

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Sección Departamental de Fisiología (Fisiología Animal)



**Crecimiento celular y metabolismo proteico del músculo
gastrocnemio del ratón BALB-c entre el destete y la pubertad,
durante la respuesta bifásica a la administración exógena
de rhGH. Influencia de la edad, la dieta y el sexo**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Elvira López-Oliva Muñoz

Directora

Emilia Muñoz Martínez.

Madrid

ISBN: 978-84-8466-884-8

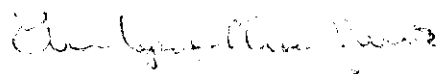
© Elvira López-Oliva Muñoz, 1994

Sección Departamental de Fisiología Animal
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

CRECIMIENTO CELULAR Y METABOLISMO PROTEICO EN MÚSCULO
GASTROCNEMIO DE RATÓN BALB/c ENTRE EL DESTETE Y LA PUBERTAD
DURANTE LA RESPUESTA BIFÁSICA A LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA
DE rhGH. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO.

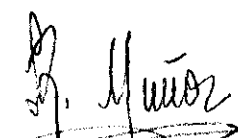
Memoria presentada por D^a M^a Elvira López-Oliva Muñoz para aspirar al grado de
Doctor en Farmacia en el Programa de Doctorado de Fisiología Animal
(Investigaciones recientes).

Madrid, Enero de 1994.



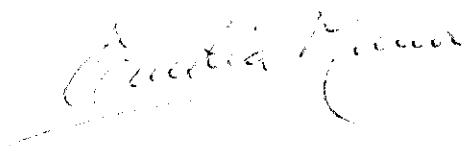
V^oB^o

Directora de la Sección
Departamental


Dra. Rocío Muñoz Calvo

V^oB^o

Directora de la Tesis



Dra. Emilia Muñoz Martínez

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Emilia Muñoz Martínez por la confianza que ha depositado en mí y la constante ayuda, estímulo y cariño que tanto en el campo científico como en el humano me ha dedicado.

A la Dra M^a Teresa Unzaga Marco por su continuo apoyo y orientación, fundamentales para llevar a buen término este trabajo.

A Angel Agis Torres por facilitarme la tarea diaria, mostrándome en todo momento su compañerismo y amistad.

A Berta Jiménez Gancedo por su siempre dispuesta ayuda y colaboración.

A Carmen Bravo Llatas por sus orientaciones en el tratamiento estadístico de esta memoria.

A todos mis compañeros de la Sección Departamental de Fisiología Animal con los que he trabajado durante estos años.

A Pablo Manrique Manrique por la puesta a punto y selección de los animales de experimentación.

A mis padres por su incondicional apoyo y acertadas orientaciones.

A Jesús, a mis hermanos y a mi cuñada Carmen por su interés y continuo apoyo.

A M^a del Mar por acudir siempre que la he necesitado.

ÍNDICE

	Pág.
1.OBJETO	1
2. SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. CRECIMIENTO	7
2.1.1. Crecimiento somático	7
2.1.1.1. Evolución del crecimiento somático	7
2.1.1.2. Mecanismos del crecimiento tisular y orgánico	9
2.1.1.3. Crecimiento celular del cuerpo total	11
2.1.2. Crecimiento del músculo esquelético	12
2.1.2.1. Determinación, diferenciación y maduración del músculo esquelético	12
2.1.2.2. Crecimiento celular del músculo esquelético durante el desarrollo postnatal	13
2.1.2.2.1. Características del crecimiento en diferentes especies	13
2.1.2.2.2. Crecimiento celular de diferentes tipos de músculo .	15
2.1.2.2.3. Influencia del sexo, la especie y la estirpe sobre el crecimiento muscular	16
2.1.3. Crecimiento y síntesis proteica	18
2.1.3.1. Síntesis proteica corporal	18
2.1.3.1.1. Contribución de los diferentes tejidos y órganos al flujo total de síntesis proteica	22
2.1.3.1.2. Tasas de síntesis proteica en diferentes tejidos en relación a la concentración de DNA y RNA	25
2.1.4. Metabolismo proteico del tejido muscular esquelético durante el crecimiento	27
2.1.4.1. Síntesis proteica muscular	27
2.1.4.1.1. Modificaciones de la síntesis proteica en distintos tipos de músculo	29
2.1.4.1.2. Cambios en la concentración del RNA muscular durante el crecimiento y su relación con la velocidad fraccional de síntesis proteica y la síntesis por unidad de DNA	31

2.1.4.2. Cambios en el catabolismo proteico muscular durante el crecimiento	33
2.1.4.2.1. Papel de los lisosomas en el catabolismo proteico muscular	34
2.1.4.3. Regulación del crecimiento. Incremento y disminución anabólica en degradación	36
2.1.4.3.1. Crecimiento asociado a un catabolismo proteico incrementado. El incremento anabólico en degradación	36
2.1.4.3.2. Crecimiento asociado a un catabolismo proteico disminuido. El decrecimiento anabólico en degradación	37
2.1.5. Crecimiento y hormona somatotropa	38
2.1.5.1. Crecimiento muscular y hormona somatotropa	40
2.1.5.2. Metabolismo proteico y hormona de crecimiento	42
2.2. CRECIMIENTO Y ESTADO NUTRITIVO	46
2.2.1. Crecimiento corporal y nutrición	46
2.2.2. Crecimiento muscular y nutrición	48
2.2.2.1. Requerimientos proteicos y crecimiento del músculo esquelético	48
2.2.2.2. Efectos de la alteración en la cantidad de proteínas y/o calorías en la dieta sobre el crecimiento del músculo esquelético	49
2.2.2.2.1. Efectos de la deficiencia en proteínas	49
2.2.2.2.2. Efectos de la deficiencia proteico-calórica y calórica	51
2.2.2.3. Regulación del crecimiento y nutrición	52
2.2.3. Metabolismo proteico y estado nutritivo durante crecimiento	54
2.2.3.1. Síntesis proteica corporal durante el crecimiento e ingesta de nutrientes	54
2.2.3.2. Modificaciones en el metabolismo proteico del músculo en crecimiento por cambios en la dieta	55
2.2.3.2.1. Efectos de una dieta control	55

2.2.3.2.2. Efectos de la deficiencia en proteínas y/o calorías de la dieta sobre la síntesis proteica del músculo esquelético	57
2.2.3.2.2.a. Efecto de la deficiencia en proteínas	57
2.2.3.2.2.b. Efecto de la deficiencia proteico-calórica	59
2.2.3.3. Efecto de la deficiencia dietaria sobre el contenido de RNA y sobre la actividad de RNA en músculo esquelético	60
2.2.3.3.1. Dieta y concentración de ribosomas	60
2.2.3.3.2. Dieta y actividad de RNA	61
2.2.4. Regulación nutritivo-endocrina del metabolismo proteico en el músculo esquelético	63
2.2.4.1. Regulación de la síntesis proteica	63
2.2.4.1.1. Regulación de la actividad de RNA muscular	63
2.2.4.1.2. Regulación de la concentración de ribosomas del músculo	65
2.2.4.2. Regulación del catabolismo proteico muscular	66
2.2.5. Hormona de crecimiento y estado nutritivo	72
2.2.5.1. Relación entre la hormona de crecimiento, la proteína dietaria y la capacidad de depósito proteico	73
2.2.5.2. Relación entre la hormona de crecimiento y la ingesta energética con la capacidad de depósito proteico	76
3. MATERIAL Y MÉTODOS	78
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	79
3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	84
3.2.1. Composición de las dietas utilizadas	84
3.2.1.1. Control de las materias primas y de las dietas	86
3.2.2. Pauta del experimento	87
3.3. PARÁMETROS CONTROLADOS	89
3.3.1. Variables diarias	89
3.3.2. Variables periódicas	89
3.3.3. Variables globales	90

3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	93
3.4.1. Determinación de la proteína muscular	93
3.4.2. Determinación de ácidos nucleicos	94
3.4.2.1. Extracción	94
3.4.2.2. Determinación de ácido desoxirribonucleico (DNA)	95
3.4.2.3. Determinación de ácido ribonucleico (RNA)	96
3.4.3. Determinación del enzima desoxirribonucleasa ácida	97
3.4.4. Determinación del enzima ribonucleasa ácida	98
3.4.5. Determinación del enzima catepsina D	99
3.5. MÉTODOS ESTADÍSTICOS E INFORMÁTICOS UTILIZADOS	101
3.5.1. Métodos estadísticos aplicados	101
3.5.2. Criterios aplicados al estudio del crecimiento	101
3.5.3. Material informático utilizado	102
3.6. APARATOS UTILIZADOS	103
4. RESULTADOS	104
4.1. Influencia de la EDAD, la DIETA, el SEXO y sus interacciones sobre el crecimiento del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c No Tratados (NT).	
Exposición numérica (Tablas 1-8)	105
Descripción de resultados	113
4.2. Influencia de la EDAD, la DIETA, el SEXO y sus interacciones sobre el crecimiento del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c Tratados con rhGH (T).	
Exposición numérica (Tablas 9-16)	116
Descripción de resultados	124
4.3. Efectos de administración exógena de rhGH sobre el crecimiento del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c.	
Exposición numérica (Tablas 17-23 y gráficas 1-4)	127
Descripción de resultados	138
4.4. Dinámica de crecimiento del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c No Tratados (NT) y Tratados con rhGH (T).	
Ecuaciones de regresión y gráficas (5-12)	140
Descripción de resultados	148

4.5. Influencia de la EDAD, la DIETA, el SEXO y sus interacciones sobre el crecimiento celular del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c No Tratados (NT).	
Exposición numérica (Tablas 24-30)	151
Descripción de resultados	158
4.6. Dinámica de crecimiento del número y tamaño celular en músculo gastrocnemio de ratones BALB/c No Tratados (NT).	
Ecuaciones de regresión y gráficas (13-19)	161
Descripción de resultados	168
4.7. Influencia de la EDAD, la DIETA, el SEXO y sus interacciones sobre el crecimiento celular del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c Tratados con rhGH (T).	
Exposición numérica (Tablas 31-37)	170
Descripción de resultados	177
4.8. Dinámica de crecimiento del número y tamaño celular en músculo gastrocnemio de ratones BALB/c Tratados con rhGH (T).	
Ecuaciones de regresión y gráficas (20-25)	180
Descripción de resultados	186
4.9. Efectos de administración exógena de rhGH sobre el crecimiento celular del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c.	
Exposición numérica (Tablas 38-44)	188
Descripción de resultados	196
4.10. Influencia de la EDAD, la DIETA, el SEXO y sus interacciones sobre el metabolismo proteico y del RNA en músculo gastrocnemio en ratones BALB/c No Tratados (NT).	
Exposición numérica (Tablas 45-55)	198
Descripción de resultados	209
4.11. Dinámica de crecimiento del RNA y del enzima catepsina D en músculo gastrocnemio de ratones BALB/c No Tratados (NT).	
Ecuaciones de regresión y gráficas (27,28 y 30)	212
Descripción de resultados	216

4.12. Dinámica del metabolismo proteico durante el crecimiento de músculo gastrocnemio de ratones BALB/c No Tratados (NT).	
Ecuaciones de regresión y gráficas (29)	214
Descripción de resultados	217
4.13. Influencia de la EDAD, la DIETA, el SEXO y sus interacciones sobre el metabolismo proteico y del RNA en músculo gastrocnemio en ratones BALB/c Tratados con rhGH (T).	
Exposición numérica (Tablas 56-66)	218
Descripción de resultados	229
4.14. Dinámica de crecimiento del RNA en músculo gastrocnemio de ratones BALB/c Tratados con rhGH (T).	
Ecuaciones de regresión y gráficas (31 y 32)	231
Descripción de resultados	234
4.15. Dinámica del metabolismo proteico durante el crecimiento de músculo gastrocnemio de ratones BALB/c Tratados con rhGH (T).	
Ecuaciones de regresión y gráficas (33)	233
Descripción de resultados	234
4.16. Efectos de administración exógena de rhGH sobre el metabolismo proteico y del RNA en músculo gastrocnemio de ratones BALB/c.	
Exposición numérica (Tablas 67-77)	235
Descripción de resultados	246
5. DISCUSIÓN	248
5.1. ESTUDIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA <u>NO TRATADOS (NT)</u> Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 Y 20%)	249
5.1.1. Influencia de la EDAD, la DIETA y el SEXO sobre el crecimiento del músculo gastrocnemio	249
5.1.1.1. Estudio alométrico	253
5.1.2. Influencia de la EDAD, la DIETA y el SEXO sobre el crecimiento celular del músculo gastrocnemio	254
5.1.3. Influencia de la EDAD, la DIETA y el SEXO sobre el metabolismo del RNA en músculo gastrocnemio	261

5.1.4. Influencia de la EDAD, la DIETA y el SEXO sobre el metabolismo proteico del músculo gastrocnemio	263
5.2. ESTUDIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA <u>TRATADOS (T)</u> CON HORMONA DE CRECIMIENTO (rhGH) Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 Y 20%). EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE LA HORMONA.	268
5.2.1. Influencia de la EDAD, la DIETA y el SEXO sobre el crecimiento del músculo gastrocnemio	268
5.2.1.1. Primera fase de la respuesta	268
5.2.1.2. Segunda fase de la respuesta	271
5.2.1.3. Estudio alométrico	274
5.2.1.4. Efectos de la administración exógena de la hormona de crecimiento (rhGH)	275
5.2.2. Influencia de la EDAD, la DIETA, el SEXO y el TRATAMIENTO con rhGH sobre el crecimiento celular del músculo gastrocnemio	278
5.2.3. Influencia de la EDAD, la DIETA, el SEXO y el TRATAMIENTO con rhGH sobre el metabolismo del RNA del músculo gastrocnemio	283
5.2.4. Influencia de la EDAD, la DIETA, el SEXO y el TRATAMIENTO con rhGH sobre el metabolismo proteico del músculo gastrocnemio	286
6. CONCLUSIONES	291
7. BIBLIOGRAFÍA	294
8. ABREVIATURAS	330

1. OBJETO

El control homeorrético por parte de la hormona del crecimiento, permite la coordinación metabólica de los tejidos corporales a fin de que puedan adaptarse a la nueva redistribución de nutrientes, inducidos por la hormona, entre los distintos depósitos corporales.

El incremento del tejido magro es uno de los efectos fundamentales de la administración exógena de GH a animales en crecimiento (Bauman y col., 1982), siendo el músculo esquelético el órgano blanco, por excelencia, de la somatotropa.

La GH actúa sobre los dos mecanismos fundamentales que determinan el crecimiento muscular: la proliferación celular y la acreción de la proteína (Allen y col., 1979).

La administración de GH a ratas hipofisectomizadas restaura el número de células musculares por estímulo de la replicación del DNA (Beach y Kostyo, 1968), pero los pocos datos existentes indican que en el animal postnatal intacto, la hormona da lugar a un crecimiento hipertrófico (Fabry y col., 1991). Este crecimiento implica una mayor velocidad de depósito de la proteína muscular, que a su vez, representa el efecto neto de dos procesos: síntesis y degradación proteica, pudiendo cambiar por la alteración de uno o de ambos mecanismos simultáneamente (Reeds y Palmer, 1986).

Sin embargo, las respuestas anabólicas a la administración exógena de GH a animales normales son muy variables. No se aprecian cambios en ratones Snell control (Bates y Holder, 1988) y sólo aparecen efectos pasajeros en ratas (Albertsson-Wikland y col., 1980). No obstante, el tratamiento a corto plazo aumenta la captación de aminoácidos por el músculo bíceps e incrementa la síntesis proteica corporal total en el hombre adulto (Fryburg y col., 1991).

Los resultados más evidentes se han encontrado en rumiantes, aunque la razón por la que se mejora la retención proteica es mal conocida. El incremento de la velocidad fraccional de síntesis proteica, parece ser un fenómeno generalmente aceptado (Pell y Bates, 1987; Eisemann y col., 1989a; Campbell y col. 1989a)

aunque no se conoce bien el mecanismo de acción de la GH, habiéndose postulado tanto el aumento de la capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína), como de la actividad del RNA.

Los efectos sobre la degradación proteica, por su parte, parecen depender del estado fisiológico del músculo en el momento de la administración hormonal, aunque en general, se mantiene estable o se incrementa (Campbell y col., 1989b; Bates y Holder, 1988).

La importancia de un nivel nutritivo adecuado que facilite el aumento GH-dependiente de la acreción del tejido magro, ha sido puesto de manifiesto recientemente (Campbell y col., 1990; Goodband y col., 1990), ya que la insuficiencia de sustratos, especialmente de proteínas, puede suprimir la capacidad de la célula para sintetizar más proteína (MacRae y col., 1991), condicionando el efecto anabólico de la hormona.

Sin embargo la magnitud de la respuesta hormonal no parece depender de la capacidad intrínseca del animal para depositar proteína, puesto que se ha comprobado, que la GH invierte la forma de crecimiento y la tendencia a la distribución de los sustratos corporales entre los sexos (Campbell y col., 1989b) .

Además la capacidad de la somatotropa para reorganizar los procesos metabólicos, varía con el período de vida en el que es administrada. Por ejemplo en animales jóvenes tratados 21 semanas con GH la ganancia de peso se incrementa, pero no se altera ni la retención de nitrógeno ni la composición corporal (Sandles y Peel, 1987), mientras que en animales más viejos se manifiesta claramente el incremento de la masa proteica (Moseley y col, 1982).

En trabajos previos, se ha demostrado a este respecto, que la edad y especialmente la etapa fisiológica del animal condicionan de forma fundamental la respuesta a la administración exógena de GH (Agis, 1994). Así, durante el período del destete, la disminución en la ingesta de alimentos provocada por la hormona (Dalke y col., 1992) desencadena un déficit proteico-calórico que impide el crecimiento del animal, quizás mediante la alteración de los delicados mecanismos de adaptación a la alimentación sólida (Issad y col., 1988), fundamentales durante esta etapa. Esta situación se invierte por la aparición de un fenómeno de hiperfagia autoregulada, mediante la cual, el crecimiento corporal se recupera en un mecanismo

similar al crecimiento compensador, en el que la acción anabólica de la GH parece favorecer la restauración del depósito proteico corporal, si se dispone de un nivel adecuado de proteína dietaria.

A fin de profundizar en el conocimiento de esta respuesta bifásica a la GH en animales al destete, se considera de interés relacionar los mecanismos de crecimiento corporal con la adaptación a nivel muscular, estudiando el efecto de la administración exógena de la rhGH sobre el crecimiento total, la proliferación celular y el metabolismo proteico del músculo gastrocnemio, para poder dilucidar los mecanismos íntimos desencadenados por el efecto hormonal. También son consideradas las influencias del nivel proteico de la dieta y del sexo.

Los objetivos concretos a alcanzar son los siguientes:

1- Examinar los efectos de la administración exógena de hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) a ratones BALB/c entre el destete y la pubertad, sobre el crecimiento total del músculo gastrocnemio, mediante el estudio de las modificaciones de las velocidades de crecimiento del peso y la proteína muscular y su posible dependencia de la eficacia de utilización de la ingesta.

2- Comprobar los cambios inducidos durante la respuesta bifásica a la administración exógena de rhGH, mediante el estudio de los mecanismos de proliferación celular y de acreción de la proteína del músculo gastrocnemio, a través de las modificaciones en la capacidad de síntesis y de degradación proteica.

3- Hacer énfasis en la posible definición de los mecanismos que, a nivel celular, puedan diferenciar el crecimiento de carácter compensatorio y el crecimiento dependiente de la acción somatotrópica.

4- Examinar la influencia del nivel proteico de la dieta en el desarrollo de la respuesta bifásica a la administración exógena de rhGH, mediante la selección de dos porcentajes de proteína dietaria (12 y 20%), elegidos según el rango de requerimientos proteicos del ratón de laboratorio.

5- Estudiar la posible influencia sexual en el proceso.

6- Comprobar los efectos que la interacción entre los factores estudiados: edad, dieta, sexo y administración exógena de rhGH, puede ejercer sobre el crecimiento y el metabolismo proteico muscular.

7- Estudio paralelo en animales control, no tratados, que permita dilucidar la exacta influencia de la hormona del crecimiento.

2. SITUACIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CRECIMIENTO

2.1.1. CRECIMIENTO SOMÁTICO

2.1.1.1. EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO SOMÁTICO.

Todos los embriones de mamíferos presentan, al comienzo de la vida, una única célula de aproximadamente la misma masa y volumen (1000 micrometros³). Durante la implantación, la mayoría de las células del blastocisto tienen una función nutritiva que facilita el flujo de nutrientes entre madre y feto, destinándose muy pocas a la organogénesis.

Debido a que la velocidad de división celular, desde la 64 hasta la 128 generación de células embrionarias, presenta muy poca variación entre las especies, el momento más crítico para la regulación de la masa corporal, se produce después de la aparición de la línea primitiva (Snow y Bennett, 1978), ya que en este estadio los embriones de las diferentes especies empiezan a presentar velocidades de proliferación distintas. En la rata durante las primeras tres semanas de vida prenatal, el proceso mitótico incrementa desde una a dos o tres miles de millones de células (Winick y Noble, 1965).

Se ha demostrado que la velocidad de crecimiento después de la concepción marca la rapidez del desarrollo "in útero" (McCance y Widdowson, 1978). En esta etapa, pequeñas diferencias en el tiempo de duplicación celular pueden dar lugar a grandes divergencias en la masa corporal. Un 10% de diferencia temporal conduce a duplicar el número de células después de sólo 8 generaciones. Diferencias de un minuto en la velocidad de proliferación tienen un impacto sustancial sobre la masa corporal (Falconer y col., 1981).

También el aporte materno-fetal de nutrientes tiene gran importancia sobre el crecimiento durante las últimas etapas de gestación y sobre la composición química del recién nacido (McCance y Widdowson, 1977, Lodge y col., 1978).

El nacimiento tiene una influencia sustancial sobre la función y la masa corporal del organismo en todas las especies. Sin embargo, la relación entre el peso maduro y el peso al nacimiento es función, tanto de la longitud del período de

crecimiento para llegar a la masa y la estatura del adulto, como de la velocidad necesaria para hacerlo. Los roedores tienen altas tasas fraccionales de depósito proteico inmediatamente después del nacimiento (10-20%/día), pero sólo mantienen altas velocidades de crecimiento durante un 6% de su vida media (Reeds y Fiorotto, 1990).

Durante esta primera etapa se produce un aumento proporcional en peso, proteína y contenido de DNA celular. El número de células se incrementa, mientras que el tamaño celular no cambia. Se produce hiperplasia (Winick y col., 1970). El crecimiento proliferativo no se mantiene indefinidamente a la misma velocidad que después de la implantación. De hecho, tanto la masa ganada como la tasa de proliferación se hacen mucho más lentas, y los mecanismos hipertróficos asumen paulatinamente un papel más importante en el incremento de la masa proteica de las células y tejidos corporales.

Cuando la velocidad de síntesis de DNA se hace menor, le sigue el incremento en peso y proteína a la misma velocidad, produciéndose una fase de transición, con participación de ambos fenómenos, hiperplasia e hipertrofia, que termina cuando la síntesis de DNA finaliza. A partir de este momento el crecimiento se realiza exclusivamente por hipertrofia. Finalmente, cuando se estabiliza el peso y la síntesis proteica termina, el crecimiento concluye (Winick, 1970).

Estos datos señalan que el crecimiento total de cualquier órgano se debe a una acreción continua de protoplasma constituida por agua, proteínas y en algunos casos lípidos. El empaquetamiento de este protoplasma en una célula individual depende de la velocidad con que se realiza la síntesis de DNA.

Sin embargo, actualmente se ha sugerido que el período de crecimiento no puede ser dividido simplemente en fases hiperplásica e hipertrófica, puesto que el número de núcleos sigue incrementándose en todos los órganos durante los períodos pre y postnatal y algunas células como las de la mucosa intestinal o la dermis, proliferan a alta velocidad toda la vida.

Del mismo modo, en ratones recién nacidos de cepas seleccionadas para crecer hasta distintos pesos corporales maduros (Falconer, 1973), se ha demostrado que la primera diferencia en el crecimiento es el aumento en el tamaño celular (Rudklidge, 1981).

En el momento de alcanzar la competencia reproductora se produce la disminución o el cese del crecimiento corporal lineal. Las ratas y ratones alcanzan, respectivamente, su madurez sexual cuando el peso es unas 30-40 veces mayor que al nacimiento, siendo similares en ambas especies las cantidades de energía y proteína necesarias para soportarlo (Reeds y col.,1985).

2.1.1.2. MECANISMOS DEL CRECIMIENTO TISULAR Y ORGÁNICO.

El mecanismo por el que los órganos y tejidos crecen, influye no sólo sobre el tamaño final al que pueden llegar, sino también, sobre su capacidad de regeneración y la eficiencia con que funcionan (Goss, 1978). Los vertebrados superiores se caracterizan por un crecimiento limitado, que depende a su vez de la pérdida de la capacidad de crecimiento de sus órganos, en el curso de su maduración (Goss, 1980). Algunos órganos pierden toda su capacidad de proliferación, excepto la de sus entidades subcelulares, mientras que otros retienen su poder regenerativo incluso a niveles histológicos complejos. Por ello, desde los estudios de Bizzozero (1894) se han clasificado los tejidos y órganos corporales de acuerdo a su actividad mitótica y han sido designados como tejidos de carácter estático, tejidos en renovación y tejidos en expansión (Messier y Leblond, 1960).

Desde el punto de vista embriológico todos los tejidos están en crecimiento expansivo, pero cuando sufren cambios en su diferenciación, que son compatibles con la conservación de su potencial mitótico, pueden convertirse en estáticos, en renovables o conservar su categoría de expansibles. En tejidos no mitóticos, el crecimiento se alcanza por multiplicación de las organelas citoplasmáticas, pero está limitado por el último tamaño que pueden alcanzar. Por otro lado, órganos capaces de dividirse pueden crecer teóricamente a tamaños indeterminados si sus unidades funcionales se incrementan proporcionalmente (como en el caso de las glándulas exo o endocrinas), hasta que puedan cumplir las necesidades del adulto.

Los tejidos en renovación pueden sufrir mitosis durante toda la vida pero sus células se pierden a la misma velocidad que son reemplazadas, lo que garantiza la integridad tisular. Su carácter más interesante se debe a que el compartimento diferenciado es distinto al compartimento germinativo. Así, los productos de los nódulos linfáticos y de la médula ósea se liberan a la circulación periférica, donde no existe prácticamente división celular. Sin embargo, la separación entre la sangre circulante y los tejidos hemopoyéticos no es completa, lo que puede ser importante en el mecanismo de regulación del crecimiento. Al mismo tipo pertenecen la epidermis y los tubos seminíferos.

La constante de velocidad de renovación celular sugiere la existencia de una comunicación fisiológica entre los compartimentos diferenciado y germinativo, por lo que el resultado neto permanece constante. Por ello, Goss (1981) indica que la pérdida celular regula la frecuencia de las mitosis y viceversa. Además, la capacidad de estos tejidos para modificar su velocidad de cambio en respuesta a diferencias en las demandas funcionales (eritropoyesis acelerada en hipoxia, linfopoyesis en mecanismos de defensa), es importante para poder comprender los mecanismos de control de su crecimiento. Para Leblond (1972), en estos tejidos predomina el *incremento del número de células sobre el de su tamaño*.

Los tejidos en expansión son también capaces de una actividad proliferativa durante toda la vida o al menos en un período considerable después del nacimiento, pero no sufren un "turnover" constante a nivel celular (Leblond, 1972). Por lo tanto en estos tejidos, el incremento en el número de células es más importante que el del tamaño celular. No obstante, pueden ser capaces de incrementar su tamaño en respuesta a demandas funcionales más altas o bien en períodos de regeneración.

Los mecanismos de regulación que controlan los tejidos en expansión deben prevenir una proliferación incontrolada. Es conocida la capacidad de órganos como hígado, riñón, páncreas y corteza adrenal de sufrir hiperplasia compensatoria. Ello conduce al peligro de sobre-desarrollo, por lo que se necesita comprender, no sólo cómo se estimula la proliferación, sino cuál es la señal que inhibe el crecimiento cuando se ha producido una masa adecuada de tejido.

La tercera categoría de tejidos son los estáticos. Tejidos como el músculo estriado o el nervioso tienen su fase proliferativa exclusivamente en las primeras etapas del desarrollo. Antes de la madurez, se produce el paso del crecimiento hiperplásico al hipertrófico y es el momento en el que los neuroblastos y mioblastos se diferencian, disminuyendo el pool germinativo. Por consiguiente, al igual que los tejidos en renovación, sus células diferenciadas son mitóticamente incompetentes, aunque no tienen una vida media definida, al contrario que en aquellos.

2.1.1.3. CRECIMIENTO CELULAR DEL CUERPO TOTAL.

Según lo señalado anteriormente el crecimiento corporal total, es decir, el conjunto de órganos y tejidos corporales crece por hiperplasia y por hipertrofia. Durante el período fetal de la rata, entre los 14 y los 20 días "in útero", la cantidad de DNA se incrementa 16 veces, mientras que la razón proteína/DNA sólo se duplica (Goldspink y Kelly, 1984).

Después del destete, el crecimiento es más lento y se realiza por hiperplasia, con cambios poco notables en la razón proteína/DNA (Leblond, 1972), de tal modo que la contribución al crecimiento del número de células es mayor que el de su tamaño.

Se ha demostrado en ratas Charles River CD, que desde el día 14 del período fetal hasta la senilidad, el peso corporal aumenta aproximadamente unas 3.550 veces, mientras que el contenido proteico total se incrementa unas 9.000 veces. Este incremento desproporcionado refleja tanto el desarrollo total del animal, como el continuo depósito de proteína que se efectúa en la masa corporal y que oscila entre un 4,7 y un 13,7% en dicho período vital. Por otra parte, la concentración de DNA es más de 500 veces el nivel basal, acumulándose de forma paulatina pero más lentamente que la masa corporal total. Además la velocidad de crecimiento, determinada como el cambio diario en porcentaje de la masa proteica del animal total (%/día), disminuye drásticamente a lo largo de la vida, con valores muy altos entre los días 16 y 18 preparto y muy bajos a partir del destete, lo que se relaciona con las modificaciones simultáneas en las tasas de síntesis y catabolismo proteico durante el desarrollo.

2.1.2. CRECIMIENTO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

2.1.2.1. DETERMINACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

El crecimiento y diferenciación del músculo esquelético proporciona un magnífico ejemplo de las fases del crecimiento orgánico. Durante la determinación del músculo embrionario aparece una población de mioblastos primarios. La formación de células es un proceso de determinación positiva, en el que está implícita una activación transcripcional y no la supresión de la síntesis del mRNA. Se han identificado recientemente dos genes denominados MyD (Myogenic determination gene) (Pinney y col., 1988) y MyD1 (Myoblast determination gene number one) (Davis y col., 1987), que son activados secuencialmente al comienzo de la determinación. Cuando se transfieren a otras células, las inducen a expresar genes que son característicos de miotubos (Davis y col., 1987). En "heterocarions" (Blau y col., 1985), se ha demostrado, que la presencia de productos genéticos músculo-específicos (posiblemente los genes de diferenciación primarios) activan la transcripción de estos genes en células no musculares, aunque éstas hayan sido ya determinadas hacia su propia vía de diferenciación. Además la mayor frecuencia en la expresión del gen muscular de los "heterocarions" son los formados a partir de mioblastos y células diferenciadas de origen mesodérmico, lo que sugiere que ya en etapas muy tempranas las células se predisponen hacia una línea particular de diferenciación (Blau y col. 1985). Sin embargo, se produce un mayor desarrollo "in útero" por el hecho de que son móviles o lo serán inmediatamente después del nacimiento.

Por lo tanto, la presencia de miotubos primarios y secundarios es el punto de partida para los procesos que deben presentarse antes de que el músculo sea totalmente funcional, es decir, antes de que tenga contracciones reguladas externamente.

Estos procesos son seguidos por la expresión, ordenada en el tiempo, de proteínas contráctiles (Whalen y col., 1979) músculo-específicas que se transforman desde la forma fetal a la adulta, con diferente velocidad de contracción

y con modificaciones progresivas en la proporción entre miofibrillas y fibras lentas/fibras rápidas, así como en sus características metabólicas y funcionales (Bass y col., 1975).

Poco después del nacimiento las fibras adquieren mayor número de miofilamentos, aumentando la razón proteínas miofibrilares/proteínas sarcoplásmicas a fin de incrementar su fuerza en respuesta a las demandas funcionales y al aumento de peso. El número de fibras musculares y de núcleos en este momento es fija y por lo tanto es el último paso de la diferenciación muscular, mientras que, en términos funcionales, el músculo está en la etapa de maduración.

2.1.2.2. CRECIMIENTO CELULAR DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL.

2.1.2.2.1. *Características del crecimiento en diferentes especies.*

El crecimiento celular del músculo es único. Las células musculares son multinucleadas, con cientos de núcleos por fibra muscular (Layman y col., 1980), que se alinean a lo largo de la membrana celular o sarcolema.

En la rata, el máximo número de fibras musculares se establece alrededor del nacimiento (Rowe y Goldspink, 1969) (Rayne y Crawford, 1976), mientras que el número de núcleos dentro de cada fibra se incrementa durante los 3 meses siguientes, estando asociado este cambio con la hipertrofia de la fibra muscular (Layman y col., 1980) (Moss, 1968).

Estos núcleos no se dividen, sino que se añaden nuevos núcleos procedentes de las células miogénicas satélites adyacentes, dispuestas entre el plasmalema y la lámina basal de cada fibra muscular (Mauro, 1961; Campion y col., 1984 y Moss y Leblond, 1971). La contribución de estas células satélite al contenido en DNA puede ser mayor que el correspondiente al aumento de la masa proteica, puesto que estas células poseen poco citoplasma.

Teniendo en cuenta la naturaleza multinucleada de la célula muscular Cheek y col. (1971) definen la unidad de DNA como un volumen imaginario de citoplasma controlado por un único núcleo. Es pues un término de tipo operativo que puede ser influido por el número de células no musculares en el tejido, que en la rata es del orden del 20 al 30% (Enesco y Puddy, 1964). El tamaño y el número de éstas unidades de DNA pueden medirse, al igual que en otros tejidos, por la razón proteína/DNA y por la cantidad total de DNA, determinados en el músculo total.

En general, la contribución del número de unidades de DNA es mayor que la del tamaño de las células durante el crecimiento postnatal de la rata (Enesco y Leblond, 1962).

El incremento en proteína y en DNA total del músculo gastrocnemio de ratas entre 3 y 7 semanas de vida da lugar a un aumento de tres veces la razón proteína/DNA (Mendes y Waterlow, 1953), así como del número total de núcleos del músculo (Gordon y col., 1966).

Datos similares se han encontrado en ratas de edades comprendidas entre las 4 y 45 semanas (Durand y Penot, 1970; Durand y col., 1967, 1969), continuando el incremento ponderal y de las proteínas sarcoplásmica y miofibrilar hasta los 140 días de vida (Gordon y col., 1966).

También en ratas de lento crecimiento el desarrollo de los músculos gastrocnemio y cuádriceps se realiza por hipertrofia e hiperplasia, incrementándose 22 veces la proteína muscular entre los días 23 y 330 de vida, mientras que el tamaño celular se incrementa unas 6 veces y el número de células (DNA) se multiplica por cuatro (Millward y col., 1975). Datos similares se han encontrado en ratas CFY de rápido crecimiento (Bates y Millward, 1981).

En el ratón en crecimiento se han descrito incrementos de la cantidad total de DNA (2,42 veces), de proteína (7,2 veces) y de peso muscular por unidad de DNA entre los 7 y 70 días de vida, (Cheek, y col., 1965a) y de 6,7 a 11 veces en la cantidad de DNA entre los 0 y 84 días de vida, con un aumento paralelo en el tamaño celular (Robinson y Bradford, 1969). El aumento en la razón proteína/DNA es de 4,8 a 8,3 veces, entre 1 y 60 días de vida (Aberle y Doolittle, 1976). En otras especies, los rangos de incremento tanto en el número, como en el tamaño celular son muy variables; así, la tasa de DNA oscila entre 4,24 y 4,77 veces en el conejo

(Cordesse y Nougues, 1973), entre 23,3 y 35,4 veces en la oveja (Rattray y col., 1975), entre 1,8 y 2,9 veces (Harbison y col., 1976), 1,5 y 4 veces (Gilbreath y Trout, 1973), ó 6,3 y 7,7 veces (Stickland y col., 1975) en el cerdo, 8 veces en el mono (Cheek y Scott, 1975), entre 3,7 y 5 veces (Cheek y col., 1966) en el hombre y 25,5 veces en el pollo (Montgomery y col., 1964).

El desarrollo de la fibra muscular también se caracteriza por cambios específicos en sus dimensiones transversas y longitudinales, que se correlacionan (Burleigh, 1974; Goldspink, 1974) con las modificaciones en el número de núcleos (Layman y col., 1980). Músculos de fibras anchas de distintas especies presentan más núcleos y una superficie de sección más grande por núcleo a una edad determinada (Landing y col., 1974; Burleigh, 1977; Kelly, 1978).

Para Burleigh (1976) en animales pequeños como el ratón o en grandes como los bóvidos, el número de núcleos de las fibras musculares podría ser bajo y difícil de manipular genéticamente, puesto que mucha parte de la energía se utiliza en el primer caso, para mantener la temperatura y en el segundo, para combatir la gravedad. De acuerdo con esto, el valor medio del número de núcleos por fibra es muy alto en conejos, pollos y quizás ratas, (Burleigh, 1977, Knizetova y col., 1972, Kelly, 1978), mientras que en el ratón, la vaca y el hombre se encuentran valores más bajos (Cardasis y Cooper, 1975, Williams y Goldspink, 1971, Vassilopoulos y col., 1977).

2.1.2.2.2. Crecimiento celular de diferentes tipos de músculo.

El desarrollo muscular varía entre grupos musculares. Existen diferencias marcadas en la concentración de DNA, entre músculos de contracción rápida (plantar y gastrocnemio) y de contracción lenta (sóleo) en ratas Sprague-Dawley (Hubbard y col., 1974). También, los músculos sóleo y tibial anterior (de contracción rápida) entre los 20 días "in útero" y las 44 semanas de vida postnatal en la rata, presentan incrementos en el contenido proteico y en la tasa total de DNA

(Lewis y col., 1984). Su contribución a la masa proteica corporal total permanece constante (0,09-0,015% para el sóleo)(0,6-0,8% para el tibial anterior) durante este período de tiempo. Así mismo, la acumulación de DNA se produce paulatina y correlativamente al aumento de DNA corporal total (Goldspink y Kelly, 1984), lo que determina una constancia relativa en el porcentaje de su contribución al crecimiento somático.

La mayor tasa de DNA/g del músculo sóleo respecto al tibial anterior (Lewis y col., 1984) parece relacionarse con un mayor número de células satélite e intersticiales en los músculos de contracción lenta.

2.1.2.2.3. Influencia del sexo, la especie y la estirpe sobre el crecimiento muscular.

Factores como el sexo, la especie y la estirpe también afectan el crecimiento celular del músculo. En general, la tasa de DNA se incrementa en especies genéticamente seleccionadas para un crecimiento rápido, con el fin de alcanzar un gran tamaño corporal o desarrollar una gran musculatura. Paralelamente se produce un descenso en el tamaño celular, con bajas razones proteína/DNA. Esta tendencia se ha puesto de manifiesto en estudios de selección con ratones (Robinson y Bradford, 1969; Aberle y Doolittle, 1976; Ezekwe y Martin, 1975), en cerdos magros con gran musculatura en comparación con otros más obesos (Buhlinger y col., 1978), en estirpes de pollos de gran tamaño en relación a pollos menos desarrollados (Moss, 1968), y en animales machos o en hembras castradas que poseen mayor musculatura respecto a las hembras de la misma especie, por ejemplo, en ratas (Cheek y col., 1968), conejos (Cordesse y Nougues, 1973) y en el hombre (Cheek y col., 1966, 1971).

Esta variación en sentido inverso del DNA respecto a la razón proteína/DNA parece ser una función de la edad y puede tener un cierto paralelismo con la relación entre el número de las fibras musculares y su sección.

Cerdos con mayor número de fibras tienden a ser más delgados (Staun 1972; Stickland y Goldspink, 1973), como parece suceder en animales vacunos doblemente

musculados (Holmes y Ashmore, 1972). Sin embargo, estirpes de ratón con gran tamaño corporal presentan más número de fibras y con más sección, que estirpes más pequeñas (Byrne y col., 1973; Ezekwe y Martin, 1975).

Se ha sugerido (Burleigh, 1980) que la disminución en la razón proteína/DNA en los músculos de gran tamaño, puede ser consecuencia de varias causas: 1) Un proceso de replicación celular muy lento y prolongado de los animales más grandes (Widdowson 1973; Burleigh, 1976; 1980) que origine fibras relativamente inmaduras, en comparación con animales más pequeños de edad similar. 2) La existencia de un número desproporcionado de células más inmaduras debido a una replicación celular más rápida, lo que origina razones proteína/DNA bajas y 3) Alteraciones de los grandes músculos, que impiden la total expresión de su potencial de crecimiento.

El sexo también parece afectar a la masa, el tamaño y el número de células musculares. Así, en ratas macho Sprague-Dawley entre 3 y 14 semanas de edad, la masa muscular se incrementa linealmente en relación al peso corporal entre los 15 y 144 g. Las hembras presentan al nacimiento la misma masa muscular que los machos, pero la velocidad de crecimiento es menor, en especial después de 8 semanas de edad. La hembra adulta alcanza una masa muscular de 90 g a las 14 semanas, pero comparada la masa muscular con el peso total corporal, la diferencia sexual desaparece (Graystone, 1968).

El crecimiento de la masa celular individual también difiere entre animales machos y hembras. Mientras en las ratas macho en crecimiento aumenta unas diez veces entre 3 y 14 semanas de vida (Gordon y col., 1966 y Millward y col., 1975), en las ratas hembra presenta la misma velocidad que en los machos hasta el destete, incrementándose después velozmente y superando la masa celular de los machos a la novena semana. Ambos se igualan hacia la 13 semana de vida (Cheek y col., 1968, 1971; Elliot y Cheek 1968).

A partir de la pubertad (6-8 semanas) las ratas macho acumulan mayor número de núcleos (DNA) que las hembras, especialmente en los músculos diafragma, sóleo, plantar y gastrocnemio (Garlick y col., 1973). La diferencia es máxima, 2 veces, a las 8 semanas a partir del nacimiento y disminuye, 1,5 veces, a las 14 semanas. Sin embargo, la razón masa muscular/DNA en machos es menor

que en hembras (x0,7) a la 8 semana, incrementándose hacia la 14 semana (x1,08) (Cheek y col., 1968). Para Burleigh (1980) y Millward y col. (1975) el sexo no afecta al tamaño de las fibras musculares, por lo que el número de células parece determinar el tamaño final del músculo en ambos sexos, aunque ello no se corresponde con el hecho, de que el catabolismo muscular es más rápido en las primeras (Waterlow y Stephen, 1968).

2.1.3. CRECIMIENTO Y SÍNTESIS PROTEICA.

2.1.3.1. SÍNTESIS PROTEICA CORPORAL.

El fenómeno del crecimiento se puede considerar como un incremento de la masa proteica. Este depósito de proteína representa el balance entre la cantidad de proteína sintetizada y la degradada por unidad de tiempo. En este sentido Arnal y col. (1983) señalan, que las variaciones en estos parámetros deben ser interpretadas considerando que el desarrollo de los animales es un proceso complejo de aumento del número y la talla de unidades funcionales, asociado a una importante diferenciación tisular.

Se conoce desde hace tiempo (Waterlow y col., 1978) que la velocidad fraccional de síntesis proteica corporal (VFSP) (porcentaje de la proteína renovada/día), cuando se relaciona al peso metabólico, es mayor en el mamífero joven que en el adulto y disminuye en función de la edad en diferentes especies (Richardson y col., 1983), siendo la síntesis menos importante en el hombre (Reeds y Harris, 1981).

La pérdida edad-dependiente de la velocidad fraccional de síntesis proteica es muy rápida en la rata de crecimiento lento después del destete y en el período comprendido entre los 65 y 330 días de vida (Millward y col., 1981b), pero es más rápido que en los animales adultos de la misma especie. En ratas de crecimiento muy rápido (CFY), no sólo la velocidad fraccional de síntesis proteica presenta un valor mucho más alto que en las ratas de lento crecimiento, sino que no se produce la caída contemporánea con el destete.

Disminuciones en la tasa de síntesis proteica total durante el desarrollo se han encontrado en la oveja (Soltesz y col., 1973, Lemons y col. 1976 y Meier y col., 1981) y durante la vida fetal en el cordero, aunque en el momento del nacimiento (Patureau-Mirand y col., 1982) y en los días siguientes parece elevarse de nuevo (Soltesz y col., 1973).

Del mismo modo, en la rata CD albina la velocidad fraccional de síntesis proteica total corporal desciende desde un 73% en el feto de 14 días a un 10,8% en el animal senil. Sin embargo, la tasa absoluta de síntesis proteica total, calculada teniendo en cuenta el aumento de tamaño de los animales, se incrementa aproximadamente 1.500 veces (Goldspink y Kelly, 1984). Datos similares han sido señalados en ratas entre el destete y un año de vida (Waterlow y col., 1978, McNurlan y Garlick, 1980).

La cantidad de proteína sintetizada expresada por unidad de peso corporal, oscila entre 13 y 35 g de proteína/Kg/día, no existiendo cambios prominentes que pudieran relacionarse con acontecimientos significativos del desarrollo como el nacimiento, el destete o la pubertad.

Cambios similares pero con un rango más amplio (14-18g/Kg/día) se han señalado en otras cepas de rata desde el destete hasta la vejez (Waterlow y col., 1978; McNurlan y Garlick, 1980), pero existe mucha menos información de otras especies, incluido el hombre.

Simultáneamente la concentración del RNA corporal se incrementa 1250 veces, lo que conlleva el aumento de la razón RNA/DNA, aún cuando ambos ácidos nucleicos se acumulan mucho más lentamente que la masa corporal, puesto que sus valores descienden en relación al peso (RNA/g).

Por otra parte, la disminución en la tasa de síntesis proteica durante la vida fetal depende tanto de una menor capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) como del descenso en la actividad sintética de los ribosomas. Sin embargo en la vida postnatal, la disminución de la tasa de síntesis sólo depende de una capacidad ribosómica baja (Goldspink y Kelly, 1984).

Este decrecimiento es paralelo al descenso en la velocidad de crecimiento de la proteína corporal. En la vida fetal, ambas tasas la de crecimiento y la de síntesis, son cuantitativamente similares, lo que sugiere la existencia de bajos niveles de

degradación que contribuyen a un crecimiento óptimo. Más tarde, coincidiendo con la época del destete, la tasa fraccional de degradación proteica (VFDP) se incrementa cuatro veces, para descender hasta un 50% a la 44 semana de vida, de forma paralela a la disminución de la síntesis, alcanzando la estabilidad entre la 44 y la 105 semanas de vida.

La medida de la diferencia entre los flujos de síntesis y de degradación de las proteínas señala, con bastante exactitud, la cantidad de proteína depositada y permite conocer mejor el determinismo de la acreción proteica en el curso del crecimiento.

En el cerdo entre los 30 y 90 kg de peso, la tasa de degradación proteica disminuye menos rápidamente que la tasa de síntesis (Reeds y col., 1980), por lo que el rendimiento de fijación de la proteína (proteínas depositadas/proteínas sintetizadas) disminuye de un 22 a un 8%. Por otra parte, como el aporte alimentario de proteínas representa alrededor de un 40% de la síntesis proteica total, cualquiera que sea el peso del animal, es la tasa de catabolismo la que aumenta en función de la edad.

Cuando se incrementa la cantidad de alimento ingerido, a un peso dado, por cada gramo de proteína depositada se produce un aumento de la cantidad de proteínas sintetizadas, que es de 2,2g en el cerdo en crecimiento (Reeds y col., 1980) y de 1,5 g en el niño en realimentación, después de un período de malnutrición (Golden y Waterlow, 1977). Estos resultados confirman las conclusiones de Millward y col. (1976b) y de Waterlow y col. (1978), quienes indican que la tasa de síntesis proteica en el animal o en el hombre en crecimiento, no se puede considerar como la suma de la tasa de síntesis proteica necesaria para el mantenimiento del animal (con depósito de proteína nulo) más la cantidad de proteínas depositadas. Por el contrario, la disminución con la edad del flujo de síntesis proteica, estaría sólo asociada con la fijación de las proteínas en el curso del desarrollo. En realidad, la mayor parte de la síntesis proteica corporal se utiliza en reemplazar la pérdida de proteínas por efecto del catabolismo, siendo sólo una pequeña parte destinada para el propio crecimiento (Reeds y col., 1980).

Existe además una alta correlación entre la tasa de síntesis proteica y la producción de calor, como lo demuestran los estudios realizados en cerdos y ratas magras y obesas utilizando dos pesos y dos niveles de alimentación diferentes (Webster, 1981; Reeds y col., 1980). El elevado coste energético de la acreción proteica se explica por el débil rendimiento del depósito proteico (Buttery y Boozman, 1976; Millward y col., 1976b), a pesar del importante flujo de la síntesis en condiciones de balance nitrogenado nulo (Reeds y Harris, 1981).

Los rendimientos energéticos del depósito proteico, calculados con ayuda del flujo de síntesis proteica, son variables y dan valores más elevados que los medidos a partir de la ganancia proteica (Reeds y col., 1980), aunque no tienen en cuenta parte de los mecanismos implicados en la síntesis de RNA u otros procesos relacionados con la síntesis de proteínas.

Puesto que la velocidad de síntesis proteica en la rata y en ratones de crecimiento rápido al destete, es aproximadamente cuatro o cinco veces su velocidad de acreción proteica (Goldspink y col., 1984) y puesto que se requieren 4 ó 5 ATP para sintetizar una unión peptídica (Millward y col., 1976b; Buttery y Annison, 1973), la síntesis proteica aparece como el mayor componente del gasto energético en animales en crecimiento. Se ha estimado que la síntesis proteica es responsable del 15 al 40% de la cantidad total de calor producido en este período de la vida (Webster, 1986; Reeds y Fuller, 1983).

El coste energético de la acreción proteica durante el crecimiento depende también de la relación proteínas sintetizadas/proteínas depositadas, que a la vez es función de la relación entre los nutrientes energéticos (glúcidos y lípidos) de la dieta.

En el niño en crecimiento y en el realimentado después de malnutrición (Adeniyi-Jones y col., 1979), el flujo de síntesis proteica es relativamente independiente del aporte proteico de la dieta y sólo depende de la energía ingerida. En el obeso, un régimen débil en proteínas casi no modifica la síntesis proteica (Garlick y col., 1980b), mientras que en el hombre joven (20 años), el incremento de la formación de proteínas se relaciona en parte con los lípidos y en especial con los glúcidos dietarios, que dan lugar a una ganancia proteica importante.

En cerdos y niños en crecimiento, el aumento en el depósito de proteínas, originado por un incremento en la ingesta alimentaria, se asocia con mayores velocidades en la síntesis y el catabolismo del cuerpo total (Reeds y col., 1981, Golden y Waterlow, 1977). La acreción proteica más importante se debe a una disminución del flujo de degradación, lo que requiere menos energía que en el caso de un exceso de proteínas. Igualmente se observa que los glúcidos y lípidos de la dieta aumentan muy poco el flujo de síntesis proteica, de modo inverso al efecto de las proteínas dietarias.

El rendimiento energético del depósito proteico varía, por lo tanto, con la ingesta acercándose a valores teóricos cuando es inducido mediante la proteína dietaria (Reeds y Harris, 1981). Además, la relación entre la síntesis proteica y el depósito proteico puede ser modificada por la proporción de nutrientes en la dieta y por las hormonas.

2.1.3.1.1. Contribución de los diferentes tejidos y órganos al flujo total de síntesis proteica.

Las modificaciones de la tasa de síntesis proteica total corporal están en función de los cambios en la proporción de los diferentes tejidos y órganos en el curso del desarrollo respecto a la masa corporal (de acuerdo a la alometría) y de las modificaciones de su propia velocidad de síntesis.

La gran mayoría de los estudios sobre síntesis proteica "in vivo" se han realizado en la rata, aunque existen trabajos efectuados en varios tejidos de diferentes especies, que se han realizado a una edad y con una ingesta de alimentos definidas (Garlick y col., 1976; Nicholas y col., 1977; Arnal y col., 1977; Edmunds y col., 1978, Reeds y col., 1978.).

En todos estos trabajos se llega a la conclusión general de que la velocidad fraccional de síntesis proteica en músculo esquelético es baja, mientras que en los tejidos viscerales es alta, aunque hay alguna controversia acerca de la contribución relativa de los distintos tejidos a la síntesis proteica corporal total (Lobley y col., 1980).

Existe, no obstante, una gran variabilidad en la velocidad de síntesis proteica de los diversos tejidos en los individuos en crecimiento. Mediante el método de infusión constante con tirosina C¹⁴ se ha observado una alta tasa de síntesis fraccional en riñón e hígado (40-70%/día) de ratas entre 100 y 200 g de peso (Chatterjee y col., 1975) (Pain y Garlick, 1974) y tasas mucho menores (11-20%/día) en corazón, músculo y cerebro (Waterlow y col., 1978; Garlick y col., 1975).

Resultados similares se han encontrado en cerdos en crecimiento de unos 75 kg de peso, en este caso la síntesis proteica fraccional máxima corresponde al bazo (30%/día), siendo las de hígado y riñón tres veces superiores a la encontrada en cerebro y siete veces mayor que la correspondiente a los músculos esquelético y cardíaco (Garlick y col., 1976).

Por otra parte, la tasa absoluta de síntesis proteica depende de la composición corporal del individuo, por lo que aquellos tejidos como el músculo, que presentan una mayor proporción respecto al cuerpo total, contribuyen en mayor medida a la síntesis proteica corporal total.

Comparando el valor de la velocidad fraccional de síntesis proteica de los diversos tejidos corporales durante el desarrollo se puede establecer un orden decreciente, que en la rata de 100 g de peso (McNurlan y Garlick, 1980) y entre 3 y 105 semanas (Goldspink y Kelly, 1984; Lewis y col., 1984) corresponde a la siguiente secuencia: intestino delgado > hígado > intestino grueso > riñón > esófago > cuerpo total > corazón y músculo sóleo (contracción lenta) > músculo tibial anterior (contracción rápida). También en corderos pre-rumiantes, la secuencia de la velocidad fraccional de síntesis proteica presenta un orden similar: hígado > intestino delgado > estómago > intestino grueso (músculo liso) > piel > cuerpo total > músculo esquelético (Attaix y col., 1988).

En el animal muy joven, las modificaciones de la tasa de síntesis proteica de los diversos tejidos son relativamente pequeñas, por lo que la contribución de su síntesis en relación a la corporal refleja la masa de cada tejido.

Estos cambios en la velocidad de síntesis proteica son proporcionales a las modificaciones de la capacidad ribosómica tisular. Así, la velocidad fraccional de síntesis proteica y la capacidad ribosómica del hígado de rata a las 44 semanas

postparto, son 9,4 y 8,2 veces superiores, respectivamente, (Goldspink y Kelly, 1984) que en el músculo tibial anterior (Lewis y col., 1984). Por el contrario, la tasa de síntesis por unidad de RNA en los tejidos y en el cuerpo total son muy similares y así permanecen a lo largo de la vida. La mayor excepción puede encontrarse en muchos tejidos inmediatamente antes del nacimiento (20 días de gestación) y en la edad avanzada (105 semanas) (Goldspink y Kelly, 1984; Lewis y col., 1984).

Aunque la tasa de síntesis proteica disminuye en los tejidos corporales durante el desarrollo, no en todos los tejidos desciende de la misma manera. Así, el "turnover" proteico del músculo sigue disminuyendo a lo largo de la vida postnatal (Waterlow y col., 1978; Lewis y col., 1984), decrece menos en riñón (Goldspink y Kelly, 1984) e intestino, mientras que en hígado y tejido linfoide estos cambios son detectados inmediatamente después del nacimiento (Waterlow y col., 1978).

El descenso en la musculatura parece ser el responsable más importante de la pérdida de la velocidad fraccional de síntesis proteica en el animal total. Sin embargo, debido al rápido desarrollo del músculo esquelético después del nacimiento (representando un 70-75% de la proteína corporal), hay una clara desviación en la contribución del músculo a la síntesis proteica corporal total, de aproximadamente el 20% en el feto de 20 días de vida, al 45% en el adulto de 8 semanas (Kelly y Goldspink, 1983). Por el contrario, la contribución hepática a la síntesis total y a la masa proteica disminuye con la edad.

Estas variaciones podrían explicarse por la importancia funcional que cada tejido tiene en los distintos períodos del crecimiento. Los cambios más importantes que se producen en hígado y cerebro aparecen antes del nacimiento, mientras que en el intestino y la musculatura se modifican mucho más tarde, después del nacimiento o a lo largo de la vida postnatal. (Goldspink y col., 1984).

Por otra parte, existen pocos datos sobre la contribución tisular a la síntesis proteica corporal entre diferentes especies (Waterlow y col., 1978). Se han señalado rangos de contribución tisular muy similares en corderos, ratas, cerdos o pollos. La contribución de tejidos con alta velocidad fraccional de síntesis proteica como hígado e intestino es respectivamente de un 12% y un 9% en corderos (Attaix y col., 1988), de un 15% y un 9% en ratas de 100 a 130 g de peso (McNurlan y Garlick, 1980; Preedy y col., 1983), de un 13% en el cerdo (Séve y col., 1986 a,b)

y de un 16% y un 14% en ratas de 18 (Reeds y col., 1982) y pollos de 23 días (Muramatsu y col., 1987b), respectivamente.

La contribución de músculo y piel, por su parte, oscila entre un 25 a un 35% y un 13 a un 18% en las especies señaladas. Además los órganos viscerales y la piel aportan una mayor proporción que el músculo a la síntesis total en animales jóvenes, con pequeñas diferencias entre especies.

2.1.3.1.2. Tasas de síntesis proteica en diferentes tejidos en relación a la concentración de DNA y RNA.

La gran variación existente en la tasa fraccional de síntesis proteica entre los diferentes tejidos se relaciona, de acuerdo con Millward y col. (1973), con la distinta concentración tisular de RNA, y con la cantidad de DNA necesaria para su síntesis, aunque también puede modificarse la actividad del RNA, es decir, la velocidad de síntesis proteica por ribosoma. Por ello, el estudio de la síntesis proteica tisular durante el crecimiento puede realizarse según dos vías bien determinadas:

- a) Cambios en la concentración y en la actividad del RNA.
- b) Modificaciones en la velocidad de síntesis proteica relativa a DNA.

A lo largo del crecimiento disminuye la concentración de RNA tisular relativo a la proteína (RNA/proteína), mientras que la velocidad de síntesis proteica por unidad de RNA (actividad de RNA g/día) apenas se modifica en hígado, riñón, corazón y músculo esquelético de ratas Wistar entre 100 y 200 g de peso, lo que sugiere, que la cantidad de síntesis que controla cada núcleo está en función de la cantidad de su propio RNA (Millward y col., 1973).

Puesto que la mayor parte del RNA tisular es ribosómico, la concentración en ribosomas se corresponde a la tasa de síntesis "in vivo". En muchos tejidos el RNA ribosómico representa, al menos, el 80% del RNA total (Young, 1970) y como la tasa de síntesis por unidad de RNA es parecida entre los diferentes tejidos en condiciones normales, las diferencias en la velocidad fraccional de síntesis proteica "in vivo" reflejan más los cambios en la concentración de RNA, que en su actividad.

Esto implica que o bien la velocidad de elongación (aminoácidos por ribosoma activo/seg) es similar entre tejidos, o que las modificaciones en la tasa de elongación están íntimamente relacionadas con el número de ribosomas activos (polisómicos), por lo que una elongación más rápida puede acompañarse por la existencia de muy pocos ribosomas en actividad (Waterlow y col., 1978). De ello se deduce, que la relación entre la tasa de síntesis proteica y la concentración de RNA puede dividirse en dos componentes:

- 1) La capacidad para síntesis proteica, indicada por la razón RNA/ proteína (una medida de la concentración de ribosomas y que refleja la cantidad del aparato traslacional presente en el tejido).
- 2) La extensión a la cual la capacidad es utilizada, determinada por la velocidad de síntesis por unidad de RNA o actividad de RNA (una medida de la tasa mínima de traslación).

Así en cerebro, corazón y músculo esquelético, los cambios en la velocidad fraccional de síntesis proteica durante el desarrollo son paralelos a las modificaciones en la concentración de RNA, mientras que no existen variaciones significativas en la actividad de RNA (Garlick y col., 1976). En otros tejidos, como hígado y riñón la interpretación es más difícil, aunque se admite que los cambios efectuados durante el desarrollo, van acompañados de modificaciones en la concentración de RNA, cuya actividad permanece constante dentro de estrechos límites (Waterlow y col., 1978).

Por otra parte, puesto que la actividad de RNA cambia poco durante el crecimiento postnatal, las alteraciones en la velocidad de síntesis proteica por unidad de DNA (tasa de síntesis fraccional comparada con la concentración de DNA) puede ocurrir, sólo si hay modificaciones en la razón RNA/DNA (Waterlow y col., 1978).

En muchos tejidos de la rata, las etapas finales de diferenciación ocurren antes e inmediatamente después del nacimiento y se acompañan por aumentos en el contenido ribosómico de la célula, sin modificaciones posteriores en el curso del crecimiento. Así Devi y col. (1963), Winick y Noble (1966) y Moon y Kirksey (1973) señalan incrementos de la razón RNA/DNA en hígado, músculo y cerebro durante las primeras semanas de vida postnatal en la rata. Por el contrario, Waterlow y col. (1978) no encuentran cambios en esta razón en músculo, corazón y riñón de

ratas CFY entre 63 y 771 g de peso, mientras que en cerebro e hígado disminuye ligeramente. En general, parece que la cantidad de RNA por célula permanece relativamente constante en todos los tejidos señalados, en contraste con el aumento en 10 veces el peso corporal.

Esto parece indicar, que si la actividad de RNA y la razón RNA/DNA no cambian durante el crecimiento, la tasa de síntesis por unidad de DNA debe permanecer constante (Waterlow y col., 1978).

2.1.4. METABOLISMO PROTEICO DEL TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO DURANTE EL CRECIMIENTO.

2.1.4.1. SÍNTESIS PROTEICA MUSCULAR.

La tasa fraccional de síntesis proteica muscular en el animal joven es baja comparada con la existente en órganos como hígado y riñón, como se ha demostrado en rata de 100 a 200 g de peso (Chatterjee y col., 1975) (Pain y Garlick, 1974) y en cerdos en crecimiento (Garlick y col., 1976), lo que depende fundamentalmente de la concentración de ribosomas.

Sin embargo, en etapas tempranas del desarrollo, existen altas velocidades fraccionales de síntesis y catabolismo de la proteína muscular que disminuyen con la edad (Millward y col., 1975). Así, en ratas CD albinas (Lewis y col., 1984) y en ratas de lento y rápido crecimiento se ha demostrado una disminución en la velocidad fraccional de síntesis proteica en los músculos gastrocnemio + cuádriceps entre el destete y los 320 días de vida, llegando a decrecer 3 veces entre las 3 y las 105 semanas (Millward y col. 1975; Bates y Millward, 1981).

También en músculo gastrocnemio de ratas Wistar entre el destete y los 90 días de edad se ha encontrado una disminución de la velocidad fraccional de síntesis proteica, entre un 30%/día a los 25 días y un 7,4%/día a los 90 días de vida (Siebrits y Barnes, 1989). Un desarrollo similar de la síntesis proteica muscular se produce en condiciones "in vitro" (Srivastava, 1969; Goldspink y Goldspink, 1977; Saleenn y Nicholls, 1979). Esta disminución edad-dependiente de la velocidad

fraccional de síntesis proteica se compensa por el incremento de la masa muscular en la masa magra total. Así, el aumento de la síntesis proteica muscular total de la rata CFY, oscila entre un 14%/día al destete y un 21%/día en la madurez (Millward y col. 1981a). De modo similar, la síntesis absoluta de la proteína muscular en la rata Wistar es de 0,88 mg/día a los 25 días de edad y de 2,65 mg/día a los 90 días (Siebrits y Barnes, 1989).

A su vez, la velocidad fraccional de crecimiento de la proteína muscular (VFPM) disminuye a lo largo de la vida en el músculo gastrocnemio de rata, oscilando entre un 6,27%/día al destete a un 0,29%/día en la vejez (Millward y col., 1975).

La rapidez de recambio de la proteína puede limitar el crecimiento, dependiendo de la magnitud de aumento de la demanda de aminoácidos y de energía impuesta por las altas velocidades de síntesis proteica. El aporte de aminoácidos no parece tener carácter limitante, puesto que las demandas de estos sustratos son satisfechas por el catabolismo proteico del tejido y sólo las necesidades para crecimiento proceden de fuente exógena. Sin embargo, el aporte energético sí puede limitar el desarrollo, al ser indispensable para alcanzar la máxima velocidad de síntesis proteica. El coste energético de la síntesis proteica es sustancial al proceso (Kielanowski, 1972; Payne y Waterlow, 1971), de tal modo, que en niños, una disminución en el aporte energético puede condicionar su crecimiento, en especial durante el estirón puberal (Ashworth, 1969; Payne y Waterlow, 1971).

También la alta velocidad de crecimiento de la proteína muscular (VFPM) encontrada en el músculo de ratas CFY, depende del coste energético de la síntesis proteica, que en estos animales se traduce en una alta eficiencia de síntesis, definida como la razón síntesis neta/síntesis total (Bates y Millward, 1981). No obstante, la velocidad de crecimiento puede mantenerse a un alto ritmo aún cuando exista una baja eficiencia en la síntesis proteica, mediante el aumento de la velocidad de síntesis, como sucede en ratas muy jóvenes de lento crecimiento (Millward y col., 1975).

2.1.4.1.1. Modificaciones de la síntesis proteica en distintos tipos de músculos.

La intensidad de la síntesis proteica varía entre distintos tipos de músculos, siendo en general más alta en aquellos que contienen fibras rojas de tipo oxidativo, que en los formados por fibras blancas de carácter glicolítico (Goldberg, 1967).

Independientemente del sexo o de la cepa del animal, la tasa fraccional de síntesis proteica en músculos con mayoría de fibras rojas y de contracción lenta, como el sóleo o el diafragma, se duplica respecto a la velocidad fraccional de síntesis proteica, tanto de los músculos plantar y tibial anterior (de fibras blancas) como de los músculos psoas y gastrocnemio (de fibras mixtas) (Bates y Millward, 1981; Watt y col., 1982). Esto significa que los músculos con fibras de contracción lenta poseen un metabolismo proteico mucho más rápido.

Para cada edad, la tasa de crecimiento de la proteína es siempre más alta en músculos de contracción lenta que en los de contracción rápida, lo que parece corresponder a sus más altas velocidades de "turnover" (Goldberg, 1967; Rannels y col., 1977; Millward y Waterlow, 1978; Waterlow y col., 1978; Watt y col., 1982; Kelly y Goldspink, 1982). Así, la velocidad de crecimiento desciende entre un 10,6 a un 1,3%/día en el músculo sóleo y entre 5,9 y 0,2%/día en el músculo tibial anterior de rata, entre el nacimiento y la senectud (Lewis y col., 1984).

Velocidades superiores de crecimiento se han descrito en el músculo plantar de rata durante la hipertrofia inducida por el ejercicio (Goldberg, 1967), en la hipertrofia del diafragma sucesiva a frenectomía (Turner y Garlick, 1974) y en la hipertrofia muscular consecutiva a la rehabilitación nutritiva (Millward y col., 1975), con valores aproximados del 7%/día. Esto demuestra que el trabajo de los miembros para soportar peso o durante la locomoción es el estímulo más importante para el crecimiento del músculo.

También la mayor velocidad de síntesis proteica de los músculos de contracción lenta y quizás de los mixtos se relaciona con su función, puesto que exhiben una capacidad contráctil de tipo continuo, constante y con alta resistencia a la fatiga, a consecuencia de la utilización energética procedente del metabolismo oxidativo de las células. Además, son relativamente insensibles a las hormonas que

controlan la síntesis proteica. Su actividad contrasta con la menor capacidad contráctil de los músculos rápidos con fibras glicolíticas blancas, que se caracterizan por una baja frecuencia de reclutamiento (Ariano y col., 1973; Watt y col., 1982). La actividad de estas fibras se suma cuando los movimientos deben acelerarse y originar una mayor fuerza de contracción. Por ello, las fibras rápidas poseen actividades muy altas de ATPasa en los filamentos de miosina, a fin de incrementar de forma inmediata la escisión del ATP.

Los mayores valores de la razón proteína/DNA del músculo tibial avalan la existencia de fibras con diámetros mayores y con alta capacidad de contracción y de generación de fuerza, en los músculos de contracción rápida.

La relación entre fibras lentas y rápidas de un músculo y los cambios consiguientes de su metabolismo y de su capacidad contráctil, se reflejan a lo largo del crecimiento en las diferentes velocidades fraccionales de síntesis proteica existentes en los distintos músculos. A su vez, las modificaciones de la tasa de síntesis proteica muscular pueden estar determinadas por los cambios en las velocidades relativas del "turnover" de las proteínas individuales, puesto que las proteínas contráctiles se metabolizan más lentamente (Waterlow y col., 1978).

De acuerdo con esto, las proteínas sarcoplásmicas se sintetizan y se degradan dos veces más rápidamente que las miofibrilares, como se ha demostrado en músculos de la pata en ratas (Bates y Millward, 1983) y en los músculos pectoral (Laurent y col., 1978b) y dorsal anterior y posterior de gallo y de pollo (Laurent y col., 1978a). Parecen existir, además, diferencias de especie en las velocidades relativas del metabolismo proteico de las dos fracciones proteicas del músculo esquelético, ya que la razón proteína sarcoplásmica/proteína miofibrilar presenta, en el conejo (Lobley y Lovie, 1979) y en el cerdo valores bajos (1,2), mientras en el hombre la razón encontrada es de 2,7 (Halliday y col., 1988).

Durante el desarrollo, la razón proteína sarcoplásmica/ proteína miofibrilar del músculo gastrocnemio de rata aumenta entre 1,72 en el destete y 2,08 en la madurez, lo que señala que el "turnover" de las proteínas miofibrilares es menor que el de la masa proteica total. Su velocidad de recambio oscila entre 18,7%/día y 3,42%/día, lo que equivale a una vida media de 3,7 y 20,3 días en el músculo gastrocnemio y cuádriceps, respectivamente. Más tarde, en la edad adulta la razón

proteína sarcoplásmica/miofibrilar se hace constante, lo que implica que el "turnover" de las proteínas miofibrilares y la velocidad del metabolismo proteico total disminuyen paralelamente en las ratas más viejas (Bates y Millward, 1983), aunque la causa de estas modificaciones durante el desarrollo no es bien conocida.

2.1.4.1.2. Cambios en la concentración del RNA muscular durante el crecimiento y su relación con la velocidad fraccional de síntesis proteica y la síntesis por unidad de DNA.

La significativa reducción de la velocidad fraccional de síntesis de la proteína muscular durante el crecimiento presenta una alta correlación con la concentración del RNA, puesto que la razón RNA/proteína disminuye de forma paralela. Descensos edad-dependientes en la concentración de ribosomas se han demostrado en los músculos gastrocnemio, cuádriceps, diafragma, sóleo, plantar y tibial de ratas de lento crecimiento (Millward y col., 1975), de ratas de alta velocidad de desarrollo (Bates y Millward, 1981) y de ratas albinas (Waterlow y col., 1978), lo que indica una pérdida de la capacidad ribosómica del tejido.

El primer factor responsable de la caída de la síntesis proteica muscular es la pérdida de la concentración de los ribosomas, aún cuando existen discrepancias acerca de las modificaciones que se producen en la actividad del RNA. Mientras en músculo gastrocnemio de ratas CFY, la actividad ribosómica no parece cambiar sustancialmente con la edad (Bates y Millward, 1981), en ratas al destete de lento crecimiento, la actividad de RNA es dos veces mayor que la encontrada en ratas adultas (19,2g de proteína sintetizada/día/g de RNA) (Millward y col., 1975) mientras que en el músculo tibial de la rata CD albina, entre 44 y 105 semanas de vida, por el contrario, se produce una drástica caída de la velocidad de síntesis por ribosoma (Lewis y col., 1984).

La disminución de la tasa de síntesis proteica muscular durante el crecimiento parece ser una consecuencia inevitable del incremento simultáneo en el tamaño de la fibra muscular y por lo tanto, de la unidad de DNA. Esto es debido,

a que los incrementos de hasta cinco veces el contenido proteico celular (Millward y col., 1975) que dan lugar a la hipertrofia del músculo, no se acompañan de incrementos similares en la concentración de RNA. Por ello, la razón RNA/DNA no alcanza, aunque hay excepciones (Young y col., 1971), valores superiores a 3 en el músculo de rata, presentando poca alteración en el curso del crecimiento (Bates y Millward, 1981; Lewis y col., 1984). Se ha descrito, bien una ligera disminución en la concentración de ribosomas cuando el tamaño de la unidad de DNA se incrementa (Millward y col., 1984), o bien una razón RNA/DNA constante entre los 25 y 320 días en el músculo de la rata CFY (Bates y Millward, 1981). En cualquier caso, la hipertrofia celular da lugar a la caída de la razón RNA/proteína y de la velocidad de síntesis proteica fraccional.

Puesto que la actividad de RNA cambia poco con la edad, la velocidad de síntesis proteica por unidad de DNA tampoco parece afectarse durante el crecimiento. En ratas jóvenes de lento crecimiento, parece existir una velocidad de síntesis/DNA más alta (30%), siendo su descenso durante el crecimiento de menor entidad que la pérdida de la velocidad fraccional de síntesis proteica (Millward y Waterlow, 1978).

Como en la fase final del crecimiento las velocidades de síntesis por unidad de DNA son iguales en diferentes músculos (diafragma, sóleo, plantar y gastrocnemio) y en animales de ambos sexos, a pesar de tener distinto tamaño celular (Millward y Waterlow, 1978), la velocidad fraccional de síntesis proteica variará según el tipo muscular de que se trate, siendo inversa la relación entre el tamaño de la unidad de DNA y la velocidad fraccional de síntesis proteica. Por lo tanto, a menor tamaño celular existirá un metabolismo proteico más rápido (Waterlow y col., 1978; Laurent y col., 1978a).

2.1.4.2. CAMBIOS EN EL CATABOLISMO PROTEICO MUSCULAR DURANTE EL CRECIMIENTO.

El crecimiento muscular, al igual que el de otros tejidos, puede ser regulado no sólo por cambios en la velocidad de síntesis proteica, sino también en la de su degradación.

En general durante el desarrollo, la tasa fraccional de catabolismo proteico (VFDP) es muy alta al destete, disminuyendo con la edad, tanto en músculo de ratas de lento como de rápido crecimiento (Millward y col., 1975; Bates y Millward, 1981). Dado que la tasa de catabolismo es directamente proporcional a la velocidad fraccional de crecimiento de la proteína, es preciso que la velocidad fraccional de síntesis proteica sea aún mayor, para que exista un depósito neto de proteína. Estos cambios parecen ser una modificación de carácter general interespecies del desarrollo muscular (Millward y col., 1978; Millward, 1980a).

Las características estructurales o funcionales de un tejido dado son las que determinan su particular velocidad de degradación proteica. En el músculo, la relación entre velocidad de crecimiento y degradación proteica se ha asociado a la disociación miofibrilar y a la remodelación de la arquitectura del aparato contráctil (Millward y col., 1975). Así, durante el crecimiento las miofibrillas de gran diámetro se dividen longitudinalmente para dar lugar a miofibrillas hijas. La división puede determinar qué porciones de las miofibrillas o de los miofilamentos quedan sueltas y puedan ser fácilmente degradadas, resultando en un alto "turnover" proteico. Un ejemplo de este mecanismo lo presenta la hipertrofia celular inducida por el trabajo del músculo, en el que se produce una remodelación tisular como la indicada, con incrementos de la degradación proteica (Laurent y col., 1978c; Laurent y Millward, 1980).

A consecuencia de la degradación de la proteína muscular, se incrementa la excreción urinaria de 3-Metil-histidina y creatinina en ratas de 100 g de peso (Haverberg y col., 1975). Esto corresponde a un índice de degradación miofibrilar del 4,7% por día, el cual disminuye con la edad hasta un 2,5% por día en las ratas de 300 g. También en el hombre, se ha encontrado un descenso pronunciado en la

excreción de 3-Metil-histidina/Kg de peso corporal desde la etapa fetal a la vejez (Young y Munro, 1978; Uauy y col., 1978), lo que confirma que la masa muscular disminuye con la edad en el hombre, tanto en varones como en mujeres (Young y col., 1976). Sin embargo, la tasa fraccional de catabolismo proteico muscular no varía con la edad dentro del mismo sexo. La contribución muscular al catabolismo proteico total corporal es del 27% en el adulto joven y desciende en un 20% en el viejo, lo que se asocia con el incremento del aporte de los órganos viscerales al metabolismo proteico total en este período de la vida, al contrario que sucede entre el nacimiento y la pubertad. Datos similares se han encontrado en ratas (Young y Munro, 1978), aunque la contribución muscular al metabolismo proteico, en este caso, es sólo de un 10%.

2.1.4.2.1. Papel de los lisosomas en el catabolismo proteico muscular.

El mecanismo preciso por el que las proteínas intracelulares son degradadas, es desconocido. Se acepta que la proteólisis puede ocurrir dentro y fuera de los lisosomas (Wibo y Poole, 1974; Dean, 1975; Seglen y col., 1979; Wildenthal y Crie, 1980; Ballard y Gunn, 1982). Sin embargo, el papel del lisosoma en la regulación del catabolismo proteico en el músculo esquelético no está claro. En este tejido se han identificado morfológicamente lisosomas, aunque en número escaso (Bird y col., 1980, Whitaker y col., 1983), así como proteasas lisosómicas que presentan actividad degradativa sobre las miofibrillas (Bird y col., 1980).

Las enzimas catepsina B y D se visualizan en los lisosomas de la célula muscular por microscopía electrónica (Spanier y col., 1977) en dos localizaciones: a nivel de la región perinuclear, en la vecindad del aparato de Golgi y en el interior de las miofibrillas. Frecuentemente, también aparecen en formaciones laminares, contiguas al retículo sarcoplásmico (Bird y col., 1978).

Ambas enzimas presentan un grado limitado de proteólisis frente a miosina y actina, degradando la catepsina D a la miosina en péptidos menores de 5.000 daltons o en aminoácidos (Schwartz y Bird, 1977). Las catepsinas H e I tienen una actividad específica mucho mayor.

Utilizando inhibidores de proteínas lisosómicas como cloruro amónico, cloroquina, leucepeptina y EP 475, se ha demostrado un descenso en la proteólisis muscular en condiciones "in vitro" (Libby y Goldberg, 1978; Jenkins y col., 1979; Clark y col., 1984), lo que demuestra la relación de la actividad lisosómica con la proteólisis del músculo. Sin embargo, estos estudios no distinguen entre el catabolismo de las proteínas miofibrilares y no miofibrilares. Aproximadamente un 60% de la proteína del músculo esquelético es miofibrilar, pero al ser su velocidad de "turnover" más lenta que la de las proteínas no-miofibrilares (Bates y Millward, 1983), las medidas de la proteólisis total pueden reflejar, principalmente, los cambios producidos en el catabolismo de la proteína no miofibrilar o sarcoplásmica. Se ha demostrado que el tratamiento con cloroquina y leucepeptina no determina efecto alguno sobre el catabolismo de las miofibrillas en células de corazón (Wildenthal y Crie, 1980), ni de músculo esquelético (Riebow y Young, 1980), lo que sugiere que las proteínas miofibrilares pueden ser hidrolizadas en un lugar extralisosómico y posteriormente degradadas a aminoácidos en los lisosomas.

De acuerdo con esto Lowell y col. (1986) indican que la degradación completa de las proteínas miofibrilares se produce por una vía no lisosómica y que la proteólisis total, reflejo de la degradación de las proteínas no-miofibrilares o sarcoplásmicas, se produce al menos en parte en el interior de los lisosomas.

En este mismo sentido, Dice y col. (1978) señalan que aunque los lisosomas participan en el metabolismo proteico muscular, de tal modo que cualquier incremento en la velocidad de degradación durante el ayuno está mediado por proteínas lisosomales, su alteración, parece reflejar la velocidad de cambio en el metabolismo de las proteínas sarcoplásmicas. Éstas parecen ser eliminadas por macroautofagia (Dayton y col., 1981), mientras que la proteína miofibrilar requiere un ataque inicial por proteasas calcio-dependientes (Brooks y col., 1983; Zeman y col., 1986).

Parecen existir, de acuerdo con Lowell y col. (1986) dos vías para la proteólisis en músculo esquelético:

Una vía no lisosómica responsable de la lisis de la proteína miofibrilar y otra lisosómica que parece actuar sólo sobre la proteína no-miofibrilar.

No obstante, es posible que la regulación de la degradación miofibrilar en respuesta a diversos agentes externos como hormonas, estrés, ayuno u otras causas, puedan modificar esta situación.

2.1.4.3. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO. INCREMENTO Y DISMINUCIÓN ANABÓLICA EN DEGRADACIÓN.

Los cambios producidos en el metabolismo proteico durante el crecimiento tisular son complejos y variables, puesto que un mismo tejido modifica su mecanismo de crecimiento ante distintas situaciones.

Estas modificaciones se han estudiado en músculo estriado en crecimiento. La observación de que la degradación en músculo puede cambiar en cualquier dirección, que incluye un decrecimiento en estados catabólicos y un incremento en estados anabólicos, ha conducido a definir los cambios como "anabólicos", para aquellos que se producen durante el crecimiento y "catabólicos" para los que se producen durante la atrofia o el retraso en el crecimiento (Millward, 1980b).

2.1.4.3.1. Crecimiento asociado a un catabolismo proteico incrementado. El incremento anabólico en degradación.

Un mecanismo sorprendente del músculo en desarrollo es que, en algunos casos, el crecimiento está asociado con velocidades elevadas de degradación, lo cual requiere a la vez tasas muy altas de síntesis proteica. Este mecanismo denominado "proteolisis anabólica", para diferenciarlo del incremento catabólico desencadenado en estados de inanición (Millward, 1980 a,b; Goldspink y col., 1983), se produce, como se ha visto más arriba, durante la etapa de crecimiento rápido de los animales más inmaduros.

Este cambio se observa también en el curso de la rehabilitación ponderal, después de un déficit nutritivo (Millward y col., 1975), durante la hipertrofia

muscular obtenida después de frenectomía unilateral del diafragma (Turner y Garlick, 1974), así como, durante el crecimiento inducido por alargamiento del músculo del ala de pollo (Laurent y col., 1978b). Inversamente, cuando el crecimiento muscular se suprime en animales jóvenes, la velocidad degradativa cesa (Millward y col., 1976b).

La naturaleza de este incremento del catabolismo proteico se basa en un cambio necesario de arquitectura del aparato contráctil, que se corresponde con la remodelación, el alargamiento y la proliferación de las miofibrillas musculares, asociado a la modificación del metabolismo de las proteínas citoplásmicas (Millward y col., 1983b).

Durante la elevación del catabolismo en el músculo hipertrofiado, se produce la remodelación del tejido (Sola y col., 1973; Laurent y Millward, 1980; Millward y col., 1981a), observándose una degeneración mitocondrial, junto con la formación de nuevos lisosomas, que contribuyen a la degradación (Hall-Craggs, 1972; Morton y Rowe, 1974).

Sin embargo, la alta tasa del catabolismo proteico encontrada en músculos de pollo de 1 semana de vida, se mantiene cuando el crecimiento se inhibe por deficiencia en aminoácidos. Al mismo tiempo disminuye con el desarrollo, desde un 26,5%/día en la primera semana a un 10%/día en la segunda semana de vida, mientras que la velocidad fraccional de crecimiento se incrementa simultáneamente. Esto señala que en este caso, la alta velocidad de degradación en el músculo neonatal puede ser dissociada del proceso de crecimiento y refleja algún otro acontecimiento dependiente del desarrollo postnatal (Muruyama y col., 1978).

2.1.4.3.2. Crecimiento asociado a un catabolismo proteico disminuido. El decrecimiento anabólico en degradación.

El decrecimiento anabólico en degradación es un mecanismo de crecimiento de cultivos celulares (Hersko y col., 1971) pero del que han sido obtenidos pocos ejemplos "in vivo". Entre ellos destaca la disminución de la tasa catabólica en el músculo de ratas al destete de rápido crecimiento, que cae hasta los valores de la

rata adulta a una edad temprana (Bates y Millward, 1978; Bates y Millward, 1981). El resultado es un crecimiento más rápido, alcanzándose a una menor velocidad de síntesis proteica y con una mayor eficiencia, es decir, con una mayor proporción de proteína sintetizada y una síntesis proteica neta superior (Bates y Millward, 1981).

Este mecanismo se ha observado también después de la administración a ratas hembra de un esteroide anabólico, el acetato de trembolona, el cual acelera el crecimiento por disminución de la tasa del catabolismo proteico, que llega a ser un 69% menor que en los controles. (Vernon y Buttery, 1976; Brown y Millward, 1981). De modo similar, el acetato de trembolona provoca un incremento en la deposición de proteína muscular en ovejas, mediante la disminución de ambas tasas fraccionales, de catabolismo y de síntesis proteica, especialmente de la primera (Sinnott-Smith y col., 1983).

2.1.5. CRECIMIENTO Y HORMONA SOMATOTROPA.

La hormona somatotropa (GH) ejerce una acción fundamental en el control del crecimiento. Presenta efectos reguladores sobre el metabolismo y controla la redistribución de los nutrientes absorbidos durante el crecimiento y la lactación. Su papel sobre el metabolismo es primordial, no sólo en situaciones de equilibrio nutritivo, sino también durante períodos de subnutrición o de mala utilización de los nutrientes.

Los efectos somatotrópicos de la GH se conocen desde hace 60 años, cuando Evans y Simpson (1931) encuentran un incremento ponderal en ratas tratadas con extracto de hipófisis. Posteriormente, Lee y Schaffer (1934) demuestran la modificación del reparto corporal de sustratos por la hormona, mediante el aumento de la acreción de proteína y la reducción del depósito de grasa. Hasta hace poco tiempo, la dificultad de la extracción y purificación de la hormona impidió el estudio y por lo tanto el conocimiento de su mecanismo de acción, especialmente en el campo de la producción animal. Hoy en día, los mejores procedimientos de

purificación y sobre todo el desarrollo de métodos de síntesis por recombinación del DNA, han hecho posible un avance importante en su investigación, aunque la excesiva variedad en el uso de sistemas heterólogos y de distintos niveles farmacológicos de la hormona en animales hipofisectomizados o intactos, han complicado el desarrollo de la base conceptual de la acción de la GH.

Sus efectos generales más conocidos son:

- 1) Regulación de la distribución de nutrientes en el depósito de sustratos.
- 2) Control de la proliferación celular, que puede ser directo o mediado a través de la producción de factores de crecimiento "insulin-like".
- 3) Efectos sobre el metabolismo de los tres principios inmediatos, cuya regulación se realiza por mecanismos homeostáticos y homeorréticos (Bauman y Currie, 1980; Bauman, 1984).

Como es sabido los controles homeostáticos operan minuto a minuto para mantener constante el medio interno. La homeorresis, por su parte, es una regulación endocrina a más largo plazo que dirige la coordinación del metabolismo tisular a fin de controlar de forma prioritaria un estado fisiológico dado. Hoy se acepta que la GH actúa fundamentalmente mediante control homeorrético y por consiguiente como un regulador crónico del metabolismo (Bauman y col., 1982).

Puesto que la GH ejerce un control a largo plazo, sus efectos tendrán lugar sobre mecanismos celulares que tienen una vida media relativamente prolongada (horas o días y no segundos o minutos). Por ello, la retención nitrogenada inducida en animales en crecimiento por administración de la hormona, se incrementa gradualmente en los primeros días de la experiencia, pero no es significativa hasta los 7 ó 10 días de tratamiento (Moseley y col., 1982). Un cambio similar se ha observado en la producción de leche por vacas tratadas con GH (Bauman y McCutcheon, 1986). También los metabolismos glucídico, lipídico y mineral están bajo control homeorrético de la GH (Boyd y Bauman, 1989).

2.1.5.1. CRECIMIENTO MUSCULAR Y HORMONA SOMATOTROPA

La hormona somatotropa (GH) es esencial en el crecimiento y desarrollo corporal y muscular de los animales jóvenes. Se ha demostrado, que el tratamiento con hormona del crecimiento de animales de laboratorio hipofisectomizados (Machlin, 1972; Evoke y col., 1988) o de animales de granja intactos (Early y col., 1990) incrementa el desarrollo del tejido magro a través de la aceleración de la velocidad de crecimiento.

Los efectos promotores del crecimiento de la GH sobre el músculo esquelético se producen mediante la activación de la proliferación celular y de la acreción de la proteína (Allen y col., 1979), funciones sobre las que la hormona parece tener un efecto estimulante, como se ha comprobado en estudios con animales o individuos GH-deficientes. Así, la hipofisectomía en la rata y en el feto de cerdo determina la pérdida de la cantidad total de DNA (Cheek y col., 1965b) y del número de fibras musculares (Hausman y col., 1982, 1987). También individuos enanos con hipopituitarismo presentan un marcado déficit en el número de células musculares y en el tamaño celular. El tratamiento con GH restaura el número de células a niveles normales (Cheek, 1968), estimulando la replicación del DNA muscular (Beach y Kostyo, 1968; Goldspink y Goldberg, 1975) y disminuyendo la razón proteína/DNA (Cheek y col., 1971). Observaciones similares se han realizado en ratas con tumores que segregan GH (Pryor-Jones y Jenkins, 1980; McCusker y Champion, 1986).

La estimulación del crecimiento celular parece producirse a través de la adición de nuevos núcleos a la fibra muscular, por incremento de la proliferación de células satélite, aunque la hormona somatotropa no parece tener una acción directa ni sobre estas células (Allen y col., 1986), ni sobre las células miogénicas "in vitro" (Gospodarowicz y col., 1976).

Sin embargo, Nixon y Green (1984) observan un efecto directo sobre una línea celular de mioblastos ($10T_{1/2}$) en la que la GH promueve la miogénesis y la formación de células musculares multinucleadas. Estos autores sugieren que o bien algunas líneas celulares pueden haber sufrido una selección para mostrar

independencia de la GH durante su evolución, como las usadas comunmente en cultivos (L_6), o bien pueden existir diferentes subtipos de mioblastos que difieren en su dependencia de la hormona.

