes una disminución significativa a partir del 8 día, siendo esta disminución más acusada en el lote 3. En este sentido MAK y col. (1986) indican que el incremento paralelo de la uremia que se produce por malnutrición proteica aumenta la resistencia a insulina, pero al disminuir los niveles de insulina la sensibilidad del músculo a esta hormona se hace mayor, por lo que el descenso de glucosa que se produce en el lote 3 podría estar de acuerdo con este autor, ya que no es tan drástico como se esperaría, pues predomina la resistencia a la insulina sobre la sensibilidad de los tejidos a esta hormona.

Así, dietas bajas en proteínas producen una menor tolerancia a la glucosa (HEARD, 1986).

La insulina favorece la entrada de aminoácidos en las células, la síntesis proteica, la tasa de RNA y DNA en músculo, aún en ausencia de glucosa; disminuye la gluconeogénesis hepática, aminora los requerimientos hepáticos de aminoácidos y la liberación de aminoácidos por el músculo. Con una falta de insulina decrece la formación de polisomas, y los ribosomas traducen peor los RNAm con deterioro de la síntesis proteica (FLAKOLL y col., 1989).

La disminución de insulina que se produce en nuestro caso, junto con la falta de metionina y cisteína impide que la síntesis proteica se lleve a cabo. Esto conlleva a una disminución de la proteólisis (TABLA 6), lo que producirá un estado de adaptación en estas condiciones experimentales. Estos resultados concuerdan con los de PAYNE-ROBINSON y col. (1990).

5.14. UREA Y NITRÓGENO UREICO EN PLASMA (Tabla 8, Gráfica XI).

El ciclo de la urea es el mecanismo por el cual se eliminan los grupos amonio procedentes del catabolismo de los aminoácidos (KANG y col., 1987).

El proceso se lleva a cabo principalmente en el hígado, interviniendo la mitocondria como soporte de los distintos enzimas del ciclo de la urea, relacionados con otros citoplasmáticos. Así, una alteración en la ingesta proteica queda reflejada en la producción de urea (HARPER y col., 1970), existiendo una relación directa entre la ingesta proteica e inversa con la menor calidad de la proteína en la rata (PELIPO y col., 1991).

Estudiando en nuestro caso el nitrógeno ureico en plasma se observa en ambos lotes carentes un aumento muy significativo con respecto al control, lo que supone un aprovechamiento mejor de los aminoácidos con la dieta control.

Al ser la metionina el aminoácido iniciador de la síntesis proteica, su carencia dietaria hace que los aminoácidos, en lugar de seguir la vía sintética se oxiden a través de ciclo de la urea. Esto está de acuerdo con los valores de nitrógeno ureico encontrados por Jackson (JACKSON y col., 1990) como consecuencia de la administración de dietas carentes de aminoácidos esenciales, así como en dietas libres de proteína.

5.15. VARIACIONES EN EL DNA, RELACIÓN PROTEÍNAS/DNA, NÚMERO DE NÚCLEOS, TAMAÑO CELULAR Y ACTIVIDAD DNAsa ÁCIDA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO (Tablas 9 y 10, Gráficas XII y XIII).

En el músculo de animales en crecimiento se observa un aumento en el contenido de DNA. La malnutrición disminuye la cantidad de ácidos nucleicos (SINGH y col., 1990)

En los lotes 2 y 3 se observa el día 4 un aumento en la cantidad de DNA por órgano (GRÁFICA XII). Esto puede ser debido a la disminución del contenido proteico del músculo, como se puede observar por la relación proteína/DNA (GRÁFICA XIII). Esta relación disminuye en los lotes 2 y 3 respecto del control todos los días del proceso experimental. MILLWARD y col (1974) encuentran también reducción del índice proteína/DNA en el músculo de ratas sometidas a malnutrición proteica. Estos valores se correlacionan con el aumento del número de núcleos y la disminución del tamaño celular, datos señalados por SINGH y col. (1990).

El contenido de DNA en el núcleo de las células diploides es constante, por lo que la valoración de la concentración de DNA aporta una medida del número de núcleos y, por tanto, del número de células de un tejido. El cálculo del número de núcleos y tamaño celular se consideran valores medios en el tejido, ya que en un mismo tejido aparece diferentes tipos de células.

En el músculo, según ENESCO y PUDDY (1964), el número de fibras musculares individuales no aumenta en el período postnatal, sin embargo el número de núcleos sí aumenta dentro de la fibra, así como el tamaño de ésta, con la edad.

El aumento del número de núcleos indica una hiperplasia de la célula muscular (GORDON y col., 1966). En nuestro estudio disminuye el tamaño celular en ambos lotes carentes a lo largo de la experiencia respecto al control, reflejando una atrofia del músculo. Paradójicamente, el mayor número de núcleos que se detecta al final de la experiencia es debido tanto a la disminución en el contenido del RNA (GRÁFICA XIV) como en el contenido proteico (GRÁFICA VI).

Comparando los tres lotes entre sí, se observa una disminución de la actividad de la enzima DNAsa ácida por órgano, mg de proteína y con respecto al DNA, del mismo nivel en ambos lotes carentes. Esto puede ser debido a un mecanismo de

adaptación desarrollado para conservar el contenido de DNA (GRÁFICA XII).

5.16. VARIACIONES EN EL RNA (mg/ÓRGANO), RNA/DNA, RNA/PROTEÍNA Y ACTIVIDAD RNAsa ÁCIDA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO (Tablas 11 y 12 , Gráficas XIV y XV).

El contenido en RNA es proporcional al volumen de la célula (NAKAHARA y col., 1990; SINGH y col., 1990) y depende del DNA disponible para su síntesis (SINGH y col., 1990).

El RNA en músculo gastrocnemio aumenta en el lote control a lo largo de la experiencia y disminuye en ambos lotes carentes a partir del día 8 (GRÁFICA XIV). Estos datos coinciden con los de GOENA y col. (1988), que indican una disminución en la concentración de RNA muscular en ratas alimentadas con dietas pobres en aminoácidos azufrados.

OMSTED y VON DER DECKEN (1974) indican que la administración de dietas carentes en metionina y triptófano disminuye la cantidad de ribosomas activos, lo que coincide con la disminución de la síntesis proteica.

JEPSON y col. (1988) indican la relación directa existente entre la proteína de la dieta y la concentración de RNA en el músculo.

La relación RNA/DNA refleja el contenido de RNA por célula. En esta experiencia se observa una disminución en dicha fracción en los lotes 2 y 3 comparados con el control en cada uno de los días estudiados sin mostrar diferencias entre ellos (GRÁFICA XV). Este descenso del RNA implica una disminución de la síntesis proteica, como se ha discutido anteriormente.

Estos datos coinciden con los observados por MILLWARD y col. (1974), que indican cambios paralelos a los de la insulina plasmática, cuya disminución reduce la síntesis proteica en músculo.

La actividad RNAsa ácida aumenta en el lote control y disminuye en el lote 2 a lo largo de la experiencia, siendo por órgano en el lote 2 de un -88% los días 8 y 14 con respecto al 4 (GRÁFICA XIV).

El lote 2 presenta valores considerablemente menores que los controles, que llega a ser de -35,7%, -96,8% y -97,56% los días 4, 8 y 14, respectivamente. Por el contrario, el lote carente de aminoácidos azufrados y con $\frac{1}{2}$ de energía mantiene el día 8 los mismos valores que el 4, siendo muy superiores a los del lote 2, aunque menores que los controles (GRÁFICA XIV). Lo mismo sucede con la actividad RNAsa por mg de proteína, por RNA y por DNA (TABLA 12). Este último lote muestra así una degradación superior del RNA, uno de los factores decisivos para impedir la supervivencia de estos animales.

En músculo la capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) (TABLA 11) disminuye al mismo nivel en ambos lotes carentes a partir del día 8. El lote 3, a pesar del bajo contenido energético de la dieta, tiene una capacidad de síntesis proteica superior al lote 2 el día 8, lo cual confirma la idea de que el efecto de la deficiencia energética influye menos en la capacidad de síntesis proteica que la carencia proteica (GRÁFICA XV).

5.17. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LAS HIDROLASAS: FOSFATASA ÁCIDA, FOSFATASA ALCALINA Y B-GLUCURONIDASA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO (Tablas 13 y 14, Gráfica XVI).

La dieta carente en metionina + cisteína produce cambios en la actividad de las hidrolasas estudiadas, tanto por órgano como por mg de proteína, así como dietas carentes en otros aminoácidos azufrados (TEMLER y col., 1983).

La fosfatasa ácida por órgano disminuye su actividad con respecto al control en los lotes carentes a partir del día 8. Esta disminución se debe a la reducción de la síntesis proteica, reflejando la involución del órgano.

Lo mismo se observa al expresar la actividad de esta enzima por mg de proteína el último día de la experiencia.

La fosfatasa alcalina disminuye en el lote 2 a lo largo de la experiencia, tanto por órgano como por mg de proteína.

Con respecto al control, el lote 2 presenta valores superiores todos los días del estudio tanto por órgano como por mg de proteína, mientras que el lote 3 no varía por órgano y aumenta por mg de proteína. Este aumento en la actividad está relacionado con el retraso en el crecimiento, coincidiendo con los estudios de

LUNDGREEN (1977) en ratas sometidas a dietas inadecuadas.

La β -glucuronidasa es una de las enzimas más activas en la degradación tisular (DE DUVE y col., 1955).

La actividad β -glucuronidasa en el lote 2 presenta un valor superior todos los días del experimento, tanto por órgano como por miligramo de proteína, mientras en el lote 3 dicha actividad es inferior a los otros lotes. Ello es debido a que la involución del músculo es evidente por la carencia de metionina y cisteína, iniciador el primero de la síntesis proteica. En el lote deficitario en energía, paradójicamente, la actividad es inferior al lote 2, como consecuencia del efecto de la relación proteína/energía, ya discutida anteriormente, comprobando de nuevo que la carencia proteico-energética tiene menor efecto en la involución tisular que la carencia proteica dietaria (YOUNG y MARCHINI, 1990).

El aumento en la actividad hidrolásica se relaciona con acciones degradativas, observado por MARCOS (1982) en ratas con malnutrición proteico-calórica. Esta autora indica que la malnutrición proteica tiene una acción más importante que la malnutrición proteico-calórica, lo que coincide con nuestros resultados.

5.18. EFECTO SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS TRANSAMINASAS: GPT Y GOT (Tabla 15, Gráfica XVII).

Los valores de las actividades de las transaminasas GPT y GOT muestran variaciones producidas por la dieta administrada, tanto por órgano como por mg de proteína.

Así, la actividad GPT disminuye por órgano en los dos lotes carentes a lo largo de la experiencia, mientras que en el control no varía. También se observa disminución en los lotes 2 y 3 el último día del proceso experimental (día 14 y 8 respectivamente) con respecto al control. Así mismo disminuyen ambos lotes carentes al expresar la actividad enzimática por mg de proteína (- 47% el lote 2 y -67% el lote 3 los días 14 y 8 respectivamente). Este descenso coincide con la disminución de glutamato y alanina en músculo, como posteriormente señalaremos, que son los sustratos de la enzima. Así mismo coincide con el menor contenido en proteínas solubles, entre las que se hallan estas enzimas.

La actividad GOT también disminuye por órgano y por mg de proteína cuando comparamos los lotes carentes con el control. En el lote 2 el día 8 aumenta la actividad enzimática, para volver a disminuir el día 14, tanto por órgano como por mg de proteína. El lote 3 presenta menor actividad de esta enzima frente al lote control y al lote 2. La invariabilidad en músculo gastrocnemio de los aminoácidos de cadena ramificada, el aumento de serina, glicina y treonina y el descenso de alanina y glutamato justifican la disminución de dicha actividad.

Teniendo en cuenta que las transaminaciones son esenciales en los procesos oxidativos de los aminoácidos, estos datos indican un mecanismo adaptativo para conservar los aminoácidos de cadena ramificada.

Diversos autores encuentran aumento (SKETCHER y JAMES, 1974), descenso (McFARLANE y VON HOLT, 1969) e invariabilidad (SKETCHER y col., 1974) en la actividad transaminásica bajo diferentes condiciones dietarias.

5.19. EFECTO DE LA CARENCIA DE METIONINA + CISTEINA Y METIONINA + CISTEINA CON ½ DE ENERGÍA SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN PLASMA, GLÓBULOS ROJOS Y MÚSCULO GASTROCNEMIO.

Los factores que pueden afectar la concentración de aminoácidos libres en los distintos compartimentos son el aporte procedente de la dieta, el turnover proteico (WATERLOW y col., 1978a), la biosíntesis, transaminación, transporte a través de las membranas celulares y la oxidación.

Existe una relación entre las concentraciones de aminoácidos de la sangre y de los tejidos (PASCAUD y NG, 1990).

El contenido proteico de la dieta y la composición relativa de la misma en aminoácidos esenciales y no esenciales provoca respuestas fisiológicas diferentes, de manera que la variación selectiva de los aminoácidos repercute en la concentración de aminoácidos libres en diferentes tejidos y en el comportamiento frente a la alimentación.

En el plasma, la concentración de aminoácidos es afectada por factores hormonales, actividad de los transportadores transmembrana, concentración de aminoácidos en el pool intracelular, y por el aclaramiento plasmático (éste se realiza fundamentalmente en hígado, excepto para los aminoácidos de cadena ramificada, que tiene lugar principalmente en el músculo).

Los glóbulos rojos están implicados en el transporte de aminoácidos, aunque existen controversias acerca de la contribución de los mismos al metabolismo tisular de los aminoácidos (ELWIN y col., 1972). Se acepta que el plasma y los glóbulos rojos tienen papeles independientes y a menudo opuestos respecto al transporte de aminoácidos entre órganos, existiendo un intercambio muy lento entre los aminoácidos de plasma y glóbulos rojos y rápido entre cada uno de ellos con los tejidos.

5.19.1. Aminoácidos de cadena ramificada (AAR) (Tablas 16, 17 y 19, Gráfica XVIII).

Los aminoácidos de cadena ramificada se metabolizan principalmente en el músculo, entre un 30 y un 70%. Su concentración en plasma, glóbulos rojos y tejidos dependen de cambios nutricionales (DARMAUN y col., 1989)

La dieta carente en metionina + cisteína y ésta con $\frac{1}{2}$ de energía provoca un descenso en plasma de los aminoácidos de cadena ramificada, tanto considerados individualmente como su suma, los días 4 y 14. El descenso observado se debe a un menor contenido proteico en las dietas (SOEMITRO y col., 1989).

Los tres aminoácidos isoleucina, leucina y valina y su suma en plasma presentan una evolución semejante durante el proceso experimental en los tres lotes. Ambos lotes carentes tienen valores inferiores los días 4 y 14 con respecto al día 8 y frente a los controles. La reducción de estos aminoácidos en plasma está relacionada con la disminución de la ingesta (YOUNG y HILL, 1981).

El día 8 las dietas carentes no producen modificaciones en la concentración de los aminoácidos de cadena ramificada con respecto al control, a excepción de un descenso significativo de la isoleucina en el lote 3. Estas variaciones cuantitativas pueden relacionarse con el nivel de insulina plasmática, que disminuye el día 8 en ambos lotes carentes. Esta hormona favorece la entrada de los aminoácidos de cadena ramificada en el músculo, por ser estos aminoácidos muy sensibles a las variaciones de insulina (FUKAGAWA y col., 1985).

Los valores de insulina más altos los días 4 y 14 (GRÁFICA X) se relacionan con niveles más bajos de aminoácidos de cadena ramificada en plasma.