En contraste con estos resultados, se ha confirmado la acción mitogénica sobre las células satélite y las células miogénicas de las somatomedinas, especialmente de la IGF-I (Allen y col., 1984; Florini, 1985, 1987; Dodson y col., 1985), lo que ha llevado a la teoría de la mediación de los efectos de la GH sobre la proliferación celular por los factores "insulin-like" (Daughaday y col., 1972).

El factor IGF-I, idéntico a la somatomedina C, (Klapper y col., 1983) es GH-dependiente y se considera el principal mediador de los efectos anabólicos de la GH (Herington y col., 1983), aunque también el factor IGF-II parece intervenir en el desarrollo muscular. Se ha demostrado su acción estimulante sobre la proliferación, diferenciación, captación de aminoácidos, "turnover" proteico e incorporación de timidina tritiada en mioblastos y miotubos derivados de ratas recién nacidas o de fetos humanos (Merrill y col., 1971; Ewton y Florini, 1980; Hill y col., 1985), así como su capacidad de inducción del C-fos mRNA en células musculares esqueléticas (L_6) de rata (Ong y col., 1987).

También la GH estimula la formación de IGF-I en varios órganos. Así, la administración de GH incrementa la concentración del mRNA de IGF-I en el hígado del ratón lit/lit (Mathews y col., 1986) y en hígado, corazón y músculo esquelético de ratas hipofisectomizadas (Murphy y col., 1987). La máxima acumulación del mRNA de IGF-I se produce entre las 6 y 12 horas de una única inyección de GH, aunque el aumento comienza ya a la primera hora de su administración, lo que sugiere una gran rapidez en la interacción hormona-receptor para la estimulación de la expresión genética de este factor de crecimiento.

No se conoce, sin embargo, si las células efectoras corresponden a una población seleccionada o si todas las células musculares expresan el mRNA de IGF-I después del tratamiento. Puesto que la GH actúa predominantemente sobre células progenitoras, que forman grandes colonias de condrocitos "in vitro" (Lindahl y col., 1987) y parecen contener material inmunorreactivo semejante al IGF-I (Nilsson y col., 1986), se ha sugerido un mecanismo de acción similar en el músculo esquelético, en el que la hormona podría interaccionar con unas pocas células

progenitoras inmaduras, que a su vez inducirían el crecimiento y desarrollo muscular.

Ello conduce a la hipótesis de que el factor IGF-I, producido localmente, puede actuar de mediador para el efecto estimulador de la GH sobre el crecimiento y el desarrollo en músculo esquelético (Isgaard y col., 1989). Este papel autocrino del IGF-I se ha relacionado con el incremento de los receptores para IGF durante la diferenciación de mioblastos C₂ (Tollefsen y col., 1989a, 1989b).

Sin embargo, más recientemente, se ha demostrado que la administración de GH no cambia los niveles de mRNA IGF-I muscular (Grant y col., 1991), lo que se ha interpretado como un mecanismo de insensibilidad de la síntesis local del IGF-I a la hormona. El autor sugiere que el crecimiento muscular resulta de un efecto directo de la GH (independiente del factor IGF-I), lo que se relaciona con el descubrimiento de receptores musculares específicos para GH (Louveau y Etherton, 1992).

2.1.5.2. METABOLISMO PROTEICO Y HORMONA DE CRECIMIENTO.

Los cambios metabólicos asociados a la acción anabólica de la GH incluyen la inducción de balances positivos de nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, sodio, cloruro (Kostyo y Nutting, 1974) y el aumento del gasto en energía (Salomon y col., 1989) la cual procede del incremento de la hidrólisis grasa, desencadenada incluso en presencia de altos niveles de insulina.

Desde un punto de vista clínico, la reducción de la uremia es el cambio bioquímico más fácilmente detectable en relación a las acciones anabólicas de la GH, y resulta de la disminución en la síntesis de urea, que conduce a la retención nitrogenada (Dahms y col., 1989). Los dos precursores principales de la urea son los aminoácidos, alanina y glutamina, los cuales se liberan del músculo esquelético en cantidades normales después de la administración de GH (Fong y col., 1989). La acción anabólica de la hormona está ligada a la disminución de la cantidad de glutamina que se transforma en urea, aumentando el glutamato en proporción a la

disminución de la síntesis de este catabolito (Welbourne y col., 1989). Al mismo tiempo, se estimula la captación de aminoácidos y la síntesis proteica en el músculo esquelético, mientras que la acción coordinada de la insulina y del factor IGF-I disminuyen el catabolismo, lo que da lugar a un incremento neto de la proteína (Salomon y col., 1991).

Sin embargo, la influencia sobre la síntesis y degradación de la proteína muscular por parte de la hormona de crecimiento es poco conocida.

Estudios con ratas hipofisectomizadas han demostrado que el tratamiento con bGH aumenta la velocidad de síntesis proteica en el músculo sóleo, incrementando la proteína soluble y la miofibrilar (Goldberg y col., 1980).

Más recientemente los estudios se han llevado a cabo en animales intactos. En general, la administración exógena de hormona somatotropa incrementa la síntesis proteica corporal en terneros (Eisemann y col., 1986b), en cerdos (Campbell y col., 1989a), en novillos (Eisemann y col., 1989b), en corderos (Pell y Bates, 1987) y en el ratón Snell enano (Bates y Pell, 1991), lo que parece producirse mediante el aumento de la velocidad fraccional de síntesis proteica. En el ratón Snell enano, Bates y Holder (1988) señalan que la tasa fraccional de síntesis proteica de los músculos gastrocnemio y plantar se modifica también con la duración del tratamiento. Por el contrario, Early y col. (1990) no logran resultados positivos en novillos rbGH-tratados.

También Eisemann y col. (1989b) señalan que la eficacia de depósito de la proteína aumenta un 50% en los animales tratados con GH respecto de los controles, lo que indica el predominio de la síntesis sobre la degradación proteica. Ello pone de manifiesto el efecto de redirección del metabolismo proteico por parte de la hormona, confirmando su función de control homeorrética.

Sin embargo, la influencia sobre el catabolismo de la proteína es mucho menos clara, puesto que la velocidad de degradación proteica puede quedar inalterada (Pell y Bates, 1987), disminuida (Eisemann y col., 1986b) o significativamente incrementada (Bates y Holder, 1988) en animales tratados con la hormona. Aunque, de acuerdo con Bates y Pell (1991), la respuesta de la degradación proteica muscular a la GH parece depender del estado fisiológico en que se encuentre el músculo.

Más recientemente Sève y col. (1993) indican que el depósito proteico

muscular de cerdos tratados con pGH se realiza a través de la estimulación de la síntesis y del "turnover" de la proteína.

A su vez el aumento de la tasa fraccional de síntesis proteica aparece ligado en primer lugar, al incremento en la concentración del RNA (RNA/proteína) (Bates y Holder, 1988; Sève y col., 1993) y en segundo término a la actividad del RNA (Bates y Pell, 1991) en animales intactos GH-tratados. Por el contrario, en ratas hipofisectomizadas sometidas a la hormona el aumento de la velocidad fraccional de síntesis proteica muscular se lleva a cabo primariamente, mediante el incremento de la actividad de RNA y de un aumento marginal secundario de la concentración de RNA (Flaim y col., 1978).

La existencia de respuestas distintas a la GH en diferentes músculos pueden relacionarse con el tipo de fibra muscular y de las características contráctiles de cada una. Es posible que el mayor efecto estimulador de la hormona sobre las fibras musculares lentas, sea la causa de la mayor tasa de síntesis proteica encontrada en el músculo bíceps femoral de cordero, respecto del músculo semitendinoso (Pell y Bates, 1987).

También la etapa de crecimiento o la velocidad de crecimiento del animal puede modificar la respuesta a la GH. Por ejemplo, terneros muy jóvenes tratados durante 21 semanas con bGH, ganan peso pero no retienen nitrógeno, ni se altera la composición de la carcasa (Sandles y Peel, 1987), mientras que terneros más viejos, con un tratamiento a corto plazo, presentan una mayor retención nitrogenada (Moseley y col., 1982).

No se conoce el mecanismo de acción de la hormona de crecimiento sobre el metabolismo proteico, aunque se ha postulado la acción mediadora del factor IGF-I. La administración exógena de IGF-I incrementa la síntesis proteica muscular pero no del hígado del ratón Snell normal (Pell y col., 1989) y por lo tanto la acción de la GH puede ser distinta en ambos tejidos. En este sentido se ha demostrado una alta correlación entre los niveles plasmáticos del factor IGF-I y la actividad del RNA muscular en cerdos tratados con pGH, lo que parece indicar una acción directa de IGF-I sobre el músculo (Sève y col., 1993). También Yacob y col. (1989) observan que la infusión sistemática de IGF-I a ratas disminuye los aminoácidos plasmáticos sin estimular su incorporación a la proteína muscular, lo que sugiere que el IGF-I

tiene una acción inhibitoria de la proteólisis. Sin embargo, el hecho de que la GH estimule la síntesis proteica en el hombre, sin suprimir la proteólisis (Fryburg y col., 1991), indica que la acción de la GH sobre el músculo esquelético se realiza a través de mecanismos diferentes que los del factor IGF-I.

Estos autores (Fryburg y col., 1991) sugieren que al ser los efectos agudos que ejerce la GH sobre el metabolismo de lípidos y glúcidos distintos a los ejercidos por el factor IGF-I (Davidson, 1987) puede concebirse que la GH tenga su propio efecto sobre el metabolismo de la proteína, diferente al del factor IGF-I. Tampoco se descarta que el factor IGF-I liberado en el músculo de forma paracrina tenga efectos diferentes del administrado sistémicamente.

2.2. CRECIMIENTO Y ESTADO NUTRITIVO

2.2.1. CRECIMIENTO CORPORAL Y NUTRICIÓN.

El mamífero en crecimiento requiere un estado nutritivo suficiente que facilite el depósito de sustratos, especialmente de proteínas, para llevar su cuerpo al tamaño adecuado. Cualquier alteración por defecto o por exceso de nutrientes, puede causar modificaciones en la velocidad de crecimiento y en consecuencia en las dimensiones últimas del individuo.

Por lo tanto, el déficit en la cantidad total de alimento, en el contenido proteico y/o calórico de la dieta, así como, la ingestión de dietas altas en grasa, el exceso en la ingesta total o el empleo de dietas de "cafetería", afectan decisivamente el crecimiento corporal y el muscular.

La malnutrición proteico-calórica (MPC), la malnutrición proteica (MP) y el ayuno agotan la masa corporal total del individuo, y la correspondiente a diversos órganos: corazón (McLeod y col., 1972), pulmón, hígado y especialmente músculo esquelético (Dickerson y col., 1972; Dickerson y McAnulty, 1975) sea cual sea la etapa vital en la que se produce: gestación (Stephens, 1980), lactancia (Adlar y col., 1973), postdestete (Harris, 1980a, 1980b) y edad adulta (Muñoz-Martínez y col., 1989).

Igualmente la masa corporal total, la masa corporal total sin grasa y la masa de algunos órganos se modifica por sobrealimentación, dando lugar a un incremento de la masa corporal, en especial durante la lactancia (Winick y Noble, 1967) (Harris, 1980a) y el destete (Stephens, 1980) (Pitts y Bull, 1977; Pitts, 1984). Por el contrario, no se produce modificación alguna después del destete (Stephens, 1980), ni en la vida adulta (Goodman y Ruderman, 1980).

Esto parece significar que los mecanismos fisiológicos que regulan la masa corporal y la orgánica, comienzan a funcionar después del destete y llegan a su máximo en la edad adulta (Pitts y Bull, 1977; Pitts, 1984).

La capacidad de rehabilitación después de un estrés nutritivo también está en función de la etapa ontogénica en la que se ha iniciado la alteración, siendo muy

probable en el adulto y problemática durante las primeras etapas de la vida, con una fase de transición durante el postdestete (Pitts, 1986).

Estas modificaciones en la masa corporal se correlacionan con las que se producen a nivel celular. Así, la sobrenutrición incrementa la masa y el número de células de órganos como hígado, corazón, pulmón, riñón, cerebro y músculo de ratas lactantes (Winick y Noble, 1967; Winick y col., 1968), pero no de animales adultos (Goodman y Ruderman, 1980), mientras que la subnutrición disminuye la masa orgánica y el número de células y/o el tamaño celular, en cualquier período de la vida.

Este efecto se ha descrito en ratas gestantes y al destete sometidas a MPC (McLeod y col., 1972; Dickerson y McAnulty, 1975; Glore y Layman, 1983; Hill y col., 1970) y a MP (McLeod y col., 1972), en ratas adultas sometidas a ayuno prolongado (Goodman y Ruderman, 1980) y en ratones con restricción dietaria durante las etapas de gestación y lactación (Glore y Layman, 1985; Winick y Noble, 1966).

En general se observa una relación recíproca entre los cambios en el número de células y su tamaño. Éste se mantiene constante cuando el número de células cambia y a su vez, al modificarse el tamaño, el número de células se mantiene constante. Antes del destete, los cambios nutritivos afectan al número de células mientras que en la edad adulta, la alteración dietaria modifica de forma fundamental el tamaño celular (Pitts, 1986). Sólo después del destete, ambos parámetros parecen cambiar simultáneamente. (Dickerson y col., 1972; Glore y Layman 1983; Hill y col., 1970).

2.2.2. CRECIMIENTO MUSCULAR Y NUTRICIÓN.

2.2.2.1. REQUERIMIENTOS PROTEICOS Y CRECIMIENTO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético es muy sensible a las variaciones dietarias, lo que influye notablemente sobre el desarrollo general corporal, al ser el músculo el mayor almacén de proteínas somáticas y en mayor proporción respecto a la masa proteica corporal total (Young, 1970; Goll y col., 1977).

El crecimiento óptimo del músculo depende de un aporte suficiente de aminoácidos dietarios, cuyos requerimientos en el animal joven y en el adulto (Muñoz-Martínez y col., 1989) (Smith y col., 1982), no están bien establecidos, aunque niveles entre un 12% y un 24% de proteína dietaria parecen ser óptimos para un desarrollo completo en rata y ratón (Knapka y col., 1974) (Edozien y Switzer, 1978).

Utilizando el crecimiento del músculo esquelético como índice de los requerimientos proteicos de la rata entre el destete y los 35 días de edad, Howarth (1972) indica que el máximo acúmulo de proteína muscular se produce con dietas del 24% de caseína. Hamilton (1939) sin embargo señala, que niveles entre un 12 y un 16% de proteína, son suficientes en ratas de 11 semanas de vida, aunque sugiere que para ratas más jóvenes se precisa un nivel cercano al 20%. Por el contrario Allison y col. (1964) y Smith y col. (1982) demuestran que el máximo crecimiento expresado en peso, proteína, DNA, RNA/DNA y síntesis proteica del músculo, se produce con dietas cuyo contenido es del 15% de caseína, sin que exista un incremento adicional con tasas superiores de proteína dietaria.

En el ratón Swiss, también se ha encontrado un nivel del 13,6% (Goeltsch, 1960) como concentración proteica mínima necesaria para lograr un crecimiento aceptable, y en el ratón CFI el máximo peso ganado se produce con dietas del 11,3% de proteína de huevo o con un 11,9% de proteína de pescado (Korsrud, 1966), mientras que en el ratón híbrido de rápido crecimiento, el máximo desarrollo se alcanza a una concentración del 12,5% de proteína.

De acuerdo con ésto, concentraciones entre el 12% y el 14% de proteína de buena calidad parecen ser adecuadas para el crecimiento del ratón, aunque la cepa del animal y la concentración calórica de la dieta determinan una gran variabilidad en los requerimientos proteicos de esta especie (Knapka y col., 1977).

Ello significa que oscilaciones en cualquier dirección del nivel proteico dietario alrededor del nivel óptimo, pueden afectar profundamente el desarrollo corporal y en consecuencia el muscular.

2.2.2.2. EFECTOS DE LA ALTERACIÓN EN LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS Y/O CALORÍAS EN LA DIETA SOBRE EL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

2.2.2.2.1. *Efectos de la deficiencia en proteínas.*

Como se ha señalado previamente, la subnutrición origina una depleción corporal y orgánica a la que no escapa el tejido muscular esquelético.

La disminución en la concentración proteica de la dieta determina, si se produce durante la etapa del crecimiento neonatal, un significativo retardo de la tasa de síntesis de DNA que conduce a la parada inmediata del crecimiento (Elliot y Cheek, 1968). No parece afectarse sin embargo, el tamaño celular, puesto que no se modifica la razón proteína/DNA manteniéndose normal el crecimiento por hipertrofia (Nnanyelugo, 1976).

En ratas al destete, el acúmulo de DNA en el músculo gastrocnemio se inhibe completamente con dietas del 6% de proteína, aunque el peso y el contenido proteico intracelular se incrementan. Para Howarth (1972) la síntesis de proteínas tiene prioridad sobre la síntesis de DNA en deficiencias proteicas moderadas.

La ingesta de una dieta del 7% de proteína determina, en ratas al destete, pérdidas de la concentración de DNA celular del 54% y del 61% respectivamente, en los músculos sóleo y extensor largo del dedo (ELD) en relación a una dieta control del 15% de proteína (Smith y col., 1982). El depósito proteico también se

reduce, pero no tan drásticamente como el DNA y esta disminución se relaciona con la pérdida de la razón RNA/DNA. Para Trenkle (1974), sin embargo, la concentración crítica dietaria que afecta al acúmulo de DNA muscular, se encuentra entre un 3 y un 6% de proteína.

Deficiencias proteicas más severas (1-3% proteína) conducen al cese total del crecimiento en el músculo gastrocnemio, por reducción del número y del tamaño de las células (Hill y col., 1970) (Mendes y Waterlow, 1953). En estas condiciones, con pérdidas muy grandes en la proteína celular que conducen a la supresión del crecimiento muscular, la disminución en el tamaño de la unidad de DNA condiciona a su vez la caída de la velocidad de síntesis proteica por célula, originando núcleos menos activos que los controles (Waterlow y col., 1978) (Muñoz-Martínez y col., 1992).

También en ratas con malnutrición marginal durante varias generaciones, que nacen pequeñas y crecen lentamente hasta alcanzar el 50% del tamaño de las bien alimentadas, la tasa de crecimiento del DNA es mucho más lenta que en controles, en especial a los 30 días de edad. Ello hace que el déficit en DNA llegue a ser del 40% en ratas de un año, mientras que el tamaño de la unidad de DNA no se modifica.

En las ratas muy jóvenes, la proliferación nuclear se inhibe y los núcleos son mucho menos activos, como resultado de la caída de la razón RNA/DNA y de la incapacidad de mantener la velocidad de síntesis por unidad de RNA al nivel de las ratas bien nutridas. (Millward y col., 1975).

Sin embargo, a pesar de la pérdida de peso, durante el destete es posible la rehabilitación de la función de crecimiento por realimentación hasta que las ratas son sexualmente maduras. Ello se debe a la recuperación de la velocidad fraccional de crecimiento a valores casi normales a los 30 días de vida, por lo que su caída edad-dependiente es menor que en controles.

Por último, el efecto de la ingestión de dietas sin proteínas determina en ratas de 60-90 días de vida (Durand, 1973), en ratas después del destete (Howarth, 1972) y en ratas de 100 gramos de peso (Garlick y col., 1975) una profunda caída del peso corporal y muscular con pérdida del contenido proteico intracelular, que conlleva el decrecimiento del tamaño celular así como la disminución de la tasa de RNA y de la razón RNA/DNA, sin una pérdida significativa del número de células.

2.2.2.2.2. *Efectos de la deficiencia proteico-calórica y calórica.*

La malnutrición proteico-calórica determina en el hombre (Montgomery, 1962), en el gato y en el ratón (Rowe y Goldspink, 1969) la pérdida de peso del músculo y el decrecimiento del diámetro medio de la fibra muscular.

En cerdos jóvenes procedentes de madres sometidas a restricción calórica durante gestación, se produce una disminución de la tasa de crecimiento muscular debido fundamentalmente a la reducción de la multiplicación celular, con poca modificación en el tamaño de la célula (Reznik, 1969). Esta misma causa se observa en músculo de ratas al destete sometidas a un 50% de restricción dietaria, en el que la síntesis y la acumulación de los ácidos nucleicos se inhiben, lo que repercute en el retardo de la síntesis proteica (Howarth y Baldwin, 1971).

Por su parte Wechsler (1964) encuentra en ratas sometidas a subnutrición, la pérdida del número de miofilamentos en la zona periférica de las miofibrillas de las células musculares, mientras que en ratas recién nacidas alimentadas con dietas restringidas (50% del control), disminuye el número de fibras musculares pero aumenta el tamaño celular (Elliot y Cheek, 1968), lo que sugiere que la formación de nuevos núcleos es más sensible a la restricción energética que la acreción de la proteína muscular.

Sin embargo, según Dickerson y col. (1972) la reducción del contenido calórico de la dieta, induce en ratas la disminución de la masa muscular y del número y tamaño de las células. Más recientemente Glore y Layman (1983) indican que el efecto más marcado de la restricción dietaria sobre el crecimiento muscular de ratas gestantes y lactantes, es la disminución en longitud y anchura de las fibras musculares aunque no aparecen cambios en la razón proteína/DNA.

Por su parte, la restricción calórica sin cambios en la proteína dietaria limita la proliferación celular del músculo, pero en este caso el tamaño celular (proteína/DNA) y la razón RNA/DNA se incrementan en comparación a las ratas control, tanto de su mismo peso (Durand y col., 1967) como de su misma edad (Graystone y Cheek, 1969). Paralelamente, la síntesis proteica muscular medida por incorporación de L-lisina C¹⁴ disminuye un 40%, mientras que el catabolismo sólo

desciende un 25%, lo que señala que el tiempo medio necesario para la renovación de las proteínas musculares pasa de 7,5 a 16,1 días (Arnal y col., 1972).

Ambas deficiencias, en proteínas o en calorías, causan un retardo comparable del crecimiento muscular, traducido en los efectos depresivos sobre la concentración de DNA, más sensible a estas deficiencias que la acumulación de la proteína celular (Trenkle, 1974).

Además, el depósito de RNA disminuye en ambos tipos de restricción, muy especialmente por malnutrición proteica, aunque la razón RNA/DNA no cambia durante deficiencia calórica pero sí por déficit proteico (Durand, 1976).

Por último, el ayuno prolongado conduce en ratas de 8 y 16 semanas a la disminución ponderal de los músculos sóleo y extensor largo del dedo. El primero compuesto por fibras rojas de contracción lenta pierde poco peso, mientras que el segundo con un 50% de fibras rojas y un 50% de fibras blancas, pierde un 20% de peso sobre su valor inicial (Goldberg y Chang, 1978). A este respecto Addis y col. (1936) señalan que el músculo esquelético provee la mayor parte de la proteína perdida durante el ayuno, aunque la disminución del peso sea relativamente pequeña. Sin embargo el contenido en DNA no disminuye, lo que sugiere que el decrecimiento del tejido no se debe a la pérdida del número de células, sino a la disminución de su tamaño (Goodman y Ruderman, 1980).

2.2.2.3. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y NUTRICIÓN.

La contribución relativa del número de unidades de DNA al crecimiento normal del músculo esquelético durante el período postnatal de la rata (Enesco y Leblond, 1962; Winick y Noble, 1965) es mayor que la de su tamaño. Por lo tanto, el número de unidades de DNA será el principal determinante del tamaño en la madurez. Si se asume que la velocidad de muerte celular no está sujeta a un control fisiológico, la tasa de producción mitótica de unidades de DNA es, probablemente, el principal mecanismo efector para la regulación del crecimiento (Pitts, 1986).

Hay al menos dos posibles mecanismos para la regulación de la tasa de división celular:

a) Que la síntesis sea dirigida por osciladores biológicos, como se ha propuesto para muchos fenómenos fisiológicos rítmicos (Klevecz, 1978; Shall, 1981; Winfree, 1980).

b) Que las mitosis sean iniciadas cuando la cantidad de protoplasma por DNA alcance un valor umbral (Donachie, 1968; Prescott, 1956), aunque esto no implica necesariamente, que la masa protoplasmática actúe como un estímulo "per se".

Estas dos posibilidades no son mutuamente exclusivas; pueden ser aspectos distintos de un sistema único y además, no están en conflicto con los datos sobre los efectos de factores promotores del crecimiento o sustancias inhibitoras (Baserga, 1981). Puede existir, sin embargo, una tercera posibilidad en la que el número de células de la población mitóticamente competente, pueda ser o incrementada por reclutamiento o disminuida por desaparición.

La dirección por osciladores puede producir unidades de DNA a una velocidad constante, que podría alcanzar la masa corporal predecible a una edad dada y en un individuo normal. Sin embargo, ello no sería posible en animales cuya velocidad de crecimiento está alterada por modificaciones dietarias.

La segunda hipótesis podría explicar estos cambios. Se ha sugerido que una inadecuada provisión de nutrientes podría incrementar el tiempo requerido por una célula para alcanzar su división mitótica y su tamaño celular crítico (Prescott, 1982), lo que dará lugar a una desaceleración del crecimiento de la unidad de DNA. Aparentemente en la rata joven, donde la producción de células nuevas es rápida, la velocidad mitótica es efectiva en el mantenimiento del tamaño de la unidad de DNA y en consecuencia, el cambio en el número de células es el único responsable de la perturbación nutritiva. (En esta edad el tamaño celular se mantiene, aún a costa de un cambio en el número de células y por lo tanto de la masa corporal madura).

En el adulto sin embargo, en el que la producción de nuevas células se reduce drásticamente, la tasa mitótica puede no ser suficiente para controlar el tamaño celular y éste cambia libremente.

Así pues, en la rata adulta donde las alteraciones nutritivas reducen el tamaño de la unidad de DNA, el número de células puede constituir una "memoria" individual del tamaño de sus órganos, por lo que es posible la rehabilitación frente a la malnutrición. Por el contrario, cuando el cambio es en el número de células, como en el caso de ratas jóvenes, el tamaño apropiado es "olvidado" y no es posible la rehabilitación a su valor normal.

2.2.3. METABOLISMO PROTEICO Y ESTADO NUTRITIVO DURANTE CRECIMIENTO.

2.2.3.1. SÍNTESIS PROTEICA CORPORAL DURANTE EL CRECIMIENTO E INGESTA DE NUTRIENTES.

En animales en crecimiento, la mayor parte de la síntesis proteica corporal se relaciona con el reemplazo de la proteína celular perdida por efecto del catabolismo (Reeds y Fuller, 1983) y sólo una menor parte, se utiliza para el crecimiento propiamente dicho.

Aunque los nutrientes favorecen la velocidad fraccional de síntesis proteica corporal (VFSP), cuando los animales maduran y la tasa de crecimiento disminuye, los incrementos en la síntesis proteica que acompañan los aumentos en la ingesta y que superan los requeridos para el mantenimiento, descienden progresivamente. El límite se alcanza en el adulto, donde un aumento de la ingesta superior a la necesaria para alcanzar el balance nitrogenado, tiene poco efecto sobre la velocidad de síntesis proteica. Así se ha demostrado en cerdos (Reeds y Fuller, 1983), ovejas (Reeds y col., 1981) y en el hombre (Motil y col., 1981).

Aunque el efecto de la ingesta de nutrientes sobre la síntesis y la degradación de la proteína corporal, depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentra el individuo, el "status" nutritivo y fisiológico de éste puede influir sobre la respuesta a un cambio de la ingesta en una etapa dada. A este respecto se ha demostrado, que el metabolismo proteico durante el período postprandial está influido profundamente por la ingesta proteica precedente (Clugston y Garlick, 1982b). Del mismo modo,

se ha propuesto que la pérdida de nitrógeno asociada al trauma, resulta de la disminución en la síntesis (consecutiva al cambio en el estado nutritivo) y al incremento del catabolismo proteico determinado por el propio trauma (Clague y col., 1983).

Por otra parte, la síntesis proteica corporal y la oxidación de los aminoácidos se alteran rápidamente cuando cesa la ingesta de alimentos, lo que parece una medida de la rapidez con que aquellos son evacuados del estómago (Clugston y Garlick, 1982a) (Rennie y col., 1982). También en ratas sometidas a una sola comida, la síntesis proteica muscular sólo disminuye cuando el estómago se vacía (Garlick y col., 1973), lo que indica que las señales que median entre la ingesta y el metabolismo proteico corporal cambian rápidamente cuando cesa la absorción de nutrientes.

2.2.3.2. MODIFICACIONES EN EL METABOLISMO PROTEICO DEL MÚSCULO EN CRECIMIENTO POR CAMBIOS EN LA DIETA.

La velocidad con la que se deposita proteína en el músculo esquelético depende de la capacidad de la dieta para aportar suficientes sustratos para el crecimiento y de la capacidad para evocar los factores reguladores que activen los procesos anabólicos necesarios en el desarrollo. El primero de estos factores dependerá a su vez, no sólo de la concentración de la proteína dietaria, sino también de la cantidad de alimento consumida, puesto que dietas marginales en proteína pueden compensar la deficiencia gracias al aumento de la ingesta que favorece el crecimiento normal del músculo (Jepson y col., 1988).

2.2.3.2.1. *Efectos de una dieta control.*

La ingestión de una dieta adecuada en proteína y en energía favorece la velocidad de síntesis proteica muscular, ya que la cantidad de aminoácidos extraídos del plasma es proporcional a los incorporados a la proteína muscular.

Así, en ratas Sprague-Dawley de 21 días sometidas a un 22% de proteína dietaria, ingerida durante 10 días en ciclos de 12 horas/día, se incrementa la velocidad de incorporación de leucina C¹⁴ en la proteína muscular, lo que indica una alta tasa de síntesis proteica (Ogata y col., 1978). La incorporación de leucina C¹⁴ es máxima a las 48 horas de la administración del isótopo en el músculo esquelético de ratas Wistar al destete, aunque la tasa de catabolismo parece ser superior en ratas alimentadas con una ingesta única diaria, respecto a los animales que tienen una ingesta continuada (Pocknee y Heaton, 1978).

Cuando la ingesta de alimentos se realiza en un período diario fijo (4 horas), se observa que en las primeras 24 horas, la velocidad fraccional de síntesis de proteínas se incrementa significativamente hasta un máximo de 22%/día a las 12-18 horas, disminuyendo posteriormente si no se alimenta al animal en un período normal de tiempo, modificándose en razón inversa a la longitud del período de postalimentación (Garlick y col., 1973).

En condiciones "in vitro", se ha comprobado un aumento de la capacidad de incorporación de aminoácidos a la proteína muscular de la rata, después de la ingesta de proteína de alta calidad (Von der Decken y Omstedt, 1970), así como una correlación lineal directa entre el valor biológico de la proteína y la actividad de incorporación en los ribosomas musculares (Omstedt y Von der Decken, 1972). Igualmente en ratas al destete bien nutridas o durante rehabilitación después de deficiencia proteica, la limitación de la síntesis proteica depende de la actividad ribosómica (Millward y col., 1975).

El factor más importante es, sin embargo, la concentración de la proteína dietaria. Parece existir en animales en crecimiento una relación directa entre la ganancia de peso corporal y la velocidad fraccional de síntesis proteica muscular, cuando se ingieren dietas que contienen entre un 5% y un 30% de caseína y entre un 5 y un 15% de grasa, sin que niveles de proteína dietaria superiores, favorezcan más el crecimiento.

Durante esta etapa de la vida dicha relación parece razonable, puesto que los animales maximizan la síntesis proteica incrementando la agregación de ribosomas en mRNA y la capacidad de síntesis proteica en el tejido magro (Layman y col., 1976; Srivastava, 1969).

Por el contrario, la sobrealimentación (Glick y col., 1982), el incremento en la concentración de aminoácidos esenciales en el medio de perfusión del músculo gastrocnemio (Jefferson y col., 1977) y la realimentación de ratas malnutridas (Dickerson y McAnulty, 1975), producen una disminución en la velocidad fraccional de síntesis proteica muscular. Este efecto parece ligado a mecanismos muy sensibles capaces de proteger a los tejidos del impacto de una ingesta excesiva de proteína y que desembocan en el incremento de la degradación proteica y de la formación de urea. (Grisolía y col., 1975; Harper, 1976).

2.2.3.2.2. Efectos de la deficiencia en proteínas y/o calorías de la dieta sobre la síntesis proteica del músculo esquelético.

La respuesta general del músculo esquelético al déficit en energía y proteína de la dieta es una reducción de la velocidad fraccional de síntesis proteica, la cual se evidencia desde el primer día de la deficiencia (Waterlow y col., 1978).

La disminución en la síntesis se acompaña, al menos en las etapas iniciales, de la pérdida de la velocidad fraccional del catabolismo proteico (Garlick y col., 1975). Puesto que la velocidad del catabolismo durante el crecimiento rápido es alta, su disminución cuando el crecimiento se suprime, sugiere que es el propio proceso de crecimiento el que induce estas altas velocidades de degradación. La reducción impuesta por el déficit dietario disminuye la tasa de degradación hasta los niveles de "mantenimiento" existentes en las ratas adultas y a veces a valores más bajos, como sucede en ratas con ingesta restringida en energía (Heard y col., 1977).

2.2.3.2.2.a. Efecto de la deficiencia en proteínas

La deficiencia proteica total en la dieta produce una reducción significativa de la velocidad fraccional de síntesis proteica dentro de las primeras 24 horas de experiencia, a la que sigue una disminución paralela de las tasas de síntesis y catabolismo proteicos, que evita la pérdida de proteína muscular. Posteriormente, el descenso en la velocidad de síntesis se agudiza, mientras que se mantiene el

catabolismo, lo que incrementa la proteólisis (Garlick y col., 1975) (Millward y col., 1974b). En la rata joven la pérdida de la proteína muscular es lenta, porque los tejidos viscerales hacen frente en un primer momento a la insuficiencia dietaria, pero cuando la exposición al déficit se hace crónico, una gran cantidad de proteína se pierde (Mendes y Waterlow, 1953), la cual llega a ser un 60% respecto al control en ratas sometidas al 1% de proteína (Muñoz-Martínez y col., 1992).

Del mismo modo en ratas sin proteína, el porcentaje de pérdida de la velocidad fraccional de síntesis proteica llega a ser del 71% y la de la velocidad fraccional de degradación proteica del 47%, por lo que el animal en estado catabólico, pierde proteína (Jepson y col., 1988).

Las deficiencias proteicas menos drásticas determinan también significativos descensos en la velocidad fraccional de síntesis y de degradación de la proteína muscular, aunque sin pérdida del contenido proteico. Así, la ingestión de dietas con porcentajes del 3,5% (Heard y col., 1977), 4% (Muñoz-Martínez y col., 1989), 5% y 7% (Smith y col., 1982) y 6% de proteína (Howarth, 1972) provocan el incremento de la proteína entre un 20 y un 30% respecto al control en los músculos gastrocnemio y cuádriceps. En ratas en crecimiento marginalmente malnutridas, la velocidad de la síntesis proteica muscular disminuye a los 30 días respecto a las bien nutridas, descendiendo posteriormente a lo largo de la vida. Por otra parte, aunque la velocidad de degradación proteica en estos animales desciende un 50% respecto al control, se mantienen niveles similares a través del desarrollo (Millward y col., 1975), lo que resulta en la normalización de la tasa fraccional de crecimiento.

Se ha señalado recientemente, que la influencia de la deficiencia proteica sobre la síntesis y la degradación de la proteína muscular varía con la cantidad de alimentos ingeridos. Así, en animales sometidos a una dieta del 8% de caseína y que muestran hiperfagia, tanto la velocidad fraccional de síntesis proteica como la velocidad fraccional de degradación proteica se mantienen al nivel de los animales control de su misma edad. Por el contrario, la ausencia de hiperfagia determina una disminución de ambos procesos (Jepson y col., 1988). Ello sugiere que una dieta del 8% de proteína aporta suficiente cantidad de sustratos como para alcanzar unas velocidades de crecimiento normales, gracias al aumento de la eficiencia en la utilización de la proteína.

2.2.3.2.2.b. Efecto de la deficiencia proteico-calórica.

La restricción alimentaria causa un déficit energético, que origina un importante descenso en las velocidades fraccionales de síntesis y de degradación proteica muscular, superior al observado con dietas bajas en proteína (Heard y col., 1977) (Garlick y col., 1975).

En este caso el gran descenso en el catabolismo permite el acúmulo de la proteína intracelular en proporciones entre el 30% (Muñoz-Martínez y col., 1982) y el 70% (Heard y col., 1977) con relación al control.

Por el contrario, en ratones al destete de la línea Ch (hg/hg) de rápido crecimiento y de sus controles de crecimiento normal CH (Hg/Hg) sometidos a una ingesta restringida se ha observado una disminución de las concentraciones de proteína y DNA, así como de las velocidades fraccional y absoluta de síntesis proteica corporal. Dicho descenso es proporcional al grado de restricción dietaria (Bernier y col., 1987).

Descensos en la proteína muscular por déficit calórico-proteico, también han sido señaladas en ratas y ratones por otros autores (Winick y Noble, 1966) (Howarth y Baldwin, 1971) (Robinson y Lambourne, 1970) y se han correlacionado con el incremento en la excreción de 3-Metilhistidina producida a los 7 días de ingerir la dieta restringida (Young y Munro, 1978), lo que refleja altas velocidades de catabolismo muscular.

Del mismo modo en músculo extensor largo del dedo de ratas en ayuno, se produce un incremento muy significativo de la velocidad fraccional de degradación proteica muscular (Li y Goldberg, 1976) que se acompaña de la reducción de la velocidad fraccional de síntesis proteica (Waterlow y col., 1978; Ogata y col., 1978).

Sin embargo en niños con varias formas de malnutrición proteico-calórica se producen menores tasas de excreción de 3-Metilhistidina que en niños bien nutridos, lo que se ha interpretado como un mecanismo de adaptación muscular a fin de favorecer el mantenimiento del balance entre las tasas de síntesis y del catabolismo muscular en estas circunstancias. (Young y Munro, 1978).

Por último, dietas bajas en energía pero sin proteínas determinan en individuos obesos, un descenso del 40% en la síntesis proteica corporal total con una pequeña caída de la degradación. Estos cambios no se producen si la dieta baja en energía contiene proteína, lo que indica que el metabolismo proteico corporal depende del aporte de proteínas para su mantenimiento (Garlick y col., 1980a).

2.2.3.3. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DIETARIA SOBRE EL CONTENIDO DE RNA Y SOBRE LA ACTIVIDAD DE RNA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

2.2.3.3.1. *Dieta y concentración de ribosomas.*

La concentración del RNA muscular es muy sensible a modificaciones agudas en la dieta, tanto en respuesta a la ingestión diaria única de alimento, como frente a alteraciones proteico-energéticas (Millward y col., 1974b), (Young y Aleaxis, 1968) (Howarth y Baldwin, 1971) (Goodman y Ruderman, 1980) (Jepson y col., 1988).

La disminución del ácido nucleico puede ser muy grande por malnutrición. Después de tres semanas de ingestión de dietas bajas en proteínas, sin proteínas o bajas en energía, la razón RNA/proteína decrece alrededor del 60% respecto al control bien alimentado, llegando a ser hasta de un 70% en déficit prolongado (Millward y col., 1975) (Jepson, 1987) (Muñoz-Martínez y col., 1992), aunque es difícil diferenciar cuál de estos regímenes dietarios afectan en mayor medida a la concentración del ácido nucleico.

Después de dos o tres días de ayuno, la concentración de RNA también desciende, con pérdida del 50% (Ogata y col., 1978) en músculo gastrocnemio y del 25% en músculo psoas (Rannels y col., 1978a), mientras que la caída es de un 30% en el sóleo y de un 50% en músculo extensor largo del dedo, cuando el período de inanición es de 5 días (Goodman y Ruderman, 1980).

Estos resultados sugieren que la proteína dietaria parece ejercer un efecto estimulador sobre el RNA muscular, aunque sea escasa la evidencia de un estímulo directo de los aminoácidos sobre la concentración de ribosomas.

A este respecto se ha demostrado recientemente, que las concentraciones de glutamina tienen una influencia reguladora sobre la síntesis proteica muscular a nivel traslacional (MacLennan y col., 1987), presentando correlación lineal con el RNA muscular (Jepson y col., 1988). La causa de esta correlación es poco conocida, aunque se ha sugerido que viene dada por factores hormonales. Puesto que el factor "insulin-like" (IGF-I) es sensible a la proteína dietaria (Prewitt y col., 1982; Yahya y col., 1986) y ejerce una influencia básica sobre la proliferación "in vitro" de células satélite musculares (Dodson y col., 1985) y puesto que la síntesis de DNA es un factor limitante para la síntesis de RNA durante el crecimiento normal del músculo (Millward, 1980a), el factor IGF-I podría influir sobre la correlación entre la proteína dietaria y el RNA muscular.

La proteína dietaria parece estimular el crecimiento muscular en forma directa por incremento del contenido en RNA muscular, independientemente del mecanismo mediador. Por el contrario, la energía dietaria no parece tener influencia sobre el crecimiento del músculo (Jepson y col., 1988).

2.2.3.3.2. *Dieta y actividad de RNA.*

La influencia que las modificaciones en la concentración del RNA muscular tienen sobre la velocidad de síntesis fraccional de la proteína, depende de cómo la actividad del RNA, es decir, la cantidad de proteína sintetizada por mg de RNA, responde a cada tipo de dieta administrada. Los datos existentes son contradictorios; se ha señalado que los ribosomas aislados de ratas malnutridas contienen menos peptidil-tRNA, lo que determina una menor capacidad para incorporar aminoácidos marcados "in vitro" (Von der Decken y Omstedt, 1972) (Young y col., 1968). Del mismo modo, la velocidad de síntesis por unidad de RNA se reduce entre un 25% y un 50% en ratas en ayuno, respecto a las bien alimentadas (Henshaw y col., 1971), variando la actividad del RNA con la velocidad de crecimiento. Por el contrario, en

2.2.4. REGULACIÓN NUTRITIVO-ENDOCRINA DEL METABOLISMO PROTEICO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

2.2.4.1. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS PROTEICA.

Existen dos tipos fundamentales de regulación que afectan a la síntesis proteica muscular: el grado de utilización del músculo y el estado nutritivo.

La regulación nutricional está mediada a su vez por cambios hormonales inducidos por la dieta y se establece tanto sobre la actividad como sobre la concentración de RNA.

2.2.4.1.1. Regulación de la actividad de RNA muscular.

La insulina juega un papel primordial sobre la regulación traslacional. Se ha demostrado que el tratamiento con insulina normaliza la actividad deprimida del RNA en ratas diabéticas (Millward y col., 1976a; Odedra y col., 1982.)

Esta acción parece ejercerla sobre el proceso de iniciación (Jefferson, 1980), mediante estimulación de la actividad del RNA a concentraciones fisiológicas de la hormona. A este respecto, se ha demostrado una correlación lineal entre la concentración de insulina y la tasa de síntesis proteica, así como entre la insulina y la actividad del RNA, en especial en animales malnutridos (dietas de 0 y 4,5% de proteína), cuyos coeficientes de correlación resultan más altos cuanto más bajos son los niveles de la hormona (< 20 mU/ml) (Jepson y col., 1988).

La reducción en la velocidad fraccional de síntesis proteica muscular en estados de malnutrición se produce por lo tanto mediante la disminución en el proceso de traslación que conlleva, como ya se ha visto previamente, un descenso de la actividad del RNA (Millward y col., 1975; Garlick y col., 1975; Waterlow y col., 1978).

El efecto insulínico también se ha observado durante la respuesta a la realimentación en ratas ayunadas toda la noche, registrando un rápido aumento (dentro de los primeros 60 minutos) de la síntesis proteica muscular (Garlick y col., 1983), que resulta del incremento correlativo de la concentración de insulina plasmática.

La mayor sensibilidad de la síntesis proteica muscular a la insulina se produce, de acuerdo con lo antedicho, con valores plasmáticos menores de 20 $\mu\text{U/ml}$, aunque concentraciones tan bajas como 10 $\mu\text{U/ml}$ son suficientes para alcanzar incrementos modestos en la actividad de RNA en ratas Zn-deficientes (Giugliano y Millward, 1984).

En contraste, Garlick y col. (1983) encuentran que la insulina no tiene efecto por debajo de 40 $\mu\text{U/ml}$. Además, si el incremento en insulina se bloquea por administración de un suero anti-insulina antes de la realimentación, aparece una inhibición parcial de la recuperación de la síntesis proteica (Millward y col., 1983a), lo que sugiere que algún otro factor, que no es la insulina, está implicado en la estimulación de la síntesis proteica durante la rehabilitación después del déficit nutritivo.

El efecto insulínico puede ser modificado por los glucocorticoides. Además de sus acciones catabólica e inhibitoria sobre la síntesis proteica muscular (Munro, 1964), estas hormonas podrían suprimir la síntesis proteica contrarrestando el efecto estimulador de la insulina (Millward y col., 1981b). Así, grandes dosis de corticosterona inhiben el crecimiento muscular suprimiendo la síntesis proteica, aún cuando los niveles de insulina sean muy elevados (Odedra y Millward, 1982). La inhibición simultánea de la estimulación de la actividad del RNA, se ha demostrado por el hecho de que la normalización de la síntesis proteica después de la infusión de insulina a ratas diabéticas, no se produce antes de las seis horas de la administración (Odedra y col., 1982). Por el contrario, ratas diabéticas adrenalectomizadas responden en la primera hora post-administración. Debido al alto nivel de corticosterona existente en ratas diabéticas y al mecanismo de resistencia a la insulina de las ratas adrenalectomizadas tratadas con corticosterona, se piensa que el mecanismo de resistencia a la insulina de los diabéticos, refleja los niveles elevados de corticosterona.

También durante realimentación después de una deficiencia nutritiva, el incremento en insulina se acompaña con un gran descenso en la concentración de corticosterona, ya a los 30 minutos de experiencia, el cual se correlaciona muy estrechamente con la recuperación de la síntesis proteica (Millward y col., 1983a). Este efecto inhibitor de la estimulación insulínica de la síntesis proteica muscular es, sin embargo, parcial. Tampoco la disminución de la actividad de RNA, después del tratamiento con corticosterona (Odedra y Millward, 1982), es tan marcada como el observado en ratas diabéticas (Odedra y col., 1982). Por ello se sugiere que la corticosterona tiene dos efectos independientes sobre la síntesis proteica muscular: uno, la inhibición del efecto estimulador de la insulina y otro como primer regulador a nivel ribosómico, quizá mediante la inhibición de la síntesis del rRNA (Millward y col., 1983a).

2.2.4.1.2. Regulación de la concentración de ribosomas del músculo.

La concentración del RNA parece estar regulado fundamentalmente por dos hormonas: triyodotironina (T_3) y glucocorticoides. Después de tiroidectomía se produce en la rata una pérdida del RNA muscular previa a cualquier otro cambio bioquímico y reversible por tratamiento con T_3 y T_4 (Brown y col., 1981) (Flaim y col., 1978) (Brown y Millward, 1983).

Ya que el contenido en RNA muscular se restaura con el tratamiento con T_3 , no parece ser necesaria la presencia de insulina para mantenerlo (Brown y Millward, 1980). La importancia fisiológica del papel de las hormonas tiroideas se basa en la relación existente entre el nivel del "turnover" proteico muscular y la tasa metabólica total.

El efecto de la hormona T_3 libre puede realizarse a través de la regulación de la síntesis del RNA (Grimble, 1981), estimulando su formación (Jepson y col., 1988) y en consecuencia favoreciendo la capacidad de síntesis proteica muscular.

El efecto sería directo sobre el músculo, al igual que lo es la acción de esta hormona sobre la fase de maduración del cartílago en crecimiento en condiciones "in vitro", que se ha demostrado es independiente del factor IGF-I (Burch y Van Wyk, 1987).

Puesto que hay una reducción de la T_3 libre en estados de subnutrición (Cox y col., 1981) y durante malnutrición proteica tanto moderada como severa (Jepson y col., 1988), no es sorprendente la marcada disminución de la velocidad de síntesis proteica que se produce en estas situaciones.

Simultáneamente se produce un incremento de la concentración de los glucocorticoides, que también presentan un efecto negativo sobre los ribosomas. El tratamiento con corticosterona reduce los niveles del RNA muscular en ratas (Odedra y Millward, 1982), disminuyendo la velocidad de su síntesis (Goodlad y Onyezali, 1981), por lo que ambas hormonas interaccionan regulando los niveles del RNA muscular. En este sentido, se ha señalado que el efecto inhibitorio de la corticosterona sobre la síntesis del RNA muscular, predomina sobre el efecto estimulador de la T_3 (Millward y col., 1983a).

2.2.4.2. REGULACIÓN DEL CATABOLISMO PROTEICO MUSCULAR.

El catabolismo proteico muscular parece tener dos respuestas perfectamente definidas ante las modificaciones dietarias:

- 1) El déficit proteico y/o energético conduce a una disminución de la velocidad del catabolismo muscular que es paralela a la caída de la síntesis proteica, impidiendo la pérdida de la proteína muscular a pesar de la supresión del crecimiento. Sólo con la prolongación de la dieta deficiente, se produce un incremento en la relación catabolismo/síntesis proteica que favorece la disminución del contenido de la proteína muscular, aún cuando el valor total de la velocidad fraccional de degradación proteica es la mitad del valor control (Garlick y col., 1975) (Millward y col., 1975).

2) La respuesta a un estrés nutritivo más severo como el ayuno (Wassner y col., 1975) determina al igual que frente al trauma o la infección (Beisel, 1984) (Baracos y col., 1983), un incremento significativo de la tasa fraccional de catabolismo proteico muscular acoplada a una caída de la síntesis proteica, lo que acelera la movilización y la pérdida rápida de la proteína (Millward y Waterlow, 1978) (Li y Goldberg, 1976).

No obstante, también en ratas sometidas a 2 días de ayuno, se ha descrito una disminución del 23% de la degradación proteica muscular, que aumenta posteriormente (Millward y col., 1976b).

Ambas respuestas se acompañan de modificaciones en el mismo sentido, de la excreción de 3-Metil-Histidina, lo que refleja la tasa de degradación miofibrilar (Haverberg y col., 1975) (Wassner y col., 1975) (Young y col., 1973).

Los factores que influyen sobre la regulación del catabolismo muscular son fundamentalmente de carácter hormonal. En estudios con músculos aislados "in vitro", incubados en buffer Krebs-Ringer bicarbonatado y no suplementado, en los que el catabolismo proteico excede varias veces el valor de la síntesis proteica (Li y Goldberg, 1976; Goldberg, 1979), se ha demostrado tanto el efecto estimulador de la insulina sobre la síntesis proteica como su efecto inhibitorio sobre la degradación. A los mismos resultados llega Mortimore y Mondon (1970) y Jefferson y col. (1977).

En estados de deficiencia proteica y proteico-calórica, se produce una disminución de la tasa de insulina plasmática (Coward y col., 1977), que es paralela al incremento de la liberación de los aminoácidos musculares (Marliss y col., 1971), lo que sugiere la activación de la degradación proteica por hipoinsulinemia.

Resultados más recientes, parecen probar un efecto estimulador de la insulina sobre la proteólisis (Jepson y col., 1988), y la existencia de una correlación muy significativa entre la concentración de insulina plasmática y la velocidad fraccional de degradación proteica del músculo.

Según Palmer y col. (1985), los niveles fisiológicos de insulina estimulan tanto la síntesis como la degradación proteica en músculos incubados bajo una tensión constante y con una proteólisis mantenida en condiciones "in vivo", mientras que la adición de dosis farmacológicas sólo estimulan la síntesis proteica (Palmer, 1987).

Este incremento paralelo de la síntesis y del catabolismo proteicos, denominado "proteolisis anabólica" (Millward, 1985), coincidente con el crecimiento muscular, puede ser fisiológicamente distinto de la "proteolisis catabólica", que se produce durante el ayuno prolongado y en el que la degradación proteica se acompaña de un descenso de la síntesis (Millward y Waterlow, 1978).

Los glucocorticoides, por su parte, parecen tener importantes efectos sobre el catabolismo proteico facilitando la movilización de los aminoácidos de las proteínas musculares y provocando el retardo del crecimiento. Paralelamente deprimen la síntesis de DNA (Goldberg y Goldspink, 1975) y de la proteína muscular, probablemente a nivel traslacional (Rannels y col., 1978b).

Aunque se acepta generalmente que estas hormonas activan la proteolisis, sus efectos sobre el catabolismo proteico están todavía en discusión. Mientras algunos autores encuentran un incremento en la excreción de 3-Metil-histidina por tratamiento con distintas dosis de glucocorticoides (Munro, 1982) (Tomas y col., 1979), otros no han observado modificación alguna en la degradación proteica muscular (Millward y col., 1976b) (Odedra y Millward, 1982).

Esta discrepancia puede depender de la evolución temporal de los cambios del metabolismo proteico después del tratamiento con corticosterona, la cual induce un incremento transitorio de la degradación proteica muscular, disminuyendo posteriormente a valores normales después de 5 días, con una depresión paralela en la síntesis (Odedra y col., 1983).

Se ha demostrado, sin embargo, la participación de los glucocorticoides en la aceleración de catabolismo muscular en ratas adrenalectomizadas y ayunadas (Tischler y Goldberg, 1980), mientras que en ratas bien nutridas, tanto normales como adrenalectomizadas, no se observan incrementos en el catabolismo muscular.

Estos resultados sugieren que otros factores dependientes del estado nutritivo (como la insulina), pueden influir en la respuesta muscular a los esteroides. Puesto que en ratas diabéticas se produce un incremento en la degradación proteica del músculo gastrocnemio, no tan elevado como el observado en estados de ayuno (Odedra y Millward, 1982), la respuesta inducida por inanición, puede requerir la combinación de bajos niveles de insulina y altos de corticosterona para desencadenar el marcado incremento del catabolismo muscular, típico del ayuno.

No obstante, el mecanismo de acción de la corticosterona sobre la degradación proteica es desconocido, pero parece diferente de su efecto sobre la síntesis, que se mantiene durante toda la duración del tratamiento con la hormona y además los niveles de corticosterona se elevan antes de cualquier cambio en la degradación (Millward y col., 1983a).

El estado tiroideo del individuo también influye marcadamente en los cambios adaptativos de la degradación proteica muscular ante distintos estados nutritivos. Al igual que influyen sobre la capacidad de síntesis proteica, las hormonas tiroideas regulan la capacidad proteolítica muscular (De Martino y Goldberg, 1978) (Millward y col., 1980a).

Los bajos niveles plasmáticos de T_3 detectados en animales con deficiencia proteica y energética (Cox y col., 1981), parecen ser responsables de la disminución en el catabolismo proteico que se registra en estos animales. Además, la degradación decrece después de tiroidectomía y se restaura con el tratamiento hormonal, tanto en animales normales (Brown y Millward, 1981), como en hipofisectomizados (Flaim y col., 1978).

Así mismo, la administración de T_3 y T_4 a ratas sin hipófisis incrementa la velocidad de degradación proteica a niveles de las ratas control no hipofisectomizadas (Goldberg y col., 1980). El efecto es dosis-dependiente, puesto que cuando se manipula el "status" tiroideo de la rata, la velocidad de degradación proteica varía directamente con el nivel plasmático de T_3 , de tal modo que la tasa degradativa depende de la dosis administrada de la hormona. La caída del metabolismo se produce a dosis muy bajas (como sucede en malnutrición), mientras que a grandes dosis la degradación se incrementa y el crecimiento se suprime (Brown y Millward, 1983).

Sin embargo el significado fisiológico de los cambios de T_3 durante la deficiencia proteica en la rata son difíciles de interpretar (Burini y col., 1981), debido a los cambios diferenciales que se producen en las tasas libre y total de la hormona en esta situación nutritiva (Smallridge y col., 1982; Young y col., 1982; Cox y col., 1984).

Se ha sugerido, que la pérdida de la velocidad de proteólisis en malnutrición es una adaptación mediada por la hormona tiroidea, que minimiza la pérdida de la función de crecimiento inducido por la disminución simultánea de la síntesis proteica (Millward, 1985). Sin embargo, puesto que la T_3 estimula tanto la síntesis proteica como la proteólisis, la reducción de sus niveles puede ser también responsable de la disminución de la síntesis proteica y del crecimiento en estados de deficiencia en proteína.

La hormona T_3 parece actuar también como mediador del incremento del metabolismo proteico en el proceso de remodelación que se produce durante el crecimiento del músculo esquelético, junto con otros factores del crecimiento, que inducen un incremento neto de la síntesis proteica (Jepson y col., 1988). En este sentido, se ha demostrado también una acción mediadora de la T_3 sobre la reorganización estructural asociada con la maduración del cartílago en crecimiento "in vitro" y en ausencia de IGF-I, aún cuando sólo permite un pequeño incremento de tamaño (Burch y Van Wyk, 1987).

La actividad degradativa de las hormonas tiroideas parece estar mediada por el incremento de la actividad de las proteasas intracelulares. Sin embargo, aunque los lisosomas participan en el metabolismo proteico muscular (Bird, 1975), de tal modo, que cualquier incremento en la velocidad de degradación proteica total del músculo durante el ayuno es mediado por proteasas lisosomales, hoy se ha demostrado que estas enzimas no intervienen en el metabolismo de las proteínas miofibrilares (Dayton y col., 1976), y su alteración parece reflejar sólo la velocidad de cambio en el metabolismo de las proteínas sarcoplásmicas (Dayton y col., 1981), las cuales parecen ser eliminadas por macroautofagia.

En este sentido, se ha señalado recientemente que la degradación de la proteína muscular regulada por insulina, parece depender de los componentes del compartimento no miofibrilar de rápido "turnover", que son secuestrados en grandes vacuolas autofágicas de carácter lisosómico en el miocito (Mortimore y Pösö, 1987). Así, los efectos inhibidores de la degradación proteica mediados por insulina y el nivel de aminoácidos se producen por supresión de la macroautofagia (Smith y Sugden, 1983).

Por su parte la proteína miofibrilar (de turnover mucho más lento) requiere un ataque inicial por proteasas calcio-dependientes en el citosol, que iniciaría la degradación de la miofibrilla, entre las que se han propuesto una proteasa neutra activada por Ca^{2+} (Brooks y col., 1983; Zeman y col., 1985).

No obstante la proteólisis inducida por T_3 parece reflejar tanto la estimulación de varias proteasas lisosomales (DeMartino y Goldberg 1978), como la de la proteasa neutra activada por Ca^{2+} (Zeman y col., 1986), lo que determina la pérdida de la proteína sarcoplásmica y miofibrilar.

El tratamiento de animales hipotiroideos con niveles catabólicos o anabólicos de T_3 ó T_4 incrementa dos o tres veces la actividad de los enzimas catepsina B y D. Este efecto no es evidente hasta dos días después de la administración de la hormona y presenta una correlación positiva con la aceleración del catabolismo proteico. Por ello, se ha sugerido que la inducción de estos enzimas puede ser responsable de la pérdida de peso muscular, como sucede en el hipertiroidismo.

Las hormonas tiroideas influyen además sobre una variedad de enzimas lisosómicos: fosfatasa ácida, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, desoxirribonucleasa y ribonucleasa (Goldberg y col., 1980), alterando su efecto sobre sus sustratos respectivos.

2.2.5. HORMONA DEL CRECIMIENTO Y ESTADO NUTRITIVO.

El estado nutritivo juega un papel de primera magnitud en la regulación de la secreción de la hormona del crecimiento y a su vez ésta influye sobre la utilización de los nutrientes. Se conoce desde hace tiempo la asociación entre los estados de malnutrición y el ayuno con concentraciones plasmáticas elevadas de GH y subnormales de IGF-I (Felig y col., 1971) (Ho y col., 1988) y viceversa, la disminución de la tasa plasmática y de la respuesta de GH a la estimulación por GH-RH en individuos obesos (Veldhuis y col., 1991).

El aumento en la concentración de GH en malnutrición está ligado a un mecanismo adaptativo conducente a movilizar energía del tejido adiposo para mantener el metabolismo basal (Hart y Morant, 1980) (Bauman y col., 1985) y puede ser consecuencia de la alteración en el mecanismo de retrocontrol entre los factores "insulin-like" y la secreción de GH (Berelowitz y col., 1980) o a la alteración del "clearance" metabólico de la GH (Trenkle, 1976). Una posible explicación para el papel regulador de la nutrición sobre la secreción de la hormona, se basa en sus efectos sobre el metabolismo, de tal modo, que sus acciones proteínogénica, lipolítica y sus propiedades anti-insulínicas pueden facilitar la utilización óptima de los nutrientes en períodos de privación nutritiva (Clemmons y col., 1987).

Se ha comprobado, recientemente, la influencia que tienen las modificaciones en la cantidad de nutrientes ingeridos sobre el eje somatotrópico y sus consecuencias sobre la velocidad de crecimiento de los rumiantes. Así, con altos niveles nutritivos, la secreción de GH se reduce mientras el factor IGF-I se mantiene en el valor alcanzado por los animales con un nivel medio de dieta. Sin embargo, con bajos niveles nutritivos la tasa de IGF-I disminuye, sin cambios en la GH, lo que conduce a un balance energético negativo. Según Breier y col. (1988) este resultado parece señalar una buena relación GH/IGF-I en el primer caso y un estado refractario parcial a la GH en el segundo, aunque manteniendo una tasa de crecimiento positiva. Esta diferente relación entre las secreciones de GH y IGF-I con cada nivel nutritivo sugiere que con bajas ingestas de alimento puede existir una insensibilidad a la GH central o periférica (Breier y col., 1986).

Por lo tanto, el estado nutritivo puede ser un factor de primera importancia para determinar el crecimiento y la regulación del eje somatotrópico, a través de la modulación de la sensibilidad tisular a la GH, ya que a menos que el nivel de nutrición sea mejorado, la relación entre GH y su efecto sobre el crecimiento puede no ser óptimo.

Por ello algunos autores han relacionado las pobres respuestas a la GH sobre la ganancia de peso y el depósito de tejido magro de animales en crecimiento (Baile y col., 1983; Chung y col., 1985) con las condiciones nutritivas empleadas, puesto que las mejores respuestas a pGH se han alcanzado en cerdos sometidos a dietas con un mínimo entre un 16 y un 18% de proteína (Etherton, 1989), mientras que el crecimiento es menor con un 14% de proteína dietaria (Smith y col., 1989).

Sin embargo, mientras las acciones anabólica y antilipogénica por administración exógena de GH son inequívocas, el impacto que los componentes dietarios (energía, proteína y minerales, así como sus modificaciones en la dieta) pueden tener sobre la acción promotora del crecimiento de la hormona GH, es muy poco conocido y se ha comenzado a investigar muy recientemente. En especial se hace énfasis en la interrelación entre los niveles de proteína y energía dietarias y la acción hormonal con la distribución de los nutrientes y su capacidad de depósito corporal.

2.2.5.1. RELACIÓN ENTRE LA HORMONA DE CRECIMIENTO, LA PROTEÍNA DIETARIA Y LA CAPACIDAD DE DEPÓSITO PROTEICO.

La secreción endógena de GH es el factor principal que favorece la acreción de la proteína corporal en cerdos en crecimiento (Boyd y col., 1988, Campbell y col., 1988, 1989b), cuya velocidad de depósito aumenta en machos entre 196 y 238 g/día y en hembras entre 148 a 235 g/día, lo que parece requerir un incremento concomitante de los niveles de proteína dietaria.

Boyd y col. (1988) usando un método factorial y Goodband y col. (1988) predicen que es necesario un aumento de dos veces la concentración de lisina dietaria, para alcanzar un 81% de incremento en la deposición proteica inducida por

GH en cerdos machos castrados entre 55 y 100 Kg de peso, aunque los autores no miden los cambios producidos por la hormona sobre la capacidad de depósito proteico, ni tampoco la respuesta de los animales control a contenidos de lisina por debajo del nivel estudiado (6%).

Easter (1987) por su parte sugiere que en cerdos castrados GH-tratados, entre 45 y 100 Kg de peso, los requerimientos proteicos aumentan de un 14% a un 23,6%, pero no estudian las respuestas de los animales control a la proteína dietaria. Así mismo, Fowler y Kanis (1989) comparan la composición de la canal de cerdos administrados con 4 dosis de GH y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (16,5% y 19,0%) entre 30 y 95 Kg. Los resultados indican que el aumento de la velocidad de crecimiento y de la eficacia alimentaria, así como la reducción de la grasa corporal inducidos por la GH, se incrementan con la dieta de mayor nivel proteico. Sin embargo estos datos no aportan la información cuantitativa necesaria para determinar cuál es el porcentaje de lisina y otros aminoácidos requeridos para aumentar el depósito proteico.

Por el contrario, Campbell y col. (1990) y Caperna y col. (1990) señalan que sólo se requiere un incremento marginal (4%) en el nivel de la proteína dietaria "ideal" (Arc, 1981), para aumentar de un 18 a un 24% la deposición proteica en cerdos machos tratados con GH, entre 30 y 60 Kg de peso.

Estos resultados sugieren que la hormona GH puede aumentar la eficiencia de la absorción y/o de la utilización de la proteína, y por lo tanto mejorar el depósito proteico sin un incremento concomitante de los niveles de proteína dietaria.

Por otra parte, la máxima acreción proteica en cerdos muy jóvenes (<50 Kg) depende fundamentalmente de la ingesta energética (Whittemore, 1986). Al menos, parte de los incrementos en la deposición proteica inducida por GH, puede estar asociada con el efecto antilipogénico de la hormona y con el incremento de la energía derivada hacia la síntesis proteica.

En cerdos de más peso corporal, el máximo depósito proteico está limitado más por factores intrínsecos que por ambientales (ingesta energética) y por lo tanto, la relación entre la administración de GH, la proteína dietaria y sus efectos sobre la capacidad de acreción proteica puede ser distinta que en los animales más jóvenes.

En trabajos recientes, Campbell y col. (1991) señalan que cuando la ingesta energética es fija, la administración de GH aumenta la velocidad de deposición proteica de 119 a 215 g/día, lo que se corresponde con un incremento en el nivel de proteína dietaria del 10,6% al 18% en cerdos entre 60 y 90 Kg de peso. Este resultado indica que el aumento en el porcentaje proteico de la dieta requerido por los animales GH-tratados es directamente proporcional al incremento en la capacidad de depósito proteico, aunque no existe evidencia alguna de un efecto marcado de la GH sobre la utilización de los aminoácidos dietarios.

Recíprocamente, la magnitud del incremento en la acreción proteica y en la composición corporal inducidos por la GH pueden ser función del contenido dietario en proteína, puesto que la velocidad con que se deposita proteína es la misma en cerdos sometidos a bajas ingestas proteicas, tanto controles como GH-tratados.

Por el contrario, la velocidad de acreción grasa (g/día) se reduce con dietas altas en proteína, agudizándose la pérdida con la administración de la hormona, tanto en cerdos jóvenes como más viejos (Campbell y col., 1990).

Estos datos ponen de manifiesto las acciones independientes de la hormona sobre los metabolismos grasa y proteico, lo que no es demasiado sorprendente, puesto que los efectos estimuladores de la proteína parecen mediados en parte por el factor IGF-I (Cheng y Kalant, 1968; Allen y col., 1986), cuya síntesis y posterior liberación puede ser inhibida por la deficiencia proteica (Campbell y col., 1990). Por el contrario, la inhibición de la lipogénesis por disminución de la captación de glucosa y de la sensibilidad a la insulina de los adipocitos (Walton y col., 1987) es un efecto directo de la GH, mediante la inhibición de la actividad de las enzimas lipogénicas fundamentales (Magri y col., 1987).

Por último, la magnitud de los cambios en la velocidad de depósito de proteína y grasa inducida por la GH están influidos por el peso corporal (Etherton y col., 1986) y el sexo del animal (Campbell y col., 1989b), así como por la dosis empleada de la hormona (Evock y col., 1988), por lo que todos estos factores pueden modificar el nivel de proteína dietaria necesario para su acción anabólica.

2.2.5.2. RELACIÓN ENTRE LA HORMONA DE CRECIMIENTO Y LA INGESTA ENERGÉTICA CON LA CAPACIDAD DE DEPÓSITO PROTEICO.

Con dietas adecuadas en proteínas la acreción proteica corporal, en animales muy jóvenes en crecimiento, es una función de la ingesta energética y parece independiente de la ingesta proteica (Campbell y Taverner, 1988). La relación entre la ingesta energética y la acreción de la proteína corporal, determina la distribución de la energía entre los requerimientos para mantenimiento y la proteína y la grasa corporales y en consecuencia, indica los efectos que la modificación de la ingesta energética puede ejercer sobre el crecimiento y la composición corporal (Black y col., 1986, Dunkin y col., 1986).

En cerdos de más de 60 Kg la relación es de forma lineal/meseta, representando la meseta la máxima capacidad de crecimiento de la proteína del animal (Campbell y col., 1985a, Dunkin y col., 1986). En cerdos de menos peso, el depósito proteico presenta una relación lineal con el aumento de la ingesta energética, hasta el límite del apetito del animal (Campbell y col., 1985b), lo que influye de forma marcada sobre la ganancia ponderal y por tanto sobre la eficiencia de conversión del alimento en peso. De acuerdo con Campbell y col. (1985,a,b), Dunkin y col. (1986) y Whittemore (1986) esta relación tiene consecuencias sobre la expresión de los requerimientos de aminoácidos y de proteína dietaria. Así por ejemplo, la necesidad de mantener constante la razón proteína/energía dietaria para un buen crecimiento de la proteína corporal, permanece válido y es biológicamente el método ideal para expresar los requerimientos proteicos, sólo cuando la acreción proteica se relaciona linealmente con la ingesta energética. Como la ingesta energética es el mayor determinante de la velocidad de depósito proteico, una razón proteína/energía específica puede corregir cambios en la ingesta de alimentos; por ello, la demanda de proteína a nivel tisular será alcanzada por un cambio apropiado en la ingesta proteica. Por el contrario, la relación en meseta de la acreción proteica determina que los requerimientos proteicos tisulares para proteína permanezcan constantes e independientes de la ingesta energética, por lo que los requerimientos dietarios deben ser expresados sobre una base de ingesta diaria y teóricamente

cambiará cuando se modifique la ingesta de alimentos. Esta relación lineal entre la ingesta energética y el depósito proteico se mantiene en cerdos administrados con GH, entre 25 y 55 Kg de peso (Campbell y col., 1988).

Sin embargo en los animales GH-tratados aumentan los requerimientos de energía para mantenimiento y se altera la relación entre la ingesta energética y el depósito proteico, aunque la magnitud de los cambios y los efectos consiguientes sobre la expresión de los requerimientos de proteína están influidos por el sexo del animal, lo que indica que la hormona somatotropa altera la demanda de nutrientes a nivel tisular (Campbell y col., 1991).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

EXPERIMENTO 1: ANIMALES *NO TRATADOS* (NT).

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA EDAD, NIVEL DE PROTEÍNA DIETARIA, SEXO Y DE SUS INTERACCIONES SOBRE EL CRECIMIENTO Y METABOLISMO PROTEICO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATONES BALB/c ENTRE EL DESTETE Y LA PUBERTAD.

Lote 1. Control no tratado y sometido al 12% de proteína (caseína+D,L-metionina) en la dieta.

- n° de animales: 60 ratones BALB/c.
 - grupo ♀ 12% NT (30 ratones BALB/c ♀).
 - grupo ♂ 12% NT (30 ratones BALB/c ♂).
- peso inicial: 11 ± 1 g.
- edad inicial: 21 días de vida.
- período experimental total: 30 días.
- períodos experimentales parciales: 21-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 y 45-50 días de vida.
- Administración de solución salina fisiológica estéril por vía subcutánea, en dosis de 20 μ l/g de peso, según se expresa en la sección 3.2.2.
- Al final de cada período parcial de experiencia se sacrifican 5 animales machos y 5 hembras.
- Toma de muestra: músculo gastrocnemio.

Lote 2. Control no tratado y sometido al 20% de proteína (caseína+D,L-metionina) en la dieta.

- n° de animales: 60 ratones BALB/c.
 - grupo ♀ 20% NT (30 ratones BALB/c ♀).
 - grupo ♂ 20% NT (30 ratones BALB/c ♂).
- peso inicial: 11 ± 1 g.

- edad inicial: 21 días de vida.
- período experimental total: 30 días.
- períodos experimentales parciales: 21-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 y 45-50 días de vida.
- Administración de solución salina fisiológica estéril por vía subcutánea, en dosis de 20 μ l/g de peso, según se expresa en la sección 3.2.2.
- Al final de cada período parcial de experiencia se sacrifican 5 animales machos y 5 hembras.
- Toma de muestra: músculo gastrocnemio.

La influencia de la EDAD de los animales *No Tratados* se observa mediante la comparación de los diferentes períodos experimentales parciales dentro de cada grupo. El efecto de la DIETA se obtiene por comparación de animales del mismo sexo sometidos a ambos niveles proteicos dietarios (♀ 12% NT con ♀ 20% NT y ♂ 12% NT con ♂ 20% NT). Finalmente, en un mismo nivel proteico se comparan animales de distinto sexo (♀ 12% NT con ♂ 12% NT y ♀ 20% NT con ♂ 20% NT) para observar el efecto sexual. Se estudia también la influencia de las interacciones entre los factores mencionados.

EXPERIMENTO 2: ANIMALES *TRATADOS* (T).

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA EDAD, NIVEL DE PROTEÍNA DIETARIA, SEXO Y SUS INTERACCIONES SOBRE EL CRECIMIENTO Y METABOLISMO PROTEICO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATONES BALB/c ADMINISTRADOS CON rhGH ENTRE EL DESTETE Y LA PUBERTAD.

Lote 3. Tratado con hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) y sometido al 12% de proteína (caseína+D,L-metionina) en la dieta.

- n° de animales: 60 ratones BALB/c.
 - grupo ♀ 12% T (30 ratones BALB/c ♀).
 - grupo ♂ 12% T (30 ratones BALB/c ♂).

- peso inicial: 11 ± 1 g.
- edad inicial: 21 días de vida.
- período experimental total: 30 días.
- períodos experimentales parciales: 21-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 y 45-50 días de vida.
- Administración de rhGH por vía subcutánea, en dosis de $0,074 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ ClNa $0,9\%/g$ de peso, según se expresa en la sección 3.2.2.
- Al final de cada período parcial de experiencia se sacrifican 5 animales machos y 5 hembras.
- Toma de muestra: músculo gastrocnemio.

Lote 4. Tratado con hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) y sometido al 20% de proteína (caseína+D,L-metionina) en la dieta.

- n° de animales: 60 ratones BALB/c.
 - grupo ♀ 20% T (30 ratones BALB/c ♀).
 - grupo ♂ 20% T (30 ratones BALB/c ♂).
- peso inicial: 11 ± 1 g.
- edad inicial: 21 días de vida.
- período experimental total: 30 días.
- períodos experimentales parciales: 21-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 y 45-50 días de vida.
- Administración de rhGH por vía subcutánea, en dosis de $0,074 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ sol. de ClNa $0,9\%/g$ peso, según se expresa en la sección 3.2.2.
- Al final de cada período parcial de experiencia se sacrifican 5 animales machos y 5 hembras.
- Toma de muestra: músculo gastrocnemio.

La influencia de la EDAD de los animales *Tratados* se observa mediante la comparación de los diferentes períodos experimentales parciales dentro de cada grupo. El efecto de la DIETA se obtiene por comparación de animales del mismo sexo sometidos a ambos niveles proteicos dietarios (♀ 12% T con ♀ 20% T y ♂ 12% T con ♂ 20% T). Finalmente, en un mismo nivel proteico se comparan animales de distinto sexo (♀ 12% T con ♂ 12% T y ♀ 20% T con ♂ 20% T) para observar el efecto sexual. Se estudia la influencia de las interacciones de los factores mencionados.

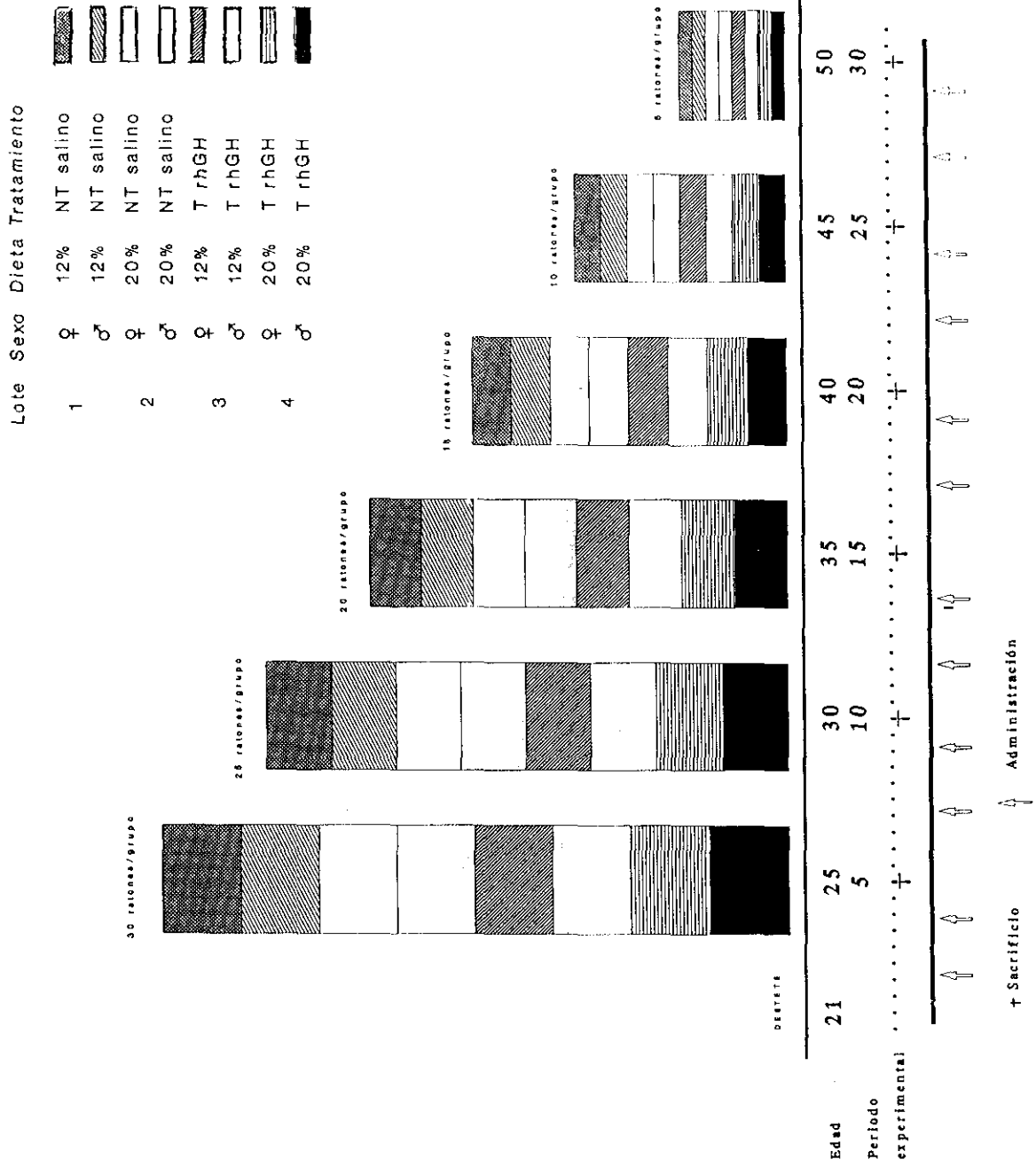
EXPERIMENTO 3: ANIMALES *NO TRATADOS* (NT) Y *TRATADOS* (T).

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE (rhGH) SOBRE EL CRECIMIENTO Y METABOLISMO PROTEICO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATONES BALB/c ENTRE EL DESTETE Y LA PUBERTAD.

INFLUENCIA DE LAS INTERACCIONES ENTRE TRATAMIENTO, EDAD Y DIETA.

La influencia del TRATAMIENTO con rhGH se observa mediante la comparación entre los animales *No Tratados* y *Tratados* de igual sexo y nivel proteico dietario (♀ 12% NT con ♀ 12% T, ♂ 12% NT con ♂ 12% T, ♀ 20% NT con ♀ 20% T y ♂ 20% NT con ♂ 20% T). Se estudia también el efecto de las interacciones entre los factores: TRATAMIENTO con rhGH, EDAD y DIETA.

DISEÑO EXPERIMENTAL



3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.2.1. COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS UTILIZADAS.

Las dietas fueron preparadas siguiendo las recomendaciones para el ratón del American Institute of Nutrition (AIN-76™, 1977).

- *Dieta del 12% de proteína (Caseína + D,L- metionina).*

INGREDIENTES	% S.S.S
CASEÍNA	12,0%
METIONINA	0,3%
SACAROSA	56,15%
ALMIDÓN	16,85%
CELULOSA	5,0%
ACEITE DE OLIVA	5,0%
COLINA	0,2%
CORRECTOR MINERAL *	3,5%
CORRECTOR VITAMÍNICO **	1,0%

- *Dieta del 20% de proteína (Caseína + D,L-metionina).*

INGREDIENTES	% S.S.S
CASEÍNA	20,0%
METIONINA	0,3%
SACAROSA	50,0%
ALMIDÓN	15,0%
CELULOSA	5,0%
ACEITE DE OLIVA	5,0%
COLINA	0,2%
CORRECTOR MINERAL *	3,5%
CORRECTOR VITAMÍNICO **	1,0%

Suplementos dietarios

* CORRECTOR MINERAL

FOSFATO CÁLCICO HIDRATADO	500,00 mg
CLORURO SÓDICO	74,00 mg
CITRATO POTÁSICO MONOHIDRATADO	220,00 mg
SULFATO POTÁSICO	52,00 mg
OXIDO DE MAGNESIO	24,00 mg
CARBONATO MAGNÉSICO	3,50 mg
CITRATO FÉRRICO	6,00 mg
CARBONATO DE ZINC	1,60 mg
CARBONATO CÚPRICO	0,30 mg
IODATO POTÁSICO	0,01 mg
SELENITO SÓDICO	0,01 mg
SULFATO CRÓMICO POTÁSICO	0,55 mg
SACAROSA para completar hasta	1.000,00 mg

** CORRECTOR VITAMÍNICO

TIAMINA CLORHIDRATO (B1)	600,0 mg
RIBOFLAVINA (B2)	600,0 mg
PIRIDOXINA CLORHIDRATO (B6)	700,0 mg
ÁCIDO NICOTÍNICO	3.000,0 mg
PANTOTENATO CÁLCICO	1.600,0 mg
ÁCIDO FÓLICO	200,0 mg
D-BIOTINA	20,0 mg
CIANOCOBALAMINA (B12)	1,0 mg
VITAMINA A	120,0 mg
VITAMINA D	2,5 mg
VITAMINA E	100,0 mg
VITAMINA K	5,0 mg
SACAROSA para completar hasta	1.000,0 g

3.2.1.1. Control de las materias primas y de las dietas

Se realiza el control de riqueza de las materias primas, así como de la composición de las dietas (AOAC, 1990):

- HUMEDAD por pérdida de peso en estufa de desecación a 100 ± 2 °C a presión atmosférica normal, hasta pesada constante.
- RIQUEZA EN PROTEÍNA TOTAL: Determinación del contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl. El resultado se multiplica por el factor de conversión del nitrógeno total en proteína (6,25).
- CENIZAS por incineración a 450-500°C durante 15 horas.
- GRASA mediante la técnica de Soxhlet, con dietileter de petróleo como líquido extractor.

RESULTADOS:

MATERIAS PRIMAS	% RIQUEZA	% HUMEDAD
CASEÍNA	$92 \pm 0,2$	$11 \pm 0,1$
ALMIDÓN	-	$12 \pm 0,2$
CELULOSA	-	$5 \pm 0,05$

DIETAS	% HUMEDAD	% PROTEÍNAS	% GRASA	% CENIZAS
12%	$3,8 \pm 0,3$	$12,3 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,05$
20%	$5,0 \pm 0,1$	$20,2 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,1$

3.2.2. PAUTA DEL EXPERIMENTO

Animales de experimentación

Se han utilizado como animales de experimentación ejemplares machos y hembras de ratones blancos *Mus musculus* línea BALB/c, de 21 días de edad, con pesos iniciales de 11 ± 1 g y destetados a los 21 días. Proceden del criadero de animales de la Sección Departamental de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Se mantienen en condiciones ideales para el trabajo de laboratorio (BOE 67 18/03/88) siguiendo la Directiva Comunitaria 86/609/CEE (Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L 358, 1986).

Agrupación de los animales en conjuntos homogéneos

Los animales se distribuyen en ocho grupos de 30 ratones cada uno (4 grupos de 30 ratones machos y 4 grupos de 30 ratones hembras) atendiendo a los tres factores de categorización: TRATAMIENTO, DIETA y SEXO. Cada factor admite dos estados o categorías (TRATAMIENTO: grupo control NT (solución salina) y grupo T (administrado con rhGH), DIETA: niveles proteicos del 12% y del 20%, SEXO: hembra y macho). Cada grupo se especifica en el cuadro del diseño experimental.

Régimen de mantenimiento

Los animales se disponen en jaulas individuales ubicadas en una habitación iluminada de 08:00 a 20:00 h y mantenida a una temperatura de 23 ± 1 °C hasta el día de sacrificio de cada grupo.

A lo largo del período experimental total (30 días), el agua y la dieta son administradas *ad libitum* y el peso corporal y la ingesta de alimento son controladas diariamente.

A fin de disminuir la cantidad de alimento desperdiciado se ha diseñado un dispositivo especial para su suministro y medida. El dispositivo se rellena diariamente con 4 g de dieta, pesándolo de nuevo transcurridas 24 h con el contenido que no ha sido consumido. A este valor se le añade el alimento desperdiciado. La ingesta diaria se calcula por diferencia entre la dieta suministrada y la no consumida más la desperdiciada.

Se administra a los animales controles *No Tratados* solución salina fisiológica estéril en dosis de 20 μ l/g de peso, dos veces cada cinco días, incrementando el volumen en proporción al aumento ponderal.

Los animales *Tratados* son administrados con hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH). La hormona se disuelve en solución salina obteniendo una concentración de 0,074 μ g/20 μ l y se administra dos veces cada cinco días, en un volumen de 20 μ l/g de peso, aumentando la cantidad de rhGH proporcionalmente al incremento de peso. La dosis utilizada es de 0,074 μ g/20 μ l/g.

A los 25, 30, 35, 40, 45 y 50 días de vida (al final de cada período experimental parcial), de cada grupo de animales son sacrificados 5 ratones macho y 5 ratones hembra por dislocación cervical. Posteriormente se procede a la extracción del músculo gastrocnemio.

Extracción del músculo gastrocnemio

Se coloca la rata en posición decúbito dorsal, fijándose las extremidades que no se intervienen a la tablilla de disección.

A continuación se realiza una incisión circular a nivel de la articulación distal de la pata, que compromete únicamente la piel. Acto seguido, se tira de ésta, en sentido proximal, dejando al descubierto toda la aponeurosis superficial de la musculatura de la extremidad.

Posteriormente, se disecciona la aponeurosis a nivel del músculo dejando a la vista los músculos aductor y grácilis, que se seccionan mediante tijera en la unión de los tercios proximal y distal. Así, se visualiza la inserción proximal del músculo gastrocnemio. A este nivel se realiza la primera sección del mismo, repitiéndose el mismo proceso para la inserción distal, separándolo cuidadosamente del músculo sóleo.

Una vez extraído el músculo gastrocnemio de ambos miembros inferiores, con el fin de obtener suficiente cantidad de muestra, éstos se pesan y se suspenden en una solución tampón constituida por ClNa 0,1 M y CO_3HNa 0,005M en una proporción de 1/20 (P/V) a 0°C y pH 7,4. Posteriormente se homogeneiza a 4.000 g a intervalos de 15 segundos hasta su completa homogeneización.

Una parte alícuota del homogenado se destina para la determinación analítica de las concentraciones de DNA y RNA y el resto se centrifuga durante 20 minutos a 1.000 g. El sobrenadante se introduce en un baño de hielo para impedir pérdidas enzimáticas y se utiliza para analizar los demás parámetros bioquímicos. Todas las pruebas analíticas se realizaron por triplicado teniendo en cuenta su control tanto intra como inter-ensayo.

3.3. PARÁMETROS CONTROLADOS

Las variables determinadas se pueden englobar en tres categorías:

3.3.1. VARIABLES DIARIAS: Variables que se miden diariamente: Peso del animal, utilizado para el cálculo de las variables estimadas en el grupo de variables acumuladas (véase apartado 3.3.3).

3.3.2. VARIABLES PERIÓDICAS: Aquellas que se determinan al final de cada período experimental parcial que corresponden a los días 25, 30, 35, 40, 45 y 50 de vida y que a su vez comprenden:

- Parámetros relacionados con el crecimiento general y muscular: Peso corporal final, peso muscular, Índice miosomático, proteína muscular/órgano y proteína muscular/g.

- Parámetros relacionados con el crecimiento celular del músculo: DNA/órgano, DNA/g, número de núcleos*, proteína/DNA*, Peso muscular/número de núcleos*, DNasa ácida/órgano, DNasa ácida/g, DNasa ácida/proteína, DNasa ácida/DNA.

- Parámetros relacionados con el metabolismo proteico y del RNA muscular: RNA/órgano, RNA/g, RNA/Proteína*, RNA/DNA*, RNasa ácida/órgano, RNasa ácida/g, RNasa ácida/proteína, RNasa ácida/DNA, RNasa ácida/RNA, catepsina D/órgano, catepsina D/g, catepsina D/proteína y catepsina D/DNA.

Mediante estas variables se estudian las diferencias por TRATAMIENTO, EDAD, DIETA y SEXO expuestas en el diseño experimental, así como para representar su evolución en relación con la edad.

* Cálculo de Parámetros:

NÚMERO DE NÚCLEOS (millones): Es el cociente entre la cantidad de DNA total (mg/órgano) y cantidad de DNA que contiene un único núcleo ($6,2 \times 10^3$) (Enesco y Leblond, 1962).

PROTEÍNA/DNA: Indica el tamaño de la célula muscular en función del contenido proteico del músculo. Se calcula dividiendo la cantidad de proteína (mg) entre el DNA total del músculo (mg) (Enesco y Puddy, 1964).

PESO MUSCULAR/NÚMERO DE NÚCLEOS (ng): Expresa el tamaño de la célula muscular en función del peso del músculo. Se calcula dividiendo el peso muscular (mg) entre el número de núcleos (millones) (Leblond, 1972).

RNA/PROTEÍNA: Esta razón indica la capacidad de síntesis proteica del músculo. Se calcula dividiendo la cantidad de RNA total (mg) por la cantidad de proteína muscular (mg) (Millward y col. 1973).

RNA/DNA: Indica la cantidad de ribosomas por unidad de DNA. Se calcula dividiendo el contenido de RNA (mg) entre la cantidad de DNA muscular (mg) (Winick y Noble, 1966).