En el grupo 3, con una ingesta energética del 50%, el mantenimiento de la glucemia se debe al aumento de glucagón y corticosterona, que favorece la gluconeogénesis en el hígado (BEYLOT, 1989). Además, la hipoinsulinemia del día 8 favorece la proteólisis y disminuye la síntesis proteica (TABLA 6).

Implicadas en este catabolismo se encuentran las hormonas glucocorticoides, que activan los enzimas relacionados con la proteólisis miofibrilar (MAYER y col., 1976), además de inducir una marcada hiperglucemia e hiperinsulinemia (LUNN y col., 1976). Ello se relaciona con el mantenimiento de la concentración de glucosa, del mismo nivel que el lote control (GRÁFICA X) y con el descenso significativo en la concentración de alanina plasmática, principal aminoácido gluconeogénico utilizado por el hígado.

En glóbulos rojos el contenido en aminoácidos de cadena ramificada aumenta a lo largo de la experiencia, considerados tanto individualmente como por la suma de los mismos en los tres lotes. Con respecto al lote control se observa una disminución en ambos lotes carentes para la valina el día 4. El lote 3 presenta valores superiores que el control y que el lote 2 para los tres aminoácidos el día 8, mientras que el lote 2 disminuye tanto la isoleucina como la valina el día 14. Estas variaciones se ven reflejadas en la suma de los AAR presentando el día 4 en ambos lotes carentes valores inferiores al control (-32,16%) que aumentan en el lote 3 el día 8 (97%) y disminuyen en el lote 2 el día 14 (-22,5%)

Con respecto al músculo gastrocnemio (TABLA 18), se observa en los lotes 2 y 3 un aumento en el día 4, tanto para los AAR por separado como para la suma de los mismos. Mientras que en lote 2 no se modifican en el resto de los días, en el lote 3 aumenta el día 8 la valina. Estos datos coinciden con los valores reducidos en plasma del lote 3, que necesita movilizar dichos aminoácidos con fines energéticos.

La restricción dietaria aumenta la capacidad del músculo para oxidar leucina, isoleucina y valina, sin grandes cambios en la oxidación de otros aminoácidos y no tiene efecto significativo en la actividad transaminasa del músculo, pero estimula la α -cetoácido-deshidrogenasa en el hígado. Este cambio parece ser responsable de la mayor velocidad degradativa de la leucina en el músculo de ratas en ayuno (GOLDBERG y CHANG, 1978). La finalidad de estas variaciones es llevar los AAR hacia otros destinos metabólicos ante la imposibilidad de sintetizar proteínas por

carecer de metionina, el aminoácido iniciador de la proteosíntesis. El esqueleto carbonado de la valina se utilizará como precursor gluconeogénico por medio del succinil-CoA, los catabolitos de la leucina (acetoacetato y acetil-CoA) se desviarán hacia la producción de grasa y la isoleucina compartirá ambos destinos (TANAKA y col., 1988).

5.19.2. Aminoácidos gluconeogénicos en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 19-1, 19-2, 20-1, 20-2, 21-1,).

FELIG y col. (1970) observan que los aminoácidos liberados del músculo en el estado postabsortivo o durante el ayuno no representan el hidrolizado de la proteína muscular, ya que la alanina y la glutamina se liberan en cantidades mucho mayores que las que se esperarían a partir del catabolismo de las proteínas musculares. Estos dos aminoácidos se sintetizan de novo en el músculo a partir de los grupos amino generados por la degradación de los aminoácidos. En estas situaciones el músculo libera leucina, isoleucina, valina y ácido aspártico en menores cantidades que las que se esperarían de su presencia en la proteína tisular, lo que refleja una rápida degradación de estos aminoácidos en el músculo (GOLDBERG y CHANG, 1978). Estos procesos tienen importancia en el mantenimiento de la homeostasis de los aminoácidos y de la glucemia.

A continuación se revisan las modificaciones que provoca la dieta carente en met+cis y ésta con $\frac{1}{2}$ de energía en la concentración de aminoácidos gluconeogénicos (ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, serina, glutamina, glicina, treonina y alanina) en diferentes compartimentos.

5.19.2.1. Ácido aspártico y asparragina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 19-1, 20-1, 21-1; Gráficas XIX y XX).

El ácido aspártico en plasma (TABLA 19-1) es poco afectado por la dieta carente en metionina y cisteína, observándose sólo una reducción en el lote carente en met+cis con $\frac{1}{2}$ de energía el día 8 con respecto al control (GRÁFICA XIX), de acuerdo con los datos obtenidos por SEMON y col. (1989) en ratas sometidas a dietas con diferente contenido en caseína.

En glóbulos rojos (TABLA 20-1) se aprecian diferencias en ambos lotes carentes. El lote 2 muestra valores superiores de ácido aspártico el día 4 (28%), disminuyendo posteriormente para alcanzar el último día un descenso del orden del -61% con respecto al control. Aunque el lote 3 el día 4 presenta valores inferiores

al control y al lote 2, sufre un aumento de ácido aspártico el día 8, superando al control en un 30,8% (GRÁFICA XIX).

La concentración de ácido aspártico en músculo (TABLA 21-1) no sufre variaciones significativas, tanto a lo largo del tiempo como al comparar los lotes entre sí (GRÁFICA XIX).

El ácido aspártico en el músculo se convierte en glutamina por el ciclo tricarbóxico (GOLDBERG y CHANG, 1978; CHANG y GOLDBERG, 1978), por lo que se libera a plasma en menor cantidad de la que se debería esperar. Además, KADOWAKI y col. (1984) indican que el hígado y el músculo metabolizan el ácido aspártico, disminuyendo su contenido en plasma y así se evita la neurotoxicidad de este aminoácido.

La asparragina plasmática disminuye a lo largo de la experiencia en el lote control y en el 2, mientras que en el 3 se mantiene. Los valores del lote 2 son significativamente menores a los del control, todos los días de la experiencia, y aún lo son más los del lote 3 el día 4 (-60% respecto al control y -31,7% respecto al lote 2) (GRÁFICA XX).

En glóbulos rojos la asparragina disminuye en los lotes 2 y 3 el día 4 con respecto al control (-46% y -59% respectivamente), observándose un aumento en el lote 3 el día 8 de 225,5% con respecto al día 4, que hace que supere a los otros lotes (56% y 98% con respecto al control y al lote 2 respectivamente). ADIBI y col. (1973) observan un descenso de asparragina en el plasma y músculo de ratas alimentadas sin proteína (GRÁFICA XX).

La asparragina es otro de los aminoácidos que posteriormente a la proteólisis entran en el ciclo tricarbóxico en el músculo (GOLDBERG y CHANG, 1978; CHANG y GOLDBERG, 1978).

En el músculo la asparragina disminuye en los lotes 2 y 3 el día 8 (-26,47% y -55,77% con respecto al control, respectivamente). Ese día los valores de asparragina son del mismo nivel en ambos lotes carentes (-33,33%), observándose una recuperación en el lote 2 el último día (GRÁFICA XX).

5.19.2.2. Ácido glutámico y glutamina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 19-1, 20-1, 21-1; Gráficas XXI y XXII).

Los aminoácidos generados por el catabolismo proteico en ayuno pueden tener diferentes destinos en el músculo (GOLDBERG y CHANG, 1978).

El ácido glutámico puede ser metabolizado en el músculo para aportar esqueletos carbonados para la síntesis de glutamina y alanina (CHANG y GOLDBERG, 1978).

El ácido glutámico en plasma (TABLA 19-1) aumenta progresivamente a lo largo del periodo experimental en los tres lotes estudiados. El lote 2 presenta un aumento de 218,2% respecto al control el día 14, mientras que el lote 3 muestra valores más bajos todos los días del proceso experimental con respecto a los otros dos lotes (GRÁFICA XXI).

En glóbulos rojos (TABLA 20-1) el ácido glutámico se comporta de modo similar, aumentando a lo largo de la experiencia en los tres lotes, con variaciones del 67% y 98% para el lote 2 con respecto al control los días 8 y 14 (GRÁFICA XXI).

Por el contrario, en el músculo (TABLA 21-1) disminuye a lo largo del tiempo en ambos lotes carentes, así como con respecto al control los días 8 (-62%) y 14 (-59%) (GRÁFICA XXI). Estos datos están de acuerdo con los observados por SOEMITRO y col. (1989) y con los de ADIBI y col. (1973), que encuentran valores más reducidos de ácido glutámico en músculo de ratas sometidas a dietas sin caseína y a dietas con restricción proteica, respectivamente.

El ácido glutámico puede ser metabolizado en músculo para aportar esqueletos carbonados para la síntesis de glutamina y alanina (CHANG y GOLDBERG, 1978). La evolución de los niveles de este aminoácido se podría relacionar con la modificación de la concentración de insulina plasmática ya que, según AOKI y col. (1972), la insulina ejerce un efecto positivo sobre la entrada de glutámico en el músculo de modo que, al disminuir los niveles de insulina en plasma (TABLA 8), favorece el flujo del aminoácido hacia el plasma y los glóbulos rojos. Los eritrocitos, mediante un mecanismo de transporte activo, movilizan los aminoácidos.

En el mismo sentido AOKI y col. (1972) proponen que la insulina sensibiliza de algún modo la membrana del eritrocito, de forma que cuando éstos atraviesan zonas musculares con una síntesis proteica activa en las que hay gran requerimiento

de aminoácidos, son incapaces de mantener el gradiente, liberando aminoácidos al plasma y al músculo. Es evidente el papel de los glóbulos rojos en el transporte de aminoácidos desde las regiones del organismo con mayor concentración hacia otras en que ésta es menor o existe mayor demanda.

La glutamina es uno de los aminoácidos más abundantes en el organismo, encontrándose en plasma en mayor proporción que otros aminoácidos. Constituye más del 50% del contenido aminoacídico intracelular (ELIA y col., 1988).

Se ha comprobado en numerosas especies animales que, en condiciones normales y de acidosis, el intestino delgado (BERGMAN y col., 1982) y los riñones (SOUBA, 1991) son los lugares esenciales para la utilización de glutamina, mientras que su producción, tanto en condiciones normales como patológicas, se realiza principalmente en el músculo esquelético (ELIA y col., 1988; SOUBA, 1991) a partir de ácido glutámico y amonio y con la intervención de la glutamina sintetasa.

La falta de metionina + cisteína en la dieta produce descensos de glutamina en plasma (TABLA 19-1) los días 8 y 14 de la experiencia en -25% y -43% con respecto al día 4. Al comparar los lotes carentes con el control se observa una disminución del mismo nivel en ambos, siendo del orden de -45% el día 4, -53% el día 8 y para el lote 2 de -64, 76% el día 14 (GRÁFICA XXII). Este descenso se debe al papel de la glutamina en la gluconeogénesis.

En glóbulos rojos (TABLA 20-1) la glutamina es superior en ambos lotes carentes con respecto al control el día 4. El día 8 disminuye este aminoácido en el lote 2, mientras que en el lote 3 no se modifica (GRÁFICA XXII).

La disminución de glutamina en plasma y en glóbulos rojos puede estar relacionada con la mayor captura de este aminoácido que tiene lugar en órganos como el intestino y el riñón en estados catabólicos. CERSOSIMO y col. (1986) relacionan este hecho con la producción de amonio en estos tejidos, que es captado por el músculo esquelético. Así es favorecida la síntesis de glutamina frente a la de alanina, por el aumento de cortisona. Esta situación constituye una adaptación frente al ayuno. Según SOUBA (1991), el metabolismo intestinal de glutamina proporciona precursores y productos finales nitrogenados para la gluconeogénesis y la síntesis de urea en el hígado.

La falta de metionina y cisteína en la dieta no produce modificaciones de glutamina en el músculo (TABLA 21-1), pero sí la restricción energética, que provoca un aumento de aproximadamente un 70% con respecto a los lotes control y 2 los días 4 y 8 respectivamente (GRÁFICA XXII), de acuerdo con SHOJI (1990).

Ya se ha indicado anteriormente que la glutamina se puede sintetizar en el músculo a expensas de otros aminoácidos (CHANG y GOLDBERG, 1978). La glutamina liberada del músculo tiene diferentes destinos: puede ser capturada por el riñón donde es precursor del amonio urinario, mientras que su esqueleto carbonado se utiliza para la gluconeogénesis o para la producción de energía (GOLDBERG y CHANG, 1978) mediante transaminación con el piruvato para formar alanina (ésta pasa al hígado y se utiliza para sintetizar glucosa).

5.19.2.3. Serina, glicina y treonina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 19-2, 20-2, 21-2; Gráficas XXIII, XXIV, XXV).

Los aminoácidos serina, glicina y treonina se encuentran entre los más sensibles a la falta de metionina y cisteína en la dieta, con aumentos significativos en los compartimientos estudiados.

5.19.2.3.1. Serina (GRÁFICA XXIII).

El lote 3 no presenta variaciones en la serina plasmática (TABLA 19-2) a lo largo del tiempo ni frente al control. No ocurre lo mismo con el lote 2, que presenta un aumento a lo largo de la experiencia, siendo el aumento del día 14 con respecto al 4 de 112,44%. Si el lote 2 se compara con el control, la serina aumenta en 45,84%, 268% y 579% los días 4, 8 y 14 respectivamente. SOEMITRO y col. (1989) observan, contrariamente a nuestros datos, que la serina en plasma es directamente proporcional al contenido proteico de la dieta en el rango de 0 a 20% de caseína, alcanzando posteriormente una meseta.

En glóbulos rojos (TABLA 20-2) en el lote 2 la serina presenta un aumento semejante al del plasma, mientras que en el lote 3 aumenta el día 8 con respecto al control en menor proporción que el lote 2.

El contenido en serina del músculo gastrocnemio, (TABLA 21-2), en el lote 2 aumenta desde el día 8, siendo el valor superior al control y al lote 3, ambos del mismo nivel. ADIBI y col. (1973) también señalan aumentos significativos en la serina plasmática de ratas sometidas a dietas sin proteína. SOEMITRO y col. (1989),

así mismo, indican niveles mayores de serina en el músculo de ratas al descender el contenido proteico de la dieta.

5.19.2.3.2. Glicina (GRÁFICA XXIV).

La glicina en plasma (TABLA 19-2) aunque disminuye a lo largo del tiempo en los lotes carentes, sus valores son superiores al control todos los días de la experiencia, si bien el lote 3 es inferior al 2. Estos datos están de acuerdo con los de ADIBI y col. (1973), que observan aumentos significativos en la concentración plasmática de este aminoácido en ratas privadas de proteína y con los de SOEMITRO y col. (1989), quienes señalan que este aminoácido responde de forma inversamente proporcional al contenido proteico de la dieta.

En glóbulos rojos la glicina (TABLA 20-2) aumenta los días 4, 8 y 14 en el lote 2 en 175,13%, 192,94% y 90,14% respectivamente. En el lote 3 este aumento es de 120,55% el día 8, aunque menor que en el lote 2 (-24,7%) con respecto al control. Según DARMAUN y col. (1989) solo una fracción de la glicina de los glóbulos rojos se puede intercambiar con el plasma. El glutatión, tripéptido rico en glicina que se halla en elevada concentración en los glóbulos rojos, tal vez sea la principal fuente de dicho aminoácido.

La glicina en músculo gastrocnemio es superior en ambos lotes carentes el día 4; el día 8 sigue siendo su concentración en el lote 2 superior al control para igualarse el día 14. Este proceso se relaciona con un mayor catabolismo y una reducción posterior del mismo por adaptación.

5.19.2.3.3. Treonina (GRÁFICA XXV).

La treonina es también afectada por la carencia de los aminoácidos azufrados en la dieta, así como por esta dieta con $\frac{1}{2}$ de energía.

En el plasma del lote 2 (TABLA 19-2) aumenta a lo largo de la experiencia en 72% y 132,6% los días 8 y 14 respecto al 4, siendo superior al control todos los días, mientras que en el lote 3 no se modifica.

La treonina en los glóbulos rojos y músculo presenta en el lote 2 un aumento semejante al del plasma.

Este aminoácido en glóbulos rojos del lote 3 tiene valores similares al control e inferiores al lote 2 el día 4. El día 8 aumenta significativamente con respecto al día 4 (99,8%) mostrando así valores superiores al control (169,1%), e inferiores al lote 2 ese mismo día (-44,44%).

El contenido en treonina en el músculo del lote 3 aumenta con respecto al control el día 4 y no se modifica el día 8.

WILDHALM y col. (1989) observan un aumento constante en los niveles de glicina, serina y treonina en plasma de individuos sometidos a restricción calórica y afirman que estas variaciones se deben a un aumento en la liberación periférica de estos aminoácidos en ayuno.

La acumulación de glicina, serina y treonina observada en plasma, glóbulos rojos y músculo de las ratas sometidas a ambas dietas carentes se puede deber al bloqueo de la ruta metabólica de la serina que produce cistationina por la acción de la enzima cistationina sintetasa.



La metionina y la cisteína son precursores de la homocisteína, por lo que la falta de aminoácidos azufrados impedirá la utilización de serina en esta reacción, favoreciendo su acumulación (LEHNINGER, 1972). Además, las ingestas bajas en metionina conservan este aminoácido por disminución de su tasa de oxidación, que se consigue por un reciclaje más eficaz de homocisteína, es decir, es menor la tasa de transmetilación a homocisteína y la transulfuración de ésta a cistationina que en la dieta adecuada (YOUNG y MARCHINI, 1990).

La serina es a su vez precursor de la glicina y está relacionada con la treonina. Por tanto, un aumento en los valores de serina justifica la elevación de la concentración de estos aminoácidos.

TANAKA y col. (1987) afirman que el esqueleto carbonado de la serina y de la glicina se utiliza más para la síntesis proteica que para producir energía. Como en este experimento disminuye la síntesis proteica por la falta de metionina, se favorece la acumulación de estos aminoácidos.

5.19.2.4. Alanina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 19-2, 20-2, 21-2; Gráfica XXVI).

La alanina es el principal aminoácido precursor de la gluconeogénesis en el hígado (FELIG y col., 1970). El músculo interviene de manera importante en la producción de alanina a partir de la transaminación de los aminoácidos al piruvato que proviene de la oxidación de la glucosa.

Incluso durante el ayuno el músculo capta glucosa para liberarla como alanina en plasma. Para ello la fuente de nitrógeno no sólo es el catabolismo proteico muscular, sino también la leucina captada por el músculo desde la sangre. Cuando aumenta la concentración sanguínea de leucina, aparece más alanina y glutamina, disminuyendo la oxidación de glucosa en el músculo, ya que se inhibe la oxidación del piruvato.

La alanina en plasma (TABLA 19-2) no varía respecto al control en el lote carente en metionina + cisteína, pero en el lote con deficiencia energética del 50% disminuye significativamente (-68% y -57% respecto al lote control y al 2 el día 4 respectivamente; y -20,67% y -67,24% el día 8). WILDHALM y col. (1989) señalan valores menores de alanina en plasma en restricción energética como un intento de ahorrar proteína, aunque PADRO y col. (1984) lo atribuyen al elevado porcentaje de la captura de dicho aminoácido por el hígado, ya que es un substrato esencial para la gluconeogénesis. SOEMITRO y col. (1989) afirman que la concentración de alanina en plasma es directamente proporcional al contenido proteico de la dieta en el rango de 0% a 20% de caseína, alcanzando después una meseta.

Ambos lotes muestran un comportamiento similar en glóbulos rojos (TABLA 20-2), con disminución respecto al control de -27% y -40,5% el día 4 para los lotes 2 y 3 respectivamente. Los glóbulos rojos son responsables de un 22-32% del intercambio de alanina entre la sangre y los diferentes tejidos (FELIG y col., 1973), desempeñando un papel fundamental en la captación de alanina por el hígado.

La administración de las dietas carentes en metionina y cisteína produce una disminución en la concentración de alanina en músculo (aproximadamente el -60% en ambos lotes carentes) (TABLA 21-2), coincidiendo con los valores normales de glucosa encontrados. Estos datos coinciden con los de FUKAGAWA y col. (1985). TAWA (1984) atribuyen este aumento a que la síntesis "de novo" del aminoácido está reducida en situaciones de deficiencia proteica, así como en estados de ayuno (CERSOSIMO y col., 1986), favoreciendo la síntesis de glutamina.

Esta alanina liberada en el plasma es llevada al hígado y utilizada en la gluconeogénesis.

5.19.3. Aminoácidos aromáticos (Tablas 22, 23, 24).

Las variaciones en la concentración de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano influyen en la síntesis de catecolaminas y/o serotonina (THURMOND y col., 1990; TACKMAN y col., 1990). El acceso al cerebro de estos aminoácidos también depende de las concentraciones de otros aminoácidos que compiten por el mismo transportador (OLDENDORF y SZABO, 1976).

Por lo tanto, es importante el aporte equilibrado de aminoácidos al cerebro, que depende de la concentración plasmática de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada. Estos varían con el contenido proteico de la dieta. (SOEMITRO y col., 1989).

5.19.3.1. Tirosina.

Este aminoácido sufre una disminución en el plasma de los lotes carentes frente al control (TABLA 22), siendo esta disminución más importante para el lote 3 el día 4. Este descenso concuerda con los datos obtenidos por ADIBI y col. (1973) al estudiar plasma de ratas alimentadas con dieta carente de proteína, como también con los resultados de PETERS y HARPER (1985), que encuentran una proporcionalidad entre las concentraciones de tirosina y el contenido proteico de la dieta en un margen del 5 al 20% de caseína.

En los glóbulos rojos (TABLA 23) se observa un aumento de tirosina en los lotes carentes a lo largo de la experiencia, del orden del 62,34% para el lote 2 los días 8 y 14 respecto al 4 y del 113,18% el día 8 para el lote 3.

Al comparar los lotes carentes con el control, se aprecia un descenso en la concentración de tirosina en los glóbulos rojos de los animales alimentados con la dieta 2, del -19% el día 4, mientras que en los días posteriores se igualan al control. En el lote 3, debido al gran aumento de tirosina el día 8, supera los valores de los otros lotes ese día en un 53%.

El efecto de la dieta carente en metionina + cisteína en el músculo gastrocnemio (TABLA 24) no modifica los valores de tirosina frente al control, mientras que en el lote con falta de energía (lote 3) aumenta.

La actividad de la tirosina aminotransferasa disminuye por malnutrición proteico-energética, por lo que la tirosina en músculo no se cataboliza (HOLTEN y KENNEY, 1967).

5.19.3.2. Triptófano.

El triptófano, aminoácido precursor de serotonina, no se ha valorado en el músculo gastrocnemio, pero sí en plasma (TABLA 22) y en glóbulos rojos (TABLA 23), debido a que en el proceso de extracción se altera fácilmente por oxidación.

En plasma los lotes carentes tienen valores inferiores al control todos los días de la experiencia y del mismo nivel.

En glóbulos rojos la concentración de triptófano (TABLA 23) disminuye a partir del día 4 en el lote 2 con respecto al control; el lote con $\frac{1}{2}$ de energía no se diferencia del lote 2 el día 4 y el día 8 supera a éste y se iguala al control.

5.19.3.3. Fenilalanina.

La fenilalanina, aminoácido que se oxida a tirosina en el hígado, presenta en el plasma de ambos lotes carencias del mismo nivel con respecto al control el día 4 (-35%), se igualan a los controles el día 8 y luego disminuye el día 14 el lote 2 (-29%). En este sentido PETERS y HARPER (1985) señalan que en ratas alimentadas con dietas con un contenido de caseína inferior al 35%, la fenilalanina plasmática disminuye proporcionalmente, lo que también ocurre con el triptófano.

La fenilalanina en glóbulos rojos (TABLA 23) no se modifica en el lote 2 a partir del día 8. En el lote 3 aumenta el último día de la experiencia (176,5%) con respecto al lote 2 y al control.

En el músculo (TABLA 24) sólo se observa un aumento en la concentración de fenilalanina en el lote 3 el día 4 respecto al control.

5.19.4. Suma de aminoácidos aromáticos, neutros y relación AAR/AAA en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 25, 26, 27; Gráficas XXVII, XXVIII).

5.19.4.1. Suma de aminoácidos aromáticos en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Gráfica XXVII).

La disminución de los aminoácidos aromáticos individuales en plasma se refleja en la suma de los mismos, que es del -29%, -17% y -41% y del -56% y -21% respecto al lote control para los lotes 2 y 3 los días 4, 8 y 14 de la experiencia. Los bajos niveles de aminoácidos aromáticos en plasma están relacionados con la reducción de la ingesta y la mayor captación de los mismos por el cerebro, donde se utilizan para la síntesis de neurotransmisores (WURTMAN y col., 1980).

La concentración plasmática de la suma de los aminoácidos aromáticos, así como la de los aminoácidos neutros, varía directamente con el contenido proteico de la dieta (SUZIC y col., 1987).

En los glóbulos rojos del lote 2 dicha suma disminuye el día 4 para igualarse al control a partir del día 8, mientras que con la dieta carente de energía en este día aumenta.

En el músculo no se aprecian variaciones de la suma de aminoácidos aromáticos en el lote 2, pero sí en el lote 3, que aumenta con respecto a los otros dos lotes los días 4 y 8. Estas respuestas diferentes se deben a que, si bien la disminución de la síntesis proteica mantiene en el lote 2 la concentración de la suma de los aminoácidos aromáticos (MILLWARD y col., 1985), esta suma aumenta en el lote 3 debido a la restricción energética a que está sometido, pues se produce una movilización mayor de estos aminoácidos, superando al control.

La disminución de la suma de AAA que se produce en músculo en el lote 3 el día 8 con respecto al 4 (46%) coincide con el aumento observado ese mismo día en plasma y glóbulos rojos.

5.19.4.2. Suma de aminoácidos neutros en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Gráfica XXVIII).

La concentración en plasma de la suma total de aminoácidos neutros desciende el día 4 en ambos lotes carentes con respecto al control, para igualarse el día 8 y disminuir en el lote 2 de nuevo el día 14.

En glóbulos rojos se observa una variación en la suma de aminoácidos neutros similar a la encontrada para los aminoácidos aromáticos, con valores inferiores al control el día 4 en ambos lotes carentes, que tienden a aumentar en días posteriores, de forma que el lote 2 se iguala al control el día 8 y el lote 3 se duplica el valor.

En el músculo, la suma de aminoácidos neutros aumenta en el lote 2 el día 4 (63%) debido a la elevación de leucina ese día. En el lote 3 esta suma es superior a los lotes control y 2 los días 4 y 8, debido a una menor captura de estos aminoácidos por el músculo, como consecuencia de una menor concentración de insulina en plasma y a un aumento de la proteólisis muscular.

5.19.4.3. Relación AAR/AAA en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio.

La relación indicada no se modifica en plasma ni en músculo, lo que refleja una variación paralela en las concentraciones de aminoácidos de cadena ramificada y de aminoácidos aromáticos en estos tejidos.

No sucede lo mismo en los glóbulos rojos, pues la fracción AAR/AAA es menor para los lotes 2 (-25%) el día 14, y 3 (-30%) el día 4, por el descenso de los aminoácidos ramificados esos días.

5.19.5. Aminoácidos básicos y azufrados libres en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 28, 29, 30, 31).

5.19.5.1. Arginina (Gráfica XXIX).

La arginina es un aminoácido que interviene en el ciclo de la urea del hígado en las reacciones de detoxificación de amonio del organismo, cuando las ingestas proteicas son elevadas. Alternativamente, la ruta podría facilitar la conservación de nitrógeno cuando las ingestas son bajas.

Al reducirse la síntesis proteica por la falta de metionina, se produce en el organismo una concentración elevada de aminoácidos, que al oxidarse pueden producir una acumulación de grupos amino, potencialmente tóxicos, que el organismo elimina mediante la formación de alanina, urea, ácido úrico o amoníaco. El aumento observado de urea en orina en los lotes carentes (TABLA 2) refleja una actividad elevada de los enzimas que intervienen en la formación de la misma.

La arginina en plasma (TABLA 28) tiene valores menores al control en ambos lotes carentes el último día de la experiencia (-68% el lote 2 el día 14 y -61% el lote 3 el día 8), coincidiendo con el aumento que se produce en el músculo (TABLA 30) en los dos lotes citados con respecto al control. En glóbulos rojos (TABLA 29) este aminoácido es significativamente mas elevado el día 8 en un 103% en el lote 2 y 258% en el lote 3 respecto al control, lo que podría estar relacionado con la captura de aminoácidos por los glóbulos rojos de la sangre al atravesar el músculo, que son transportados hacia órganos vitales como el cerebro y el hígado.

5.19.5.2. Histidina.

La histidina es un aminoácido esencial, así como la arginina, aunque se pueden sintetizar en el organismo en pequeñas cantidades.

La histidina en plasma (TABLA 28) se reduce en el lote 2 en un -84% el día 14) y en el lote 3 aproximadamente en un -54% el día 8 con respecto al control, siendo los valores del lote 3 inferiores a los del lote 2 durante toda la experiencia. Estos datos coinciden con los obtenidos por PETERS y HARPER (1987) y por SOEMITRO y col. (1989) en estudios con ratas sometidas a dietas sin proteína, aunque otros autores (MERCER y col., 1989) encuentran valores superiores con carencia dietaria de proteína.

Se ha observado un descenso en la histidina del eritrocito en ambos lotes carentes con respecto al control (-40% en el lote 2 el día 14 y -55% en el lote 3 el día 8).

La concentración de histidina en músculo no varía, coincidiendo con los resultados de SOEMITRO y col. (1989), excepto el día 14 para el lote 2, de acuerdo con el aumento observado por MERCER y col. (1989) en deficiencia proteica dietaria. PARKER y col. (1985) indican que este aumento es consecuencia del mayor catabolismo de la hemoglobina, de la degradación de la carnosina y del menor catabolismo de la histidina.

5.19.5.3. Aminoácidos azufrados.

Los aminoácidos azufrados analizados en este trabajo han sido metionina y taurina en plasma (TABLA 31) y taurina en músculo (TABLA 30).

La metionina en plasma no varía, lo que indica un mantenimiento de la homeostasis cuando la ingesta de metionina es baja, por reducción de la síntesis proteica y de la oxidación de este aminoácido. Esto se consigue por un reciclaje más eficaz de homocisteína, relacionado con la oxidación de la homocisteína por transulfuración (YOUNG y MARCHINI, 1990).

Al formarse la taurina a partir de la cisteína (TANAKA y col., 1990) y carecer la dieta de metionina y de cisteína, la síntesis de este aminoácido está limitada. Este aminoácido es muy abundante en el pool intracelular (JACOBSEN y SMITH, 1968), por lo que su concentración en plasma sólo disminuye respecto al control en el lote 2 el día 14, mientras que en músculo no varía en ninguno de los lotes carentes.

5.19.6. Sumas de aminoácidos esenciales, no esenciales, relación AAE/AANE y totales en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 32, 33, 34; Gráficas XXX, XXXI, XXXII y XXXIII).

La suma de aminoácidos esenciales (AAE) en plasma aumenta en el lote 2 los días 8 y 14 con respecto al 4 (52,26% y 62,5% respectivamente), y se observa un aumento en este lote esos mismos días con respecto al control (120% el día 8 y 90% el día 14). También se aprecia un aumento en AAE del músculo tanto en el lote 2 como en el lote 3 durante toda la experiencia. En cambio, en los glóbulos rojos no se observan variaciones significativas (GRÁFICA XXX).