3.3.3. VARIABLES GLOBALES: Variables que se calculan entre el día inicial y final de vida (variables acumuladas).

Comprenden valores individuales correspondientes al período total de vida de cada grupo de animales (5, 10, 15, 20, 25 y 30 días):

INCREMENTO ACUMULADO DE PESO MUSCULAR (IACM). Es la cantidad en gramos que ha incrementado el peso muscular de un animal desde el inicio del período experimental hasta el final de su período de vida. Se obtiene por diferencia entre el peso muscular final (día de sacrificio) y el peso muscular inicial (día 21 de vida), y se han estimado utilizando las ecuaciones alométricas entre el peso muscular y el peso corporal final a día inicial y final de cada grupo de animales. A continuación se expresan las ecuaciones utilizadas.

Grupos

♀ 12% NT	$IACM = (0,0015 \cdot PCF^{1,407}) - (0,0015 \cdot PCI^{1,407})$
♂ 12% NT	$IACM = (0,0048 \cdot PCF^{1,017}) - (0,0048 \cdot PCI^{1,017})$
♀ 20% NT	$IACM = (0,0049 \cdot PCF^{0,994}) - (0,0049 \cdot PCI^{0,994})$
♂ 20% NT	$IACM = (0,0063 \cdot PCF^{0,918}) - (0,0063 \cdot PCI^{0,918})$
♀ 12% T	$IACM = (0,0061 \cdot PCF^{0,914}) - (0,0061 \cdot PCI^{0,914})$
♂ 12% T	$IACM = (0,0140 \cdot PCF^{0,606}) - (0,0140 \cdot PCI^{0,606})$
♀ 20% T	$IACM = (0,0062 \cdot PCF^{0,904}) - (0,0062 \cdot PCI^{0,904})$
♂ 20% T	$IACM = (0,0074 \cdot PCF^{0,856}) - (0,0074 \cdot PCI^{0,856})$

VELOCIDAD ABSOLUTA DE CRECIMIENTO MUSCULAR (VACM). Calculado como el cociente entre el incremento acumulado de peso muscular y el número de días de que consta cada período de vida estudiado (5, 10, 15, 20, 25, 30).

$$VACM \text{ (g/día)} = IACM \text{ (g)}/\text{período (días)}$$

VELOCIDAD FRACCIONAL DE CRECIMIENTO MUSCULAR (VFCM). Esta velocidad relativa se obtiene hallando el cociente entre la velocidad absoluta de crecimiento muscular (VACM) y el peso del músculo en el día inicial de cada período experimental parcial. Se expresa como porcentaje de incremento sobre el peso inicial.

$$VFCM \text{ (%/día)} = 100 \cdot VACM \text{ (g/día)}/\text{Peso Muscular Inicial del Período (g)}$$

INCREMENTO ACUMULADO DE PROTEÍNA MUSCULAR (IAPrM). Es el incremento expresado en peso de proteína (g), desde el día inicial del período experimental, hasta el último día de vida del ratón. Corresponde a la diferencia entre el contenido proteico al sacrificio y el contenido proteico a día 21 de vida. Se ha estimado utilizando las ecuaciones de regresión lineal entre la cantidad de proteína absoluta y el peso muscular de cada grupo de animales. A continuación se expresan las ecuaciones utilizadas.

Grupos

♀ 12% NT	$IAPrM = (-5,467 + PCF \cdot 1,040) - (-5,467 + PCI \cdot 1,040)$
♂ 12% NT	$IAPrM = (-6,556 + PCF \cdot 1,174) - (-6,556 + PCI \cdot 1,174)$
♀ 20% NT	$IAPrM = (1,300 + PCF \cdot 0,550) - (1,300 + PCI \cdot 0,550)$
♂ 20% NT	$IAPrM = (3,047 + PCF \cdot 0,488) - (3,047 + PCI \cdot 0,488)$
♀ 12% T	$IAPrM = (9,331 - PCF \cdot 0,066) - (9,331 - PCI \cdot 0,066)$
♂ 12% T	$IAPrM = (13,433 - PCF \cdot 0,291) - (13,433 - PCI \cdot 0,291)$
♀ 20% T	$IAPrM = (-6,223 + PCF \cdot 1,171) - (-6,223 + PCI \cdot 1,171)$
♂ 20% T	$IAPrM = (-1,933 + PCF \cdot 0,995) - (-1,933 + PCI \cdot 0,995)$

VELOCIDAD ABSOLUTA DE CRECIMIENTO DE LA PROTEÍNA MUSCULAR (VAPrM). Calculado como el cociente entre el incremento acumulado de proteína muscular y el número de días de que consta cada período de vida estudiado (5, 10, 15, 20, 25, 30).

$$VAPrM \text{ (g/día)} = IAPrM \text{ (g)} / \text{período (días)}$$

VELOCIDAD FRACCIONAL DE CRECIMIENTO DE LA PROTEÍNA MUSCULAR (VFPrM). Esta velocidad relativa se obtiene hallando el cociente entre la velocidad absoluta de crecimiento de la proteína muscular (VAPrM) y el valor de la proteína en el día inicial de cada período experimental parcial, previamente estimado. Se expresa como porcentaje de incremento sobre el peso inicial.

$$VFPrM \text{ (%/día)} = 100 \cdot VAPrM \text{ (g/día)} / \text{Proteína muscular inicial del período (g)}$$

Todos los parámetros antedichos se relacionan entre sí para estudiar la dinámica del crecimiento, y se aplican en las ecuaciones alométricas y de regresión lineal a fin de establecer el grado de relación existente entre pares de variables.

NOTA: Los parámetros, proteína de la carcasa e ingestas proteica (IP) y energética (IE), se han tomado de trabajos previos (Agis, 1994) y se utilizan en la obtención de relaciones lineales con algunos parámetros musculares.

3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.4.1. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA MUSCULAR

Fundamento:

Se utiliza el método colorimétrico de Lowry (1951).

En esta técnica intervienen dos reacciones:

1.- Una interacción inicial de la proteína con solución alcalina de tartrato de cobre (reactivo de Biuret) formando complejos cúprico-proteicos y cúprico-aminoacídicos (triptofano y tirosina contenidos en la proteína).

2.- Estos complejos intervienen en la reducción de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico (reactivo de Folin-Ciocalteu) a óxido de molibdeno y de tungsteno respectivamente. Estos últimos compuestos producen una coloración azul intensa cuya absorbancia a 750 nm, es proporcional a la concentración de proteína de la muestra (Peterson, 1979).

Reactivos:

- Reactivo cuproalcalino: CO_3Na al 2% en NaOH 0,1 N y SO_4Cu al 0,5% en tartrato sódico-potásico al 1%.

- Reactivo Fenol Folin-Ciocalteu.

Técnica:

0,1 ml de homogenado se mezclan con 5 ml de reactivo cupro-alcalino y se dejan reposar 20 minutos. Posteriormente se agregan 0,5 ml de reactivo fenol y se deja en reposo 30 minutos. El color desarrollado se lee a una longitud de onda de 750 nm frente al blanco.

Cálculos:

Las absorbancias obtenidas se llevan a una curva de calibración realizada con solución madre de albúmina a la concentración de 10 mg/ml [prot μ g] = $651,458 \cdot x - 43,877$ con una correlación de $r = 0,995$. Se asume que una unidad de absorbancia es equivalente a 0,6 mg de péptido/ml.

Los resultados se expresan en mg de proteína/órgano y en mg de proteína/g.

3.4.2. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.4.2.1. Extracción.

Fundamento:

El método utilizado es el de Schmidt y Thannhauser (1945), modificado por Fleck y Munro (1961). Los ácidos nucleicos son separados por digestión en solución alcalina mediante la cual el RNA se hidroliza a mononucleótidos que son solubles en medio ácido, mientras que el DNA y la mayoría de las proteínas celulares se precipitan mediante acidificación.

Técnica:

2,5 ml de ClO_4H 0,6 N se mezclan con 5 ml de homogenado. El precipitado obtenido se lava tres veces con ClO_4H 0,2 N frío, siendo desechados los líquidos de lavado. Posteriormente el precipitado es disuelto en 4 ml de KOH 0,3 N durante 1 h. a 37°C con el fin de hidrolizar el RNA. Después de añadir 2,5 ml de ClO_4H 1,2 N los ribonucleóticos son extraídos por lavado con solución ClO_4H 0,2 N. El sobrenadante es recogido para determinar la concentración de RNA.

El precipitado resultante se trata con 4 ml de ClO_4H 0,6 N a 90°C durante 10 minutos para hidrolizar el DNA. En el sobrenadante obtenemos los nucleótidos correspondientes a la hidrólisis del DNA.

3.4.2.2. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA).

Fundamento:

El método utilizado es el de Burton (1956). Se basa en la adición de difenilamina a la desoxirribosa de los nucleótidos procedentes de la hidrólisis del DNA, lo que origina una coloración azul que es proporcional a la cantidad de DNA.

Reactivos:

Reactivo de difenilamina: 1,5 g de difenilamina se disuelven en 100 ml de ácido acético glacial y 1,5 ml de SO_4H_2 concentrado.

Técnica:

Un volumen de extrato de DNA se mezcla con dos volúmenes de reactivo de difenilamina. La absorbancia del color desarrollado después de incubar a 100°C durante 10 minutos, es leído a una longitud de onda de 600 nm frente al blanco.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una recta de calibración, construída con distintas concentraciones de DNA tipo I : $[\mu\text{g de DNA}] = 708,597.x + 34,734$, con una correlación de $r = 0,986$. Se asume que una unidad de absorbancia es equivalente a 0,67 mg/ml.

La cantidad de DNA se expresa en $\mu\text{g}/\text{órgano}$ y en mg/g.

3.4.2.3. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA)

Fundamento:

El método utilizado es el de Kerr y Seraidarian (1945). Se basa en la adición al RNA de orcinol y cloruro férrico, lo que resulta en la valoración de la ribosa existente en el ácido nucleico.

Reactivos:

Reactivo de orcinol: 100 mg de orcinol en 1 ml de etanol 95%.

Solución de cloruro férrico: Cl_3Fe 0,1% en CIH concentrado.

Técnica:

A 3 ml de extracto de RNA se le añaden 3 ml de solución de Cl_3Fe y 0,3 ml de reactivo de orcinol. Se incuba a 100°C durante cuarenta minutos y se mide la absorbancia del color desarrollado a 670nm frente al blanco.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una recta de calibración obtenida con distintas concentraciones de RNA tipo XI. $[\mu\text{g RNA}] = 425,477 \cdot x - 3,015$, cuya correlación es de $r = 0,985$. Se asume que una unidad de absorbancia corresponde con 0,42 mg de RNA/ml.

La cantidad de RNA se expresa en $\mu\text{g}/\text{órgano}$ y en mg/g .

3.4.3. DETERMINACIÓN DEL ENZIMA DESOXIRRIBONUCLEASA ÁCIDA (*Deoxiribonucleato-3'-nucleótido hidrolasa E.C. 3.1.4.6.*).

Fundamento:

El método utilizado es el de McDonald modificado (1955). El enzima desoxiribonucleasa ácida es una endonucleasa, que actúa sobre todas las uniones de tipo b del DNA, es decir, hidroliza las uniones 5'-OH de las pentosas y el grupo fosfato de los polinucleótidos.

Su actuación sobre las cadenas de ácido desoxiribonucleico, produce oligonucleótidos cuya extinción puede ser medida espectrofómicamente a 260 nm. Las lecturas son proporcionales a la cantidad de oligonucleótidos y ésta a la actividad enzimática de las muestras ensayadas.

Reactivos:

- Solución de sustrato: 10 mg de DNA (ternera tipo I) se disuelven en 30 ml de H₂O. Una vez disuelto el DNA se añaden 25 ml de solución buffer de acetato sódico 0,1 M a pH 5,0 y 10,5 ml de SO₄Mg 0,1 M. Posteriormente se enrasa con H₂O destilada hasta 250 ml.
- Solución de acetato de uranilo: acetato de uranilo al 0,25% en ácido perclórico al 60%.

Técnica:

2,5 ml de sol. sustrato se mezclan con 0,5 ml de homogenado. La reacción se lleva a cabo a 37 °C durante una hora. El DNA no digerido se precipita con 1,25 mg de solución de acetato de uranilo. Las mezclas de ensayo se mantienen 15 minutos a 0°C y se centrifugan posteriormente durante 20 minutos a 1.000 g. La absorción de los oligonucleótidos liberados se miden a 260 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva de calibración construída con soluciones patrón de DNasa ácida: $[DNasa\ UI] = 3,505 \cdot x - 0,067$, $r=0,989$.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de producir un incremento de 0,001 de absorbancia a 260 nm de nucleótido por minuto en 1 ml a pH 5 y 37 °C.

La cantidad de enzima se expresa en UI/órgano, UI/g y UI/DNA y la actividad específica del enzima se expresa en UI/mg de proteína.

3.4.4. DETERMINACIÓN DEL ENZIMA RIBONUCLEASA ÁCIDA. (*Ribonucleato pirimidín-nucleótido-2'-trasferasa ciclizante E.C. 2.7.7.16.*)

Fundamento:

El método utilizado es el de Kalnitsky (1959).

El enzima ribonucleasa es una endonucleasa que escinde las uniones en 5' de los pirimidín-nucleótidos. Su actuación sobre las cadenas de ácido ribonucleico produce oligonucleótidos cuya extinción puede ser medida espectrofotométricamente a 260 nm. Las lecturas son proporcionales a la cantidad de oligonucleótidos, y ésta a la actividad enzimática de las muestras ensayadas.

Reactivos:

- Solución de sustrato: Se mezclan 10 mg de sustrato de RNA (tipo XI) con 100 ml de solución tampón de acetato sódico 0,1 M a pH 5,0.
- Solución de acetato de uranilo: acetato de uranilo al 0,25% en ácido perclórico al 60%.

Técnica:

1 ml de solución de sustrato de RNA se mezcla con 0,2 ml. de homogenado y se completa el volumen con solución tampón acetato sódico 0,1 M hasta 2 ml. La reacción se lleva a cabo a 37°C durante una hora. El RNA no digerido se precipita con 1,25 mg de solución de acetato de uranilo. La mezcla del ensayo se mantiene 2 horas a 0°C y se centrifuga posteriormente durante 20 minutos a 1.000 g. La absorbancia de los oligonucleótidos liberados se lee a 260 nm.

Cálculos:

Los resultados se llevan a una curva de calibración construida con soluciones patrón de RNasa ácida, $[RNasa\ UI] = 0,074 \cdot x - 0,003$ con una correlación de $r = 0,995$.

Una unidad enzimática es la cantidad de enzima capaz de liberar una unidad óptica de absorción de nucleótidos a 260 nm por minuto y por ml a 37°C.

La cantidad del enzima obtenida se expresa en mUI/órgano, mUI/g, mUI/DNA y mUI/RNA y la actividad específica del enzima se expresa en mUI/mg de proteína.

3.4.5. DETERMINACIÓN DEL ENZIMA CATEPSINA D (*Carboxilpeptidasa D E.C. 3.4.23.5.*)

Fundamento:

Se utiliza el método de Anson modificado (1938). El enzima catepsina D es un endopeptidasa lisosómica que hidroliza los enlaces peptídicos del interior de las moléculas de proteína. Su acción sobre la hemoglobina desnaturalizada con urea, produce polipéptidos que son solubles en ácido tricloroacético y cuya extinción puede ser medida a una longitud de onda de 280nm. Las lecturas son proporcionales a la cantidad de péptidos liberados y ésta a la actividad enzimática de las muestras estudiadas.

Reactivos:

- Solución de sustrato de hemoglobina: 5 g de hemoglobina liofilizada se mezcla con 80 ml de H₂O destilada y desionizada. Después de dializar la solución se añaden 80 g de urea y se incuba durante 1 h a 37°C. Posteriormente se mezclan con 125 ml de buffer fosfato 0,133 M a pH 8,5 y 10 g de urea y se deja en reposo toda la noche. Finalmente la solución se ajusta a pH 4,4 con ácido acético glacial.
- Solución TCA: ácido tricloroacético al 5%

Técnica:

2,5 ml de sustrato de hemoglobina se mezcla con 0,5 ml de muestra. Después de 10 minutos de incubación a 37°C, la reacción se para con 5 ml de solución TCA. La mezcla del ensayo se centrifuga posteriormente a 1.000 g durante 20 min para precipitar las proteínas no digeridas. La absorbancia de los polipéptidos producto de la hidrólisis de la hemoglobina se mide a 280 nm frente al blanco.

Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de 1 en absorbancia durante 10 min a pH 4,4 y 37°C.

Cálculos:

Las absorbancias se llevan a la curva de calibración obteniendo así la unidades enzimáticas correspondientes [Catepsina (UI)] = $1,078 \cdot x - 0,078$
 $r=0,984$.

La cantidad de enzima se expresa en UI/órgano, UI/g y UI/DNA y la actividad específica del enzima se expresa en mUI/mg de proteína.

3.5. MÉTODOS ESTADÍSTICOS E INFORMÁTICOS UTILIZADOS

3.5.1. MÉTODOS ESTADÍSTICOS APLICADOS

Para detectar diferencias entre las medias de distintos grupos se utiliza el análisis de la varianza uni y multifactorial, mediante el procedimiento Split-plot del apartado GLM (General Lineal Model) del SAS que posee diferente número de casos por celda de análisis (Statistical Analysis Systems, 1990).

También se utiliza el test de comparación múltiple LSD de SPSS/PC⁺ (Norusis, 1986) a fin de determinar donde se encuentran las diferencias detectadas por el ANOVA unifactorial.

La medida de la correlación lineal o de Pearson se aplica a la determinación del grado de relación lineal entre dos o más variables, su expresión gráfica (Statgraphics, 1986) y la recta de regresión correspondiente (Turner, 1970). También se aplica la ecuación alométrica para obtener el correspondiente coeficiente de crecimiento ($Y = a.X^b$) (Kowalski y Gluire, 1974).

La determinación de diferencias entre las pendientes de las rectas de regresión lineal y entre los coeficientes alométricos de dos grupos, se realiza mediante el procedimiento de variables ficticias (Dummy variables) (Wallace y Silver, 1988).

3.5.2. CRITERIOS APLICADOS AL ESTUDIO DEL CRECIMIENTO

El estudio del crecimiento del músculo gastrocnemio se ha llevado a cabo mediante dos perspectivas: el análisis transversal y el longitudinal.

En el análisis transversal se comparan los distintos grupos en un mismo punto determinado del crecimiento (Goldstein, 1978), utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) en cada uno de los períodos experimentales, a fin de determinar la influencia de los factores individualmente considerados: DIETA, SEXO y TRATAMIENTO. La determinación exacta de las diferencias entre grupos se lleva a cabo mediante el test de comparación múltiple LSD.

En el análisis longitudinal se utiliza también el ANOVA, pero en éste caso se determina la influencia del factor EDAD y sus posibles interacciones con los factores anteriores.

Además se utiliza la ecuación alométrica mediante la que se puede comparar una parte distinguible del cuerpo (Y) (músculo gastrocnemio, proteína muscular, etc...) con el total corporal o el muscular (X) y permite aplicar las prioridades que establece un organismo al aumentar su biomasa, bajo el supuesto de un crecimiento exponencial, cuando el período de tiempo es pequeño (Kowalski y Gluire, 1974).

Los procedimientos de series temporales en el análisis longitudinal (Kowalski y Gluire, 1974) se utilizan para la determinación de la evolución de las variables consideradas y su representación frente la edad.

3.5.3. MATERIAL INFORMÁTICO UTILIZADO

Centro de proceso de datos de la U.C.M. Sistema IBM 4381/P22.

- Sistemas Operativos: VM/SP (versión 4.0)
- Herramientas de usuario: DMS/CMS
- Análisis estadístico aplicado: SAS BASIC, SAS EST

Sección Departamental de Fisiología Animal. Facultad de Farmacia. U.C.M. Sistema COP-AT 286-12 (IBM COMPATIBLE).

- Sistemas Operativos: MS-DOS (versión 5.0)
- Herramientas de usuario: PC Tools 7.1 (Central Point Software Inc.)
- Proceso de textos: Word Perfect V 5.2 (Español)
- Análisis estadístico aplicado: SPSS/PC+ V 1.1
- Representación gráfica: GRAPHER 1.79 (Golden Software)
- Sistema de base de datos: dBase IV (Español)

3.6. APARATOS UTILIZADOS

- Agitadores magnéticos MATHESON SCIENTIFIC y agitadores mecánicos de tubos HEIDOLPH REAX 2000.
- Balanzas de precisión METTLER PM 460 DELTARANGE y balanzas analíticas SAUTER 414/13 y METTLER H72.
- Baño ATOM UNITRONIC 320 y baños con termostato de inmersión electrónico TECTRON S-473-100.
- Centrífuga de refrigeración "KUBOTA 5500".
- Digestor KJELDATHERM y sistema de determinación KJELDAHL BÜCHI.
- Estufa desecación y esterilización SELECT serie V-300.
- Extractor de grasa SOXHLET modelo SOXTEC SYSTEM M6 1040-001 TECATOR.
- Fotocolorímetro SPECTRONIC 20 D y Espectrofotómetro SPECTRONIC 601.
- Homogenizador ULTRATURRAX T 25 JANKE & KUNKLE K.G.
- Jaulas metabólicas de metacrilato.
- Mufla SELECT HORN.
- PHmetro CRISON MICROPH 2001.
- Pipetas automáticas PIPETMAN GILSON.

4. RESULTADOS

Los resultados se presentan bajo dos conceptos:

- 1) Exposición numérica y gráfica (Tablas y gráficas).
- 2) Descripción de cada grupo de resultados.

Tabla 1. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el Peso corporal final, Peso muscular e Índice miosomático del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

PESO CORPORAL FINAL (PCF) (g)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	11,1 ± 0,2 ^a	12,7 ± 0,4 ^a	13,0 ± 0,5 ^a	13,1 ± 0,4 ^a
Día 30	16,3 ± 0,4 ^{bc}	14,6 ± 0,4 ^b	15,5 ± 0,5 ^{b+}	13,0 ± 0,4 ^{a+}
Día 35	14,9 ± 0,2 ^b	15,6 ± 0,5 ^b	15,5 ± 0,3 ^b	15,2 ± 0,6 ^{ab}
Día 40	16,2 ± 0,4 ^{bc}	15,9 ± 0,4 ^b	17,9 ± 0,6 ^c	16,4 ± 0,6 ^{bc}
Día 45	16,9 ± 0,7 ^c	16,0 ± 0,5 ^{b*}	18,4 ± 0,5 ^c	18,3 ± 0,7 ^{c*}
Día 50	17,1 ± 0,5 ^{c*}	18,6 ± 0,7 ^c	20,5 ± 0,5 ^{d*}	18,8 ± 1,9 ^c

PESO MUSCULAR (PM) (g)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,045 ± 0,001 ^{a+*}	0,065 ± 0,002 ^{a+*}	0,058 ± 0,002 ^{a*}	0,057 ± 0,002 ^{a*}
Día 30	0,087 ± 0,002 ^{b+}	0,075 ± 0,002 ^{b+}	0,083 ± 0,003 ^{bc+}	0,071 ± 0,002 ^{b+}
Día 35	0,074 ± 0,003 ^c	0,081 ± 0,003 ^b	0,077 ± 0,002 ^b	0,077 ± 0,003 ^{bc}
Día 40	0,080 ± 0,003 ^{bc}	0,078 ± 0,003 ^b	0,087 ± 0,004 ^{cd}	0,084 ± 0,004 ^c
Día 45	0,075 ± 0,002 ^{c*}	0,080 ± 0,003 ^{b*}	0,093 ± 0,003 ^{dc+*}	0,101 ± 0,004 ^{d+*}
Día 50	0,089 ± 0,003 ^{b+}	0,099 ± 0,003 ^{c+}	0,096 ± 0,003 ^c	0,093 ± 0,004 ^c

ÍNDICE MIOSOMÁTICO (IMS) (mg/g)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	4,0 ± 0,11 ^{a+*}	5,1 ± 0,03 ^{ab+*}	4,4 ± 0,19 ^{a*}	4,3 ± 0,13 ^{a*}
Día 30	5,3 ± 0,09 ^b	5,1 ± 0,09 ^{ab}	5,3 ± 0,13 ^b	5,4 ± 0,15 ^{bc}
Día 35	4,9 ± 0,15 ^b	5,1 ± 0,11 ^{ab}	4,9 ± 0,15 ^{bc}	5,0 ± 0,03 ^b
Día 40	4,9 ± 0,15 ^b	4,9 ± 0,05 ^b	4,8 ± 0,23 ^{ac}	5,1 ± 0,08 ^b
Día 45	4,4 ± 0,09 ^{c+*}	5,0 ± 0,07 ^{ab+*}	5,0 ± 0,06 ^{bc+*}	5,5 ± 0,08 ^{c+*}
Día 50	5,1 ± 0,08 ^{b*}	5,3 ± 0,08 ^a	4,6 ± 0,06 ^{ac+*}	5,1 ± 0,49 ^{b+}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 2. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el incremento acumulado de peso y sobre las Velocidades absoluta y fraccional de crecimiento ponderal del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	INCREMENTO ACUMULADO DE PESO MUSCULAR (IACM)(g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,012 ± 0,001 ^{a+}	0,016 ± 0,001 ^{a+}	0,008 ± 0,002 ^{a+}	0,013 ± 0,001 ^{a+}
Día 30	0,023 ± 0,002 ^{bc+}	0,012 ± 0,002 ^{a+}	0,019 ± 0,001 ^b	0,015 ± 0,001 ^a
Día 35	0,018 ± 0,001 ^{b*}	0,018 ± 0,002 ^a	0,024 ± 0,002 ^{b*}	0,020 ± 0,001 ^a
Día 40	0,028 ± 0,002 ^c	0,024 ± 0,003 ^b	0,035 ± 0,004 ^c	0,029 ± 0,002 ^b
Día 45	0,035 ± 0,002 ^{d+}	0,024 ± 0,004 ^{b+}	0,036 ± 0,001 ^c	0,035 ± 0,003 ^{bc*}
Día 50	0,038 ± 0,003 ^d	0,034 ± 0,004 ^c	0,039 ± 0,003 ^c	0,037 ± 0,005 ^c

VELOCIDAD ABSOLUTA DE CRECIMIENTO DE PESO MUSCULAR (VACM) (mg/día)

Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
	Día 25	2,45 ± 0,19 ^{a+}	3,19 ± 0,16 ^{a+*}	1,68 ± 0,40 ^{ab+}
Día 30	2,25 ± 0,21 ^{a+*}	1,23 ± 0,19 ^{b+}	1,88 ± 0,07 ^{a+*}	1,51 ± 0,13 ^{b+}
Día 35	1,23 ± 0,07 ^b	1,21 ± 0,11 ^b	1,59 ± 0,14 ^{ab}	1,36 ± 0,05 ^b
Día 40	1,39 ± 0,11 ^b	1,19 ± 0,13 ^b	1,72 ± 0,20 ^{ab}	1,46 ± 0,10 ^b
Día 45	1,40 ± 0,09 ^{b+}	0,96 ± 0,15 ^{b+*}	1,45 ± 0,03 ^{ab}	1,41 ± 0,10 ^{b*}
Día 50	1,26 ± 0,09 ^b	1,13 ± 0,11 ^b	1,28 ± 0,09 ^b	1,24 ± 0,17 ^b

VELOCIDAD FRACCIONAL DE CRECIMIENTO DE PESO MUSCULAR (VFCM) (%/día)

Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
	Día 25	7,61 ± 0,58 ^{a*}	6,67 ± 0,28 ^{a*}	3,16 ± 0,74 ^{a+*}
Día 30	4,21 ± 0,41 ^{b+*}	2,09 ± 0,42 ^{b+*}	3,39 ± 0,28 ^{a*}	2,93 ± 0,24 ^{b*}
Día 35	2,53 ± 0,21 ^c	2,06 ± 0,30 ^b	3,15 ± 0,34 ^{a+}	2,48 ± 0,26 ^{b+}
Día 40	2,93 ± 0,27 ^{c+}	2,14 ± 0,25 ^{b+}	3,42 ± 0,52 ^a	2,82 ± 0,27 ^b
Día 45	3,14 ± 0,29 ^{c+}	1,79 ± 0,40 ^{b+}	2,80 ± 0,19 ^a	2,58 ± 0,23 ^b
Día 50	2,87 ± 0,28 ^{c+}	1,89 ± 0,18 ^{b+}	2,24 ± 0,37 ^a	2,24 ± 0,32 ^b

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 3. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre Proteína absoluta y relativa del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c, de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **No Tratados (NT)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	PROTEÍNA ABSOLUTA (PrA) (mg/órgano)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	6,0 ± 0,2 ^{a+*}	8,9 ± 0,3 ^{a+*}	9,2 ± 0,3 ^{a*}	9,3 ± 0,3 ^{a*}
Día 30	10,2 ± 0,3 ^{b+*}	9,5 ± 0,2 ^{ab+*}	8,9 ± 0,3 ^{a*}	8,2 ± 0,2 ^{b*}
Día 35	9,9 ± 0,2 ^{b*}	10,4 ± 0,4 ^{b*}	8,7 ± 0,1 ^{a+*}	9,7 ± 0,2 ^{a+*}
Día 40	10,7 ± 0,3 ^{bc+*}	12,2 ± 0,3 ^{c+*}	11,8 ± 0,2 ^{b*}	11,1 ± 0,3 ^{c*}
Día 45	11,8 ± 0,3 ^c	12,2 ± 0,3 ^{c*}	11,9 ± 0,2 ^{b+}	13,0 ± 0,2 ^{d+*}
Día 50	14,9 ± 0,4 ^{d+*}	17,1 ± 0,3 ^{d+*}	13,0 ± 0,2 ^{c*}	13,3 ± 0,2 ^{d*}

Edad	PROTEÍNA RELATIVA (PrR) (mg/g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	135,3 ± 2,7 ^{a*}	138,1 ± 1,5 ^{a*}	159,4 ± 0,8 ^{a+*}	135,8 ± 2,0 ^{a+*}
Día 30	117,5 ± 1,7 ^{b+*}	126,5 ± 2,1 ^{b+*}	106,2 ± 0,5 ^{b+*}	114,8 ± 1,9 ^{b+*}
Día 35	134,5 ± 2,5 ^{a*}	129,4 ± 2,7 ^{b*}	112,2 ± 1,8 ^{c*}	117,0 ± 1,0 ^{b*}
Día 40	134,1 ± 1,8 ^{a+}	156,3 ± 1,9 ^{c+*}	135,3 ± 0,6 ^d	132,8 ± 2,5 ^{ac*}
Día 45	157,3 ± 2,9 ^{c*}	152,6 ± 2,4 ^{c*}	128,4 ± 2,3 ^{e*}	128,7 ± 2,3 ^{c*}
Día 50	167,4 ± 1,3 ^{d+*}	172,5 ± 1,3 ^{d+*}	128,9 ± 1,7 ^{e+*}	142,9 ± 2,6 ^{d+*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 4. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el Incremento acumulado de proteína y sobre las Velocidades absoluta y fraccional de crecimiento de la proteína del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c, de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

INCREMENTO ACUMULADO DE PROTEÍNA (IAPrM) (mg)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	2,37 ± 0,17 ^{a+*}	3,68 ± 0,18 ^{a+*}	0,96 ± 0,23 ^{a*}	1,33 ± 0,03 ^{a*}
Día 30	3,74 ± 0,34 ^{bc+*}	2,84 ± 0,45 ^{a+*}	2,15 ± 0,08 ^{b+*}	1,56 ± 0,14 ^{a+*}
Día 35	3,16 ± 0,19 ^{b+}	4,20 ± 0,39 ^{a+*}	2,75 ± 0,24 ^b	2,12 ± 0,08 ^{a*}
Día 40	4,70 ± 0,37 ^c	5,51 ± 0,61 ^{b*}	3,96 ± 0,46 ^c	3,05 ± 0,21 ^{b*}
Día 45	5,88 ± 0,35 ^{d*}	5,56 ± 0,90 ^{b*}	4,16 ± 0,10 ^{c*}	3,71 ± 0,27 ^{cb*}
Día 50	6,34 ± 0,46 ^{d+*}	7,81 ± 0,80 ^{c+*}	4,43 ± 0,31 ^{c*}	3,94 ± 0,56 ^{c*}

VELOCIDAD ABSOLUTA DE CRECIMIENTO DE LA PROTEÍNA (VAPrM) (mg/día)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,474 ± 0,034 ^{a+*}	0,737 ± 0,038 ^{a+*}	0,194 ± 0,047 ^{a*}	0,267 ± 0,007 ^{a*}
Día 30	0,374 ± 0,034 ^{b*}	0,284 ± 0,046 ^{b*}	0,216 ± 0,009 ^{a+*}	0,156 ± 0,014 ^{b+*}
Día 35	0,211 ± 0,013 ^c	0,280 ± 0,026 ^{b*}	0,183 ± 0,017 ^a	0,142 ± 0,006 ^{b*}
Día 40	0,235 ± 0,019 ^{c*}	0,276 ± 0,031 ^{b*}	0,198 ± 0,023 ^{a+*}	0,153 ± 0,011 ^{b+*}
Día 45	0,235 ± 0,014 ^{c*}	0,223 ± 0,036 ^{b*}	0,167 ± 0,004 ^{a*}	0,149 ± 0,011 ^{b*}
Día 50	0,211 ± 0,016 ^{c*}	0,261 ± 0,027 ^{b*}	0,148 ± 0,010 ^{a*}	0,131 ± 0,019 ^{b*}

VELOCIDAD FRACCIONAL DE CRECIMIENTO DE LA PROTEÍNA (VFPrM) (%/día)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	12,75 ± 1,08 ^{a+*}	15,91 ± 1,10 ^{a+*}	2,62 ± 0,62 ^{a+*}	3,30 ± 0,14 ^{a+*}
Día 30	4,85 ± 0,49 ^{b*}	4,00 ± 1,01 ^{b*}	2,82 ± 0,20 ^{a+*}	1,98 ± 0,16 ^{b+*}
Día 35	3,09 ± 0,30 ^c	4,00 ± 0,89 ^{b*}	2,59 ± 0,27 ^{a+}	1,71 ± 0,13 ^{b+*}
Día 40	3,54 ± 0,33 ^{bc}	4,19 ± 0,51 ^{b*}	2,81 ± 0,41 ^{a+}	1,92 ± 0,16 ^{b+*}
Día 45	3,93 ± 0,48 ^{bc*}	3,76 ± 1,11 ^{b*}	2,31 ± 0,13 ^{a*}	1,80 ± 0,15 ^{b*}
Día 50	3,56 ± 0,39 ^{bc*}	3,48 ± 0,32 ^{b*}	1,88 ± 0,28 ^{a*}	1,57 ± 0,22 ^{b*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 5. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), la Dieta (D) y el Sexo ((S) sobre el estudio del crecimiento² del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	PCF	PM	IMS	IACM	VACM	VFCM	PrA	PrR	IAPrM	VAPrM	VFPrM
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0030	0,0004	NS	0,019	NS	0,0290	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
SEXO	NS	NS	0,0006	0,004	NS	0,0001	0,0001	0,0220	NS	NS	NS
ExD	0,011	0,0001	0,0020	0,041	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0001
ExS	0,044	0,0001	NS	0,030	0,0001	NS	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,017
DxS	0,035	0,0048	NS	NS	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,023
ExDxS	NS	0,0214	0,0079	NS	NS	NS	0,0001	0,0001	NS	NS	NS

1. Valor de la probabilidad ($p < 0,05$). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: Peso corporal final (PCF), peso muscular (PM), índice miosomático (IMS), incremento acumulado de peso muscular (IACM), velocidad absoluta (VACM) y fraccional (VFCM) de crecimiento de peso muscular, proteína muscular absoluta (PrA) y relativa (PrR), incremento acumulado de proteína muscular (IAPrM), velocidad absoluta (VAPrM) y fraccional (VFPrM) de crecimiento de proteína muscular.

Tabla 6. Relación con la Edad de las variables: Peso corporal, peso muscular, índice miosomático y proteína absoluta y relativa del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
Peso corporal	♀	$y = 12,12 + x \cdot 0,190$	0,034 ^{a1}	0,719	0,0000	$y = 11,97 + x \cdot 0,278$	0,026 ^{a2}	0,893	0,0000
	♂	$y = 12,22 + x \cdot 0,193$	0,027 ^{a1}	0,796	0,0000	$y = 11,28 + x \cdot 0,260$	0,043 ^{a1}	0,751	0,0000
Peso muscular	♀	$y = 0,055 + x \cdot 0,0011$	0,0002 ^{a1}	0,605	0,0004	$y = 0,059 + x \cdot 0,0013$	0,0001 ^{a1}	0,808	0,0000
	♂	$y = 0,615 + x \cdot 0,0010$	0,0001 ^{a1}	0,783	0,0000	$y = 0,053 + x \cdot 0,0015$	0,0001 ^{a1}	0,849	0,0000
Índice Miosomático	♀	$y = 4,490 + x \cdot 0,0183$	0,0107 ^{a1}	0,307	NS	$y = 5,066 + x \cdot 0,0029$	0,0044 ^{a1}	0,123	NS
	♂	$y = 4,887 - x \cdot 0,0001$	0,0091 ^{b1}	-0,002	NS	$y = 4,719 + x \cdot 0,0223$	0,0120 ^{b2}	0,330	NS
Proteína/órgano	♀	$y = 5,621 + x \cdot 0,285$	0,028 ^{a1}	0,883	0,0000	$y = 7,431 + x \cdot 0,179$	0,019 ^{a2}	0,862	0,0000
	♂	$y = 6,717 + x \cdot 0,288$	0,029 ^{a1}	0,879	0,0000	$y = 7,189 + x \cdot 0,205$	0,018 ^{b2}	0,904	0,0000
Proteína/g	♀	$y = 113,16 + x \cdot 1,594$	0,248 ^{a1}	0,771	0,0000	$y = 134,68 - x \cdot 0,359$	0,379 ^{a2}	-0,176	NS
	♂	$y = 118,20 + x \cdot 1,580$	0,233 ^{a1}	0,788	0,0000	$y = 119,38 + x \cdot 0,531$	0,218 ^{a2}	0,418	NS

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

p < 0,01 según análisis *Dummy variables*.

Tabla 7. Relación con la Edad de las variables: Incremento acumulado de peso (IACM) y velocidades absoluta (VACM) y fraccional (VFCM) de crecimiento ponderal del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
IACM	♀	$y=0,008 + x \cdot 0,0010$	0,0001 ^{a1}	0,860	0,0000	$y=0,005 + x \cdot 0,0012$	0,0001 ^{a2}	0,885	0,0000
	♂	$y=0,008 + x \cdot 0,0007$	0,0001 ^{b1}	0,728	0,0000	$y=0,005 + x \cdot 0,0011$	0,0001 ^{a2}	0,861	0,0000
VACM	♀	$y=2,50 - x \cdot 0,048$	0,008 ^{a1}	-0,718	0,0000	$y=1,92 - x \cdot 0,018$	0,009 ^{a2}	-0,345	NS
	♂	$y=2,60 - x \cdot 0,063$	0,013 ^{a1}	-0,658	0,0001	$y=2,29 - x \cdot 0,039$	0,008 ^{b1}	-0,666	0,0001
VFCM	♀	$y=65,38 - x \cdot 1,513$	0,306 ^{a1}	-0,683	0,0000	$y=36,41 - x \cdot 0,347$	0,208 ^{a2}	-0,300	NS
	♂	$y=52,52 - x \cdot 1,413$	0,313 ^{a1}	-0,648	0,0001	$y=43,48 - x \cdot 0,780$	0,170 ^{a2}	-0,654	0,0001

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

Tabla 8. Relación con la Edad de las variables: Incremento acumulado de proteína (IAPrM) y velocidades absoluta (VAPrM) y fraccional (VFPrM) de crecimiento de la proteína del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
IAPrM	♀	$y=1,58 + x \cdot 0,159$	0,017 ^{a1}	0,863	0,0001	$y=0,61 + x \cdot 0,140$	0,013 ^{a1}	0,885	0,0001
	♂	$y=1,92 + x \cdot 0,172$	0,030 ^{a1}	0,727	0,0001	$y=0,58 + x \cdot 0,110$	0,013 ^{a1}	0,861	0,0001
VAPrM	♀	$y=0,46 - x \cdot 0,009$	0,001 ^{a1}	-0,756	0,0000	$y=0,22 - x \cdot 0,002$	0,001 ^{a2}	-0,344	NS
	♂	$y=0,60 - x \cdot 0,014$	0,003 ^{a1}	-0,659	0,0001	$y=0,23 - x \cdot 0,003$	0,001 ^{a2}	-0,650	0,0001
VFPrM	♀	$y=101,1 - x \cdot 2,750$	0,590 ^{a1}	-0,658	0,0001	$y=30,12 - x \cdot 0,280$	0,165 ^{a2}	-0,312	NS
	♂	$y=108,5 - x \cdot 3,020$	0,770 ^{a1}	-0,599	0,0006	$y=29,49 - x \cdot 0,510$	0,111 ^{a2}	-0,655	0,0001

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

4.1. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS, ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA, NO TRATADOS (NT) Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 Y 20%) (Tablas 1-8, Gráficas 1 y 3).

De acuerdo con el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 5), la EDAD afecta significativamente a todos los parámetros en estudio: Peso corporal final (PCF), peso muscular (PM), índice miosomático (IMS), incremento acumulado de peso (IACM), velocidad absoluta de crecimiento de peso (VACM), velocidad fraccional de crecimiento de peso (VFCM), proteína absoluta (PrA) y relativa (PrR), incremento acumulado de proteína (IAPrM), velocidad absoluta de crecimiento de proteína (VAPrM) y velocidad fraccional de crecimiento de proteína muscular (VFPrM).

A lo largo del período experimental (25-50 días), se produce un aumento paulatino en los valores de PCF y PM de todos los grupos de animales estudiados, en especial en el grupo ♀ 12% NT, cuyo PM alcanza un 97% sobre su valor inicial (Tabla 1). Este resultado determina una correlación lineal temporal significativa, cuyos coeficientes de correlación más altos corresponden a los grupos con mayor nivel proteico dietario, lo que demuestra el carácter edad-dependiente del crecimiento muscular (Tabla 6 y Gráfica 1a).

Además, el PM presenta un crecimiento proporcionalmente superior al PCF, que se manifiesta en el aumento de IMS entre los días 25 y 50 de vida en los grupos ♀ 12% NT y ♂ 20% NT (Tabla 1), aún cuando no presentan correlación temporal significativa (Tabla 6).

El crecimiento ponderal del músculo se realiza mediante un aumento edad-dependiente del IACM (Tablas 2 y 7) que llega a ser del 387% en el grupo ♀ 20% NT. Paralelamente aparece un descenso temporal en las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento muscular (Tabla 2), que oscila entre un 50% y un 60% en todos los grupos estudiados, a excepción de los animales ♀ 20% NT que presentan

carácter edad-independiente, de acuerdo con el valor de las pendientes de las ecuaciones de regresión frente a la edad (Tabla 7).

Por otra parte, los valores de proteína absoluta y relativa y del IAPrM, aumentan durante el tiempo de experiencia en todos los grupos estudiados, excepto el valor de PrR del grupo ♀ 20% NT, que desciende significativamente respecto al valor inicial. Los mayores porcentajes de incremento de proteína absoluta corresponden a los animales sometidos al 12% de proteína (♀ = 147% y ♂ = 91%), mientras que el mayor IAPrM lo obtiene el grupo ♀ 20% NT (Tablas 3 y 4, Gráficas 1b y 3a).

Las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento de la proteína muscular descienden temporalmente en todos los grupos estudiados, a excepción de los animales ♀ 20% NT en el que se mantienen estables (Tabla 4, Gráfica 3b).

El carácter edad-dependiente de los valores relacionados con la proteína muscular se refleja en sus correspondientes rectas de regresión frente a la edad, las cuales presentan altos coeficientes de correlación en todos los grupos, a excepción de los valores de proteína relativa (♀ y ♂ 20% NT) y de VAPrM y VFPrM (♀ 20% NT) que resultan no significativos (Tablas 6 y 8).

La DIETA afecta significativamente a todos los parámetros estudiados, a excepción del IMS y de la VACM según el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 5).

No obstante, las diferencias dietarias en las variables PCF, PM, IMS, IACM y VFCM son muy puntuales según el test LSD, apareciendo un ligero incremento en los días 45 y 50 de vida en los animales sometidos al 20% de proteína, aunque las mayores VFCM las presentan los grupos sometidos al 12% de proteína entre los 25 y 30 días de vida (Tablas 1 y 2). También los grupos del 12% presentan a día 50 de vida un ligero aumento de la proteína absoluta (Gráfica 1b), aunque la concentración de proteína muscular (proteína/g) resulta siempre superior a la de los animales del 20% (Tabla 3). Este resultado es consecuencia de la elevación tanto del IAPrM como de las variables VAPrM y VFPrM en relación a las obtenidas por los animales de mayor nivel proteico (Tabla 4, Gráficas 3a y 3b).

Además, las variables IMS, IACM, VFCM, PrA y PrR se encuentran afectadas significativamente por el SEXO según el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 5), aunque se detectan diferencias de carácter puntual en los demás parámetros, según el test LSD (Tablas 1-4).

En general, los machos obtienen valores puntuales significativamente mayores que las hembras, independientemente de la dieta utilizada en todos los parámetros afectados.

La diferente evolución temporal entre los animales estudiados es, básicamente, una manifestación del efecto de las interacciones ExD, ExS y en menor medida de la interacciones ExDxS (Tabla 5).

Se puede destacar, que aún cuando las más altas velocidades absoluta y fraccional de crecimiento de proteína muscular corresponden a los grupos del 12% de proteína (Tablas 2 y 4), su pérdida temporal es mucho más pronunciada que la correspondiente a los grupos de mayor nivel proteico, de acuerdo con las pendientes de las ecuaciones de regresión respectivas (Tablas 7 y 8).

Tabla 9. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el Peso corporal final, Peso e Índice miosomático del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

PESO CORPORAL FINAL (PCF) (g)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	11,9 ± 0,4 ^a	11,4 ± 0,4 ^a	11,3 ± 0,4 ^a	12,1 ± 0,1 ^a
Día 30	11,8 ± 0,4 ^a	11,7 ± 0,4 ^{ab}	11,2 ± 0,5 ^a	12,0 ± 0,4 ^a
Día 35	14,1 ± 0,4 ^b	13,0 ± 0,4 ^b	12,7 ± 0,5 ^a	13,8 ± 0,3 ^b
Día 40	13,3 ± 0,4 ^{ab*}	14,6 ± 0,5 ^c	15,3 ± 0,5 ^{b*}	15,8 ± 0,5 ^c
Día 45	14,0 ± 0,5 ^{b*}	15,2 ± 0,3 ^{c*}	16,7 ± 0,9 ^{b+*}	18,3 ± 0,7 ^{d+*}
Día 50	17,0 ± 0,6 ^{c*}	15,6 ± 0,5 ^{c*}	20,1 ± 0,6 ^{c+*}	20,4 ± 1,0 ^{e*}

PESO MUSCULAR (PM) (g)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,063 ± 0,004 ^{abc}	0,067 ± 0,003 ^a	0,064 ± 0,004 ^a	0,061 ± 0,002 ^a
Día 30	0,057 ± 0,003 ^b	0,059 ± 0,002 ^b	0,050 ± 0,002 ^{b+}	0,064 ± 0,002 ^{ab+}
Día 35	0,067 ± 0,002 ^{c*}	0,065 ± 0,003 ^{ab}	0,058 ± 0,003 ^{a+*}	0,071 ± 0,003 ^{bc+}
Día 40	0,065 ± 0,003 ^{c*}	0,067 ± 0,002 ^{a*}	0,079 ± 0,004 ^{c*}	0,080 ± 0,002 ^{d*}
Día 45	0,071 ± 0,002 ^{c*}	0,075 ± 0,002 ^{c*}	0,080 ± 0,003 ^{c+*}	0,090 ± 0,004 ^{c+*}
Día 50	0,085 ± 0,003 ^{d+*}	0,078 ± 0,002 ^{c+*}	0,096 ± 0,003 ^{d*}	0,098 ± 0,005 ^{e*}

ÍNDICE MIOSOMÁTICO (IMS) (mg/g)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	5,2 ± 0,41 ^{a+}	5,8 ± 0,10 ^{a+*}	5,7 ± 0,44 ^{a+}	5,0 ± 0,23 ^{ab+*}
Día 30	4,8 ± 0,16 ^{ab}	5,0 ± 0,21 ^b	4,4 ± 0,13 ^{b+}	5,3 ± 0,16 ^{b+}
Día 35	4,7 ± 0,09 ^b	4,9 ± 0,19 ^b	4,6 ± 0,02 ^{b+}	5,1 ± 0,08 ^{ab+}
Día 40	4,8 ± 0,10 ^{ab}	4,5 ± 0,15 ^b	5,1 ± 0,09 ^c	5,0 ± 0,13 ^{ab}
Día 45	5,0 ± 0,10 ^{ab}	4,9 ± 0,14 ^b	4,8 ± 0,26 ^{bc}	4,8 ± 0,03 ^a
Día 50	5,0 ± 0,14 ^{ab}	4,9 ± 0,11 ^b	4,7 ± 0,15 ^{bc}	4,7 ± 0,01 ^a

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 10. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el incremento acumulado de peso y sobre las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento ponderal del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c, de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	INCREMENTO ACUMULADO DE PESO MUSCULAR (IACM) (g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,008 ± 0,001 ⁺⁺	0,005 ± 0,001 ⁺⁺	0,008 ± 0,001 [*]	0,008 ± 0,001 [*]
Día 30	0,008 ± 0,001 [*]	0,007 ± 0,001 [*]	0,010 ± 0,002 [*]	0,009 ± 0,002 ^{ab}
Día 35	0,017 ± 0,002 ^{b+}	0,010 ± 0,001 ^{b+}	0,015 ± 0,001 [*]	0,015 ± 0,001 ^b
Día 40	0,019 ± 0,002 ^{bc*}	0,013 ± 0,002 ^{c*}	0,024 ± 0,003 ^{b*}	0,024 ± 0,002 ^{cx}
Día 45	0,023 ± 0,002 ^{c++}	0,016 ± 0,001 ^{d++}	0,032 ± 0,004 ^{c*}	0,035 ± 0,003 ^{d*}
Día 50	0,032 ± 0,002 ^{d++}	0,017 ± 0,002 ^{d++}	0,045 ± 0,003 ^{d*}	0,043 ± 0,004 ^{c*}

Edad	VELOCIDAD ABSOLUTA DE CRECIMIENTO DE PESO MUSCULAR (VACM) (mg/día)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	1,67 ± 0,21 ^{a+}	1,01 ± 0,16 ^{a++}	1,64 ± 0,18 ^a	1,67 ± 0,14 ^{a*}
Día 30	0,84 ± 0,09 ^b	0,70 ± 0,10 ^b	1,04 ± 0,15 ^b	0,85 ± 0,19 ^b
Día 35	1,12 ± 0,10 ^{b+}	0,68 ± 0,07 ^{b++}	1,02 ± 0,09 ^b	1,00 ± 0,06 ^{b*}
Día 40	0,94 ± 0,08 ^{b+}	0,67 ± 0,07 ^{b++}	1,21 ± 0,13 ^b	1,19 ± 0,11 ^{b*}
Día 45	0,92 ± 0,07 ^{b+}	0,65 ± 0,03 ^{b++}	1,27 ± 0,14 ^{ab}	1,39 ± 0,10 ^{a*}
Día 50	1,07 ± 0,08 ^{b++}	0,58 ± 0,05 ^{b++}	1,49 ± 0,10 ^{a*}	1,44 ± 0,12 ^{a*}

Edad	VELOCIDAD FRACCIONAL DE CRECIMIENTO DE PESO MUSCULAR (VFCM) (%/día)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	3,30 ± 0,40 ^{a+}	1,79 ± 0,29 ^{a+}	3,51 ± 0,40 ^a	2,95 ± 0,28 ^a
Día 30	1,68 ± 0,18 ^{b*}	1,27 ± 0,19 ^b	2,38 ± 0,39 ^{b++}	1,59 ± 0,35 ^{b+}
Día 35	2,19 ± 0,23 ^{b+}	1,22 ± 0,14 ^{b++}	2,35 ± 0,39 ^b	1,84 ± 0,17 ^{b*}
Día 40	2,02 ± 0,16 ^{b+}	1,16 ± 0,13 ^{b++}	2,49 ± 0,28 ^{ab}	2,19 ± 0,21 ^{b*}
Día 45	2,02 ± 0,13 ^{b++}	1,16 ± 0,05 ^{b++}	2,70 ± 0,29 ^{ab*}	2,56 ± 0,15 ^{a*}
Día 50	2,17 ± 0,16 ^{b++}	1,02 ± 0,10 ^{b++}	3,07 ± 0,28 ^{ab*}	2,65 ± 0,21 ^{a*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 11. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la proteína absoluta y relativa del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c, de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	PROTEÍNA ABSOLUTA (PrA) (mg/órgano)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	9,4 ± 0,3 ^{a+*}	11,1 ± 0,2 ^{a+*}	7,7 ± 0,2 ^{a*}	8,0 ± 0,2 ^{a*}
Día 30	7,8 ± 0,2 ^{b+*}	10,5 ± 0,2 ^{a+*}	6,2 ± 0,2 ^{b+*}	12,5 ± 0,2 ^{b+*}
Día 35	8,6 ± 0,1 ^{c*}	8,1 ± 0,1 ^{b*}	7,9 ± 0,2 ^{a+*}	9,5 ± 0,1 ^{c+*}
Día 40	8,6 ± 0,1 ^{d+*}	9,3 ± 0,3 ^{c+*}	11,5 ± 0,2 ^{c+*}	16,3 ± 0,3 ^{d+*}
Día 45	8,1 ± 0,1 ^{bc*}	8,5 ± 0,1 ^{b*}	12,2 ± 0,1 ^{c+*}	14,1 ± 0,1 ^{c+*}
Día 50	8,0 ± 0,3 ^{bc+*}	9,5 ± 0,2 ^{c+*}	19,6 ± 0,6 ^{d*}	20,2 ± 1,1 ^{f*}

Edad	PROTEÍNA RELATIVA (PrR) (mg/g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	150,2 ± 3,1 ^{a*}	153,8 ± 1,1 ^{a*}	125,5 ± 2,7 ^{a*}	129,8 ± 0,5 ^{a*}
Día 30	133,6 ± 0,4 ^{b+*}	180,1 ± 2,1 ^{b+*}	125,5 ± 1,8 ^{a+*}	198,6 ± 1,4 ^{b+*}
Día 35	125,2 ± 2,4 ^{c*}	125,6 ± 2,6 ^{c*}	132,8 ± 1,4 ^{b*}	137,3 ± 2,0 ^{c*}
Día 40	129,2 ± 2,2 ^{bc+*}	138,0 ± 2,3 ^{d+*}	153,5 ± 1,0 ^{c+*}	200,3 ± 2,9 ^{b+*}
Día 45	113,7 ± 0,8 ^{d*}	113,6 ± 1,1 ^{e*}	153,8 ± 2,1 ^{c*}	155,7 ± 0,8 ^{d*}
Día 50	93,7 ± 2,0 ^{e+*}	123,2 ± 1,4 ^{c+*}	204,5 ± 3,4 ^{d*}	206,6 ± 0,9 ^{e*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 12. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el Incremento acumulado de proteína y sobre las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento de la Proteína del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c, de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

INCREMENTO ACUMULADO DE PROTEÍNA MUSCULAR (IAPrM)(mg)

Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	-0,12 ± 0,01 ^{a++}	-0,44 ± 0,07 ^{a++}	2,15 ± 0,23 ^{a*}	1,78 ± 0,16 ^{a*}
Día 30	-0,12 ± 0,01 ^{a++}	-0,61 ± 0,09 ^{a++}	2,71 ± 0,44 ^{a++}	1,90 ± 0,43 ^{a++}
Día 35	-0,24 ± 0,02 ^{b++}	-0,92 ± 0,10 ^{b++}	4,03 ± 0,36 ^{a*}	3,38 ± 0,20 ^{a*}
Día 40	-0,27 ± 0,02 ^{bc++}	-1,25 ± 0,15 ^{c++}	6,49 ± 0,71 ^{b*}	5,44 ± 0,54 ^{b*}
Día 45	-0,33 ± 0,02 ^{c++}	-1,53 ± 0,08 ^{d++}	8,54 ± 1,00 ^{c*}	8,05 ± 0,61 ^{c*}
Día 50	-0,47 ± 0,03 ^{d++}	-1,63 ± 0,17 ^{d++}	12,12 ± 0,88 ^{d*}	10,09 ± 0,94 ^{d*}

VELOCIDAD ABSOLUTA DE CRECIMIENTO DE LA PROTEÍNA (VAPrM) (mg/día)

Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	-0,024 ± 0,003 ^{a++}	-0,088 ± 0,015 ^{a++}	0,431 ± 0,048 ^{a+}	0,358 ± 0,033 ^{a++}
Día 30	-0,012 ± 0,001 ^{b++}	-0,062 ± 0,010 ^{b++}	0,272 ± 0,041 ^{b++}	0,190 ± 0,044 ^{b++}
Día 35	-0,017 ± 0,002 ^{b++}	-0,061 ± 0,007 ^{b++}	0,269 ± 0,024 ^{b*}	0,225 ± 0,014 ^{b*}
Día 40	-0,014 ± 0,001 ^{b++}	-0,063 ± 0,008 ^{ab++}	0,325 ± 0,036 ^{ab*}	0,272 ± 0,027 ^{ab*}
Día 45	-0,013 ± 0,001 ^{b++}	-0,061 ± 0,003 ^{b++}	0,342 ± 0,040 ^{ab*}	0,322 ± 0,025 ^{a*}
Día 50	-0,016 ± 0,001 ^{b++}	-0,054 ± 0,006 ^{b++}	0,404 ± 0,030 ^{a*}	0,336 ± 0,032 ^{a*}

VELOCIDAD FRACCIONAL DE CRECIMIENTO DE LA PROTEÍNA (VFPrM) (%/día)

Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	-0,282 ± 0,037 ^{a++}	-0,840 ± 0,147 ^{a++}	9,258 ± 1,301 ^{a++}	4,309 ± 0,416 ^{ab++}
Día 30	-0,142 ± 0,016 ^{b++}	-0,580 ± 0,090 ^{b++}	7,111 ± 1,365 ^{a++}	2,347 ± 0,528 ^{b++}
Día 35	-0,191 ± 0,017 ^{b++}	-0,581 ± 0,063 ^{b++}	7,568 ± 1,904 ^{a++}	2,719 ± 0,301 ^{b++}
Día 40	-0,157 ± 0,013 ^{b++}	-0,600 ± 0,074 ^{ab++}	6,220 ± 0,810 ^{a++}	3,264 ± 0,332 ^{ab++}
Día 45	-0,154 ± 0,012 ^{b++}	-0,582 ± 0,032 ^{b++}	7,066 ± 0,738 ^{a++}	3,871 ± 0,232 ^{a++}
Día 50	-0,182 ± 0,014 ^{b++}	-0,518 ± 0,054 ^{b++}	7,829 ± 1,036 ^{a++}	4,043 ± 0,334 ^{a++}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

p < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 13. Análisis de la Varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), la Dieta (D) y el Sexo (S) sobre el estudio del crecimiento² del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	PCF	PM	IMS	IACM	VACM	VFCM	PrA	PrR	IAPrM	VAPrM	VFPrM
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	NS
DIETA	0,0030	0,0008	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
SEXO	NS	NS	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExD	0,011	0,0001	NS	0,0001	0,0017	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	NS
ExS	0,044	0,0001	0,0266	NS	NS	NS	0,0001	0,0001	NS	NS	NS
DxS	0,035	NS	NS	0,0001	0,0001	0,017	NS	0,0003	NS	NS	0,0001
ExDxS	NS	0,0018	0,0058	NS	NS	NS	0,0001	0,0001	NS	NS	NS

1. Valor de la probabilidad ($p < 0,05$). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: Peso corporal final (PCF), peso muscular (PM), índice miosomático (IMS), incremento acumulado de peso muscular (IACM), velocidad absoluta (VACM) y fraccional (VFCM) de crecimiento de peso muscular, proteína muscular absoluta (PrA) y relativa (PrR), incremento acumulado de proteína muscular (IAPrM), velocidad absoluta (VAPrM) y fraccional (VFPrM) de crecimiento de proteína muscular.

Tabla 14. Relación con la Edad de las variables: Peso corporal, peso muscular, índice miosomático, proteína absoluta y relativa del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
Peso corporal	♀	$y=10,64 + x \cdot 0,176$	0,027 ^{a1}	0,770	0,0000	$y=8,21 + x \cdot 0,363$	0,034 ^{a2}	0,893	0,0000
	♂	$y=10,32 + x \cdot 0,189$	0,021 ^{a1}	0,856	0,0000	$y=9,18 + x \cdot 0,357$	0,031 ^{a2}	0,903	0,0000
Peso muscular	♀	$y=0,052 + x \cdot 0,0008$	0,0001 ^{a1}	0,718	0,0000	$y=0,044 + x \cdot 0,0015$	0,0002 ^{a2}	0,789	0,0000
	♂	$y=0,058 + x \cdot 0,0005$	0,0001 ^{a1}	0,632	0,0002	$y=0,050 + x \cdot 0,0015$	0,0001 ^{a2}	0,893	0,0000
Índice Miosomático	♀	$y=5,000 - x \cdot 0,0019$	0,0097 ^{a1}	-0,038	NS	$y=5,221 - x \cdot 0,0179$	0,0130 ^{a2}	-0,251	NS
	♂	$y=5,574 - x \cdot 0,0298$	0,0096 ^{b1}	-0,506	0,0043	$y=5,293 - x \cdot 0,0148$	0,0062 ^{a1}	-0,408	NS
Proteína/órgano	♀	$y=9,033 - x \cdot 0,035$	0,013 ^{a1}	-0,439	NS	$y=2,747 + x \cdot 0,463$	0,046 ^{a2}	0,882	0,0000
	♂	$y=10,74 - x \cdot 0,070$	0,020 ^{b1}	-0,548	0,0017	$y=6,168 + x \cdot 0,414$	0,049 ^{a2}	0,843	0,0000
Proteína/g	♀	$y=158,06 - x \cdot 1,932$	0,155 ^{a1}	-0,919	0,0000	$y=99,17 + x \cdot 2,862$	0,289 ^{a2}	0,881	0,0000
	♂	$y=173,02 - x \cdot 1,941$	0,339 ^{a1}	-0,733	0,0000	$y=139,54 + x \cdot 1,819$	0,610 ^{b2}	0,490	0,0059

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

Tabla 15. Relación con la Edad de las variables: Incremento acumulado de peso (IACM) y velocidades absoluta (VACM) y fraccional (VFCM) de crecimiento ponderal del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
IACM	♀	$y=0,0015 + x \cdot 0,0009$	0,00009 ^{a1}	0,900	0,0000	$y=-0,0031 + x \cdot 0,0014$	0,0001 ^{a2}	0,902	0,0000
	♂	$y=0,0022 + x \cdot 0,0005$	0,00006 ^{b1}	0,873	0,0000	$y=-0,0041 + x \cdot 0,0015$	0,0001 ^{a2}	0,921	0,0000
VACM	♀	$y=1,39 - x \cdot 0,0170$	0,007 ^{a1}	-0,359	NS	$y=1,27 + x \cdot 0,0007$	0,007 ^{a2}	0,017	NS
	♂	$y=0,94 - x \cdot 0,0130$	0,004 ^{a1}	-0,473	0,008	$y=1,14 + x \cdot 0,0058$	0,008 ^{b2}	0,133	NS
VFCM	♀	$y=27,14 - x \cdot 0,273$	0,144 ^{a1}	-0,337	NS	$y=28,66 - x \cdot 0,063$	0,178 ^{a1}	-0,066	NS
	♂	$y=16,97 - x \cdot 0,241$	0,081 ^{a1}	-0,470	0,0059	$y=21,26 + x \cdot 0,100$	0,149 ^{a1}	0,126	NS

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

Tabla 16. Relación con la Edad de las variables: Incremento de acumulado de proteína (IAPrM) y velocidades absoluta (VAPrM) y fraccional (VFPrM) de crecimiento de la proteína del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
IAPrM	♀	$y = -0,02 - x \cdot 0,013$	0,001 ^{a1}	-0,897	0,0001	$y = 0,96 + x \cdot 0,390$	0,030 ^{a2}	0,908	0,0001
	♂	$y = -0,16 - x \cdot 0,051$	0,005 ^{b1}	-0,872	0,0001	$y = -1,09 + x \cdot 0,350$	0,020 ^{a2}	0,917	0,0001
VAPrM	♀	$y = -0,02 + x \cdot 0,0002$	0,0001 ^{a1}	0,385	NS	$y = 0,327 + x \cdot 0,0007$	0,002 ^{a2}	0,066	NS
	♂	$y = -0,08 + x \cdot 0,0009$	0,0004 ^{b1}	0,396	NS	$y = 0,250 + x \cdot 0,0019$	0,001 ^{b2}	0,190	NS
VFPrM	♀	$y = -2,34 + x \cdot 0,028$	0,012 ^{a1}	0,389	NS	$y = 83,71 - x \cdot 0,490$	0,585 ^{a1}	-0,157	NS
	♂	$y = -7,75 + x \cdot 0,090$	0,040 ^{b1}	0,386	NS	$y = 30,48 + x \cdot 0,210$	0,223 ^{b1}	0,179	NS

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

4.2. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA, TRATADOS CON rhGH (T) Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 Y 20%). (Tablas 9-16, Gráficas 2 y 4).

La EDAD afecta significativamente a todos los parámetros en estudio relacionados con el crecimiento del músculo gastrocnemio, a excepción de la VFPrM según el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 13).

En este estudio se observa una respuesta bifásica temporal en todos los parámetros estudiados de los animales tratados (T). En la primera etapa (25 a 35 días de vida), los valores descienden o se mantienen, mientras que en la segunda etapa (35-50 días), vuelven a incrementarse con tendencia a alcanzar el nivel inicial.

A partir del día 35 de vida, los animales tratados con rhGH experimentan un incremento significativo de los pesos corporal y muscular, alcanzando los mayores porcentajes de aumento los grupos sometidos al 20% de proteína dietaria (Tabla 9, Gráfica 2a), lo que da lugar a una correlación lineal temporal muy significativa (Tabla 14).

Puesto que los aumentos en PM son en general, menores proporcionalmente que los del PCF, el IMS tiende a disminuir a lo largo del período experimental, en especial en los grupos ♂ 12% T y ♀ 20% T (Tabla 9).

Esta evolución temporal del IMS sólo resulta correlativa con la edad en el grupo ♂ 12% T, aunque con un bajo coeficiente de correlación ($r=-0,506$), lo que indica la independencia respecto a la edad de éste parámetro (Tabla 14).

También el IACM experimenta un elevación significativa edad-dependiente, según demuestran las pendientes de la ecuaciones de regresión lineal frente a la edad (Tabla 15), alcanzando los mayores porcentajes de aumento los animales de ambos sexos alimentados con la dieta del 20% de proteína (Tabla 10). Este resultado se acompaña de la estabilización temporal de la VACM y la VFCM.

Por el contrario en los animales T sometidos al 12% de proteína, el menor aumento en IACM se acompaña del descenso prolongado en dichas velocidades, descenso que se inicia a día 30 de vida coincidiendo con la primera etapa de la respuesta bifásica a la hormona (Tabla 10).

Los valores de PrA y PrR descienden entre los 25 y los 50 días de vida en los animales sometidos al 12% de proteína, mientras que en el grupo del 20% se produce un incremento edad-dependiente en ambos parámetros (Tablas 11 y 14).

Esta disminución temporal de los animales del 12% de proteína es consecuencia del profundo descenso con valores negativos del IAPrM y de las velocidades VAPrM y VFPrM. Por el contrario en los animales del 20% T, el IAPrM alcanza un 450% sobre el valor inicial debido a la estabilidad temporal de las VAPrM y la VFPrM (Tabla 12, Gráfica 4 a y b)

La evolución bifásica en las velocidades de crecimiento de la proteína condiciona su carácter edad-independiente, resultando no significativos sus coeficientes de correlación (Tabla 16).

La DIETA modifica significativamente todos los parámetros estudiados de los animales tratados, a excepción del IMS según el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 13).

El mayor nivel proteico dietario induce un incremento de los valores ponderales PCF, PM, IACM, VACM y VFCM a partir del día 40 de vida (Tablas 9 y 10), aunque no aparecen modificaciones en el IMS.

También a partir del día 35 de vida se produce un incremento en la concentración de PrA y PrR muscular de los animales sometidos al 20% de proteína, respecto de los alimentados con el 12%, lo que señala la mayor disponibilidad de sustrato y la facilidad de depósito proteico en los animales mejor alimentados. Del mismo modo, el resto de las variables relacionadas con la proteína, presentan valores superiores en los animales tratados sometidos al 20% respecto a los del 12% (Tabla 11 y 12, Gráficas 4a y b).

El SEXO afecta a todos los parámetros estudiados a excepción de los valores de PCF, PM e IMS (Tabla 13).

El grupo ♀ 12% T presenta mayores valores del IACM, así como de las VACM y VFCM respecto de los animales machos, mientras que no hay modificaciones sexuales en los animales T sometidos al 20% de proteína (Tabla 10).

Por el contrario, los valores de PrA y PrR son superiores en los animales machos T de ambas dietas, aún cuando los parámetros IAPrM y VAPrM y VFPrM son menores que en las hembras, especialmente en el grupo ♂ 12% T (Tablas 11 y 12).

El crecimiento muscular más acentuado se produce en los animales de mayor nivel proteico respecto de los sometidos al 12% de proteína, de acuerdo con el estudio estadístico del valor de las pendientes de sus respectivas rectas de regresión, lo que parece ser consecuencia de la mayor velocidad temporal de PrA y PrR (Tabla 15).

Por el contrario, la caída del depósito proteico de los grupos ♀ y ♂ 12% T se debe a la negatividad de los valores de VAPrM y VFPrM, lo que da lugar a un menor crecimiento muscular (Tabla 12). Este diferente comportamiento indica el efecto de la interacción ExD ($p=0,0001$). Las demás interacciones resultan menos significativas (Tabla 13).

Tabla 17. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre el peso corporal final y peso e índice miosomático del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	PESO CORPORAL FINAL (PCF) (g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	11,1 ± 0,2	12,7 ± 0,4*	11,9 ± 0,4	11,4 ± 0,4*	13,0 ± 0,5*	13,1 ± 0,4	11,3 ± 0,4*	12,1 ± 0,1
Día 30	16,3 ± 0,4*	14,6 ± 0,4*	11,8 ± 0,4*	11,7 ± 0,4*	15,5 ± 0,5*	13,0 ± 0,4	11,2 ± 0,5*	12,0 ± 0,4
Día 35	14,9 ± 0,2	15,6 ± 0,5*	14,1 ± 0,4	13,0 ± 0,4*	15,5 ± 0,3*	15,2 ± 0,6*	12,7 ± 0,5*	13,8 ± 0,3*
Día 40	16,2 ± 0,4*	15,9 ± 0,4	13,3 ± 0,4*	14,6 ± 0,5	17,9 ± 0,6*	16,4 ± 0,6	15,3 ± 0,5*	15,8 ± 0,5
Día 45	16,9 ± 0,7*	16,0 ± 0,5	14,0 ± 0,5*	15,2 ± 0,3	18,4 ± 0,5	18,3 ± 0,7	16,7 ± 0,9	18,3 ± 0,7
Día 50	17,1 ± 0,5	18,6 ± 0,7*	17,0 ± 0,6	15,6 ± 0,5*	20,5 ± 0,5	18,8 ± 1,9	20,1 ± 0,6	20,4 ± 1,0

Edad	PESO MUSCULAR (PM) (g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,045 ± 0,001*	0,065 ± 0,002	0,063 ± 0,004*	0,067 ± 0,003	0,058 ± 0,002	0,057 ± 0,002	0,064 ± 0,004	0,061 ± 0,002
Día 30	0,087 ± 0,002*	0,075 ± 0,002*	0,057 ± 0,003*	0,059 ± 0,002*	0,083 ± 0,003*	0,071 ± 0,002*	0,050 ± 0,002*	0,064 ± 0,002*
Día 35	0,074 ± 0,003	0,081 ± 0,003*	0,067 ± 0,002	0,065 ± 0,003*	0,077 ± 0,002*	0,077 ± 0,003	0,058 ± 0,003*	0,071 ± 0,003
Día 40	0,080 ± 0,003*	0,078 ± 0,003*	0,065 ± 0,003*	0,067 ± 0,002*	0,087 ± 0,004	0,084 ± 0,004	0,079 ± 0,004	0,080 ± 0,002
Día 45	0,075 ± 0,002	0,080 ± 0,003	0,071 ± 0,002	0,075 ± 0,002	0,093 ± 0,003*	0,101 ± 0,004*	0,080 ± 0,003*	0,090 ± 0,004*
Día 50	0,089 ± 0,003	0,099 ± 0,003*	0,085 ± 0,003	0,078 ± 0,002*	0,096 ± 0,003	0,093 ± 0,004	0,096 ± 0,003	0,098 ± 0,005

Edad	ÍNDICE MIO-SOMÁTICO (IMS) (mg/g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	4,0 ± 0,11*	5,1 ± 0,03*	5,2 ± 0,41*	5,8 ± 0,10*	4,4 ± 0,19*	4,3 ± 0,13*	5,7 ± 0,44*	5,0 ± 0,23*
Día 30	5,3 ± 0,09*	5,1 ± 0,09	4,8 ± 0,16*	5,0 ± 0,21	5,3 ± 0,13*	5,4 ± 0,15	4,4 ± 0,13*	5,3 ± 0,16
Día 35	4,9 ± 0,15	5,1 ± 0,11	4,7 ± 0,09	4,9 ± 0,19	4,9 ± 0,15	5,0 ± 0,03	4,6 ± 0,02	5,1 ± 0,08
Día 40	4,9 ± 0,15	4,9 ± 0,05	4,8 ± 0,10	4,5 ± 0,15	4,8 ± 0,23	5,1 ± 0,08	5,1 ± 0,09	5,0 ± 0,13
Día 45	4,4 ± 0,09*	5,0 ± 0,07	5,0 ± 0,10*	4,9 ± 0,14	5,0 ± 0,06	5,5 ± 0,08*	4,8 ± 0,26	4,8 ± 0,03*
Día 50	5,1 ± 0,08	5,3 ± 0,08	5,0 ± 0,14	4,9 ± 0,11	4,6 ± 0,06	5,1 ± 0,49	4,7 ± 0,15	4,7 ± 0,01

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0.05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 18. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre el Incremento acumulado de peso y sobre las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento ponderal del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	INCREMENTO ACUMULADO DE PESO MUSCULAR (IACM)(g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Edad								
Día 25	0,012 ± 0,001*	0,016 ± 0,001*	0,008 ± 0,001*	0,005 ± 0,001*	0,008 ± 0,002	0,013 ± 0,001*	0,008 ± 0,001	0,008 ± 0,001*
Día 30	0,023 ± 0,002*	0,012 ± 0,002*	0,008 ± 0,001*	0,007 ± 0,001*	0,019 ± 0,001*	0,015 ± 0,001*	0,010 ± 0,002*	0,009 ± 0,002*
Día 35	0,018 ± 0,001	0,018 ± 0,002*	0,017 ± 0,002	0,010 ± 0,001*	0,024 ± 0,002*	0,020 ± 0,001*	0,015 ± 0,001*	0,015 ± 0,001*
Día 40	0,028 ± 0,002*	0,024 ± 0,003*	0,019 ± 0,002*	0,013 ± 0,002*	0,035 ± 0,004*	0,029 ± 0,002	0,024 ± 0,003*	0,024 ± 0,002
Día 45	0,035 ± 0,002*	0,024 ± 0,004*	0,023 ± 0,002*	0,016 ± 0,001*	0,036 ± 0,001	0,035 ± 0,003	0,032 ± 0,004	0,035 ± 0,003
Día 50	0,038 ± 0,003	0,034 ± 0,004*	0,032 ± 0,002	0,017 ± 0,002*	0,039 ± 0,003	0,037 ± 0,005	0,045 ± 0,003	0,043 ± 0,004

	VELOCIDAD ABSOLUTA DE CRECIMIENTO MUSCULAR (VACM)(mg/día)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Edad								
Día 25	2,45 ± 0,19*	3,19 ± 0,16*	1,67 ± 0,21*	1,01 ± 0,16*	1,68 ± 0,40	2,59 ± 0,07*	1,64 ± 0,18	1,67 ± 0,14*
Día 30	2,25 ± 0,21*	1,23 ± 0,19*	0,84 ± 0,09*	0,70 ± 0,10*	1,88 ± 0,07*	1,51 ± 0,13*	1,04 ± 0,15*	0,85 ± 0,19*
Día 35	1,23 ± 0,07	1,21 ± 0,11*	1,12 ± 0,10	0,68 ± 0,07*	1,59 ± 0,14*	1,36 ± 0,05*	1,02 ± 0,09*	1,00 ± 0,06*
Día 40	1,39 ± 0,11*	1,19 ± 0,13*	0,94 ± 0,08*	0,67 ± 0,07*	1,72 ± 0,20*	1,46 ± 0,10	1,21 ± 0,13*	1,19 ± 0,11
Día 45	1,40 ± 0,09*	0,96 ± 0,15*	0,92 ± 0,07*	0,65 ± 0,03*	1,45 ± 0,03	1,41 ± 0,10	1,27 ± 0,14	1,39 ± 0,10
Día 50	1,26 ± 0,09*	1,13 ± 0,11*	1,07 ± 0,08*	0,58 ± 0,05*	1,28 ± 0,09*	1,24 ± 0,17	1,49 ± 0,10*	1,44 ± 0,12

	VELOCIDAD FRACCIONAL DE CRECIMIENTO MUSCULAR (VFCM) (%/día)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Edad								
Día 25	7,61 ± 0,58*	6,67 ± 0,28*	3,30 ± 0,40*	1,79 ± 0,29*	3,16 ± 0,74	4,83 ± 0,28*	3,51 ± 0,40	2,95 ± 0,28*
Día 30	4,21 ± 0,41*	2,09 ± 0,42*	1,68 ± 0,18*	1,27 ± 0,19*	3,39 ± 0,28*	2,93 ± 0,24*	2,38 ± 0,39*	1,59 ± 0,35*
Día 35	2,53 ± 0,21	2,06 ± 0,30*	2,19 ± 0,23	1,22 ± 0,14*	3,15 ± 0,34	2,48 ± 0,26*	2,35 ± 0,39	1,84 ± 0,17*
Día 40	2,93 ± 0,27*	2,14 ± 0,25*	2,02 ± 0,16*	1,16 ± 0,13*	3,42 ± 0,52*	2,82 ± 0,27*	2,49 ± 0,28*	2,19 ± 0,21*
Día 45	3,14 ± 0,29*	1,79 ± 0,40*	2,02 ± 0,13*	1,16 ± 0,05*	2,80 ± 0,19	2,58 ± 0,23	2,70 ± 0,29	2,56 ± 0,15
Día 50	2,87 ± 0,28*	1,89 ± 0,18*	2,17 ± 0,16*	1,02 ± 0,10*	2,24 ± 0,37*	2,24 ± 0,32	3,07 ± 0,28*	2,65 ± 0,21

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. p < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 19. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre la proteína absoluta y relativa del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	PROTEÍNA ABSOLUTA (PrA) (mg/órgano)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	6,0 ± 0,2*	8,9 ± 0,3*	9,4 ± 0,3*	11,1 ± 0,2*	9,2 ± 0,3*	9,3 ± 0,3*	7,7 ± 0,2*	8,0 ± 0,2*
Día 30	10,2 ± 0,3*	9,5 ± 0,2*	7,8 ± 0,2*	10,5 ± 0,2*	8,9 ± 0,3*	8,2 ± 0,2*	6,2 ± 0,2*	12,5 ± 0,2*
Día 35	9,9 ± 0,2*	10,4 ± 0,4*	8,6 ± 0,1*	8,1 ± 0,1*	8,7 ± 0,1*	9,7 ± 0,2	7,9 ± 0,2*	9,5 ± 0,1
Día 40	10,7 ± 0,3*	12,2 ± 0,3*	8,6 ± 0,1*	9,3 ± 0,3*	11,8 ± 0,2	11,1 ± 0,3*	11,5 ± 0,2	16,3 ± 0,3*
Día 45	11,8 ± 0,3*	12,2 ± 0,3*	8,1 ± 0,1*	8,5 ± 0,1*	11,9 ± 0,2	13,0 ± 0,2*	12,2 ± 0,1	14,1 ± 0,1*
Día 50	14,9 ± 0,4*	17,1 ± 0,3*	8,0 ± 0,3*	9,5 ± 0,2*	13,0 ± 0,2*	13,3 ± 0,2*	19,6 ± 0,6*	20,2 ± 1,1*

Edad	PROTEÍNA RELATIVA (PrR) (mg/g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	135,3 ± 2,7*	138,1 ± 1,5*	150,2 ± 3,1*	158,8 ± 1,1*	159,4 ± 0,8*	135,8 ± 2,0*	125,5 ± 2,7*	129,8 ± 0,5*
Día 30	117,5 ± 1,7*	126,5 ± 2,1*	133,6 ± 0,4*	180,1 ± 2,1*	106,2 ± 0,5*	114,8 ± 1,9*	125,5 ± 1,8*	198,6 ± 1,4*
Día 35	134,5 ± 2,5*	129,4 ± 2,7	125,2 ± 2,4*	125,6 ± 2,6	112,2 ± 1,8*	117,0 ± 1,0*	132,8 ± 1,4*	137,3 ± 2,0*
Día 40	134,1 ± 1,8*	156,3 ± 1,9*	129,2 ± 2,2*	138,0 ± 2,3*	135,3 ± 0,6*	132,8 ± 2,5*	153,5 ± 1,0*	200,3 ± 2,9*
Día 45	157,3 ± 2,9*	152,6 ± 2,4*	113,7 ± 0,8*	113,6 ± 1,1*	128,4 ± 2,3*	128,7 ± 2,3*	153,8 ± 2,1*	155,7 ± 0,8*
Día 50	167,4 ± 1,3*	172,5 ± 1,3*	93,7 ± 2,0*	123,2 ± 4,4*	128,9 ± 1,7*	142,9 ± 2,6*	204,5 ± 3,4*	206,6 ± 0,9*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. P<0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 20. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre el Incremento acumulado de proteína y sobre las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento de la proteína del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	INCREMENTO ACUMULADO DE PROTEÍNA (IAPrM)(mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	2,37 ± 0,17*	3,68 ± 0,18*	-0,12 ± 0,01*	-0,44 ± 0,07*	0,96 ± 0,23*	1,33 ± 0,03*	2,15 ± 0,23*	1,78 ± 0,16*
Día 30	3,74 ± 0,34*	2,84 ± 0,45*	-0,12 ± 0,01*	-0,61 ± 0,09*	2,15 ± 0,08	1,56 ± 0,14	2,71 ± 0,44	1,90 ± 0,43
Día 35	3,16 ± 0,19*	4,20 ± 0,39*	-0,24 ± 0,02*	-0,92 ± 0,10*	2,75 ± 0,24*	2,12 ± 0,08*	4,03 ± 0,36*	3,38 ± 0,20*
Día 40	4,70 ± 0,37*	5,51 ± 0,61*	-0,27 ± 0,02*	-1,25 ± 0,15*	3,96 ± 0,46*	3,05 ± 0,21*	6,49 ± 0,71*	5,44 ± 0,54*
Día 45	5,88 ± 0,35*	5,56 ± 0,90*	-0,33 ± 0,02*	-1,53 ± 0,08*	4,16 ± 0,10*	3,71 ± 0,27*	8,54 ± 1,00*	8,05 ± 0,61*
Día 50	6,34 ± 0,46*	7,81 ± 0,80*	-0,47 ± 0,03*	-1,63 ± 0,17*	4,43 ± 0,31*	3,94 ± 0,56*	12,12 ± 0,88*	10,09 ± 0,94*

Edad	VELOCIDAD ABSOLUTA DE CRECIMIENTO DE LA PROTEÍNA (VAPrM)(mg/día)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,474 ± 0,034*	0,737 ± 0,038*	-0,024 ± 0,003*	-0,088 ± 0,015*	0,194 ± 0,047*	0,267 ± 0,007*	0,431 ± 0,048*	0,358 ± 0,033*
Día 30	0,374 ± 0,034*	0,284 ± 0,046*	-0,012 ± 0,001*	-0,062 ± 0,010*	0,216 ± 0,009	0,156 ± 0,014	0,271 ± 0,041	0,190 ± 0,044
Día 35	0,211 ± 0,013*	0,280 ± 0,026*	-0,017 ± 0,002*	-0,061 ± 0,007*	0,183 ± 0,017*	0,142 ± 0,006*	0,269 ± 0,024*	0,225 ± 0,014*
Día 40	0,235 ± 0,019*	0,276 ± 0,031*	-0,014 ± 0,001*	-0,063 ± 0,008*	0,198 ± 0,023*	0,153 ± 0,011*	0,325 ± 0,036*	0,272 ± 0,027*
Día 45	0,235 ± 0,014*	0,223 ± 0,036*	-0,013 ± 0,001*	-0,061 ± 0,003*	0,167 ± 0,004*	0,149 ± 0,011*	0,342 ± 0,040*	0,322 ± 0,025*
Día 50	0,211 ± 0,016*	0,261 ± 0,027*	-0,016 ± 0,001*	-0,054 ± 0,006*	0,148 ± 0,010*	0,131 ± 0,019*	0,404 ± 0,030*	0,336 ± 0,032*

Edad	VELOCIDAD FRACCIONAL DE CRECIMIENTO DE LA PROTEÍNA (VFPrM) (%/día)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	12,75 ± 1,08*	15,91 ± 1,10*	-0,28 ± 0,03*	-0,84 ± 0,14*	2,62 ± 0,62*	3,30 ± 0,14*	9,25 ± 1,30*	4,30 ± 0,41*
Día 30	4,85 ± 0,49*	4,00 ± 1,01*	-0,14 ± 0,01*	-0,58 ± 0,09*	2,82 ± 0,20*	1,98 ± 0,16*	7,11 ± 1,36*	2,34 ± 0,52*
Día 35	3,09 ± 0,30*	4,00 ± 0,89*	-0,19 ± 0,01*	-0,58 ± 0,06*	2,59 ± 0,27*	1,71 ± 0,13*	7,56 ± 1,90*	2,71 ± 0,30*
Día 40	3,54 ± 0,33*	4,19 ± 0,51*	-0,15 ± 0,01*	-0,60 ± 0,07*	2,81 ± 0,41*	1,92 ± 0,16*	6,22 ± 0,81*	3,26 ± 0,33*
Día 45	3,93 ± 0,48*	3,76 ± 1,11*	-0,15 ± 0,01*	-0,58 ± 0,03*	2,31 ± 0,13*	1,80 ± 0,15*	7,06 ± 0,73*	3,87 ± 0,23*
Día 50	3,56 ± 0,39*	3,48 ± 0,32*	-0,18 ± 0,01*	-0,51 ± 0,05*	1,88 ± 0,28*	1,57 ± 0,22*	7,82 ± 1,03*	4,04 ± 0,33*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. p < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 21. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), el Tratamiento (T) y la Dieta (D) sobre el estudio del crecimiento² del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y Tratados con rhGH (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	PCF	PM	IMS	IACM	VACM	VFCM	PtA	PtR	IAPtM	VAPtM	VFPtM
EDAD	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
rhGH	0,0060	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0350	NS	NS	0,0001	0,0001	0,0001
EXT	0,0010	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0010	0,0001	0,0020	0,0001	0,0001	0,0001
EXD	NS	0,0001	0,0420	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0090	0,0001
TxD	NS	NS	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
EXTxD	0,0100	0,008	NS	0,0030	0,016	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad (p < 0,05). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: Peso corporal final (PCF), peso muscular (PM), índice miosomático (IMS), incremento acumulado de peso muscular (IACM), velocidad absoluta (VACM) y fraccional (VFCM) de crecimiento de peso muscular, proteína muscular absoluta (PtA) y relativa (PtR), incremento acumulado de proteína muscular (IAPtM), velocidad absoluta (VAPtM) y fraccional (VFPtM) de crecimiento de proteína muscular.

Tabla 22. Valor de las pendientes de las rectas de regresión frente a la Edad y su error de las variables: peso corporal final, peso muscular, índice miosomático y proteína absoluta y relativa del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados y Tratados con rhGH y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12% y 20%).

variables	sexo	12% PROTEINA				20% PROTEINA			
		NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
		pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error
Peso corporal	♀	0,190	0,034	0,176	0,027	0,278	0,026*	0,363	0,031*
	♂	0,193	0,027	0,189	0,021	0,260	0,043*	0,357	0,031*
Peso muscular	♀	0,0011	0,0002	0,0008	0,0001	0,0013	0,0001	0,0015	0,0002
	♂	0,0010	0,0001*	0,0005	0,0001*	0,0015	0,0001	0,0015	0,0001
Índice miosomático	♀	0,0183	0,0107*	-0,0019	0,0097*	0,0029	0,0044*	-0,0179	0,0130*
	♂	-0,0001	0,0091*	-0,0298	0,0096*	0,0223	0,0120*	-0,0148	0,0062*
Proteína/ órgano	♀	0,285	0,028*	-0,035	0,013*	0,179	0,019*	0,463	0,046*
	♂	0,288	0,029*	-0,070	0,020*	0,205	0,018*	0,414	0,049*
Proteína/g	♀	1,594	0,248*	-1,932	0,155*	-0,359	0,379*	2,862	0,289*
	♂	1,580	0,233*	-1,941	0,339*	0,531	0,218*	1,819	0,610*

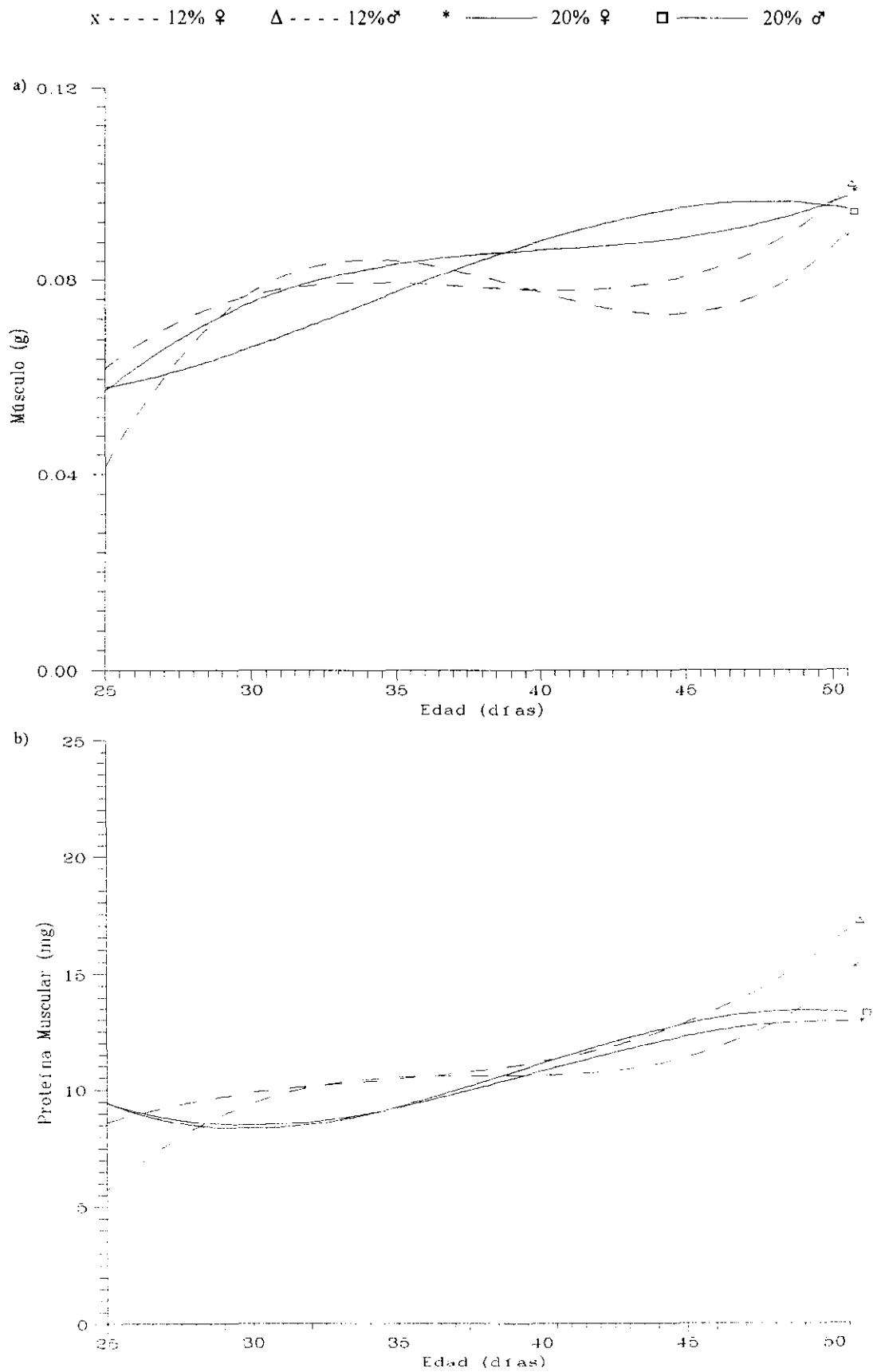
El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $P < 0,01$ según el análisis de *Dummy variables*.

Tabla 23. Valor de las pendientes de las rectas de regresión frente a la Edad y su error de las variables: Incremento acumulado de peso muscular (IACM), Velocidades absoluta (VACM) y fraccional (VFCM) de crecimiento ponderal, Incremento acumulado de Proteína (IAPrM) y Velocidades absoluta (VAPrM) y fraccional (VFPrM) de proteína del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados y Tratados con rhGH y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12% y 20%).

variables	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
		pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error
IACM	♀	0,0010	0,0001	0,0009	0,00009	0,0012	0,0001	0,0014	0,0001
	♂	0,0007	0,0001*	0,0005	0,00006*	0,0011	0,0001*	0,0015	0,0001*
VACM	♀	-0,048	0,008*	-0,017	0,007*	-0,018	0,009*	0,0007	0,007*
	♂	-0,063	0,013*	-0,013	0,004*	-0,039	0,008*	0,0058	0,008*
VFCM	♀	-1,513	0,306*	-0,273	0,144*	-0,347	0,208	-0,063	0,178
	♂	-1,413	0,313*	-0,240	0,081*	0,780	0,170*	0,100	0,149*
IAPrM	♀	0,159	0,017*	-0,013	0,001*	0,140	0,013*	0,390	0,030*
	♂	0,172	0,030*	-0,051	0,005*	0,110	0,013*	0,350	0,020*
VAPrM	♀	-0,009	0,001*	0,0002	0,0001*	-0,002	0,0010*	0,0007	0,002*
	♂	-0,014	0,003*	0,0009	0,0004*	-0,009	0,0008*	0,0019	0,001*
VFPrM	♀	-2,750	0,590*	0,028	0,012*	-0,280	0,165	-0,490	0,580
	♂	-3,020	0,770*	0,090	0,040*	-0,510	0,111*	0,210	0,223*

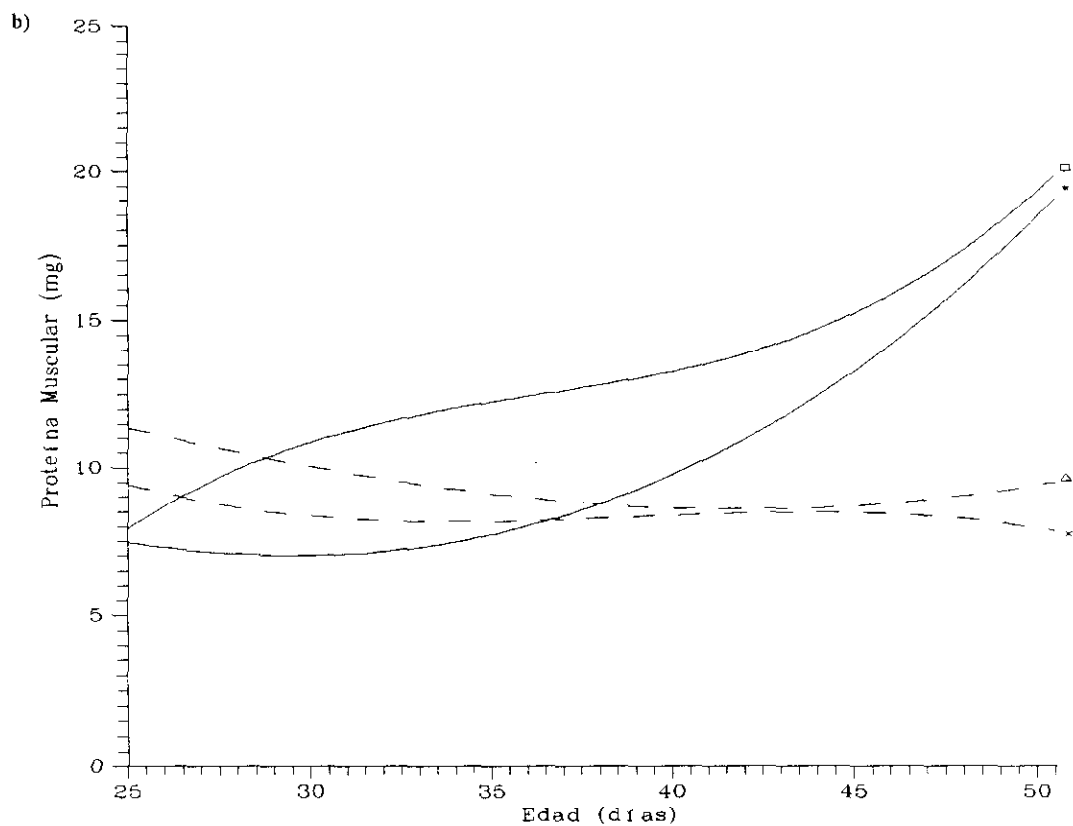
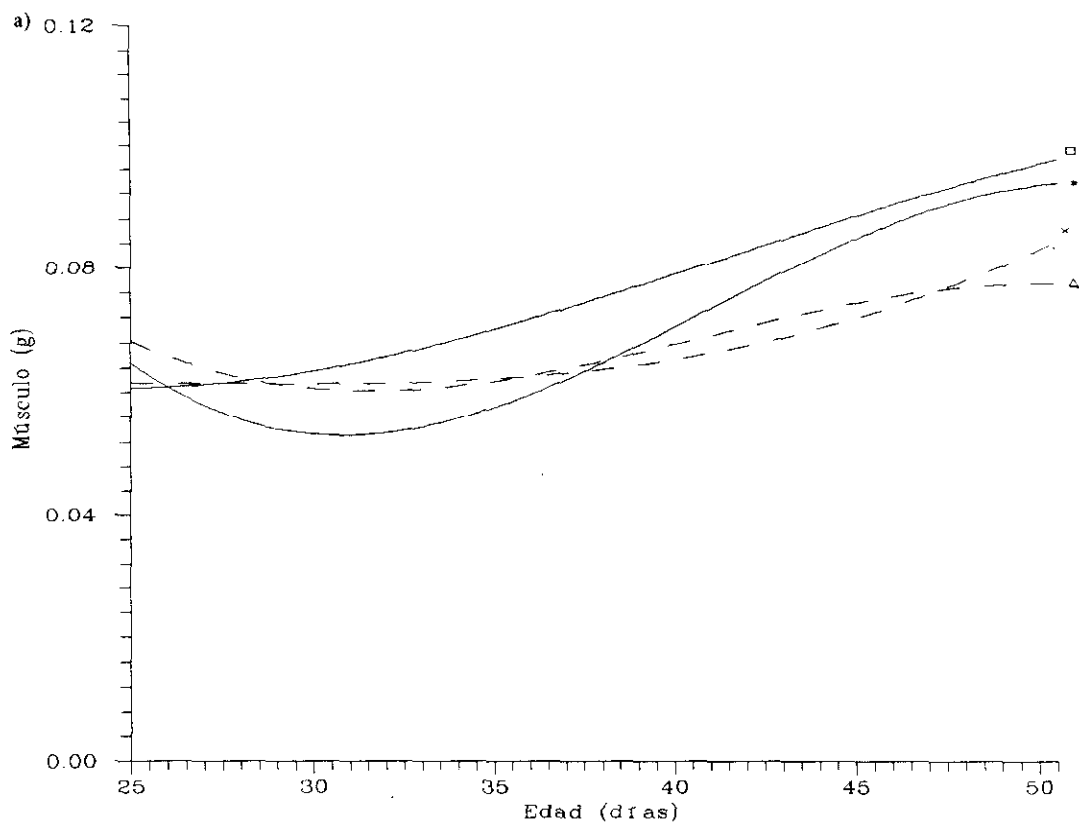
El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario.
 $P < 0,01$ según el análisis de *Dummy variables*.

Gráfica 1. Evolución temporal del **Peso muscular** (a) y de la **Proteína muscular absoluta** (b) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

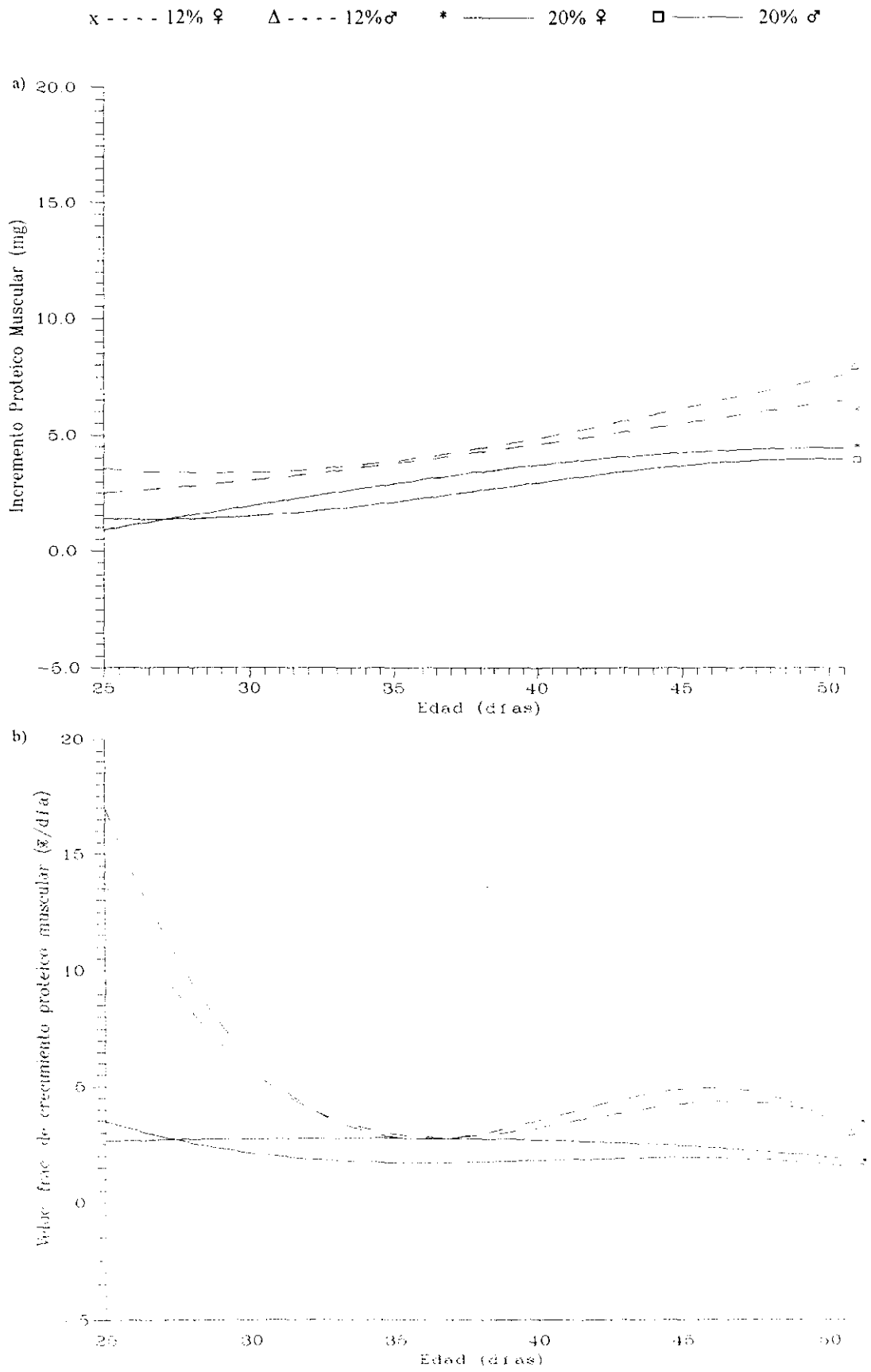


Gráfica 2. Evolución temporal del **Peso muscular** (a) y de la **Proteína muscular absoluta** (b) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH* (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

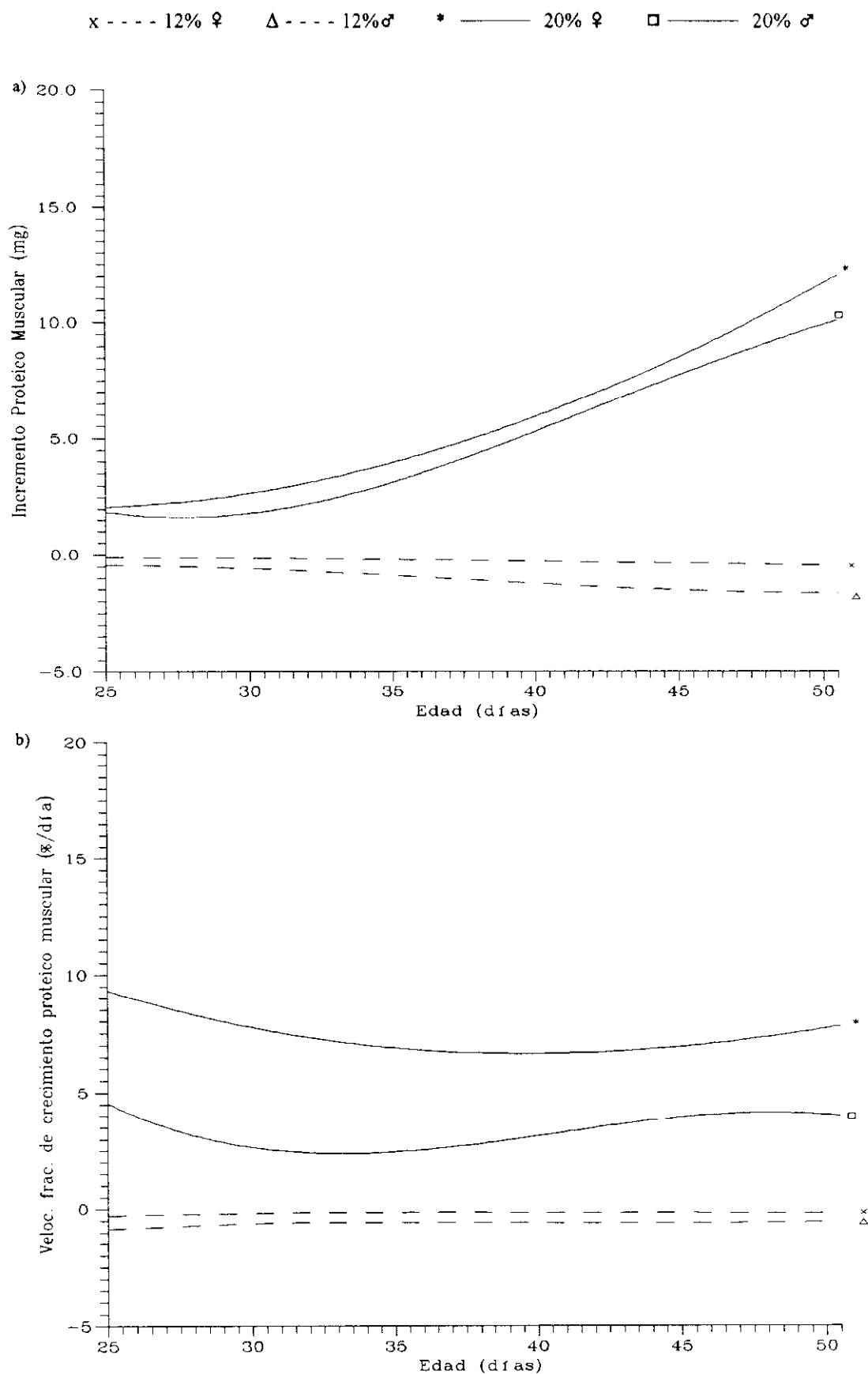
x - - - - 12% ♀ Δ - - - - 12% ♂ * ——— 20% ♀ □ ——— 20% ♂



Gráfica 3. Evolución temporal del **Incremento proteico muscular** (a) y de la **Velocidad Fraccional de crecimiento de la Proteína muscular** (b) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).



Gráfica 4. Evolución temporal del **Incremento proteico muscular** (a) y de la **Velocidad Fraccional de crecimiento de la Proteína muscular** (b) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida *Tratados* (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).



4.3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE LA HORMONA SOMATOTROPA (rhGH) SOBRE EL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS, ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 Y 20%) (Tablas 17-23, Gráficas 1-4).

La EDAD, el TRATAMIENTO y la DIETA influyen muy significativamente sobre todos los parámetros estudiados, a excepción del IMS según el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 21).

El efecto bifásico de la hormona es evidente sobre el crecimiento corporal y muscular en todos los animales T respecto a los NT de acuerdo con el test LSD, ya que durante la primera etapa del tratamiento (25-35 días) disminuyen tanto los valores de peso (PCF, PM) (Tabla 17, compárese gráficas 1a y 2a) como las variables IACM y VACM y VFCM (Tabla 18).

Sin embargo en la segunda etapa (35-50 días), los valores de peso se incrementan hasta alcanzar el valor de los animales NT, a excepción de los correspondientes al grupo ♂ 12% T, que no se recuperan (Tabla 17).

Los valores de IACM y las VACM y VFCM sólo aumentan en los grupos de animales sometidos al 20% de proteína, permaneciendo inferiores a los controles en los grupos de menor nivel proteico (12%) (Tabla 18).

Este comportamiento depende fundamentalmente de la influencia de las interacciones ExT, TxD y ExTxD (Tabla 21), que también se manifiestan sobre los parámetros relacionados con la proteína muscular.

Así, sólo los animales ♀ y ♂ 20% T aumentan los valores de PrA y PrR en relación a los animales NT respectivos a pesar de un ligero descenso a los 25 días de vida (Tabla 19). Ello es consecuencia de la elevación del IAPrM, así como de las velocidades VAPrM y VFPrM en relación a los animales control a lo largo del estudio, aunque no presentan diferencias a día 30 de vida (Tabla 20, Gráficas 3a y 4a, 3b y 4b).

Por el contrario, todos los parámetros antedichos resultan menores en los animales 12% T respecto a los del 12% NT, ya que la negatividad de los valores de IAPrM, VAPrM y VFPrM impiden el crecimiento de la proteína muscular (Tablas 19 y 20, Gráficas 3a y 4a, 3b y 4b).

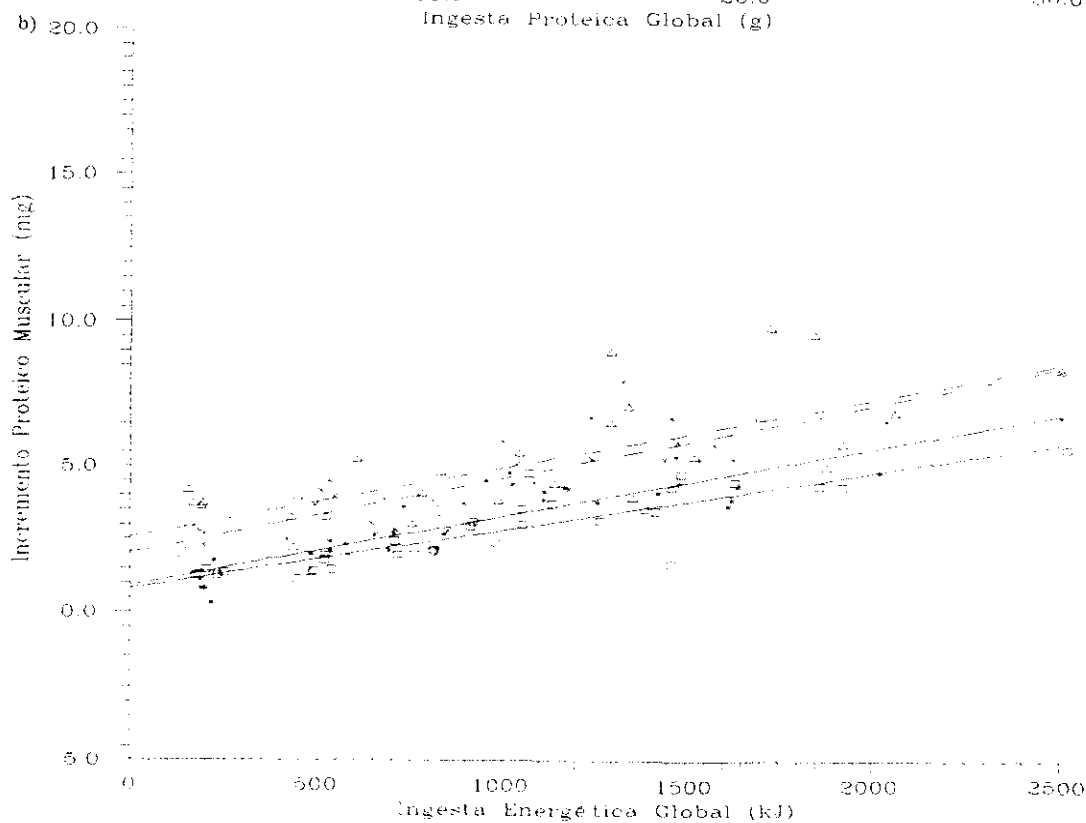
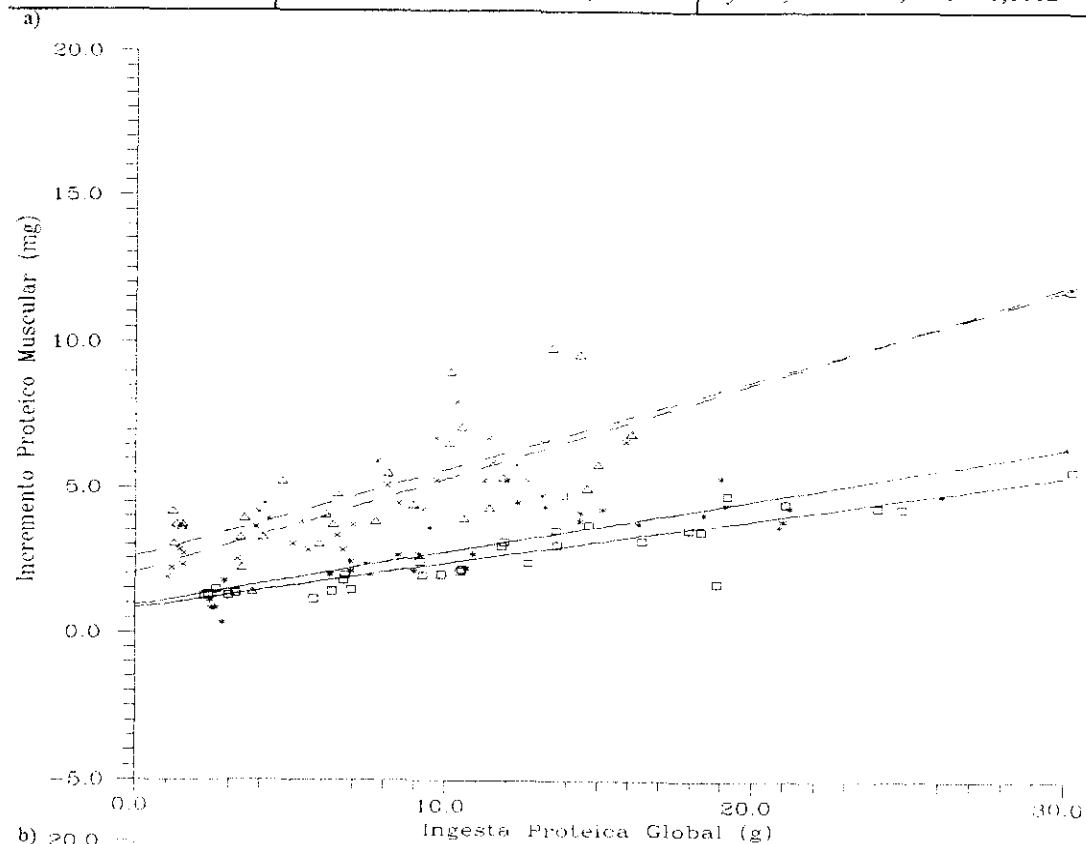
El estudio estadístico de las pendientes de las rectas de regresión (Tablas 22 y 23) indica que los animales T del 12% de proteína tienen un crecimiento más lento del PM y del IACM en relación a los animales NT, aunque las VACM y VFCM tienen menor rapidez de decrecimiento.

La disminución de los valores de la proteína muscular y del IAPrM respecto a los animales NT (Tablas 19 y 20) se acompaña, no obstante, de menores pérdidas temporales de las velocidades de crecimiento en relación a las obtenidas por los animales 12% NT (Tablas 22 y 23).

También los animales T sometidos al 20% de proteína presentan una mayor o idéntica aceleración en el crecimiento del PCF y del PM, respectivamente, que los animales 20% NT, junto con una mayor rapidez en el desarrollo de las variables IACM, VACM y VFCM. Los valores relacionados con la proteína tienen un crecimiento más acelerado en los animales 20% T respecto de los controles 20% NT.

Gráfica 5. Relación entre el **Incremento proteico muscular (Y)** y las **Ingestas Proteica (X) (a)** y **Energética (X) (b)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

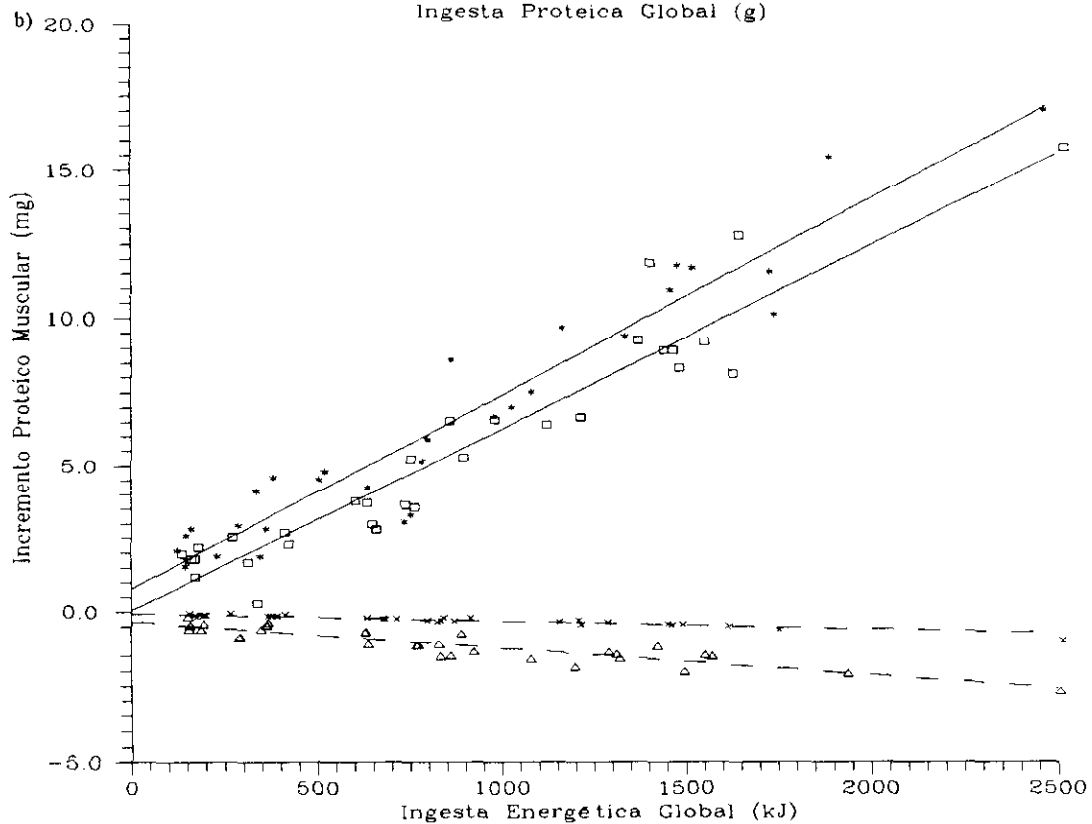
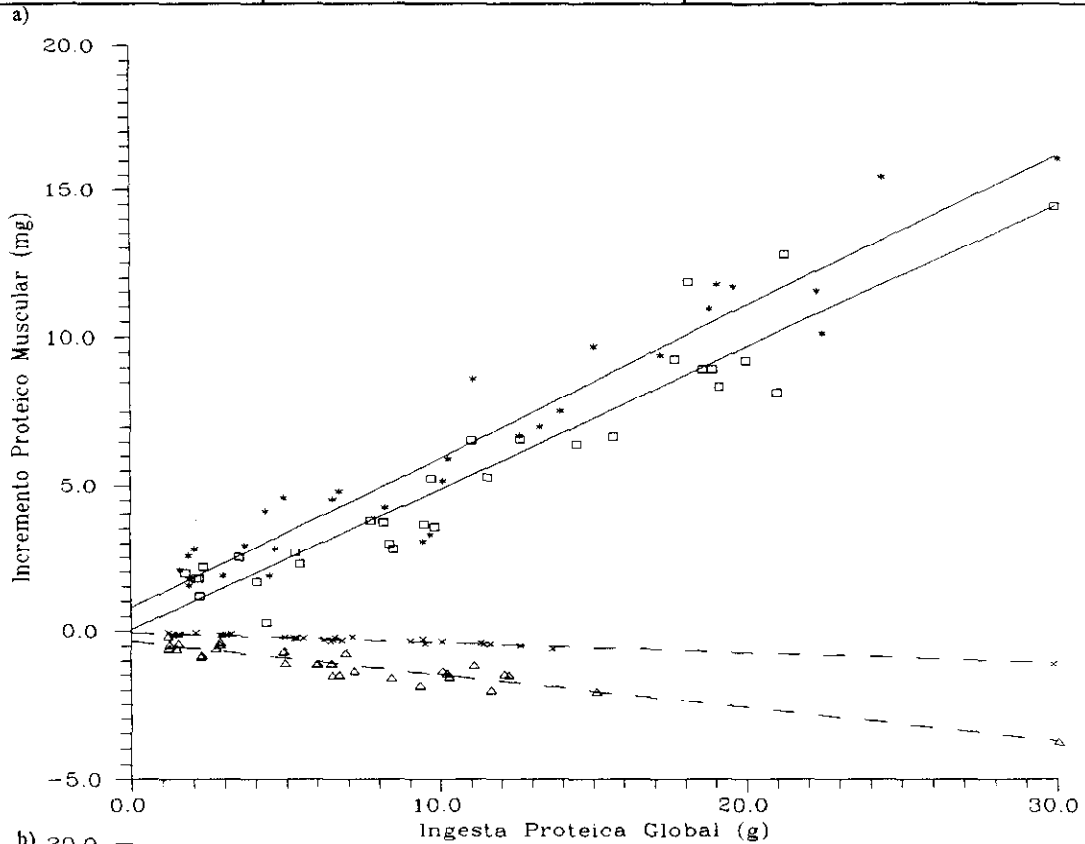
	a	b
x ---- 12% ♀	$y = 2,027 + x \cdot 0,330 \pm 0,04^{a1*}$	$y = 2,027 + x \cdot 0,0025 \pm 0,0003^{a1*}$
Δ ---- 12% ♂	$y = 2,565 + x \cdot 0,308 \pm 0,05^{a1*}$	$y = 2,565 + x \cdot 0,0024 \pm 0,0004^{a1*}$
* ---- 20% ♀	$y = 0,931 + x \cdot 0,183 \pm 0,01^{a2*}$	$y = 0,931 + x \cdot 0,0023 \pm 0,0002^{a1*}$
□ ---- 20% ♂	$y = 0,831 + x \cdot 0,154 \pm 0,01^{a2*}$	$y = 0,831 + x \cdot 0,0020 \pm 0,0002^{a1*}$



superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo y un mismo tratamiento. El asterisco marca las diferencias entre NT y T.

Gráfica 6. Relación entre el **Incremento proteico muscular (Y)** y las **Ingestas Proteica (X) (a)** y **Energética (X) (b)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH* (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

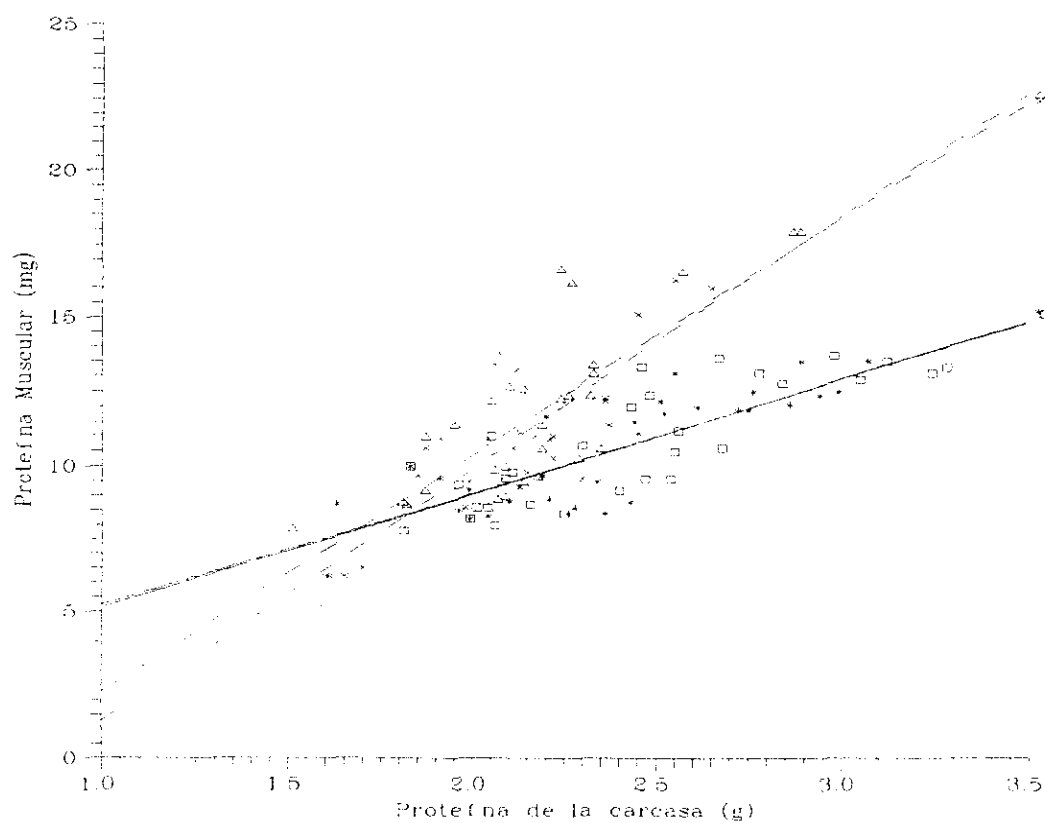
	a	b
x - - - - 12% ♀	$y = -0,052 - x \cdot 0,033 \pm 0,002^{a1*}$	$y = -0,052 - x \cdot 0,0002 \pm 0,00002^{a1*}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = -0,034 - x \cdot 0,113 \pm 0,011^{b1*}$	$y = -0,034 - x \cdot 0,0008 \pm 0,00009^{b1*}$
* ——— 20% ♀	$y = 0,960 + x \cdot 0,488 \pm 0,032^{a2*}$	$y = 0,960 + x \cdot 0,0063 \pm 0,00042^{a2*}$
□ ——— 20% ♂	$y = 0,050 + x \cdot 0,481 \pm 0,032^{a2*}$	$y = 0,050 + x \cdot 0,0062 \pm 0,00042^{a2*}$



superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo y un mismo tratamiento. El asterisco marca las diferencias entre NT y T.

Gráfica 7. Relación entre la **Proteína muscular absoluta (Y)** y la **Proteína de la carcasa (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

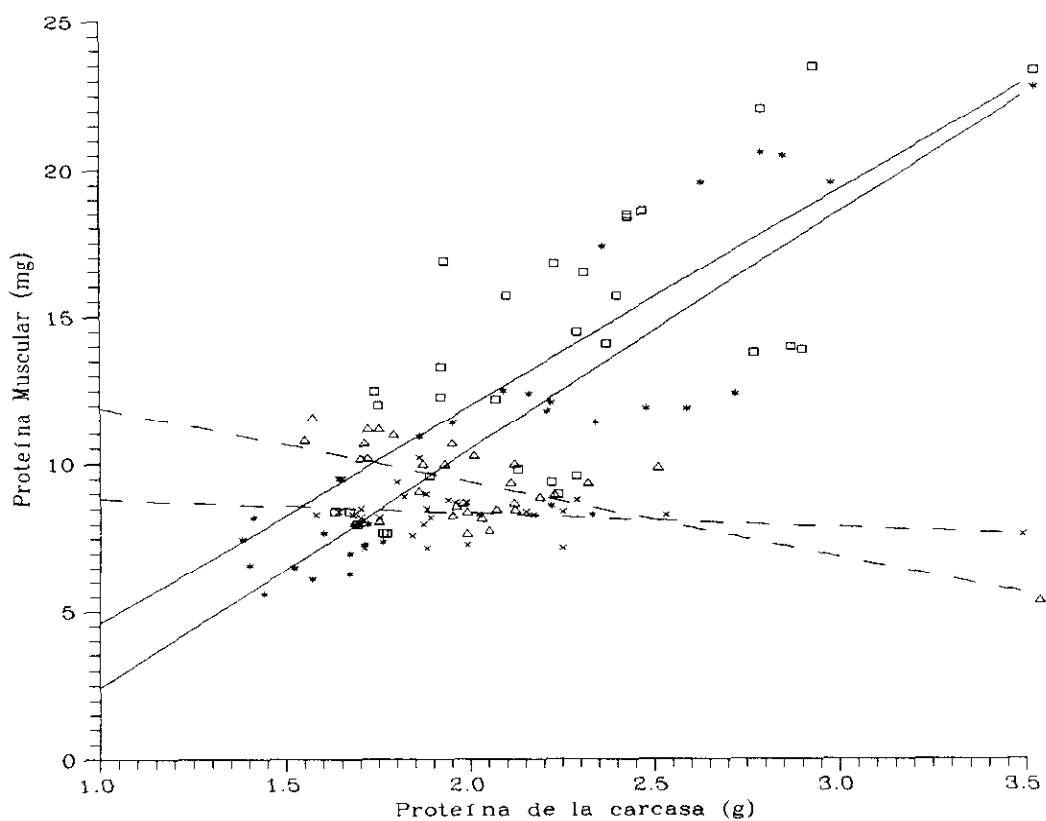
x - - - - 12% ♀	$y = 2,278 + x \cdot 8,607 \pm 0,85^{a1*}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 2,398 + x \cdot 8,076 \pm 0,74^{a1*}$
* - - - - 20% ♀	$y = 4,681 + x \cdot 3,901 \pm 0,52^{a2*}$
□ - - - - 20% ♂	$y = 5,773 + x \cdot 3,850 \pm 0,43^{a2*}$



superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo y un mismo tratamiento. El asterisco marca las diferencias entre NT y T.

Gráfica 8. Relación entre la **Proteína muscular absoluta (Y)** y la **Proteína de la carcasa (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos, entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

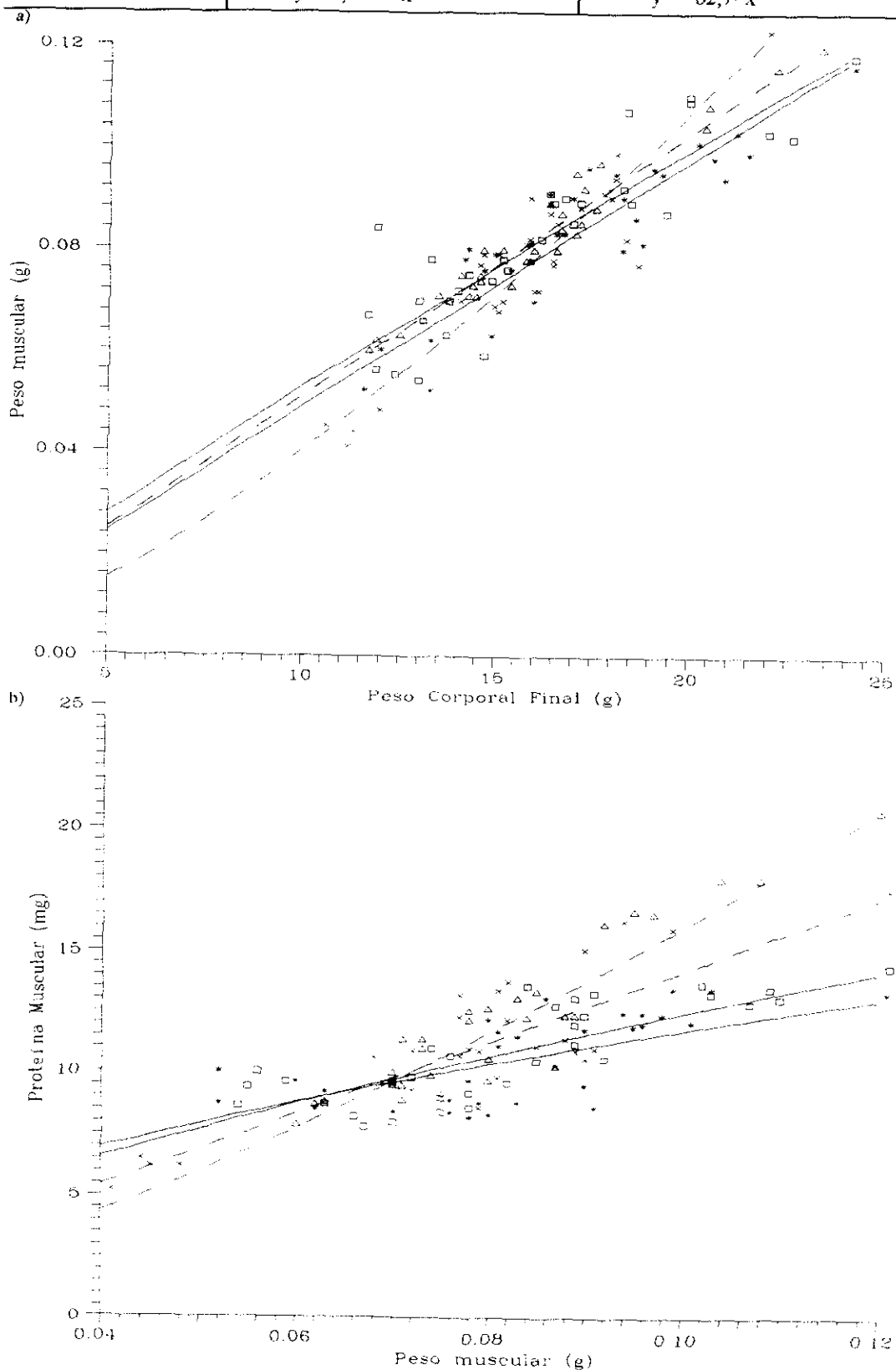
x - - - - 12% ♀	$y = 9,278 - x \cdot 0,457 \pm 0,45^{a1*}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 14,398 - x \cdot 2,505 \pm 0,59^{a1*}$
* ——— 20% ♀	$y = 4,681 + x \cdot 8,089 \pm 1,38^{a2*}$
\square ——— 20% ♂	$y = 2,773 + x \cdot 7,375 \pm 1,77^{a2*}$



superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo y un mismo tratamiento. El asterisco marca las diferencias entre NT y T.

Gráfica 9. a). Relación entre el **Peso Muscular (Y)** y el **Peso Corporal Final (X)**. b) Relación entre la **Proteína Muscular Absoluta (Y)** y el **Peso Muscular (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

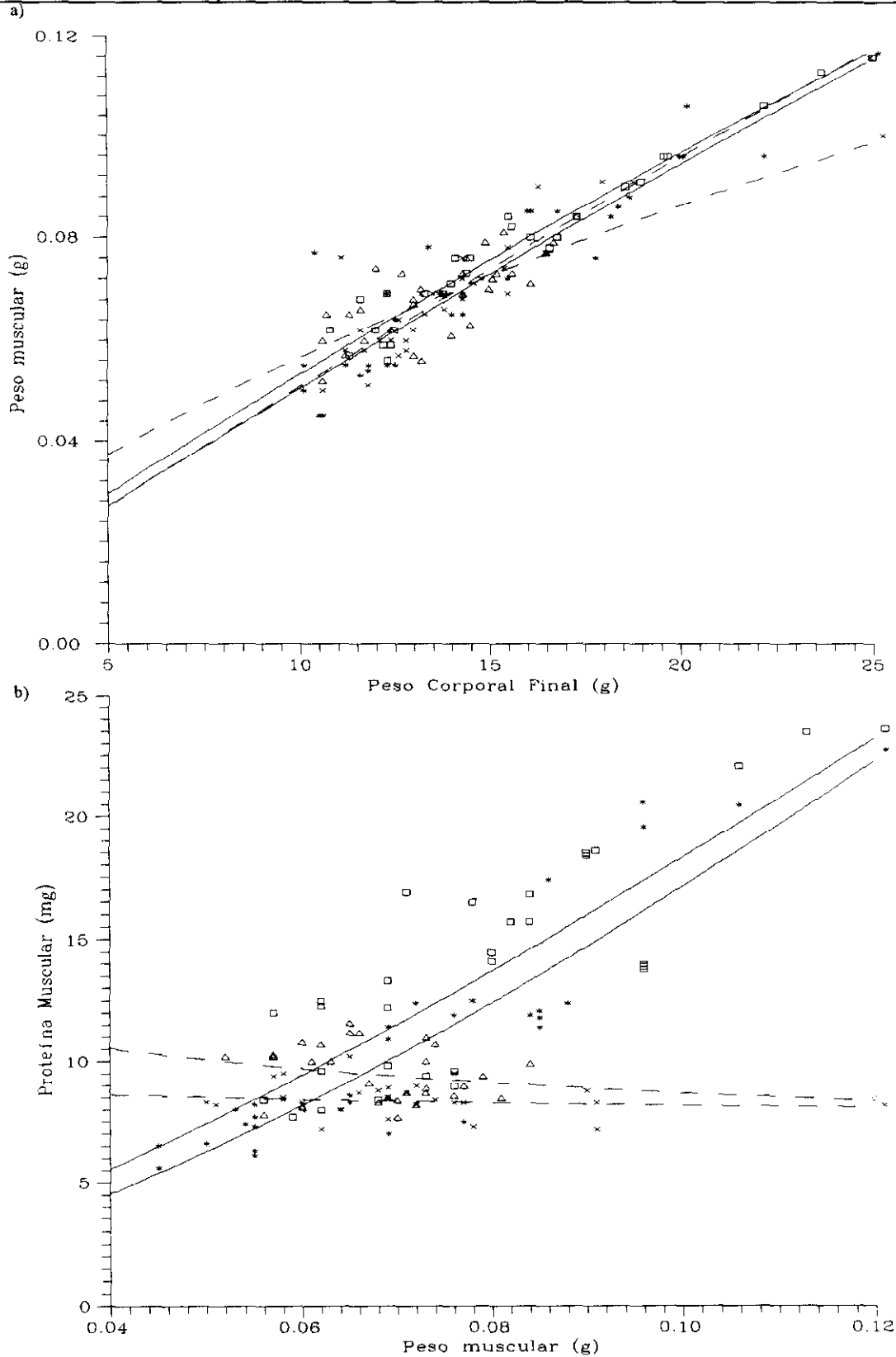
	a	b
x - - - - 12% ♀	$y = 0,0015 \cdot x^{1,40 \pm 0,10} a1^*$	$y = 159,6 \cdot x^{1,05 \pm 0,09} a1^*$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 0,0048 \cdot x^{1,01 \pm 0,06} b1^*$	$y = 423,6 \cdot x^{1,42 \pm 0,13} b1^*$
* - - - - 20% ♀	$y = 0,0049 \cdot x^{0,99 \pm 0,10} a2$	$y = 44,2 \cdot x^{0,57 \pm 0,13} a2^*$
\square - - - - 20% ♂	$y = 0,0063 \cdot x^{0,91 \pm 0,11} a1$	$y = 62,7 \cdot x^{0,70 \pm 0,70} a2^*$



superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo y un mismo tratamiento. El asterisco marca las diferencias entre NT y T.

Gráfica 10. a) Relación entre el **Peso Muscular (Y)** y el **Peso Corporal Final (X)**. b) Relación entre la **Proteína Muscular Absoluta (Y)** y el **Peso Muscular (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

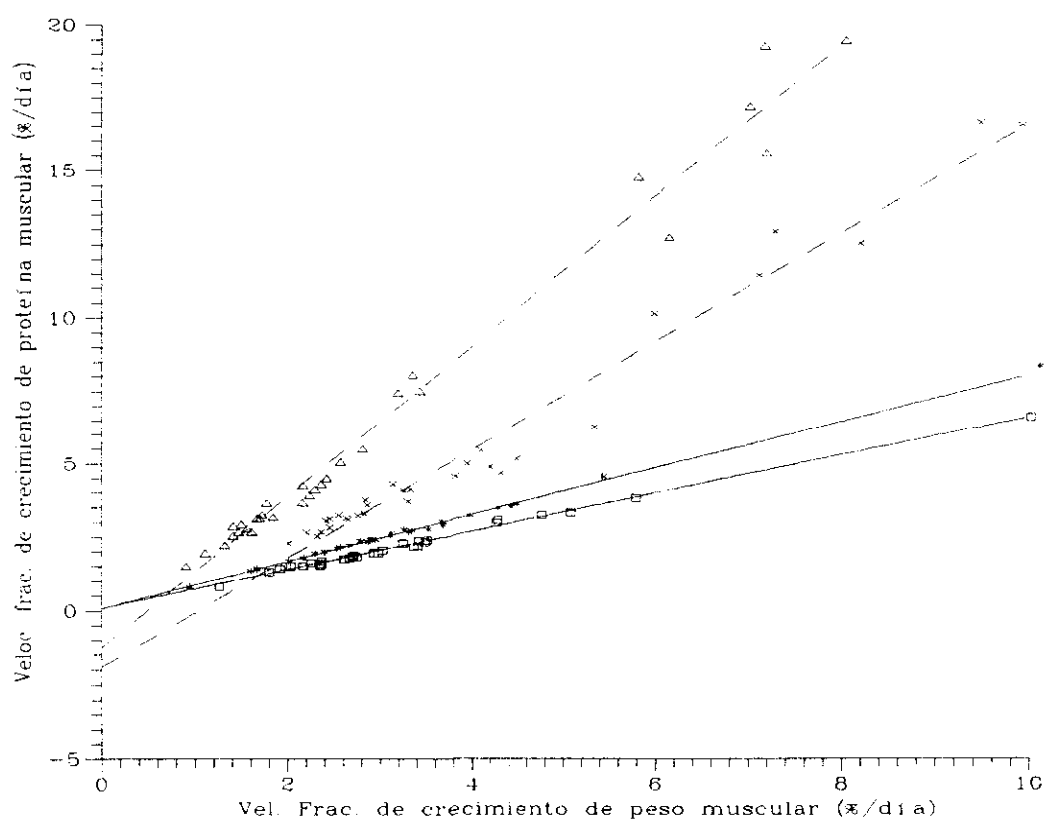
	a	b
x - - - - 12% ♀	$y = 0,0061 \cdot x^{0,91 \pm 0,10 a1^*}$	$y = 7,16 \cdot x^{-0,05 \pm 0,19 a1^*}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 0,0140 \cdot x^{0,60 \pm 0,10 b1^*}$	$y = 5,38 \cdot x^{-0,20 \pm 0,18 a1^*}$
* ——— 20% ♀	$y = 0,0062 \cdot x^{0,90 \pm 0,08 a2}$	$y = 478,32 \cdot x^{1,44 \pm 0,13 a2^*}$
□ ——— 20% ♂	$y = 0,0073 \cdot x^{0,85 \pm 0,04 a1}$	$y = 366,34 \cdot x^{1,30 \pm 0,19 a2^*}$



superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo y un mismo tratamiento. El asterisco marca las diferencias entre NT y T.

Gráfica 11. Relación entre la **Velocidad fraccional de crecimiento de la Proteína muscular (Y)** y la **Velocidad fraccional de crecimiento de peso muscular (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

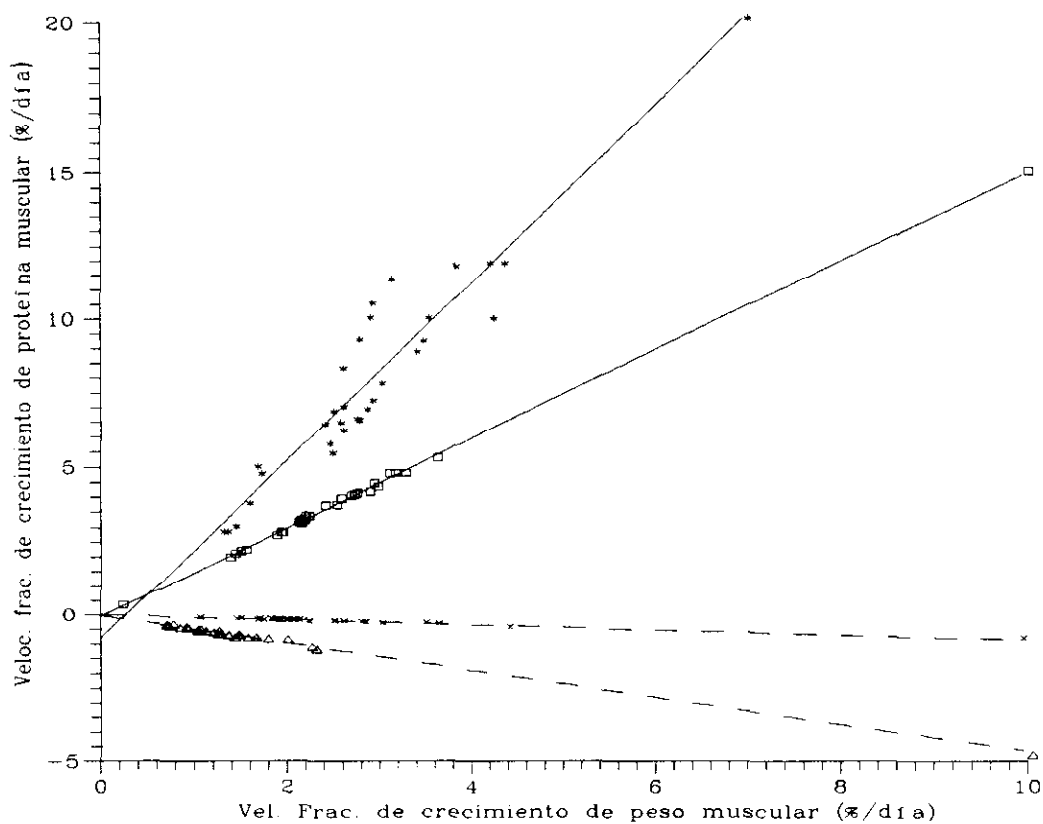
x - - - - 12% ♀	$y = -2,11 + x \cdot 1,85 \pm 0,06^{a1*}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = -1,72 + x \cdot 2,46 \pm 0,06^{a1*}$
* ——— 20% ♀	$y = 0,08 + x \cdot 0,79 \pm 0,01^{a2*}$
\square ——— 20% ♂	$y = 0,10 + x \cdot 0,65 \pm 0,01^{a2*}$



superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo y un mismo tratamiento. El asterisco marca las diferencias entre NT y T.

Gráfica 12. Relación entre la **Velocidad fraccional de crecimiento de la Proteína muscular (Y)** y la **Velocidad fraccional de crecimiento de peso muscular (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

x - - - - 12% ♀	$y = 0,01 - x \cdot 0,08 \pm 0,01$ ^{a1*}
△ - - - - 12% ♂	$y = -0,62 - x \cdot 0,44 \pm 0,03$ ^{b1*}
* ——— 20% ♀	$y = -0,07 + x \cdot 3,01 \pm 0,25$ ^{a2*}
□ ——— 20% ♂	$y = -0,04 + x \cdot 1,51 \pm 0,02$ ^{b2*}



superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo y un mismo tratamiento. El asterisco marca las diferencias entre NT y T.

4.4. DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c NO TRATADOS (NT) Y TRATADOS CON rhGH (T).

- *Relación entre el incremento proteico muscular y las ingestas proteica (IP) y energética (IE) (Gráficas 5a y b, 6a y b).*

De acuerdo con las ecuaciones de regresión correspondientes, existe una correlación lineal entre el depósito de proteína muscular y las ingestas proteica y energética, de tal modo que el incremento de la proteína es directamente proporcional al aumento de las ingestas para todos los animales estudiados, a excepción de los grupos ♀ y ♂ 12% T en los que resulta inversamente proporcional.

La utilización de la proteína ingerida (Gráfica 5a) es mejor por parte de los animales del 12% NT respecto a los de mayor nivel proteico, mientras que la IE es utilizada (Gráfica 5b) de forma similar por todos los grupos NT. Sin embargo, tanto la IP como la IE son mejor utilizadas por los animales T sometidos al 20% de proteína (Gráfica 6a y b).

Por otra parte, la administración de la hormona rhGH induce un mayor depósito de proteína muscular en los animales T sometidos al 20% de proteína, a partir tanto de la IP como de la IE respecto de los grupos del 20% NT, mientras que los grupos 12% T utilizan peor ambas ingestas que sus controles NT, siendo el grupo ♂ 12% T el que presenta la peor utilización (compárese gráficas y ecuaciones 5a-6a y 5b-6b).

- *Relación entre la proteína muscular y la proteína de la carcasa (Gráficas 7 y 8).*

El aporte de la proteína muscular a la proteína de la carcasa se incrementa a medida que aumenta esta última en todos los animales estudiados, a excepción de los grupos ♀ y ♂ 12% T en los que resulta inversamente proporcional, de acuerdo con las ecuaciones de regresión lineal respectivas (Gráficas 7 y 8).

En los animales NT la contribución de la proteína muscular/g de proteína de la carcasa es mayor en los grupos sometidos al 12% de proteína dietaria (Gráfica 7), mientras que por el contrario, en los animales T la mayor contribución corresponde a los grupos del 20% T, no sólo respecto a los grupos T de menor nivel proteico (cuya pendiente es negativa)(Gráfica 8), sino también respecto a los grupos 20% NT (compárese gráficas y ecuaciones 7 y 8).

- Relaciones alométricas entre el peso muscular y el peso corporal final y entre la proteína muscular y el peso muscular (Gráficas 9a y b, 10a y b).

El crecimiento del músculo gastrocnemio es proporcional al del peso corporal en todos los animales NT (coeficiente alométrico ≈ 1) a excepción del grupo ♀ 12% NT, cuyo crecimiento muscular es superior al corporal ($b = 1,40$) a consecuencia de diferencias de carácter sexual y dietario (Gráfica 9a).

El crecimiento muscular en los animales T, aunque con coeficientes ligeramente inferiores a 1 respecto al PCF, es casi proporcional a éste en todos los grupos, a excepción del grupo ♂ 12% T cuyo coeficiente alométrico es el más bajo ($b=0,60$) (Gráfica 10a).

Siempre, el porcentaje de contribución del peso muscular respecto al peso corporal es menor en los animales 12% T respecto de los grupos 12% NT, e igual en los sometidos al 20% de proteína respecto a sus controles (20% NT) (compárese gráficas y ecuaciones 9a y 10a).

También los grupos 12% NT y especialmente los animales ♂ 12% NT presentan los mayores coeficientes alométricos entre la proteína muscular y el peso del músculo (Gráfica 9b) respecto de los animales del 20% NT, lo que indica las diferencias dietaria y sexual de esta alometría.

Por su parte, son los grupos de mayor nivel proteico (20% T) los que aportan una mayor cantidad de proteína al peso muscular tanto respecto a los animales sometidos al 12% T (Gráfica 10b) como a los controles 20% NT (compárese gráficas y ecuaciones 9b y 10b).

- *Relación entre la velocidad fraccional de crecimiento de la proteína muscular y la velocidad fraccional de crecimiento de peso muscular (Gráficas 11 y 12).*

Ambas velocidades son directamente proporcionales entre si en todos los animales estudiados, a excepción de los grupos ♂ y ♀ 12% T en los que son inversamente proporcionales.

La dieta del 12% de proteína proporciona una mayor pendiente en los animales NT respecto a los grupos NT del 20% de proteína (Gráfica 11), mientras que es muy superior en los grupos 20% T, tanto respecto de los animales 12% T (Gráfica 12) como de los grupos 20% NT (compárese gráficas y ecuaciones 11 y 12).

Tabla 24. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el crecimiento celular muscular: DNA absoluto, DNA relativo y número de núcleos del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

DNA ABSOLUTO ($\mu\text{g}/\text{órgano}$)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	103 \pm 2 ^{a+}	246 \pm 6 ^{a++}	95 \pm 4 ^{a+}	141 \pm 10 ^{a++}
Día 30	223 \pm 2 ^{b+}	104 \pm 4 ^{b++}	220 \pm 9 ^{b+}	133 \pm 8 ^{a++}
Día 35	99 \pm 4 ^{a++}	172 \pm 3 ^{c++}	148 \pm 6 ^{c++}	220 \pm 5 ^{b++}
Día 40	168 \pm 5 ^{c*}	181 \pm 9 ^{c*}	217 \pm 4 ^{b++}	332 \pm 6 ^{c++}
Día 45	220 \pm 2 ^b	235 \pm 7 ^{a*}	233 \pm 6 ^{b+}	268 \pm 11 ^{d++}
Día 50	237 \pm 7 ^d	232 \pm 5 ^{a*}	237 \pm 8 ^{b+}	341 \pm 11 ^{d++}

DNA RELATIVO (mg/g)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	2,3 \pm 0,02 ^{a++}	3,8 \pm 0,10 ^{a++}	1,6 \pm 0,01 ^{a++}	2,4 \pm 0,02 ^{a++}
Día 30	2,4 \pm 0,01 ^{b++}	1,4 \pm 0,03 ^{b++}	2,6 \pm 0,01 ^{b++}	1,9 \pm 0,01 ^{b++}
Día 35	1,3 \pm 0,03 ^{c++}	2,1 \pm 0,01 ^{c++}	1,9 \pm 0,02 ^{c++}	2,9 \pm 0,01 ^{c++}
Día 40	2,1 \pm 0,03 ^{d++}	2,3 \pm 0,04 ^{d++}	2,5 \pm 0,02 ^{d++}	3,9 \pm 0,02 ^{d++}
Día 45	2,9 \pm 0,01 ^{e*}	2,9 \pm 0,01 ^{e*}	2,5 \pm 0,01 ^{d++}	2,6 \pm 0,01 ^{e++}
Día 50	2,7 \pm 0,01 ^{f++}	2,3 \pm 0,01 ^{d++}	2,5 \pm 0,01 ^{d++}	3,7 \pm 0,01 ^{f++}

NÚMERO DE NÚCLEOS (millones/órgano)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	16,6 \pm 0,32 ^{a+}	39,7 \pm 0,63 ^{a++}	15,3 \pm 0,76 ^{a+}	22,4 \pm 0,72 ^{a++}
Día 30	34,3 \pm 0,93 ^{b+}	16,7 \pm 0,64 ^{b++}	35,5 \pm 1,12 ^{b+}	21,4 \pm 0,81 ^{a++}
Día 35	15,8 \pm 0,73 ^{a++}	27,1 \pm 0,94 ^{c++}	24,1 \pm 0,66 ^{c++}	35,6 \pm 1,19 ^{b++}
Día 40	27,1 \pm 1,07 ^{c*}	29,2 \pm 1,24 ^{c*}	34,8 \pm 1,33 ^{b++}	52,8 \pm 2,45 ^{c++}
Día 45	35,5 \pm 1,17 ^{bd}	37,9 \pm 1,11 ^{a*}	36,9 \pm 1,16 ^{b+}	43,2 \pm 1,73 ^{d++}
Día 50	38,3 \pm 1,45 ^d	37,3 \pm 1,11 ^{a*}	37,9 \pm 0,99 ^{b+}	55,0 \pm 2,48 ^{c++}

Cada valor es la media \pm error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 25. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el tamaño celular: peso muscular/número de núcleos y proteína/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	PESO MUSCULAR/NÚMERO DE NÚCLEOS (ng)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	2,69 ± 0,03 ^{a++}	1,63 ± 0,03 ^{a++}	3,78 ± 0,04 ^{a++}	2,57 ± 0,02 ^{a++}
Día 30	2,54 ± 0,02 ^{a++}	4,53 ± 0,11 ^{b++}	2,35 ± 0,01 ^{b++}	3,32 ± 0,03 ^{b++}
Día 35	4,69 ± 0,13 ^{b++}	2,99 ± 0,03 ^{c++}	3,19 ± 0,00 ^{c++}	2,18 ± 0,01 ^{c++}
Día 40	2,96 ± 0,04 ^{c++}	2,69 ± 0,05 ^{d++}	2,49 ± 0,02 ^{d++}	1,59 ± 0,01 ^{d++}
Día 45	2,12 ± 0,01 ^{d++}	2,12 ± 0,01 ^{e++}	2,52 ± 0,02 ^{d++}	2,35 ± 0,02 ^{e++}
Día 50	2,33 ± 0,02 ^{f++}	2,66 ± 0,02 ^{d++}	2,53 ± 0,02 ^{d++}	1,69 ± 0,01 ^{f++}

Edad	PROTEÍNA/DNA MUSCULAR (mg/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	58,8 ± 1,5 ^{ad++}	36,5 ± 0,8 ^{a++}	97,1 ± 1,2 ^{a++}	56,2 ± 1,0 ^{a++}
Día 30	46,0 ± 0,6 ^{b++}	92,3 ± 3,0 ^{b++}	40,2 ± 0,4 ^{b++}	61,5 ± 0,9 ^{b++}
Día 35	100,7 ± 2,7 ^{c++}	61,1 ± 1,1 ^{c++}	57,7 ± 0,9 ^{c++}	41,0 ± 0,4 ^{c++}
Día 40	64,5 ± 1,0 ^{a*}	68,1 ± 0,9 ^{c*}	54,3 ± 0,7 ^{d++}	34,1 ± 0,5 ^{d++}
Día 45	53,6 ± 1,1 ^d	52,5 ± 0,8 ^{d*}	52,3 ± 1,2 ^{d+}	48,7 ± 0,8 ^{e++}
Día 50	63,8 ± 0,7 ^{a++}	73,6 ± 0,8 ^{c++}	52,6 ± 0,9 ^{d++}	39,0 ± 0,8 ^{c++}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 26. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la cantidad absoluta y relativa del enzima desoxirribonucleasa ácida del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	DNasa ÁCIDA ABSOLUTA (UI/órgano)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	1,87 ± 0,06 ^{a+*}	3,28 ± 0,13 ^{a+*}	2,85 ± 0,13 ^{a*}	2,65 ± 0,14 ^{a*}
Día 30	4,69 ± 0,03 ^{b+*}	3,49 ± 0,07 ^{ab+*}	3,50 ± 0,13 ^{b+*}	2,89 ± 0,07 ^{a+*}
Día 35	3,08 ± 0,05 ^{c*}	3,20 ± 0,07 ^{a*}	3,76 ± 0,05 ^{b+*}	4,14 ± 0,04 ^{b+*}
Día 40	2,85 ± 0,07 ^{c*}	2,85 ± 0,07 ^{c*}	4,23 ± 0,14 ^{c+*}	5,23 ± 0,13 ^{c+*}
Día 45	3,05 ± 0,06 ^{c+*}	3,57 ± 0,10 ^{b+*}	5,43 ± 0,10 ^{d+*}	4,72 ± 0,11 ^{d+*}
Día 50	3,56 ± 0,15 ^{d+*}	4,75 ± 0,09 ^{d+*}	4,77 ± 0,08 ^{c*}	4,94 ± 0,08 ^{c*}

Edad	DNasa ÁCIDA RELATIVA (UI/g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	41,9 ± 0,5 ^{a+*}	50,5 ± 0,1 ^{a+*}	49,3 ± 0,2 ^{a+*}	45,1 ± 0,3 ^{a+*}
Día 30	51,5 ± 0,5 ^{b+*}	46,3 ± 0,4 ^{b+*}	42,0 ± 0,8 ^{b+*}	40,5 ± 0,4 ^{b+*}
Día 35	41,4 ± 0,1 ^{ad+*}	39,6 ± 0,3 ^{c+*}	52,1 ± 0,5 ^{c+*}	53,5 ± 0,2 ^{c+*}
Día 40	35,7 ± 0,3 ^{c*}	36,3 ± 0,3 ^{d*}	49,0 ± 0,6 ^{a+*}	55,6 ± 0,3 ^{d+*}
Día 45	40,5 ± 0,5 ^{de+*}	44,2 ± 0,2 ^{e+*}	58,3 ± 0,5 ^{d+*}	46,6 ± 0,3 ^{e+*}
Día 50	40,0 ± 0,6 ^{e+*}	48,2 ± 0,1 ^{f+*}	49,8 ± 0,6 ^{a+*}	53,3 ± 0,8 ^{c+*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 27. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la actividad específica del enzima desoxirribonucleasa ácida y sobre la razón DNasa ácida/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No **Tratados** (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	DNasa ÁCIDA/PROTEÍNA MUSCULAR (UI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,30 ± 0,009 ^{a+}	0,36 ± 0,008 ^{a++}	0,30 ± 0,002 ^{a+}	0,33 ± 0,004 ^{a++}
Día 30	0,45 ± 0,015 ^{b++}	0,36 ± 0,014 ^{a++}	0,39 ± 0,009 ^{b++}	0,35 ± 0,003 ^{a++}
Día 35	0,31 ± 0,011 ^{a*}	0,30 ± 0,014 ^{b*}	0,46 ± 0,008 ^{c*}	0,45 ± 0,005 ^{b*}
Día 40	0,26 ± 0,005 ^{c++}	0,23 ± 0,008 ^{c++}	0,36 ± 0,003 ^{d++}	0,41 ± 0,010 ^{c++}
Día 45	0,25 ± 0,007 ^{cd++}	0,29 ± 0,011 ^{bd++}	0,45 ± 0,011 ^{c++}	0,36 ± 0,007 ^{ad++}
Día 50	0,24 ± 0,008 ^{d++}	0,27 ± 0,004 ^{d++}	0,38 ± 0,004 ^{b*}	0,37 ± 0,011 ^{d*}

Edad	DNasa ÁCIDA/DNA MUSCULAR (UI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	18,2 ± 0,4 ^{a++}	13,3 ± 0,4 ^{a++}	30,0 ± 0,3 ^{a++}	18,7 ± 0,2 ^{a++}
Día 30	21,1 ± 0,2 ^{b++}	33,8 ± 0,9 ^{b++}	15,9 ± 0,2 ^{b++}	21,7 ± 0,1 ^{b++}
Día 35	31,3 ± 0,8 ^{c++}	19,1 ± 0,3 ^{c+}	26,8 ± 0,3 ^{c++}	18,8 ± 0,2 ^{a+}
Día 40	17,0 ± 0,2 ^{d++}	15,7 ± 0,3 ^{d++}	19,7 ± 0,4 ^{d++}	14,3 ± 0,1 ^{c++}
Día 45	13,8 ± 0,2 ^{c++}	15,1 ± 0,1 ^{d++}	23,7 ± 0,2 ^{c++}	17,6 ± 0,1 ^{d++}
Día 50	15,0 ± 0,2 ^{e++}	20,7 ± 0,1 ^{e++}	20,3 ± 0,3 ^{d++}	14,6 ± 0,2 ^{c++}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 28. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), la Dieta (D) y el Sexo (S) sobre el estudio del crecimiento celular² del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	DNA/órgano	DNA/g	NN	Peso/NN	Proteína/DNA	DNasa/órgano	DNasa/g	DNasa/Proteína	DNasa/DNA
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
SEXO	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	NS	0,0095	0,0001	0,0001	0,0001
ExD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DxS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0032	0,0001
ExDxS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad ($p < 0,05$). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: DNA absoluto (DNA/órgano) y relativo (DNA/g), número de núcleos (NN), peso muscular/número de núcleos (peso/NN), Proteína/DNA, DNasa ácida absoluta (DNasa/órgano) y relativa (DNasa/g) y actividad específica DNasa ácida/proteína (DNasa/Proteína) y la razón DNasa ácida/DNA (DNasa/DNA).

Tabla 29. Relación con la Edad de las variables: DNA absoluto y relativo, número de núcleos, peso muscular/número de núcleos y proteína/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos, entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
DNA/órgano	♀	$y=0,101 + x \cdot 0,0041$	0,0009 ^{a1}	0,623	0,0002	$y=0,110 + x \cdot 0,0046$	0,0008 ^{a2}	0,737	0,0000
	♂	$y=0,161 + x \cdot 0,0019$	0,0010 ^{b1}	0,319	NS	$y=0,088 + x \cdot 0,0086$	0,0009 ^{b2}	0,875	0,0000
DNA/g	♀	$y=1,892 + x \cdot 0,0229$	0,0103 ^{a1}	0,385	NS	$y=1,866 + x \cdot 0,0231$	0,0065 ^{a1}	0,554	0,0015
	♂	$y=2,713 - x \cdot 0,0139$	0,0165 ^{b1}	-0,157	NS	$y=1,927 + x \cdot 0,0549$	0,0115 ^{b2}	0,667	0,0001
Número de núcleos	♀	$y=16,378 + x \cdot 0,675$	0,160 ^{a1}	0,623	0,0002	$y=17,964 + x \cdot 0,730$	0,128 ^{a1}	0,732	0,0000
	♂	$y=25,961 + x \cdot 0,306$	0,173 ^{b1}	0,316	NS	$y=14,246 + x \cdot 1,392$	0,145 ^{b2}	0,875	0,0000
Peso músculo/ nº de núcleos	♀	$y=3,366 - x \cdot 0,027$	0,018 ^{a1}	-0,274	NS	$y=3,450 - x \cdot 0,036$	0,008 ^{a2}	-0,612	0,0003
	♂	$y=3,009 + x \cdot 0,013$	0,019 ^{a1}	0,129	NS	$y=3,071 - x \cdot 0,045$	0,009 ^{a1}	-0,664	0,0001
Proteína/DNA	♀	$y=63,71 + x \cdot 0,0399$	0,399 ^{a1}	0,019	NS	$y=78,03 - x \cdot 1,0856$	0,340 ^{a2}	-0,515	0,0035
	♂	$y=56,70 + x \cdot 0,4195$	0,395 ^{a1}	0,196	NS	$y=59,92 - x \cdot 0,7519$	0,164 ^{b2}	-0,653	0,0001

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

Tabla 30. Relación con la Edad de las variables: cantidad absoluta y relativa del enzima DNasa ácida, actividad específica DNasa ácida/proteína y la razón DNasa ácida/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
DNasa ácida/ órgano	♀	$y=2,847 + x \cdot 0,0190$	0,0187 ^{a1}	0,189	NS	$y=2,499 + x \cdot 0,0907$	0,009 ^{a2}	0,885	0,0000
	♂	$y=2,800 + x \cdot 0,0413$	0,0114 ^{a1}	0,562	0,0012	$y=2,292 + x \cdot 0,1030$	0,011 ^{a2}	0,864	0,0000
DNasa ácida/g	♀	$y=46,62 - x \cdot 0,275$	0,093 ^{a1}	-0,485	0,0065	$y=45,22 + x \cdot 0,276$	0,096 ^{a2}	0,478	0,0075
	♂	$y=46,28 - x \cdot 0,118$	0,106 ^{a1}	-0,206	NS	$y=42,94 + x \cdot 0,351$	0,101 ^{a2}	0,548	0,0017
DNasa ácida/ proteína	♀	$y=0,407 - x \cdot 0,005$	0,0010 ^{a1}	-0,631	0,0002	$y=0,349 + x \cdot 0,002$	0,001 ^{a2}	0,408	NS
	♂	$y=0,380 - x \cdot 0,004$	0,0007 ^{a1}	-0,726	0,0000	$y=0,363 + x \cdot 0,001$	0,000 ^{a2}	0,216	NS
DNasa ácida/ DNA	♀	$y=24,58 - x \cdot 0,296$	0,116 ^{a1}	-0,431	NS	$y=25,94 - x \cdot 0,183$	0,098 ^{a1}	-0,330	NS
	♂	$y=21,90 - x \cdot 0,129$	0,150 ^{a1}	-0,161	NS	$y=21,32 - x \cdot 0,213$	0,043 ^{a1}	-0,701	0,0000

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

4.5. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS, ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA, NO TRATADOS (NT) Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 Y 20%) (Tablas 24-30).

Todos los parámetros relacionados con el crecimiento celular del músculo gastrocnemio de ratones no tratados: DNA/órgano, DNA/g, Número de núcleos (NN), Peso muscular/NN, Proteína/DNA, DNasa ácida/órgano, DNasa ácida/g, DNasa ácida/proteína, DNasa ácida/DNA se encuentran afectados muy significativamente por la EDAD, según el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 28).

Entre los días 25 y 50 de vida, se produce en todos los animales NT un aumento de las cantidades absoluta y relativa de DNA muscular, así como del número de núcleos/órgano, a excepción del grupo ♂ 12% NT en el que estos valores descienden (DNA/g) o se mantienen (DNA/órgano, NN) a lo largo de la experiencia (Tabla 24).

La evolución de todas las variables mencionadas resulta edad-dependiente en los animales sometidos al 20% de proteína, mientras que sólo los valores DNA/órgano y NN del grupo ♀ 12% NT presentan correlación temporal significativa (Tabla 29).

De forma paralela el tamaño celular del músculo, expresado mediante las razones proteína/DNA y peso muscular/número de núcleos, evoluciona de forma diferente a lo largo de la edad según el grupo considerado (Tabla 25). Mientras que ambas razones presentan descensos temporales en los animales del 20% de proteína, en los grupos del 12% NT bien aumentan (♂) o bien disminuyen o no se alteran (♀), aunque siempre de forma no correlativa con la edad (Tablas 25 y 29).

Por otra parte, a lo largo del tiempo la cantidad absoluta del enzima DNasa ácida se incrementa en todos los animales NT, lo que se corresponde con ligeros descensos de su valor relativo (DNasa ácida/g) en los grupos ♀ y ♂ 12% NT, mientras que aumenta (♂) o no se altera (♀) en los grupos del 20% de proteína dietaria (Tabla 26).

La correlación lineal temporal de ambas variables es significativa en todos los animales excepto para los valores DNasa ácida/órgano (♀ 12%) y DNasa ácida/g (♂ 12%), presentando los mayores coeficientes de correlación lineal los grupos sometidos al mayor nivel proteico dietario, especialmente en el valor absoluto del enzima (♀ $r=0,885$ y ♂ $r=0,864$) (Tabla 30).

La variación temporal de la actividad específica de DNasa ácida es diferente en cada nivel dietario estudiado, disminuyendo en función de la edad en los animales del 12% de proteína e incrementándose en los alimentados con el 20% de forma edad- independiente (Tablas 27 y 30).

Por su parte, la razón DNasa ácida/DNA sufre descensos en todos los animales estudiados, a excepción del grupo ♂ 12% NT en el que se incrementa un 55% sobre el nivel inicial (Tabla 27).

También el crecimiento celular muscular está influido significativamente por la DIETA, según el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 28).

El test de comparación múltiple (LSD) señala en general, que la cantidad absoluta y relativa de DNA y el NN se incrementan en los animales alimentados con la dieta de mayor nivel proteico, siendo más acentuado el aumento en los animales ♂ (Tabla 24).

La razón proteína/DNA decrece en los animales ♀ y ♂ 20% NT entre los 30 y 50 días de vida, mientras que la razón peso muscular/NN es más variable (Tabla 25).

Así mismo, los animales bien alimentados presentan un incremento en todos los parámetros relacionados con el enzima DNasa ácida respecto a los sometidos al 12% de proteína dietaria (Tablas 26 y 27).

El SEXO influye de forma significativa sobre todos los parámetros relacionados con el crecimiento celular del músculo, a excepción de la razón proteína/DNA, según el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 28).

En general, los animales macho presentan un mayor número de células y de núcleos en el músculo gastrocnemio. Por el contrario, el mayor tamaño celular corresponde a los animales hembra, observándose mejor la influencia sexual en los grupos alimentados con el 20% de proteína (Tablas 24 y 25)

El enzima DNasa ácida, en cualquiera de sus relaciones presenta una gran variabilidad sexual, por lo que resulta poco clara la significación de este efecto (Tablas 26 y 27).

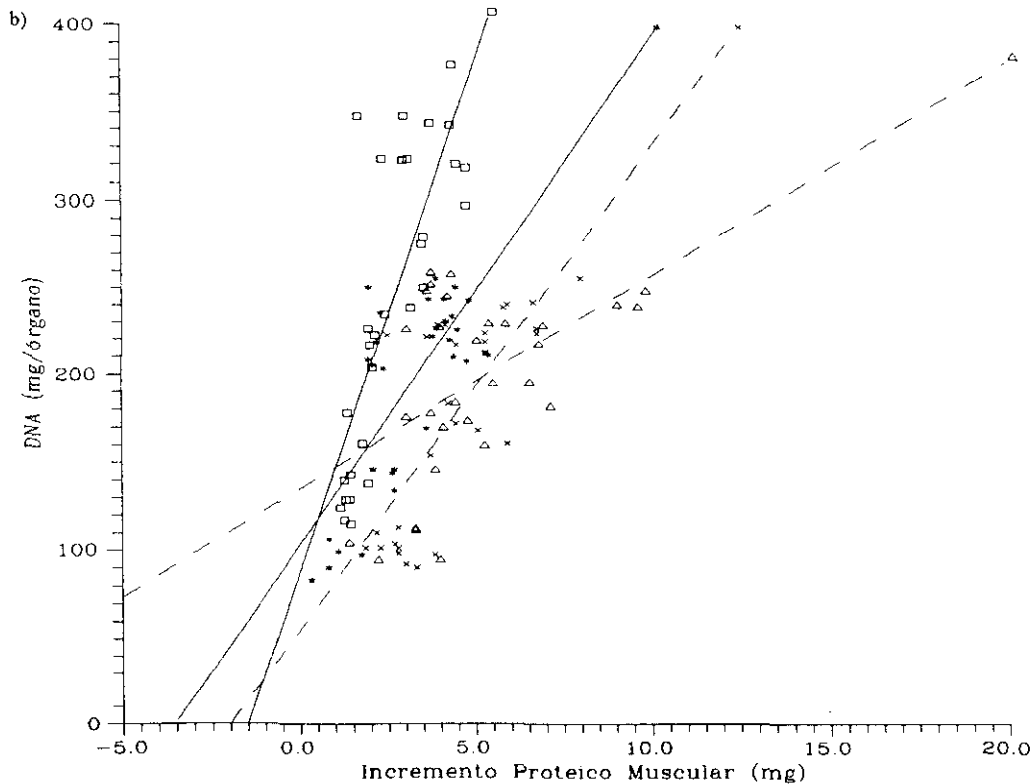
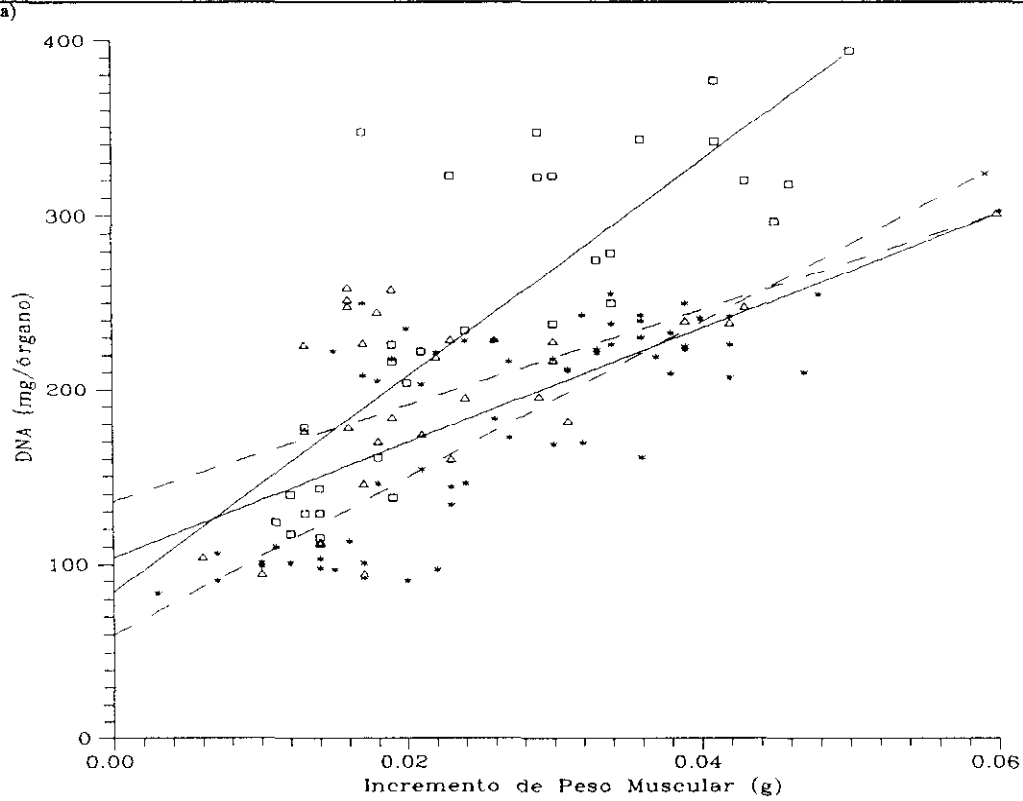
Del estudio de las pendientes de las rectas de regresión (Tablas 29 y 30) se desprende que todos los parámetros estudiados en el crecimiento celular, excepto el tamaño de la célula, crecen más rápidamente en los animales sometidos al 20% de proteína que los de menor nivel de proteína en la dieta. La mayor velocidad de crecimiento del DNA y las menores pérdidas en la razón proteína/DNA, las obtienen los animales ♂ 20% NT respecto de sus ♀.

Por otra parte, mientras que el grupo ♀ 12% NT presenta una mayor velocidad de crecimiento de DNA muscular y menor velocidad de la razón proteína/DNA que el grupo ♂ 12% NT, el grupo ♂ 20% NT tiene mayor rapidez de crecimiento de DNA con un menor decrecimiento de su tamaño celular respecto al grupo ♀ 20% NT (Tabla 29).

Como consecuencia de estas influencias, se produce un efecto importante de las interacciones ExD, ExS, DxS y ExDxS como muestra el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 28).

Gráfica 13. a). Relación entre DNA (Y) y el **Incremento de Peso Muscular (X)**. b) Relación entre el DNA (Y) y el **Incremento Proteico Muscular (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

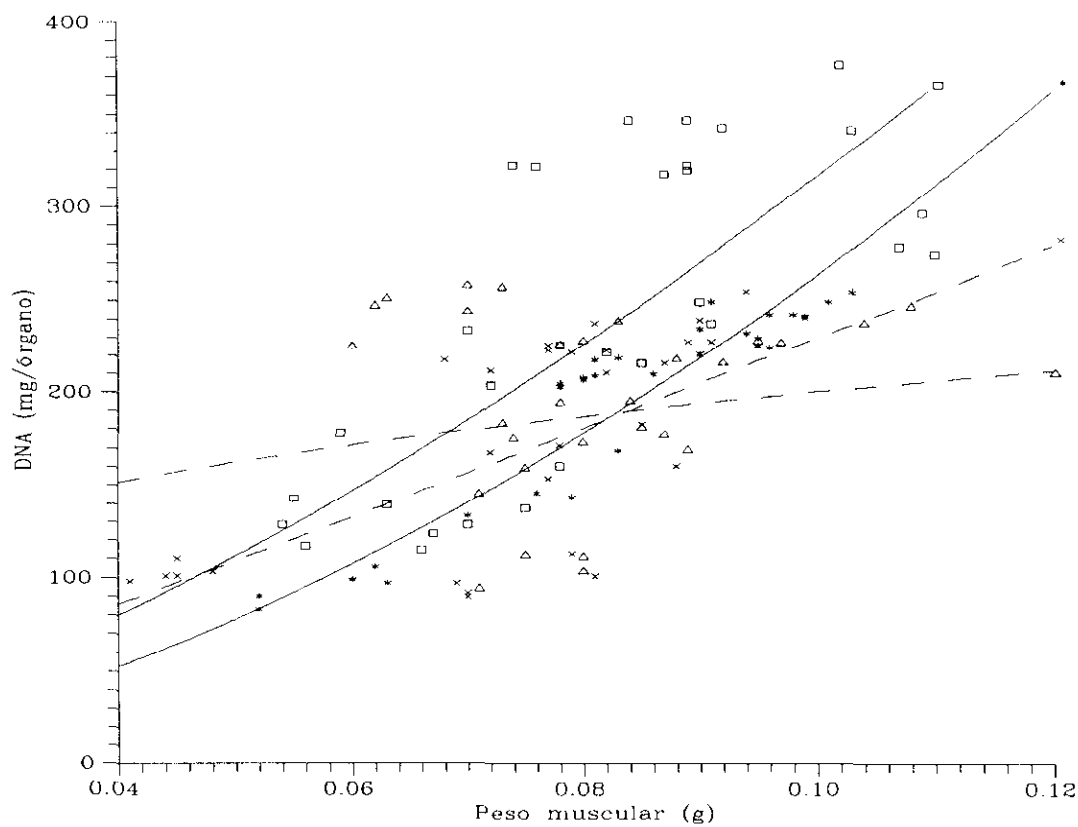
	a	b
x - - - - 12% ♀	$y = 0,060 + x \cdot 4,46 \pm 0,7^{a1}$	$y = 55,17 + x \cdot 27,40 \pm 0,63^{a1}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 0,135 + x \cdot 2,78 \pm 0,9^{a1}$	$y = 134,70 + x \cdot 12,16 \pm 1,08^{b1}$
* ——— 20% ♀	$y = 0,102 + x \cdot 3,30 \pm 0,5^{a1}$	$y = 102,97 + x \cdot 28,81 \pm 0,51^{a1}$
□ ——— 20% ♂	$y = 0,084 + x \cdot 6,14 \pm 0,8^{b2}$	$y = 87,59 + x \cdot 57,79 \pm 2,34^{b2}$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo.