La suma de aminoácidos no esenciales aumenta en plasma del lote 2 el día 8 en un 24,34% y es menor en el lote 3 en un -44% con respecto al control todos los días, lo que refleja la utilización de estos aminoácidos como fuente energética, al ser casi todos gluconeogénicos. En glóbulos rojos se observa un aumento en el lote 2 todos los días, siendo el día 14 del 43%. En músculo el lote 2 presenta valores superiores al control el día 4 y el 14, mientras que el lote 3 aumenta el día 4 con respecto al control para disminuir el día 8 (GRÁFICA XXXI).

Resumiendo, en plasma y músculo aumentan los AAE y AANE en el lote carente en met + cis, mientras que en el lote con $\frac{1}{2}$ de energía disminuyen o no varían, dependiendo del compartimento estudiado. Estas variaciones implican que la suma de aminoácidos totales en plasma y en músculo aumente en el lote 2 y disminuya en el 3 el último día.

En glóbulos rojos la suma de aminoácidos totales es superior en el grupo 2 que en el control durante el período experimental, mientras que el lote 3 no varía (GRÁFICA XXXII).

La relación AAE/AANE (GRÁFICA XXXIII) aumenta en plasma en ambos lotes carentes, siendo el último día de 40,16% para el lote 2 y 98,04% para el lote 3, y en músculo de 84% el lote 2 y 92% el lote 3 el último día respecto al control. En glóbulos rojos disminuye en un -24% el lote 2 y -12% el lote 3 el último día.

MUNRO (1982) muestra que la deficiencia proteica produce una reducción aproximadamente del 50% de los AAE y AANE en plasma. LUNN y col. (1976) obtienen resultados similares en músculo e hígado, aunque relativamente menores.

WANNEMACHER y ALLISON (1968) observan que las concentraciones de aminoácidos están relacionadas con el grado de deplección de nitrógeno corporal. Así mismo, señalan que en plasma e hígado las concentraciones de aminoácidos esenciales disminuyen más rápidamente que las de no esenciales, pero en músculo se produce una pequeña disminución hasta alcanzar la etapa más severa de deplección. Además encuentran un ligero aumento en los aminoácidos no esenciales.

MUNRO (1982) observa en el plasma de ratas en ayuno variaciones opuestas a las producidas por la deficiencia proteica, es decir, un aumento en los aminoácidos esenciales y una disminución en los no esenciales, y en músculo un aumento de los esenciales (MILLWARD y col., 1976b), quizá por la menor incorporación en la proteína y mayor proteólisis. Los valores obtenidos en esta experiencia coinciden con dichos estudios, a excepción del lote 2 para los aminoácidos no esenciales, tanto en plasma como en músculo. Este aumento es debido a que los aminoácidos no se pueden utilizar para la síntesis proteica por falta de metionina, acumulándose en estos compartimentos.

5.19.7 Relaciones bioquímicas aminoacídicas en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 35 - 44).

5.19.7.1 Ile/AAN-ile, Leu/AAN-leu, Val/AAN-val en plasma y glóbulos rojos (Tablas 35, 36).

Estas relaciones representan la proporción entre cada uno de los aminoácidos de cadena ramificada y la suma de aminoácidos neutros exceptuando el aminoácido al cual nos referimos, reflejando la competitividad por los mismos transportadores entre cada uno de ellos y los restantes.

En plasma no varían estas relaciones con respecto al control en ninguno de los lotes eurentes, excepto la relación Ile/AAN-Ile para el lote 3 el día 4, que aumenta en un 31,4%. La invariabilidad de las relaciones indica que la isoleucina, la leucina y la valina sufren cambios paralelos a la suma de los aminoácidos neutros, Por el contrario, el aumento experimentado en el lote 3 refleja la disminución de los aminoácidos neutros ese día, siendo la isoleucina uno de los aminoácidos menos afectados por la falta de energía.

En glóbulos rojos se observa un descenso en la relación Ile/AAN-ile en el lote 2 a partir del día 8, como también sucede en la relación Val/AAN-Val el día 14. El lote 3 presenta valores superiores al control en la relaciones Leu/AAN-Leu el día 8 (57%) e inferiores en la relación Valina/AAN-Valina a partir del día 4.

5.19.7.2. Phe/AAN-Phe, Tyr/AAN-Tyr en plasma y glóbulos rojos. Phe/tyr en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 37, 38, 41; Gráfica XXXIV).

Estas fracciones completan la descripción de la proporción entre los aminoácidos aromáticos estudiados y la suma del resto de los aminoácidos neutros.

En el plasma (TABLA 37) se observa un aumento de la fracción fenilalanina/AAN-fenilalanina en el lote 2 el último día de la experiencia, con disminución en la relación tirosina/AAN-tirosina y aumento en la fenilalanina/tirosina para el lote 3 el día 4.

En los glóbulos rojos las fracciones fenilalanina/AAN-fenilalanina y tirosina/AAN-tirosina (TABLA 38) aumentan en el lote 2 el último día de la experiencia. Las relaciones fenilalanina/AAN-fenilalanina y fenilalanina/tirosina aumentan el día 8 en el lote 3 con respecto al control, mientras que la relación tirosina/AAN-tirosina

disminuye ese mismo día.

En el músculo se observa un aumento en la relación fenilalanina/tirosina en el lote 2 el día 8 con respecto al control (GRÁFICA XXXIV), ya que se produce una disminución del catabolismo de la proteína miofibrilar, descendiendo más la tirosina que la fenilalanina.

5.19.7.3. ~~Ala/tyr. Ala/leu. Ala/AAR en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 39, 40, 41; Gráficas XXXV, XXXVI, XXXVII).~~

Estos índices, relacionados con el metabolismo de la glucosa, tienen valores normales respecto al control en plasma y glóbulos rojos al final de la experiencia en el lote carente en aminoácidos azufrados, mientras que en el lote con $\frac{1}{2}$ de energía disminuyen. La disminución de dichas relaciones pone de manifiesto la utilización de estos aminoácidos con fines gluconeogénicos, ante la carencia energética. En músculo también disminuyen estas relaciones en el lote 2.

5.19.7.4. ~~Serina + glicina + alanina/AAR y glicina/valina en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio (Tablas 42, 43, 44; Gráficas XXXVIII y XXXIX).~~

Estos índices son más afectados por las dietas carentes en metionina y cisteína que por la dieta con $\frac{1}{2}$ de energía. En plasma y glóbulos rojos estas relaciones aumentan durante todo el proceso experimental respecto al control; en el músculo aumenta el día 8 y se iguala al control el 14. Mientras, el lote con $\frac{1}{2}$ de energía no se modifican esos valores al final de la experiencia, debido a que son utilizados con fines gluconeogénicos.

FAUS y col. (1984) también observan valores significativamente más elevados en estos índices, medidos en plasma de niños con malnutrición proteico-calórica.

**CONCLUSIONES
Y RESUMEN**

6.1. - CONCLUSIONES.

Esta tesis tiene como finalidad estudiar el efecto de la malnutrición proteica y proteico-energética inducida en ratas Wistar macho de 87 g de peso, mediante el suministro de dietas sintéticas de aminoácidos cristalinos, carentes de metionina y cisteína (LOTE II) y carentes de metionina y cisteína con la mitad de energía (LOTE III) frente a un control alimentado con 10% de caseína + D-L metionina (0,2%) durante un período experimental de 14 días, con el objeto de cuantificar las variaciones de algunos parámetros implicados en el turnover proteico del músculo gastrocnemio y, al mismo tiempo, determinar las alteraciones aminoacídicas del mismo junto con las del plasma y glóbulos rojos.

También se ha valorado algunos otros parámetros implicados directamente en dicho turnover.

De los resultados obtenidos se puede deducir las siguientes conclusiones:

. Referentes al animal.

- 1.- Ambas dietas experimentales disminuyen la ingesta, el peso corporal, el peso del músculo gastrocnemio y el balance de nitrógeno y producen una elevación en el contenido plasmático de urea y en la pérdida de urea en orina. Todos estos parámetros son más afectados por la dieta carente en $\frac{1}{2}$ de energía.
- 2.- Otros parámetros sanguíneos como la glucemia se mantienen a pesar de la ingesta baja en calorías, aunque descienden los niveles de insulina, sobre todo en el lote III

. Referentes al turnover proteico del músculo gastrocnemio.

3. - Ambas dietas carentes disminuyen la masa muscular, así como el contenido de proteínas solubles, contenido de proteínas miofibrilares y la eliminación de 3-metil-histidina por el riñón. También disminuye el catabolismo de la proteína miofibrilar, la tasa fraccional catabólica, la síntesis de proteínas en el músculo además de la tasa fraccional de síntesis. La ganancia y la tasa fraccional de ganancia de la proteína miofibrilar se hacen negativas.
4. - La vida media de la proteína miofibrilar se prolonga.
5. - Paradójicamente se eleva el contenido en DNA, consecuencia de la menor cantidad de proteína soluble.

La relación proteína/DNA, que representa el tamaño celular, disminuye y, como consecuencia, la actividad y el contenido de DNAsa ácida, con la finalidad adaptativa de conservar el DNA impidiendo su catabolismo.

6. - El contenido de RNA disminuye por célula muscular, expresado por la relación RNA/DNA, lo que implica una reducción de la síntesis proteica, a pesar del descenso de la actividad RNAsa ácida, tanto por órgano como por mg de proteína, que tiende a impedir la degradación del RNA.
7. - La deficiencia de metionina y cisteína provoca una disminución de la actividad de la fosfatasa ácida, reflejando la involución del músculo, y de las transaminasas GOT y GPT, impidiendo la degradación de los aminoácidos esenciales isoleucina, leucina y valina. La actividad fosfatasa alanina y β -glucuronidasa aumentan, lo que indica retraso del crecimiento muscular. La dieta con $\frac{1}{2}$ de energía causa un efecto menos marcado, por lo que la actividad involutiva del órgano es más afectada por malnutrición proteica que calórica.

. Referentes a las variaciones en las concentraciones de aminoácidos en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio.

8.- Los aminoácidos de cadena ramificada disminuyen en ambos lotes carentes tanto en plasma como en glóbulos rojos, mientras que en el músculo gastrocnemio aumentan los primeros días para luego igualarse al control.

9.- La dieta carente en metionina y cisteína aumenta la concentración plasmática de ácido glutámico, serina, glicina y treonina y disminuye la de asparragina y glutamina. En glóbulos rojos disminuye los valores de ácido aspártico.

En músculo disminuye el ácido glutámico, asparragina y glutamina, aumentando serina, glicina y treonina

La dieta con $\frac{1}{2}$ de energía causa disminución plasmática del ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, glutamina y alanina, y aumento de glicina en menor nivel que la dieta II. En glóbulos rojos eleva el ácido aspártico, la asparragina, y en menor proporción que la dieta carente en metionina y cisteína la serina, glicina y treonina. En el músculo gastrocnemio las variaciones son las mismas que las producidas por la dieta II, excepto para serina, glicina y treonina, que no varían. En cambio la glutamina aumenta. En este lote estos aminoácidos se utilizan en la gluconeogénesis, sobre todo los referentes al plasma.

10.- La restricción dietaria impuesta disminuye las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos aromáticos, especialmente el triptófano. La suma de aminoácidos aromáticos y la de aminoácidos neutros sufre un descenso en plasma en ambos lotes, mientras que en los glóbulos rojos y músculo del lote III aumenta.

- 11.- Los aminoácidos básicos, arginina e histidina, disminuyen en plasma y aumentan en músculo gastrocnemio en ambos lotes, mientras que en eritrocitos aumenta la arginina y disminuye la histidina, más marcadamente en el lote con restricción energética.

- 12.- Todas las variaciones que sufren los aminoácidos en ambos lotes carentes se reflejan en un aumento de las relación AAE/AANE en plasma y músculo, y en una disminución en glóbulos rojos.

- 13.- Los índices bioquímicos gluconeogénicos estudiados indican la respuesta de los aminoácidos ante las necesidades de glucosa. Destaca el aumento de las relaciones $Ser + Gli + Ala / AAR$ en los tres compartimentos estudiados en el lote carente en metionina y cisteína y el descenso en el lote carente en energía de Ala/Tir , Ala/Leu y Ala/AAR en plasma, glóbulos rojos y músculo gastrocnemio, ya que este lote utiliza la alanina para la síntesis de glucosa con el fin de hacer frente a sus necesidades energéticas.

6.2. - RESUMEN.

De todas las conclusiones obtenidas se resume que:

Dietas carentes en metionina y cisteína y éstas con la mitad de energía provocan un estado de malnutrición proteica y proteico-energética respectivamente, causando una disminución de la ingesta, peso corporal y balance de nitrógeno, aumento de urea en plasma y en orina, lo que modifica el turnover proteico muscular.

Disminuye tanto la síntesis como el catabolismo de las proteínas miofibrilares, siendo mayor la reducción de la síntesis, lo cual hace que la ganancia de la proteína miofibrilar sea negativa. El descenso del catabolismo aumenta la vida media de estas proteínas, reflejando una adaptación a la malnutrición proteica. En el caso de la malnutrición proteico-calórica esta adaptación no se consigue, por lo que los animales no sobreviven.

Otros parámetros estudiados apoyan estos resultados, destacando la reducción de las proteínas solubles musculares, el descenso del RNA y las variaciones de las enzimas lisosomales, que conducen a una involución de este tejido.

Las concentraciones de los aminoácidos libres en plasma, glóbulos rojos y músculo varía de la siguiente forma:

- . Disminuyen en ambos lotes los aminoácidos de cadena ramificada, aromáticos, básicos y neutros plasmáticos.
- . Aumentan en plasma algunos aminoácidos gluconeogénicos en el lote carente en metionina y cisteína (glutámico, serina, glicina y treonina) y la suma de aminoácidos totales, reduciéndose en el lote deficitario en energía, ya que se utilizan con fines gluconeogénicos.
- . En músculo aumenta los aminoácidos esenciales. Esta elevación es consecuencia de las variaciones relativas entre la síntesis y el catabolismo de la proteína miofibrilar. Aunque en términos absolutos desciende tanto la proteosíntesis como la proteólisis, se produce un estado catabólico por predominio de la última, aumentando dichos aminoácidos

BIBLIOGRAFÍA

- ADIBI, S.A.; MODESTO, T.A.; MORSE, E.L. Y AMIN, P.M. (1973). "Amino acid levels in plasma, liver and skeletal muscle during protein deprivation". *Am. J. Physiol.*, 225,3: 408-414.
- ADIBI, S.A.; MORSE, E.L. y AMIN, P.M. (1975). "Role of insulin and glucose in the induction of hypoaminoacidemia in man: studies in normal juvenile diabetic and insulinoma patients". *J. Lab. Clin. Med.* 86: 395-409.
- AGUILAR, T.S.; HARPER, A.E. y BENEVENGA, N.J. (1972). "Efficiency of utilization of indispensable amino acids for growth by the rats". *J. Nutr.*, 102: 1199-1208.
- ANASUYA, A. y RAO, B.S.N. (1970). "Relationship between body collagen and urinary hydroxyproline excretion in young rats fed on a low-protein or low-caloric diet". *Brit. J. Nutr.*, 24: 97-107.
- ANDERSCH, M.A. y SZCZYPIN, A.J. (1947). "Use of P-nitrophenylphosphate as the substrate in determination of serum acid phosphatase". *Am. J. Clin. Path.*, 17: 571-574.
- AOKI, T.T.; BRENNAN, M.F.; MULLER, W.A.; MOORE, F.D. y CAHILL, G.F.Jr. (1972). "Effect of insulin on muscle glutamate uptake". *Clin. Invest.*, 5: 2889-1894.
- ASATOOR, A.M. y ARMSTRONG, M.D. (1967). "3-Methylhistidine, a component of actin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26: 168-174.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (1970). "Official methods of analysis". Washington D.C.; Association of Official Agricultural Chemists, pp. 800-801.
- ASTROM, S. y VON DER DECKEN, A. (1983). "Lysine deficiency reduces transcription activity and concentration of chromatin proteins reversibly in rat liver". *Acta Physiol. Scand.*, 117: 519-525.
- BATES, P.C.; GRIMBLE, G.K.; SPARROW, M.P.; MILLWARD, D.J. y al. (1983). "Myofibrillar protein turnover. Synthesis of protein bound 3-methylhistidine, actin, myosin heavy chain and aldolase in rat skeletal muscle in the fed and starved states". *Biochem. J.*, 214: 593-605.
- BATES, P.C. y MILLWARD, D.J. (1981). "Further examination of the source of urinary N¹-methyl histidine in the rat". *Proc. Nutr. Soc.*, 40: 89A.
- BAXTER, J.D. y ROUSSEAY, G.G. (1979). "Glucocorticoid hormone action: An overview". En: "Glucocorticoid hormone action". Eds. Baxter, J.D.; Rosseau, G.G. New York, Springer-Verlag, 1979 p. 1.