Gráfica 14. Relación entre **DNA muscular (Y)** y **Peso muscular (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

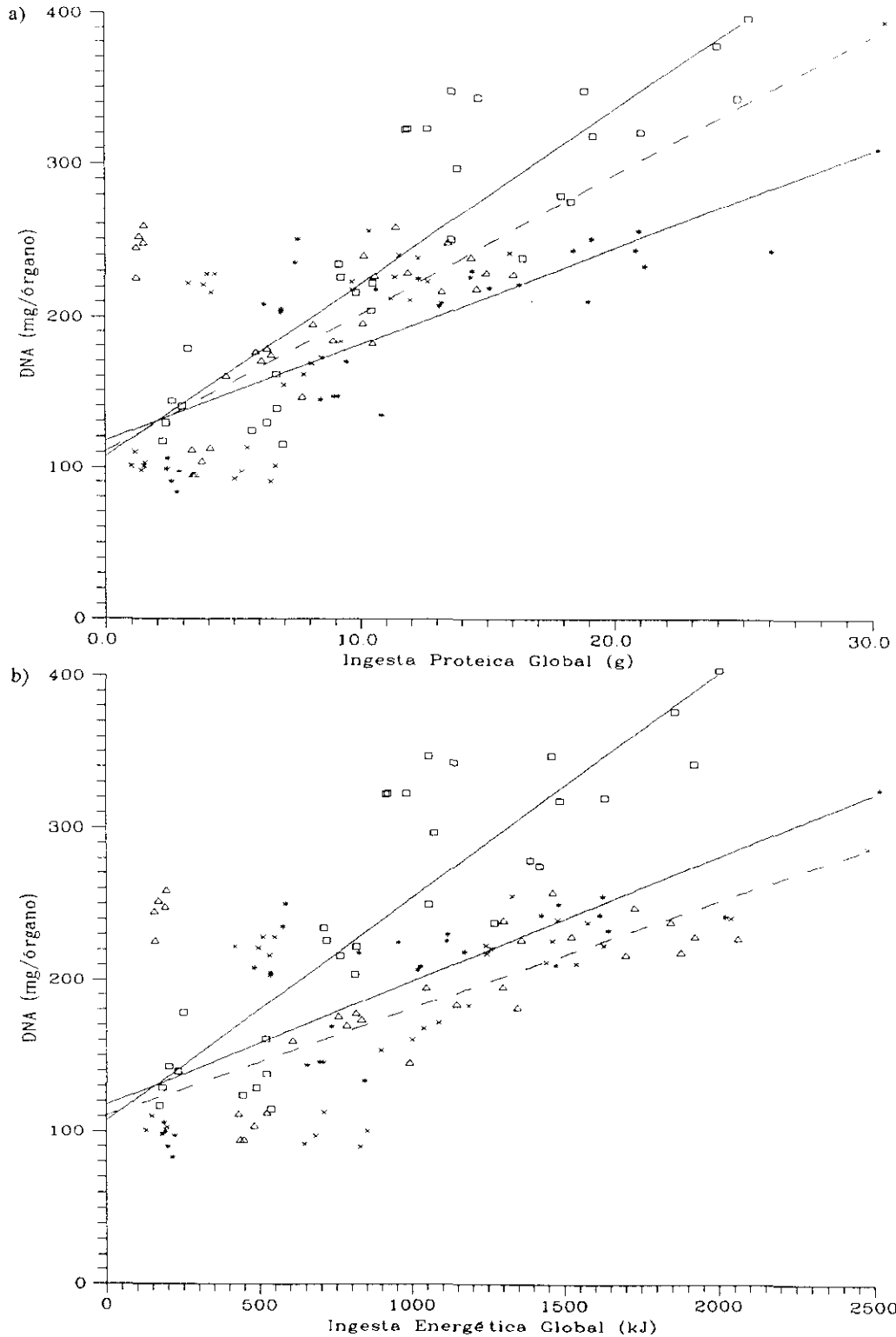
x - - - - 12% ♀	$y = 2,7 \cdot x^{1,07 \pm 0,20} a1$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 0,4 \cdot x^{0,30 \pm 0,19} b1$
* - - - - 20% ♀	$y = 15,0 \cdot x^{1,75 \pm 0,11} a2$
□ - - - - 20% ♂	$y = 10,0 \cdot x^{1,50 \pm 0,23} a2$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo.

Gráfica 15. Relación entre el DNA muscular (Y) y las **Ingestas Proteica (X) (a)** y **Energética (X) (b)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

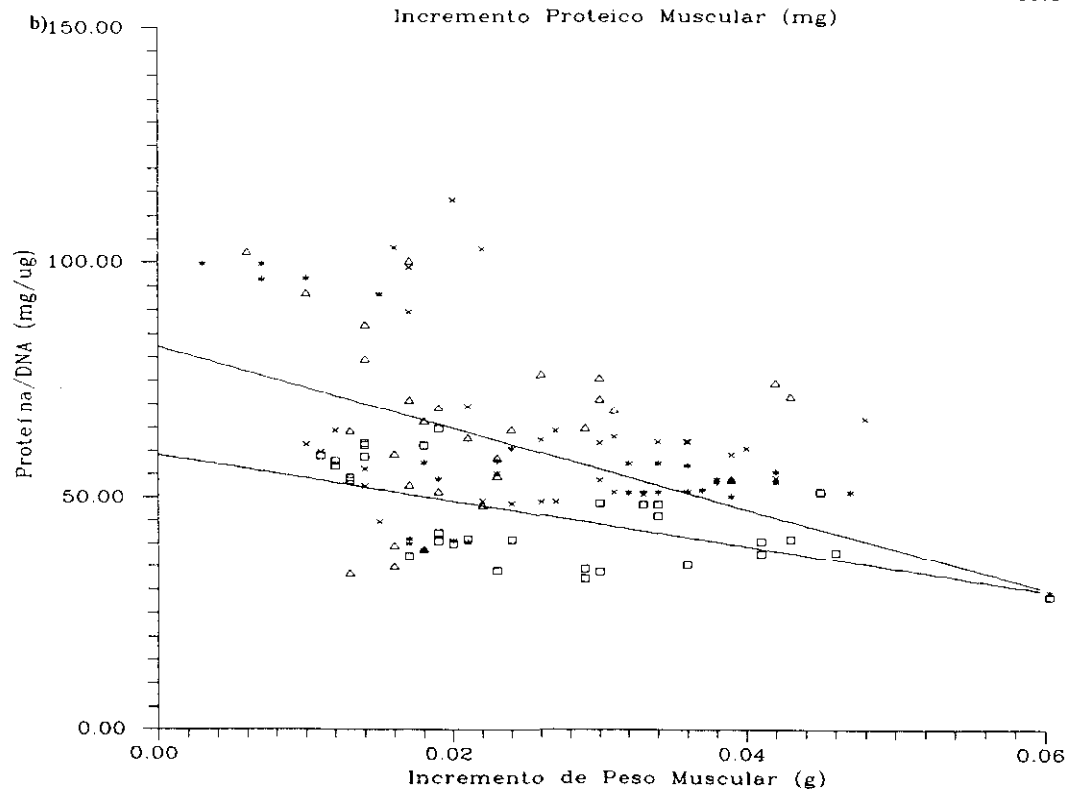
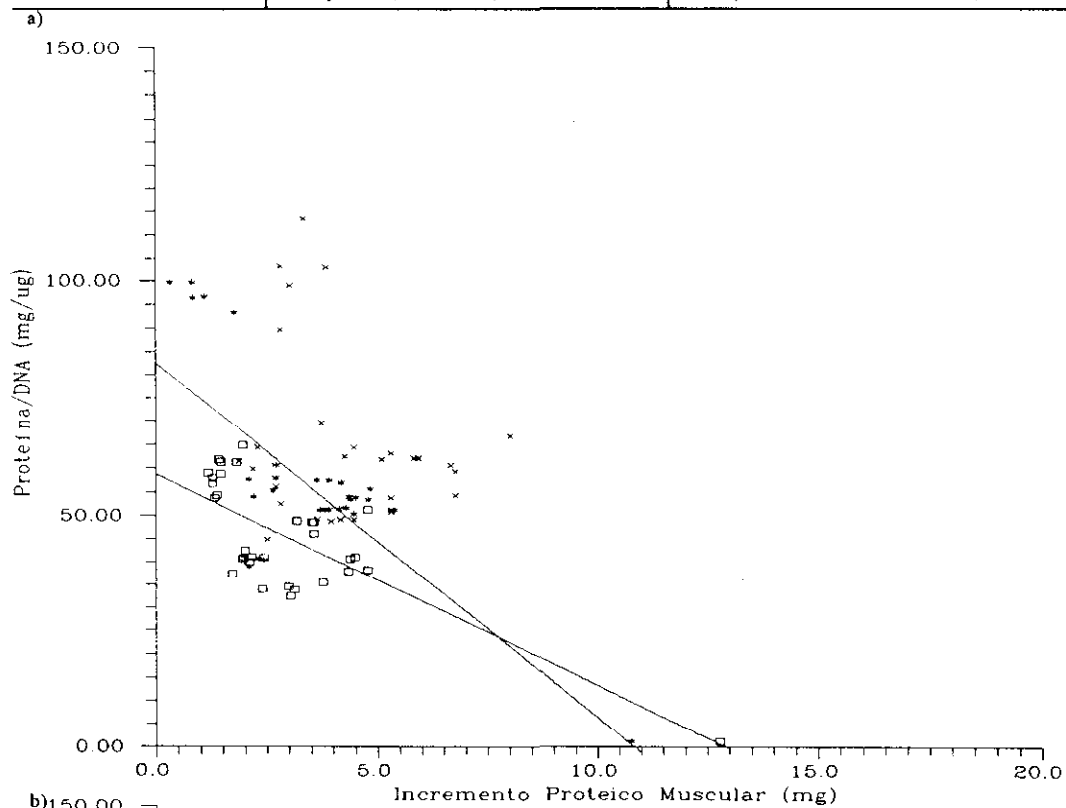
	a	b
x - - - - 12% ♀	$y = 110,54 + x \cdot 9,07 \pm 2,11^{a1}$	$y = 110,54 + x \cdot 0,070 \pm 0,02^{a1}$
Δ - - - - 12% ♂	NS	NS
* ——— 20% ♀	$y = 117,47 + x \cdot 6,33 \pm 1,04^{a2}$	$y = 117,47 + x \cdot 0,081 \pm 0,01^{a1}$
□ ——— 20% ♂	$y = 107,39 + x \cdot 11,3 \pm 1,28^{b2}$	$y = 107,39 + x \cdot 0,147 \pm 0,02^{b2}$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo.

Gráfica 16. a). Relación entre la razón **Proteína/DNA** (Y) y el **Incremento proteico muscular** (X)
 b). Relación entre la razón **Proteína/DNA** (Y) y el **Incremento de peso muscular** (X) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

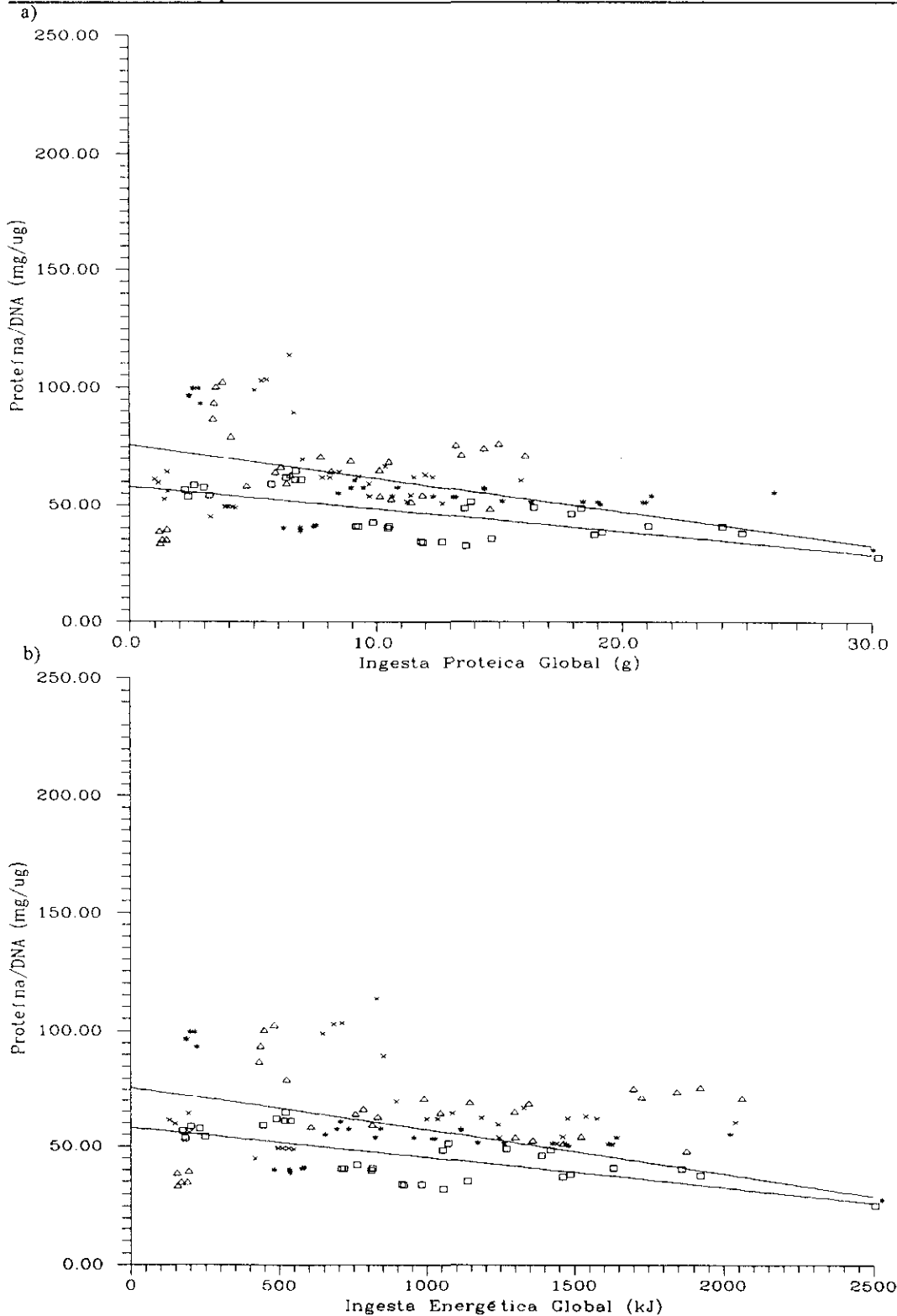
	a	b
x - - - - 12% ♀	NS	NS
Δ - - - - 12% ♂	NS	NS
* ——— 20% ♀	$y = 82,45 - x \cdot 7,62 \pm 2,05^a$	$y = 82,47 - x \cdot 0,87 \pm 0,2^a$
□ ——— 20% ♂	$y = 58,67 - x \cdot 4,53 \pm 1,35^a$	$y = 58,95 - x \cdot 0,48 \pm 0,2^a$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta .

Gráfica 17. Relaciones entre la razón **Proteína/DNA** (Y) y las **Ingestas Proteica** (X) (a) y **Energética** (X) (b) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

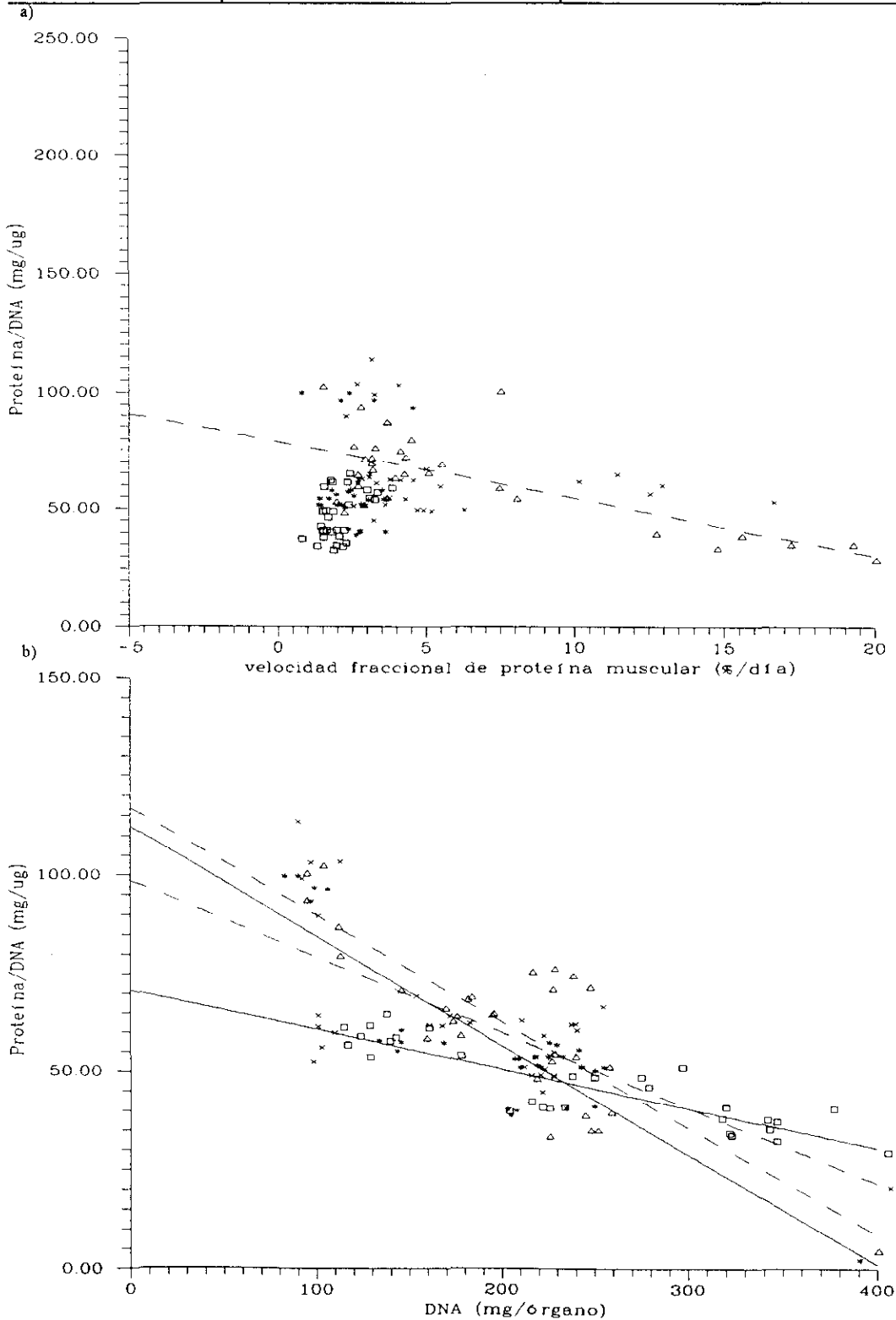
	a	b
x - - - - 12% ♀	NS	NS
Δ - - - - 12% ♂	NS	NS
* ——— 20% ♀	$y = 75,9 - x \cdot 1,44 \pm 0,4^a$	$y = 75,9 - x \cdot 0,018 \pm 0,005^a$
□ ——— 20% ♂	$y = 58,0 - x \cdot 0,97 \pm 0,2^a$	$y = 58,0 - x \cdot 0,012 \pm 0,002^a$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta.

Gráfica 18. a) Relación entre la razón **Proteína/DNA** (Y) y la **Velocidad fraccional de crecimiento de proteína muscular** (X). b) Relación entre la razón **Proteína/DNA** (Y) y el **DNA muscular** (X) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

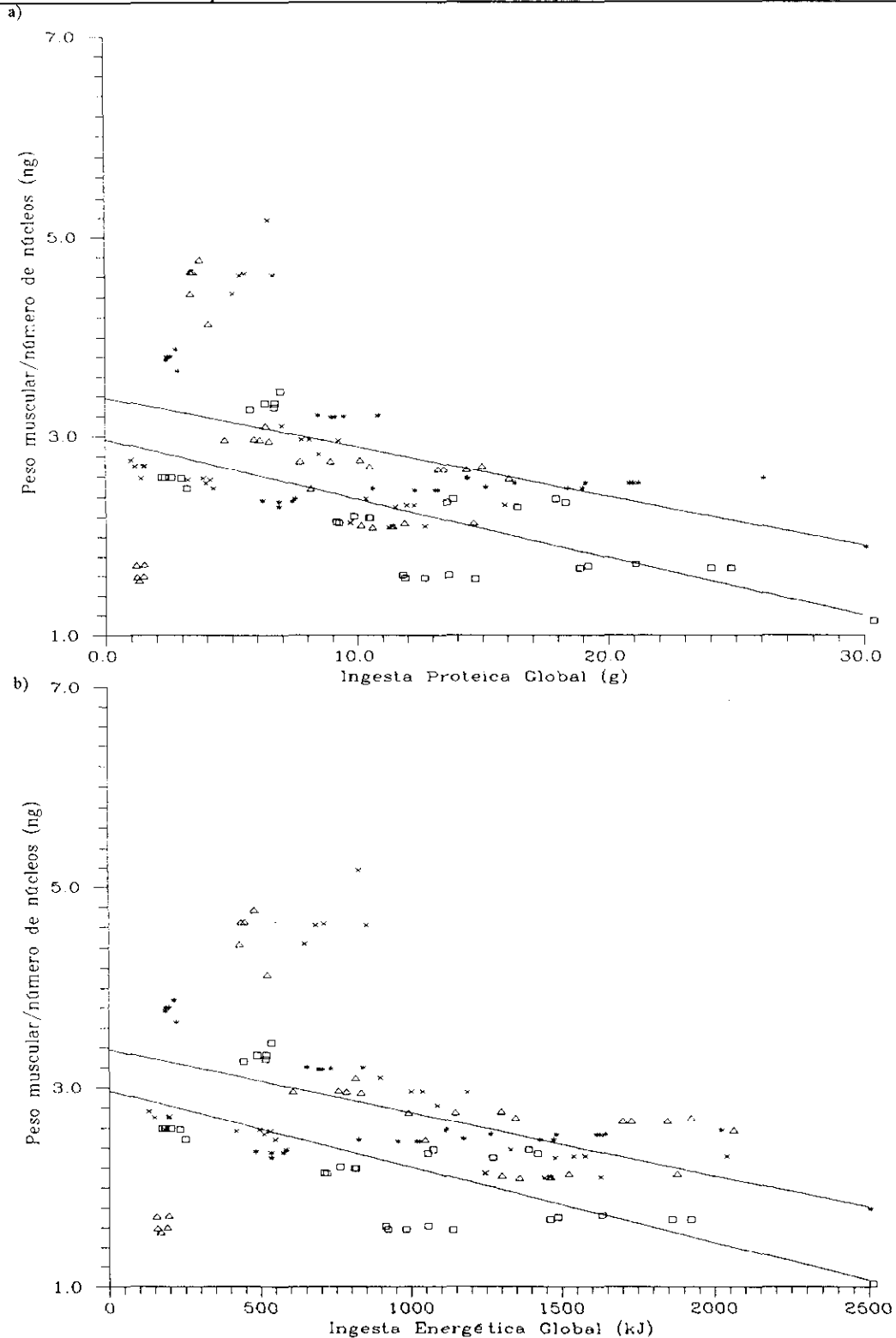
	a	b
x - - - - 12% ♀	NS	$y = 98,5 - x \cdot 0,192 \pm 0,04^{a1}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 188,67 - x \cdot 0,294 \pm 0,064$	$y = 117,8 - x \cdot 0,270 \pm 0,04^{a1}$
* ——— 20% ♀	NS	$y = 112,2 - x \cdot 0,278 \pm 0,03^{a2}$
□ ——— 20% ♂	NS	$y = 70,7 - x \cdot 0,100 \pm 0,01^{b2}$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo.

Gráfica 19. Relación entre la razón **Peso muscular/número de núcleos (Y)** y las **Ingestas Proteica (X) (a)** y **Energética (X) (b)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	a	b
x - - - - 12% ♀	NS	NS
Δ - - - - 12% ♂	NS	NS
* - - - - 20% ♀	$y = 3,37 - x \cdot 0,048 \pm 0,01^a$	$y = 3,37 - x \cdot 0,00063 \pm 0,0001^a$
□ - - - - 20% ♂	$y = 2,96 - x \cdot 0,058 \pm 0,01^a$	$y = 2,96 - x \cdot 0,00076 \pm 0,0001^a$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta.

4.6. DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL NÚMERO Y TAMAÑO CELULAR EN MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATONES BALB/c NO TRATADOS (NT).

- *Relaciones entre DNA muscular e incremento de peso muscular y entre DNA muscular e incremento proteico muscular (Gráficas 13 a y b).*

Las ecuaciones de regresión lineal nos señalan, que la cantidad total de DNA del músculo gastrocnemio es directamente proporcional tanto al incremento de peso como al de la proteína muscular (Gráfica 13a y b).

El grupo ♂ 20% NT presenta el mayor depósito de DNA para un mismo valor de incremento de peso o de proteína muscular respecto a cualquier otro grupo.

Existe una diferencia sexual en la relación DNA/incremento proteico muscular (Gráfica 13b).

- *Relación alométrica entre DNA y peso muscular (Gráfica 14).*

De acuerdo con sus coeficientes alométricos (Gráfica 14), el DNA muscular de los grupos ♀ y ♂ 20% NT crece mucho más rápidamente que el peso del músculo, mientras que el porcentaje de contribución del grupo ♂ 12% NT es mínimo ($b=0,30$) y el del grupo ♀ 12% NT es proporcional al peso muscular ($b=1,07$).

- *Relación entre DNA muscular y las ingestas proteica (IP) y energética (IE) (Gráficas 15a y b).*

El aumento de la tasa de DNA es directamente proporcional al incremento de la IP e IE en todos los grupos estudiados, a excepción de los animales ♂ 12% NT. La mejor utilización de las ingestas la obtienen los animales ♂ 20% NT.

- *Relaciones entre la razón proteína/DNA y los incrementos de proteína muscular y de peso muscular (Gráficas 16a y b).*
- *Relaciones entre las razones proteína/DNA y peso muscular/número de núcleos y las ingestas proteica (IP) y energética (IE) (Gráficas 17 y 19).*

De acuerdo con las rectas de regresión de las relaciones antedichas (Gráficas 16, 17 y 19) se deduce que en los grupos de ratones NT sometidos al 20% de proteína, el tamaño celular del músculo gastrocnemio resulta inversamente proporcional a los incrementos de peso y de proteína muscular, así como al aumento de las ingestas proteica y energética.

No existe correlación alguna en los grupos de animales sometidos al 12% de proteína dietaria.

- *Relación entre la razón proteína/DNA y la velocidad fraccional de crecimiento de la proteína muscular (Gráfica 18a).*

Sólo el tamaño celular del grupo ♂ 12% NT presenta una correlación lineal inversa y significativa con la VFPrM, de tal modo que las mayores VFPrM corresponden a los menores tamaños celulares y viceversa.

- *Relación entre la razón proteína/DNA y DNA muscular (Gráfica 18b).*

Todos los grupos NT presentan una relación inversa entre el tamaño celular y la cantidad de DNA. El menor descenso de proteína/DNA respecto al DNA le obtiene el grupo ♂ 20% NT y el mayor el grupo ♀ 20% NT.

Tabla 31. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el crecimiento celular: DNA absoluto, DNA relativo y número de núcleos del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

DNA ABSOLUTO ($\mu\text{g}/\text{órgano}$)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	110 \pm 2 ^{a+}	197 \pm 2 ^{a+*}	100 \pm 4 ^a	104 \pm 2 ^{a*}
Día 30	74 \pm 2 ^{b+}	101 \pm 4 ^{b+*}	77 \pm 1 ^b	75 \pm 1 ^{b*}
Día 35	95 \pm 1 ^{c*}	91 \pm 2 ^{cd}	74 \pm 1 ^{b+*}	92 \pm 1 ^{c+}
Día 40	84 \pm 1 ^d	87 \pm 2 ^d	92 \pm 2 ^c	97 \pm 2 ^{ac}
Día 45	83 \pm 2 ^d	98 \pm 2 ^b	86 \pm 1 ^d	96 \pm 2 ^{ac}
Día 50	104 \pm 3 ^a	93 \pm 5 ^{bd}	92 \pm 1 ^c	83 \pm 1 ^d

DNA RELATIVO (mg/g)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	1,8 \pm 0,020 ^{a+*}	2,9 \pm 0,009 ^{a+*}	1,6 \pm 0,018 ^{a*}	1,7 \pm 0,007 ^{a*}
Día 30	1,3 \pm 0,015 ^{b+*}	1,7 \pm 0,005 ^{b+*}	1,5 \pm 0,028 ^{b+*}	1,2 \pm 0,010 ^{b+*}
Día 35	1,4 \pm 0,021 ^{c+*}	1,3 \pm 0,025 ^{c+}	1,3 \pm 0,009 ^{c*}	1,3 \pm 0,014 ^c
Día 40	1,3 \pm 0,010 ^d	1,3 \pm 0,010 ^{c*}	1,2 \pm 0,008 ^d	1,2 \pm 0,003 ^{b*}
Día 45	1,2 \pm 0,007 ^{e+*}	1,3 \pm 0,014 ^{c+*}	1,1 \pm 0,011 ^{c*}	1,1 \pm 0,011 ^{d*}
Día 50	1,2 \pm 0,006 ^{f*}	1,2 \pm 0,027 ^{d*}	1,0 \pm 0,012 ^{f+*}	1,1 \pm 0,007 ^{d+*}

NÚMERO DE NÚCLEOS (millones/órgano)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	18,0 \pm 1,16 ^{a+}	31,4 \pm 1,31 ^{a+*}	16,8 \pm 0,97 ^a	16,5 \pm 0,46 ^{a*}
Día 30	12,3 \pm 0,47 ^{b+}	16,4 \pm 0,67 ^{b+*}	12,2 \pm 0,70 ^b	12,3 \pm 0,36 ^{b*}
Día 35	15,1 \pm 0,57 ^{cd*}	13,7 \pm 0,69 ^c	11,9 \pm 0,53 ^{b+*}	14,9 \pm 0,54 ^{ac+}
Día 40	13,3 \pm 0,54 ^{bc}	14,2 \pm 0,53 ^c	15,1 \pm 0,74 ^a	15,8 \pm 0,39 ^a
Día 45	13,4 \pm 0,35 ^c	15,8 \pm 0,26 ^{bc}	13,5 \pm 0,44 ^{bc}	15,7 \pm 0,69 ^a
Día 50	16,7 \pm 0,62 ^{ad}	15,2 \pm 0,47 ^{bc}	14,8 \pm 0,51 ^c	13,4 \pm 0,81 ^c

Cada valor es la media \pm error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 32. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre el tamaño celular: Peso muscular/número de núcleos y proteína/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	PESO MUSCULAR/NÚMERO DE NÚCLEOS (ng)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	4,36 ± 0,04 ^{a+*}	2,15 ± 0,01 ^{a+*}	3,80 ± 0,04 ^{a+*}	3,68 ± 0,03 ^{a+*}
Día 30	4,63 ± 0,05 ^{b+*}	3,58 ± 0,01 ^{b+*}	4,10 ± 0,08 ^{b+*}	5,18 ± 0,11 ^{b+*}
Día 35	4,44 ± 0,07 ^{c+*}	4,73 ± 0,09 ^{c+}	4,92 ± 0,04 ^{c*}	4,78 ± 0,01 ^c
Día 40	4,93 ± 0,04 ^{d+*}	4,72 ± 0,03 ^{c+*}	5,20 ± 0,03 ^{d+*}	5,06 ± 0,06 ^{b+*}
Día 45	5,29 ± 0,03 ^{e+*}	4,76 ± 0,05 ^{c+*}	5,88 ± 0,06 ^{e+*}	5,69 ± 0,06 ^{d+*}
Día 50	5,11 ± 0,02 ^{f*}	5,12 ± 0,11 ^{d*}	6,48 ± 0,08 ^{f+*}	7,35 ± 0,03 ^{d+*}

Edad	PROTEÍNA/DNA MUSCULAR (mg/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	84,6 ± 1,4 ^{a+*}	53,3 ± 0,3 ^{a+*}	76,9 ± 2,0 ^{a*}	77,1 ± 0,8 ^{a*}
Día 30	99,7 ± 0,8 ^{b+*}	103,9 ± 1,1 ^{b+*}	82,9 ± 1,2 ^{b+*}	165,7 ± 2,1 ^{b+*}
Día 35	89,6 ± 2,4 ^{c+*}	95,9 ± 1,8 ^{c+*}	105,4 ± 1,6 ^{c*}	105,9 ± 1,4 ^{c*}
Día 40	102,8 ± 2,2 ^{bd*}	105,0 ± 2,3 ^{b*}	128,7 ± 1,5 ^{d+*}	162,3 ± 2,9 ^{b+*}
Día 45	97,0 ± 1,0 ^{be+*}	87,3 ± 1,5 ^{d+*}	145,9 ± 1,2 ^{e*}	143,0 ± 1,0 ^{d*}
Día 50	77,2 ± 1,8 ^{f+*}	101,6 ± 2,1 ^{b+*}	213,7 ± 3,5 ^{f+*}	188,1 ± 1,8 ^{e+*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 33. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la cantidad absoluta y relativa del enzima desoxirribonucleasa ácida del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	DNasa ÁCIDA ABSOLUTA (UI/órgano)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	1,99 ± 0,03 ^{a+*}	2,70 ± 0,13 ^{a+*}	1,28 ± 0,02 ^{a+*}	1,46 ± 0,01 ^{a+*}
Día 30	2,59 ± 0,13 ^{b*}	2,47 ± 0,08 ^a	1,82 ± 0,13 ^{b+*}	2,22 ± 0,12 ^{b+}
Día 35	2,91 ± 0,04 ^{c+*}	3,64 ± 0,14 ^{b+*}	2,23 ± 0,11 ^{c+*}	2,51 ± 0,04 ^{c+*}
Día 40	3,35 ± 0,15 ^{d*}	3,50 ± 0,12 ^{b*}	1,99 ± 0,03 ^{b*}	2,21 ± 0,07 ^{b*}
Día 45	3,32 ± 0,10 ^{d+*}	3,67 ± 0,09 ^{b+*}	2,61 ± 0,05 ^{c*}	2,69 ± 0,06 ^{c*}
Día 50	3,45 ± 0,08 ^{d*}	3,12 ± 0,08 ^{c*}	2,76 ± 0,07 ^{c+*}	2,20 ± 0,09 ^{b+*}

Edad	DNasa ÁCIDA RELATIVA (UI/g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	31,7 ± 0,3 ^{a+*}	39,8 ± 0,3 ^{a+*}	21,0 ± 0,5 ^{a+*}	23,7 ± 0,9 ^{a+*}
Día 30	42,9 ± 0,2 ^{b*}	42,2 ± 0,2 ^{b*}	36,8 ± 0,0 ^{b*}	35,9 ± 0,8 ^{b*}
Día 35	43,9 ± 0,1 ^{b+*}	53,9 ± 0,1 ^{c+*}	36,2 ± 0,5 ^{b+*}	33,4 ± 0,1 ^{c+*}
Día 40	51,7 ± 0,7 ^{c*}	52,2 ± 0,5 ^{d*}	24,3 ± 0,5 ^{c+*}	27,0 ± 0,8 ^{d+*}
Día 45	46,6 ± 0,2 ^{d+*}	48,9 ± 0,1 ^{e+*}	33,2 ± 0,5 ^{d+*}	30,5 ± 0,1 ^{e+*}
Día 50	40,3 ± 0,4 ^{e*}	41,5 ± 0,2 ^{b*}	28,9 ± 0,5 ^{e*}	28,8 ± 0,1 ^{de*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 34. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la actividad específica del enzima desoxirribonucleasa ácida y sobre la razón DNasa ácida/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	DNasa ÁCIDA/PROTEÍNA MUSCULAR (UI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,21 ± 0,005 ^{a+*}	0,25 ± 0,003 ^{a+*}	0,16 ± 0,006 ^{a+*}	0,18 ± 0,008 ^{a+*}
Día 30	0,32 ± 0,001 ^{b+*}	0,23 ± 0,002 ^{b+*}	0,29 ± 0,004 ^{b+*}	0,18 ± 0,004 ^{a+*}
Día 35	0,35 ± 0,008 ^{c+*}	0,43 ± 0,010 ^{c+*}	0,27 ± 0,006 ^{c+*}	0,24 ± 0,003 ^{b+*}
Día 40	0,40 ± 0,006 ^{d+*}	0,38 ± 0,008 ^{d+*}	0,15 ± 0,002 ^{a+*}	0,13 ± 0,002 ^{c+*}
Día 45	0,41 ± 0,002 ^{d+*}	0,43 ± 0,005 ^{c+*}	0,21 ± 0,006 ^{d+*}	0,19 ± 0,001 ^{d+*}
Día 50	0,43 ± 0,011 ^{e+*}	0,31 ± 0,006 ^{e+*}	0,14 ± 0,001 ^{e*}	0,13 ± 0,001 ^{c*}

Edad	DNasa ÁCIDA/DNA MUSCULAR (UI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	17,9 ± 0,3 ^{a+*}	13,8 ± 0,1 ^{a+}	12,8 ± 0,2 ^{a+*}	14,1 ± 0,5 ^{a+}
Día 30	32,0 ± 0,2 ^{b+*}	24,4 ± 0,1 ^{b+*}	24,3 ± 0,5 ^{b+*}	30,0 ± 0,5 ^{b+*}
Día 35	31,4 ± 0,5 ^{b+*}	41,1 ± 0,7 ^{c+*}	28,7 ± 0,2 ^{c+*}	25,8 ± 0,1 ^{c+*}
Día 40	41,1 ± 0,8 ^{c+*}	39,7 ± 0,5 ^{c+*}	20,4 ± 0,5 ^{d+*}	22,3 ± 0,5 ^{d+*}
Día 45	39,8 ± 0,3 ^{d+*}	37,5 ± 0,4 ^{d+*}	31,5 ± 0,3 ^{e+*}	28,0 ± 0,3 ^{e+*}
Día 50	33,2 ± 0,2 ^{b*}	31,8 ± 0,8 ^{e*}	30,2 ± 0,4 ^{f+*}	26,2 ± 0,3 ^{c+*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 35. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), la Dieta (D) y el Sexo (S) sobre el estudio del crecimiento celular² del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	DNA/órgano	DNA/g	NN	Peso/NN	Proteína/DNA	DNasa/órgano	DNasa/g	DNasa/Proteína	DNasa/DNA
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
SEXO	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DxS	0,0001	0,0001	0,0030	0,0001	0,0324	NS	0,0001	NS	0,0041
ExDxS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad ($p < 0,05$). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: DNA absoluto (DNA/órgano) y relativo (DNA/g), número de núcleos (NN), peso muscular/número de núcleos (peso/NN), Proteína/DNA, DNasa ácida absoluta (DNasa/órgano) y relativa (DNasa/g) y actividad específica DNasa ácida/proteína (DNasa/Proteína) y la razón DNasa ácida/DNA (DNasa/DNA).

Tabla 36. Relación con la Edad de las variables: DNA absoluto y relativo, número de núcleos, peso muscular/número de núcleos y proteína/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
DNA/órgano	♀	$y=0,093 - x \cdot 0,000$	0,0002 ^{a1}	-0,051	NS	$y=0,086 + x \cdot 0,0000$	0,0000 ^{a1}	0,010	NS
	♂	$y=0,164 - x \cdot 0,003$	0,0006 ^{b1}	-0,665	0,0001	$y=0,094 - x \cdot 0,0002$	0,0002 ^{a2}	-0,168	NS
DNA/g	♀	$y=1,705 - x \cdot 0,0197$	0,0025 ^{a1}	-0,831	0,0000	$y=1,751 - x \cdot 0,0276$	0,0011 ^{a2}	-0,977	0,0000
	♂	$y=2,591 - x \cdot 0,0551$	0,0077 ^{b1}	-0,800	0,0000	$y=1,597 - x \cdot 0,0189$	0,0026 ^{b2}	-0,801	0,0000
Número de núcleos	♀	$y=15,002 - x \cdot 0,012$	0,046 ^{a1}	-0,051	NS	$y=13,987 + x \cdot 0,018$	0,034 ^{a1}	0,010	NS
	♂	$y=26,526 - x \cdot 0,489$	0,103 ^{b1}	-0,665	0,0001	$y=15,260 - x \cdot 0,032$	0,032 ^{a2}	-0,168	NS
Peso músculo/ nº nucleos	♀	$y=3,590 + x \cdot 0,060$	0,006 ^{a1}	0,864	0,0000	$y=3,157 + x \cdot 0,108$	0,003 ^{a2}	0,985	0,0000
	♂	$y=2,336 + x \cdot 0,105$	0,011 ^{b1}	0,894	0,0000	$y=3,306 + x \cdot 0,115$	0,015 ^{a2}	0,815	0,0000
Proteína/DNA	♀	$y=94,95 - x \cdot 0,179$	0,209 ^{a1}	-0,160	NS	$y=35,92 + x \cdot 5,1231$	0,338 ^{a2}	0,944	0,0000
	♂	$y=71,07 + x \cdot 1,149$	0,340 ^{b1}	0,537	0,0022	$y=86,06 + x \cdot 3,1035$	0,603 ^{b2}	0,696	0,0000

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

Tabla 37. Relación con la Edad de las variables: cantidad absoluta y relativa del enzima DNasa ácida, actividad específica DNasa ácida/proteína y la razón DNasa ácida/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, Tratados con rhGH (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
DNasa ácida /órgano	♀	$y=1,945 + x \cdot 0,056$	0,006 ^{a1}	0,869	0,0000	$y=1,164 + x \cdot 0,054$	0,005 ^{a1}	0,889	0,0000
	♂	$y=2,619 + x \cdot 0,023$	0,001 ^{b1}	0,529	0,0026	$y=1,733 + x \cdot 0,027$	0,007 ^{b1}	0,566	0,0011
DNasa ácida/g	♀	$y=36,68 + x \cdot 0,352$	0,118 ^{a1}	0,489	0,0061	$y=28,34 + x \cdot 0,096$	0,130 ^{a1}	0,138	NS
	♂	$y=43,72 + x \cdot 0,153$	0,132 ^{b1}	0,238	NS	$y=29,61 + x \cdot 0,015$	0,092 ^{b1}	0,031	NS
DNasa ácida/ proteína	♀	$y=0,213 + x \cdot 0,008$	0,000 ^{a1}	0,921	0,0000	$y=0,255 - x \cdot 0,0027$	0,001 ^{a2}	-0,397	NS
	♂	$y=0,252 + x \cdot 0,005$	0,001 ^{a1}	0,585	0,0007	$y=0,207 - x \cdot 0,0016$	0,001 ^{a2}	-0,366	NS
DNasa ácida/ DNA	♀	$y=21,60 + x \cdot 0,626$	0,119 ^{a1}	0,705	0,0000	$y=14,64 + x \cdot 0,570$	0,095 ^{a1}	0,748	0,0000
	♂	$y=17,85 + x \cdot 0,790$	0,156 ^{a1}	0,689	0,0001	$y=19,30 + x \cdot 0,291$	0,101 ^{b2}	0,475	0,0008

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

4.7. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS, ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA, TRATADOS CON rhGH (T) Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 Y 20%) (Tablas 31-37).

La EDAD afecta muy significativamente a todos los parámetros relacionados con el crecimiento celular del músculo gastrocnemio en ratones tratados, según el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 35).

La cantidad absoluta de DNA y el NN del músculo gastrocnemio (Tabla 31) disminuyen a lo largo del período experimental en todos los grupos de animales tratados, presentando un fuerte descenso a día 30 y una ligera recuperación posterior, que no llega al valor inicial. Ello determina correlaciones temporales no significativas, a excepción del grupo ♂ 12% T, en el que la disminución es más aguda (Tabla 36).

El valor DNA/g, por su parte, desciende significativamente con carácter edad-dependiente en todos los grupos estudiados (Tablas 31 y 36).

Las razones proteína/DNA y peso muscular/NN se incrementan de forma edad-dependiente en todos los animales T, a excepción del grupo ♀ 12% T, cuya razón proteína/DNA desciende a día 50 de vida respecto a su valor inicial, aún cuando se observa una tendencia ascendente previa, entre los 25 y 45 días de vida (Tablas 32 y 36).

Los mayores aumentos temporales en proteína/DNA los presentan los grupos 20% T (♀ = 178% y ♂ = 144%), mientras que el grupo ♂ 12% T obtiene el mayor porcentaje de aumento de la razón peso muscular/NN (138%) (Tabla 32).

Por otra parte, los valores absoluto y relativo del enzima DNasa ácida y la razón DNasa ácida/DNA se incrementan paulatinamente entre los 25 y 50 días de vida, correspondiendo los mayores porcentajes de aumento a los grupos 20% T, aunque la razón DNasa ácida/DNA presenta incrementos similares para los dos grupos dietarios estudiados (Tablas 33 y 34).

La actividad específica del enzima DNasa ácida varía en razón inversa al contenido proteico de la dieta, aumentando en los grupos sometidos al 12% de proteína dietaria y descendiendo en los animales del 20% (Tabla 34).

Todos los parámetros relacionados con el enzima presentan correlaciones lineales temporales significativas en los grupos 12% T, a excepción del valor DNasa ácida/g del grupo ♂ 12% T que resulta independiente de la edad. Por su parte, los grupos ♀ y ♂ 20% T sólo presentan correlaciones temporales significativas en la cantidad absoluta del enzima y en la razón DNasa ácida/DNA (Tabla 37).

El crecimiento celular de los animales tratados también se encuentra afectado por la DIETA, según el ANOVA de tres factores (Tabla 35).

Básicamente la dieta del 20% induce una disminución, en ambos sexos, del valor DNA/g respecto a los animales 12% T, aunque la cantidad absoluta de DNA y el NN descienden de forma más puntual entre los días 25 y 30 de vida, según el test LSD (Tabla 31).

Mientras las razones peso muscular/NN y proteína/DNA se incrementan, los parámetros relacionados con el enzima DNasa ácida sufren un descenso significativo en los ratones 20% T respecto a los grupos del 12% T (Tablas 32, 33 y 34).

El SEXO afecta de forma significativa a todos los parámetros antedichos a excepción de la razón proteína/DNA según el ANOVA de tres factores (Tabla 35), aunque esta influencia es muy variable y puntual en cada uno de los grupos estudiados, por lo que no se puede establecer una pauta clara del efecto sexual.

Del estudio de las rectas de regresión lineal (Tablas 36 y 37) se deduce que los animales T sometidos al 20% de proteína dietaria experimentan una mayor rapidez en el crecimiento del tamaño celular. Así mismo, los animales ♂ 20% T pierden DNA menos rápidamente que el grupo ♂ 12% T, mientras que en los animales ♀ 20% T la disminución del valor DNA/g es más rápida que en las ♀ 12% T (Tabla 36).

Además, el grupo ♂ 12% T presenta un crecimiento más veloz del tamaño celular y un decrecimiento más rápido de DNA respecto al grupo ♀ 12% T, mientras que el crecimiento del tamaño celular es más rápido en el grupo ♀ 20% T, pero pierden más rápidamente DNA/g respecto al grupo ♂ 20% T (Tabla 36).

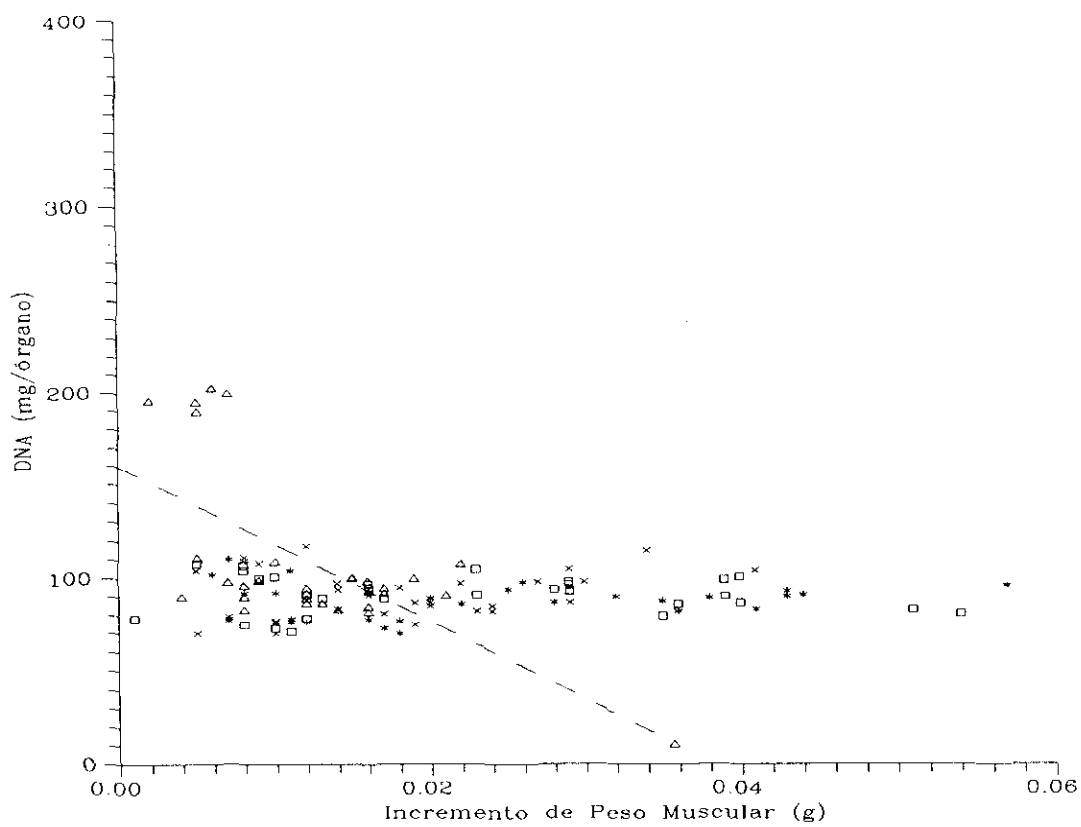
La evolución temporal más rápida de la actividad específica DNasa ácida la presentan los grupos 12% T, y sólo el grupo ♂ 12% T tiene mayor velocidad de la razón DNasa ácida/DNA respecto al grupo ♂ 20% T (Tabla 37).

Por otra parte, los animales ♀ de ambas dietas obtienen las mayores velocidades temporales respecto a los de animales ♂ en los valores DNasa ácida/órgano, DNasa ácida/g y DNasa ácida/DNA (Tabla 37).

Estos resultados demuestran las interacciones existentes entre los tres factores estudiados ExS, ExD, DxS y ExDxS, como se manifiesta en el análisis de la varianza de tres factores (Tabla 35).

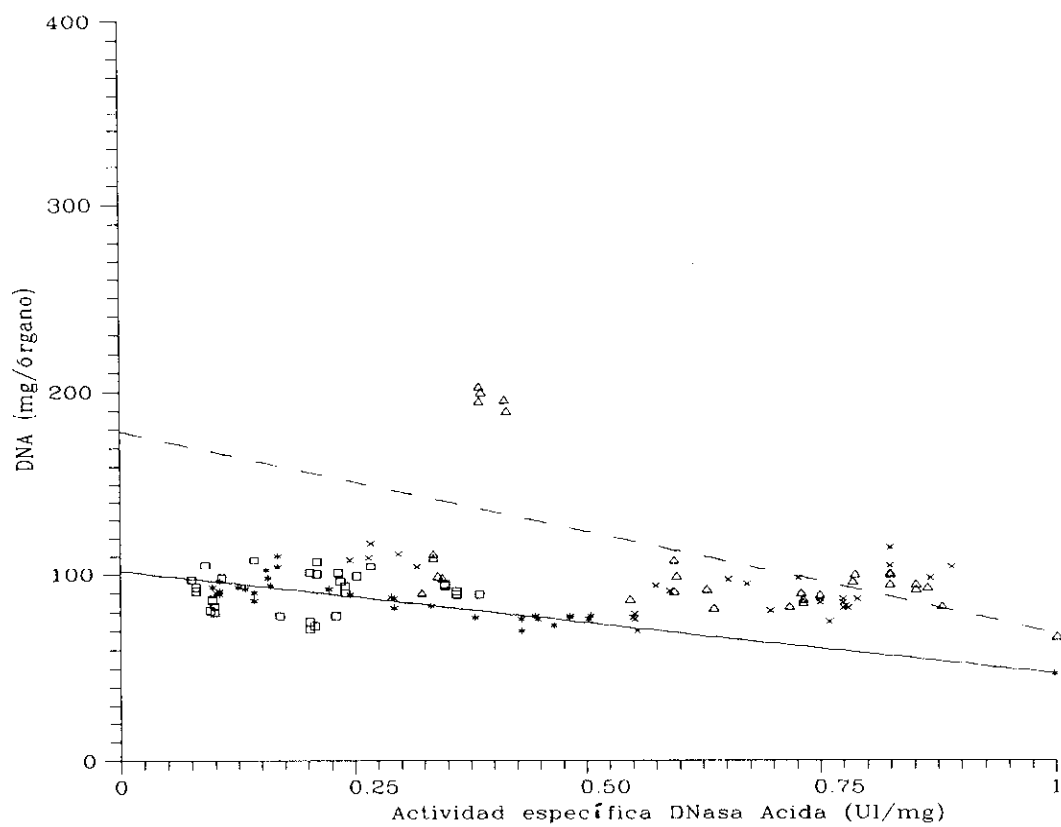
Gráfica 20. Relación entre **DNA muscular (Y)** y el **Incremento de Peso muscular (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

x - - - - 12% ♀	NS
Δ - - - - 12% ♂	$y = 159,22 - x \cdot 4,12 \pm 0,10$
* - - - - 20% ♀	NS
□ - - - - 20% ♂	NS



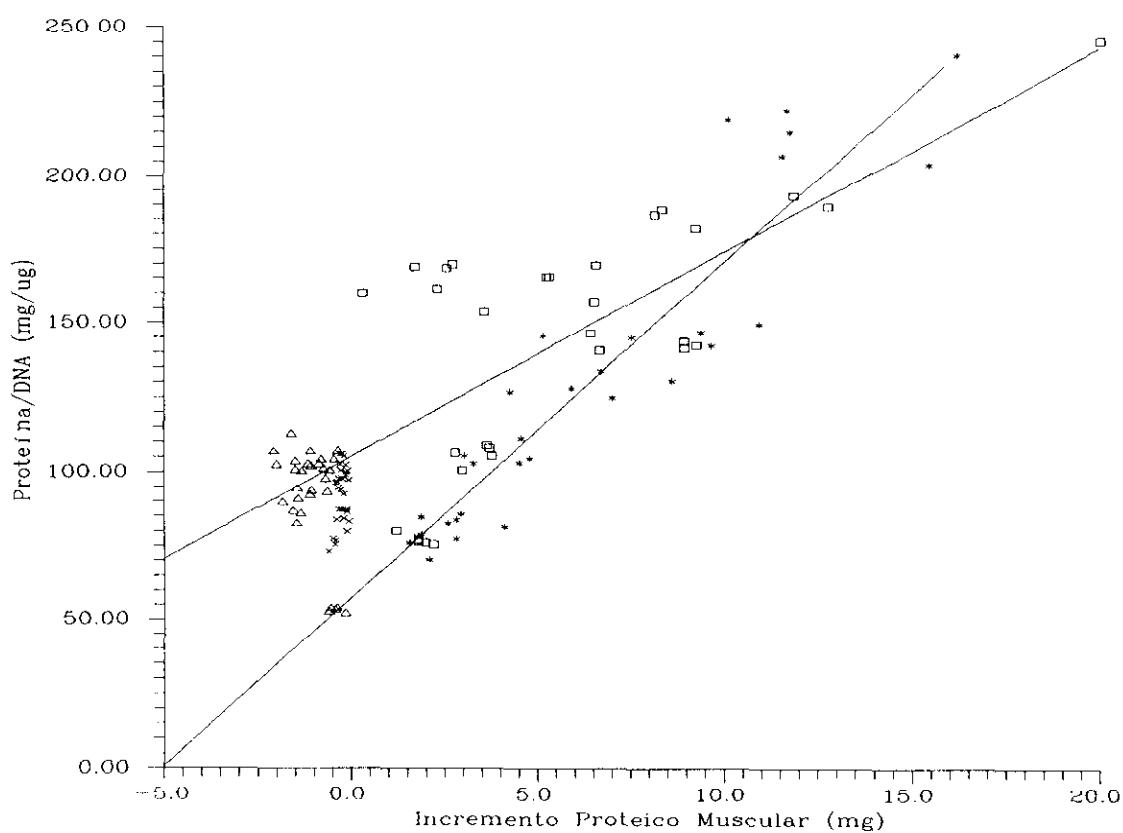
Gráfica 21. Relación entre **DNA muscular (Y)** y la **Actividad específica DNasa ácida (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

x - - - - 12% ♀	NS
Δ - - - - 12% ♂	$y = 46,82 - x \cdot 1,10 \pm 0,31$
* - - - - 20% ♀	$y = 64,20 - x \cdot 4,99 \pm 0,65$
□ - - - - 20% ♂	NS



Gráfica 22. Relación entre la razón **Proteína/DNA muscular (Y)** y el **Incremento Proteico muscular (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados* con rhGH (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

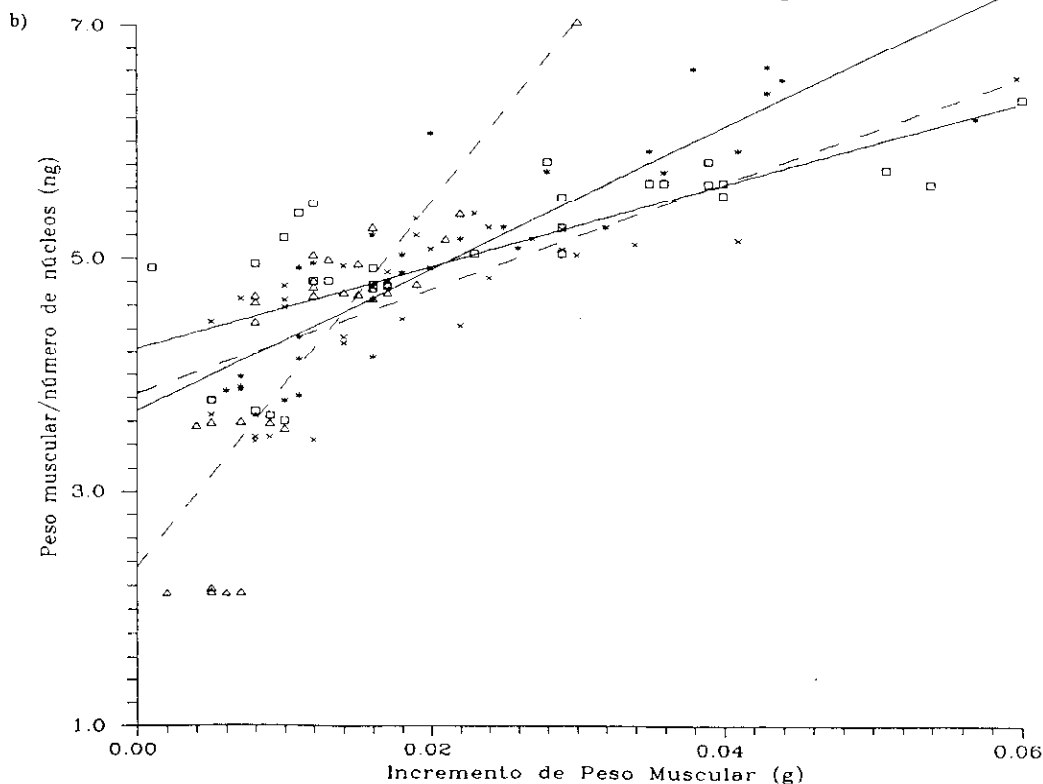
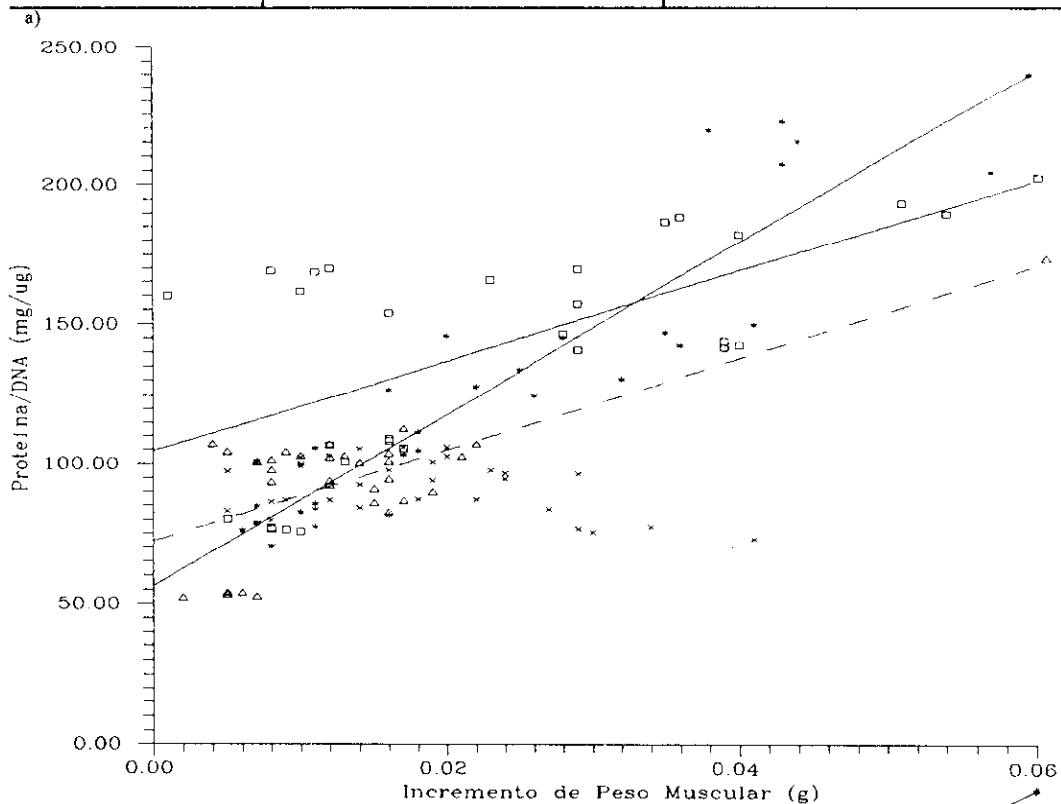
x - - - - 12% ♀	NS
Δ - - - - 12% ♂	NS
* ——— 20% ♀	$y = 57,41 + x \cdot 11,3 \pm 0,9^a$
□ ——— 20% ♂	$y = 105,09 + x \cdot 6,9 \pm 1,7^b$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta.

Gráfica 23. a) Relación entre la razón **Proteína/DNA (Y)** y el **Incremento de peso muscular (X)**. b) Relación entre la razón **Peso muscular/número de núcleos (Y)** y el **Incremento de peso muscular (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

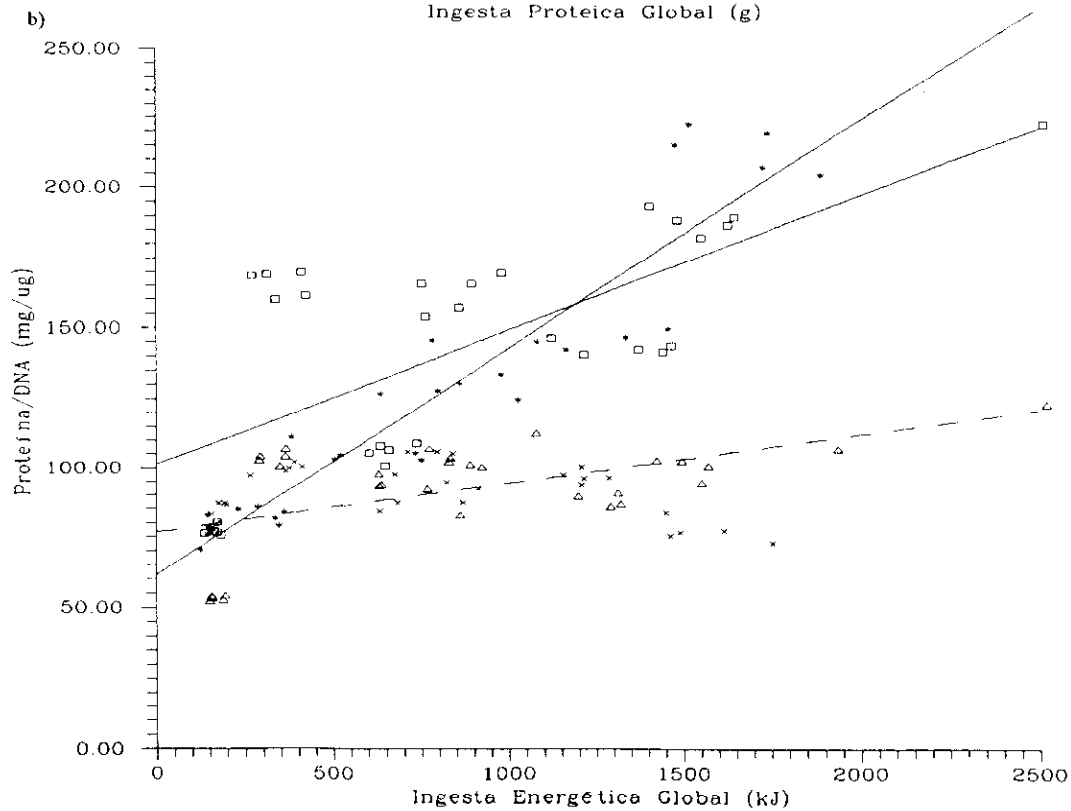
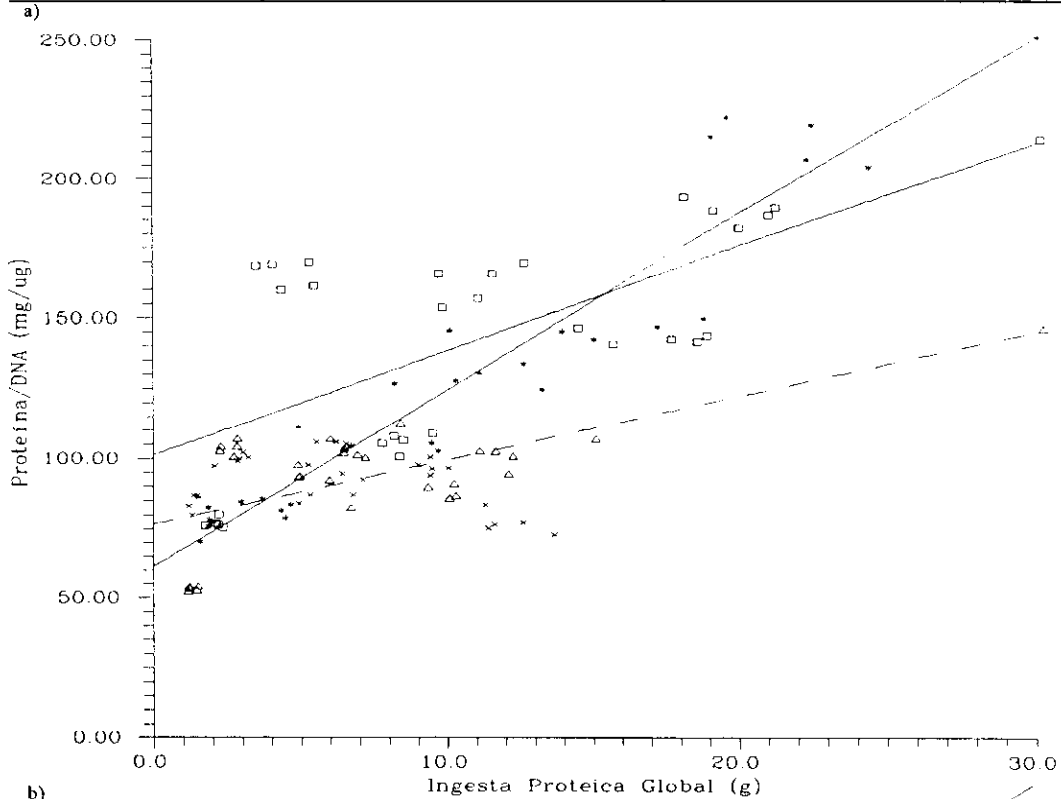
	a	b
x - - - - 12% ♀	NS	$y = 3,5 + x \cdot 45,17 \pm 11,36^{a1}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 72,26 + x \cdot 1,62 \pm 0,5^l$	$y = 2,2 + x \cdot 157,93 \pm 23,26^{b1}$
* ——— 20% ♀	$y = 56,05 + x \cdot 3,08 \pm 0,2^a$	$y = 3,7 + x \cdot 63,38 \pm 6,70^{a1}$
□ ——— 20% ♂	$y = 104,12 + x \cdot 1,62 \pm 0,4^{a1}$	$y = 4,2 + x \cdot 34,99 \pm 8,04^{b2}$



superíndices (diferencias entre pendientes); letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo.

Gráfica 24. Relación entre la razón Proteína/DNA (Y) y las Ingestas Proteica (X) (a) y Energética (X) (b) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGII* (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

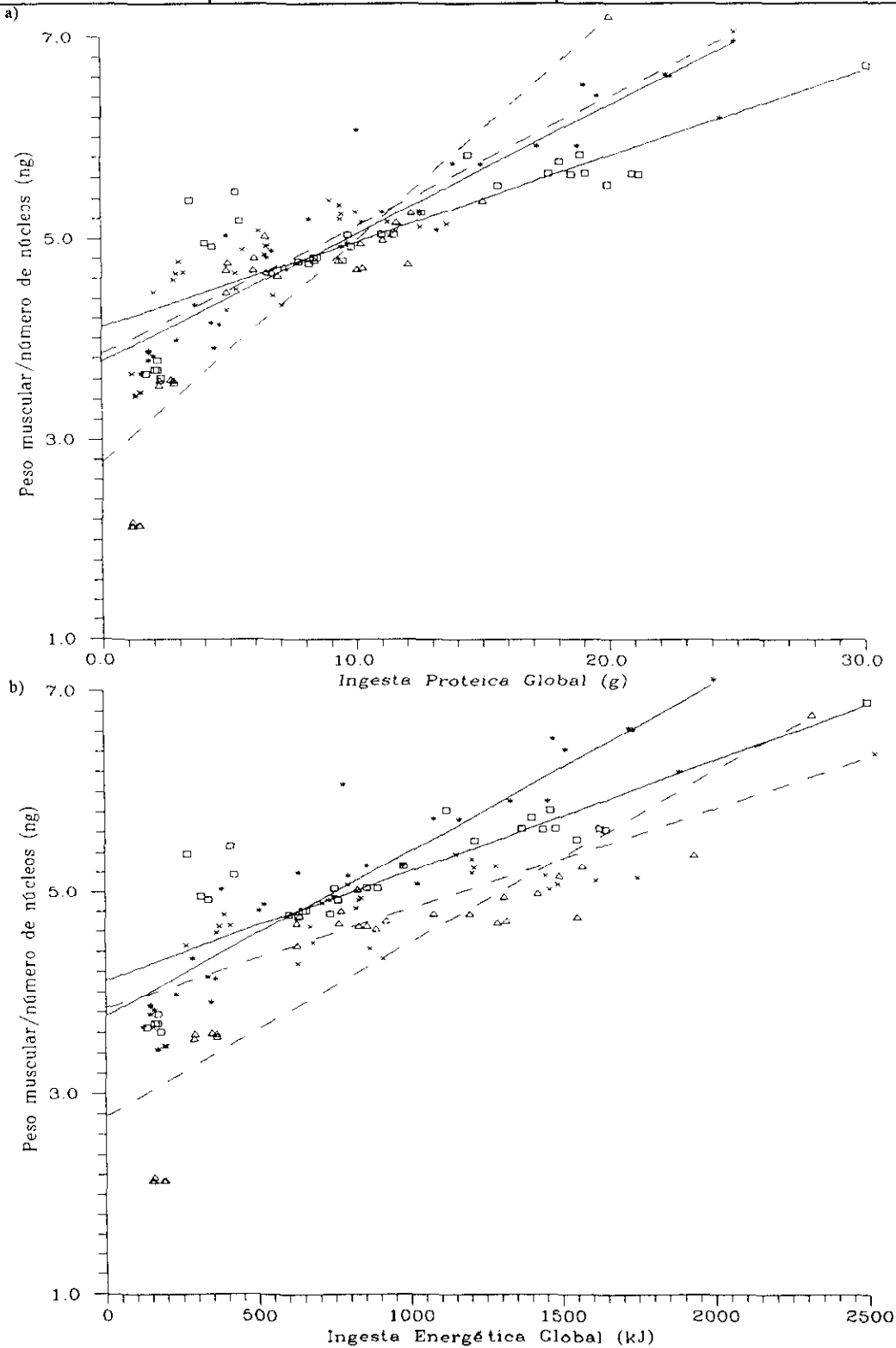
	a	b
x - - - - 12% ♀	NS	NS
Δ - - - - 12% ♂	$y = 76,7 + x \cdot 2,27 \pm 0,77^1$	$y = 76,7 + x \cdot 0,02 \pm 0,01^1$
* ——— 20% ♀	$y = 61,4 + x \cdot 6,30 \pm 0,41^a$	$y = 61,4 + x \cdot 0,08 \pm 0,01^a$
□ ——— 20% ♂	$y = 101,2 + x \cdot 3,72 \pm 0,86^{b1}$	$y = 101,2 + x \cdot 0,04 \pm 0,01^{b1}$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo.

Gráfica 25. Relación entre la razón **Peso muscular/ número de núcleos (Y)** y las **Ingestas Proteica (X)** (a) y **Energética (X)** (b) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	a	b
x - - - - 12% ♀	$y = 3,83 + x \cdot 0,12 \pm 0,02^{a1}$	$y = 3,83 + x \cdot 0,0009 \pm 0,0002^{a1}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 2,77 + x \cdot 0,21 \pm 0,02^{b1}$	$y = 2,77 + x \cdot 0,0017 \pm 0,0002^{b1}$
* ——— 20% ♀	$y = 3,76 + x \cdot 0,13 \pm 0,01^{a1}$	$y = 3,76 + x \cdot 0,0017 \pm 0,0001^{a2}$
□ ——— 20% ♂	$y = 3,70 + x \cdot 0,15 \pm 0,02^{a2}$	$y = 3,70 + x \cdot 0,0019 \pm 0,0002^{a1}$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo.

4.8. DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL NÚMERO Y TAMAÑO CELULAR EN MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATONES BALB/c, TRATADOS CON rhGH (T).

- *Relación entre DNA muscular y el incremento de peso muscular (Gráfica 20).*

El DNA muscular del grupo ♂ 12% T resulta inversamente proporcional al incremento de peso muscular. El resto de los grupos no presentan correlación lineal significativa.

- *Relación entre DNA muscular y la actividad específica de DNasa ácida (Gráfica 21).*

De acuerdo con las correspondientes ecuaciones de regresión lineal, el DNA muscular de los grupos ♂ 12% T y ♀ 20% T disminuye a medida que aumenta la actividad específica del enzima DNasa ácida, resultando no significativos el resto de los grupos.

- *Relación entre la razón proteína/DNA y el incremento de proteína muscular (Gráfica 22).*

Sólo en los animales del 20% tratados, el tamaño celular presenta correlaciones lineales significativas con el incremento proteico muscular, en especial los animales hembra.

- *Relaciones entre las razones proteína/DNA y peso muscular/número de núcleos y el incremento de peso muscular (Gráfica 23a y b).*

Todos los grupos estudiados presentan un incremento de las razones proteína/DNA y peso muscular/número de núcleos que es directamente proporcional al aumento de peso muscular excepto el grupo ♀ 12% T, cuya razón proteína/DNA no presenta correlación lineal alguna.

- *Relaciones entre las razones proteína/DNA y peso muscular/número de núcleos y las ingestas proteica (IP) y energetica (IE) (Gráficas 24 y 25a y b).*

A excepción del grupo ♀ 12% T cuya razón proteína/DNA no presenta correlación lineal significativa, el tamaño celular dependiente de la proteína y del peso del resto de los animales T es directamente proporcional al incremento de las ingestas.

Los animales 20% T utilizan mejor las ingestas IP e IE para proteína/DNA y también la IE para peso muscular/NN, mientras que la IP es mejor utilizada por los animales ♂ 12% T en la razón peso muscular/NN.

Este resultado contrasta con la relación lineal negativa encontrada en los animales NT entre el tamaño celular y las ingestas proteica y energética (compárese gráficas 17 y 24, 19 y 25).

Tabla 38. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre el crecimiento celular muscular: DNA absoluto, DNA relativo y número de núcleos del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	DNA ABSOLUTO ($\mu\text{g}/\text{órgano}$)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	103 \pm 2	246 \pm 6*	110 \pm 2	197 \pm 2*	95 \pm 4	141 \pm 10*	100 \pm 4	104 \pm 2*
Día 30	223 \pm 2*	104 \pm 4	74 \pm 2*	101 \pm 4	220 \pm 9*	133 \pm 8*	77 \pm 1*	75 \pm 1*
Día 35	99 \pm 4	172 \pm 3*	95 \pm 1	91 \pm 2*	148 \pm 6*	220 \pm 5*	74 \pm 1*	92 \pm 1*
Día 40	168 \pm 5*	181 \pm 9*	84 \pm 1*	87 \pm 2*	217 \pm 4*	332 \pm 6*	92 \pm 2*	97 \pm 1*
Día 45	220 \pm 2*	235 \pm 7*	83 \pm 2*	98 \pm 2*	233 \pm 6*	268 \pm 11*	86 \pm 1*	96 \pm 2*
Día 50	237 \pm 7*	232 \pm 5*	104 \pm 3*	93 \pm 5*	237 \pm 8*	341 \pm 11*	92 \pm 1*	83 \pm 1*

Edad	DNA RELATIVO (mg/g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	2,3 \pm 0,02*	3,8 \pm 0,10*	1,8 \pm 0,02*	2,9 \pm 0,01*	1,6 \pm 0,01	2,4 \pm 0,02*	1,6 \pm 0,01	1,7 \pm 0,01*
Día 30	2,4 \pm 0,01*	1,4 \pm 0,03*	1,3 \pm 0,01*	1,7 \pm 0,01*	2,6 \pm 0,01*	1,9 \pm 0,01*	1,5 \pm 0,02*	1,2 \pm 0,02*
Día 35	1,3 \pm 0,03*	2,1 \pm 0,01*	1,4 \pm 0,02*	1,3 \pm 0,02*	1,9 \pm 0,00*	2,9 \pm 0,02*	1,3 \pm 0,00*	1,3 \pm 0,00*
Día 40	2,1 \pm 0,03*	2,3 \pm 0,04*	1,3 \pm 0,01*	1,3 \pm 0,01*	2,5 \pm 0,02*	3,9 \pm 0,01*	1,2 \pm 0,00*	1,2 \pm 0,01*
Día 45	2,9 \pm 0,01*	2,9 \pm 0,01*	1,2 \pm 0,01*	1,3 \pm 0,01*	2,5 \pm 0,01*	2,6 \pm 0,01*	1,1 \pm 0,01*	1,1 \pm 0,01*
Día 50	2,7 \pm 0,01*	2,3 \pm 0,02*	1,2 \pm 0,01*	1,2 \pm 0,02*	2,5 \pm 0,01*	3,7 \pm 0,01*	1,0 \pm 0,01*	1,1 \pm 0,00*

Edad	NÚMERO DE NÚCLEOS (millones/órgano)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	16,6 \pm 0,32	39,7 \pm 0,63*	18,0 \pm 1,16	31,4 \pm 1,31*	15,3 \pm 0,76	22,4 \pm 0,72*	16,8 \pm 0,97	16,5 \pm 0,46*
Día 30	34,3 \pm 0,93*	16,7 \pm 0,64	12,3 \pm 0,47*	16,4 \pm 0,67	35,5 \pm 1,12*	21,4 \pm 0,81*	12,2 \pm 0,70*	12,3 \pm 0,36*
Día 35	15,8 \pm 0,73	27,1 \pm 0,94*	15,1 \pm 0,57	13,7 \pm 0,69*	24,1 \pm 0,66*	35,6 \pm 1,19*	11,9 \pm 0,53*	14,9 \pm 0,54*
Día 40	27,1 \pm 1,07*	29,2 \pm 1,24*	13,3 \pm 0,54*	14,2 \pm 0,53*	34,8 \pm 1,33*	52,8 \pm 2,45*	15,1 \pm 0,74*	15,8 \pm 0,39*
Día 45	35,5 \pm 1,17*	37,9 \pm 1,11*	13,4 \pm 0,35*	15,8 \pm 0,26*	36,9 \pm 1,16*	43,2 \pm 1,73*	13,5 \pm 0,44*	15,7 \pm 0,69*
Día 50	38,3 \pm 1,45*	37,3 \pm 1,11*	16,7 \pm 0,62*	15,2 \pm 0,47*	37,9 \pm 0,99*	55,0 \pm 2,48*	14,8 \pm 0,51*	13,4 \pm 0,81*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0,05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 39. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre el Tamaño celular: Peso muscular/número de núcleos y Proteína/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	PESO MUSCULAR/NÚMERO DE NÚCLEOS (ng)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	2,69 ± 0,03*	1,63 ± 0,03*	4,36 ± 0,04*	2,15 ± 0,01*	3,78 ± 0,04	2,57 ± 0,02*	3,80 ± 0,04	3,68 ± 0,03*
Día 30	2,54 ± 0,02*	4,53 ± 0,11*	4,63 ± 0,05*	3,58 ± 0,01*	2,35 ± 0,01*	3,32 ± 0,03*	4,10 ± 0,08*	5,18 ± 0,11*
Día 35	4,69 ± 0,13*	2,99 ± 0,03*	4,44 ± 0,07*	4,73 ± 0,09*	3,19 ± 0,00*	2,18 ± 0,01*	4,92 ± 0,04*	4,78 ± 0,01*
Día 40	2,96 ± 0,04*	2,69 ± 0,05*	4,93 ± 0,04*	4,72 ± 0,03*	2,49 ± 0,02*	1,59 ± 0,01*	5,20 ± 0,03*	5,06 ± 0,06*
Día 45	2,12 ± 0,01*	2,12 ± 0,01*	5,29 ± 0,03*	4,76 ± 0,05*	2,52 ± 0,02*	2,35 ± 0,02*	5,88 ± 0,06*	5,69 ± 0,06*
Día 50	2,33 ± 0,02*	2,66 ± 0,02*	5,11 ± 0,02*	5,12 ± 0,11*	2,53 ± 0,02*	1,69 ± 0,01*	6,48 ± 0,08*	7,35 ± 0,03*

Edad	PROTEÍNA/DNA (mg/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	58,8 ± 1,5*	36,4 ± 0,8*	84,6 ± 1,4*	53,3 ± 0,3*	97,1 ± 1,2*	56,2 ± 1,0*	76,9 ± 2,0*	77,1 ± 0,1*
Día 30	46,0 ± 0,6*	92,3 ± 3,0*	99,7 ± 0,8*	103,9 ± 1,1*	40,2 ± 0,4*	61,5 ± 0,9*	82,9 ± 1,2*	165,7 ± 2,1*
Día 35	100,6 ± 2,7*	61,1 ± 1,1*	89,6 ± 2,4*	95,9 ± 1,8*	57,7 ± 0,9*	41,0 ± 0,4*	105,4 ± 1,6*	105,9 ± 1,4*
Día 40	64,1 ± 1,0*	68,1 ± 0,9*	102,8 ± 2,2*	105,0 ± 2,3*	54,3 ± 0,7*	34,1 ± 0,5*	128,7 ± 1,5*	162,3 ± 2,9*
Día 45	53,6 ± 1,1*	52,5 ± 0,8*	97,0 ± 1,0*	87,3 ± 1,5*	52,3 ± 1,2*	48,7 ± 0,8*	145,9 ± 1,2*	143,0 ± 1,0*
Día 50	63,8 ± 0,7*	73,6 ± 0,8*	77,2 ± 1,8*	101,6 ± 2,1*	52,6 ± 0,9*	39,0 ± 0,8*	213,7 ± 3,5*	188,1 ± 1,8*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0,05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 40. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre la cantidad absoluta y relativa del enzima desoxirribonucleasa ácida del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	DNasa ÁCIDA ABSOLUTA (UI/órgano)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	1,87 ± 0,06	3,28 ± 0,13*	1,99 ± 0,03	2,70 ± 0,13*	2,85 ± 0,13*	2,65 ± 0,14*	1,28 ± 0,02*	1,46 ± 0,01*
Día 30	4,69 ± 0,03*	3,49 ± 0,07*	2,59 ± 0,13*	2,47 ± 0,08*	3,50 ± 0,13*	2,89 ± 0,07*	1,82 ± 0,13*	2,22 ± 0,12*
Día 35	3,08 ± 0,05	3,20 ± 0,07*	2,91 ± 0,04	3,64 ± 0,14*	3,76 ± 0,05*	4,14 ± 0,04*	2,23 ± 0,11*	2,51 ± 0,04*
Día 40	2,85 ± 0,07*	2,85 ± 0,07*	3,35 ± 0,15*	3,50 ± 0,12*	4,23 ± 0,14*	5,23 ± 0,13*	1,99 ± 0,03*	2,21 ± 0,07*
Día 45	3,05 ± 0,06	3,57 ± 0,10	3,32 ± 0,10	3,67 ± 0,09	5,43 ± 0,10*	4,72 ± 0,11*	2,61 ± 0,05*	2,69 ± 0,06*
Día 50	3,56 ± 0,15	4,75 ± 0,09*	3,45 ± 0,08	3,12 ± 0,08*	4,77 ± 0,08*	4,94 ± 0,08*	2,76 ± 0,07*	2,20 ± 0,09*

Edad	DNasa ÁCIDA RELATIVA (UI/g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	41,9 ± 0,5*	50,5 ± 0,1*	31,7 ± 0,3*	39,8 ± 0,3*	49,3 ± 0,2*	45,1 ± 0,3*	21,0 ± 0,5*	23,7 ± 0,9*
Día 30	51,5 ± 0,5*	46,3 ± 0,4*	42,9 ± 0,2*	42,2 ± 0,2*	42,0 ± 0,8*	40,5 ± 0,4*	36,8 ± 0,0*	35,9 ± 0,8*
Día 35	41,4 ± 0,1*	39,6 ± 0,3*	43,9 ± 0,1*	53,9 ± 0,1*	52,1 ± 0,5*	53,5 ± 0,2*	36,2 ± 0,5*	33,4 ± 0,1*
Día 40	35,7 ± 0,3*	36,3 ± 0,3*	51,7 ± 0,7*	52,2 ± 0,5*	49,0 ± 0,6*	55,6 ± 0,3*	24,3 ± 0,5*	27,0 ± 0,8*
Día 45	40,5 ± 0,5*	44,2 ± 0,2*	46,6 ± 0,2*	48,9 ± 0,1*	58,3 ± 0,5*	46,6 ± 0,3*	33,2 ± 0,5*	30,5 ± 0,1*
Día 50	40,0 ± 0,6	48,2 ± 0,1*	40,3 ± 0,4	41,5 ± 0,2*	49,8 ± 0,6*	53,3 ± 0,8*	28,9 ± 0,5*	28,8 ± 0,1*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0,05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 41. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre la actividad específica del enzima desoxirribonucleasa ácida y sobre la razón DNasa ácida/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	DNasa ÁCIDA/PROTEÍNA (UI/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,309 ± 0,009*	0,365 ± 0,008*	0,212 ± 0,005*	0,259 ± 0,003*	0,309 ± 0,002*	0,333 ± 0,004*	0,168 ± 0,006*	0,183 ± 0,008*
Día 30	0,459 ± 0,015*	0,367 ± 0,014*	0,321 ± 0,001*	0,235 ± 0,002*	0,396 ± 0,009*	0,352 ± 0,003*	0,293 ± 0,004*	0,181 ± 0,001*
Día 35	0,311 ± 0,011*	0,307 ± 0,014*	0,351 ± 0,008*	0,430 ± 0,010*	0,465 ± 0,008*	0,457 ± 0,005*	0,272 ± 0,006*	0,244 ± 0,003*
Día 40	0,266 ± 0,005*	0,233 ± 0,008*	0,400 ± 0,006*	0,383 ± 0,008*	0,362 ± 0,003*	0,419 ± 0,010*	0,158 ± 0,002*	0,135 ± 0,002*
Día 45	0,258 ± 0,007*	0,291 ± 0,011*	0,410 ± 0,002*	0,430 ± 0,005*	0,455 ± 0,011*	0,363 ± 0,007*	0,216 ± 0,006*	0,196 ± 0,001*
Día 50	0,240 ± 0,008*	0,278 ± 0,004*	0,431 ± 0,011*	0,313 ± 0,006*	0,386 ± 0,004*	0,374 ± 0,011*	0,141 ± 0,001*	0,139 ± 0,001*

Edad	DNasa ÁCIDA/DNA (UI/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	18,2 ± 0,4	13,3 ± 0,4	17,9 ± 0,3	13,8 ± 0,1	30,0 ± 0,3*	18,7 ± 0,2*	12,8 ± 0,2*	14,1 ± 0,5*
Día 30	21,1 ± 0,2*	33,8 ± 0,9*	32,0 ± 0,2*	24,4 ± 0,1*	15,9 ± 0,2*	21,7 ± 0,1*	24,3 ± 0,5*	30,0 ± 0,5*
Día 35	31,3 ± 0,8	19,1 ± 0,3*	31,4 ± 0,5	41,1 ± 0,7*	26,8 ± 0,3*	18,8 ± 0,2*	28,7 ± 0,2*	25,8 ± 0,1*
Día 40	17,0 ± 0,2*	15,7 ± 0,3*	41,1 ± 0,8*	39,7 ± 0,5*	19,7 ± 0,4	14,3 ± 0,1*	20,4 ± 0,5	22,3 ± 0,5*
Día 45	13,8 ± 0,2*	15,1 ± 0,1*	39,8 ± 0,3*	37,5 ± 0,4*	23,7 ± 0,2*	17,6 ± 0,1*	31,5 ± 0,3*	28,0 ± 0,3*
Día 50	15,0 ± 0,2*	20,7 ± 0,1*	33,2 ± 0,2*	31,8 ± 0,8*	20,3 ± 0,3*	14,6 ± 0,2*	30,2 ± 0,4*	26,2 ± 0,3*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0,05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 42. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), el Tratamiento (T) y la Dieta (D) sobre el estudio del crecimiento celular² del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y Tratados con rhGH (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	DNA/órgano	DNA/g	NN	Peso/NN	Proteína/DNA	DNasa/órgano	DNasa/g	DNasa/Proteína	DNasa/DNA
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
rhGH	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0390	NS	0,0180	0,0060	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001
ExT	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0006	0,0001
ExD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
TxD	0,0230	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExTxD	0,0001	0,0001	0,0430	0,0020	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad ($p < 0,05$). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: DNA absoluto (DNA/órgano) y relativo (DNA/g), número de núcleos (NN), peso muscular/número de núcleos (peso/NN), Proteína/DNA, DNasa ácida absoluta (DNasa/órgano) y relativa (DNasa/g) y actividad específica DNasa ácida/proteína (DNasa/Proteína) y la razón DNasa ácida/DNA (DNasa/DNA).