- BEGGS, M.; PATEL, H.; ESPINAL, J. y RANDLE, P.J. (1987). "Temporal relationships in the effect of protein-free diet on the activities of rat liver branched chain ketoacid dehydrogenase complex and kinase". *FEBS lett.*, 215: 13-15.
- BENDER, A.E. (1965). "The balancing of amino acid mixtures and proteins". *Proceedings of the nutrition Society*, 24: 1890-196.
- BERGMAN, R.N.; BEIR, J.R. y HOURINGAN, P.M. (1982). "Intraportal glucose infusion matched to oral glucose absorption. Lack of evidence for "gut factor" involvement in hepatic glucose storage". *Diabetes*, 31: 27.
- BERGMEYER, H.U. (1963). "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer, H.V. ed. Verlag Acad. Press. N.Y. London, pp 941-948.
- BERK, M.A.; CLUTTER, W.E.; SKOR, D.S.; SHAH, S. y CRYER, P. (1985). "Enhanced glycemic responsiveness to epinephrine in insulin-dependent diabetes mellitus is the result of the inability to secrete insulin". *J. Clin Invest.* 75: 1842.
- BERRIDGE, M.J. (1984). "Inositol triphosphate and diacylglycerol second messengers". *Biochemistry*, 220: 385.
- BEVERLY, J.L.; GIETZEN, D.W. y ROGERS, Q.S. (1991). "Protein synthesis in the prepyriform cortex: Effects on intake of an amino acid-imbalanced diet by sprague-Dawley rats". *J. Nutr.*, 121: 754-761.
- BEYLOT, M.; CHAMBRIER, C.; MONEGER, A. y COHEN, R. (1989). "Effect of small variations in insulin and glucose levels on plasma amino acids concentrations". *Diabetes and metabolism*, 15: 38-44.
- BIER, D.M. (1989). "Intrinsically difficult problems: the kinetics of body protein and amino acids in man". *Diabetes Metab. Rev.*, 5:111-132.
- BIRD, J.W.C.; BERG, T. y LEATHEM, J.H. (1968). "Cathepsin activity of liver and muscle fraction of adrenalectomized rats". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127: 182.
- BLOCK, W.D. y HUBBARD, R.W. (1962). "Amino acid content of rabbit urine and plasma". *Arch. Biochem. Biophys.*, 96:557-564.
- BODY, J.J.; CRYER, P.E.; OFFORD, K.P. y HEATH, H. III. (1983). "Epinephrine is a hypophosphatemic hormone in man". *J. Clin. Invest.* 71: 572.

- BROWN, J.G.; BATES, P.C.; HOLLIDAY, M.A. y MILLWARD, D.J. (1981). "Thyroid hormones and muscle protein turnover. The effect of thyroid-hormone deficiency and replacement in thyroidectomized and hypophysectomized rats". *Biochem. J.*, 194: 771-782.
- BURTON, K. (1956). "The conditions and mechanism of the dyphenilamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid". *Biochem. J.*, 62: 315-323.
- BUSE, M.G.; BIGGERS, F.; DRIER, C. y BUSE, J.F. (1973). "Effect of epinephrine, glucagon and the nutritional state on the oxidation of branched chain amino acids and pyruvate by isolated hearts and diaphragms of the rat". *J. Biol. Chem.*, 248: 697-706.
- CARMONA DA MOTTA, H.; ANTONIO, A.M.; LEITAO, G. y PORTO, M. (1990). "Late effects of early malnutrition". *Lancet*, 335: 8698.
- CARTER-SU, C. y OKAMOTO, K. (1985). "Effect of glucocorticoids on hexose transport in rat adipocytes". *J. Biol. Chem.*, 260: 11091.
- CERSOSIMO, E.; WILLIAMS, P.E.; RADOSEVICH, P.M.; HOXWORTH, B.T.; LACY, W.W. y ABUMRAAD, N.N. (1986). "Role of glutamina in adaptations in nitrogen metabolism during fasting". *Am. J. Physiol.*, 250 (Endocrinol. Metab., 13): E622-E628.
- CHIANG, T.W. y GOLDBERG, A.L. (1978). "The origin of alanine produced in skeletal muscle". *J. Biol. Chem.*, 253: 3677-3685.
- CHEEK, D.B. y HILL, D.E. (1970). "Muscle and liver cell growth: role of hormones and nutritional factors". *Fed. Proceed.*, 29: 1503-1509.
- CHEREL, Y. y LE MAHO, Y. (1991). "Refeeding after the late increase in nitrogen excretion during prolonged fasting in the rat". *Phys. Behav.*, 50: 345-349.
- CHERRINGTON, A.D.; CHIASSON, J.L.; LILJENQUIST, J.E. y al. (1976). "The role of insulin and glucagon in the regulation of basal glucose production in the postabsorptive dog" *J. Clin. Invest.*, 58: 1407.
- CHRISTENSEN, H.N. (1986). "Interorgan nutrition: introductory comments from the chair". *Fed. Proc.*, 45: 2165-2166.
- CIECHANOVER, A. (1993). "The ubiquitin-mediated proteolytic pathway". En: "International workshop on proteolysis and meat quality". 24-28 may 1993. Clermont-ferrant. OECD. INRA.

- CLARK, A.F. y VIGNOS, P.J. (1979). "Experimental corticosteroid myopathy: Effect on myofibrillar ATPase activity and protein degradation". *Muscle Nerve*, 2: 265.
- CLARK, A.F. y VIGNOS, P.J. (1981). "The role of proteases in experimental glucocorticoid myopathy". *Muscle Nerve*, 4: 219.
- CLUTTER, W.E.; BRER, D.M.; SHAH, S.D. y CRYER, P.E. (1980). "Epinephrine plasma metabolic clearance rates and physiologic thresholds for metabolic and hemodynamic actions in man" *J. Clin. Invest.*, 66: 94.
- CONDON, J.R. y ASATOOR, A.M. (1971). "Amino acid metabolism in uraemic patients". *Clin. Chim. Acta*, 32:333-337.
- COOK, G.M.V. (1973). En: "Lysosomes in Biology and pathology". Eds. Dingle, J.T.; Fell, H. Vol 13, 237-277, North Holland, Amsterdam.
- COUFALIK, A.M. y MONDER, C. (1981). "Stimulation of gluconeogenesis by cortisol in fetal rat liver in organ culture". *Endocrinology*, 108: 1132.
- COWGILL, R.W. y FREEBURG, B. (1957). "The metabolism of 3-M-H-compound in animals". *Arc. Biochem. Biophys.* 71: 466-472.
- COX, M.D.; DALAL, S.S., HEARD, C.R.C. y MILLWARD, D.J. (1984). "Metabolic rate and thyroid status in rats fed diets of different protein-energy value: The importance of free T₃". *J. Nutr.*, 118: 1240-1244.
- DAHLMANN, B. (1993). "Structure and related enzymatic activities of the proteasome (multicatalytic proteinase)". En: "International workshop on proteolysis and meat quality". 24-28 may 1993. Clermont-ferrant. OECD. INRA.
- DANIEL, P.W.; PRATT, O.E. y SPARGO, E. (1977). "The metabolic homeostatic role of muscle and its function as a store of protein". *Lancet*, 27: 446-448.
- DARMAUN, D.; FROGUEL, P.; RONGIER, M. y ROBERT, J.J. (1989). "Amino acid exchange between plasma and erythrocytes in vivo humans". *J. Appl. Physiol.*, 67: 2383-2388.
- DAS, T.K. y WATERLOW, J.C. (1974). "The rate of adaptation of urea cycle enzymes, aminotransferases and glutamate dehydrogenase to changes in dietary protein intake". *Br. J. Nutr.*, 32: 353-373.
- DE DUVE, C. (1969). En: "Lysosomes in biology and pathology". Eds. Dingle, J.T.; Fell, H. North Holland, Amsterdam pp 3-40.

- DE DUVE, C.; PRESSMAN, B.C.; GIANETO, R.; WATIAUX, P. y APPELEMENTS, F. (1955). "Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue". *Biochemical J.*, 60: 604-606.
- DE FRONZO, R.A.; FERRANNINI, E. y HENDLER, R. y Al. (1983). "Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia in man". *Diabetes*, 32: 35.
- DE JONG, F.A. y SCHREIBER, G. (1987). "Messenger RNA levels of plasma proteins in rat during protein depletion and refeeding" *J. Nutr.*, 117:1795-1800.
- DE MOOR, P.; LOUWAGIE, A.; VAN BAELEN, H. y VAN DE PUTTE, I. (1980). "Unexplained high transcortin levels in patients with various hematological disorders and in their relatives: A connection between these high transcortin levels and HLA antigen B 12". *J. of Clin. Endocr. Metab.*, 59: 491.
- DECKEN, A. y OMSTED, P.T. (1970). "Protein feeding of rats after protein starvation: incorporation of amino acid into polypeptide by skeletal muscle polyribosomes". *J. Nutr.*, 100: 623-630.
- DEIBERT, D.C. y DE FRONZO, R.A. (1980). "Epinephrine-induced insulin resistance in man". *J. Clin. Invest.*, 65: 717.
- DENTON, R.M.; BROWNSEY, R.W.; BELSHAM, G.J. y al. (1981). "A partial view of the mechanism of insulin action". *Diabetologia*, 51: 347.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE. "Metodo estandar optimado". *Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.*, vol. 8 (1970): 658; vol 10 (1972): 182.
- DISCHE, Z. (1930). *Mikrochemie*, 8. Citado por Marcos, A. (1982). "Adaptación del metabolismo proteico hepático al stress, en ratas con malnutrición proteica y calórico-proteica". Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. U.C.M.
- DUNLOP, D.S.; VAN ELDEN, W.; PLUCINSKI, I. y LAJHTA, A. (1981). "Brain slice protein-degradation and development". *J. Neurochem.*, 36: 258.
- ELIA, M.; CARTER, A. y SMITH, R. (1979). "The 3-methyl histidine content of human tissues". *Brit. J. Nutr.*, 42: 567-572.
- ELIA, M.; FOLMER, P.; SCHLATMANN, A.; GOREN, A. y AUSTIN, S. (1988). "Effect of short term starvation on the release of glutamine by human muscle". *Proc. Nutr. Soc.*, 17 nº3: 179A.

- ELWIN, D.H.; LAUNDER, W.J.; PARIKH, H.C. y WISE, E.M. (1972). "Roles of plasma and erythrocytes in interorgan transport of amino acids in dogs". *Am. J. Physiol.*, 222: 1333-1334.
- ELZINGA, M.; COLLINS, J.H.; KUEHL, W.M. y ALDESTEIN, R.S. (1973). "Complete amino acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70:2687-2691.
- ENESCO, M. y PUDDY, D. (1964). "Increase in the number of nucleic and weight in skeletal muscle of fasted and refed rats". *J. Nutr.*, 116: 2028-2033.
- EXTON, J.H. (1979). "Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. En: "Glucocortical hormone action". Eds. Baxter, J.D.; Rousseau, G.G. New York, Springer-Verlag, 1979 p. 535.
- FAIN, J.N. (1979). "Inhibition of glucose transport in fat cells and activation of lipolysis by glucocorticoids". En "Glucocortical hormone action" .Eds. Baxter, J.D.; Rousseau, G.G. New York, Springer-Verlag, 1979 p. 547.
- FAO/WHO (1973). *FAO Nutr. Rpt. No 52 (WHO Tech. Rpt. Ser. No 522)* FAO/WHO, Roma y Génova.
- FAO. (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). (1987). "The fifth world food survey". Roma: FAO, 1987.
- FAUS, M.J.; GIL, A.; ROBLES, R.; SANCHEZ-POZO, A.; PITA, M.L. y SÁNCHEZ-MEDINA, F. (1984). "Changes in serum albumin, transferrin and amino acid indices during the first month of life in small-for date enfants". *Ann. Nutr. Metab.*, 28: 70-76.
- FAWCETT, J.K. y SCOTT, J.E. (1960). "A rapid and precise method for the determination of urea". *J. Clin. Path.*, 13: 156-159.
- FELIG, P. (1975). "Amino acid metabolism in man". *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 933-954.
- FELIG, P.; POZEFSKY, E.; MARLISS, E. y CAHILL, G.F. Jr. (1970). "Alanine: key role in gluconeogenesis". *Science*, 167: 1003-1004.
- FELIG, P.; WAHREN, J. y HENDLER, R. (1975). "Influence of oral glucose ingestion on splanchnic glucose and amino acid metabolism". *Diabetes*, 24: 468.
- FELIG, P.; WAHREN, J. y HENDLER, R. (1977). "Amino acid and protein metabolism in diabetes mellitus". *Arch. Intern. Med.*, 135: 507-513.

- FELIG, P. y WAHREN, J. y RAF, L. (1973). "Evidence of inter-organ amino acid transport by blood cells in humans". *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70: 1775-1779.
- FELIPO, V.; MIÑANA, M.D. y GRISOLIA, S. (1991). "Control of urea synthesis and ammonia utilization in protein deprivation and refeeding". *Arch. Biochem. Biophys.*, 285(2): 351-356.
- FLAKOLL, P.J.; KULAYLAT, M.; FREXES-STEED, M.; HOURANI, U.; BROWN, L.L.; HILL, J.O. y ABUMRAD, N.N. (1989). "Amino acids augment insulin's suppression of whole body proteolysis". *Am. J. Physiol.*, 257 (Endocrinol. Metabolism, 20): E839-E847.
- FLIER, J.S.; KAHN, J. y ROTH, J. (1979). "Receptors, antireceptors, antibodies and mechanisms of insulin resistance". *N. Engl. J. Med.*, 300: 413-425.
- FOLIN, O. (1905a). "Laws governing the chemical composition of urine". *Am J. Physiol.*, 13: 66-115.
- FOLIN, O. (1905b). "A theory of protein metabolism". *Am. J. Physiol.*, 13: 1117-138.
- FONG, Y.; MOLDAWER, L.L.; MARANO, M.A.; WEI, H.; BARBER, A.; FISCHMAN, D.A. y LOWRY, S.F. (1989). "Starvation leads to decreased levels of RNAm for myofibrillar proteins". *J. Surg. Res.*, 46: 457-461.
- FRUTON, J.S.; IRVING, G.W. y BERGMANN, M. (1941). "Proteolytic enzymes of animal tissues II. Composite nature of beef spleen cathepsin". *J. Biol. Chem.*, 138: 249-262.
- FUKAGAWA, N.K.; MINAKER, K.L.; ROWE, J.W.; GOODMAN, M.N.; MATTHEWS, D.E.; BIER, O.M. y YOUNG, V.R. (1985). "Insulin-mediated reduction of whole body protein breakdown". *Am. Soc. Clin. Invest.*, 76: 2306-2311.
- FUKAGAWA, N.K.; MINAKER, K.L.; YOUNG, V.R. y ROWE, J.W. (1986). "Insulin dose-dependent reductions in plasma amino acids in man". *Am. J. Physiol.*, 250 (Endocrinol. Metab.:13): E13-E17.
- FULKS, R.M.; LI, J.B. y GOLDBERG, A.L. (1975). "Effects of insulin, glucose and amino acids in protein turnover in rat diaphragm". *J. Biol. Chem.*, 250: 290-298.
- FUNABIKI, R.; WATANABE, Y.; NISHIZAWA, N. y HAREYAMA, S. (1976). "Quantitative aspect of the myofibrillar protein turnover in transient state on dietary protein depletion and repletion revealed by urinary excretion of N¹⁵-methylhistidine". *Biochem. Biophys. Acta.*, 451: 143-150.

- GARLICK, P.J. (1980). "Protein turnover in the whole animal and specific tissues". En: "Protein metabolism", vol 19B (pt.1). Ed. Neuberger, A. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press. 1980: 77-152.
- GARLICK, P.J.; McNURLAN, M.A. y PREEDY, V.R. (1980). "A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis by injection of ^3H phenylalanine". *Biochemistry Journal*, 192: 719-723.
- GARLICK, P.J.; MILLWARD, D.J.; JAMES, W.P.T. y WATERLOW, J.C. (1975). "The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat". *Biochem. and Biophys. Acta*, 414: 71-84.
- GARLICK, P.J.; WATERLOW, J.C. y MILLWARD, D.J. (1978). "Free amino acids". En "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". Eds. Waterlow, J.C.; Garlick, P.J.; Millward, D.J., North Holland Publishing Co., Amsterdam. pp. 117-176.
- GARROW, J.S.; FLETCHER, K. y HALLIDAY, D. (1965). "Body composition in severe infantile malnutrition". *J. Clin. Invest.*, 44: 417-424.
- GERICH, J.E.; RAPTIS, S. y ROSENTHAL, J. (1978). "Somatostatin symposium". *Metabolism*, 27 (suppl.1) : 1.
- GOENA, M.; SANTIDRIAN, S; CUEVILLAS, F. y LARRALDE, J. (1988). "Muscle and liver protein synthesis and degradation in growing rats fed a raw field bean (*Vicia faba* L.) diet". *Rev. Esp. Fisiol.*, 44 (4), 345-352.
- GOLDBERG, A.L. (1968). "Protein synthesis during work-induced growth of skeletal muscle". *J. Cell. Biol.*, 36: 653-658.
- GOLDBERG, A.L. y CHANG, T.W. (1978). "Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle". *Fed. Proceed.*, 37: 2301-2307.
- GOLDBERG, A.L. y DICE, J.F. (1974). "Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells". *Annu. Rev. Biochem.*, 43: 835-869.
- GOLDBERG, A.L. y ODESSEY, R. (1972). "Oxidation of amino acids by diaphragms from fed and fasted rats". *Am. J. Physiol.*, 223: 1384-1391.
- GOLDBERG, A.L.; TISCHLER, M.; DE MORTINO, G. y GRIFFIN, G. (1980). "Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle". *Fed. Proc.*, 39: 31.
- GOLL, E.D.; KLEESE, W.C.; OKITANI, A.; KUMAMOTO, T.; CONG, J. y KAPPRELL, H.P. (1990). En: "Intracellular calcium-dependent proteolysis". Eds. R.L. Mellgren, T. Murachi. CRC Press, Boca-Ratón F.L. pp 103-114.

- GORDON, A.H. (1973) En: "Lysosomes in biology and pathology". Ed. Dingle, J.T. Vol 3: 89-137. North Holland, Amsterdam.
- GORDON, E.E.; KOWALSKY, K. y FRITTS, M. (1966). "Muscle proteins and DNA in rat quadriceps during growth". *Am. J. Clin. Physiol.*, 210: 1033-1040.
- GRUMMT, I.; SMITH, V.A. y GRUMMT, F. (1976). "Amino acid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase" *Cell*, 7:439-445.
- HALLIDAY, D. y McKERON, R.O. (1975). "Measurement of muscle protein synthetic role from serial muscle biopsies and total protein turnover in man by continuous intravenous infusion of L-(α - 15 N)-lysine". *Clin. Sci. Molec. Med.*, 49: 581.
- HARPER, A.E. (1986). "Enzymatic basis for adaptative changes in amino acid metabolism". En: Eds. Taylor T.G., Jenkins, N.K. "Proceedings of the XIII International Congress Nutrition". London: John Libbey, 1986: 409-414
- HARPER, A.E.; BENEVENGA, N.J. y WOHLHUETER, R.M. (1970). "Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids". *Physiol. Rev.*, 50: 428-458.
- HARPER, A.E.; MILLER, R.H. y BLOCK, K.P. (1984). "Branched chain amino acid metabolism". *Annu. Rev. Nutr.*, 4:409-454.
- HARPER, A.E. y PETERS, J.C. (1989). "Protein intake, brain amino acid, serotonin concentration and protein self-selection". *J. Nutr.*, 119: 677-689.
- HARRIS, C.I. y MILNE, G. (1981a). "The urinary excretion of N^T-methyl histidine by cattle: validation as an index of muscle protein breakdown". *Brit. J. Nutr.*, 45: 411-422.
- HARRIS, C.I. y MILNE, G. (1981b). "The inadequacy of urinary N^T-methyl histidine excretion in the pig as a measure of protein breakdown". *Brit. J. Nutr.*, 45: 423-430.
- HARRIS, A.S. y MORROW, J.S. (1990). "Calmodulin and calcium-dependent protease-I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin". *J. Biochem. (Tokyo)*, 87: 1305-1312.
- HASSELGREN, P.O.; WARNER, B.W.; JAMES, J.H.; TAKEHARA, H. y FISCHER, J.E. (1987). "Effect of insulin on amino acid uptake and protein turnover in skeletal muscle from septic rats". *Arch. Surg.*, 122: 228-233.

- HAYERBERG, L.N.; DECKELBAUM, L.; BILMAZES, C.; MUNRO, H.N. y YOUNG, V.R. (1975a). "Myofibrillar protein turnover and urinary N²-methylhistidine output. Response to dietary supply of protein and energy". *Biochem. J.*, 152: 503-510.
- HAYERBERG, L.N.; OMSTEDT, P.T.; MUNRO, H.N. y YOUNG, V.R. (1975b). "N¹-methylhistidine content of mixed proteins in various rats tissues". *Biochem. Biophys. Acta*, 405: 67-71.
- HEARD, C. (1986). "Effects of severe protein-calorie deficiency on the endocrine control of carbohydrate metabolism". *Diabetes*, 15: 78-89.
- HEGER, J. y FRYDRYCH, Z. (1985). "Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake". *Br. J. Nutr.*, 54: 499-508.
- HENRY, K.M.; KOLSTERLITZ, H.W. y QUENOUILLE, M.H. (1953). "A method for determining the nutritive value of a protein by its effect on liver protein". *Br. J. Nutr.*, 7:51-57.
- HENSHAW, E.C.; HIRSCH, C.A.; MORTON, B.E. y HIATT, H.H. (1971). "Control of protein synthesis in mammalian tissues through changes in ribosome activity". *J. Biol. Chem.*, 246: 436-446
- HOLTEN, D. y KENNEY, F.T. (1967). "Regulation of tyrosine alpha-ketoglutarate transaminase in rat liver. Induction by pancreatic hormones". *J. Biol. Chem.*, 242: 4372-4380
- HOFFER, J. (1990). "Nutritional status affects renal 3-methylhistidine handling in humans". *Metabolism*, 39 (7): 744-748.
- HOWARTH, R.E. y BALDWIN, R.L. (1971). "Synthesis and accumulation of protein and nucleic acid in rat gastrocnemius muscles during normal growth and recovery from restricted growth". *J. Nutr.*, 101: 477-484.
- HUSZAR, G. (1972). "Developmental changes of the primary structure and histidine methylation in rabbit skeletal muscle myosin". *Nature New Biol.*, 240: 260-264.
- HUSZAR, G. y ELZINGA, M. (1971). "Amino acid sequence around the single 3-methylhistidine residue in rabbit skeletal muscle myosin". *Biochemistry*, 10: 229-236.
- HUSZAR, G. y ELZINGA, M. (1972). "Homologous methylated and non-methylated peptides in skeletal and cardiac muscle". *J. Biol. Chem.*, 247: 745-753.

- HUNTER, W.M. y GREENWOOD, F.C. (1962). "Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity". *Nature*, 194: 495-496.
- ISHIDA, T.; CHAP, Z; CHOU, J. y al. (1983). "Differential effect of oral peripheral intravenous and intraportal glucose on hepatic glucose intake and insulin and glucagon extraction in conscious dogs". *J. Clin. Invest.*, 72: 590.
- IYENGAR, A.K.; RAO, B.S.N. y REDDY, V. (1981). "Nitrogen-balance in indian preschool-children receiving the safe level of protein at varying levels of energy". *Brit. J. Nutr.*, 46: 295-300.
- JABLONSKI, E. y RAFALSKI, H. (1984). "The utilization of protein from a low-protein diet as determined by limiting essential amino acids". *Brit. J. Nutr.*, 51: 235-243.
- JACKSON, A.A. (1983). "Amino acids: essential and non essential?". *Lancet* 1:1034-1037.
- JACKSON, A.A.; DOHERTY, J.; BENOIST, M.H.; HIBBERT, J. y PERSAUD, C. (1990). "The effect of the level of dietary protein, carbohydrate and fat on urea kinetics in young children during rapid catch-up weight gain". *Brit. J. Nutr.*, 64: 371-385.
- JACOBSEN, J.G. y SMITH, L.H.Jr. (1968). "Biochemical and physiology of taurine and taurine derivatives". *Physiol. Rev.*, 48: 424-511.
- JEFFERSON, L.S. (1980). "Role of insulin in the regulation of protein synthesis". *Diabetes*, 39: 487-496.
- JELLIFE, D.B. (1959). "Protein-calorie malnutrition in tropical preschool children". *J. Pediatr.*, 54: 227-256.
- JEPSON, M.M.; BATES, P.C. y MILLWARD, D.J. (1988). "The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat". *Brit. J. Nutr.*, 59: 397-415.
- JOHNSON, R. y BHATTACHARYYA, G. (1987). "Statistics: principles and methods". Wiley, J. ed.
- JOHNSON, R.; HARRIS, C.I. y PERRY, S.V. (1967). "3-Methylhistidine in actin and other muscle proteins". *Biochem. J.* 105:361-370.
- JOLES, J.A.; JANSEN, E.J.M.; LAAN, C.A.; WILLEKES-KOOLSCHIJIN, N.; KORTLANDT, W. y KOOMANS, H.A. (1988). "Plasma proteins in growing analbuminaemic rats fed on a diet of low-protein content". *Brit. J. Nutr.*, 61: 485-494.

- JONES, B.N.; PAABO, S. y STEIN, S. (1981). "Amino acid analysis and enzymatic sequences determination of peptides by an improved O-phthalaldehyde precolumn labeling procedure". *J. Liquid Chromat.*, 4(4): 565-586.
- KADOWAKI, M.; NOGUCHI, T. y NAITO, H. (1984). "Regulation of plasma amino acid levels by perfusion of hindquarters of rats". *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30: 187-198.
- KANG, M.H.; MORRIS, J.G. y ROGERS, Q.R. (1987). "Effect of concentration of some dietary amino acids and protein on plasma urea nitrogen concentration in growing kittens". *J. Nutr.*, 117: 1689-1696.
- KASUGA, M.; IZUMI, T.; TOBE, K.; SHIBATA, T.; MOMOMURA, K., TASHIRO-HASHIMOTO, Y. y KADOWAKI, T. (1990). "substrates for insulin-receptor kinase". *Diabetes Care*, 13: 317-326.
- KETTELHULT, I.C.; WING, S.S. y GOLDBERG, A.L. (1988). "Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle". *Diabetes/Metabolism Reviews*, vol 4 n°8, 751-772.
- KJELDAHL (A.O.A.C., 1975). Association of Official Analytical Chemist. "Official methods of analysis", 12ª ed. Washington. pp 15-17.
- KOMJATI, M.; BRATUSCH-MARRAIN, P. y WALDHAUST, W. (1986). "Superior efficacy of pulsatile versus hormona exposure on hepatic glucose production in vitro". *Endocrinology*, 118: 312.
- KOSOWA, N.S. y GLASER, T. (1990). En: "Intracellular calcium dependent proteolysis". Eds. R.L. Mellgren, T. Murachi. CRC Press, Boca-Ratón F.L. pp 163-180.
- LAJTHA, A.; BANAY-SCHWARTZ, M y GIUFFRIDA, A.M.E.. (1987). "Changes in brain protein metabolism with developmental and nutritional state". En: "Basic and clinical aspects of nutritional and brain development". Eds. D.K. Rassin, B. Harber, B. Drujan. New York, vol 16, pp. 345-349.
- LANDSBERG, L.; SAVILLE, M.E. y YOUNG, J.B. (1984). "Simpathoadrenal system and regulation of thermogenesis". *Am. J. Physiol.*, 247: E181.
- LAZZARI, E.P.; SULLIVAN, E. y MURRAY, D.R. (1970). "Sensitive colorimetric assay for ribonuclease". *Texas Rep. Biol. Med.*, 28: 561-564.
- LEHNINGER, A.L. (1972). En: "Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular". Ediciones Omega. Barcelona. Cap. 24, pp 575-602.

- LENZEN, S y BAILEY, C.J. (1984). "Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the Islets of Langerhans". *Endocrinol. Rev.*, 5: 411.
- LEUNG, P.M.B. y ROGERS, Q.R. (1969). "Food intake: Regulation by plasma amino acid pattern". *Life Sci.*, 8: 1-9.
- LEWIS, S.E.M.; ANDERSON, P. y GOLDSPINK, D.F. (1982). "The effect of calcium on protein-turnover in skeletal muscles of the rat". *Biochem. J.*, 204: 257-264.
- LONG, C.L.; HAVERBERG, L.N.; YOUNG, V.R.; KINNEY, J.M.; MUNRO, H.N. y GEIGER, J.W. (1975). "Metabolism of 3-M-H in man". *Metabolism*, 24: 929-935.
- LONG, C.L.; DILLARD, D.R.; BODZIN, J.H.; GEIGER, J.W. y BLAKEMORE, W.S. (1988). "Validity of 3-methylhistidine excretion as an indicator of skeletal muscle protein breakdown in humans". *Metabolism*, 37 (9): 844-849.
- LOWENSTEIN, J.M. y GOODMAN, M.N. (1978). "The purine nucleotide cycle in skeletal muscle". *Fed. Proceed.*, 37: 2308-2312.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). "Protein measurement". *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- LUNDGREEN, E. (1977). "Conditions for induction of alkaline phosphatase in cultured human fetal skin fibroblasts". *Exp. Cell. Res.*, 110: 25-30.
- LUNN, P.G.; WHIREHEAD, R.G.; BAKER, B.A. y AUSTIN, B. (1976). "The effect of cortisone acetate on the course of development experimental PEM in rats". *Brit. J. Nutr.*, 36: 537-542.
- MAK, R.H.K.; TURNER, C.; THOMPSON, T.; HAYCOCK, G. y CHATLER, C. (1986). "The effect of a low protein diet with amino acid/keto acid supplements on glucose metabolism in children with uremia". *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 63 (4): 985-989.
- MARTINEZ, J.A.; GOENA, M.; SANTIDRIAN, S. y LARRALDE, J. (1987). "Response of muscle liver and whole body protein turnover to two different sources of protein in growing rats". *Ann. Rev. Metab.*, 31: 146-153.
- MANCHESTER, K.R. (1975) En: "M.T.P. International Review of Science". Ed. Arnstein, H.R.V. *Biochemistry series* 1, 7: 329-358.
- MARCOS, A. (1982). "Adaptación del metabolismo proteico hepático al stress, en ratas con malnutrición proteica y calórico-proteica". Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. U.C.M.