Tabla 43. Valor de las pendientes de las rectas de regresión frente a la Edad de las variables relacionadas con el crecimiento celular: DNA absoluto y relativo, número de núcleos, peso muscular/número de núcleos, proteína/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **No Tratados** y **Tratados con rhGH** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variables	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
		pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error
DNA/órgano	♀	0,0419	0,0009*	-0,0000	0,0002*	0,0046	0,0008*	0,0001	0,00001*
	♂	0,0019	0,0010*	-0,0030	0,0006*	0,0086	0,0009*	-0,0002	0,0002*
DNA/g	♀	0,022	0,010*	-0,019	0,002*	0,023	0,006*	-0,027	0,001*
	♂	-0,013	0,016*	-0,055	0,007*	0,054	0,011*	-0,018	0,002*
Número de núcleos	♀	0,675	0,160*	-0,012	0,046*	0,730	0,128*	-0,018	0,034*
	♂	0,306	0,173*	-0,489	0,103*	1,403	0,148*	-0,032	0,032*
Peso/Número de núcleos	♀	-0,027	0,018*	0,060	0,006*	-0,036	0,008*	0,108	0,003*
	♂	0,013	0,019*	0,105	0,011*	-0,045	0,009*	0,115	0,015*
Proteína/DNA	♀	0,039	0,399	-0,179	0,209	-1,085	0,340*	5,123	0,338*
	♂	0,419	0,395*	1,149	0,340*	-0,751	0,164*	3,103	0,603*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. P < 0,01 según el análisis de *Dummy variables*.

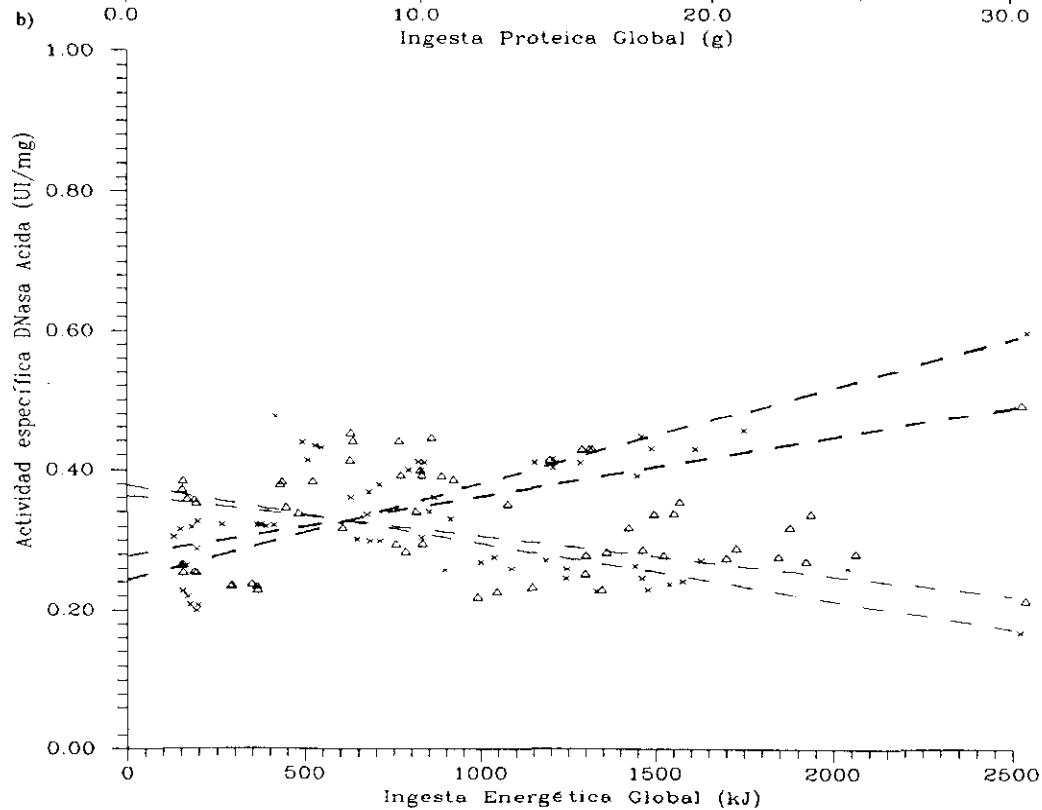
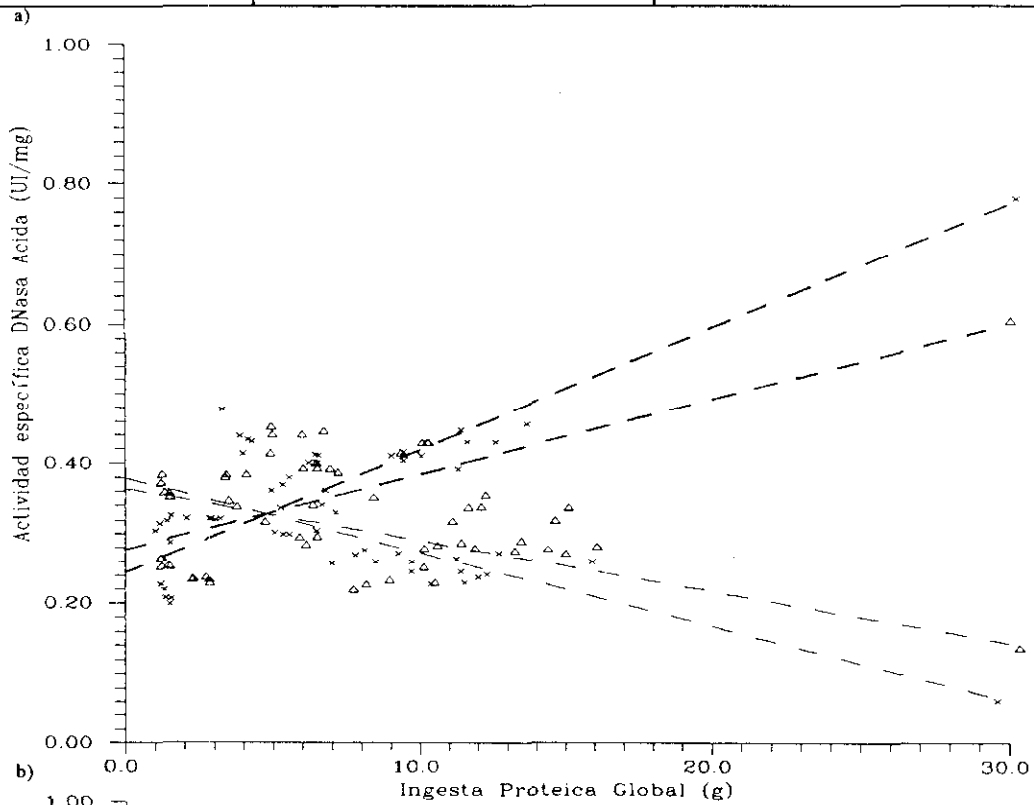
Tabla 44. Valor de las pendientes de las rectas de regresión y su error frente la Edad de las variables relacionadas con el enzima desoxirribonucleasa ácida: cantidades absoluta y relativa, actividad específica y razón DNasa ácida/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados y Tratados con rhGH y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variables	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
		pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error
DNasa ácida/ órgano	♀	0,0190	0,0187*	0,0564	0,0060*	0,0907	0,0090*	0,0543	0,0052*
	♂	0,0413	0,0114	0,0232	0,0001	0,1030	0,0113*	0,0273	0,0075*
DNasa ácida/g	♀	-0,2750	0,0938*	0,3525	0,1187*	0,2769	0,0961	0,0966	0,1309
	♂	-0,1183	0,1062*	0,1530	0,1180*	0,3514	0,1013*	0,0156	0,0926*
DNasa ácida/ proteína	♀	-0,005	0,0010*	0,0080	0,0006*	0,0026	0,0011*	-0,0027	0,0011*
	♂	-0,004	0,0007*	0,0056	0,0015*	0,0011	0,0009*	-0,0016	0,0007*
DNasa ácida/ DNA	♀	-0,2961	0,1169*	0,6264	0,1199*	-0,1835	0,0988*	0,5707	0,0956*
	♂	-0,1299	0,1500*	0,7906	0,1563*	-0,2130	0,0409*	0,2914	0,1019*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $P < 0,01$ según el análisis de *Dummy variables*.

Gráfica 26. Relación entre la **Actividad específica DNasa ácida** y las **Ingestas Proteica (IP)** (a) y **Energética (IE)** (b) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y *Tratados con rhGH* (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	a	b
x - - - - 12% ♀ NT	$y = 0,37 - x \cdot 0,010 \pm 0,002$ ^{a*}	$y = 0,37 - x \cdot 0,00007 \pm 0,00002$ ^{a*}
Δ - - - - 12% ♂ NT	$y = 0,36 - x \cdot 0,007 \pm 0,001$ ^{a*}	$y = 0,36 - x \cdot 0,00006 \pm 0,00001$ ^{a*}
x - - - - 12% ♀ T	$y = 0,24 + x \cdot 0,017 \pm 0,001$ ^{a*}	$y = 0,24 + x \cdot 0,00014 \pm 0,00010$ ^{a*}
Δ - - - - 12% ♂ T	$y = 0,27 + x \cdot 0,010 \pm 0,003$ ^{b*}	$y = 0,27 + x \cdot 0,00008 \pm 0,00002$ ^{b*}



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta y un mismo tratamiento. El asterisco marca las diferencias entre NT y T.

4.9. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE LA HORMONA SOMATOTROPA (rhGH) SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS, ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 y 20%). (Tablas 38-44, Gráfica 26).

La EDAD, el TRATAMIENTO, la DIETA y sus interacciones influyen muy significativamente sobre el crecimiento celular del músculo en los animales T respecto a los NT, según el ANOVA de tres factores (Tabla 42).

El test de comparación múltiple LSD señala que la administración exógena de rhGH induce la pérdida de los valores DNA/órgano, DNA/g y del NN de los animales T respecto de los NT, que se manifiesta a lo largo del estudio independientemente de la dieta suministrada y del sexo. Los porcentajes de descenso oscilan entre un 30% y un 66% en el día 30 y entre un 48% y un 75% en el día 50 de vida, en todas las variables mencionadas (Tabla 38).

Por el contrario, el tamaño celular dependiente de la proteína (proteína/DNA) o del peso muscular (peso muscular/NN) se incrementa en todos los animales tratados, especialmente en los grupos sometidos al 20% de proteína (Tabla 39).

Todas las relaciones de DNasa ácida presentan disminuciones muy significativas en los animales ♀ y ♂ 20% T respecto de los NT en todos los días de la experiencia, a excepción de la razón DNasa ácida/DNA que aumenta (Tablas 40 y 41).

Sin embargo éstos valores, después de disminuciones iniciales, aumentan en los animales sometidos al 12% de proteína, a excepción de un descenso significativo de los valores DNasa ácida absoluta y relativa del grupo ♂ 12% T a día 50 de vida, en relación a los animales NT (Tablas 40 y 41).

El estudio de las pendientes de las rectas de regresión confirma la rápida pérdida de DNA y del NN, así como la mayor aceleración en el crecimiento del tamaño celular de los animales T en relación a los NT (Tabla 43).

Respecto al enzima DNasa ácida y parámetros relacionados, los animales ♂ y ♀ 12% T presentan las mayores velocidades de crecimiento, mientras que en los grupos ♂ y ♀ 20% T por el contrario estos valores crecen menos rápidamente, a excepción de la razón DNasa ácida/DNA que evoluciona positivamente respecto a sus controles NT (Tabla 44).

Estas modificaciones en el valor de las pendientes de las rectas de regresión entre animales T y NT demuestran el efecto de las interacciones ExT, ExD y ExTxD (Tabla 42).

- Relación entre la actividad específica DNasa ácida y las ingestas proteica (IP) y energética (IE) en ratones BALB/c No tratados (NT) y Tratados con rhGH (T) (Gráficas 26a y b).

La actividad enzimática DNasa ácida sólo presenta correlación lineal significativa con ambas ingestas en los animales sometidos al 12% de proteína.

No obstante, la correlación tiene direcciones opuestas en ambos grupos de animales NT y T. En los animales 12% NT resulta inversamente proporcional, con mayores descensos de la actividad enzimática a medida que se elevan la IP e IE. Por el contrario, en los animales T la actividad DNasa es directamente proporcional, incrementándose a medida que lo hace el nivel de ingesta.

Tabla 45. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la cantidad de RNA absoluto y relativo del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNA ABSOLUTO ($\mu\text{g}/\text{órgano}$)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	160 \pm 5 ^{a*}	172 \pm 7 ^a	127 \pm 4 ^{a+*}	184 \pm 4 ^{a+}
Día 30	250 \pm 12 ^{b+*}	105 \pm 2 ^{b+*}	217 \pm 5 ^{b+*}	159 \pm 11 ^{b+*}
Día 35	88 \pm 1 ^{c+*}	137 \pm 3 ^{c+*}	148 \pm 4 ^{c+*}	213 \pm 4 ^{c+*}
Día 40	127 \pm 3 ^{d+*}	145 \pm 4 ^{c+*}	241 \pm 8 ^{d+*}	209 \pm 4 ^{c+*}
Día 45	154 \pm 4 ^{a+*}	208 \pm 5 ^{d+*}	239 \pm 13 ^{d*}	257 \pm 11 ^{d*}
Día 50	198 \pm 6 ^c	204 \pm 6 ^d	213 \pm 8 ^b	212 \pm 5 ^c

Edad	RNA RELATIVO (mg/g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	3,5 \pm 0,09 ^{a+*}	2,6 \pm 0,08 ^{a+*}	2,2 \pm 0,02 ^{a+*}	3,0 \pm 0,09 ^{a+*}
Día 30	2,6 \pm 0,08 ^{b+}	1,4 \pm 0,05 ^{b+*}	2,6 \pm 0,06 ^{b+}	2,2 \pm 0,08 ^{b+*}
Día 35	1,2 \pm 0,02 ^{c+*}	1,7 \pm 0,02 ^{c+*}	1,9 \pm 0,06 ^{c+*}	2,7 \pm 0,06 ^{c+*}
Día 40	1,6 \pm 0,01 ^{d+*}	1,9 \pm 0,04 ^{c+*}	3,0 \pm 0,06 ^{d+*}	2,5 \pm 0,08 ^{d+*}
Día 45	2,0 \pm 0,05 ^{e+*}	2,5 \pm 0,08 ^{a+}	2,6 \pm 0,07 ^{b*}	2,5 \pm 0,03 ^d
Día 50	2,2 \pm 0,03 ^f	2,1 \pm 0,07 ^d	2,2 \pm 0,04 ^a	2,2 \pm 0,08 ^b

Cada valor es la media \pm error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 46. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la capacidad de síntesis proteica y sobre la razón RNA/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNA/PROTEÍNA (mg/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	26,6 ± 0,4 ^{a++}	19,1 ± 0,3 ^{a++}	13,8 ± 0,1 ^{a++}	22,3 ± 0,4 ^{a++}
Día 30	24,7 ± 0,7 ^{b+}	11,1 ± 0,2 ^{b++}	24,5 ± 0,4 ^{b+}	19,5 ± 0,6 ^{b++}
Día 35	8,9 ± 0,1 ^{c++}	13,2 ± 0,1 ^{c++}	17,3 ± 0,5 ^{c++}	23,4 ± 0,3 ^{a++}
Día 40	11,9 ± 0,1 ^{d*}	11,9 ± 0,1 ^{bc*}	22,0 ± 0,5 ^{d++}	18,9 ± 0,6 ^{b++}
Día 45	13,1 ± 0,3 ^{e++}	17,0 ± 0,2 ^{d++}	19,9 ± 0,3 ^{e*}	19,6 ± 0,5 ^{b*}
Día 50	13,3 ± 0,2 ^{e++}	11,9 ± 0,1 ^{bc++}	17,2 ± 0,3 ^{c++}	15,9 ± 0,5 ^{e++}

Edad	RNA/DNA (mg/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	1,5 ± 0,04 ^{a++}	0,7 ± 0,02 ^{a++}	1,3 ± 0,02 ^{a*}	1,3 ± 0,02 ^{a*}
Día 30	1,1 ± 0,03 ^b	1,0 ± 0,03 ^{b*}	1,0 ± 0,03 ^{b+}	1,2 ± 0,03 ^{b++}
Día 35	0,9 ± 0,01 ^{c++}	0,8 ± 0,01 ^{c++}	1,0 ± 0,02 ^{b*}	1,0 ± 0,02 ^{c*}
Día 40	0,8 ± 0,01 ^{d*}	0,8 ± 0,01 ^{c*}	1,2 ± 0,02 ^{c++}	0,6 ± 0,01 ^{d++}
Día 45	0,7 ± 0,02 ^{d++}	0,9 ± 0,01 ^{d++}	1,0 ± 0,01 ^{b*}	1,0 ± 0,01 ^{c*}
Día 50	0,8 ± 0,01 ^{c++}	0,9 ± 0,01 ^{d++}	0,9 ± 0,01 ^{d++}	0,6 ± 0,01 ^{d++}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 47. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la cantidad absoluta y relativa del enzima ribonucleasa ácida del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNasa ÁCIDA ABSOLUTA (mUI/órgano)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	3,5 ± 0,07 ^{a+*}	5,9 ± 0,07 ^{ab+*}	6,1 ± 0,21 ^{a+*}	6,5 ± 0,15 ^{a+*}
Día 30	8,2 ± 0,16 ^{b+*}	6,3 ± 0,18 ^{a+*}	9,2 ± 0,07 ^{b+*}	8,7 ± 0,15 ^{b+*}
Día 35	6,3 ± 0,12 ^{c+}	5,5 ± 0,20 ^{b+*}	6,7 ± 0,16 ^{c+}	7,3 ± 0,14 ^{c+*}
Día 40	6,9 ± 0,10 ^{c*}	7,2 ± 0,16 ^{c*}	8,0 ± 0,17 ^{d*}	8,1 ± 0,09 ^{d*}
Día 45	6,6 ± 0,12 ^{c+*}	8,3 ± 0,17 ^{d+*}	9,1 ± 0,15 ^{b+*}	7,8 ± 0,15 ^{d+*}
Día 50	9,9 ± 0,03 ^{d+*}	9,4 ± 0,17 ^{e+*}	8,8 ± 0,16 ^{b*}	9,0 ± 0,12 ^{b*}

Edad	RNasa ÁCIDA RELATIVA (mUI/g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	79,3 ± 0,6 ^{a+*}	90,3 ± 0,5 ^{a+*}	112 ± 0,5 ^{a+*}	108 ± 0,4 ^{a+*}
Día 30	94,5 ± 1,0 ^{b+*}	83,1 ± 0,5 ^{b+*}	108 ± 0,7 ^{b+*}	119 ± 0,8 ^{b+*}
Día 35	84,4 ± 1,3 ^{c+*}	68,8 ± 1,0 ^{c+*}	92,8 ± 0,4 ^{c*}	94,5 ± 0,8 ^{c*}
Día 40	86,3 ± 0,8 ^{c+*}	91,5 ± 0,9 ^{a+}	89,5 ± 0,3 ^{d*}	91,6 ± 0,5 ^d
Día 45	85,1 ± 1,1 ^{c+*}	104 ± 1,2 ^{d+*}	97,5 ± 0,9 ^{e+*}	73,6 ± 0,7 ^{e+*}
Día 50	112 ± 0,6 ^{d+*}	93,8 ± 0,2 ^{a+}	93,5 ± 1,2 ^{c*}	94,2 ± 0,9 ^c

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 48. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la actividad específica del enzima ribonucleasa ácida y sobre las razones RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNasa ÁCIDA/PROTEÍNA (mUI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,58 ± 0,022 ^{a++}	0,66 ± 0,018 ^{a++}	0,70 ± 0,007 ^{a++}	0,80 ± 0,015 ^{a++}
Día 30	0,80 ± 0,021 ^{b++}	0,65 ± 0,015 ^{a++}	1,02 ± 0,008 ^{b*}	1,04 ± 0,024 ^{b*}
Día 35	0,63 ± 0,035 ^{a++}	0,53 ± 0,026 ^{b++}	0,83 ± 0,016 ^{c*}	0,81 ± 0,008 ^{a*}
Día 40	0,64 ± 0,030 ^{c+}	0,58 ± 0,019 ^{c++}	0,66 ± 0,004 ^{d+}	0,69 ± 0,010 ^{c++}
Día 45	0,56 ± 0,024 ^{d++}	0,67 ± 0,018 ^{a++}	0,76 ± 0,018 ^{e++}	0,57 ± 0,016 ^{d++}
Día 50	0,66 ± 0,010 ^{c++}	0,53 ± 0,014 ^{b++}	0,73 ± 0,016 ^{ae++}	0,66 ± 0,012 ^{c++}

Edad	RNasa ÁCIDA/DNA (mUI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	34,4 ± 0,4 ^{a++}	23,9 ± 0,7 ^{a++}	68,0 ± 0,8 ^{a++}	44,8 ± 0,4 ^{a++}
Día 30	38,8 ± 0,5 ^{b++}	60,8 ± 0,7 ^{b++}	40,9 ± 0,4 ^{b++}	64,0 ± 0,8 ^{b++}
Día 35	63,8 ± 1,2 ^{c++}	33,1 ± 0,3 ^{c+}	47,7 ± 0,3 ^{c++}	33,2 ± 0,4 ^{c+}
Día 40	41,2 ± 0,6 ^{d*}	39,7 ± 0,6 ^{d*}	35,9 ± 0,4 ^{d++}	23,5 ± 0,1 ^{d++}
Día 45	29,1 ± 0,3 ^{e++}	35,5 ± 0,4 ^{e++}	39,7 ± 0,4 ^{be++}	27,8 ± 0,3 ^{e++}
Día 50	41,9 ± 0,3 ^{d*}	40,2 ± 0,4 ^{d*}	38,2 ± 0,3 ^{e++}	25,7 ± 0,2 ^{f++}

Edad	RNasa ÁCIDA/RNA (mUI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	22,5 ± 0,5 ^{a++}	34,3 ± 0,9 ^{a++}	50,8 ± 0,7 ^{a++}	35,8 ± 1,1 ^{a++}
Día 30	36,0 ± 0,8 ^{b++}	60,0 ± 0,6 ^{b++}	41,6 ± 1,2 ^{b++}	53,5 ± 1,2 ^{b++}
Día 35	71,6 ± 0,7 ^{c++}	40,6 ± 0,1 ^{c++}	48,0 ± 0,7 ^{a++}	34,6 ± 0,6 ^{a++}
Día 40	54,4 ± 0,6 ^{d++}	49,5 ± 0,8 ^{d++}	30,1 ± 0,7 ^{c++}	37,0 ± 0,6 ^{a++}
Día 45	41,9 ± 0,8 ^{e*}	40,7 ± 0,2 ^{c*}	38,2 ± 1,2 ^{d++}	29,2 ± 0,2 ^{c++}
Día 50	50,3 ± 0,5 ^{f++}	45,0 ± 0,8 ^{c++}	42,3 ± 1,2 ^{b++}	32,1 ± 1,5 ^{a++}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 49. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la cantidad absoluta y relativa del enzima catepsina D del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

CATEPSINA D ABSOLUTA (mUI/órgano)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	590 ± 15 ^{a++}	755 ± 11 ^{a++}	433 ± 13 ^{a++}	161 ± 9 ^{a++}
Día 30	1370 ± 45 ^{b++}	857 ± 10 ^{b++}	307 ± 11 ^{b*}	279 ± 8 ^{b*}
Día 35	887 ± 9 ^{c++}	963 ± 4 ^{c++}	574 ± 19 ^{c++}	221 ± 12 ^{c++}
Día 40	804 ± 7 ^{d++}	745 ± 15 ^{a++}	154 ± 8 ^{d++}	325 ± 9 ^{d++}
Día 45	888 ± 14 ^{c++}	1069 ± 23 ^{d++}	452 ± 15 ^{a*}	449 ± 13 ^{e*}
Día 50	787 ± 26 ^{d++}	1009 ± 17 ^{e++}	125 ± 2 ^{d*}	123 ± 3 ^{f*}

CATEPSINA D RELATIVA (UI/g)				
Edad	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	13,7 ± 0,17 ^{a++}	11,6 ± 0,12 ^{a++}	7,50 ± 0,14 ^{a++}	2,73 ± 0,11 ^{a++}
Día 30	15,7 ± 0,10 ^{b++}	11,4 ± 0,09 ^{a++}	3,68 ± 0,04 ^{b++}	3,90 ± 0,00 ^{b++}
Día 35	11,7 ± 0,06 ^{c*}	11,7 ± 0,04 ^{a*}	7,56 ± 0,08 ^{a++}	2,85 ± 0,04 ^{a++}
Día 40	10,2 ± 0,06 ^{d++}	9,27 ± 0,08 ^{b++}	1,78 ± 0,02 ^{c++}	3,89 ± 0,03 ^{b++}
Día 45	11,8 ± 0,11 ^{c++}	13,3 ± 0,12 ^{c++}	4,85 ± 0,09 ^{d++}	4,25 ± 0,05 ^{c++}
Día 50	8,83 ± 0,04 ^{e++}	10,3 ± 0,16 ^{d++}	1,28 ± 0,03 ^{c*}	1,30 ± 0,03 ^{d*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 50. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la actividad específica del enzima catepsina D y sobre la razón catepsina D/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **No Tratados (NT)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	CATEPSINA D/PROTEÍNA (mUI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	98,1 ± 1,0 ^{a++}	84,6 ± 0,9 ^{a++}	47,1 ± 0,9 ^{a++}	20,2 ± 1,0 ^{a++}
Día 30	133,7 ± 2,2 ^{b++}	90,1 ± 2,0 ^{b++}	34,6 ± 0,3 ^{b*}	34,0 ± 0,6 ^{b*}
Día 35	89,7 ± 2,1 ^{c*}	92,7 ± 1,9 ^{b*}	67,5 ± 1,5 ^{c++}	24,4 ± 0,3 ^{c++}
Día 40	75,5 ± 1,0 ^{d++}	61,4 ± 0,9 ^{c++}	13,1 ± 0,2 ^{d++}	29,4 ± 0,7 ^{d++}
Día 45	75,4 ± 1,1 ^{d++}	87,4 ± 1,4 ^{b++}	37,9 ± 1,0 ^{e++}	33,0 ± 0,7 ^{b++}
Día 50	52,9 ± 0,3 ^{e++}	59,1 ± 0,6 ^{c++}	10,0 ± 0,2 ^{f*}	9,1 ± 0,3 ^{e+}

Edad	CATEPSINA D/DNA (UI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	5,9 ± 0,11 ^{a++}	3,1 ± 0,07 ^{a++}	4,6 ± 0,11 ^{a++}	1,1 ± 0,05 ^{a++}
Día 30	6,4 ± 0,07 ^{b++}	8,3 ± 0,20 ^{b++}	1,4 ± 0,02 ^{b++}	2,1 ± 0,02 ^{b++}
Día 35	8,8 ± 0,10 ^{c++}	5,6 ± 0,07 ^{c++}	3,9 ± 0,04 ^{c++}	1,0 ± 0,02 ^{a++}
Día 40	4,8 ± 0,08 ^{d++}	4,0 ± 0,05 ^{d++}	0,7 ± 0,01 ^{d++}	1,0 ± 0,01 ^{a++}
Día 45	4,0 ± 0,04 ^{e++}	4,6 ± 0,05 ^{e++}	2,0 ± 0,04 ^{e++}	1,6 ± 0,02 ^{c++}
Día 50	3,3 ± 0,02 ^{f++}	4,4 ± 0,09 ^{e++}	0,5 ± 0,01 ^{f++}	0,4 ± 0,01 ^{d++}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 51. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), la Dieta (D) y el Sexo (S) sobre el estudio del metabolismo del RNA y la capacidad de síntesis proteica² del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	RNA/órgano	RNA/g	RNA/Proteína	RNA/DNA	RNasa/órgano	RNasa/g	RNasa/Proteína	RNasa/DNA	RNasa/RNA
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0088	0,0001
SEXO	NS	0,0048	0,0001	0,0001	0,0046	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001
DxS	NS	0,0001	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0031	0,0001	0,0024
ExDxS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad ($p < 0,05$). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: RNA absoluto (RNA/órgano) y relativo (RNA/g), capacidad de síntesis (RNA/proteína), la razón RNA/DNA, RNasa ácida absoluta (RNasa/órgano) y relativa (RNasa/g), actividad específica RNasa ácida/proteína (RNasa/Proteína) y las razones RNasa ácida/DNA (RNasa/DNA) y RNasa ácida/RNA (RNasa/RNA).

Tabla 52. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), la Dieta (D) y el Sexo (S) sobre la degradación proteica² del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	Catepsina/órgano	Catepsina/g	Catepsina/Proteína	Catepsina/DNA
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
SEXO	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DxS	0,0001	0,0001	NS	0,0001
ExDxS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad ($P < 0,05$). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: Catepsina D/órgano, catepsina D/g, catepsina D/proteína y catepsina D/DNA.

Tabla 53. Relación con la Edad de las variables: RNA absoluto y relativo, capacidad de síntesis proteica y razón RNA/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **No Tratados (NT)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
RNA/órgano	♀	$y=0,145 + x \cdot 0,0005$	0,0010 ^{a1}	0,098	NS	$y=0,139 + x \cdot 0,0030$	0,0007 ^{a2}	0,617	0,0005
	♂	$y=0,113 + x \cdot 0,0027$	0,0006 ^{b1}	0,613	0,0003	$y=0,165 + x \cdot 0,0020$	0,0005 ^{a1}	0,624	0,0004
RNA/g	♀	$y=2,998 - x \cdot 0,045$	0,014 ^{a1}	-0,509	0,0041	$y=2,316 + x \cdot 0,005$	0,007 ^{a2}	0,137	NS
	♂	$y=1,947 + x \cdot 0,005$	0,010 ^{a1}	0,093	NS	$y=2,875 - x \cdot 0,018$	0,005 ^{b2}	-0,513	0,0037
RNA/proteína	♀	$y=26,224 - x \cdot 0,560$	0,110 ^{a1}	-0,684	0,0000	$y=17,713 + x \cdot 0,068$	0,076 ^{a2}	0,169	NS
	♂	$y=15,975 - x \cdot 0,110$	0,070 ^{b1}	-0,298	NS	$y=23,526 - x \cdot 0,205$	0,043 ^{b1}	-0,667	0,0001
RNA/DNA	♀	$y=1,445 - x \cdot 0,027$	0,003 ^{a1}	-0,818	0,0000	$y=1,257 - x \cdot 0,009$	0,002 ^{a2}	-0,580	0,0008
	♂	$y=0,796 + x \cdot 0,003$	0,002 ^{b1}	0,257	NS	$y=1,362 - x \cdot 0,024$	0,003 ^{b2}	-0,836	0,0000

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

Tabla 54. Relación con la Edad de las variables: Cantidad absoluta y relativa del enzima RNasa ácida, actividad específica RNasa ácida/proteína y las razones RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
RNasa ácida /órgano	♀	$y=4,162 + x \cdot 0,1571$	0,0313 ^{a1}	0,688	0,0000	$y=6,506 + x \cdot 0,0826$	0,022 ^{a2}	0,564	0,0012
	♂	$y=4,568 + x \cdot 0,1451$	0,0154 ^{a1}	0,871	0,0000	$y=6,879 + x \cdot 0,0590$	0,015 ^{a2}	0,579	0,0008
RNasa ácida/g	♀	$y=76,66 + x \cdot 0,7760$	0,187 ^{a1}	0,615	0,0003	$y=111,27 - x \cdot 0,712$	0,123 ^{a2}	-0,735	0,0000
	♂	$y=78,40 + x \cdot 0,5796$	0,212 ^{a1}	0,458	NS	$y=114,84 - x \cdot 1,087$	0,215 ^{a2}	-0,703	0,0000
RNasa ácida/ proteína	♀	$y=0,684 - x \cdot 0,0018$	0,002 ^{a1}	-0,178	NS	$y=0,8624 - x \cdot 0,0045$	0,002 ^{a1}	-0,326	NS
	♂	$y=0,653 - x \cdot 0,0023$	0,001 ^{a1}	-0,288	NS	$y=0,9832 - x \cdot 0,0126$	0,002 ^{b2}	-0,711	0,0000
RNasa ácida/ DNA	♀	$y=42,91 + x \cdot 0,0790$	0,241 ^{a1}	0,061	NS	$y=61,508 - x \cdot 0,9402$	0,163 ^{a1}	-0,735	0,0000
	♂	$y=37,60 + x \cdot 0,0700$	0,248 ^{a1}	0,053	NS	$y=57,889 - x \cdot 1,2215$	0,211 ^{a2}	-0,736	0,0000
RNasa ácida/ RNA	♀	$y=32,15 + x \cdot 0,797$	0,306 ^{a1}	0,441	NS	$y=48,87 - x \cdot 0,4036$	0,134 ^{a2}	-0,490	0,0056
	♂	$y=44,57 + x \cdot 0,024$	0,181 ^{b1}	0,025	NS	$y=45,96 - x \cdot 0,5101$	0,149 ^{a2}	-0,541	0,0002

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

Tabla 55. Relación con la Edad de las variables: cantidad absoluta y relativa del enzima catepsina D, actividad específica catepsina D/proteína y la razón catepsina D/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
Catepsina D/ órgano	♀	$y=0,942 - x \cdot 0,0031$	0,0053 ^{a1}	-0,110	NS	$y=0,493 - x \cdot 0,0087$	0,0032 ^{a1}	-0,453	NS
	♂	$y=0,730 + x \cdot 0,0096$	0,0021 ^{b1}	0,650	0,0001	$y=0,217 + x \cdot 0,0024$	0,0024 ^{b1}	0,188	NS
Catepsina D/g	♀	$y=15,72 - x \cdot 0,214$	0,028 ^{a1}	-0,813	0,0000	$y=7,77 - x \cdot 0,190$	0,041 ^{a1}	-0,654	0,0001
	♂	$y=11,58 - x \cdot 0,019$	0,028 ^{a1}	-0,128	NS	$y=3,66 - x \cdot 0,029$	0,021 ^{b1}	-0,246	NS
Catepsina D/ proteína	♀	$y=129,06 - x \cdot 2,370$	0,340 ^{a1}	-0,794	0,0000	$y=58,03 - x \cdot 1,315$	0,358 ^{a2}	-0,569	0,001
	♂	$y=95,92 - x \cdot 0,950$	0,280 ^{b1}	-0,544	0,0009	$y=30,34 - x \cdot 0,304$	0,183 ^{b2}	-0,299	NS
Catepsina D/DNA	♀	$y=7,99 - x \cdot 0,138$	0,030 ^{a1}	-0,655	0,0001	$y=4,34 - x \cdot 0,123$	0,024 ^{a1}	-0,686	0,0000
	♂	$y=5,61 - x \cdot 0,035$	0,036 ^{b1}	-0,180	NS	$y=1,73 - x \cdot 0,030$	0,010 ^{b1}	-0,479	0,0073

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

4.10. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL METABOLISMO PROTEICO Y DEL RNA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS, ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA, **NO TRATADOS (NT)** Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 y 20%) (Tablas 45-55).

El efecto de la EDAD sobre los valores RNA/órgano, RNA/g, RNA/proteína, RNA/DNA, RNasa ácida/órgano, RNasa ácida/g, RNasa ácida/proteína, RNasa ácida/DNA, RNasa ácida/RNA, catepsina D/órgano, catepsina D/g, catepsina D/proteína y catepsina D/DNA es muy significativo en los animales NT de acuerdo con el análisis de la varianza de tres factores (Tablas 51 y 52).

La cantidad absoluta de RNA muscular se incrementa de forma edad-dependiente en todos los animales NT, a excepción del grupo ♀ 12% NT, que resulta independiente de la edad (Tablas 45 y 53). Por su parte, la concentración de RNA/g disminuye en el mismo período, aunque en el grupo ♀ 20% NT se mantiene inalterado (Tabla 45).

Las razones RNA/proteína y RNA/DNA presentan descensos en todos los animales estudiados (Tabla 46) de carácter edad-dependiente (Tabla 53), a excepción de la razón RNA/proteína del grupo ♀ 20% NT y de la razón RNA/DNA del grupo ♂ 12% NT cuyos incrementos no son correlativos con la edad.

Por otra parte, el valor absoluto del enzima RNasa ácida aumenta con la edad muy significativamente en todos los animales NT (Tabla 47), presentando los grupos sometidos al 12% de proteína dietaria, los mayores coeficientes de correlación temporal (Tabla 54).

Sin embargo, los valores relativos RNasa ácida/g, RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA varían en razón inversa al nivel proteico de la dieta, aumentando en los animales NT del 12% de proteína y disminuyendo en los grupos del 20% (Tablas 47 y 48). Estas variables presentan correlaciones temporales negativas y significativas con coeficientes de correlación alrededor de $r = -0,700$ en los grupos

de mayor nivel proteico, mientras que sólo es correlativo el valor RNasa ácida/g del grupo ♀ 12% NT (Tabla 54).

Las modificaciones temporales en la razón RNasa ácida/proteína son muy desiguales entre grupos (Tabla 48), ya que mientras los animales machos de ambas dietas sufren descensos significativos respecto al valor inicial, los grupos hembras o bien no presentan modificación (♀ 20%) o aumentan ligeramente (♀ 12%), presentando carácter edad-dependiente sólo el grupo ♂ 20% NT (Tabla 54).

También la EDAD afecta de forma negativa a los parámetros relacionados con el enzima catepsina D en todos los animales NT, a excepción de la cantidad absoluta del enzima en los grupos ♀ y ♂ 12% NT y de la razón catepsina D/DNA del grupo ♂ 12% NT que aumentan un 33% y un 43% respectivamente (Tablas 49 y 50).

Los descensos resultan edad-dependientes en los grupos hembras de ambas dietas, a excepción del valor de catepsina D/órgano que no presenta correlación temporal (Tabla 55). Por su parte, todos los animales ♂ obtienen menores correlaciones temporales (Tabla 55).

El factor DIETA afecta también significativamente a todos los parámetros en estudio, según el análisis de la varianza de tres factores (Tablas 51 y 52).

En general, la dieta del 20% de proteína induce en los animales de ambos sexos, un incremento significativo de las cantidades absoluta y relativa de RNA, de las razones RNA/proteína y RNA/DNA (Tablas 45 y 46), así como de la actividad RNasa ácida/proteína y de las cantidades absoluta y relativa del enzima, según el test de comparación múltiple LSD (Tablas 47 y 48).

Por su parte las razones RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA presentan efectos más aleatorios inducidos por el nivel de proteína más alto, aunque en general los valores tienden a bajar respecto a los grupos del 12% de proteína (Tabla 48).

Descensos muy significativos en todos los días de vida experimentan también los animales ♀ y ♂ 20% NT en todos los parámetros relacionados con la catepsina D, presentando a día 50 los mayores porcentajes de disminución respecto a los grupos sometidos a la dieta del 12% de proteína (Tablas 49 y 50).

Por otra parte, el ANOVA de tres factores (Tablas 51 y 52) señala una influencia del SEXO en todas las variables estudiadas, excepto en la cantidad absoluta de RNA. Sin embargo el carácter aleatorio de las modificaciones encontradas, hacen imposible la determinación de una clara influencia sexual.

El estudio estadístico de las pendientes de las rectas de regresión (Tablas 53, 54 y 55) nos indica que la evolución temporal de los parámetros RNA/órgano, RNA/g, RNA/proteína y RNA/DNA de los animales ♀ 20% NT es más rápida que las del grupo ♀ 12% NT.

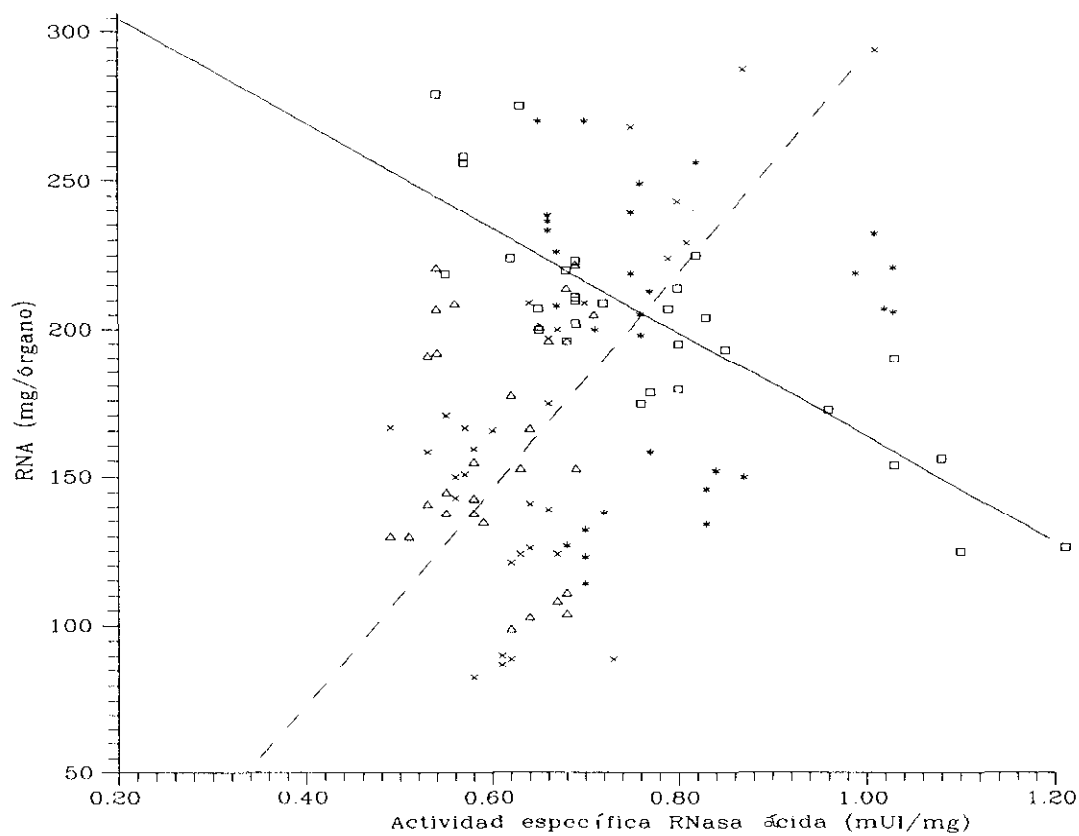
Por el contrario, el grupo ♂ 12% NT presentan mayores aceleraciones en el crecimiento de estas variables respecto al grupo ♂ 20% NT (Tabla 53), lo que señala la influencia de la triple interacción ExDxS (Tabla 51).

Por su parte todos los parámetros relacionados con la actividad RNasa ácida, presentan crecimientos temporales más rápidos en los animales sometidos al 12% de proteína respecto a los del 20%, independientemente del sentido positivo o negativo de dicha evolución (Tabla 54).

Por último, sólo la variable catepsina D/proteína presenta una mayor desaceleración del crecimiento en los grupos 12% NT respecto a los 20% NT. También la influencia de las interacciones ExD, ExS, DxS y ExDxS son muy significativas (Tablas 51 y 52).

Gráfica 27. Relación entre **RNA muscular (Y)** y la **Actividad específica RNasa ácida (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NI) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

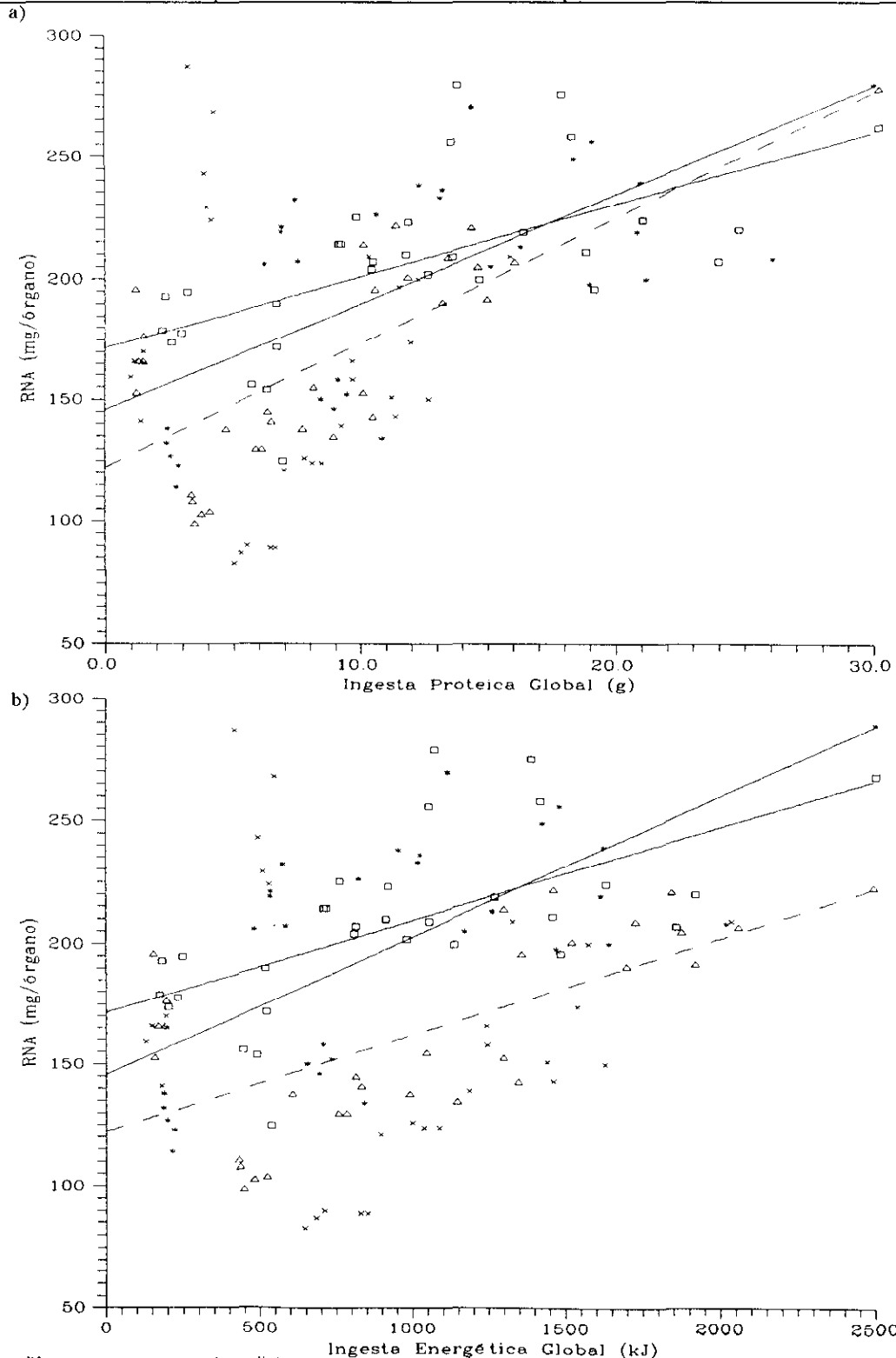
x - - - - 12% ♀	$y = -72,2 + x \cdot 0,36 \pm 0,03$
Δ - - - - 12% ♂	NS
* ——— 20% ♀	NS
\square ——— 20% ♂	$y = 339,7 - x \cdot 0,17 \pm 0,14$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo.

Gráfica 28. Relación entre el RNA muscular (Y) y las Ingestas Proteica (X) (a) y Energética (X) (b) en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

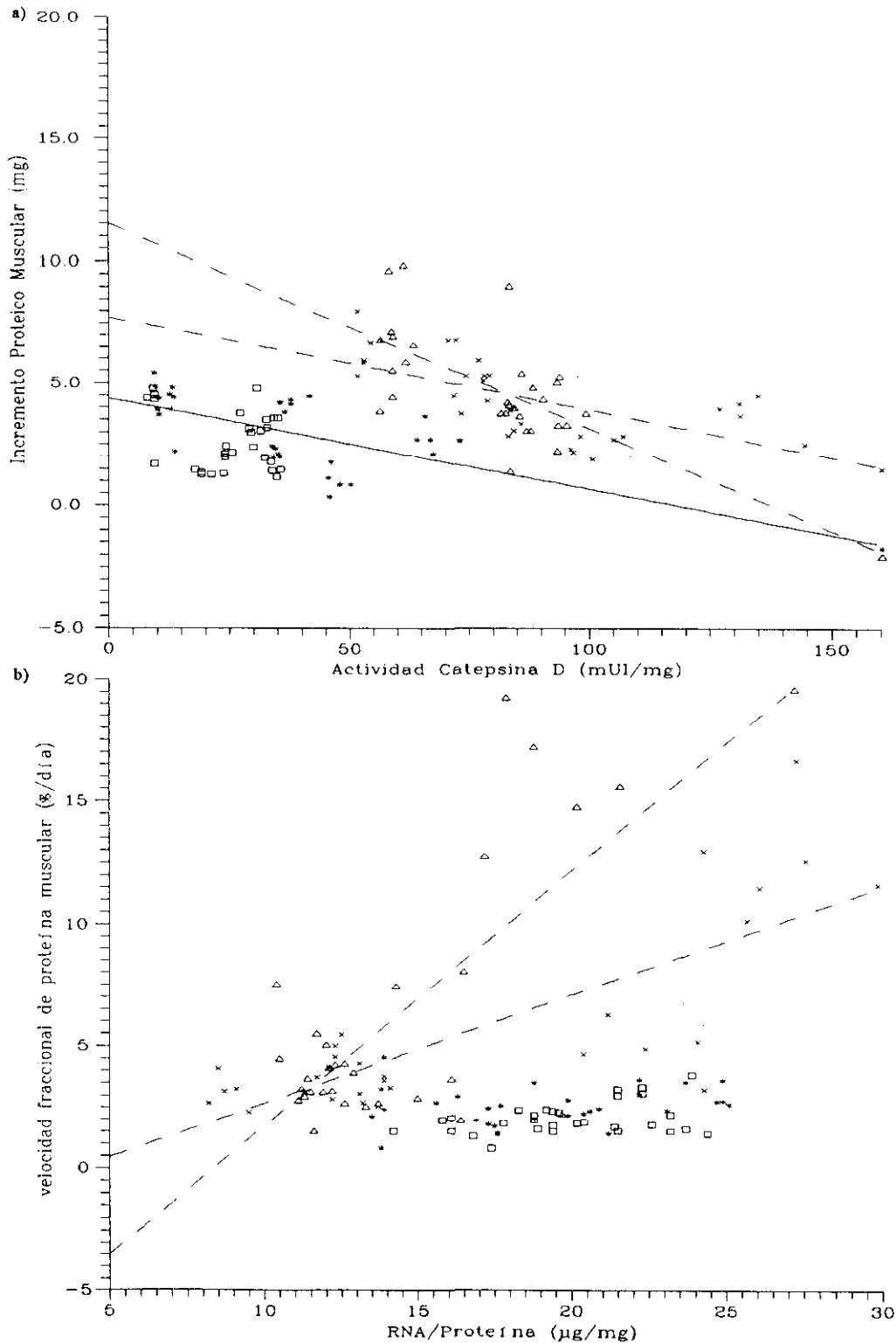
	a	b
x - - - - 12% ♀	NS	NS
Δ - - - - 12% ♂	$y = 122,2 + x \cdot 0,005 \pm 0,001^1$	$y = 112,2 + x \cdot 0,039 \pm 0,01^1$
* ——— 20% ♀	$y = 145,6 + x \cdot 0,040 \pm 0,001^a$	$y = 145,6 + x \cdot 0,057 \pm 0,01^a$
□ ——— 20% ♂	$y = 171,6 + x \cdot 0,029 \pm 0,008^{b2}$	$y = 171,6 + x \cdot 0,037 \pm 0,01^{b2}$



superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo

Gráfica 29. a) Relación entre el **Incremento acumulado de proteína muscular (Y)** y la **Actividad específica Catepsina D (X)**. b) Relación entre la **Velocidad fraccional de crecimiento de Proteína (Y)** y la razón **RNA/proteína (X)** en ratones BALB/c de ambos sexo entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	a	b
x ---- 12% ♀	$y = 7,7 - x \cdot 0,038 \pm 0,009^{a1}$	$y = -0,75 + x \cdot 0,44 \pm 0,06^a$
Δ ---- 12% ♂	$y = 11,5 - x \cdot 0,083 \pm 0,021^b$	$y = -4,16 + x \cdot 1,03 \pm 0,04^b$
* — 20% ♀	$y = 4,3 - x \cdot 0,037 \pm 0,008^{a1}$	NS
□ — 20% ♂	NS	NS

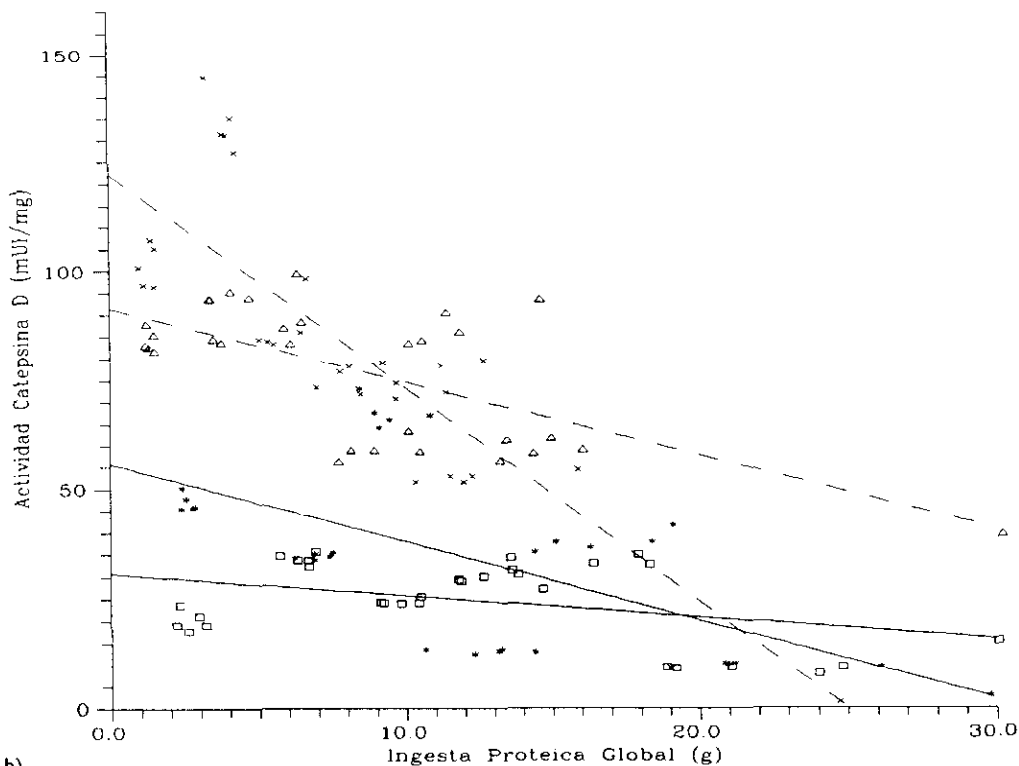


superíndices (diferencias entre pendientes): letras distintas indican dif. sig. entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican dif. sig. entre dietas para un mismo sexo.

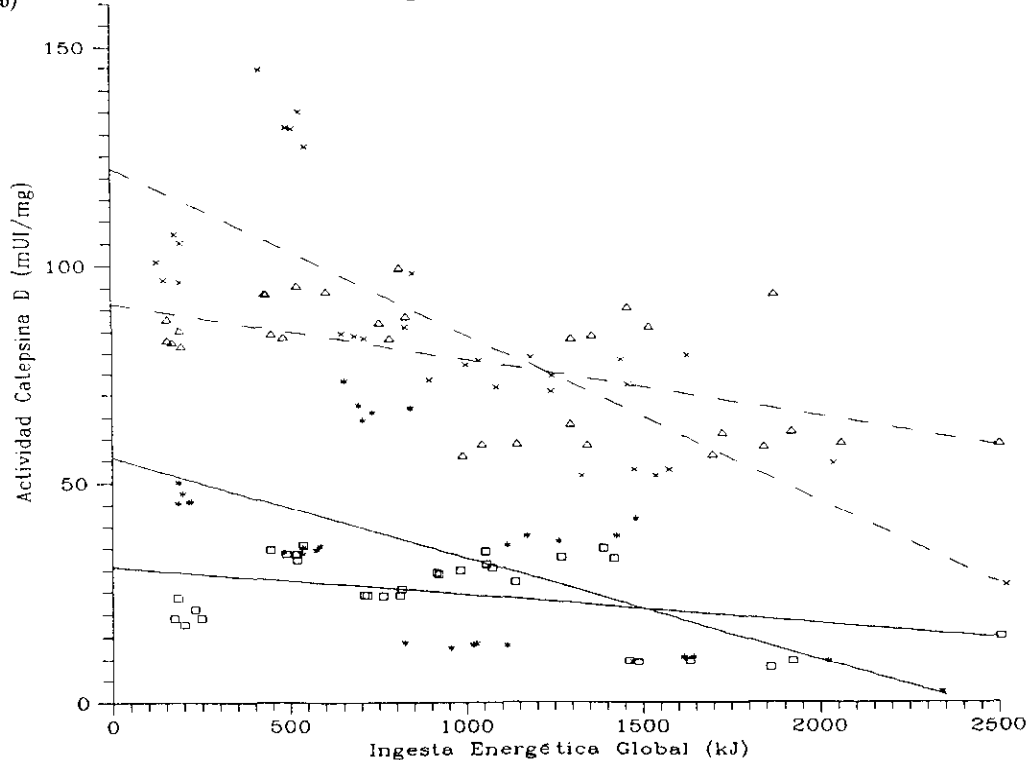
Gráfica 30. Relación entre la **Actividad específica Catepsina D (Y)** y las **Ingestas Proteica (X) (a)** y **Energética (X) (b)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados* (NT) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	a	b
x - - - - 12% ♀	$y = 122,24 - x \cdot 4,88 \pm 0,79^{a1}$	$y = 122,24 - x \cdot 0,038 \pm 0,006^{a1}$
Δ - - - - 12% ♂	$y = 91,42 - x \cdot 1,68 \pm 0,48^{b1}$	$y = 91,42 - x \cdot 0,013 \pm 0,003^{b1}$
* - - - - 20% ♀	$y = 55,84 - x \cdot 1,78 \pm 0,47^{a2}$	$y = 55,84 - x \cdot 0,023 \pm 0,006^{a2}$
□ - - - - 20% ♂	$y = 30,74 - x \cdot 0,49 \pm 0,24^{b2}$	$y = 30,74 - x \cdot 0,006 \pm 0,003^{b2}$

a)



b)



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo.

4.11. DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL RNA Y DEL ENZIMA CATEPSINA D EN MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATONES BALB/c NO TRATADOS (NT).

- *Relación entre el RNA muscular y la actividad específica de RNasa ácida (Gráfica 27).*

De acuerdo con las ecuaciones de regresión lineal correspondientes, se observa que sólo el grupo ♀ 12% NT presenta correlación lineal positiva, mientras que en los animales ♂ 20% NT la correlación es negativa. El resto de los grupos carecen de correlación lineal.

- *Relación entre el RNA muscular y las ingestas proteica (IP) y energética (IE) (Gráficas 28a y b).*

A excepción del grupo ♀ 12% NT que no presenta correlación alguna, el RNA total muscular del resto de los grupos es directamente proporcional al incremento de las ingestas proteica y energética. El grupo ♀ 20% NT deposita una mayor cantidad de RNA a partir de ingestas proteicas por encima de 16 g y de ingestas energéticas superiores a 1300 kj.

- *Relación entre la actividad específica de catepsina D y las ingestas proteica (IP) y energética (IE) (Gráficas 30a y b).*

Todos los grupos de animales estudiados presentan correlaciones lineales negativas entre los parámetros especificados, lo que significa que a medida que se incrementan las ingestas disminuye la actividad enzimática.

4.12. DINÁMICA DEL METABOLISMO PROTEICO DURANTE EL CRECIMIENTO DE MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c NO TRATADOS (NT).

- *Relación entre el incremento proteico muscular y la actividad específica de catepsina D (Gráfica 29a).*

Excepto el grupo ♂ 20% NT, todos los animales presentan una correlación lineal negativa entre los parámetros antedichos, de tal modo, que el incremento de la proteína muscular disminuye a medida que aumenta la actividad específica de catepsina D, especialmente en el grupo ♂ 12% NT.

- RELACIÓN ENTRE LA VELOCIDAD FRACCIONAL DE PROTEÍNA MUSCULAR Y LA RAZÓN RNA/PROTEÍNA (Gráfica 29b).

Sólo los grupos de animales NT sometidos al 12% de proteína presentan una correlación lineal entre la VFPrM y la capacidad de síntesis proteica, siendo el grupo ♂ 12% NT el que consigue una mayor VFPrM para un mismo valor de RNA/proteína.

Tabla 56. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la cantidad de RNA absoluto y relativo del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNA ABSOLUTO ($\mu\text{g}/\text{órgano}$)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	192 \pm 6 ^{a+}	210 \pm 3 ^{a++}	178 \pm 8 ^a	180 \pm 3 ^{a*}
Día 30	137 \pm 3 ^{b+}	123 \pm 1 ^{b++}	132 \pm 5 ^{b+}	99 \pm 7 ^{b++}
Día 35	121 \pm 3 ^c	112 \pm 3 ^{c*}	116 \pm 5 ^{c+}	135 \pm 3 ^{c+*}
Día 40	91 \pm 5 ^{d+}	106 \pm 5 ^{c++}	100 \pm 3 ^{d+}	121 \pm 2 ^{d++}
Día 45	103 \pm 2 ^{d++}	157 \pm 5 ^{d++}	127 \pm 3 ^{b++}	109 \pm 6 ^{bd++}
Día 50	134 \pm 6 ^{b*}	127 \pm 4 ^b	103 \pm 2 ^{d++}	134 \pm 3 ^{c+}

Edad	RNA RELATIVO (mg/g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	3,0 \pm 0,05 ^a	3,2 \pm 0,03 ^{a*}	2,9 \pm 0,05 ^a	3,0 \pm 0,04 ^{a*}
Día 30	2,5 \pm 0,07 ^{b++}	2,1 \pm 0,05 ^{b++}	2,7 \pm 0,07 ^{b++}	1,6 \pm 0,05 ^{b++}
Día 35	1,8 \pm 0,02 ^{c*}	1,7 \pm 0,02 ^{c*}	1,9 \pm 0,04 ^{c*}	2,0 \pm 0,07 ^{c*}
Día 40	1,4 \pm 0,01 ^{d++}	1,6 \pm 0,06 ^{d+}	1,3 \pm 0,01 ^{d++}	1,5 \pm 0,01 ^{b+}
Día 45	1,4 \pm 0,02 ^{d++}	2,1 \pm 0,02 ^{b++}	1,6 \pm 0,03 ^{e++}	1,2 \pm 0,04 ^{d++}
Día 50	1,6 \pm 0,03 ^{e*}	1,6 \pm 0,03 ^c	1,1 \pm 0,02 ^{f++}	1,7 \pm 0,01 ^{b+}

Cada valor es la media \pm error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 57. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la capacidad de síntesis proteica y sobre la razón RNA/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNA/PROTEÍNA (mg/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	20,3 ± 0,7 ^{a*}	20,7 ± 0,3 ^{a*}	23,0 ± 0,5 ^{a*}	22,7 ± 0,2 ^{a*}
Día 30	18,4 ± 0,1 ^{b+*}	11,6 ± 0,2 ^{b+*}	21,4 ± 0,1 ^{b+*}	7,9 ± 0,1 ^{b+*}
Día 35	14,6 ± 0,2 ^{c+}	13,7 ± 0,2 ^{c+}	14,6 ± 0,3 ^c	14,3 ± 0,1 ^c
Día 40	10,8 ± 0,2 ^{d*}	11,4 ± 0,3 ^{b*}	8,2 ± 0,1 ^{d*}	7,6 ± 0,1 ^{b*}
Día 45	12,6 ± 0,2 ^{e+*}	18,4 ± 0,1 ^{d+*}	10,4 ± 0,1 ^{e+*}	8,0 ± 0,1 ^{b+*}
Día 50	16,7 ± 0,1 ^{f+*}	13,4 ± 0,2 ^{c+*}	5,2 ± 0,1 ^{f+*}	8,0 ± 0,1 ^{b+*}

Edad	RNA/DNA (mg/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	1,7 ± 0,01 ^{a+}	1,1 ± 0,01 ^{a+*}	1,8 ± 0,04 ^a	1,8 ± 0,01 ^{a*}
Día 30	1,8 ± 0,02 ^{b+*}	1,2 ± 0,02 ^{b+*}	1,7 ± 0,02 ^{a+*}	1,3 ± 0,04 ^{b+*}
Día 35	1,3 ± 0,01 ^{c*}	1,3 ± 0,03 ^{c*}	1,5 ± 0,01 ^{b*}	1,5 ± 0,01 ^{c*}
Día 40	1,1 ± 0,01 ^d	1,2 ± 0,02 ^{b*}	1,1 ± 0,02 ^{c+}	1,3 ± 0,01 ^{d+*}
Día 45	1,2 ± 0,02 ^{e+*}	1,6 ± 0,03 ^{d+*}	1,5 ± 0,04 ^{b+*}	1,1 ± 0,03 ^{e+*}
Día 50	1,3 ± 0,02 ^{c*}	1,4 ± 0,02 ^{c*}	1,1 ± 0,02 ^{c+*}	1,5 ± 0,02 ^{c+*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 58. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la cantidad absoluta y relativa del enzima ribonucleasa ácida del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c, de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNasa ÁCIDA ABSOLUTA (mUI/órgano)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	6,2 ± 0,11 ^{a+*}	5,0 ± 0,15 ^{a+*}	4,1 ± 0,12 ^{a*}	3,8 ± 0,09 ^{a*}
Día 30	4,1 ± 0,15 ^{b+*}	3,0 ± 0,11 ^{b+*}	2,8 ± 0,11 ^{b+*}	3,8 ± 0,09 ^{a+*}
Día 35	3,3 ± 0,09 ^{c*}	3,4 ± 0,13 ^{c*}	4,5 ± 0,16 ^{c*}	4,8 ± 0,15 ^{b*}
Día 40	3,8 ± 0,16 ^{b*}	3,9 ± 0,17 ^{d*}	4,8 ± 0,15 ^{cd+*}	6,0 ± 0,06 ^{c+*}
Día 45	4,9 ± 0,11 ^d	5,1 ± 0,13 ^{a*}	5,0 ± 0,09 ^{d+}	5,5 ± 0,14 ^{d+*}
Día 50	5,7 ± 0,15 ^{c+*}	4,8 ± 0,10 ^{a+*}	7,4 ± 0,04 ^{e+*}	4,5 ± 0,10 ^{b+*}

Edad	RNasa ÁCIDA RELATIVA (mUI/g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	99,9 ± 0,4 ^{a+*}	74,3 ± 0,8 ^{a+*}	66,6 ± 0,5 ^{a+*}	61,8 ± 0,1 ^{a+*}
Día 30	73,2 ± 0,2 ^{b+*}	50,6 ± 0,6 ^{b+*}	57,3 ± 0,6 ^{b*}	57,2 ± 0,2 ^{b*}
Día 35	49,6 ± 0,3 ^{c*}	49,6 ± 0,5 ^{b*}	75,0 ± 0,5 ^{c+*}	69,5 ± 0,8 ^{c+*}
Día 40	57,3 ± 0,2 ^{d*}	58,5 ± 0,6 ^{c*}	62,3 ± 0,2 ^{d+*}	75,3 ± 0,1 ^{d+*}
Día 45	68,8 ± 0,4 ^{e*}	67,6 ± 0,1 ^{d*}	63,6 ± 0,1 ^{d+*}	57,4 ± 0,8 ^{b+*}
Día 50	64,6 ± 0,6 ^{f*}	64,9 ± 0,1 ^{e*}	76,7 ± 0,7 ^{e+*}	56,2 ± 0,5 ^{b+*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 59. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la actividad específica del enzima ribonucleasa ácida y sobre las razones RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNasa ÁCIDA/PROTEÍNA (mUI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,67 ± 0,014 ^{a+*}	0,48 ± 0,007 ^{a+}	0,53 ± 0,014 ^{a+*}	0,48 ± 0,001 ^{a+}
Día 30	0,55 ± 0,002 ^{b+*}	0,28 ± 0,006 ^{b+}	0,46 ± 0,011 ^{b+*}	0,29 ± 0,002 ^{b+}
Día 35	0,40 ± 0,008 ^{c*}	0,40 ± 0,006 ^{c*}	0,56 ± 0,003 ^{c+*}	0,51 ± 0,003 ^{c+*}
Día 40	0,44 ± 0,008 ^{d*}	0,42 ± 0,005 ^{d*}	0,41 ± 0,002 ^{d+*}	0,38 ± 0,005 ^{d+*}
Día 45	0,61 ± 0,006 ^{e*}	0,59 ± 0,006 ^{e*}	0,41 ± 0,005 ^{d+*}	0,37 ± 0,006 ^{d+*}
Día 50	0,69 ± 0,018 ^{a+*}	0,53 ± 0,005 ^{f+*}	0,38 ± 0,009 ^{e+*}	0,27 ± 0,002 ^{e+*}

Edad	RNasa ÁCIDA/DNA (mUI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	56,3 ± 0,5 ^{a+*}	25,8 ± 0,4 ^{a+*}	40,8 ± 0,6 ^{a+*}	36,7 ± 0,3 ^{a+*}
Día 30	54,7 ± 0,6 ^{b+*}	29,2 ± 0,4 ^{b+*}	37,9 ± 1,0 ^{b+*}	47,8 ± 0,9 ^{b+*}
Día 35	35,5 ± 0,3 ^{c+*}	37,8 ± 1,1 ^{c+*}	59,5 ± 0,5 ^{c+*}	53,7 ± 0,5 ^{c+*}
Día 40	45,6 ± 0,4 ^{d*}	44,5 ± 0,7 ^{d*}	52,3 ± 0,5 ^{d+*}	61,5 ± 0,8 ^{d+*}
Día 45	58,7 ± 0,4 ^{e+*}	51,9 ± 0,6 ^{e+}	60,4 ± 0,7 ^{c+*}	52,7 ± 0,9 ^{ce+}
Día 50	53,3 ± 0,7 ^{b*}	53,6 ± 1,1 ^{e*}	80,2 ± 1,2 ^{e+*}	51,2 ± 0,5 ^{e+*}

Edad	RNasa ÁCIDA/RNA (mUI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	32,9 ± 0,7 ^{a+*}	23,4 ± 0,4 ^{a+*}	23,2 ± 0,2 ^{a+*}	20,9 ± 0,3 ^{a+*}
Día 30	30,0 ± 0,8 ^{b+*}	24,2 ± 0,7 ^{a+*}	21,5 ± 0,4 ^{a+*}	36,6 ± 1,1 ^{b+*}
Día 35	27,3 ± 0,5 ^{c*}	28,8 ± 0,5 ^{b*}	38,7 ± 1,1 ^{b+*}	35,6 ± 1,0 ^{b+*}
Día 40	41,0 ± 0,2 ^{d+*}	37,4 ± 0,9 ^{c+*}	49,3 ± 0,4 ^{c*}	49,1 ± 0,2 ^{c*}
Día 45	48,0 ± 0,7 ^{e+*}	32,3 ± 0,3 ^{d+*}	39,8 ± 0,7 ^{b+*}	46,2 ± 1,2 ^{d+*}
Día 50	41,4 ± 0,8 ^{d*}	39,5 ± 0,7 ^{f*}	73,7 ± 1,4 ^{d+*}	34,0 ± 0,4 ^{c+*}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 60. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la cantidad absoluta y relativa del enzima catepsina D del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	CATEPSINA D ABSOLUTA (mUI/órgano)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	338 ± 21 ^{a++}	424 ± 7 ^{a++}	894 ± 12 ^{a++}	534 ± 15 ^{a++}
Día 30	257 ± 17 ^{b++}	456 ± 15 ^{a++}	773 ± 13 ^{b++}	944 ± 10 ^{b++}
Día 35	256 ± 10 ^{b++}	451 ± 10 ^{a++}	569 ± 16 ^{c++}	521 ± 10 ^{a++}
Día 40	353 ± 15 ^{a++}	527 ± 10 ^{b++}	752 ± 18 ^{b*}	763 ± 15 ^{c*}
Día 45	409 ± 7 ^{c++}	346 ± 10 ^{c++}	1530 ± 27 ^{d++}	1291 ± 30 ^{d++}
Día 50	253 ± 15 ^{b*}	260 ± 15 ^{d*}	1330 ± 41 ^{c++}	982 ± 31 ^{b++}

Edad	CATEPSINA D RELATIVA (mUI/g)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	5,37 ± 0,09 ^{a++}	6,31 ± 0,08 ^{a++}	14,2 ± 0,13 ^{a++}	8,94 ± 0,10 ^{a++}
Día 30	4,63 ± 0,05 ^{b++}	7,81 ± 0,06 ^{b++}	15,6 ± 0,08 ^{b++}	15,0 ± 0,09 ^{b++}
Día 35	3,88 ± 0,06 ^{c++}	6,45 ± 0,14 ^{a++}	9,66 ± 0,09 ^{c++}	7,56 ± 0,09 ^{c++}
Día 40	5,41 ± 0,14 ^{a++}	7,84 ± 0,05 ^{b++}	9,25 ± 0,16 ^{d*}	9,59 ± 0,13 ^{d*}
Día 45	5,66 ± 0,12 ^{a++}	4,61 ± 0,15 ^{c++}	18,9 ± 0,23 ^{e++}	15,1 ± 0,03 ^{b++}
Día 50	2,96 ± 0,05 ^{d++}	3,36 ± 0,03 ^{d++}	13,9 ± 0,05 ^{a++}	9,54 ± 0,05 ^{d++}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P<0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 61. Influencia de la Edad, la Dieta y el Sexo sobre la actividad específica del enzima catepsina D y sobre la razón catepsina D/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	CATEPSINA D/PROTEÍNA (mUI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	35,8 ± 0,9 ^{a++}	41,0 ± 0,8 ^{a++}	113,5 ± 3,0 ^{a++}	68,9 ± 0,9 ^{a++}
Día 30	34,6 ± 0,3 ^{a++}	43,4 ± 0,3 ^{b++}	124,2 ± 2,2 ^{b++}	75,6 ± 0,3 ^{b++}
Día 35	31,0 ± 0,9 ^{b++}	51,4 ± 0,4 ^{c++}	72,7 ± 1,3 ^{c++}	55,1 ± 0,7 ^{c++}
Día 40	42,0 ± 0,1 ^{c++}	56,8 ± 1,0 ^{d++}	60,3 ± 1,3 ^{d++}	47,9 ± 0,8 ^{d++}
Día 45	49,8 ± 0,5 ^{d++}	40,6 ± 0,8 ^{a++}	123,0 ± 3,1 ^{b++}	96,9 ± 0,6 ^{c++}
Día 50	31,6 ± 0,3 ^{b++}	27,3 ± 0,1 ^{c++}	68,0 ± 1,0 ^{c++}	46,2 ± 0,4 ^{d++}

Edad	CATEPSINA D/DNA (mUI/mg)			
	12% PROTEÍNA		20% PROTEÍNA	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	3,0 ± 0,05 ^{a++}	2,2 ± 0,03 ^{a++}	8,7 ± 0,13 ^{a++}	5,3 ± 0,09 ^{a++}
Día 30	3,5 ± 0,02 ^{b++}	4,5 ± 0,03 ^{b++}	10,3 ± 0,20 ^{b++}	12,6 ± 0,29 ^{b++}
Día 35	2,8 ± 0,05 ^{c++}	4,9 ± 0,07 ^{c++}	7,7 ± 0,03 ^{c++}	5,8 ± 0,07 ^{c++}
Día 40	4,3 ± 0,11 ^{d++}	6,0 ± 0,03 ^{d++}	7,8 ± 0,14 ^{c*}	7,8 ± 0,18 ^{d*}
Día 45	4,8 ± 0,07 ^{e++}	3,5 ± 0,11 ^{e++}	17,9 ± 0,21 ^{d++}	13,8 ± 0,15 ^{c++}
Día 50	2,4 ± 0,05 ^{f++}	2,8 ± 0,05 ^{f++}	14,5 ± 0,19 ^{c++}	8,7 ± 0,01 ^{f++}

Cada valor es la media ± error estándar de la media para 5 ratones/día.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas edad-dependientes.

+ indica diferencias significativas entre sexos para una misma edad e igual nivel proteico.

* indica diferencias significativas entre niveles proteicos para una misma edad e igual sexo.

P < 0,05 según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 62. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), la Dieta (D) y el Sexo (S) sobre el estudio del metabolismo del RNA y la capacidad de síntesis proteica² del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	RNA/órgano	RNA/g	RNA/Proteína	RNA/DNA	RNasa/órgano	RNasa/g	RNasa/Proteína	RNasa/DNA	RNasa/RNA
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001
SEXO	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DxS	NS	0,0001	0,0001	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0035
ExDxS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad ($p < 0,05$). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: RNA absoluto (RNA/órgano) y relativo (RNA/g), capacidad de síntesis (RNA/proteína), la razón RNA/DNA, RNasa ácida absoluta (RNasa/órgano) y relativa (RNasa/g), actividad específica RNasa ácida/proteína (RNasa/Proteína) y las razones RNasa ácida/DNA (RNasa/DNA) y RNasa ácida/RNA (RNasa/RNA).

Tabla 63. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), la Dieta (D) y el Sexo (S) sobre la degradación proteica² del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	Catepsina/órgano	Catepsina/g	Catepsina/Proteína	Catepsina/DNA
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
SEXO	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DxS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExDxS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad ($P < 0,05$). NS - No significativo

2. Variables dependientes: Catepsina D/órgano, catepsina D/g, catepsina D/proteína y catepsina D/DNA.

Tabla 64. Relación con la Edad de las variables: RNA absoluto y relativo, capacidad de síntesis proteica y razón RNA/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos, entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
RNA/órgano	♀	$y=0,172 - x \cdot 0,0023$	0,0005 ^{a1}	-0,627	0,0003	$y=0,166 - x \cdot 0,0023$	0,000 ^{a1}	-0,716	0,0000
	♂	$y=0,170 - x \cdot 0,0018$	0,0007 ^{a1}	-0,423	NS	$y=0,150 - x \cdot 0,0012$	0,000 ^{a1}	-0,379	NS
RNA/g	♀	$y=3,036 - x \cdot 0,062$	0,006 ^{a1}	-0,872	0,0000	$y=3,205 - x \cdot 0,074$	0,006 ^{a1}	-0,922	0,0000
	♂	$y=2,833 - x \cdot 0,044$	0,008 ^{a1}	-0,694	0,0000	$y=2,610 - x \cdot 0,045$	0,008 ^{b1}	-0,694	0,0000
RNA/proteína	♀	$y=19,440 - x \cdot 0,221$	0,060 ^{a1}	-0,570	0,0010	$y=26,668 - x \cdot 0,734$	0,045 ^{a2}	-0,950	0,0000
	♂	$y=16,745 - x \cdot 0,107$	0,075 ^{a1}	-0,261	NS	$y=19,451 - x \cdot 0,457$	0,087 ^{b2}	-0,701	0,0000
RNA/DNA	♀	$y=1,826 - x \cdot 0,023$	0,003 ^{a1}	-0,756	0,0000	$y=1,903 - x \cdot 0,025$	0,004 ^{a1}	-0,762	0,0000
	♂	$y=1,061 + x \cdot 0,013$	0,002 ^{a1}	0,691	0,0000	$y=1,611 - x \cdot 0,011$	0,003 ^{b2}	-0,477	0,0076

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.
r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.
En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.
Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.
 $p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

Tabla 65. Relación con la Edad de las variables: Cantidad absoluta y relativa del enzima RNasa ácida, actividad específica RNasa ácida/proteína y las razones RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
RNasa ácida/ órgano	♀	$y=4,619 + x \cdot 0,0023$	0,0236 ^{a1}	0,018	NS	$y=2,453 + x \cdot 0,1322$	0,017 ^{a2}	0,822	0,0000
	♂	$y=3,611 + x \cdot 0,0329$	0,0180 ^{a1}	0,325	NS	$y=3,765 + x \cdot 0,0547$	0,015 ^{b1}	0,562	0,0012
RNasa ácida/g	♀	$y=91,124 - x \cdot 1,125$	0,253 ^{a1}	-0,663	0,0002	$y=61,268 + x \cdot 0,323$	0,141 ^{a2}	0,397	NS
	♂	$y=63,155 - x \cdot 0,022$	0,187 ^{b1}	-0,024	NS	$y=65,090 - x \cdot 0,123$	0,157 ^{b1}	-0,146	NS
RNasa ácida/ proteína	♀	$y=0,5244 + x \cdot 0,0019$	0,002 ^{a1}	0,151	NS	$y=0,5654 - x \cdot 0,0061$	0,001 ^{a2}	-0,739	0,0000
	♂	$y=0,3322 + x \cdot 0,0067$	0,001 ^{a1}	0,574	0,0009	$y=0,4723 - x \cdot 0,0052$	0,001 ^{a2}	-0,507	0,0042
RNasa ácida/ DNA	♀	$y=49,940 + x \cdot 0,0417$	0,176 ^{a1}	0,044	NS	$y=29,471 + x \cdot 1,4686$	0,144 ^{a2}	0,886	0,0000
	♂	$y=19,086 + x \cdot 1,2216$	0,049 ^{b1}	0,977	0,0000	$y=41,125 + x \cdot 0,5421$	0,132 ^{b2}	0,611	0,0003
RNasa ácida/ RNA	♀	$y=25,739 + x \cdot 0,629$	0,112 ^{a1}	0,727	0,0000	$y=9,191 + x \cdot 1,8193$	0,184 ^{a2}	0,881	0,0000
	♂	$y=19,612 + x \cdot 0,647$	0,063 ^{a1}	0,887	0,0000	$y=26,294 + x \cdot 0,6160$	0,169 ^{b1}	0,566	0,0011

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

Tabla 66. Relación con la Edad de las variables: cantidad absoluta y relativa del enzima catepsina D, actividad específica catepsina D/proteína y la razón catepsina D/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variable	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.	ecuación ^(A)	error ^(B)	r	sig.
Catepsina D/ órgano	♀	$y=0,298 + x \cdot 0,0007$	0,0014 ^{a1}	0,093	NS	$y=0,511 + x \cdot 0,0264$	0,0057 ^{a2}	0,657	0,0001
	♂	$y=0,518 - x \cdot 0,0061$	0,0015 ^{b1}	-0,590	0,0006	$y=0,486 + x \cdot 0,0201$	0,0046 ^{a2}	0,630	0,0002
Catepsina D/g	♀	$y=5,395 - x \cdot 0,042$	0,020 ^{a1}	-0,369	NS	$y=12,78 + x \cdot 0,045$	0,073 ^{a2}	0,116	NS
	♂	$y=8,35 - x \cdot 0,131$	0,026 ^{b1}	-0,684	0,0000	$y=10,43 + x \cdot 0,029$	0,065 ^{a2}	0,085	NS
Catepsina D/ proteína	♀	$y=33,96 + x \cdot 0,201$	0,142 ^{a1}	0,257	NS	$y=117,97 - x \cdot 1,390$	0,546 ^{a2}	-0,433	NS
	♂	$y=50,60 - x \cdot 0,409$	0,192 ^{b1}	-0,372	NS	$y=70,77 - x \cdot 0,324$	0,388 ^{b1}	-0,155	NS
Catepsina D/DNA	♀	$y=3,19 + x \cdot 0,015$	0,018 ^{a1}	0,155	NS	$y=5,93 + x \cdot 0,297$	0,063 ^{a2}	0,662	0,0001
	♂	$y=3,87 + x \cdot 0,006$	0,028 ^{a1}	0,040	NS	$y=6,73 + x \cdot 0,130$	0,066 ^{b2}	0,345	NS

(A) Ecuaciones de regresión entre cada variable dependiente (Y) y la Edad (X). (B) error estándar de la pendiente.

r - Coeficiente de regresión lineal de Pearson. sig. - significación de la correlación. NS - No significativa.

En cada variable: Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para un mismo nivel dietario.

Números distintos indican diferencias significativas entre niveles proteicos para un mismo sexo.

$p < 0,01$ según análisis *Dummy variables*.

4.13. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL METABOLISMO PROTEICO Y DEL RNA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS, ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA, TRATADOS CON rhGH (T) Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 y 20%) (Tablas 56-66).

La EDAD afecta muy significativamente a los parámetros relacionados con el RNA y el enzima catepsina D de los animales T, de acuerdo con el análisis de la varianza de tres factores (Tablas 62 y 63).

La cantidad absoluta y relativa de RNA, así como la capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) y la cantidad de RNA por célula (RNA/DNA), disminuyen en todos los grupos de animales tratados a lo largo del período experimental, en especial a día 30 de vida, a excepción del grupo ♂ 12% T cuya razón RNA/DNA presenta un ligero aumento (27%) respecto al valor inicial (Tablas 56 y 57). Ello da lugar a una correlación temporal significativa de todos los parámetros, excepto los valores de RNA/órgano y RNA/proteína del grupo ♂ 12% T y RNA/órgano del grupo ♂ 20% T, que no resultan correlativos con la edad (Tabla 64).

Los distintos valores que se relacionan con el enzima RNasa ácida, se modifican de forma desigual según el test de comparación múltiple LSD (Tablas 58 y 59), presentando una gran variabilidad en sus correlaciones temporales (Tabla 65).

Se puede destacar que en los animales del 12% T se incrementan las razones RNasa ácida/proteína, RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA, mientras disminuye o se mantiene la cantidad total de RNasa ácida (Tablas 58 y 59).

Por su parte los ratones 20% T aumentan todos los parámetros relacionados con el enzima, a excepción de la razón RNasa/proteína cuyo descenso presenta una buena correlación temporal (Tablas 58, 59 y 65).

Los valores relacionados con el enzima catepsina D, en general, descienden en los grupos 12% T, aumentando en los animales 20% T, excepto la razón catepsina/proteína que disminuye en estos últimos (Tablas 60 y 61).

A excepción del valor RNasa ácida/g, el resto de los parámetros estudiados están influidos por la DIETA según el análisis de varianza de tres factores (Tablas 62 y 63), pero su efecto es muy aleatorio sobre los valores RNA/órgano, RNA/g y RNA/DNA (Tablas 56 y 57), RNasa ácida/órgano y RNasa ácida/g (Tabla 58), en los que se comprueban oscilaciones en sentido opuesto a lo largo de la experiencia.

Por otra parte, mientras las razones RNA/proteína y RNasa ácida/proteína disminuyen (Tablas 57 y 59) las relaciones RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA sufren aumentos significativos en los animales ♀ y ♂ 20% T respecto a los animales 12% T.

Por el contrario, los parámetros estudiados relacionados con el enzima catepsina D se modifican en razón directa de la dieta suministrada, incrementándose en los animales T sometidos al 20% de proteína y disminuyendo en los del 12% (Tablas 60 y 61).

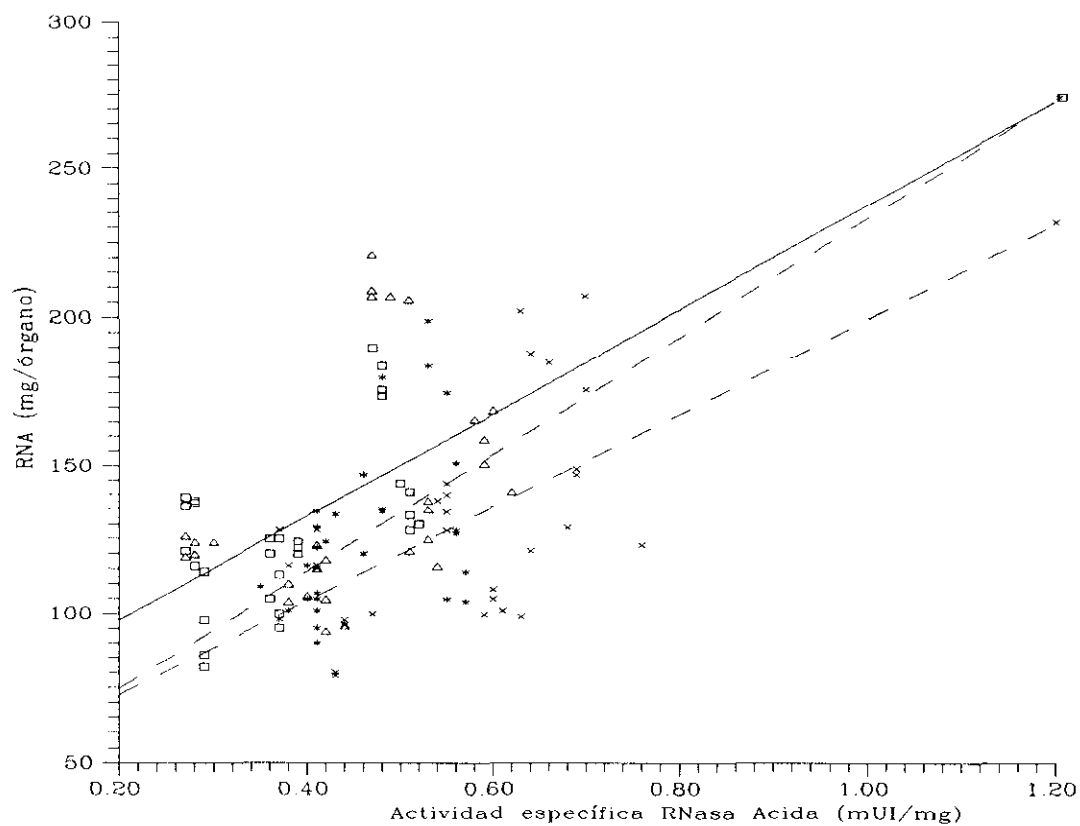
Aún cuando el ANOVA de tres factores (Tabla 62) señala la influencia del SEXO sobre todos los parámetros estudiados, a excepción del valor RNA/g, es difícil señalar un efecto claro de este factor por medio del test LSD, debido a la pronunciada oscilación de los valores (Tablas 56-61).

Del estudio estadístico de las rectas de regresión destaca, que bien en sentido positivo o negativo, los parámetros estudiados en los animales 20% T presentan en general evoluciones temporales más rápidas que en los grupos de menor nivel proteico (12% T), siendo los animales ♀ quienes obtienen crecimientos más veloces (Tablas 64, 65 y 66).

Estas modificaciones se relacionan con la influencia muy significativa de las interacciones ExD, ExS y ExDxS. También la interacción DxS resulta significativa según el ANOVA trifactorial (Tablas 62 y 63).

Gráfica 31. Relación entre **RNA muscular (Y)** y la **Actividad específica RNasa ácida (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

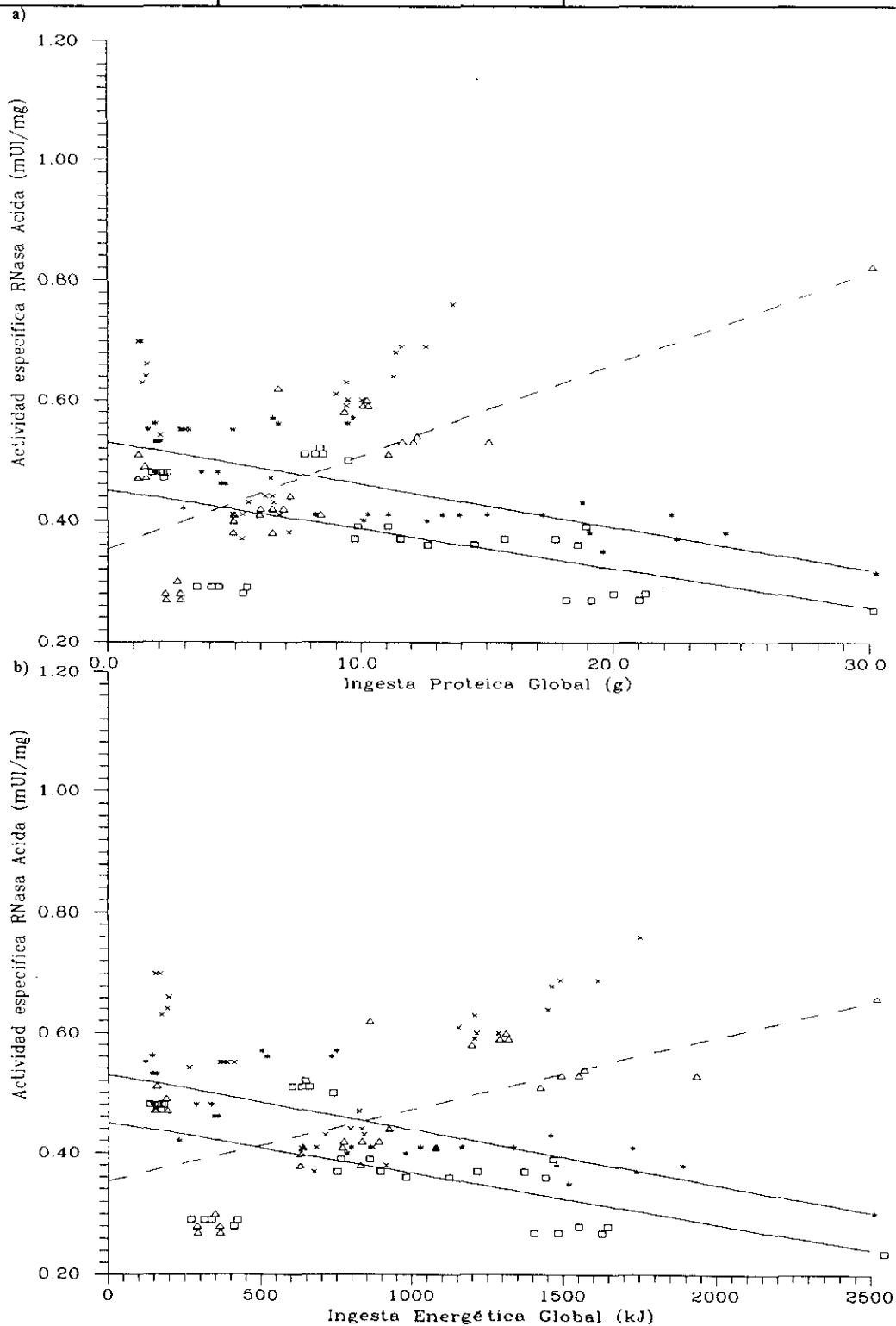
x - - - - 12% ♀	$y = 40,8 + x \cdot 0,158 \pm 0,01^1$
△ - - - - 12% ♂	NS
* - - - - 20% ♀	$y = 34,9 + x \cdot 0,198 \pm 0,01^{a2}$
□ - - - - 20% ♂	$y = 62,8 + x \cdot 0,174 \pm 0,01^a$



superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo .

Gráfica 32. Relación entre la **Actividad específica RNasa ácida (Y)** y las **Ingestas Proteica (X) (a)** y **Energética (X) (b)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *Tratados con rhGH* (T) y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	a	b
x - - - - 12% ♀	NS	NS
Δ - - - - 12% ♂	$y = 0,35 + x \cdot 0,015 \pm 0,003^1$	$y = 0,35 + x \cdot 0,0012 \pm 0,00003^1$
* ——— 20% ♀	$y = 0,53 - x \cdot 0,007 \pm 0,001^a$	$y = 0,53 - x \cdot 0,0009 \pm 0,00002^a$
□ ——— 20% ♂	$y = 0,44 - x \cdot 0,006 \pm 0,002^{a2}$	$y = 0,44 - x \cdot 0,0008 \pm 0,00003^{a2}$

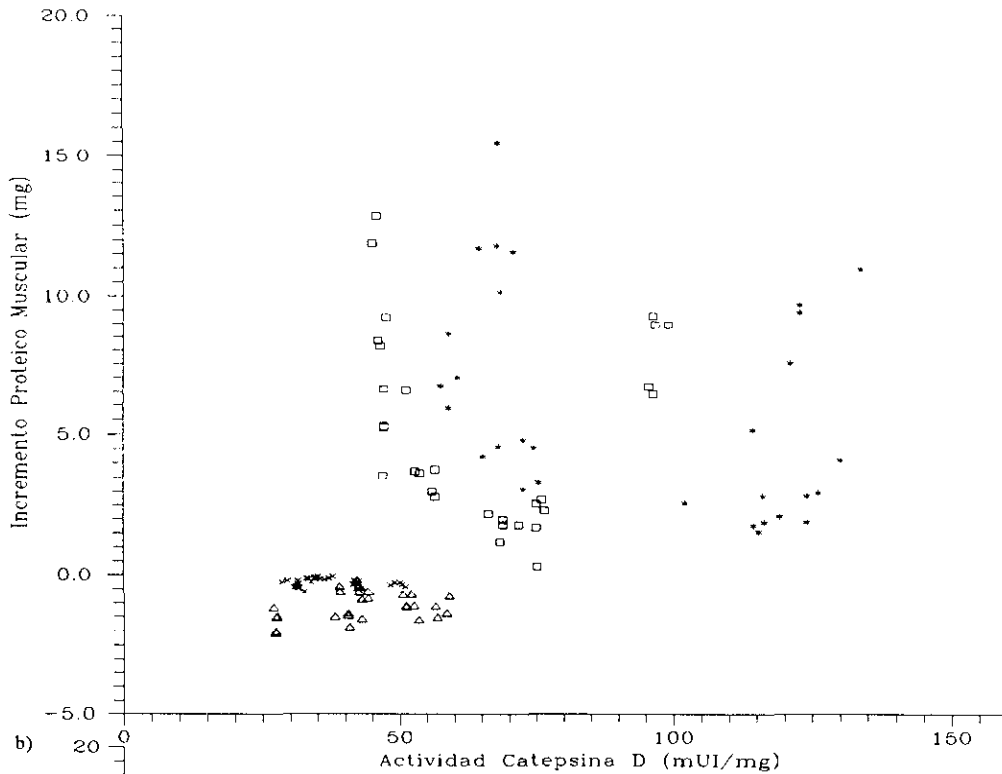


superíndices (diferencias entre pendientes): Letras distintas indican diferencias significativas entre sexos para una misma dieta. Números distintos indican diferencias significativas entre dietas para un mismo sexo.

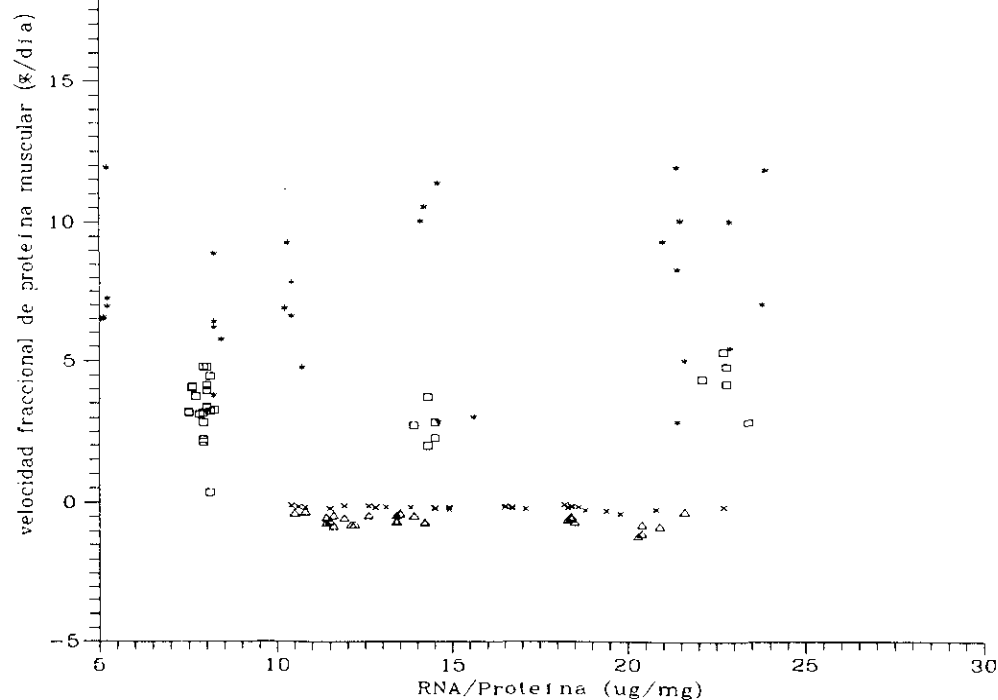
Gráfica 33. a) Relación entre el **Incremento acumulado de proteína muscular (Y)** y la **Actividad específica catepsina D (X)**. b) Relación entre la **Velocidad fraccional de proteína muscular (Y)** y la razón **RNA/proteína (X)** en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	a	b
x - - - - 12% ♀	NS	NS
Δ - - - - 12% ♂	NS	NS
* - - - - 20% ♀	NS	NS
□ - - - - 20% ♂	NS	NS

a)



b)



NS. Correlación lineal no significativa.

4.14. DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL RNA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATONES BALB/c TRATADOS CON rhGH (T).

- *Relación entre el RNA muscular y la actividad específica de RNasa ácida (Gráfica 31).*

Ambos parámetros están correlacionados linealmente en todos los animales estudiados, a excepción del grupo ♂ 12% T, de tal modo, que el contenido total de RNA se incrementa a medida que aumenta la actividad RNasa ácida.

- *Relación entre la actividad específica de RNasa ácida y las ingestas proteica (IP) y energética (IE) (Gráficas 32a y b).*

La correlación lineal entre ambos parámetros depende del nivel proteico de la dieta. La actividad RNasa ácida del grupo ♂ 12% T es directamente proporcional al incremento de ambas ingestas, mientras que es inversamente proporcional en los grupos ♀ y ♂ 20% T. El grupo ♀ 12% T no resulta significativo.

4.15. DINÁMICA DEL METABOLISMO PROTEICO DURANTE EL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO EN RATONES BALB/c TRATADOS CON rhGH (T).

- *Relación entre el incremento proteico muscular y la actividad específica de catepsina D (Gráfica 33a).*

No existe correlación lineal. Compárese con la gráfica 29a (animales NT).

- *Relación entre la velocidad fraccional de proteína muscular y la razón RNA/proteína (Gráfica 33b).*

No existe correlación lineal. Compárese con la gráfica 29b (animales NT).

Tabla 67. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre la cantidad de RNA absoluto y relativo del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNA ABSOLUTO ($\mu\text{g}/\text{organo}$)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	160 \pm 5*	172 \pm 7*	192 \pm 6*	210 \pm 3*	127 \pm 4*	184 \pm 4	178 \pm 8*	180 \pm 3
Día 30	250 \pm 12*	105 \pm 2*	137 \pm 3*	123 \pm 1*	217 \pm 5*	159 \pm 11*	132 \pm 5*	99 \pm 7*
Día 35	88 \pm 1*	137 \pm 3*	121 \pm 3*	112 \pm 3*	148 \pm 4*	213 \pm 4*	116 \pm 5*	135 \pm 3*
Día 40	127 \pm 3*	145 \pm 4*	91 \pm 5*	106 \pm 5*	241 \pm 8*	209 \pm 4*	100 \pm 3*	121 \pm 2*
Día 45	154 \pm 4*	208 \pm 5*	103 \pm 2*	157 \pm 5*	239 \pm 13*	257 \pm 11*	127 \pm 3*	109 \pm 6*
Día 50	198 \pm 6*	204 \pm 6*	134 \pm 6*	127 \pm 4*	213 \pm 8*	212 \pm 5*	103 \pm 2*	134 \pm 3*

Edad	RNA RELATIVO (mg/g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	3,5 \pm 0,09*	2,6 \pm 0,08*	3,0 \pm 0,05*	3,2 \pm 0,03*	2,2 \pm 0,02*	3,0 \pm 0,09	2,9 \pm 0,05*	3,0 \pm 0,04
Día 30	2,6 \pm 0,08*	1,4 \pm 0,05*	2,5 \pm 0,07*	2,1 \pm 0,05*	2,6 \pm 0,06	2,2 \pm 0,08*	2,7 \pm 0,07	1,6 \pm 0,05*
Día 35	1,2 \pm 0,02*	1,7 \pm 0,02	1,8 \pm 0,02*	1,7 \pm 0,02	1,9 \pm 0,06	2,7 \pm 0,06*	1,9 \pm 0,04	2,0 \pm 0,07*
Día 40	1,6 \pm 0,01*	1,9 \pm 0,04*	1,4 \pm 0,01*	1,6 \pm 0,06*	3,0 \pm 0,06*	2,5 \pm 0,08*	1,3 \pm 0,01*	1,5 \pm 0,01*
Día 45	2,0 \pm 0,05*	2,5 \pm 0,08*	1,4 \pm 0,02*	2,1 \pm 0,02*	2,6 \pm 0,07*	2,5 \pm 0,03*	1,6 \pm 0,03*	1,2 \pm 0,04*
Día 50	2,2 \pm 0,03*	2,1 \pm 0,07*	1,6 \pm 0,03*	1,6 \pm 0,03*	2,2 \pm 0,04*	2,2 \pm 0,08*	1,1 \pm 0,02*	1,7 \pm 0,01*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0,05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 68. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre la capacidad de síntesis proteica y sobre la razón RNA/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNA/PROTEÍNA (mg/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	26,6 ± 0,4*	19,1 ± 0,3	20,3 ± 0,7*	20,7 ± 0,3	13,8 ± 0,1*	22,3 ± 0,4	23,0 ± 0,5*	22,7 ± 0,2
Día 30	24,7 ± 0,7*	11,1 ± 0,2	18,4 ± 0,1*	11,6 ± 0,2	24,5 ± 0,4*	19,5 ± 0,6*	21,4 ± 0,1*	7,9 ± 0,0*
Día 35	8,9 ± 0,1*	13,2 ± 0,1	14,6 ± 0,2*	13,7 ± 0,2	17,3 ± 0,5*	23,4 ± 0,3*	14,6 ± 0,3*	14,3 ± 0,1*
Día 40	11,9 ± 0,1*	11,9 ± 0,1	10,8 ± 0,2*	11,4 ± 0,3	22,0 ± 0,5*	18,9 ± 0,6*	8,2 ± 0,0*	7,6 ± 0,1*
Día 45	13,1 ± 0,3	17,0 ± 0,2*	12,6 ± 0,2	18,4 ± 0,0*	19,9 ± 0,3*	19,6 ± 0,5*	10,4 ± 0,1*	8,0 ± 0,2*
Día 50	13,3 ± 0,2*	11,9 ± 0,1*	16,7 ± 0,1*	13,4 ± 0,2*	17,2 ± 0,3*	15,9 ± 0,5*	5,2 ± 0,0*	8,0 ± 0,0*

Edad	RNA/DNA (mg/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	1,5 ± 0,04*	0,7 ± 0,02*	1,7 ± 0,01*	1,1 ± 0,01*	1,3 ± 0,02*	1,3 ± 0,02*	1,8 ± 0,04*	1,8 ± 0,01*
Día 30	1,1 ± 0,03*	1,0 ± 0,03*	1,8 ± 0,02*	1,2 ± 0,02*	1,0 ± 0,03*	1,2 ± 0,03*	1,7 ± 0,02*	1,3 ± 0,04*
Día 35	0,9 ± 0,00*	0,8 ± 0,01*	1,3 ± 0,01*	1,3 ± 0,03*	1,0 ± 0,02*	1,0 ± 0,02*	1,5 ± 0,01*	1,5 ± 0,01*
Día 40	0,8 ± 0,01*	0,8 ± 0,01*	1,1 ± 0,01*	1,2 ± 0,02*	1,2 ± 0,02*	0,6 ± 0,01*	1,1 ± 0,02*	1,3 ± 0,01*
Día 45	0,7 ± 0,02*	0,9 ± 0,01*	1,2 ± 0,02*	1,6 ± 0,03*	1,0 ± 0,01*	1,0 ± 0,01*	1,5 ± 0,04*	1,1 ± 0,02*
Día 50	0,8 ± 0,01*	0,9 ± 0,01*	1,3 ± 0,02*	1,4 ± 0,02*	0,9 ± 0,01*	0,6 ± 0,01*	1,1 ± 0,02*	1,5 ± 0,02*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0,05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 69. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre la cantidad absoluta y relativa del enzima ribonucleasa ácida del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	RNasa ÁCIDA ABSOLUTA (mUI/órgano)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	3,5 ± 0,07*	5,9 ± 0,07*	6,2 ± 0,11*	5,0 ± 0,15*	6,1 ± 0,21*	6,5 ± 0,15*	4,1 ± 0,12*	3,8 ± 0,09*
Día 30	8,2 ± 0,16*	6,3 ± 0,18*	4,1 ± 0,15*	3,0 ± 0,11*	9,2 ± 0,07*	8,7 ± 0,15*	2,8 ± 0,11*	3,8 ± 0,09*
Día 35	6,3 ± 0,12*	5,5 ± 0,20*	3,3 ± 0,09*	3,4 ± 0,13*	6,7 ± 0,16*	7,3 ± 0,14*	4,5 ± 0,16*	4,8 ± 0,15*
Día 40	6,9 ± 0,10*	7,2 ± 0,16*	3,8 ± 0,16*	3,9 ± 0,17*	8,0 ± 0,17*	8,1 ± 0,09*	4,8 ± 0,15*	6,0 ± 0,06*
Día 45	6,6 ± 0,12*	8,3 ± 0,17*	4,9 ± 0,11*	5,1 ± 0,13*	9,1 ± 0,15*	7,8 ± 0,15*	5,0 ± 0,09*	5,5 ± 0,10*
Día 50	9,9 ± 0,03*	9,4 ± 0,17*	5,7 ± 0,15*	4,8 ± 0,10*	8,8 ± 0,16*	9,0 ± 0,12*	7,4 ± 0,04*	4,5 ± 0,10*

Edad	RNasa ÁCIDA RELATIVA (mUI/g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	79,3 ± 0,6*	90,3 ± 0,5*	99,9 ± 0,4*	74,3 ± 0,8*	112 ± 0,5*	108 ± 0,4*	66,6 ± 0,5*	61,8 ± 0,1*
Día 30	94,5 ± 1,0*	83,1 ± 0,5*	73,2 ± 0,2*	50,6 ± 0,6*	108 ± 0,7*	119 ± 0,8*	57,3 ± 0,6*	57,2 ± 0,2*
Día 35	84,4 ± 1,3*	68,8 ± 1,0*	49,6 ± 0,3*	49,6 ± 0,5*	92,8 ± 0,4*	94,5 ± 0,8*	75,0 ± 0,5*	69,5 ± 0,8*
Día 40	86,3 ± 0,8*	91,5 ± 0,9*	57,3 ± 0,2*	58,5 ± 0,6*	89,5 ± 0,3*	91,6 ± 0,5*	62,3 ± 0,2*	75,3 ± 0,1*
Día 45	85,1 ± 1,1*	104 ± 1,2*	68,8 ± 0,4*	67,6 ± 0,1*	97,5 ± 0,9*	73,6 ± 0,7*	63,6 ± 0,1*	57,4 ± 0,8*
Día 50	112 ± 0,6*	93,8 ± 0,2*	64,6 ± 0,6*	64,9 ± 0,1*	93,5 ± 1,2*	94,2 ± 0,9*	76,7 ± 0,7*	56,2 ± 0,5*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0,05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 70. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre la actividad específica del enzima ribonucleasa ácida y sobre las razones RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	RNasa ÁCIDA/PROTEÍNA (mUI/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
Edad	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	0,58 ± 0,020*	0,66 ± 0,011*	0,67 ± 0,014*	0,48 ± 0,007*	0,70 ± 0,007*	0,80 ± 0,015*	0,53 ± 0,014*	0,48 ± 0,001*
Día 30	0,80 ± 0,022*	0,65 ± 0,017*	0,55 ± 0,002*	0,28 ± 0,006*	1,02 ± 0,008*	1,04 ± 0,024*	0,46 ± 0,011*	0,29 ± 0,002*
Día 35	0,63 ± 0,038*	0,53 ± 0,022*	0,40 ± 0,008*	0,40 ± 0,006*	0,83 ± 0,016*	0,81 ± 0,008*	0,56 ± 0,003*	0,51 ± 0,003*
Día 40	0,64 ± 0,013*	0,58 ± 0,018*	0,44 ± 0,008*	0,42 ± 0,005*	0,66 ± 0,004*	0,69 ± 0,010*	0,41 ± 0,002*	0,38 ± 0,005*
Día 45	0,56 ± 0,020*	0,67 ± 0,014*	0,61 ± 0,006*	0,59 ± 0,006*	0,76 ± 0,018*	0,57 ± 0,016*	0,41 ± 0,005*	0,37 ± 0,006*
Día 50	0,66 ± 0,015*	0,53 ± 0,008	0,69 ± 0,001*	0,53 ± 0,001	0,73 ± 0,016*	0,66 ± 0,012*	0,38 ± 0,001*	0,27 ± 0,002*

	RNasa ÁCIDA/DNA (mUI/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
Edad	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	34,4 ± 0,4*	23,9 ± 0,7*	56,3 ± 0,5*	25,8 ± 0,4*	68,0 ± 0,8*	44,8 ± 0,4*	40,8 ± 0,6*	36,7 ± 0,3*
Día 30	38,8 ± 0,5*	60,8 ± 0,7*	54,7 ± 0,6*	29,2 ± 0,4*	40,9 ± 0,4*	64,0 ± 0,8*	37,9 ± 1,0*	47,8 ± 0,9*
Día 35	63,8 ± 1,2*	33,1 ± 0,3*	35,5 ± 0,3*	37,8 ± 1,1*	47,7 ± 0,3*	33,2 ± 0,4*	59,5 ± 0,5*	53,7 ± 0,5*
Día 40	41,2 ± 0,6*	39,7 ± 0,6*	45,6 ± 0,4*	44,5 ± 0,7*	35,9 ± 0,4*	23,5 ± 0,1*	52,3 ± 0,5*	61,5 ± 0,8*
Día 45	29,1 ± 0,3*	35,5 ± 0,4*	58,7 ± 0,4*	51,9 ± 0,6*	39,7 ± 0,4*	27,8 ± 0,3*	60,4 ± 0,7*	52,7 ± 0,9*
Día 50	41,9 ± 0,3*	40,2 ± 0,4*	53,3 ± 0,7*	53,6 ± 1,1*	38,2 ± 0,3*	25,7 ± 0,2*	80,2 ± 1,2*	51,2 ± 0,5*

	RNasa ÁCIDA/RNA (mUI/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
Edad	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	22,5 ± 0,5*	34,3 ± 0,9*	32,9 ± 0,7*	23,4 ± 0,4*	50,8 ± 0,7*	35,8 ± 1,1*	23,2 ± 0,2*	20,9 ± 0,3*
Día 30	36,0 ± 0,8*	60,0 ± 0,6*	30,0 ± 0,8*	24,2 ± 0,7*	41,6 ± 1,2*	53,5 ± 1,2*	21,5 ± 0,4*	36,6 ± 1,2*
Día 35	71,6 ± 0,7*	40,6 ± 0,1*	27,3 ± 0,5*	28,8 ± 0,5*	48,0 ± 0,7*	34,6 ± 0,6	38,7 ± 1,1*	35,6 ± 1,0
Día 40	54,4 ± 0,6*	49,5 ± 0,8*	41,0 ± 0,2*	37,4 ± 0,9*	30,1 ± 0,7*	37,0 ± 0,6*	49,3 ± 0,4*	49,1 ± 0,2*
Día 45	41,9 ± 0,8*	40,7 ± 0,2*	48,0 ± 0,7*	32,3 ± 0,3*	38,2 ± 1,2	29,2 ± 0,2*	39,8 ± 0,7	46,2 ± 1,2*
Día 50	50,3 ± 0,5*	45,0 ± 0,8*	41,4 ± 0,8*	39,5 ± 0,7*	42,3 ± 1,2*	32,1 ± 1,5*	73,7 ± 1,4*	34,0 ± 0,4*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0,05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 71. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre la cantidad absoluta y relativa del enzima catepsina D del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	CATEPSINA D ABSOLUTA (mUI/órgano)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	590 ± 15*	755 ± 11*	338 ± 21*	424 ± 7*	433 ± 13*	161 ± 9*	894 ± 12*	534 ± 15*
Día 30	1370 ± 45*	857 ± 10*	257 ± 17*	456 ± 15*	307 ± 11*	279 ± 8*	773 ± 13*	944 ± 10*
Día 35	887 ± 9*	963 ± 4*	256 ± 10*	451 ± 10*	574 ± 19	221 ± 12*	569 ± 16	521 ± 10*
Día 40	804 ± 7*	745 ± 15*	353 ± 15*	527 ± 10*	154 ± 8*	325 ± 9*	752 ± 18*	763 ± 15*
Día 45	888 ± 14*	1069 ± 23*	409 ± 7*	346 ± 10*	452 ± 15*	449 ± 13*	1530 ± 27*	1291 ± 30*
Día 50	787 ± 26*	1009 ± 17*	253 ± 15*	260 ± 15*	125 ± 2*	123 ± 3*	1330 ± 41*	982 ± 31*

Edad	CATEPSINA D RELATIVA (UI/g)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	13,7 ± 0,17*	11,6 ± 0,12*	5,37 ± 0,09*	6,31 ± 0,08*	7,50 ± 0,14*	2,73 ± 0,11*	14,2 ± 0,13*	8,94 ± 0,10*
Día 30	15,7 ± 0,10*	11,4 ± 0,09*	4,63 ± 0,05*	7,81 ± 0,06*	3,68 ± 0,04*	3,90 ± 0,00*	15,6 ± 0,08*	15,0 ± 0,09*
Día 35	11,7 ± 0,06*	11,7 ± 0,04*	3,88 ± 0,06*	6,45 ± 0,14*	7,56 ± 0,08*	2,85 ± 0,04*	9,66 ± 0,09*	7,56 ± 0,09*
Día 40	10,2 ± 0,06*	9,27 ± 0,08*	5,41 ± 0,14*	7,84 ± 0,05*	1,78 ± 0,02*	3,89 ± 0,03*	9,25 ± 0,16*	9,59 ± 0,13*
Día 45	11,8 ± 0,11*	13,3 ± 0,12*	5,66 ± 0,12*	4,61 ± 0,15*	4,85 ± 0,09*	4,25 ± 0,05*	18,9 ± 0,23*	15,1 ± 0,03*
Día 50	8,83 ± 0,04*	10,3 ± 0,16*	2,96 ± 0,05*	3,36 ± 0,03*	1,28 ± 0,03*	1,30 ± 0,03*	13,9 ± 0,05*	9,54 ± 0,05*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. P<0,05 según el test de comparación múltiple LDS.

Tabla 72. Efecto de la administración exógena de rhGH sobre la actividad específica del enzima catepsina D y sobre la razón Catepsina D/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida y sometidos dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

Edad	CATEPSINA D/PROTEÍNA (mUI/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	98,1 ± 1,0*	84,6 ± 0,9*	35,8 ± 0,9*	41,0 ± 0,8*	47,1 ± 0,9*	20,2 ± 1,0*	113,5 ± 3,0*	68,9 ± 0,9*
Día 30	133,7 ± 2,2*	90,1 ± 2,0*	34,6 ± 0,3*	43,4 ± 0,3*	34,6 ± 0,3*	34,0 ± 0,6*	124,2 ± 2,2*	75,6 ± 0,3*
Día 35	89,7 ± 2,1*	92,7 ± 1,9*	31,0 ± 0,9*	51,4 ± 0,4*	67,5 ± 1,5*	24,4 ± 0,3*	72,7 ± 1,3*	55,1 ± 0,7*
Día 40	75,5 ± 1,0*	61,4 ± 0,9*	42,0 ± 0,1*	56,8 ± 1,0*	13,1 ± 0,2*	29,4 ± 0,7*	60,3 ± 1,3*	47,9 ± 0,8*
Día 45	75,4 ± 1,1*	87,4 ± 1,4*	49,8 ± 0,5*	40,6 ± 0,8*	37,9 ± 1,0*	33,0 ± 0,7*	123,0 ± 3,1*	96,9 ± 0,6*
Día 50	52,9 ± 0,3*	59,1 ± 0,6*	31,6 ± 0,3*	27,3 ± 0,1*	10,0 ± 0,2*	9,1 ± 0,3*	68,0 ± 1,0*	46,2 ± 0,4*

Edad	CATEPSINA D/DNA (UI/mg)							
	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
	NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Día 25	5,9 ± 0,11*	3,1 ± 0,07*	3,0 ± 0,05*	2,2 ± 0,03*	4,6 ± 0,11*	1,1 ± 0,05*	8,7 ± 0,13*	5,3 ± 0,09*
Día 30	6,4 ± 0,07*	8,3 ± 0,20*	3,5 ± 0,02*	4,5 ± 0,03*	1,4 ± 0,02*	2,1 ± 0,02*	10,3 ± 0,20*	12,6 ± 0,29*
Día 35	8,8 ± 0,10*	5,6 ± 0,07*	2,8 ± 0,05*	4,9 ± 0,07*	3,9 ± 0,04*	1,0 ± 0,02*	7,7 ± 0,03*	5,8 ± 0,07*
Día 40	4,8 ± 0,08*	4,0 ± 0,05*	4,3 ± 0,11*	6,0 ± 0,03*	0,7 ± 0,01*	1,0 ± 0,01*	7,8 ± 0,14*	7,8 ± 0,18*
Día 45	4,0 ± 0,04*	4,6 ± 0,05*	4,8 ± 0,07*	3,5 ± 0,11*	2,0 ± 0,04*	1,6 ± 0,02*	17,9 ± 0,21*	13,8 ± 0,15*
Día 50	3,3 ± 0,02*	4,4 ± 0,09*	2,4 ± 0,05*	2,8 ± 0,05*	0,5 ± 0,01*	0,4 ± 0,01*	14,5 ± 0,19*	8,7 ± 0,01*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $p < 0,05$ según el test de comparación múltiple LSD.

Tabla 73. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), el Tratamiento (T) y la Dieta (D) sobre el estudio del metabolismo del RNA y la capacidad de síntesis proteica² del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, *No Tratados (NT)* y *Tratados con rhGH (T)* y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	RNA/órgano	RNA/g	RNA/Proteína	RNA/DNA	RNasa/órgano	RNasa/g	RNasa/Proteína	RNasa/DNA	RNasa/RNA
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0006	0,0001
rhGH	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
DIETA	0,0001	0,0005	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	NS
ExT	0,0001	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExD	0,0001	0,0001	0,0001	0,002	0,0001	0,0001	0,0001	0,0140	0,0001
TxD	0,0001	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0020	0,0001
ExTxD	0,0070	0,0001	0,0001	NS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad ($p < 0,05$). NS - No significativo.

2. Variables dependientes: RNA absoluto (RNA/órgano) y relativo (RNA/g), capacidad de síntesis (RNA/proteína), la razón RNA/DNA, RNasa ácida absoluta (RNasa/órgano) y relativa (RNasa/g), actividad específica RNasa ácida/proteína (RNasa/Proteína) y las razones RNasa ácida/DNA (RNasa/DNA) y RNasa ácida/RNA (RNasa/RNA).

Tabla 74. Análisis de la varianza trifactorial (ANOVA 2x2x6)¹ de los efectos directos e interacciones de la Edad (E), el Tratamiento (T) y la Dieta (D) sobre el catabolismo proteico² del músculo gastrocnemio en ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **No Tratados (NT)** y **Tratados con rhGH (T)** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

	Catepsina/órgano	Catepsina/g	Catepsina/Proteína	Catepsina/DNA
EDAD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
rhGH	0,015	0,0001	0,0040	0,0001
DIETA	NS	0,014	0,0001	0,0001
ExT	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
TxD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
ExTxD	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

1. Valor de la probabilidad ($P < 0,05$).NS - No significativo.

2. Variables dependientes: Catepsina D/órgano, catepsina D/g, catepsina D/proteína y catepsina D/DNA.

Tabla 75. Valor de las pendientes de las rectas de regresión y su error frente a la Edad de las variables relacionadas con la capacidad de síntesis proteica: cantidad absoluta y relativa de RNA, RNA/proteína y razón RNA/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **No Tratados** y **Tratados con rhGH** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variables	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
		pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error
RNA/órgano	♀	0,0005	0,0011*	-0,0023	0,0005*	0,0030	0,0007*	-0,0023	0,0004*
	♂	0,0027	0,0006*	-0,0018	0,0007*	0,0020	0,0005*	-0,0012	0,0005*
RNA/g	♀	-0,0455	0,0145	-0,0620	0,0065	0,0057	0,0078*	-0,0745	0,0059*
	♂	0,0050	0,0102*	-0,0447	0,0087*	-0,0187	0,0059*	-0,0451	0,0088*
RNA/proteína	♀	-0,5600	0,1101*	-0,2214	0,0602*	0,0686	0,0768*	-0,7368	0,0451*
	♂	-0,1100	0,0702	-0,1075	0,0750	-0,2053	0,0433*	-0,4578	0,0879*
RNA/DNA	♀	-0,0273	0,0036	-0,0236	0,0038	-0,0098	0,0026*	-0,0256	0,0041*
	♂	0,0030	0,0021*	0,0135	0,0026*	-0,0243	0,0031*	-0,0114	0,0039*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $P < 0,01$ según el análisis de *Dummy variables*.

Tabla 76. Valor de las pendientes de las rectas de regresión frente a la edad y su error de las variables relacionadas con el enzima Ribonucleasa ácida: cantidades absoluta y relativa, actividad específica y razones RNasa ácida/DNA y RNasa ácida/RNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, **No Tratados** y **Tratados con rhGH** y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12 y 20%).

variables	sexo	12% PROTEÍNA				20% PROTEÍNA			
		NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
		pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error
RNasa ácida/ órgano	♀	0,1571	0,0313*	0,0023	0,0236*	0,0826	0,0228	0,1322	0,0173
	♂	0,1451	0,0154*	0,0329	0,0180*	0,0590	0,0157	0,0547	0,0151
RNasa ácida/g	♀	0,7760	0,1879*	-1,1259	0,2539*	-0,7121	0,1238*	0,3235	0,1412*
	♂	0,5796	0,2125*	-0,0226	0,1878*	-1,0877	0,2154*	-0,1236	0,1578*
RNasa ácida/ proteína	♀	-0,0018	0,0019*	0,0019	0,0024*	-0,0045	0,0025	-0,0061	0,0010
	♂	-0,0023	0,0010*	0,0067	0,0018*	-0,0126	0,0023*	-0,0052	0,0016*
RNasa ácida/DNA	♀	0,0790	0,2419	0,0417	0,1762	-0,9402	0,1635*	1,4686	0,1447*
	♂	0,0700	0,2484*	1,2216	0,0497*	-1,2215	0,2119*	0,5421	0,1326*
RNasa ácida/RNA	♀	0,7974	0,3062	0,6294	0,1121	-0,4036	0,1346*	1,8193	0,1842*
	♂	0,0249	0,1819*	0,6474	0,0636*	-0,5105	0,1490*	0,6160	0,1694*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $P < 0,01$ según el análisis de *Dummy variables*.

Tabla 77. Valor de las pendientes de las rectas de regresión y su error frente a la Edad de las variables: cantidad absoluta, relativa y actividad específica del enzima catepsina D y la razón catepsina D/DNA del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c de ambos sexos entre 25 y 50 días de vida, No Tratados y Tratados con rhGH y sometidos a dos niveles de proteína dietaria (12% y 20%).

variables	sexo	12% PROTEINA				20% PROTEINA			
		NO TRATADOS		TRATADOS		NO TRATADOS		TRATADOS	
		pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error	pendiente	error
Catepsina D/ órgano	♀	-0,0031	0,0053	0,0007	0,0014	-0,0087	0,0032*	0,0264	0,0057*
	♂	0,0096	0,0021*	-0,0061	0,0015*	0,0024	0,0024*	0,0201	0,0046*
Catepsina D/g	♀	-0,2145	0,0289*	-0,0425	0,0202*	-0,1906	0,0410*	0,0456	0,0730*
	♂	-0,0193	0,0281*	-0,1311	0,0263*	-0,0291	0,0215*	0,0299	0,0650*
Catepsina D/proteína	♀	-2,3700	0,3400*	0,2014	0,1428*	-1,3150	0,3585	-1,3906	0,5468
	♂	-0,9500	0,2800*	-0,4097	0,1926*	-0,3040	0,1831	-0,3246	0,3887
Catepsina D/DNA	♀	-0,1388	0,0302*	0,0156	0,0187*	-0,1238	0,0248*	0,2977	0,0635*
	♂	-0,0358	0,0364*	0,00619	0,0285*	-0,0305	0,0105*	0,1300	0,0666*

El símbolo * en una misma fila indica diferencias significativas entre ratones No Tratados y Tratados para un mismo sexo y nivel proteico dietario. $P < 0,01$ según el análisis de *Dummy variables*.

4.16. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE LA HORMONA SOMATOTROPA (rhGH) SOBRE EL METABOLISMO PROTEICO Y DEL RNA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO DE RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS, ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 y 20%) (Tablas 67-77).

La EDAD, el TRATAMIENTO, la DIETA y sus interacciones influyen muy significativamente sobre todos los parámetros RNA-relacionados y sobre el enzima catepsina D del músculo cuando se comparan los animales NT y T, según el ANOVA de tres factores (Tablas 73 y 74). Se exceptúan las razones RNA/DNA, RNasa ácida/RNA y catepsina D/órgano, que no presentan significación para algunos efectos.

La administración exógena de rhGH induce una disminución en RNA/órgano y RNA/g a partir del día 30 de vida en todos los animales T respecto a los NT (Tabla 67), mientras que por el contrario, los valores de RNA/DNA muscular ascienden significativamente (Tabla 68).

Por su parte, las modificaciones temporales de la razón RNA/proteína dependen del nivel de proteína de la dieta, puesto que descienden en los animales 20% T, y ascienden en los grupos 12% T, especialmente entre los 45-50 días de vida (Tabla 68).

Los parámetros de RNasa ácida absoluta, relativa y RNasa/proteína de todos los animales T (Tablas 69 y 70), así como la razón RNasa ácida/RNA (Tabla 70) y los parámetros relacionados con el enzima catepsina D descienden en los animales 12% T respecto a los NT. En contraste, las razones RNasa ácida/DNA de todos los grupos T, la razón RNasa ácida/RNA (Tabla 70) y los valores catepsina D-relacionados (Tablas 71 y 72) aumentan en los animales 20% T respecto a sus controles NT.

Del estudio de las pendientes de las rectas de regresión se deduce que en los animales 20% T la evolución es más rápida y en general más negativa que en los grupos 20% NT, en todos los valores estudiados (Tablas 75, 76 y 77).

En cuanto a los animales T que ingieren la dieta del 12% de proteína obtienen una caída más veloz en RNA/órgano y RNA/g, mientras que la razón RNA/proteína desciende menos rápidamente (♀ 12% T) que sus controles (♀ 12% NT) (Tabla 75).

En general los parámetros relacionados con los enzimas RNasa ácida y catepsina D crecen más velozmente en los animales T de ambas dietas que los NT, a excepción de los valores RNasa ácida/órgano, RNasa ácida/g y catepsina D/órgano que se pierden con más rapidez en los animales 12% T respecto a los animales 12% NT (Tablas 76 y 77).

Esta diferente evolución temporal entre los grupos NT y T de ambas dietas, demuestra la influencia de las interacciones ExT, ExD y ExTxD (Tablas 73 y 74).

5. DISCUSIÓN

La peculiaridad de la adaptación a la dieta de los animales No Tratados ha conducido al estudio pormenorizado de los resultados obtenidos en estos animales, por lo que la discusión se ha establecido y ordenado en los dos apartados siguientes:

5.1. Estudio en ratones BALB/c No Tratados (NT).

5.2. Estudio en ratones BALB/c Tratados (T) y efectos de la administración exógena de rhGH.

5.1. ESTUDIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA NO TRATADOS (NT) Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 y 20%).

5.1.1. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO.

En el mamífero, el tejido muscular esquelético es el más abundante y representa entre un 25 y un 40% de la masa corporal total, desde el nacimiento a la madurez (Miller, 1969; Young, 1970). Por ello su forma de crecimiento es un buen indicador del desarrollo total del cuerpo.

El ratón BALB/c no tratado entre los 25 y 50 días de vida incrementa su peso corporal (Tabla 1) mediante el aumento edad-dependiente de los sustratos corporales (Agis, 1994)). De forma paralela el músculo gastrocnemio experimenta un aumento paulatino de peso (Tabla 1 y Gráfica 1a) cuyo porcentaje máximo corresponde al grupo ♀ 12% NT, aunque el mayor incremento acumulado de peso muscular es alcanzado por los animales sometidos al 20% de proteína dietaria, a consecuencia de la menor pérdida temporal de las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento ponderal, respecto de las obtenidas por los grupos del 12% de proteína (Tabla 2). No obstante, todos los animales alcanzan el mismo peso muscular a día 50 de vida, independientemente de la dieta ingerida (Tabla 1). También en ratas Sprague-Dawley sometidas a dos niveles proteicos dietarios (15 y 25%), Smith y col. (1982) encuentran que la ganancia ponderal y la tasa de crecimiento son idénticas en ambos grupos. Por el contrario, Howarth (1972) señala que el aumento de peso muscular es proporcional al porcentaje de proteína dietaria, en un rango entre el 6 y el 24%.

El descenso temporal de la VFCM (Tablas 2 y 7) indica la pérdida del potencial de crecimiento del músculo según se acerca la madurez, al igual que sucede con el crecimiento corporal (Salmon y col., 1990). En general, los roedores presentan las más altas velocidades de crecimiento después del nacimiento y hasta un 6% de su vida media (Reeds y Fiorotto, 1990), lo que corresponde a la edad del animal estudiado, que se encuentra entre el 4,1 y el 6,8% de su vida.

Entre los componentes químicos del músculo (Heymsfield y col., 1982) el agua y la proteína constituyen aproximadamente el 90% de la masa muscular, por lo que el aumento de peso va acompañado de un incremento paralelo de la proteína, que en este caso corresponde a la proteína sarcoplásmica no estructural.

Tanto la proteína absoluta (Tabla 3 y Gráfica 1b), como el incremento acumulado diario de proteína (Tabla 4 y Gráfica 3a) se elevan en función de la edad en el músculo gastrocnemio de todos los animales NT, lo que significa que el depósito proteico muscular va aumentando paulatinamente entre los 25 y 50 días de vida, al igual que señalan Millward y col. (1975) y Bates y Millward (1981) en ratas de lento y rápido crecimiento y Lewis y col. (1984) en ratas albinas Sprague-Dawley, entre las 3 y las 8 semanas de vida.

La ganancia de la proteína muscular se verifica mediante la disminución temporal de la velocidad absoluta de crecimiento proteico, que oscila en su más amplio rango entre 0,73 mg (día 25) y 0,26 mg (día 50) de proteína depositada/día (Tabla 4). Estos valores señalan que la mayor velocidad de crecimiento de la proteína es obtenida por los animales más jóvenes alimentados con el 12% de proteína en la dieta. Datos similares han sido señalados por Siebrits y Barnes (1989) en músculo gastrocnemio de ratas al destete.

También la velocidad fraccional de crecimiento de la proteína muscular (VFPrM) desciende temporalmente en todos los animales NT, presentando máximos valores en los ratones sometidos al 12% respecto a los del 20% de proteína, a los 25 días de vida (Tabla 4). Por ello y pese al más rápido y profundo descenso temporal de su VFPrM (Tabla 8 y Gráfica 3b), los animales NT del 12% consiguen alcanzar ganancias diarias superiores (Tabla 4 y Gráfica 3a) y mayores concentraciones de proteína muscular (Tabla 3).

Los valores obtenidos de VFPrM se aproximan a los encontrados en la literatura. Así, tasas de 6,27%/día y 11%/día se han encontrado en músculo gastrocnemio de ratas de lento crecimiento (Millward y col., 1975) y en la rata Wistar al destete (Siebrits y Barnes, 1989). En los músculos sóleo y tibial anterior de la rata albina, Lewis y col. (1984) también encuentran valores de 10,6%/día y 5,9%/día respectivamente. Menores porcentajes (3%/día) describen Bates y col. (1992) en ratón Snell a día 40 de vida.

El origen del aumento de la proteína muscular en los animales alimentados con el 12% de proteína dietaria, se asocia con el incremento de la ingesta total y de la velocidad de su consumo, observada previamente en estos animales (Agis, 1994). De esta forma, pueden compensar su baja concentración proteica dietaria y alcanzar un crecimiento muscular similar al de los animales del 20% de proteína.

La existencia de un crecimiento muscular normal en ratones de esta edad, alimentados con una dieta marginal en proteína, es un hecho poco habitual, puesto que aunque la hiperfagia es un fenómeno descrito con relativa frecuencia en casos de déficit proteico, la respuesta normal es la pérdida de la capacidad de crecimiento, asociada con el aumento de la tasa metabólica y la disminución de la eficacia de depósito energético como señalan Coyer y col. (1987) y Tulp y col. (1979).

Sin embargo, Jepson y col. (1988) encuentran en ratas sometidas a un 8% de proteína un crecimiento muscular igual al de las ratas control alimentadas con un 18%. Los autores hacen énfasis en la importancia del aumento de la ingesta e indican que es preciso un incremento simultáneo de la eficiencia de utilización de la proteína, para superar el crecimiento de los animales control.

De acuerdo con esta idea, en este estudio se demuestra que el aumento de la proteína muscular es directamente proporcional al incremento acumulado de la ingesta de proteínas (IP), aunque la utilización de la proteína dietaria resulta inversamente proporcional al nivel de proteína de la dieta, obteniendo los animales del 12% de proteína una eficacia de depósito superior ($\approx 40\%$) a la de los animales de mayor nivel proteico (Gráfica 5a).

Esta mayor eficacia de los grupos del 12% de proteína la consiguen para IP entre 0 y 17 g de proteína, lo que da lugar a un depósito de 0,33 mg de proteína/gIP mientras que los animales del 20% de proteína sólo depositan 0,18 g de proteína muscular/gIP, para valores de IP de más amplio rango (0-27 g). Ello confirma que el mayor crecimiento de la proteína muscular conseguido por el grupo de menor nivel de proteína dietaria, se debe a una superior eficiencia de depósito proteico.

Sin embargo, la utilización de la IE en la acreción de la proteína muscular es igual en todos los animales estudiados, a pesar del incremento en energía consumida por el grupo del 12% de proteína (Gráfica 5b).

Estos resultados parecen indicar que la hiperfagia permite a los animales del 12% de proteína obtener una mayor cantidad de ingesta proteica para el crecimiento muscular con una utilización óptima.

Por esta razón, la contribución de la proteína muscular a la proteína de la carcasa (Gráfica 7) también es superior en los animales de menor nivel proteico, los cuales aportan un valor medio de 8,3 mg de proteína muscular/g de proteína de la carcasa, mientras que en los animales del 20% NT la participación es sólo de 3,9 mg. Además, mientras en estos últimos dicha contribución se mantiene constante durante toda la experiencia, lo que da lugar a una aportación del 0,60%, semejante a la señalada por Lewis y col. (1984) en músculo tibial anterior de rata, los animales del 12% NT pasan de contribuir con un 0,55% a día 25, al 0,85% a día 50 de experiencia, lo que depende de su buena eficacia de depósito de la proteína muscular.

El sexo, por su parte, presenta una leve influencia sobre el crecimiento del músculo (Tabla 5), puesto que en general los animales machos de ambas dietas tienden a un mayor crecimiento que las hembras, propiciado por el incremento de la concentración de proteína (Tabla 3), que favorece el aumento del índice miosomático (Tabla 1). Sin embargo, las hembras presentan aumentos puntuales del incremento acumulado de peso y de la VFCM (Tabla 2). Según Graystone (1968) las ratas hembras comienzan con la misma masa muscular al nacimiento que los machos, pero la velocidad de crecimiento es menos rápida, por lo que entre la 3 y la 14 semana de vida la masa celular individual de los machos se incrementa unas 10 veces (Hubbard y col., 1974).

De los resultados se deduce que el músculo gastrocnemio del ratón BALB/c mantiene un crecimiento acelerado después del destete y hasta la pubertad, lo que puede depender de las demandas funcionales, traducidas en el incremento de trabajo muscular destinado al soporte del peso y la locomoción, que son los mayores estímulos para el crecimiento muscular (Lewis y col., 1984).

Además la concentración de la proteína dietaria afecta de modo decisivo al crecimiento muscular, lo que confirma la alta sensibilidad de la musculatura del ratón en crecimiento a la manipulación dietaria, que de acuerdo con Morgan y col. (1988b) es máxima entre los 10 y 40 días de vida.

5.1.1.1. Estudio alométrico

Como la proporción que el músculo guarda respecto al cuerpo total sufre modificaciones en varias etapas de la vida, de tal modo que se incrementa desde un 23% al nacimiento hasta un 46% en la rata adulta (Miller, 1969), es importante el estudio de esta relación en el período entre el destete y la pubertad.

La aplicación de la alometría (Gráfica 9a) indica, en este caso, el porcentaje que el músculo crece en relación al peso corporal final. El coeficiente de crecimiento alométrico obtenido por todos los animales estudiados, a excepción del grupo ♀ 12% NT está cerca de la unidad ($b \approx 1$), lo que significa que el músculo crece en proporción al cuerpo y su contribución al PCF se incrementa al mismo ritmo que lo hace éste.

Coefficientes alométricos para el músculo gastrocnemio próximos a uno se han descrito en cerdos entre 0 y 168 días de edad (Essien y Fetuga, 1988) y en ovejas (Wyn y Thwaites, 1981) cercanas a la pubertad.

Por otra parte, el alto coeficiente de crecimiento ($b = 1,40$) del grupo ♀ 12% NT indica una mayor contribución del peso muscular al peso corporal, que podría estar asociada con un proceso de maduración más lento del músculo. Además, puesto que el coeficiente alométrico de la proteína muscular respecto al peso del músculo de este grupo ($b = 1,05$) señala la proporcionalidad de crecimiento entre ambos parámetros, se confirma que la proteína muscular crece al mismo tiempo que el peso muscular (Gráfica 9b).

El grupo ♂ 12% NT, por su parte, cuyo músculo crece proporcionalmente al PCF presenta, no obstante, un coeficiente alométrico de la proteína muscular respecto al peso muscular (Gráfica 9b) muy alto ($b = 1,42$), lo que demuestra que su mayor eficacia de depósito permite a la proteína crecer más rápidamente que el propio músculo.

Sin embargo la contribución de la proteína al peso muscular es, por el contrario, más baja en los animales sometidos al 20% de proteína (Gráfica 9b), según su coeficiente alométrico (♀ $b = 0,57$, ♂ $b = 0,70$), lo que indica no sólo, un proceso de maduración más rápido de la proteína, sino también, que el músculo parece presentar una mayor proporción de otros componentes que como la grasa y

el agua completa el crecimiento muscular. Este, a su vez, es proporcional al crecimiento somático (Gráfica 9a).

Además, de acuerdo con Davis y col. (1989) la VFPrM es directamente proporcional a la VFCM a partir del destete (Gráfica 11). Esta relación es superior en los animales del 12% de proteína respecto a los del 20%, lo que parece determinar la mayor capacidad de crecimiento proteico y su mayor aporte al peso muscular. Así pues, las diferencias en la alometría parecen depender de la distinta dinámica de crecimiento de cada grupo dietario.

Por lo tanto, el nivel de proteína en la dieta induce una neta diferencia en la forma de crecimiento muscular, puesto que los animales del 12% emplean toda su capacidad de crecimiento en depositar más proteína a fin de paliar su déficit dietario, mientras que los animales del 20% con una cantidad suficiente de ingesta proteica, presentan una diferente redistribución de sustratos en el músculo, acumulando no solo proteína sino también posiblemente grasa, al igual que se produce en el animal total (Agis, 1994).

Parece existir además una estrecha relación entre la dieta, la alometría del órgano y su maduración, puesto que de acuerdo con Reeds y Fiorotto (1990) éste proceso depende de la sensibilidad del músculo a la distinta proporción de los nutrientes dietarios, de tal modo que la madurez sólo se alcanza con altos niveles de proteína (como parece resultar del presente estudio), pudiendo repercutir en su eficacia funcional.

5.1.2. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO.

Las modificaciones en el crecimiento muscular basadas en medidas de peso o de algunos de sus constituyentes, antes discutidos, no dan información suficiente de dicho proceso. Para entender mejor cómo se produce el desarrollo muscular es preciso utilizar medidas a nivel celular que como la tasa de ácidos nucleicos nos permiten entender el crecimiento celular del órgano (Mirsky y Ris, 1949). En la rata

(Enesco y Leblond, 1962) y el ratón (Glore y Layman, 1987) el incremento del número de células medido como contenido en DNA, ha demostrado ser un factor importante en el estudio del crecimiento de órganos y tejidos, puesto que refleja el número de células diploides del órgano (Mirsky y Ris, 1949), ya que el núcleo permanece constante a través de la vida de la célula.

Sin embargo el músculo está compuesto de fibras multinucleadas que son muy distintas a las células clásicas, por lo que hoy se acepta el concepto de unidad de DNA como la unidad funcional del músculo (Cheek y col., 1971). Así pues, se considera que la unidad de DNA es un genoma (masa diploide de DNA) que gobierna una masa constante de protoplasma tanto en células diploides, polinucleadas o poliploides (Cheek y col., 1971; Epstein, 1967; Prescott, 1956, 1982), por lo que el contenido en DNA indica el número de unidades de DNA presentes. Dividiendo el contenido total en DNA por la cantidad de DNA de un núcleo diploide, se puede estimar el número real de unidades de DNA (Pitts, 1986). Las modificaciones en la razón proteína/DNA reflejan además los cambios en el tamaño de la célula, puesto que la razón proteína/agua intracelular es constante (Cheek y col., 1968).

El crecimiento celular del músculo gastrocnemio del ratón BALB/c, entre el destete y los 50 días de vida, es la consecuencia del incremento de las tasas de DNA y RNA muscular y del número de unidades de DNA (Tabla 24). El aumento en el número de células predomina sobre el desarrollo del tamaño celular, tanto en relación a la proteína como al peso del músculo en todos los grupos de ratones no tratados, a excepción de los animales ♂ del 12 % de proteína, cuyo crecimiento celular escapa a esta norma, ya que en este caso predomina el aumento del tamaño de la célula (proteína/DNA) sobre el de unidades de DNA, que se mantienen estables. (Tablas 24 y 25).

El aumento de DNA con la edad ha sido observado desde los primeros estudios de Enesco y Leblond (1962) en la rata y se relacionó con un aumento del número de núcleos. También en la rata Gordon y col. (1966) encuentran aumentos de DNA a niveles estables hasta los 90-95 días de edad, mientras que el aumento en peso, proteína miofibrilar y proteína sarcoplásmica continúa hasta los 140 días de vida.

Por su parte el RNA se localiza primeramente en el citoplasma y varía directamente con el tamaño de la célula (Ezekwe y Martin, 1975).

Aunque se considera que en mamíferos el número de fibras musculares es fijo al nacimiento (Goldspink, 1977) y que los núcleos de las fibras pierden su capacidad de división (Stocdale y Holtzer, 1961), el contenido en DNA se incrementa muy significativamente durante el crecimiento postnatal (Enesco y Puddy, 1964), como hemos observado en nuestro estudio.

La elevación de la tasa de DNA durante el crecimiento puede representar, de acuerdo con Lewis y col. (1984), un aumento en el número de mionúcleos, que se derivan de la división mitótica y migración subsiguiente de las células satélite (Moss y Leblond, 1971), las cuales se fusionan con las fibras musculares.

Esta hipótesis ha sido confirmada recientemente por Mascarello y col. (1992), quienes demuestran en músculo esquelético de cerdos entre 8 y 210 días de edad, que el crecimiento hiperplásico no termina al nacimiento, lo que parece depender de la capacidad de regeneración de las células satélite.

En este sentido, Cossu y Molinaro (1987) especulan con la existencia de dos poblaciones de células satélite, una capaz de responder sólo a factores de crecimiento y otra a factores de carácter "inflamatorio". Las primeras se dividirían lentamente, coincidiendo con el período de máxima velocidad de crecimiento, pudiéndose fundir con fibras musculares preexistentes, lo que ha sido confirmado por Hoh y Hughes (1988).

Ello haría, puesto que la medida de DNA no es específica para las células musculares, que las células satélite y otras más pequeñas no musculares como adipocitos, fibroblastos y células vasculares indujeran una sobrevaloración del DNA muscular, como sucede en los músculos gastrocnemio y peroneo de pollo, los cuales parecen contener un mayor porcentaje de este tipo de células que otros músculos, como el pectoral mayor (Jones y col., 1986).

La contribución de las células satélite al aumento del DNA, que se presume es de un 25-30% (Cheek y col., 1971), será proporcionalmente mayor que el que efectúen al desarrollo del tamaño celular, puesto que las células no contráctiles poseen relativamente poco citoplasma (Lewis y col., 1984) y por lo tanto el acúmulo de los componentes celulares será menor.

En efecto, como ya se ha indicado, tan sólo el grupo ♂ 12% NT presenta una mayor hipertrofia consecutiva a su forma de crecimiento, mientras que el resto de los grupos tienen menores tamaños celulares. (Tablas 24 y 25).

La hiperplasia de los restantes animales estudiados (♀ 12% NT, ♀ y ♂ 20% NT) se lleva a cabo mediante una alta velocidad de depósito de DNA (Tabla 29), superior a la del depósito ponderal del músculo. Ello proporciona una acreción de DNA respecto al incremento de peso muscular que llega a ser de 4,4 mg/g de PM en el grupo ♀ 12% y de 3,3 mg y 6,1 mg/g de PM en los grupos ♀ y ♂ 20% respectivamente (Gráfica 13a).

La alta contribución de este ácido nucleico al crecimiento muscular coincide con el valor de su coeficiente alométrico, especialmente en los animales sometidos al 20% de proteína, confirmando el rápido crecimiento del DNA respecto del peso muscular (Gráfica 14).

Del mismo modo, la tasa de DNA crece en proporción a la ganancia diaria de proteína muscular, llegando a un incremento de 27,4 mg, 28 mg y 57 mg de DNA/g de proteína acumulada en los grupos ♀ 12%, ♀ 20% y ♂ 20% NT respectivamente (Gráfica 13b), lo que confirma la hipótesis de Allen (1987) quien señala que la fase más rápida de la acreción de la proteína se corresponde con la mayor acumulación de DNA o de los mionúcleos.

Este efecto se consigue mediante el aumento de la utilización de las ingestas proteica y energética en el depósito de DNA, puesto que, el incremento del DNA muscular es directamente proporcional al aumento de consumo de ambas ingestas (Gráficas 15a y b), lo que se traduce en la mejora de la eficiencia de depósito de DNA.

De estos resultados se deduce que los animales ♀ sometidos al 12% de proteína, presentan mecanismos de crecimiento muscular iguales a los animales de mayor nivel de proteína, alcanzando tasas idénticas de DNA, lo que depende de la similar eficacia de depósito de DNA muscular a partir de sus ingestas proteica y energética.

Por lo tanto, a pesar de ingerir menores cantidades de proteína dietaria (Agis, 1994), la hiperfagia y la buena utilización de los nutrientes, permiten al grupo ♀ 12% NT incrementar la cantidad de DNA muscular, no sólo respecto al peso sino

también respecto a la proteína, al mismo nivel que los animales de mayor nivel proteico.

Por el contrario, el tamaño celular de los grupos sometidos al 20% de proteína presenta descensos edad-dependientes (Tablas 25 y 29) a consecuencia de la menor acreción de sustratos citoplasmáticos como proteína y RNA, puesto que el tamaño de la célula disminuye a medida que aumenta la proteína y el peso muscular (Gráfica 16a y b) y se consume una mayor cantidad de ingesta proteica y energética (Gráfica 17a y b). Ello contribuye a que las razones proteína/DNA y peso muscular/NN (Tabla 25) sean menores que en los grupos del 12% de proteína y confirma la preponderancia del crecimiento hiperplásico de estos animales. También Millward y Waterlow (1978) señalan, que el crecimiento muscular postnatal de la rata está determinado fundamentalmente por el aumento del número de unidades de DNA y no por su tamaño.

Los animales ♀ 12% NT por su parte, con un mayor depósito proteico por célula, presentan un tamaño celular estable en el tiempo (Tabla 25) y superior al del grupo ♀ 20% NT, aunque no presentan correlación lineal alguna con la ganancia proteica (Gráfica 16a) ni con la VFPrM (Gráfica 18a). El resto de los constituyentes celulares se acumulan en menor cantidad en el citoplasma, por lo que la razón peso muscular/NN decrece con la edad (Tabla 25).

El crecimiento muscular de los animales ♂ 12% NT es esencialmente distinto, puesto que se produce por hipertrofia, con un aumento muy significativo del tamaño celular y sin incrementos edad-dependientes de la tasa de DNA, ni del número de núcleos. Por ello, la concentración del ácido nucleico disminuye en relación al grupo ♂ 20% NT, mientras que las razones proteína/DNA y peso muscular/NN se incrementan (Tablas 24 y 25). Por tanto, la dinámica y la forma de crecimiento de este grupo parece depender de una posible inhibición de la síntesis de DNA en respuesta a una dieta marginal en proteína.

También Durand (1973) y Howarth (1972) en músculo gastrocnemio de ratas sometidas a dietas del 8% y del 6% en proteína respectivamente, encuentran un menor contenido en DNA y mayor tamaño celular que en ratas control, y señalan que la síntesis proteica puede tener prioridad sobre la síntesis de DNA, aunque no estudian la forma de crecimiento.

Así pues, el crecimiento del grupo ♂ 12% NT se realiza por mecanismos diferentes al resto de los animales estudiados, puesto que la hipertrofia resulta independiente de la ingesta de alimentos (Gráfica 17a y b), del peso muscular (Gráfica 16b) y del acúmulo de proteína (Gráfica 16a) y sólo se incrementa el tamaño de la célula (Proteína/DNA) a medida que desciende la VFPrM (Gráfica 18a). Como ya se ha discutido, es el aumento de la VFPrM sobre la VFPrM lo que permite a estos animales una mayor contribución de la proteína al crecimiento del músculo (Gráfica 11).

Los datos demuestran también la diferente respuesta de los sexos en la adaptación a una dieta marginal en proteína, ya que mientras los animales ♀ 12% NT aumentan la celularidad con la edad (Tabla 24), los animales ♂ 12% NT incrementan el tamaño de las fibras musculares (Tabla 25), demostrando la influencia de la interacción ExDxS (Tabla 28) sobre la forma de crecimiento muscular de estos animales.

Por lo tanto, la disminución del contenido proteico de la dieta parece invertir la tendencia natural de cada uno de los sexos en la forma de crecimiento celular, teniendo en cuenta que los animales machos presentan normalmente menores cantidades de masa muscular/DNA que las hembras (Burleigh, 1980).

No obstante, la similitud de la cantidad total de DNA entre ♂ y ♀ del 12% NT de proteína en el período estudiado, sugiere que el desarrollo del DNA en los animales ♂ puede haber tenido lugar en etapas anteriores al destete.

Por el contrario, los animales ♂ 20% NT presentan un mayor número de fibras musculares de menor tamaño y con una mayor velocidad de crecimiento que los animales del sexo opuesto (♀ 20% NT) (Tabla 29), a consecuencia de su mayor eficacia de depósito de DNA respecto a las ingestas proteica y energética (Gráfica 15a y b), lo que les permite acrecentar su DNA por unidad de peso (Gráfica 13a) y de proteína (Gráfica 13b), mecanismo que parece acelerarse especialmente durante la pubertad (Cheek y col., 1968).

También Ezekwe y Martin (1975) señalan en ratones de rápido crecimiento, que el aumento de la celularidad es consecuencia de su mayor velocidad de crecimiento.

No obstante, independientemente de la dieta y el sexo, en todos los animales estudiados se observa una relación recíproca entre el número de unidades de DNA y el tamaño celular a lo largo de la edad. En general cuando el tamaño disminuye el número de células se incrementa, cambiando simultáneamente, lo que origina una correlación lineal negativa entre ambos parámetros (Gráfica 18b) al igual que describen Dickerson y col. (1972) y Glore y Layman (1987). También Burleigh (1980) destaca la influencia de la edad sobre esta relación inversa.

De forma coordinada con el crecimiento del DNA se produce un aumento proporcional del enzima DNasa ácida/órgano, siendo su evolución temporal, más significativa en los animales NT del 20% de proteína (Tablas 26 y 30). Sin embargo la proporción en la que se desarrolla el enzima, tanto en concentración como en actividad, es siempre inferior a la del ácido nucleico por lo que, en general, éste se acumula con la ayuda de una capacidad degradativa del enzima progresivamente menor (Tabla 27). Además cada nivel dietario muestra distintos mecanismos de protección del DNA, puesto que mientras en los animales del 20% de proteína la actividad específica (DNasa ácida/proteína) se incrementa ligeramente (Tabla 27), lo que indica que el DNA se degrada lentamente frente a una síntesis más rápida, en los animales del 12% por el contrario, gracias al descenso de la actividad catabólica del enzima se favorece el incremento (♀) o el mantenimiento (♂) del DNA, desarrollándose un mecanismo netamente protector.

La actividad del enzima DNasa ácida se modula, por lo tanto, para favorecer el crecimiento al igual que sucede ante modificaciones en la dieta, como previamente hemos observado en músculo (Muñoz-Martínez y col, 1989), hígado (Muñoz-Martínez y col., 1982) y órganos linfoides de la rata sometida a varios niveles de proteínas y calorías en la dieta (Muñoz-Martínez y col., 1981). También Castro y Sevall (1980) señalan que la sensibilidad de la cromatina a la nucleasa microcócica desciende en ratas alimentadas sin proteína, lo que indica que las modificaciones en la proporción de los macronutrientes afecta seriamente al genoma de la célula (Castro y col., 1986).

5.1.3. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL METABOLISMO DEL RNA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO.

El incremento de la cantidad absoluta de RNA durante el crecimiento muscular de los animales NT, resulta menor proporcionalmente que la masa total del músculo, por lo que la concentración de RNA por gramo, por proteína y por célula disminuye en general en función de la edad, a excepción de la razón RNA/DNA del grupo ♂ 12% NT en el que aumenta y de las razones RNA/proteína y RNA/g del grupo ♀ 20% NT en el que se elevan o se mantienen (Tablas 45 y 46). También en músculo de ratas y ratones en crecimiento y alimentados con dietas estándar se producen descensos temporales de la concentración del RNA (Lewis y col., 1984) (Millward y col., 1975) (Aberle y Doolittle, 1976).

Se comprueba en este estudio, que la concentración de RNA depende no sólo de la influencia de la edad, sino también de la dieta y el sexo (Tabla 51), factores que modifican el metabolismo de este ácido nucleico a través de cambios en las tasas de síntesis y de catabolismo, al igual que sugieren Millward y col. (1974b) en músculo esquelético de ratas bien alimentadas.

Rozovski y Winick (1979) encuentran en hígado de ratas que la velocidad de síntesis de RNA se incrementa durante el período prenatal y alcanza su máximo después del destete, pero señalan que su regulación durante el desarrollo, también depende de cambios en la velocidad del catabolismo y de las alteraciones en el transporte del RNA desde el núcleo al citoplasma.

El enzima RNasa ácida parece intervenir de forma importante en dicha regulación (Rahman y col., 1969), mediante la disminución de su capacidad degradativa, en especial en las dos primeras semanas de vida (Rosso y col., 1973).

En el músculo en crecimiento, la formación del enzima RNasa ácida aumenta entre los 25 y 50 días de vida (Tabla 47), pero su actividad catabólica depende de las condiciones de crecimiento de cada grupo de animales NT (Tabla 48).

El aumento de la actividad ribonucleasa ácida del grupo ♀ 12% NT coincide con el incremento del RNA total, lo que parece señalar la existencia de un recambio acelerado del ácido nucleico, en el que el efecto degradativo del enzima parece jugar

un papel regulador, de acuerdo con la relación lineal existente entre ambos parámetros (Gráfica 27), igual que sucede en linfocitos estimulados con mitógenos (Green, 1977).

Por el contrario, el grupo ♂ 12% NT eleva el RNA total a través de la disminución de la capacidad degradativa del enzima RNasa ácida en la misma proporción en la que se incrementa el ácido nucleico (Tabla 48). Sin embargo, el hecho de no existir correlación lineal entre el RNA y la actividad enzimática RNasa ácida sugiere que el mecanismo predominante en el desarrollo del RNA es la síntesis (Gráfica 27).

Los mecanismos de crecimiento del RNA en los ratones NT sometidos al 20% de proteína son diferentes. El mantenimiento de la actividad específica de RNasa ácida durante todo el período estudiado, permite a los animales ♀ 20% NT presentar los máximos aumentos temporales del RNA total (Tablas 45 y 48). Ello significa, que en este grupo la tasa del ácido nucleico también depende fundamentalmente del aumento de la síntesis, de acuerdo con su falta de correlación lineal con la actividad enzimática (Gráfica 27). Por el contrario, es gracias a la pérdida de la actividad degradativa del enzima, de la que depende negativamente (Gráfica 27), la que permite al grupo ♂ 20% NT aumentar la cantidad total de RNA frente a una síntesis no muy activa.

Así pues durante el crecimiento del músculo gastrocnemio, las modificaciones en la concentración del RNA dependen, en parte, de la modulación de la actividad del enzima RNasa ácida, la cual contribuye al desarrollo del crecimiento intracelular del órgano .

Los mecanismos puestos en juego a este fin, dependen a su vez, de las condiciones nutritivas de los animales en estudio. Se observa, que el nivel más alto de proteína dietaria favorece el incremento de la concentración del RNA en el tejido, a pesar del aumento simultáneo de la actividad específica del enzima RNasa ácida respecto de los grupos sometidos a menores porcentajes de proteína (12%) (Tablas 45 y 48), lo que parece señalar un incremento en la velocidad de "turnover" del RNA.

Por el contrario, la caída de la actividad RNasa ácida parece ser un mecanismo protector puesto en juego por los animales del 12% de proteína, para frenar una mayor pérdida del RNA respecto a los animales bien alimentados.

Ello permite afirmar que también en músculo, la actividad específica de ribonucleasa ácida se modula en respuesta a modificaciones en la dieta, lo que permite regular la concentración del RNA tisular, al igual que se produce en hígado de ratas sometidas a diferentes niveles dietarios (Muñoz-Martínez y col., 1982, 1983). También la diferencia sexual influye sobre el crecimiento del ácido nucleico, puesto que la utilización de las ingestas proteica y energética en el depósito del RNA muscular por parte del grupo ♂ 12% NT facilita su mantenimiento, en contraposición al grupo ♀ 12% NT en el que es independiente del alimento ingerido (Gráfica 28a y b).

5.1.4. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL METABOLISMO PROTEICO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO.

El crecimiento definido como el aumento de la masa proteica, se produce mediante un continuo recambio, que puede ser regulado a través de modificaciones en las tasas de síntesis y de degradación de la proteína. (Millward y col., 1975)

A su vez, la concentración del RNA se reconoce como un índice de la intensidad de la síntesis proteica (Goldberg, 1967), siendo la razón RNA/proteína la expresión más apropiada para poder comparar la concentración del RNA con la velocidad fraccional de síntesis proteica, puesto que ambos parámetros están directamente relacionados (Millward y Waterlow, 1978).

Todos los animales NT, a excepción del grupo ♀ 20%, presentan descensos temporales de la razón RNA/proteína (Tabla 46), lo que señala que la disminución en la concentración de ribosomas y por lo tanto de la capacidad de síntesis proteica, está ligada a la pérdida de la velocidad de síntesis en músculo del ratón BALB/c en crecimiento (Millward y col., 1973). Ello coincide con la pérdida edad-dependiente de la tasa fraccional de crecimiento de la proteína muscular (VFPrM) anteriormente discutida (Tabla 4 y Gráfica 3b). También Lewis y col. (1984)

encuentran que los descensos temporales de la capacidad ribosómica y de la velocidad fraccional de síntesis proteica, están correlacionados con la caída simultánea de la tasa fraccional de crecimiento de la proteína, en los músculos sóleo y tibial anterior de rata, entre el destete y la senectud. El mismo resultado encuentra Bates y Millward (1981) en ratas de rápido crecimiento.

De forma paralela, se produce una disminución en la tasa fraccional de degradación de la proteína muscular, lo que significa que en los animales más jóvenes, el máximo depósito de proteína muscular, se efectúa con las más altas velocidades de síntesis y de degradación (Millward, 1980a).

En efecto, las mayores velocidades absoluta y fraccional de proteína se establecen durante los días 25 y 30 del estudio (Tabla 4) y coinciden no sólo con los más altos valores de la concentración de ribosomas (RNA/proteína) (Tabla 46), sino también con las más altas actividades de catepsina D (Tabla 50), enzima proteolítica que se asocia con las modificaciones en la degradación proteica (Li, 1980). Estos descensos edad-dependientes de la actividad específica de catepsina D siguen la pauta señalada anteriormente para la tasa fraccional de degradación de la proteína, pero las mayores pérdidas temporales se producen en los animales sometidos al 12% de proteína (Tablas 50 y 55).

La catepsina D parece intervenir en la remodelación de la célula muscular durante el crecimiento, en especial en los animales más jóvenes, como demuestra la correlación lineal negativa entre la actividad específica del enzima y el incremento acumulado de proteína muscular (Gráfica 29a), lo que indica que las mayores velocidades de degradación coinciden con el menor acúmulo de proteína (Tablas 4 y 50). También Millward y col (1975) señalan la existencia de una correlación lineal entre la velocidad fraccional de degradación y la velocidad de crecimiento de la proteína durante el crecimiento muscular, correspondiendo las mayores VFPrM a las máximas tasas de degradación, lo que coincide con nuestros datos.

Este "incremento anabólico en degradación" de la proteína podría ser necesario para completar los cambios de arquitectura del aparato contráctil del músculo en crecimiento, así como para modificar el metabolismo de las proteínas citoplásmicas asociadas a su desarrollo, lo que puede ser una característica de cada tejido muscular (Millward y col., 1981a).

En cuanto al incremento de la capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) registrada en los animales ♀ 20% NT, sólo puede explicarse en relación a su forma de crecimiento. El aumento del número de unidades de DNA pero de menor tamaño (proteína/DNA), unido a un alto porcentaje de crecimiento del RNA total, conduce al aumento de la razón RNA/proteína (Tabla 46). Este mismo resultado encuentra Cheek (1968) en músculo de jóvenes entre 1 y 15 años. Como es difícil pensar en un incremento de la tasa fraccional de síntesis proteica edad-dependiente, en contra de todos los datos encontrados en la literatura, se puede postular en un descenso paralelo de la actividad del RNA, es decir, de la cantidad de proteína sintetizada por g de RNA/día, que explique la menor cantidad de proteína depositada por este grupo.

En otro orden de cosas, cuando comparamos la concentración de RNA y de DNA del músculo es obvio que la razón RNA/DNA disminuye con la edad en todos los animales NT estudiados, a excepción del grupo ♂ 12% NT en el que se incrementa (Tabla 46).

En general hay una menor concentración de ribosomas por núcleo a medida que el músculo crece, lo que significa la pérdida de la síntesis proteica por unidad de DNA, que a su vez depende de las características del crecimiento celular. En contraste con las pequeñas modificaciones de la razón RNA/DNA durante el crecimiento muscular señaladas en la rata (Millward y col., 1975, 1981a; Lewis y col., 1984; Jones y col., 1986), la disminución observada en este estudio puede estar determinada por la adición a las células musculares de las diferentes poblaciones celulares adyacentes, ya mencionadas, cuyos núcleos son comparativamente más inactivos al contener poco citoplasma (Jones y col., 1986), lo que determina la caída de la síntesis proteica por célula e impide reflejar la capacidad sintética real de las células musculares.

Por el contrario el aumento temporal, pero independiente de la edad (Tabla 53), de la razón RNA/DNA del grupo ♂ 12% NT se asociaría a su crecimiento hipertrófico, sin aumento del número de unidades de DNA (Tabla 24). Ello le obliga a acomodar una alta cantidad de RNA en el mismo número de células durante todo el período estudiado, lo que puede dar lugar a un aumento de la síntesis proteica por unidad de DNA.

No sólo la edad imprime diferencias en la forma de crecimiento muscular y en el "turnover" proteico del órgano, también el nivel de proteína dietaria modifica la relación existente entre síntesis y degradación proteica, lo que depende a su vez del tipo de crecimiento celular de cada grupo de animales estudiados.

Así, la hiperplasia, la disminución del tamaño celular y el aumento de la cantidad total del RNA son la causa del incremento en la capacidad de síntesis proteica muscular (RNA/proteína) observada en los animales NT sometidos al 20% de proteína dietaria. En estos animales, el depósito de la proteína muscular esta favorecido por la profunda disminución de la capacidad degradativa del enzima catepsina D (Tabla 50), mecanismo similar al observado en ratas tratadas con acetato de trembolona (Vernon y Buttery, 1976), pese a lo cual, tanto la velocidad fraccional de crecimiento como el depósito absoluto y relativo de la proteína muscular son menores respecto a los animales del 12% NT.

Por su parte, los grupos sometidos al nivel más bajo de proteína dietaria (12%), que crecen fundamentalmente por hipertrofia, presentan tanto una menor capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) como de síntesis proteica por unidad de DNA respecto a los grupos 20% NT (Tabla 46). Este resultado unido a una altísima capacidad degradativa (catepsina D/proteína) (Tabla 50), hace suponer la existencia de un incremento de la actividad de síntesis por ribosoma (actividad de RNA), que compense la baja concentración de RNA en estas células y que explique el mayor depósito de proteína muscular sarcoplásmica.

No obstante, la alta velocidad fraccional de crecimiento de la proteína muscular de estos animales, depende tanto de la actividad ribosómica como de la propia capacidad de síntesis, como demuestra la relación lineal existente entre la VFPrM y la razón RNA/proteína (Gráfica 29b).

Por lo tanto, estos animales parecen mantener un metabolismo proteico acelerado caracterizado por su alta tasa de recambio, inherente a los animales muy jóvenes en crecimiento, que les permite depositar mayores cantidades de proteína sarcoplásmica que los grupos del 20%, al igual que se produce en músculos lisos con muy poca proporción de proteínas contráctiles (Goldspink y col., 1984).

Por otra parte, el enzima catepsina D juega un importante papel en el crecimiento muscular, modificando la degradación proteica y contribuyendo a la

adaptación del metabolismo proteico a dicho proceso. De acuerdo con esto, Desai (1969, 1971) propone que los enzimas lisosómicos ejercen papeles específicos en los mecanismos adaptativos que regulan el "turnover" de los tejidos corporales.

También el nivel de proteína dietaria modula la actividad enzimática, la cual responde regulando la degradación proteica en respuesta a la dieta, de tal modo que la menor disponibilidad de aminoácidos induce las mayores actividades enzimáticas y viceversa, como se demuestra por la relación inversamente proporcional entre la actividad enzimática y el aumento de la cantidad de IP e IE consumidas (Gráficas 30a y b). En este sentido, Gilbreath y Trout, (1973) proponen que la actividad de catepsina D tiene un papel fundamental en el catabolismo muscular durante la adaptación al estado nutritivo.

5.2. ESTUDIO EN RATONES BALB/c DE AMBOS SEXOS ENTRE 25 Y 50 DÍAS DE VIDA TRATADOS (T) CON HORMONA DE CRECIMIENTO (rhGH) Y SOMETIDOS A DOS NIVELES DE PROTEÍNA EN LA DIETA (12 y 20%). EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE LA HORMONA.

5.2.1. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA Y EL SEXO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO.

En estudios previos se ha demostrado (Agis, 1994) que la administración exógena de la hormona de crecimiento (rhGH) durante el período del destete a ratones BALB/c de ambos sexos, determina una respuesta bifásica a consecuencia de la profunda disminución inicial de la ingesta de alimentos, lo que impide el crecimiento normal del animal al desencadenar un déficit proteico-calórico.

Durante la primera etapa de la respuesta (25-35 días de vida) se produce el cese del crecimiento corporal consecutivo a la deficiencia, que más tarde se recupera a valores control durante la segunda etapa (35-50 días de vida). La rehabilitación se lleva a cabo por un mecanismo de crecimiento compensador en el que parece participar la hormona somatotropa y que está condicionado por el nivel de proteína de la dieta. Las posibles causas de este anómalo comportamiento frente a la GH ya han sido discutidas (Agis, 1994).

5.2.1.1. *Primera fase de la respuesta*

Como era de esperar, también el crecimiento del músculo gastrocnemio responde de forma bifásica a la administración exógena de la GH, puesto que en todos los animales tratados se produce una disminución temporal del peso muscular absoluto (Tabla 9 y Gráfica 2a), mediante la pérdida de las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento ponderal entre los días 25 y 35 de vida (Tabla 10), lo que determina la caída de estos valores respecto a los animales NT (Tablas 17 y 18).

Este resultado confirma el descenso del potencial de crecimiento muscular, a consecuencia del déficit calórico por restricción dietaria (Keys y col., 1950), que en los animales sometidos al 12% de proteína se suma a la deficiencia en proteínas de la dieta. Coward y col. (1977) y Goodman y Ruderman (1980) encuentran en músculo gastrocnemio de ratas restringidas de alimento y ayunadas, respectivamente, disminuciones en el peso en relación a los controles.

De forma simultánea la proteína muscular absoluta se pierde (Tabla 11 y Gráfica 2b) a consecuencia de la incapacidad del músculo para ganar más sustrato, lo que está en función del nivel nutritivo de cada grupo, puesto que la pérdida es más aguda en los animales sometidos al 12% de proteína. En éstos animales, la caída de la proteína muscular se verifica mediante la disminución de las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento de la proteína muscular que presentan valores negativos (Tabla 12 y Gráfica 4b), contribuyendo así al descenso de los valores del incremento acumulado de la proteína (Gráfica 4a). También Millward y col. (1975) señalan en ratas malnutridas, que los valores negativos de la VFPrM inducen la pérdida de la proteína muscular, lo que hace imposible la rehabilitación posterior del órgano.

Por el contrario los animales Tratados sometidos al 20% de proteína mantienen estables en el tiempo y con valores positivos todas las variables mencionadas (Tablas 11 y 12) durante esta primera etapa de la respuesta a la hormona, lo que les permitirá la recuperación posterior del músculo por crecimiento compensatorio, coincidiendo con la evolución temporal de dichas variables (Gráficas 2a y b, 4a y b).

Así pues, el porcentaje de la proteína dietaria en condiciones de restricción energética, afecta profundamente las tasas de crecimiento y la capacidad de retención nitrogenada del músculo, debido a la diferencia en la utilización de las ingestas proteica y energética por parte de los ratones sometidos a cada nivel dietario. Dicha utilización disminuye hasta hacerse negativa en los animales de nivel proteico más bajo, provocando el decrecimiento de la eficacia de depósito de la proteína muscular, tanto respecto a los animales T mejor nutridos (Gráfica 6a y b), como a los controles NT de la misma dieta (12%), efecto que se prolonga a lo largo de la experiencia (comparese gráficas 5a y 6a, 5b y 6b).

La pérdida de la masa muscular es una constante en el déficit calórico y proteico-calórico durante el postdestete (Dickerson y McAnulty, 1975; Glore y Layman, 1983; Hill y col., 1970 y Winick y Noble, 1966), aunque de acuerdo con nuestros datos, la caída más profunda de la proteína muscular se produce en animales restringidos en energía, cuya ganancia ponderal y proteica llega a hacerse negativa cuanto más profundo es el déficit (Lunn y Austin, 1983).

En estos animales restringidos no se protege la masa muscular, lo que contribuye a la homeostasis, puesto que el músculo esquelético como mayor reserva proteica del cuerpo, moviliza los aminoácidos musculares (Felig, 1975; Ruderman, 1975) que pueden servir como precursores para gluconeogénesis en hígado (Exton y col., 1970) o riñón (Krebs y col., 1963), como sustratos para su oxidación en el músculo (Goldberg y Odessey, 1972) o en la síntesis de nuevas proteínas, esenciales durante la adaptación a la restricción. A ello se une la utilización de los ácidos grasos derivados de la lipólisis, que se incrementa (Li y Goldberg, 1976) a partir de la grasa corporal, mecanismo quizá favorecido en este caso, por la acción de la GH (Agis, 1994).

Se comprueba, por lo tanto, que la profunda disminución de la ingesta de alimentos provocada por la hormona, impide su efecto anabólico sobre el músculo (Boyd y col., 1986; Evock y col., 1988) y desencadena un síndrome de subnutrición. También en cerdos la administración exógena de somatotropa da lugar a la disminución de la velocidad de crecimiento muscular, asociada con la caída en un 22% de la ingesta de alimentos (Boyd y col., 1988), lo que parece depender de su relación lineal con dosis crecientes de pGH (Ivy y col., 1986). Este efecto puede ser el origen de la incapacidad para incrementar la retención nitrogenada en cerdos y ovejas muy jóvenes GH-tratadas (Sandles y Peel, 1987), aunque su mecanismo no se conoce.

El factor que más parece influir en el proceso es el momento fisiológico en el que se administra la hormona, puesto que los delicados mecanismos de adaptación a la alimentación sólida (Isaad y col., 1988) se ven desbordados por el déficit calórico, agudizándose el estrés propio del destete (Gilbreath y Trout, 1973). A ello se une la menor sensibilidad de los tejidos a la GH durante este período (Glasscock y col., 1991), que se agrava por la insensibilidad provocada por la malnutrición

(Merimeé y col., 1982). También Searle y col. (1992) indican en ratones GH-transgénicos que el crecimiento es muy rápido dos semanas antes del destete, lo que va seguido de un período de estasis en las semanas anterior y posterior a este período crucial. Este comportamiento parece relacionado con la reducción de la ingesta, asociada a la adaptación del tracto digestivo a los alimentos sólidos (Speck y col., 1988), lo que parece coincidir con nuestros datos.

5.2.1.2. Segunda fase de la respuesta

Durante la segunda fase de la respuesta a la hormona (35-50 días de vida) los ratones mejor nutridos (20% de proteína) recuperan la función de crecimiento del músculo gastrocnemio, con importantes incrementos temporales en el peso y en la proteína muscular (Tablas 9 y 11), lo que se debe al aumento de la ganancia acumulada de la proteína (Tabla 12) así como de la eficacia de utilización de la ingesta (Gráfica 6a y b).

El mecanismo de rehabilitación se inicia con el aumento de la ingesta de alimentos (autocontrolada), como se ha comprobado previamente (Agis, 1994), proceso semejante a la hiperfagia producida durante el crecimiento compensatorio, que sigue a la pérdida de peso corporal por restricción dietaria (Harris y col., 1986). Su mecanismo, desconocido, se ha relacionado con la capacidad de regulación del peso corporal a una edad determinada (set-point theory) lo que llevaría, a través de la disminución de los sustratos, al estímulo de la ingesta a nivel hipotalámico (Harris, 1990).

Los animales sometidos al 20% de proteína dietaria incrementan su peso muscular absoluto (Tabla 9), debido al aumento de la ganancia de peso y de las velocidades absoluta y fraccional de crecimiento ponderal durante este período (35-50 días de vida) (Tabla 10).

Estos animales invierten la dirección de la VFCM, que normalmente descende con la edad (Bates y Millward, 1981), facilitando el depósito de sustratos y alcanzando la rehabilitación del peso del órgano. El mismo incremento porcentual se registra en la tasa de crecimiento absoluto de la proteína, aunque se mantiene (♀)

o se incrementa (σ) la VFPrM (Tabla 12 y Gráfica 4b), dando lugar a una elevada ganancia proteica muscular, que es superior a la de los ratones NT (Tabla 20, compárese gráficas 3a y 4a). También en ratas rehabilitadas después de una malnutrición severa (1% proteína), Millward y col. (1975) encuentran rápidas tasas fraccionales de crecimiento de la proteína muscular, a los cuatro días de la realimentación con una dieta alta en proteína, aunque sus valores no alcanzan los del control de su misma edad.

El incremento del depósito proteico muscular se realiza en proporción a la cantidad de proteína y energía ingeridas, lo que significa que los animales 20% T presentan una buena utilización de la ingesta con altas eficacias de depósito proteico, alcanzando 0,48 mg proteína depositada/g IP consumida (Gráfica 6a) y 0,0063 mg proteína depositada/kj de IE consumida (Gráfica 6b).