- MATHEWS, R.W.; ORONSKY, A. y HASCHEME, A.E. (1973). "Effect of thyroid-hormone on polypeptide-chain assembly kinetics in liver protein-synthesis in-vivo". *J. Biol. Chem.*, 248: 1329-1333.
- MATO, J.M.; KELLY, K.L.; ABLER, A. y JARETT, L. (1987). "Identification of a novel Insulin-sensitive glycopospholipid from H35 Hepatoma cells". *J. Biol. Chem.*, 262: 187.
- MAYER, M.; SHAFRIR, E.; KAISER, N.; MILHOLLAND, R.J. y ROSEN, F. (1976). "Interaction of glucocorticoid hormones with rat skeletal muscle. Catabolic effects and hormone binding". *Metabolism*, 25: 157-167.
- McDONALD, M.R. (1955). En: "Methods in enzymology". Eds. Colowick, S.P.; Kaplan, S.O. Vol II. Academic press. N.Y., pp. 437-447.
- McDONALD, R.B. (1990). "Effects of age and diet on glucose tolerance in Sprague-Dawley rats". *J. Nutr.*, 120: 598-601.
- McFARLANE, I.G. y VON HOLT, C. (1969). "Metabolism of amino acids in protein-calorie-deficient rats". *Biochem. J.*, 111: 557-563.
- McLAREN, D.A. (1966). "A fresh look at protein-calorie malnutrition". *Lancet*, 2: 485-488.
- MEGUID, M.M.; MATTHEWS, D.E.; BIER, D.M.; MEREDITH, C.N. y YOUNG, V.R. (1986). "Valine kinetics at graded valine intakes in young men". *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 781-786.
- MERCER, L.P.; DODDS, S.J.; SCHWEISTAL, M.R. y DUNN, J.D. (1989). "Brain histidine and food intake in rats fed diets deficient in single amino acids". *J. Nutr.*, 119: 66-74.
- MEREDITH, C.N.; WEN, Z.-N.; BIER, D.M.; MATTHEWS, D.E. y YOUNG, V.R. (1986). "Lysine kinetics at graded lysine intakes in young men". *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 787-794.
- MERTZ, E.T. (1972). "The protein and amino acid needs". En: "Fish nutrition". Ed. Halver, J.E. Academic Press. New York. pp. 105-143.
- MILLWARD, D.J. (1980a). "Protein degradation in muscle and liver". En: "Protein metabolism". Ed. Neuberger, A. ed. Vol 19B (pt.1). Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical press. 1980: 153-232.
- MILLWARD, D.J. (1980b). En: "Degradative processes in heart and skeletal muscle". Ed. Wildenthal, K. Elsevier/North Holland, Oxford. pp 153-232.

- MILLWARD, D.J.; BATES, P.C.; BROWN, J.G.; COX, M.; GIUGLIANO, R.; JEPSON, M. y PELL, J. (1985). En: "Intracellular protein catabolism". Eds. Khairallah, E.A.; Bond, J.S.; Bird, J.W.C. New York. Alan Liss, pp. 531-542.
- MILLWARD, D.J.; BATES, P.C.; DeBENOIST, B.; BROWN, J.G.; COX, M. y HALLIDAY, D. (1983). "Protein turnover: the nature of the phenomenon and its physiological regulation". En: IV Int. Symp. Protein metabolism and nutrition. Clermont-Ferrand (France). INRA ed. 1983 (Les Colloques de l'INRA, n° 16).
- MILLWARD, D.J.; BROWN, J.G. y ODEDRA, B. (1981). En: "Nitrogen metabolism in man". Eds. Waterlow, J.C., Stephen, J.M.L. Applied Science Publishers, London. pp. 475-494.
- MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; JAMES, W.P.T.; NNANYELUGO, D.O. y RYATT, J.S. (1973) "Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle". Nature (London), 241: 204-205.
- MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; JAMES, W.P.T.; SENDER, P.M. y WATERLOW, J.C. (1976a). "Protein turnover". En: "Protein metabolism and nutrition". Eds. Cole, D.J.A.; Boorman, K.N.; Buttery, P.J.; Lewis, D.; Neahe, R.J.; Swan, H. Boston. Cap. 4, pp. 46-69.
- MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; NNANYELUGO, D.O. y WATERLOW, J.C. (1976b). "The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass". Biochem. J. 1976: 156-185.
- MILLWARD, D.J.; GARLICK, P.J.; STEWART, R.J.C.; NNANYELUGO, D.O. y WATERLOW, J.C., (1975). "Skeletal muscle growth and protein turnover". Biochem. J., 150: 235-243.
- MILLWARD, D.J.; NNANYELUGO, D.O.; GARLICK, P.J. y JAMES, W.P.T. (1974). "Protein metabolism in skeletal muscle. The effect of feeding and fasting on muscle RNA, free amino acids and plasma insulin concentrations". Brit. J. Nutr., 32: 127-142.
- MILLWARD, D.J. y WATERLOW, J.C. (1978). "Effect of nutrition on protein turnover in skeletal muscle". Fed. Proceed., 37: 2283-2290.
- MOLDAVE, K. (1985). "Eukaryotic protein synthesis" Annu. Rev. Biochem. 54: 1109-1159.
- MORTIMORE, G.E. y PÖSÖ, A.R. (1987). "Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply". Annu. Rev. Nutr., 7: 539-564.

- MOTIL, K.J.; MATTEWS, D.E.; BIER, D.M.; BURCKLE, J.F.; MUNRO, H.N. y YOUNG, V.R. (1981). "Whole-body leucine and lysine metabolism: response to dietary protein intake in young men". *Am. J. Physiol.*, 240: E712-E721.
- MUNRO, H.N. (1964). En: "Mammalian protein metabolism". Eds. Munro, H.N.; Allison, J.B. Academic Press, N.Y. - London, vol 1: 382-438.
- MUNRO, H.N. (1982). En: "Clinical Nutrition 81". Eds. Wesdorp, R.I.C.; Soeters, P.B. Churchill-Livingstone, Edinburgh. pp 181-189.
- MUNRO, H.N. (1983). "Metabolic basis of nutritional care in liver and kidney disease". En: "Nutritional support of the seriously ill patient". Eds. Winter, R.W; Greene, H.L. New York Academic press. 1983: 93-105.
- MUNRO, H.N. y GRAY, J.A.M. (1969). "Nucleic acid content of skeletal muscle and liver in mammals at different body sizes". *Comp. Biochem. Physiol.*, 28: 897-905.
- MUNRO, H.N.; HUBERT, C. y BALIGA, B.S. (1975). En: "Alcohol and abnormal protein biosynthesis, biochemical and clinical". Eds. Rothschild, M.A.; Oratz, M.; Schreiber, S.S. pp. 33-66. Pergamon, Oxford.
- MUNRO, H.H. y YOUNG, V.R. (1981). "Recent advances in clinical nutrition". Eds. Howard, A.; McLean-Baird, I. Vol 1. John Libby, London. p. 33.
- MURILLO, M.P.; VALENTE, G.B.; TASCA, C.I.; ATTOS, A.G. y PESSOA-PUREUR, R. (1991). "Malnutrition induces an increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex". *J. Nutr.*, 121: 1349-1354.
- NAKAHARA, T.; HIRANO, M.; MATSUMOTO, T.; KUROKI, T.; TATEBAYASHI, Y; TSUTSUMI, T.; NISHIYAMA, K.; OOBOSHI, H.; NAKAMURA, K.; YAO, H.; SHIRAIISHI, A.; WAKI, M y UCHIMURA, H. (1990). "Regional distribution of DNA and RNA in rat brain: A sensitive determination using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection". *Neurochemical research*, 15, 6: 609-611.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978). "Nutrient requirements of the laboratory rat". Natural Academy of Science. Washington, pp. 13-26.
- NISHIZAWA, N.; SHIMBO, N.; HAREYAMA, S. y FUNABIKI, R. (1977). "Fractional catabolic rates of myosin and actin estimated by urinary excretion of N¹⁵-met-hist.: The effect of dietary protein level on catabolic rats under conditions of restricted food intake". *Br. J. Nutr.*, 37:345-353 .

- OBLED, C.; ARNAL, M. y VALIN, C. (1980). "Variations through the day of hepatic and muscular cathepsin A (carboxypeptidase A; EC 3.4.12.2), C (endopeptidase C; EC 3.4.14.2) and D (endopeptidase D; EC 3.4.25.2) activities and her amino acids of blood in rats: influence of feeding schedule". *Brit. J. Nutr.*, 44: 61-69
- OEDRA, B.R.; BATES, P.C. y MILLWARD, D.J. (1983). "Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver". *Biochem. J.*, 214: 617-627.
- OEDRA, B.R. y MILLWARD, D.J. (1982). "Effect of corticosterone treatment on muscle protein turnover in adrenalectomized rats and diabetic rats maintained on insulin". *Biochem. J.*, 204: 663-672 (1982).
- OLDENDORF, W.H. y SZABO, I. (1976). "Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers". *Am. J. Physiol.*, 230: 94-98.
- OMSTEDT, P.T. y VON DER DECKER, A. (1974). "Dietary amino acids: Effect on protein synthesis in vitro in rat skeletal muscle and liver". *Brit. J. Nutr.*, 31: 67-79.
- ORLOWSKI, M. (1990). "The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system". *Biochemistry*, 29: 10289-10297.
- OUSTERHOUT, L.E. (1960). "Survival time and biochemical changes in chicks fed diets lacking different essential amino acids". *J. Nutr.*, 70: 226-232.
- PADRO, J.B.; SCHWARTZ, S; FARROIL, M. y SERRA, J. (1984). "Niveles plasmáticos de aminoácidos ramificados (AAR) en la agresión. Efecto nutriente". *Nutr. Clin*, 3: 42-45.
- PAIN, V.M. y CLEMENS, M.J. (1980). "Protein synthesis in mammalian systems". *Compreh. Biochem.*, 19b: 1-76.
- PARKER, C.J.; RIESS, G.T. y SARDESAI, V.M. (1985). "Essentiality of histidine in adult mice". *J. Nutr.*, 115: 824-826.
- PASCAUD, M. y Ng, L.T. (1990). "Plasma and tissue-free amino acids in the developing chick". *Ann. Nutr. Metab.*, 34: 198-207.
- PAYNE-ROBINSON, H.M.; COORE, H.G.; GOLDEN, M.H.N. y SIMEON, D.T. (1990). "Changes in red cells insulin receptors during recovery from severe malnutrition". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 44: 803-812.
- PENG, Y.S.; MELIZA, L.L.; VAVICH, M.G. y KEMMERER, A.R. (1974). "Changes in food intake and nitrogen metabolism of rats while adapting to a low or high protein diet". *J. Nutr.*, 104: 1008-1007.

- PETERS, T. (1975). En: "Alcohol and abnormal protein biosynthesis, biochemical and clinical". Eds. Rothschild, M.A.; Oratz, M.; Schreiber, S.S. 33-66. Pergamon, Oxford.
- PETERS, J.C. y HARPER, A.E. (1985). "Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: Effects on food intake, plasma and brain amino acid concentration and brain neurotransmitter metabolism". J. Nutr., 115: 382-398.
- PETERS, J.C. y HARPER, A.E. (1987). "Acute effects of dietary protein on food intake, tissue amino acids and brain serotonin". Am. J. Physiol., 252: R902-R914.
- PICOU, E.; HALLIDAY, D. y GARROW, J.S. (1966). "Total body protein, collagen and non collagen protein in infantile protein malnutrition." Clin. Sci., 30: 345-351.
- POLLARD, T.D. y WEIHING, R.R. (1974). "Actin and myosin and cell movement". CRC Crit. Rev. Biochem., 2:1-65.
- POOLIE, B. (1975). En: "Intracellular Protein Turnover". Eds. Schimke, R.T, Katunuma, N., pp246-264, Academic Press, N.Y.
- POPPER, H. (1937). "Creatinine determination in blood". Biochem. Z., 291: 354-367.
- PUGLIESE, M.T. (1990). "Endocrine function adaptations in undernutrition". World Rev. Nutr. Diet, 622, 186-211.
- RANA, S.V. y MEHTA, S. (1991). "Effect of protein calorie malnutrition on "in vitro" incorporation of (H-C¹⁴)-glucose in brain of young rhesus monkeys". Indian J. Exp. Biol., 29: 259-268.
- RANDLE, P.J.; PATSTON, P.A. y ESPINAL, J. (1987). "Branched chain ketoacid dehydrogenase". En: "The enzymes". Eds. Boyer, P.D.; Krebs, E.G. vol. XVIII (part B) Orlando, F.L. Academic Press, 1987: 97-121.
- REITMANN, S. y FRANKEL, S. (1957). "Determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases". Am. J. Clin. Path., 28: 56-63.
- RENNIE, M.J.; EDWARDS, R.H.T.; HALLIDAY, D.; MATTHEWS De WOLMAN, S.L. y MILLWARD, D.J. (1982). "Muscle protein synthesis measured by stable isotope technique in man. The effects of feeding and fasting". Clin. Sci., 63: 519-523.

- REPORTER, M. (1973). "Protein synthesis in cultured muscle cells: methylation of nascent proteins" *Arch. Biochem. Biophys.*, 158: 577-585.
- RIKIMARU, T.; YAMAMOTO, S.; MAEDA, K. e INOUE, G. (1980). "Effects of protein deficiency on muscle myofibrillar protein turnover in adult rats". *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 26: 39-57.
- RIVETT, A.J. (1989). "The multicatalytic proteinase of mammalian cells". *Arch. Biochem. Biophys.*, 268: 1-8.
- RIVETT, A.J. y KNECHT, E. (1993) "Proteasomes: multicatalytic proteinase complex". *Curr. Biol.*, 3: 127-129.
- RIZZA, R.A.; CRYER, P.E.; HAYMOND, M.W. y GERICH, J.E. (1980a) "Adrenergic mechanisms for the effect of epinephrine on glucose production and clearance in man". *J. Clin. Invest.*, 265: 682.
- RIZZA, R.A.; HAYMOND, M.W.; MILES, J.M.; VERDONK, C.H.; CRYER, P.E. y GERICH, J.E. (1980b). "Effect of α -adrenergic stimulation and its blockade on glucose turnover in man". *Am. J. Physiol.*, 238: E467.
- RODBELL, M. (1985). "Programmable messengers: A new theory of hormone action". *Trends. Biochem. Sci.*, 10: 461.
- RODEMANN, H.P. y GOLDBERG, A.L. (1982). "Arachidonic-acid prostaglandin E-2 and prostaglandin F-2-alpha influence rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle". *J. Biol. Chem.*, 257: 1632-1638.
- ROSE, W.C.; COON, M.J.; LOCKHART, H.B. y LAMBERT, G.F. (1955). "The amino acid requirements of man. XI: The threonine and methionine requirements". *J. Biol. Chem.*, 215: 101-110.
- SACCA, L.; SHERWIN, R. y FELIG, P. (1979). "Influence of somatostatin on glucagon and epinephrine-stimulated hepatic glucose output in the dog". *Am. J. Physiol.*, 236: E113.
- SAID, A.K. y HEGSTED, D.M. (1970). "Evaluation of dietary protein quality in adult rats". *J. Nutr.*, 100: 1363-1373.
- SAIDO, T.C.; SHIBATA, M.; TAKENAWA, T.; MUROFUSHI, H. y SUZUKI, K. (1992). "Positive regulation of μ -calpain action by polyphosphoinositides". *J. Biol. Chem.*, 267 n^o 4, 24585-24590.
- S.A.S. INSTITUTE INC. (1990). SAS/Stat[™] user's guide, Version 6. Fourth edition. SAS Institute. Cary, N.C.

- SANTIDRIAN, S. (1981). "Muscle protein breakdown in young rat fed on an energy-depleted diet". *Rev. Esp. Fisiol.*, 37: 23-30.
- SAUNDERS, S.J.; TRUSWELL, A.S.; BARBEZAT, G.O.; WITTMAN, W. y HANSEN, J.D.L. (1967). "Plasma free amino acid pattern in protein calorie malnutrition". *Lancet*, 2: 795-797.
- SAWAYA, A.L. y LUNN, P.G. (1985). "Evidence suggesting that elevated plasma triiodothyronine concentration of rats fed on protein deficient diets in physiologically active". *Brit. J. Nutr.*, 53: 175-181.
- SCHIMKE, R.T. (1970). "Regulation of protein degradation in mammalian tissues". En: "Mammalian protein metabolism". Ed. Munro, H.N.; N.Y. Academic press. vol. 4, cap. 32: 177-228.
- SCHOENHEIMER, R. (1946). "The dynamic state of body constituents". Harvard University press, Cambridge, Mass.
- SCHOENHEIMER, R.; RATNER, S. y RITTENBERG, D. (1939). "The metabolism of tyrosine". *J. Biol. Chem.*, 127: 333-344.
- SCHULTE, H.M.; CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W.; BOOTH, J.D.; OLDFIELD, E.D.; CUTLER, G.B. Jr. y LORIAUX, D.L. (1985). "Continuous administration of synthetic ovine corticotropin-releasing factor in man". *J. Clin. Invest.*, 75: 1781.
- SEELIG, H.P. y WUEST, H. (1969). "Creatinine determination by the Jaffe reaction". *Arztl. Lab.*, 15: 34-39.
- SEMON, B.A.; LEUNG, P.M.B.; ROGERS, Q.R. y GIETZEN, D.W. (1989). "Plasma and brain ammonia and amino acids in rats measured after feeding 28% casein or 28: Egg white". *J. Nutr.*, 119: 1583-1592.
- SHAMOON, H.; SOMAN, V y SHERWIN, R.S. (1980). "The influence of acute physiological increments of cortisol on fuel metabolism and insulin binding to monocytes in normal humans". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50: 495.
- SHOJI, S. (1990). "Effect of exogenous cortisone on amino acid metabolism in rats". *Int. J. Biochem.*, 22: 83-87.
- SIMAN, R.; CARD, J.P. y DAVIS, L.G. (1990). "Proteolytic processing of beta-amyloid precursor by calpain-I". *J. Neurosci.*, 10: 2400-2411.
- SIMMONS, P.S.; MILES, J.M.; GERICH, J.E. y HAYMOND, M.W. (1984). "Increased proteolysis. An effect of increased plasma cortisol within the physiologic range". *J. Clin. Invest.*, 73: 412.

- SINGH, U.K.; AGARWAL, K.N. y SHANKER, R. (1990). "Effect of undernutrition in succinate dehydrogenase and acetylcholinesterase in developing rat brain". *Indian J. Exp. Biol.*, 28: 868-870.
- SKETCHER, R.D.; FERN, E.B. y JAMES, W.P.T. (1974). "The adaptation in muscle oxidation of leucine to dietary protein and energy intake". *Brit. J. Nutr.*, 31: 332-342.
- SKETCHER, R.D. y JAMES, W.P.T. (1974). "Branched chain amino acid oxidation in relation to catabolic enzyme activities in rats given a protein free diet at different stages of development". *Brit. J. Nutr.*, 32: 615-623.
- SOARES, M.J. y SHETTY, P.S. (1991). "Basal metabolic rates and metabolic economy in chronic undernutrition". *Eur. J. Clin. Nutr.*, 45: 363-373.
- SOEMITRO, S.; BLOCK, K.P.; CROWELL, P.L. y HARPER, A.E. (1989). "Activities of branched-chain amino acid degrading enzymes in liver from rats fed different dietary levels of protein". *J. Nutr.*, 119: 1203-1212.
- SOUBA, W.W. (1991). "Glutamine: a key substrate for the splanchnic bed". *Ann. Rev. Nutr.*, 11: 285-308.
- STALMANS, W. y LALOUX, M. (1979). "Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism". En: "Glucocortical hormone action". Eds. Baxter, J.D.; Rousseau, G.G.; New York, Springer-Verlag, 1979, p. 517.
- SUZIC, S.; RADUNOVIC, L.; JANKOVIC, V. y SEGOVIC, R. (1987). "Effect of protein-free diet in amino acid homeostasis of rat blood plasma and gut contents". *Febs. Letter* 04731, 216, 2, pp. 287-290.
- TACKMAN, J.M.; TEWS, J.K. y HARPER, A.E. (1990). "Dietary disproportions of amino acids in the rat: Effects on food intake, plasma and brain amino acids and brain serotonin". *J. Nutr.*, 120: 521-533.
- TALLAN, H.; STERN, W.H. y MOORE, S. (1954a). "3-Methylhistidine, a new amino acid from human urine". *J. Biol. Chem.*, 206: 825-834.
- TALLAN, H.; STERN, W.H. y MOORE, S. (1954b). "Studies on the free amino acids and related compounds in the tissues of the cat". *J. Biol. Chem.*, 211: 927-933.
- TANAKA, H.; NAKATOMI, Y y OGURA, M. (1987). "Metabolism of glycine and threonine in growing rats at various dietary protein levels". *Agric. Biol. Chem.* 51: 3087-3093.

- TANAKA, H.; FUKUSHIMA, T.; NAKATOMI, Y. y OGURA, M. (1988). "Metabolism of valine and isoleucine in growing rats at various dietary protein levels". *Agric. Biol. Chem*, 52: 811-817.
- TANAKA, H.; NAKATOMI, Y; MORI, M. y OGURA, M. (1990). "Metabolism of methionine and cysteine in growing rats at various dietary protein levels". *Agric. Biol. Chem*, 54: 2093-2099.
- TASKINEN, M.R.; NIKKILA, E.A.; PELKONEN, R. y SANE, Y. (1983). "Plasma lipoproteins, lipolytic enzymes and very low density lipoprotein triglyceric turnover in Cushing's Syndrome". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 619.
- TAWA, N.E.Jr. (1984). "Metabolic consequences of protein deficiency and starvation". Ph.D. Thesis. Harvard University.
- TEMLER, R.S.; DORMOND, C.A. y SIMON, E. (1983). "Alterations in hepatic enzyme activities in rats fed increased levels of soya protein with or without methionine supplementation". *Nutr. Rep. Int.*, 28: 253-265.
- THURMOND, J.B.; FREEMAN, G.B.; SOBLOSKY, J.S.; IENI, J.R. y BROWN, J.W. (1990). "Effect of dietary tyrosine on L-dopa and amphetamine-induced changes in locomotor activity and neurochemistry in mice". *Pharmacol. Biochem. and Behavior*, 37: 259-266.
- TRENKLE, A. (1974). "Hormonal and nutritional interrelations and their effects on skeletal muscle". *J. Anim. Sci.*, 38: 1142-1152.
- TRESGUERRES, J.A.F. (1992). En: "Fisiología humana". Ed. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid, cap 73.
- TRINDER, P. (1969). "Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor". *Ann. Clin. Biochem.*, 6: 24-27.
- UNGER, R.H. (1985). "Glucagon physiology and patophysiology in the light of new advances". *Diabetologia*, 28: 574.
- WANNEMACHER, R.W. y ALLISON, J.B. (1968). En: "Protein Nutrition and free amino acid patterns". (Ed. Leatham, J.H). Rutgers Univ. Press, New Brunswick. pp: 206-227
- WATERLOW, J.C. (1968). "Observations on the mechanism of adaptation to low protein intakes". *Lancet* 2: 1091.
- WATERLOW, J.C. (1986). "Metabolic adaptation to low intakes of energy and protein". *Ann. Rev. Nutr.*, 6:495-526.

- WATERLOW, J.C. (1990). "Nutritional adaptation in man". *Am. J. Clin. Nutr.*, 51: 2259-263.
- WATERLOW, J.C.; GARLICK, P.J. y MILLWARD, D.J. (1978a). "The effects of nutrition and hormones on protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". Waterlow, J.C.; Garlick, P.J.; Millward, D.J. eds., North Holland Publishing Co., Amsterdam. pp 625-695.
- WATERLOW, J.C.; GARLICK, P.J. y MILLWARD, D.J. (1978b). En: "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". North Holland Publishing Company, Amsterdam. pp. 596-619.
- WATERLOW, J.C.; GARLICK, P.J. y MILLWARD, D.J. (1978c). En: "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". North Holland Publishing Company, Amsterdam. pp. 682-690.
- WATERLOW, J.C.; NEALE, R.J.; ROWE, L. y PALIN, I. (1972). "Effects of diet and infection on creatinine turnover in the rat". *Am. J. Clin. Nutr.*, 25: 371-375.
- WATSON, J.D. (1971) "Molecular Biology of the gene benjamin", N.Y. Academic press.
- WAXMAN, L. (1982). "Calcium-activated proteases in mammalian tissues". *Methods Enzymol.*, 80: 664-680.
- WILDENTHAL, K. (1975). En: "Lysosomes in biology and pathology". Eds. Dingle, J.T.; Dean, R.T. Vol 4: 167-190. North Holland, Amsterdam.
- WILDHALM, K.; ZWIAUER, K.; HADLE, M. y ROTH, E. (1989). "Plasma concentrations of free amino acids during 3 weeks treatment of massively obese children with a very low calorie diet". *Eur. J. Pediatr.*, 149: 43-47.
- WOOL, I.G.; STIRWALT, W.S.; KURIHARA, K.; LOW, R.B.; BAILEY, P. y OYER, D. (1968). *Rec. Prog. Horm. Res.*, 24: 138-208.
- WURTMAN, R.J.; HEFTI, F. y MELAMED, F. (1980). "Precursor control of neurotransmitter synthesis". *Pharmacol. Rev.*, 32: 315-335.
- YALOW, R.S. y BERGSON, S.A. (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man". *J. Clin. Invest.*, 39: 1157-1175.
- YAMAGUCHI, M y KANDATSU, M (1967). "The metabolic activity of muscle proteins. I. Changes in the activities of glutamic-oxalaceticttransaminase and Ca^{2+} ion-activated ATPase in muscle of rat during protein-dapletion". *Biol. Chem.* 31: 776-787.

- YANG, R.D.; MATTHEWS, D.E.; BIER, D.M.; WEN, Z.-M. y YOUNG, V.R. (1986). "Response of alanine metabolism in humans to manipulation of dietary protein and energy intakes". *Am. J. Physiol.*, 250: E39-46.
- YOKOGOSHI, H y YOSHIDA, A. (1976). "Some factors affecting the nitrogen sparing action of methionine and threonine in rats fed a protein free diet". *J. Nutr.*, 106:48-57.
- YOUNG, V.R.; ALEXIS, S.D.; BALIGA, B.S.; MUNRO, H.N. y MUECKE, W. (1972). "Metabolism of administered 3MH. Lack of muscle transfer ribonucleic acid charging and quantitative excretion as 3MH and its N-acetyl derivative". *J. Biol. Chem.*, 247: 3592-3600.
- YOUNG, V.R.; HAVERBERG, L.N.; BILMAZES, C. y MUNRO, H.N. (1973). "Potential use of 3-methylhistidine excretion as an index of progressive reduction in muscle protein catabolism during starvation". *Metabolism*, 22: 1429-1436.
- YOUNG, V.R. y HILL, G.L. (1981). "Evaluation of protein energy malnutrition in surgical patients from plasma valine and other amino acids, proteins and anthropometric measurements". *Am. J. Clin. Nutr.*, 34: 166-172.
- YOUNG, V.R. y MARCHINI, J.S. (1990). "Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids with reference to nutritional adaptation in humans". *Am. J. Clin. Nutr.*, 51: 270-289.
- YOUNG, V.R.; MEREDITH, C.; HOERR, R.; BIER, D.M. y MATTHEWS, D.E. (1985). "Amino acid kinetics in relation to protein and amino acid requirements: the primary importance of amino acid oxidation". En: "Substrate and energy metabolism in man". Eds Garrow, J.S.; Halliday, D. London: John Libbey, pp. 119-136.
- YOUNG, V.R. y MUNRO, H.N. (1978). "N⁷ Methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: An overview" *Fed. Proc.* 37: 2291-2300.
- YOUNG, V.R. y PLUSKAL, M.G. (1977). "Mode of action of anabolic agents with special references to steroid and skeletal muscle: A summary review". *Proc. 2nd Int. Symp. protein metab. Nutr.* The Netherlands: Centre for Agric. Publishing and Docum. Wageningen. pp. 15-28.
- YOUNG, V.R.; STOTHERS, S.C. y VILAIRE, G. (1971). "Synthesis and degradation of mixed protein and composition changes in skeletal muscle of malnourished and re-fed rats". *J. Nutr.*, 101: 1379-1390.

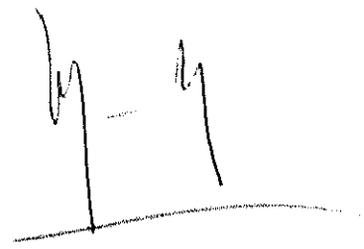
ZHAO, X.-H.; WEN, Z.-N.; MEREDITH, C.N.; MATTHEWS, D.E.; BIER, D.M.
y YOUNG, V.R. (1986). "Threonine kinetics at graded threonine intakes in
young men". Am. J. Clin. Nutr., 43: 795-802.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AA:	Aminoácido/s.
AAA:	Aminoácidos aromáticos.
AAR:	Aminoácidos de cadena ramificada.
AAN:	Aminoácidos neutros.
AAE:	Aminoácidos esenciales.
AANE:	Aminoácidos no esenciales.
AAT:	Aminoácidos totales.
BCAA:	Aminoácidos de cadena ramificada.
3-M-H:	3-metil-histidina
THF:	Tetrahidrofurano.
Ala:	Alanina.
Arg:	Arginina.
Asn:	Asparragina.
Asp:	Ácido aspártico.
Cis:	Cisteína.
Gln:	Glutamina.
Glu:	Ácido glutámico.
His:	Histidina.
Ile:	Isoleucina.
Leu:	Leucina.
Lys:	Lisina.
Met:	Metionina.
Phe:	Fenilalanina.
Ser:	Serina.
Thr:	Treonina.
Trp:	Triptófano.
Tyr:	Tirosina.
Val:	Valina.

Presidente
D. Francisco Ferrer
Vocales
D. Reguero
D. Alonso de Benito
D. Antonio Vique
Secretario
D. Francisco Ferrer

... de ley, el ...
... para esta causa ...
...
do Antonio Ferrer
Madrid, 25 de febrero de 1847
El Secretario del Tribunal

A large, stylized handwritten signature, possibly reading 'M. Ferrer', is written over a horizontal line.