Sin embargo en los animales alimentados con la dieta del 12% de proteína, aunque incrementan su peso muscular (Tabla 9), mediante el aumento en un 75% de la ganancia acumulada de peso y el mantenimiento de las tasas de crecimiento ponderal (Tabla 10), la proteína muscular permanece baja durante todo el período estudiado (Tabla 11 y Gráfica 2b). Ello depende de la negatividad de las tasas absoluta y fraccional de crecimiento de la proteína (Tabla 12 y Gráfica 4a y b) que impiden una ganancia neta, por lo que la concentración proteica muscular disminuye tanto respecto a los animales T del 20% (Tabla 11), como respecto a los ratones NT (Tabla 19). Este resultado se relaciona con la ineficacia de la utilización de las ingestas puesto que estos animales pierden hasta -0,113 mg de proteína muscular/g de IP y hasta -0,8 μ g de proteína muscular/Kj de energía ingerida, lo que determina la mala utilización de los nutrientes y el decrecimiento muscular, en especial por parte de los animales σ (Gráfica 6a y b).

De mismo modo, Campbell y col. (1985b) indican que el depósito proteico corporal responde de forma lineal al incremento de la ingesta, hasta llegar al límite del apetito del animal y que la acreción proteica aumenta con el incremento de la proteína dietaria, tanto en animales controles como en tratados con GH (Campbell y col., 1991), lo que coincide con nuestros datos.

En consecuencia, la contribución de la proteína muscular a la proteína de la carcasa de los animales T de bajo nivel proteico (12%) es negativa, de acuerdo

con la pendiente de su recta de regresión (Gráfica 8) y en contraste con la de los animales T del 20% que aportan una media de $\approx 7,5$ mg de proteína muscular/g de proteína de la carcasa, logrando superar no solo a los animales del 12% T sino también a los grupos del 20% NT (compárese gráficas 7 y 8).

Ello demuestra la gran influencia que el nivel proteico dietario ejerce sobre la capacidad de rehabilitación del crecimiento muscular, lo que se relaciona con la necesidad de una ingesta proteica adicional para llevar a cabo el crecimiento compensatorio. También el máximo efecto anabólico de la GH parece depender de un nivel adecuado de proteína, como señalan en cerdos Campbell y col. (1990).

A la influencia de la edad y de la dieta se le añade la sexual, puesto que, aunque el peso muscular y su relación al peso corporal son idénticos en ambos sexos, independientemente de la dieta suministrada (Tabla 13), los animales ♀ 12% T presentan un ligero aumento de su VFCM en relación al sexo opuesto (Tabla 10). También los animales hembra de ambas dietas tienen velocidades absoluta y fraccional de la proteína más altas (Tabla 12), a pesar de lo cual, los animales macho obtienen mayores depósitos absolutos y relativos de proteína muscular (Tabla 11). Ello podría depender de la mayor cantidad de masa muscular de los machos respecto de las hembras y de su mayor sensibilidad a la modificación nutritiva (Morgan y col. 1988a), por lo que pueden presentar velocidades más bajas de crecimiento.

De lo expuesto se deduce que la recuperación del crecimiento muscular por parte de los animales bien alimentados después de restricción dietaria, parece efectuarse a través de un mecanismo de crecimiento compensatorio, favorecido probablemente por la acción anabólica de la GH.

El hecho de que un nivel más bajo de proteína dietaria impida el desarrollo del depósito proteico muscular, pero sí pueda aumentar el peso del músculo con la edad, sugiere que en este caso, el crecimiento compensador se realiza a través del aumento del depósito de grasa, al igual que se produce en el animal total (Agis, 1994) en un mecanismo independiente de la GH. En este sentido, Dulloo y Girardier (1992) señalan que durante el crecimiento compensador la energía se utiliza esencialmente hacia el almacenamiento de la grasa.

5.2.1.3. Estudio alométrico

La relación alométrica confirma la forma de crecimiento del músculo en relación al cuerpo total para cada grupo de animales T, bajo la influencia de los distintos factores estudiados (Gráfica 10a). Los animales ♂ y ♀ 20% T presentan un crecimiento muscular casi proporcional al del cuerpo total, (♀ $b=0,90$; ♂ $b=0,85$) con una contribución de proteína muy elevada, según indica el alto coeficiente alométrico de la relación proteína muscular/peso muscular (Gráfica 10b), lo que facilita la importante aportación de este sustrato a la proteína de la carcasa (Gráfica 8).

Los animales sometidos al 12% de proteína, por su parte, presentan una relación alométrica peso muscular/peso corporal muy distinta para ambos sexos (Gráfica 10a). El coeficiente alométrico ($b=0,91$) del grupo ♀ 12% T indica que el crecimiento muscular se realiza al mismo tiempo y casi de forma proporcional al del cuerpo total, aunque en este caso, no existe contribución de la proteína al crecimiento del músculo ($b=-0,05$), lo que podría relacionarse con un posible aumento de la grasa muscular, ya que de acuerdo con datos previos, este grupo utiliza preferentemente la IP hacia el depósito de grasa corporal (Agis, 1994). Ello justificaría la ganancia de peso muscular obtenida por estos animales.

El problema se agrava aún más en el caso del grupo ♂ 12% T, cuyo menor coeficiente alométrico ($b=0,60$) señala que el músculo crece en menor proporción que el PCF. La proteína no parece participar en este proceso (Gráfica 10b) a consecuencia de la alteración en la dinámica de crecimiento muscular, como demuestra la relación inversa existente entre las velocidades fraccionales de crecimiento de peso y de la proteína muscular, registrada en estos animales (Gráfica 12).

Por lo tanto y de acuerdo con los resultados obtenidos en relación con la edad, sólo los animales sometidos al 20% de proteína consiguen un crecimiento adecuado, gracias a la mejora sustancial de la eficacia de depósito de la proteína muscular, que contribuye en la segunda fase de la respuesta a la GH, a la recuperación del crecimiento del músculo gastrocnemio. El alto coeficiente alométrico de la proteína muscular frente al músculo indica además el grado de

madurez del tejido, ya que la depleción sufrida parece retrasar notablemente su maduración.

Por el contrario, los grupos del 12% de proteína dietaria, con un desarrollo graso preferente, no superan el crecimiento de la proteína muscular de los animales del 20% T y por lo tanto no presentan el mismo mecanismo de rehabilitación.

5.2.1.4. Efectos de la administración exógena de la hormona de crecimiento (rhGH).

La comparación entre animales NT y T confirma los resultados discutidos anteriormente dependientes del efecto de la GH. Así, la pérdida de peso y de proteína muscular absoluta (Tablas 17 y 19) durante la primera etapa de la respuesta, es debida a la disminución de las tasas de crecimiento (Tablas 18 y 20) y de la eficacia del depósito proteico, en especial en los grupos del 12% de proteína (compárese gráficas 5a y 6a, 5b y 6b). Sin embargo, el aumento de la VFPrM y de la cantidad de proteína relativa de los animales 20% T (Tablas 19 y 20) sugiere, que la acción anabólica de la GH se ejerce ya desde esta primera etapa en los animales mejor nutridos, al igual que sucede en novillos con restricción alimentaria y sometidos a la hormona, los cuales presentan incrementos en el contenido proteico corporal frente a los controles (Sandles y Peel, 1987).

La hiperfagia desarrollada durante la segunda fase de la respuesta (35-50 días de vida), favorece el aumento de la proteína muscular (Tabla 19) y de su ganancia acumulada, así como de la VFPrM que llega a ser un 60% más alta que en los animales controles 20% NT (Tabla 20). Este resultado, sólo puede explicarse por la influencia de la hormona somatotropa, que sobrepasa los mecanismos del crecimiento compensador propiamente dicho. Este efecto de la GH aumentando los depósitos de proteína de la carcasa (Caperna y col., 1990) y del músculo, se ha demostrado en ratones Snell control y enanos (Bates y col., 1992) y en otras especies (Fabry y col., 1991) a través de una elevada VFPrM (Beermann y col., 1990; Bates y Pell, 1991), lo que determina el aumento temporal de la retención de nitrógeno (MacRae y col., 1991).

Así mismo, el incremento entre un 160% y un 210% de la eficacia del depósito proteico muscular, debido a la mejor utilización de las ingestas (compárese gráficas 5a y 6a, 5b y 6b), puede facilitar el aumento del aporte de la proteína muscular a la proteína de la carcasa (compárese gráficas 7 y 8) respecto de los animales NT. Este resultado se corresponde con el alto depósito proteico corporal encontrado previamente en estos animales T bien nutridos (Agis, 1994), lo que confirma la capacidad de la GH para incrementar la masa magra corporal (Bauman y col., 1982). De acuerdo con esto, Caperna y col.(1991) señalan que la administración de rpST a cerdos en crecimiento eleva un 66% la eficiencia de depósito de la proteína corporal.

El efecto anabólico de la hormona se manifiesta, de nuevo, por el aumento del coeficiente alométrico de la proteína muscular respecto al peso muscular (\bar{y} $b=1,44$; $\bar{\sigma}$ $b=1,30$) en relación al de los animales 20% NT (\bar{y} $b=0,57$; $\bar{\sigma}$ $b=0,70$) (compárese las gráficas 9b y 10b). Este resultado es consecuencia del aumento de la VFPrM respecto de la VFCM (compárese gráficas 11 y 12), lo que ayuda a que la proporción en la que el músculo crece en relación al cuerpo sea idéntica a la de los animales control NT ($b=0,90$) (compárese gráficas 9a y 10a).

Así pues, el hecho de que en la segunda etapa del estudio, los animales T sometidos al 20% de proteína se recuperen totalmente del déficit calórico previo y que lo hagan por mecanismos que sobrepasan a los de los animales control NT, parece ser debido a la superación de los mecanismos del crecimiento compensador desencadenados por el déficit, mediante la acción anabólica de la GH.

No obstante, de acuerdo con Rompala y col. (1984), durante el crecimiento compensador la acreción de proteína corporal también aumenta, aunque según Morgan y col. (1986b) el músculo gastrocnemio rehabilitado después de subnutrición, sólo consigue alcanzar un 80% del valor control, sin recuperar totalmente la función de crecimiento, lo que apoya la idea del efecto adicional de la GH en este estudio.

Además el efecto hormonal parece ser mayor a nivel muscular que a nivel corporal en el ratón BALB/c (Agis, 1994), lo que confirma la sensibilidad del músculo a la GH como tejido blanco de la acción hormonal (Isgaard y col., 1989).

Por el contrario los animales 12% T no pueden recuperar la proteína muscular (Tabla 19) ni los mecanismos que favorecen su depósito (Tabla 20), a consecuencia de la profunda disminución de la eficacia de acreción de la proteína muscular, respecto a la de los animales 12% NT (compárese gráficas 5a y 6a, 5b y 6b), lo que les impide contribuir al crecimiento de la proteína corporal a nivel de los animales control (compárese gráficas 7 y 8). Sin embargo, el incremento del peso muscular y de la velocidad fraccional de crecimiento ponderal del músculo, especialmente en los animales ♀ 12% T respecto a sus controles NT (Tablas 17 y 18), *confirma el posible acúmulo de grasa muscular antes mencionado*. Ello significa que la baja disponibilidad de aminoácidos impide a la hormona somatotropa, pese al incremento temporal de la ingesta, ejercer la misma acción anabólica que en los animales sometidos a un mayor nivel de proteína y contrarrestar los efectos negativos de la primera etapa del estudio.

Esto reafirma la idea, anteriormente expuesta, de que la función somatotrópica sobre el anabolismo proteico muscular necesita de un nivel de proteína adecuado, debido a la alta demanda de sustratos por parte de la hormona y por lo tanto, el aumento en la capacidad de depósito proteico muscular GH-dependiente, está en función del nivel de proteína de la dieta.

También MacRae y col. (1991) señalan que la disponibilidad de nutrientes tiene una influencia capital en la respuesta a la GH, puesto que la eficacia de la acreción de proteína corporal no aumenta si no hay un aporte de aminoácidos adecuado. De igual modo, en cerdos GH-tratados la respuesta se alcanza con un mínimo del 16 al 18% de proteína dietaria (Etherton, 1989), mientras que los efectos son muy pobres con un nivel del 14% (Smith y Kasson, 1991), anulándose con muy bajos niveles de proteína en la dieta (Caperna y col. 1991).

No obstante, la inhibición de la acción anabólica proteica de la GH en los ratones BALB/c T del 12% de proteína parece depender, no sólo del bajo contenido proteico de la dieta sino del estado metabólico provocado por el déficit calórico previo.

5.2.2. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA, EL SEXO Y EL TRATAMIENTO CON rhGH SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO.

La estasis del crecimiento del músculo gastrocnemio provocado por la deficiencia calórica, consecutiva a la disminución de la ingesta en todos los animales tratados con rhGH, se refleja a nivel celular por la profunda pérdida de la tasa de DNA y del número de núcleos. Durante la primera etapa de la respuesta (25-35 días), la caída llega a ser de un 20 a un 40% sobre el valor inicial (25 días) en los ratones T sometidos al 20% y al 12% de proteína dietaria respectivamente (Tabla 31).

La pérdida de las unidades de DNA es irreversible dada la imposibilidad de recuperación durante la segunda etapa de la respuesta a la hormona, en la que a pesar de un leve ascenso temporal que llega a ser aproximadamente de un 40% sobre los valores a día 30, nunca alcanzan la tasa de los animales controles NT, permaneciendo un 60% más baja que en éstos (Tablas 31 y 38).

El efecto se agudiza especialmente en el grupo σ 12% T cuyo DNA disminuye proporcionalmente al incremento acumulado de peso muscular (Gráfica 20).

Estos resultados demuestran el profundo efecto deplecionante del déficit calórico al inhibir la capacidad de proliferación celular del músculo gastrocnemio, quizá, a través de la disminución del número de células satélite capaces de unirse a las fibras musculares en este período de crecimiento (Mascarello y col., 1992). También Layman y col. (1981) encuentran, que el número de fibras musculares de los músculos sóleo y plantar de rata se reduce por restricción de un 25% del alimento, indicando que sólo dietas del 6% de proteína o una restricción energética del 50%, pueden causar un cese total de la proliferación.

Así mismo, la etapa de crecimiento hiperplásico en la que se encuentra el músculo *marca profundamente la depleción del DNA, al inducir la pérdida del potencial de crecimiento del órgano, puesto que después del destete dicho potencial parece estar controlado por la tasa de DNA (Layman y col., 1981). Por ello de acuerdo con Winick y Noble (1966) y Sands y col. (1979), la deficiencia nutritiva*

impuesta durante el período de proliferación celular determina la permanente reducción del número de células.

La disminución de la síntesis de DNA parece ser la causa fundamental de este proceso (Cheek y Hill, 1970), que aparece afectado de modo inicial siempre que hay una restricción nutritiva (Howarth, 1972) pudiendo reflejar el estado hormonal del animal. En este sentido, parece existir una pérdida de la capacidad de replicación de la síntesis de DNA muscular (Beach y Kostyo, 1968) por parte de la hormona de crecimiento, pese a la continuada administración exógena de ésta y al aumento de sus niveles endógenos durante malnutrición (Clemmons y Underwood, 1992) (Pimstone y col., 1968). Sin embargo, la baja sensibilidad de los tejidos a la GH durante este período de la vida (Glasscock y col., 1990), junto con la disminución de la tasa plasmática de IGF-I (Clemmons y col., 1981) por restricción energética (Underwood y col., 1986), unido a la disminución del número de sus receptores musculares (Vandelaar y col., 1991) pueden ser los responsables de este efecto.

Así mismo, los altos niveles de glucocorticoides que se registran en estas circunstancias tendrían un efecto aditivo en la supresión del acúmulo de DNA (Goldberg y Goldspink, 1975) (Millward y col., 1983a) (Sillence y Etherton, 1987), antagonizando la acción de la GH.

No obstante, la pérdida de DNA no sólo se debe a una posible disminución de su síntesis sino también a las modificaciones en su degradación, puesto que durante el crecimiento del músculo, la elevación temporal del enzima DNasa ácida en el tejido (Tabla 33) evoluciona recíprocamente a los cambios en la tasa de DNA (Tabla 34). Debido a que la actividad enzimática es inversamente proporcional al crecimiento del DNA en los grupos ♂ 12% T y ♀ 20% T (Gráfica 21), la tasa del ácido nucleico parece depender de la actividad degradativa del enzima.

Por otra parte, la administración de rhGH parece invertir el efecto de la dieta sobre la actividad DNasa ácida, puesto que se inhibe la degradación del DNA con el incremento de la proteína dietaria, aumentando la actividad enzimática en los grupos sometidos al 12% de proteína y disminuyendo en los alimentados con la dieta del 20%, lo que denota la influencia de la interacción ExDxT (Tablas 34 y 35).

Por lo tanto, en los ratones 20% T disminuye la degradación del DNA muscular respecto a los animales NT, como mecanismo de protección frente a la deficiencia, mientras que por el contrario, en los animales sometidos al 12% de proteína se pierde más DNA respecto a los controles (Tabla 38) por el aumento de la actividad catabólica de la DNasa ácida (Tabla 41). Este efecto parece ser consecuencia de la disminución en la disponibilidad de aminoácidos, ya que sólo en los ratones del grupo 12% T se produce una correlación lineal positiva entre la actividad DNasa ácida y las ingestas proteica y energética, lo que favorece la modulación del enzima, mientras que por el contrario los animales 12% NT presentan una correlación lineal negativa (Gráfica 26a y b).

El incremento de la actividad de DNasa ácida puede además relacionarse con el decrecimiento del número de mitosis del músculo, puesto que este enzima parece tomar parte en la regulación del ciclo celular (Mayanskaya y col., 1977), a través de la pérdida de la actividad DNasa.

Por otra parte, la evolución del tamaño celular resulta inversa a la del DNA, puesto que aumenta entre los 25 y 50 días de vida tanto en relación con la proteína como en relación al peso muscular, siendo mayor el incremento durante la primera etapa de la respuesta a la GH (25-30 días) en los animales macho (100%) que en las hembras (10%) independientemente de la dieta ingerida (Tabla 32), lo que se corresponde con un aumento del 40% sobre el tamaño de los animales NT (Tabla 39).

Estos datos sugieren que la proteína muscular se acomoda en un número menor de fibras, por lo que pese al descenso de sus valores absolutos (provocado por la deficiencia energética), el tamaño celular se incrementa, dando lugar a un músculo con menor número de unidades de DNA pero con más cantidad de sustrato. Tampoco el tamaño de la célula muscular se altera, aunque disminuye su número, en ratas restringidas en energía y normales en proteínas (Durand y col., 1967), o restringidas en proteína y en energía (Cheek y Hill, 1970).

En este sentido, Glore y Layman (1987) señalan que la restricción dietaria causa una pérdida de longitud, área y especialmente de diámetro de la fibra muscular, aunque la razón proteína/DNA no aparece afectada, e indica que la caída de esta razón, sólo se produce con restricciones de la ingesta de más del 70% (Glore y Layman, 1983).

Por lo tanto, la proteína y los otros constituyentes celulares, al contrario que el DNA, siguen incrementándose durante la segunda etapa del estudio (35-50 días), originando una hipertrofia muscular que es máxima a día 50 de vida (Tabla 32), y que resulta siempre superior a la desarrollada por los animales controles NT (Tabla 39).

Sin embargo el nivel proteico de la dieta, modifica las características de los sustratos causantes de la hipertrofia, puesto que mientras en los animales 20% T se aumenta un 90% la razón proteína/DNA del músculo, en los animales sometidos al nivel más bajo de proteína, o bien se mantiene (σ) o disminuye (φ) entre los 35 y 50 días de vida (Tabla 32), lo que corresponde a unas nueve veces menos proteína celular respecto de los animales controles NT, que los de mayor nivel proteico (Tabla 39).

Por el contrario, estos animales 12% T obtienen un mayor incremento de la razón peso muscular/NN en relación con los animales NT (Tabla 39) y por tanto su hipertrofia depende del aumento de otro tipo de componentes celulares.

Ello confirma datos anteriormente discutidos, en el sentido de que durante el segundo período de la respuesta a la hormona, el acúmulo de proteína muscular predomina en los animales alimentados con mayor concentración de proteína dietaria, mientras que la grasa y quizá el agua son los sustratos esenciales de la célula muscular de los animales tratados de menor nivel proteico. De ahí, la alta correlación existente entre las razones proteína/DNA (Gráfica 23a) y peso muscular/NN (Gráfica 23b) con el incremento de peso muscular en los animales tratados del 20% y del 12% de proteína dietaria, respectivamente.

Por lo tanto, una mayor concentración de proteína en la dieta (20%) induce la hipertrofia muscular por aumento de la acreción proteica celular, que se realiza de forma proporcional al incremento de la proteína muscular absoluta en este mismo período de vida (35-50 días) (Gráfica 22), gracias a la cual se produce la recuperación del peso muscular. Este hecho se verifica como resultado de la utilización preferente de la IE y de la IP hacia la proteína celular del músculo, cuya eficacia de depósito aumenta un 500% sobre la de los animales NT (compárese gráficas 17 y 24).

Los grupos sometidos a la dieta del 12% de proteína, por el contrario, presentan una menor capacidad de depósito proteico, debido a que depositan 6 veces más sustratos no proteicos que los animales del 20% de proteína en relación a los animales NT (Tabla 39). Ello es debido a la mejor utilización de las ingestas en el depósito de constituyentes celulares no proteicos respecto de los animales NT (compárese gráficas 19 y 25), lo que determina su desviación hacia el depósito graso corporal (Agis, 1994).

Este resultado confirma que a partir del día 35 de vida, el aumento de la ingesta total de los ratones T se dirige hacia la puesta en marcha de un crecimiento compensatorio, cuya más fiel expresión se produce a nivel celular, de acuerdo con Pitts (1986), mediante el incremento del tamaño de la célula, logrando superar el crecimiento muscular de los animales NT (Bedi y col., 1982), condición indispensable para la consideración de crecimiento compensatorio, que dadas sus características, podemos denominar como "parcial".

Sin embargo, el crecimiento compensador es muy distinto en los animales tratados de cada dieta. El incremento de la razón peso muscular/NN en los animales sometidos al 12% de proteína en relación a los NT confirma nuestra hipótesis, de que en estos animales se produce el crecimiento compensador gracias al acúmulo de sustratos no proteicos, pero con una mínima participación, si la hay, de la somatotropa.

Por el contrario, el masivo incremento de la razón proteína/DNA de los animales tratados del 20% de proteína permite reafirmar el posible efecto de la hormona provocando la hipertrofia compensadora.

Aún cuando se ha descrito (Cheek, 1968), que la terapia de reemplazamiento con GH a animales hipofisectomizados restaura el número de células del músculo, por disminución de la razón proteína/DNA (Cheek y col., 1971), también en animales intactos se ha descrito el efecto anabólico de la hormona. Así, en cerdos tratados con pGH Fabry y col., (1991) señalan que el área del músculo dorsal largo aumenta, aunque no se afecta el porcentaje de las fibras, lo que parece demostrar su influencia en el incremento de la sarcómera por unidad de fibra. Solomon y col., (1990) describen un "síndrome de fibra gigante" en músculo de cerdos en crecimiento tratados con GH, que podría estar relacionado con el aumento de la

acreción de la proteína y McCusker y Campion, (1986) en músculo de ratas con tumores que segregan GH, Beermann y col., (1987) en corderos y Solomon y col., (1987) en cerdos jóvenes en crecimiento, señalan que la administración exógena de GH permite el aumento tanto de DNA como del tamaño celular.

No obstante, también la insulina parece tener un importante papel en la regulación de la proteína muscular durante la rehabilitación después de malnutrición, puesto que se ha demostrado una correlación lineal entre la recuperación de la síntesis proteica y los niveles de la hormona (Millward y col., 1983a), aunque su acción parece antagonizada por otros factores no conocidos.

En este sentido, el incremento de los niveles de GH podría actuar por su efecto anti-insulina, lo que parece coincidir con la falta de correlación entre los niveles de insulina y la síntesis proteica en músculo de cerdos tratados con GH (Sève y col., 1993).

Sin embargo puesto que se ha probado una falta de respuesta a la GH por parte de las células miogénicas en proliferación (Ewton y Florini, 1980), así como, de las células satélite en condiciones "in vitro" (Allen y col., 1986), se ha propuesto la acción mediadora de las somatomedinas a través de su función facilitadora de la proliferación y la diferenciación de dichas células (Dodson y col., 1985) a nivel muscular (Isgaard y col., 1989).

5.2.3. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA, EL SEXO Y EL TRATAMIENTO CON rhGH SOBRE EL METABOLISMO DEL RNA EN MÚSCULO GASTROCNEMIO.

La pérdida de la tasa de DNA se acompaña, durante la primera etapa de la respuesta a la hormona, de la caída irreversible de la concentración de RNA a consecuencia del déficit proteico-calórico. La disminución más brusca se produce en el día 30 de vida, para después incrementarse ligeramente a partir del día 40, pero sin alcanzar el nivel inicial (Tabla 56) ni el de los animales NT (Tabla 67).

Por lo tanto, a pesar de los mecanismos de hiperfagia (Agis, 1994) y de

hipertrofia desarrollados por los animales T en la segunda etapa de la respuesta a la hormona, la concentración de RNA no se recupera. La causa fundamental es la profunda pérdida de la capacidad de proliferación celular y del potencial de crecimiento muscular, puesto que la síntesis de DNA es limitante para la formación de RNA en el músculo en crecimiento (Millward, 1980a). También Magnusson y col. (1990) señalan en músculo de ratas en ayuno, la persistencia del bajo contenido en RNA.

Es conocida la gran sensibilidad del RNA muscular a cambios agudos en la dieta, tanto en respuesta al ayuno (Li y Goldberg, 1976) como a bajas ingestas proteicas (Millward y col., 1975) o energéticas (Durand, 1976; Graystone y Cheek, 1969), aunque la recuperación de la tasa de RNA parece efectuarse pronto después de la rehabilitación (Millward y col., 1975).

Según Reeds y col. (1985) el control de las modificaciones a largo plazo del número de ribosomas se ejerce, o sobre las tasas relativas de la síntesis del rRNA y de las proteínas ribosómicas o sobre su degradación, ya que la velocidad a la que el número de ribosomas cambia está en función de su "turnover". En los animales T el recambio del RNA aparece deprimido por el déficit calórico, quizá mediante la disminución de la síntesis del rRNA, especialmente afectada por los glucocorticoides (Goodlad y Onyezali, 1981).

También la capacidad degradativa del enzima RNasa ácida regula la concentración del ácido nucleico como demuestra la correlación lineal existente entre ambos parámetros (Gráfica 31), aunque el efecto enzimático aparece condicionado, a su vez, por el nivel proteico dietario y el sexo (Tabla 62). Así, los animales T sometidos al 20% de proteína con un significativo crecimiento temporal del enzima (Tabla 58) presentan, por contraste, en los últimos días de vida, una actividad específica disminuida, tanto en relación a los animales 12% T (Tabla 59) como en relación a los animales 20% NT (Tabla 70). Esta disminución no es suficiente para proteger al RNA, lo que sugiere que el decrecimiento de la síntesis de RNA es superior al de su degradación, en especial en relación a los animales control NT. Ello contribuiría a la desagregación de poliribosomas en monoribosomas y a la disminución consiguiente de la capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) típica de estos estados deficitarios (Wernerman y col., 1985).

La degradación temporal más baja y más lenta la presentan los animales ♂ 20% T (Tabla 59 y 65), lo que da lugar a un ligero aumento en la concentración de RNA (Tabla 56) respecto de los animales ♀ 20% T, señalando una mayor protección del ácido nucleico.

Los animales T sometidos al 12% de proteína, por su parte, parecen mantener más difícilmente la concentración temporal de RNA que los animales de nivel proteico más alto, puesto que al descenso de la síntesis del ácido nucleico se le añade, o el mantenimiento (♀) o la elevación (♂) de la capacidad degradativa de la RNasa ácida (Tabla 59), lo que no contribuye, en modo alguno, a la protección del RNA. Por ello el ácido nucleico se pierde en relación tanto al nivel inicial (Tabla 56), como en relación al de los animales NT (Tabla 67).

Al igual que en el caso de la actividad DNasa ácida el tratamiento con rhGH invierte el efecto de la concentración de proteína de la dieta sobre la actividad RNasa ácida, disminuyendo la degradación del RNA en los animales del 20% de proteína e incrementándola en los del 12%, en sentido opuesto al comportamiento de los animales NT (Tabla 70), lo que depende de la influencia de la interacción ExDxT (Tabla 73), a pesar de la mayor cantidad enzimática relativa a RNA y DNA de los grupos de mayor nivel proteico (Tabla 59).

El efecto de la concentración de proteína dietaria es evidente, ya que la actividad RNasa ácida aumenta a medida que se incrementan las ingestas proteica y energética del grupo ♂ 12% T, mientras que, por el contrario, disminuye en los animales sometidos al 20% de proteína (Gráfica 32a y b).

La concentración de RNA parece estar regulada, por lo tanto, a través de las modificaciones de la actividad RNasa ácida a lo largo del crecimiento de los animales T, aunque predomina el efecto deplecionante del déficit calórico previo. El período de recuperación no puede mejorar el RNA, quizá por el bloqueo de la actividad RNA-polimerasa, enzima incrementada por la GH en ratas hipofisectomizadas (Florini y Breuer, 1966).

5.2.4. INFLUENCIA DE LA EDAD, LA DIETA, EL SEXO Y EL TRATAMIENTO CON rhGH SOBRE EL METABOLISMO PROTEICO DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO.

La disminución temporal del RNA afecta de forma singular a su concentración, por lo que las razones RNA/g, RNA/proteína y RNA/DNA también descienden (Tablas 56 y 57).

El decrecimiento de la razón RNA/proteína, que alcanza a día 50 de vida un 30% en los animales T sometidos a la dieta del 12% y hasta un 70% en los alimentados con el 20% en relación al valor inicial (Tabla 57), es consecutivo no sólo al déficit proteico-calórico inducido por la hipofagia, sino también a la pérdida edad-dependiente de la concentración de ribosomas y por lo tanto de la capacidad de síntesis proteica.

También en estados de inanición o en animales sometidos a dietas sin proteína (Waterlow y Stephen, 1968), o alimentados con dietas restringidas al 50% (Arnal y col. 1972), la disminución de la tasa fraccional de síntesis proteica se ha asociado tanto con modificaciones en la capacidad de síntesis (RNA/proteína) como en la actividad del RNA (Muramatsu y col., 1987a). Igualmente, las bajas tasas de síntesis proteica, que se producen en ratones Snell enanos en crecimiento, parecen depender más de la pérdida de la actividad ribosómica, que del número de ribosomas (Bates y Holder, 1988).

Por otra parte, el porcentaje de descenso temporal de la actividad específica del enzima catepsina D, que es proporcional al nivel proteico de la dieta, alcanza un 40% en los animales sometidos al 20% de proteína, mientras que sólo disminuye un 20% en los alimentados con el 12% (Tabla 61). Por lo tanto, la pérdida de la capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) es superior al descenso del catabolismo, lo que induce un bajo depósito de la proteína muscular, aunque esta disminución está, posiblemente, más relacionada con la pérdida de la capacidad de síntesis proteica que con la degradación enzimática, como indica la falta de correlación lineal entre la actividad catepsina D y el incremento de la proteína muscular (Gráfica 33a), al contrario de la correlación negativa existente en los

animales NT (compárese gráficas 29a y 33a). También Arnal y col. (1972) en músculo de ratas restringidas al 50% de la dieta control, encuentra descensos del 40% en la síntesis proteica, frente a un 25% de pérdida del catabolismo, lo que determina la caída del "turnover" proteico.

A medida que crecen los animales T presentan, en general, al igual que los NT, una disminución de la concentración de ribosomas por núcleo (RNA/DNA), que es dependiente del aumento del tamaño celular que resulta del crecimiento compensatorio y de la disminución de la tasa de RNA (Tablas 57 y 68). Sin embargo, el incremento temporal en RNA/DNA del grupo ♂ 12% T se asocia a la profunda aplasia celular, que alcanza pérdidas del 52% en DNA y que condiciona el incremento de la síntesis de proteína por unidad de DNA en el músculo de estos animales. El nivel proteico de la dieta y la forma de crecimiento del músculo influyen decisivamente sobre los mecanismos de adaptación del metabolismo proteico de los animales T, determinando distintas formas de acreción de la proteína muscular.

Así, la enorme hipertrofia, desarrollada por los animales T sometidos al 20% de proteína, es la causa del importante descenso de la razón RNA/proteína ($\approx 60\%$) respecto a los animales del 12% T (Tabla 57). Esta pérdida de la capacidad de síntesis proteica va acompañada de un incremento del enzima catepsina D y de su actividad degradativa, indicando un aumento del catabolismo proteico muscular (Tablas 60 y 61).

Ello contrasta con el aumento de la proteína muscular que es un 150% mayor que en los animales NT controles, a consecuencia del aumento de la velocidad fraccional de crecimiento de la proteína muscular (Tablas 19 y 20), la cual a su vez es independiente de la capacidad de síntesis proteica, como demuestra la falta de correlación entre ambos parámetros (Gráfica 33b). El aumento de la proteína muscular sólo puede explicarse mediante la existencia de un incremento en la actividad del RNA, que al elevar su tasa de síntesis por unidad de RNA, puede aumentar la eficiencia de la síntesis por ribosoma, permitiendo así la acumulación de la proteína muscular.

Por lo tanto, puede postularse para estos animales T bien alimentados un acelerado "turnover" proteico, mediante el aumento tanto de la síntesis proteica, a través de una mayor actividad ribosómica, como del catabolismo proteico pudiendo favorecer así la acreción de la proteína muscular.

Por el contrario, el menor tamaño celular en relación a la proteína (proteína/DNA) de los animales T sometidos al nivel proteico más bajo (12%) determina un mayor acúmulo del RNA por célula, con el consiguiente incremento de la concentración de ribosomas y de la capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) (Tabla 57). Ello, unido al descenso en la actividad degradativa de la catepsina D (Tabla 61) debería conducir, en condiciones normales, a un acúmulo neto de la proteína.

Sin embargo, ambos mecanismos son insuficientes para desarrollar una síntesis proteica neta, lo que se relaciona con el menor aporte de aminoácidos proporcionados por la dieta, que parece impedir la recuperación de la proteína muscular, al hacer negativa la velocidad fraccional de proteína y la ganancia de depósito proteico (Tablas 11 y 12).

Se confirma, por lo tanto, que la hipertrofia muscular de estos animales sometidos al 12% de proteína, no se produce por el aumento de la acreción proteica, sino a consecuencia del depósito de otros constituyentes celulares no proteicos, gracias a los cuales, su peso muscular iguala al del control (Tabla 17), y que como se viene indicando, parece ser un mecanismo GH-independiente, derivado exclusivamente del crecimiento compensador.

Así pues, la regulación de la masa muscular durante el proceso de rehabilitación en respuesta al déficit calórico provocado por la administración exógena de GH, presenta diferentes mecanismos, dependiendo del nivel de proteína de la dieta, puesto que el aumento de la masa magra requiere una alta concentración de proteína para ser efectiva.

El consumo de un mayor nivel de proteína permite a los ratones del grupo 20% T, aumentar el tamaño celular gracias al incremento de la síntesis y del catabolismo proteicos, a través de un posible aumento de la actividad del RNA. En este sentido, también se ha demostrado una correlación lineal entre la actividad del RNA y las modificaciones de la tasa fraccional de síntesis proteica, durante el

proceso de rehabilitación que sigue a una subnutrición (Muramatsu y col., 1987). Del mismo modo, Magnusson y col. (1990) indican que durante el mecanismo de recuperación la primera respuesta corresponde al aumento de la actividad de RNA, seguida más tarde del incremento de la síntesis de RNA y de la concentración de ribosomas.

Sin embargo, el aumento de la proteína muscular por encima del valor control y la rapidez de su depósito (15 días), cuando el período normal de rehabilitación muscular es de \approx 45 días (Pitts, 1986), parece señalar un efecto adicional de la somatotropa en el crecimiento compensador de los animales T bien nutridos, puesto que la GH puede aumentar tanto la síntesis como la degradación proteicas en ratas normales (Kostyo y Nutting, 1974), así como en pacientes quirúrgicos (Ward y col., 1987).

El mecanismo directo, por el que la somatotropa incrementa la síntesis proteica, parece realizarse a través de un aumento de la actividad de RNA, al igual que sucede en animales hipofisectomizados (Flaim y col., 1978), en los que la rápida acción de la hormona no depende de la formación de nuevo RNA, sino que resulta de un aumento de la capacidad de traslación de los ribosomas (Martin y Young, 1965).

No obstante la posibilidad de una acción endocrina o paracrina del factor IGF-I no se debe descartar, ya que este factor, además de incrementarse en respuesta a la administración de la hormona (Chung y col. 1985, Elsasser y col., 1987), se eleva durante la rehabilitación del crecimiento después de restricción energética (Clemmons y col., 1981; Isley y col., 1983). También Sève y col. (1993) señalan que el factor IGF-I presenta una buena correlación con la actividad ribosómica, durante la aceleración de la síntesis proteica muscular en animales GH-tratados, lo que le hace un buen candidato como mediador del crecimiento compensador en los animales T sometidos al 20% de proteína.

Además, aunque los mecanismos para detectar el déficit del tamaño corporal y para estimular el crecimiento compensador, son desconocidos, se ha demostrado que la secreción endógena de GH se incrementa durante la recuperación ponderal después de malnutrición (Sinha y col., 1973; Mosier y Jansons, 1976), aunque no se ha demostrado su relación directa con el crecimiento compensatorio (Mosier y col., 1986).

Sin embargo sigue en vigor la idea de que la GH juega un importante papel en los mecanismos de crecimiento por rehabilitación, por lo que se ha propuesto una secuencia hipotética de los mecanismos neurológicos que podrían desembocar en la liberación de GH y que controlarían el peso corporal adecuado para cada edad. En esta secuencia, la señal de déficit en el crecimiento sería captada por receptores de peso y comparados con el tamaño corporal propio de cada edad, lo que a su vez estimularía la liberación del GRF hipotalámico induciendo la formación hipofisaria de GH (Mosier, 1986), que en último término regularía el crecimiento.

6. CONCLUSIONES

- 1 - El músculo gastrocnemio de ratones BALB/c no tratados y tratados con rhGH entre el destete y la pubertad crece en función de la edad, del nivel proteico dietario y del sexo, aunque la administración de la hormona modifica su dinámica de crecimiento.
- 2 - El incremento de la eficacia de depósito junto con el aumento del "turnover" y de la velocidad de crecimiento de la proteína, permite a los ratones BALB/c 12% NT, alcanzar el peso muscular de los animales de mayor nivel proteico, lo que se manifiesta por el incremento del tamaño celular. Estas modificaciones implican la aceleración del crecimiento muscular, que resulta proporcional al crecimiento somático.
- 3 - El músculo gastrocnemio del ratón BALB/c, entre el destete y la pubertad, presenta una respuesta temporal bifásica a consecuencia del déficit calórico provocado por la administración exógena de rhGH.
- 4 - La primera etapa de la respuesta a la rhGH (25-35 días de vida) se caracteriza por la inhibición de la proliferación celular, la deplección irreversible de los ácidos nucleicos y la lentificación del metabolismo proteico, lo que da lugar a la pérdida del potencial de crecimiento muscular.
- 5 - Durante la segunda etapa de la respuesta a la rhGH (35-50 días de vida) se produce la rehabilitación del músculo gastrocnemio por hipertrofia compensadora, que facilita la recuperación del peso muscular a nivel control y cuyos componentes dependen del nivel de proteína dietaria.
- 6 - La ingesta de dietas marginales en proteína (12%) induce el acumulo de sustratos celulares no proteicos, mecanismo típico del crecimiento compensador producido durante la rehabilitación que sigue a una restricción dietaria y que parece ser GH-independiente.

7 - La hipertrofia compensadora desarrollada por el músculo gastrocnemio de los ratones 20% tratados parece depender del efecto prioritario de la GH. La hormona actúa acelerando el metabolismo, la velocidad de crecimiento y la eficacia de depósito de la proteína muscular, lo que da lugar al acúmulo celular de este sustrato.

8 - La acción anabólica de la somatotropa requiere de un porcentaje de proteína adecuado para ser efectiva en la recuperación muscular que sigue al cese del crecimiento por déficit calórico.

9 - El sexo no presenta una clara influencia sobre el crecimiento muscular durante la respuesta bifásica a la administración exógena de rhGH .

7. BIBLIOGRAFÍA

- Emery, P.W.; Rothwell, N.J. y Stock, M.J.:** Protein synthesis in liver, skeletal muscle and brown adipose-tissue of rats fed a protein-deficient diet. *Bioscience Rep. J.* 3: 569-575. 1983.
- Enesco, M. y Leblond, C.P.:** Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J. Embryol. Exp. Morph.* 10: 530-562. 1962.
- Enesco, M. y Puddy, D.:** Increase in the number of nuclei and weight in skeletal muscle of rat of various ages. *Am. J. Anat.* 114: 235-244. 1964.
- Epstein, C.J.:** Cell size nuclear content, and the development of polyploides in the mammalian liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 57: 327-334. 1967.
- Essien, A.I. y Fetuga, B.L.:** Muscle growth and development in the indigenous Nigerian pigs as influence by age, sex and body weight. *J. Agric. Sci. Camb.* 110: 619-625. 1988.
- Etherton, T.D.; Wiggins, J.P.; Chung, C.S.; Evock, C.M.; Rebhun, J.F. y Walton, P.E.:** Stimulation of pig growth performance by porcine growth hormone and growth hormone-releasing factor. *J. Anim. Sci.* 63: 1389-1401. 1986.
- Etherton, T.D.:** The mechanism by which porcine growth hormone improves pig growth performance. In: *Biotechnology in growth regulation.* pp 97-105. (Eds R.B. Heap, C.G. Proseer y G.E. Larming). Butterworths. London. 1989.
- Evans, H.M. y Simpson, M.E.:** Hormones of the anterior hypophysis. *Am. J. Physiol.* 98: 511-546. 1931.
- Evock, C.M.; Etherton, T.D.; Chung, C.S. y Ivy, R.E.:** Pituitary porcine growth hormone (pGH) and a recombinant pGH analog stimulate pig growth performance in a similar manner. *J. Anim. Sci.* 66: 1928. 1988.
- Ewton, D.Z. y Florini, J.R.:** Relative effects of the somatomedins, multiplication-stimulating activity and growth hormone on myoblasts and myotubes in culture. *Endocrinology* 106: 577. 1980.
- Exton, J.H.; Mallette, L.E.; Jefferson, E.H.; Wang, A.; Friedman, N.; Miller, T.B. y Park, C.R.:** The hormonal control of hepatic gluconeogenesis. *Recent. Progr. Hormone. Res.* 26: 411-461. 1970.
- Ezekwe, M.O. y Martin R.J.:** Cellular characteristics of skeletal muscle in selected strains of pigs and mice and the unselected controls. *Growth.* 39: 95. 1975.
- Fabry, J.; Demeyer, D.; Thieleman, M.F.; Deroanne, C.; Van de Voorde, G.; Deroover, E. y Dalrymple, R.H.:** Evolution of recombinant porcine somatotropin on growth performance, carcass characteristics, meat quality, and muscle biochemical properties of Belgian landrace pigs. *J. Am. Sci.* 69: 4007-4018. 1991.
- Falconer D.S.:** Replicated selection for body weight in mice. *Gen. Res. Cambridge* 22: 291-321. 1973.

Ariano, M.A.; Armstrong, R.B. y Edgerton, V.R.: Hind-limb muscle fiber populations of five animals. *J. Histochem. Cytochem.* 2: 51-55. 1973.

Arnal, M.; Fauconneau, G. y Pech, R.: Synthèses protéiques in vivo dans divers tissus du rat en croissance soumis à une réduction de l'apport énergétique de la ration. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 12: 91-108. 1972.

Arnal, M.; Ferrara, M.; Febvay, G. y Fauconneau, G.: Aspect dynamique du métabolisme protéique dans quelques tissus de l'aqueduc au cours du développement. *Bull. Tech. C. R.Z.V. Theix INRA* 30: 17-22. 1977.

Arnal, M.; Obled, Ch. y Attaix, D. In: *IV Symp. Int. Metabolism et Nutrition Azotées.* (Pion, R.; Arnal, M. y Bonin, P., eds) Inra II (les colloques de l'Inra, n° 16) Paris. pp 117-136. 1983.

Ashworth, A.: Growth rates in children recovering from protein-calorie malnutrition. *Br. J. Nutr.* 23: 835-845. 1969.

Attaix, D.; Aurousseau, E.; Maughebat, A. y Arnal, M.: Contribution of liver, skin and skeletal muscle to whole-body protein synthesis in the young lamb. *Br. J. Nutr.* 60: 77-84. 1988.

Baile, C.A.; Della-Fera, M.A. y McLaughlin, C.L.: Performance and carcass characteristics of swine injected daily with bacterially synthesized human growth hormone. *Growth* 47: 225-236. 1983.

Ballard, F.J. y Gunn J.M.: Nutritional and hormonal effects on intracellular protein catabolism. *Nutr. Rev.* 40: 33-42. 1982.

Baracos, V.E.; Rodemann, H.P.; Dinarello, C.A.; Goldberg, A.L.: Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E₂ release by leukocytic pyrogen (Interleukin-1). A mechanism for the increased degradation of muscle proteins during fever. *New Engl. J. Med.* 308: 553-588. 1983.

Baserga, R.: Tissue Growth Factors. In: *Handbook of Experimental Pharmacology.* vol. 57. Springer-Verlag. New York. 1981.

Bass, A.; Gutmann, E. y Hanzlikova, V.: Biochemical and histochemical changes in energy supply enzyme pattern of muscles of rat during old-age. *Gerontologia (Basel)* 21: 31-45. 1975.

Bates P.C. y Millward, D.J.: Protein turnover and growth. In: *Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body.* (Waterlow, J.C; Garlick, D.J. y Millward, D.J. eds.) pp: 530-591. Elsevier. North Holland. 1978.

Bates, P.C. y Millward, D.J.: Characteristics of skeletal muscle growth and protein turnover in a fast-growing rat strain. *Br. J. Nutr.* 46: 7-13. 1981.

- Bates, P.C. y Millward, D.J.:** Myofibrillar protein turnover: synthesis rates of myofibrillar and sarcoplasmic protein fractions in different muscles and the changes observed during postnatal development and in response to feeding and starvation. *Biochem. J.* 214: 587-592. 1983.
- Bates, P.C. y Holder, A.T.:** The anabolic actions of growth hormone and thyroxine on protein metabolism in small dwarf and normal mice. *J. Endocrinology* 119:31-41. 1988.
- Bates, P.C. y Pell, J.M.:** Action and interaction of growth hormone and the β -agonist, clenbuterol on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice. *Br. J. Nutr.* 65: 115-129. 1991.
- Bates, P.C.; Aston, R. y Holder, A.T.:** Growth hormone control of tissue protein metabolism in dwarf mice: enhancement by a monoclonal antibody. *J. Endocrinol.* 132: 369-375. 1992.
- Bauman, D.E. y Currie, W.B.:** Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanism involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63: 1514-1529. 1980.
- Bauman, D.E.; Eisemann, J.H. y Currie, W.B.:** Hormonal effects on partitioning of nutrients for tissue growth: role of growth hormone and prolactin. *Fed. Proc.* 41: 2538-2544. 1982.
- Bauman, D.E.:** Regulation of nutrient partitioning. In: *Herbivore nutrition in the subtropics and tropics.* (F.M.C. Gilchrist and R.I. Machie eds.). pp. 505-524. The Science Press, Craighall. South Africa. 1984.
- Bauman, D.E.; McCutcheon, S.N.; Steinhour, W.D.; Eppard, P.J. y Sechen, S.J.:** Sources of variation and prospects for improvement of productive efficiency in the dairy cow: a review. *J. Anim. Sci.* 60: 583-592. 1985.
- Bauman, D.E. y McCutcheon, S.N.:** The effects of growth hormone and prolactin on metabolism. In: *Proceedings VI international symposium on ruminant physiology control of digestion and metabolism in ruminants.* (L.P. Milligan; W.L. Grovum y B. Dobson eds.) pp: 436-455. Prentice-Hall. Englewood Cliffs. New York. 1986.
- Beach, R.K. y Kostyo, J.L.:** Effect of growth hormone on the DNA content of muscles of young hypophysectomized rats. *Endocrinology* 82: 882-884. 1968.
- Bedi, K.S.; Birzgalis, A.R.; Mahon, M.; Smart, J.L. y Wareham, A.C.:** Early life undernutrition in rats. 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refed adult animals. *Br. J. Nutr.* 47: 417-431. 1982.
- Beermann, D.H.; Boyd, R.D.; Fishell, V.K. y Ross, D.A.:** A comparison of the repartitioning effects of cimaterol and somatotropin on skeletal muscle growth. *Fed. Proc.* 1020. 4100A. 1987.
- Beermann, D.H.; Hogue, D.E.; Fishell, V.K.; Aronica, S.; Dickson, H.W. y Schricker, B.R.:** Exogenous human growth hormone releasing factor and ovine somatotropin improve growth performance and composition of gain in lambs. *J. Anim. Sci.* 68: 4122-4133. 1990.

- Beisel, W.R.:** Metabolic effects of infection. *Prog. Food Nutr. Sci* 8: 43-75. 1984.
- Berelowitz, M.; Szabo, M.; Fireston, S.; Chu, L.; Hintz, R. y Frohman, L.A.:** Somatomedin-C (SM-C) effects of hypothalamic somatostatin and pituitary GH release in vitro. Evidence for a negative feedback role in the regulation of GH secretion *Clin. Res.* 28(4) A760. 1980.
- Bergen, W.G.:** Protein synthesis in animal models. *J. Anim. Sci.* 38: 1071-1078. 1974.
- Bernier, J.F.; Calvert, C.C. y Baldwin, R.L.:** Energetic of protein synthesis in mice with a Major Gene for growth. *J. Nutr.* 117: 2036-2045. 1987.
- Bird, J.W.C.:** Skeletal muscle lysosomes In: *Lysosomes in Biology and Pathology.* (Dingle J.T. y Dean R.T. eds.) Vol. 4, pp. 75-109. American Elsevier. New York. 1975.
- Bird, J.W.C.; Brook, R.M.; Spanier, A.M. y Schwarz, W.N.:** Biology of lysosomes: cardiac and skeletal muscle. *J. Med. Cell. Cardiol.* 10: 10-17. 1978.
- Bird, J.W.C.; Carter, J.H.; Triener, R.E.; Brooks, R.M. y Spanier, A.M.:** Proteases in cardiac and skeletal muscle. *Fed. Proc.* 39: 20-25. 1980.
- Bizzozero, G.:** An address on the growth and regeneration of the organism. *Brit. Med. J.* 1: 728-732. 1894.
- Black, J.L.; Campbell, R.G.; Willians, I.H.; James, K.J. y Davis, G.T.:** Stimulation of energy and amino acid utilization in the pig. *Res. Dev. Agric.* 3: 121-134. 1986.
- Blau, M.M.; Pavlath, G.K.; Hardeman, G.; Chiu, C.P.; Silberstein, L.; Webster, S.G.; Miller, S.C. y Webster, C.:** Plasticity of the differentiated state. *Science* 230: 758-766. 1985.
- Boyd, R.D.; Bauman, D.E.; Beermann, D.H.; De Neergaard, A.F.; Souza, L. y Butler, W.R.:** Tritation of the porcine growth hormone dose which maximizes growth performance and lean deposition in swine. *J. Anim. Sci.* 63 (1): 218 (Abs.). 1986.
- Boyd, R.D.; Wray-Cahan J.P. y Kirk, B.:** Implication of somatotropin on nutrient requirements of growing swine. In: *Proc. Cornell Nutrition Conf.* pp: 81-92. Ithaca, New York. 1988.
- Boyd, D.R. y Bauman, D.E.:** Mechanism of action of somatotropin in growth. In: *Animal growth regulation.* (Campion, D.R.; Hausman, G.J. y Martin R.J. eds.) pp: 257-293. Plenum Press. New York. 1989.
- Breier, B.H.; Bass, J.J.; Butler, J.K. y Gluckman, P.D.:** The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor-I. *J. Endocrinol.* 111: 209-215. 1986.
- Breier, B.H.; Gluckman, P.O. y Bass, J.J.:** The somatotrophic axis in young steers: Influence of nutrition status and oestradiol-17 β on hepatic high and low affinity somatotrophic binding sites. *J. Endocrinol.* 116: 169-177. 1988.

Brooks, B.A.; Goll, D.E.; Peng, Y.S.; Greweling, J.A. y Henneck, G.: Effect of starvation and refeeding on activity of calcium-dependent protease in rat skeletal muscle. *J. Nutr.* 113: 145-158. 1983.

Brown, J.G. y Millward, D.J.: The influence of thyroid status on skeletal muscle protein-metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 8 (3): 366-367. 1980.

Brown, J.G. y Millward, D.J.: Manipulation of thyroid status in the rat by means of the osmotic minipump. *Proc. Nutr. Soc.* 40(3): A93. 1981.

Brown, J.G.; Bates, P.C.; Holliday, M.A. y Millward, D.J.: Thyroid hormones and muscle protein turnover. *Biochem. J.* 194: 771-782. 1981.

Brown, J.G. y Millward, D.J.: Dose response of protein turnover in rat skeletal muscle to triiodothyronine treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 757: 182-190. 1983.

Buhlinger, C.A.; Wangness, P.J.; Martin, R.J. y Ziegler, J.H.: Body composition, in vitro lipid metabolism and skeletal muscle characteristic in fast growing lean and in slow growing obese pig at equal age and weight. *Growth* 42 (2): 225-236. 1978.

Burch, W.N. y Van Wyk, J.J.: Triiodothyronine stimulates cartilage growth and maturation by different mechanisms. *Am. J. Physiol.* 252: E176-E182. 1987.

Burini, A.; Santidrian, S.; Morera, M.; Brown, P.; Munro, H.N. y Young, V.R.: Interaction of thyroid status and diet on muscle protein breakdown in the rat as measured by N⁶-methylhistidine excretion. *Metabolism* 30 (7): 679-687. 1981.

Burleigh, I.G.: Cellular regulation of growth and development in skeletal muscle. *Biological Rev.* 49: 267-320. 1974.

Burleigh, I.G.: In: *Meat animals. Growth and productivity.* pp: 119-150. (Eds. D. Lister; D.N.; Rhodes; V.R., Fowler y M.F. Fuller). Plenum Press. New York. London. 1976.

Burleigh, I.G.: Observations on number of nuclei within fibers of some red and white muscles. *J. Cell Science* 23: 269-284. 1977.

Burleigh, J.G.: Growth curves in muscle nucleic acid and protein: Problems of interpretation at the level of the muscle cell. In: *Studies in the agriculture and food sciences. Growth in animals.* pp. 101-136. (ed. T.L.J. Lawrence). Butterworths. London. Boston. 1980.

Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenilamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323. 1956.

Buttery, P.J. y Annison E.F.: In: *Biological efficiency of protein production* (Johns J.W.C. ed.) pp. 141. University Press. Cambridge. 1973.

Buttery, P.J. y Boozman K.N.: In: *Protein metabolism and nutrition.* pp. 197-206. (ed. D.J.A. Cole y col.) Butterworths. London. 1976.

Byrne, I.; Hooper, J.C. y McCarthy, J.C.: Effects of selection for body size on weight and cellular structure of 7 mouse muscles. *Anim. Prod.* 17: 187-196. 1973.

- Campbell, R.G.; Taverner, M.R. y Curic, D.M.:** The influence of feeding level on the protein requirement of pigs between 20 and 45 Kg live weight. *Anim. Prod.* 40: 489-496. 1985a.
- Campbell, R.G.; Taverner, M.R. y Curic, D.M.:** The effects of sex and energy intake between 48 and 90 Kg live weight on protein deposition in growing pigs. *Anim. Prod.* 40: 497-512. 1985b.
- Campbell, R.G. y Taverner, M.R.:** Genotype and sex effects on the relationship between energy intake and protein deposition in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 66: 678-686. 1988a.
- Campbell, R.G.; Steele, N.C.; Caperna, T.J.; McMurtry, J.P.; Solomon, M.B. y Mitchell, A.D.:** Interrelationships between energy intake and endogenous porcine growth hormone administration on the performance, body composition and protein and energy metabolism of growing pig weighing 25 to 55 Kg live weight. *J. Anim. Sci.* 66: 1643-1654. 1988b.
- Campbell, R.G.; Johnson, R.G. y King, R.H.:** Implications of biotechnological techniques for manipulating animal growth and development on tissue and dietary nutrient requirement of pig. In: *Biotechnology and acceptability*. pp: 137-144. (Van der Wal, P.; Nieuwhof, G.J. y Politiek, R.D. eds.). Pudoc. Wageningen. The Netherlands. 1989a.
- Campbell, R.G.; Steele, N.C.; Caperna, T.J.; McMurtry, J.P.; Solomon, M.B. y Mitchell, A.D.:** Interrelationships between sex and exogenous porcine growth hormone administration on performance, body composition and protein and fat accretion of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 67: 117-186. 1989b.
- Campbell, R.G.; Johnson, R.G.; King, R.H.; Taverner, M.R. y Meisinger, D.:** Interaction of dietary protein content and exogenous porcine growth hormone administration on protein and lipid accretion rates in growing pig. *J. Anim. Sci.* 68: 3217-3225. 1990.
- Campbell, R.G.; Johnson, R.G.; Taverner, M.R. y King, R.H.:** Interrelationships between exogenous porcine somatotropin (pST) administration and dietary protein and energy intake on protein deposition capacity and energy metabolism of pigs. *J. Anim. Sci.* 69: 1522-1531. 1991.
- Campion, D.E.; Purchas, R.W.; Meryel, R.A. y Romsos, D.R.:** Genetic obesity and the muscle satellite cell. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 176: 143. 1984.
- Caperna, T.J.; Steele, N.C.; Komarek, D.R.; Mc Murtry, J.P.; Rosebrough, R.W.; Solomon, M.B. y Mitchell, A.D.:** Influence of dietary protein and recombinant porcine somatotropin administration in young pigs: growth, body composition and hormone status. *J. Anim. Sci.* 68: 4243-4252. 1990.
- Caperna, T.J.; Komarek, D.R.; Gavelek, D. y Steele, N.C.:** Influence of dietary protein and recombinant porcine somatotropin administration in young pig II: Accretion rates of protein, collagen and fat. *J. Anim. Sci.* 69: 4019-4029. 1991.
- Cardasis, C.A. y Cooper, G.M.:** Analysis of nuclear number in individual muscle fibers during differentiation and growth satellite cell muscle fiber growth unit. *J. Exp. Zool.* 191: 347-358. 1975.

Castro, C.E. y Sevall, J.S.: Alteration of higher order structure of rat liver chromatin by dietary composition. *J. Nutr.* 110: 105-116. 1980.

Castro, C.E.; Armstrong-Mojar, J. y Ramirez, M.E.: Diet-mediated alteration of chromatin structure. *Fed. Proc.* 45: 2394-2398. 1986.

Clague, M.B.; Keir, M.J.; Wright, P.D. y Johnston, I.D.A.: The effects of nutrition and trauma on whole-body protein metabolism in man. *Clin. Sci.* 65: 165. 1983.

Clark, A.S.; Kelly, R.A. y Mitch, W.E.: Systemic response to thermal injury in rats. Accelerated protein-degradation and altered glucose utilization in muscle *J. Clin. Invest.* 74: 888-899. 1984.

Clemmons, D.R.; Klibanski, A. y Underwood, L.E.: Reduction of plasma immunoreactive somatomedin-C during fasting in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53: 1247-1250. 1981.

Clemmons, D.R.; Snyder, D.K.; Willians, R. y Underwood, L.E.: Growth hormone administration conserves lean body mass during dietary restriction in obese subjects. *J. Clin. Endocr. Metab.* 64: 878-883. 1987.

Clemmons, D.R. y Underwood, L.E.: Role of IGF-I and GH in reversing catabolic status. *Horm. Res.* 38 (supl. 2): 37-40. 1992.

Clugston, G.A. y Garlick, P.S.: Human nutrition. In: *Clinical Nutrition*: 36C: 57-70. 1982a.

Clugston, G.A. y Garlick, P.S.: Human nutrition. In: *Clinical Nutrition*: 36: 391-397. 1982b.

Cordesse, R. y Nougues, J.: Multiplication et grandissement cellulaires, activité cellulaire du tissu musculaire de lapin au cours de la croissance I. Aspect descriptif. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 13: 535-552. 1973.

Cossu, G. y Molinaro, P.: Cell heterogeneity in the myogenic lineage. *Curr. Top. Dev. Biol.* 23: 185. 1987.

Coward, W.A.; Whitehead, R.G. y Lunn, P.G.: Reasons why hypoalbuminemia may or may not appear in protein-energy malnutrition. *Br. J. Nutr.* 38: 115-126. 1977.

Cox, M.D.; Dalal, S.S. y Heard, C.R.C.: The importance of free T₃ measurements in assessing thyroid status in protein-deficient rat. *Proc. Nutr. Soc.* 40 (2): 39a. 1981.

Cox, M.D.; Dalal, S.S.; Heard, C.R.C. y Millward D.J.: Metabolic rate and thyroid status in rats fed diets of different protein-energy value: The importance of free T₃. *J. Nutr.* 114: 1609-1619. 1984.

Coyer, P.; Rivers, J.P. y Millward, D.J.: The effects of dietary protein and energy restriction on heat production and growth costs in the young rat. *Br. J. Nutr.* 58: 73-85. 1987.

Chatterjee, A.K.; Nnanyelugo, D.O. y Millward, D.J.: The effects of castration on the rate of tissue protein synthesis in vivo. *Proc. Nutr. Soc.* 34: 28-29A. 1975.

- Cheek, D.B.; Powell, G.K. y Scott, R.E.:** Growth of muscle mass and skeletal collagen in the rat I. Normal growth. *Bull. John Hopkins Hospital* 116: 378-387. 1965a.
- Cheek, D.B.; Powell, G.K. y Scott, R.E.:** Growth of muscle cells (size and numbers) and liver DNA in rats and Snell-Smith mice with insufficients pituitary, thyroid or testicular function. *Bull. John Hopkins Hospital* 117: 306-321. 1965b.
- Cheek, D.B.; Brasel, J.A.; Elliot, D. y Scott, R.:** Muscle cell size and number in normal children and in dwarfs pituitary cretins and primordial before and after treatment. *Bull. John Hopkins Hospital* 119: 46-62. 1966.
- Cheek, D.B.:** Muscle cell growth in normal children. In: *Human growth*. pp. 337-351 (D.B. Cheek, ed.). Lea y Febiger. Philadelphia. 1968a.
- Cheek, D.B.; Brasel, J.A. y Graystone, J.E.:** Muscle cell growth in rodents: sex differences and the role of hormones. In: *Human growth*. pp. 306-325. (D.B. Cheek, ed.). Lea y Febiger. Philadelphia. 1968b.
- Cheek, D.B. y Hill, D.E.:** Muscle and liver cell growth: role hormone and nutritional factors. *Fed. Proc.* 29: 1503-1509. 1970.
- Cheek, D.B.; Holt, A.B.; Hill, D.E. y Talbert, J.L.:** Skeletal muscle cell mass and growth: The concept of the deoxyribonucleic acid unit. *Pediatr. Res.* 5: 312-320. 1971.
- Cheek, D.B. y Scott, R.E.:** In: *Fetal and postnatal cellular growth*. pp: 243-257. (ed. D.B. Cheek). Wiley. New York. London. 1975.
- Cheng, J.S. y Kalant, N.:** Independence of growth hormone effects on nitrogen retention and free fatty acid mobilization. *Can. J. Biochem.* 46: 1269-1275. 1968.
- Chung, E.S.; Etherton, T.D. y Wiggins, J.P.:** Stimulation of swine growth by porcine growth hormone. *J. Anim. Sci.* 60: 118-130. 1985.
- Dahms, W.J.; Owens, R.P.; Walhan, S.C.; Kerr, D.S. y Danish, R.K.:** Urea synthesis, nitrogen balance and glucose turnover in growth-deficient children before and after growth hormone administration. *Metabolism* 38: 197-203. 1989.
- Dalke, B.S.; Roeder, R.A.; Kasser, T.R.; Veenhuir, J.J.; Hunt, C.W.; Hinman, D.D. y Schellin, G.T.:** Dose response effects on rbST implants on feedlot performance in steers. *J. Anim. Sci.* 70(7): 2130-2137. 1992.
- Daughaday, W.H.; Hall, K.; Raben, M.S.; Salmon, W.D.; Jr Van den Brande, J.L. y Van Wyk, J.J.:** Proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235: 107. 1972.
- Davidson, M.B.:** Effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr. Res.* 8: 115-131. 1987.
- Davis, D.L.; Weintraub, H. y Lasser, A.B.:** Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 51: 987-1000. 1987.

- Davis, T.A.; Fiorotto, M.L.; Nguyen, H.V. y Reeds, P.J.:** Protein turnover in skeletal muscles of suckling rats. *Am. J. Physiol.* 257: R1141-R1146. 1989.
- Dayton, W.R.; Goll, D.E.; Zeece, M.G.; Robson, R.M. y Reville, W.J.:** Ca²⁺ activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover purification from porcine muscle. *Biochem J.* 15: 2150-2158. 1976.
- Dayton, W.R.; Schollemeyer, J.V.; Lepley, R.A. y Cortes, L.R.:** A calcium-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Isolation of a low calcium-requiring form of the protease. *Biochim. Biophys. Acta.* 659: 48. 1981.
- De Martino, G.N. y Goldberg, A.L.:** Thyroid hormones control lysosomal enzyme activities in liver and skeletal muscle *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1369-1373. 1978.
- Dean, R.T.:** Direct evidence of importance of lysosomes in degradation of intracellular proteins. *Nature (London)* ii 257: 414-416. 1975.
- Desai, I.D.:** Regulation of lysosomal enzymes I. Adaptative changes in enzyme activities during starvation and refeeding. *Can. J. Biochem.* 47: 785-790. 1969.
- Desai, I.D.:** Regulation of lysosomal enzymes II. Reversible adaptation of intestinal acid hidrolases during starvation and realimentation. *Can. J. Biochem* 49: 170-176. 1971.
- Devi, A.; McKundan, M.A.; Srisvastava, V. y Sarkar, N.K.:** The effects of age on the variations of DNA, RNA y total nucleotides in liver, brain and muscle of rats. *Exp. Cell. Res.* 32: 242-249. 1963.
- Dice, J.F.; Walker, C.D.; Byrne, B. y Cardiel, A.:** General characteristic of protein degradation in diabetes and starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (5) 2093-2077. 1978.
- Dickerson, J.W.T.; Hughes, P.C.R. y Mc Anulty, P.A.:** The growth and development of rats given a low-protein a diet. *Br. J. Nutr.* 27: 527-536. 1972.
- Dickerson, J.W.T. y McAnulty, P.A.:** The response of hind-limb muscles of the weanling rat to undernutrition and subsequent rehabilitation. *Br. J. Nutr.* 33: 171-180. 1975.
- Dodson, M.V.; Allen, R.E. y Hossner, K.L.:** Ovine somatomedin, multiplication stimulating activity and insulin promote skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro. *Endocrinology* 117: 2357. 1985.
- Donachie, W.D.:** Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature* 219: 1077-1079. 1968.
- Dulloo, A.G. y Girardier, L.:** Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: Implications for catch-up possible and obesity relapse. *Metabolism.* 41 (12): 1336-1342. 1992.
- Dunkin, A.C.; Black, J.L. y James, K.J.:** Nitrogen balance in relation to energy intake in entire male pigs weighing 75 kg. *Br. J. Nutr.* 55: 201-216. 1986.

- Durand, G.; Fauconneau, G. y Penot, E.:** Croissance des tissus du rat et réduction de l'apport énergétique de la ration: influence sur la teneur en acides nucléiques. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 7: 145-155. 1967.
- Durand, G.; Fanconneau, F. y Penot, E.:** Repartition des cellules entre les tissus du rat adulte, préalablement soumis à une sous-nutrition énergétique temporaire a deux stades de la croissance. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 9: 55-73. 1969.
- Durand, G. y Penot, E.:** Effets du maintien à poids constant pendant de longues durées chez le rat sevré. Reprise de la croissance. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 10: 385-399. 1970.
- Durand, G.:** Effects comparés de restrictions protéiques et de restrictions énergétiques sur les contenus en protéines et en acides nucléiques des tissus du rat en croissance. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 13: 399-418. 1973.
- Durand, G.:** Interruption de la croissance du rat par sous-nutrition énergétique pendant des durées atteignant deux ans. Reprise de la croissance et de la multiplication cellulaire. *Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 16: 43-69. 1976.
- Early, R.L.; McBride, B.W. y Ball, R.O.:** Growth and metabolism in somatotropin-treated steers I: Growth, serum chemistry and carcass weight. *J. Anim. Sci.* 68: 4134-4143. 1990.
- Easter, R.A.:** Nutritional requirement and repartitioning agents. The partitioning revolution: Impact of somatotropin and β -adrenergic on future pork production. *Pork Industry Conference.* pp: 193-199. Univ. of Illinois, Urbana. 1987.
- Edmunds, B.K.; Buttery, P.J. y Fisher, C.:** Protein turnover and whole body nitrogen metabolism in the growing pig. *Proc. Nutr. Soc.* 37: 32A. 1978.
- Edozien, J.C. y Switzer, B.R.:** Influence of diet on growth of the rat. *J. Nutr.* 108: 282-290. 1978.
- Eisemann, J.H.; Tyrrell, H.F.; Hammond, A.C.; Reynolds, P.J.; Bauman, D.E.; Haaland, G.L.; McMurtry, J. P. y Varga, G.A.:** Effect of bovine growth hormone administration on metabolism of growing hereford heifers: Dietary digestibility, energy and nitrogen balance. *J. Nutr.* 116: 157. 1986.
- Eisemann, J.H.; Hammond, A.C. y Romsey, T.S.:** Tissue protein synthesis and nucleic acid concentration in steers treated with somatotropin. *Br. J. Nutr.* 62: 657-671. 1989a.
- Eisemann, J.H.; Hammond, A.C.; Romsey, T.S. y Bauman, D.E.:** Nitrogen and protein metabolism and metabolites in plasma and urine of beef steers with somatotropin. *J. Anim. Sci.* 67: 105-115. 1989b.
- Elsasser, T.H.; Pello, M. y Rumsey, T.S.:** Somatomedin-C (SMC) and binding protein responses to GH in cattle. *J. Anim. Sci.* (Suppl.) 1: 256. 1987.
- Elliot, D.A. y Cheek, D.B.:** Muscle and liver cell growth in rats with hypoxia and reduced nutrition. In: *Human growth.* pp. 323-336. Lea y Febiger. Philadelphia. 1968.

- Jasper, S.R.; Fagan, J.M.; Satarug, S.; Cook, P.H. y Tischler, M.E.: Effects of immobilization on rat hind-limb muscles under non-weight bearing conditions. *Muscle and Nerve*. 11 (5): 458-466. 1988.
- Jefferson, L.S.; Li, J.B. y Rannels, S.R.: Regulation by insulin of amino acid release and protein turnover in the perfused rat hemicorpus *J. Biol. Chem.* 252: 1476-1483. 1977.
- Jefferson, L.S.: Role of insulin in the regulation of protein synthesis. *Diabetes* 29: 487-496. 1980.
- Jenkins, A.B.; Whitaker, M. y Schofield, P.J.: Starvation induced increase in muscle protein degradation is non-lysosomal in origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86: 1014-1019. 1979.
- Jepson M.M.: Mechanism of the response of skeletal muscle and liver protein metabolism to dietary protein and endotoxaemia in young rats. *DhD. Thesis University of London*. 1987.
- Jepson, M.M.; Bates, P.C. y Millward, D.J.: The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat. *Br. J. Nutr.* 59: 397-415. 1988.
- Jones, S.J.; Aberle, E.D. y Judge, M.O.: Skeletal muscle protein turnover in broiler and layer chicks. *J. Anim. Sci.* 62: 1576-1583. 1986.
- Kalnitsky, G.; Hummel, J.P.; Resnick, H.; Cartier, J.R.; Barnett, C.B. y Dierks, C.: The relation of structure to enzymatic activity in ribonuclease. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 81: 542-566. 1959.
- Kelly, F.J. y Golspink, D.F.: The differing responses of 4 muscles types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochem. J.* 208(1): 147-151. 1982.
- Kelly, F.J. y Golspink, D.F.: Age-related growth of the spleen in normal and glucocorticoid treated rats. *Comp. Biol. A.* 75(1): 91-96. 1983.
- Kelly, A.M.: Satellite cells and myofiber growth in rat soleus and extensor digitorum longus muscles. *Develop. Biol.* 65: 1-10. 1978.
- Kerr, S.E. y Seraidarian. K.: The separation of purine nucleosides from free purines and the determination of the purines and ribose in these fractions. *J. Biol. Chem.* 159: 211-225. 1945.
- Keys, A.; Brozek, J. y Henschel, A.: In: *The biology of human starvation*. (M N ed). University of Minnesota Press. Minneapolis. 1950.
- Kielanowski, J.: Energy requirements of the growing pig. In: *Pig production* pp 183-201. (Cole D.J.N. ed.). Butterworth. London. 1972.
- Klapper, D.O.; Svoboda, M.E. y Van Wyk, J.J.: Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin like growth factor 1. *Endocrinology* 112: 2215-2217. 1983.

- Falconer, D.S.; Ganed, I.K., Roberts, R.C. y Williams, D.A.:** The control of body size in mouse Chimeras. *Gen. Res. Cambridge* 38: 25-46. 1981.
- Felig, P.; Marliss, E.B. y Cahill, G.F.:** Metabolism response to human growth hormone during prolonged starvation. *J. Clin. Invest.* 50: 411-421. 1971.
- Felig, P.:** Aminoacid metabolism in man. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 933-955. 1975.
- Flaim, K.E.; Li, J.B. y Jefferson, L.S.:** Protein turnover in rat skeletal muscle: effects of hypophysectomy on growth hormone. *Am. J. Physiol.* 234: E38-E43. 1978.
- Fleck A. y Munro, H.N.:** The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Tannhauser procedure of nuclei acid estimation. *Biochim. Biophys. Acta* 55: 571-583. 1962.
- Florini, J.R. y Breuer, C.B.:** Amino acid incorporation into protein by cell free preparations from rat skeletal muscle. Effects of pituitary growth hormone on activity of ribosomes and ribonucleic acid polymerase in hypophysectomized rats. *Biochem. J.* 5: 1870. 1966.
- Florini, J.R.:** Hormonal control of muscle growth. *J. Anim. Sci.* 6 (suppl. 2): 25. 1985.
- Florini, J.R.:** Hormonal control of muscle growth. *Muscle and Nerve* 10: 577-589. 1987.
- Fong, Y.; Rosenbaum, M.; Tracey, K.J.; Raman, G.; Hesse, D.G.; Matthews de Leibel, R.L.; Gertner, J.M. y Fischman Da Lowry, S.F.:** Recombinant growth hormone enhances muscle myosin heavy-chain mRNA accumulation and amino acid in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 3371-3374. 1989.
- Fowler, V.A. y Kanis, J.K.:** Use of recombinant porcine somatotropin (pST) in Europe: Research experience and perspectives. In: *Biotechnology for control of growth and product quality in swine implications and acceptability.* Van der Wal, P.; Nieuwhof, G.J. y Politek, R.D. (eds.). Pudoc, Wageningen, The Netherlands. 1989.
- Fryburg, D.A.; Gelfand, R.A. y Barrett, E.J.:** Growth hormone acutely stimulates forearm muscle protein synthesis in normal humans. *Am. J. Physiol.* 260: E499-E504. 1991.
- Garlick, P.J.; Millward, D.J. y James, W.P.T.:** The diurnal response of muscle and liver protein synthesis in vivo in meal-fed rats. *Biochem. J.* 136: 935-946. 1973.
- Garlick, P.J.; Millward, D.J.; James, W.P.T. y Waterlow J.C.:** The effect of protein privation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. *Biochim. Biophys Acta* 414: 71-84. 1975.
- Garlick, P.S.; Burk, T.L. y Swick, R.W.:** Protein synthesis and RNA in the tissues of the pig. *Am. J. Physiol.* 230:1108-1115. 1976.
- Garlick, P.J.; McNurlan, M.A. y Preedy, V.R.:** A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein-synthesis in tissues by injection of phenylalanine. *Biochem. J.* 192: 719-723. 1980a.

Garlick, P.L.; Clugston, G.A. y Waterlow, J.C.: Influence of low-energy diets on whole-body protein turnover in obese subjects. *Am. J. Physiol.* 238(3): E235-E244. 1980b.

Garlick, P.J.; Fern, M.; Preedy, V.R.: The effect of insulin infusion and food intake on muscle protein synthesis in post absorptive rats. *Biochem. J.* 210: 669-676. 1983.

Gilbreath, R.L. y Trout, J.R.: Effects of early postnatal dietary protein restriction and repletion on porcine muscle growth and composition. *J. Nutr.* 103: 1637-1645. 1973.

Giuliano, R. y Millward, D.J.: Growth and homeostasis in the severely zinc deficient rat. *Br. J. Nutr.* 52: 545-560. 1984.

Glasscock, G.F.; Gelber S.E.; Lamson, G.; McGeetekula, R. y Rosenfield, R.G.: Pituitary control of growth in the neonatal rat: Effects of neonatal hypophysectomy on somatic and organ growth, serum insulin-like growth factors IGF-I and -II levels, and expression of IGF binding proteins. *Endocrinology* 127: 1792-1803. 1990.

Glasscock, G.F.; Gin, K.K.L.; Kim, J.D.; Kintz, R.L. y Rosenfield, R.G.: Ontogeny of pituitary regulation of growth in the developing rat: Comparison of effects of hypophysectomy and hormone replacement on somatic and organ growth, serum insulin-like growth factor-I(IGF-I) levels and IGF-binding protein levels in the neonatal and juvenile rat. *Endocrinology* 128 (2):1036-1047. 1991.

Glick, Z.; McNurlan, M.A. y Garlick, P.J.: Protein synthesis rate in liver and muscle of rats following four days of overfeeding *J. Nutr.* 112: 391-397. 1982.

Glore, S.R. y Layman, D.K.: Cellular growth of skeletal muscle in weanling rats during dietary restrictions. *Growth* 47: 403-410. 1983.

Glore, S.R. y Layman, D.K.: Cellular development of skeletal muscle during early periods of nutritional restriction and subsequent rehabilitation. *Pediatr. Res.* 17: 602-605. 1985.

Glore, S.R. y Layman, D.K.: Cellular development of skeletal muscle of rats during recovery from prolonged undernutrition. *J. Nutr.* 117: 1767-1774. 1987.

Goetsch, M.: Comparative protein requirement of the rat and mouse for growth reproduction and lactation using casein diets. *J. Nutr.* 70: 307-312. 1960.

Goldberg, A.L.: Protein synthesis in tonic y phasic skeletal muscles. *Nature* 216: 1219. 1967.

Goldberg, A.L.: Protein turnover in skeletal muscle II. Effects of denervation and cortisone on protein catabolism in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 244: 3223-3229. 1969.

Goldberg, A.L. y Odessey, R.: Oxidation of amino acids by diaphragms from fed and fasted rats. *Am. J. Physiol.* 223: 1384-1391. 1972.

Goldberg, A.L. y Goldspink, D.: Influence of food deprivation and adrenal steroids on DNA synthesis in various mammalian tissues. *Am. J. Physiol.* 228: 310-317. 1975.

Goldberg, A.L. y Chang, T.W.: Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. *Fed. Proc.* 37: 2301-2307. 1978.

Goldberg, A.L.: Influence of insulin and contractile activity on muscle size and protein balance. *Diabetes* 28: 18-24. 1979.

Goldberg, A.L.; Tischler, M.E.; DeMartino, G. y Griffin, G.: Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. *Fed. Proc.* 39: 31-36. 1980.

Golden, M.H.N. y Waterlow, J.C.: Total protein synthesis in elderly people: a comparison of result with N-glycine and leucine. *Clin. Sci. Mol. Med.* 53: 277-288. 1977.

Goldspink, G.: In: *Differentiation and growth of cells in vertebrate tissues*. pp: 69-100. (Goldspink, G. ed.). 1974.

Goldspink, D.F. y Goldberg, A.L.: Influence of pituitary growth hormone on DNA synthesis in rat tissue. *Am. J. Physiol.* 228: 302-309. 1975.

Goldspink, D.F.: The influence of immobilitation and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J. Physiol. (London)* 264: 267-282. 1977.

Goldspink, D.F. y Goldspink, G.: Age-related changes in protein turnover and ribonucleic acid of the diaphragm muscle of normal and hamsters dystrophic. *Biochem. J.* 162: 191-194. 1977.

Goldspink, G.: The growth of muscles. In: *Growth and poultry meat production*. pp. 13-28. (Ed. K.N. Boorman y B.J. Wilson). British Poultry Science Ltd. Edimburgh. 1977.

Goldspink, D.F.: Muscle fiber growth in adult. *Muscle and Nerv.* 3 (3): 271. 1980.

Goldspink, D.F.; Garlick, P.J. y McNurlan, M.A.: Protein turnover measured in vivo and in vitro in muscles undergoing compensatory growth and subsequent denervation atrophy. *Biochem. J.* 210: 89-98. 1983.

Goldspink, D.F. y Kelly, F.J.: Pre and postnatal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow and fast-twitch skeletal muscles of the rat. *Biochem. J.* 217: 507-510. 1984a.

Goldspink, D.F.; Lewis, S.E.M. y Kelly, F.J.: Protein synthesis during the developmental growth of the small and large intestine of the rat. *Biochem. J.* 217: 527-534. 1984b.

Goldstein, H.: Sampling for growth studies. In: *Human Growth. 1 Principles and Prenatal Growth*. (Falkner F. Tanner J.M. eds.). Plenum Press. New York. 1978.

Goll, D.E.; Stroipner, M.H. y Robson, R.M.: Muscle In: *Duke's physiology of domestic animals*. pp. 504-530. (Swenson, M.H. ed.). Cornell University Press. New York. 1977.

Goodband, R.D.; Nelseen, J.L.; Hines, R.H.; Kroph, D.H.; Thaler, R.C.; Schricker, B.R. y Fitzgner, G.E.: The effects of porcine somatotropin (pST) and dietary lysine level on growth performance and carcass characteristics of finishing swine. *J. Anim. Sci.* 60 (suppl. 1): 95 (Abstr.). 1988.

- Goodband, R.D.; Nelseen, J.L.; Hines, R.H.; Kroph, D.H.; Thaler, R.C.; Schricker, B.R.; Fitzgner, G.E. y Lewis, A.J.:** The effects of pST and dietary lysine of growth performance and carcass characteristics of finishing swine. *J. Anim. Sci.* 68 (10): 3261-3276. 1990.
- Goodlad, A.L. y Onyezali, F.N.:** Glucocorticoids and muscle RNA: Effect of prednisolone on the turnover of gastrocnemius ribosomal-RNA in rats. *Biochem. Med.* 25: 34-47. 1981.
- Goodman, M.N. y Ruderman, N.B.:** Starvation in the rat I: Effect of age and obesity on organ weights, RNA, DNA and protein. *Am. J. Physiol.* 239: E269-E276. 1980.
- Gordon, E.E.; Kowalski, K. y Fritts, M.:** Muscle proteins and DNA in rat quadriceps during growth. *Am. J. Physiol.* 210: 1033-1040. 1966.
- Gospodarowicz, D.; Weseman, J.; Moran, J.S. y Lindstrom, J.:** Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblast. *J. Cell. Biol.* 70: 395-405. 1976.
- Goss, R.J.:** *The physiology of growth.* Academic Press N.Y. 1978.
- Goss, R.J.:** Animals model for growth. *Proc. Nutr. Soc.* 39: 213-217. 1980.
- Goss, R.J.:** Physiological adaptations of growth. In: *Comp. Anim. Nutr.* vol 4. pp 1-32. Karger. Basel. 1981.
- Grant, A.L.; Helferich, S.A.; Kramer, R.A.; Merkel, R.A. y Bergen W.G.:** Administration of growth hormone to pigs alters the relative amount of insulin like growth factor-I mRNA in liver and skeletal muscle. *Endocrinology* 130: 331-338. 1991.
- Graystone, J.E.:** Creatinine excretion during growth. In: *Human Growth.* pp: 182-197. (ed. Cheek, D.B. Lea y Febiger). Philadelphia. 1968.
- Graystone, J.E. y Cheek, D.B.:** The effects of reduced calorie intake and increase calorie intake (insulin induced) on the cell growth of muscle, liver and cerebrum and on skeletal collagen in the post-weaning rat. *Pediatr. Res.* 3: 66. 1969.
- Green, R.C.:** Changes in acid ribonuclease and other acid hidrolases during lymphocyte stimulation. *Exp. Cell. Res.* 110: 215-223. 1977.
- Grimble, C.K.:** RNA metabolism in skeletal muscle. *Ph D. Thesis University of London.* 1981.
- Grisolia, S.; Wallace, R. y Mendelson, J.:** Correlation between in vivo metabolic measurements to maximun capacity for urea synthesis. *J. Physiol. Chem. Phys.* 7: 219-223. 1975.
- Hall-Craggs, E.C.B.:** The significance of longitudinal fibre division in skeletal muscle. *J. Neurol. Sci.* 15: 27-33. 1972.
- Halliday, D.; Pacy, P.J. Cheng, K.N.; Dworzak, F.; Gibson, J.N.A. y Rennie, M.J.:** Rate of protein synthesis in skeletal muscle of normal man and patients with muscular dystrophic: a reassessment. *Clin. Sci. London* 74: 237-240. 1988.

- Hamilton, T.S.:** The growth activity and composition of rats fed diets balanced and imbalanced with respect to protein. *J. Nutr.* 17: 565-582. 1939.
- Harbison, S.A., Goll, D.E.; Parrish, Jr.F.C.; Wang, V. y Kline, E.A.:** Muscle growth in 2 genetically different line of swine. *Growth* 40: 253-283. 1976.
- Harper, A.E.:** In: *Basic Mechanism and Clinical Implications*. pp 103-113. (Novin D.; Wiwickew Bray G. y Nuger RH. eds.) Raven Press. New York. 1976.
- Harris, P.M.:** Changes in adipose tissue of the rat due to early undernutrition followed by rehabilitation 1. Body composition and adipose tissue cellularity. *Br. J. Nutr.* 43: 15-26. 1980a.
- Harris, P.M.:** Changes in adipose tissue of the rat due to early undernutrition followed by rehabilitation. 2. Strain differences and adipose tissue cellularity. *Br. J. Nutr.* 43: 27-31. 1980b.
- Harris, R.B.; Kasser, T.R. y Martin, R.J.:** Dynamic of recovery of body composition after overfeeding food restriction or starvation of mature female rats. *J. Nutr.* 116: 2536-2546. 1986.
- Harris, R.B.S.:** Role of set-point theory in regulation of body weight. *FASEB J.* 4:3310-3318. 1990.
- Hart, I.C. y Morant, S.V.:** Roles of prolactin, GH, insulin and thyroxine in steroid induced lactation in goats. *J. Endocrinol.* 84 (3) 343. 1980.
- Hausman, G.J.; Campion, D.R. y Thomas, G.B.;** Semitendinosus muscle development in fetally decapitated pig. *J. Anim. Sci.* 55: 1330. 1982.
- Hausman, G.J.; Hentges, E.J. y Thomas, G.B.;** Differentiation of adipose tissue and muscle in hypophysectomized pig fetuses. *J. Anim. Sci.* 64: 1255. 1987.
- Haverberg, L.N.; Deckelbaum, L.; Bilmazes, L.; Munro, H.N. y Young, V.R.:** Myofibrillar protein turnover and N¹⁵-methylhistidine output response to dietary supply of protein and energy. *Biochem. J.* 152: 503-510. 1975.
- Heard, C.R.C.; Frangi, S.M. y Wriqth, P.M.:** Biochemical characteristics of different form of protein-energy malnutrition: Experimental model using young rats. *Br. J. Nutr.* 37: 1-21. 1977.
- Henshaw, E.C.; Hirsch, C.A. y Morton, B.E.:** Control of protein synthesis in mammalian tissues through changes in ribosomes activity. *J. Biol. Chem.* 246: 436-446. 1971.
- Herington, A.C.; Cornell, H.J. y Kuffer, A.D.:** Recent advances in the biochemistry and physiology of the insulin-like growth factor somatomedin family. *Int. J. Biochem.* 15: 1201-1210. 1983.
- Hersko, A.; Mamont, P.; Shields, R. y Tomkins, G.M.:** Pleiotypic response. *Nature (New Biol.)* 232: 206-211. 1971.

- Heymsfield, S. B.; McManus, M.D.C.; Stevens, B.S.V. y Smith, J.:** Muscle mass: reliable indicator of protein-energy malnutrition severity and outcome. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 1192-1199. 1982.
- Hill, D.J.; Crace, C.J. Nissley, S.P.; Morrell, D.; Holder, A.T. y Milner, R.D.G.:** Fetal rat myoblasts release both rat somatomedin-C (Sm-C), insulin-like growth factor I (IGF-I) and multiplication stimulating activity in vitro: partial characterization and biological activity of myoblast derived SmC/IGF-1. *Endocrinology* 117. 2061-2072. 1985.
- Hill, D.E.; Holt, A.B.; Parra, A. y Cheek, D.B.** The influence of protein-calorie versus calorie restriction on the body composition and cellular growth of muscle and liver in weanling rats. *John Hopkins. Med. J.* 127: 148-163. 1970.
- Ho, K.Y.; Veldhuis, J.D.; Johnson, M.L.; Furlanetto, R.; Evans, W.S.; Alberti, K.G.M.M. y Thorner, M.O.:** Fasting enhances growth hormone secretion and amplifies the complex rhythm of growth hormone secretion in man. *J. Clin. Invest.* 81: 968-975. 1988.
- Hob, J.F.Y. y Hughes, S.:** Myogenic and neurogenic regulation of myosin gene expression on cat jaw-closing muscles regenerating in fast and slow limb muscle beds. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 9: 59. 1988.
- Holmes, J.H.G. y Ashmore, C.R.:** Histochemical study of development of muscle fiber type and size in normal and double muscle cattle *Growth.* 36: 351-372. 1972.
- Howarth, R.E.:** Influence of dietary protein on rat skeletal muscle growth. *J. Nutr.* 102: 37-44. 1972.
- Howarth, R.E. y Baldwin, R.L.:** Synthesis and accumulation of protein and nucleic acid in rat gastrocnemius muscles during normal growth, restricted growth, and recovery from restricted growth. *J. Nutr.* 101: 477-484. 1971.
- Hubbard, R.W.; Smoake, J.A.; Matthew, W.T.; Linduska, J.D. y Bowers, W.D.:** The effect of growth and endurance training on the protein and DNA content of rat soleus, plantaris and gastrocnemius muscles. *Growth.* 38: 171. 1974.
- Isgaard, J.; Nilsson, A.; Vikman, K. y Isaksoon, O.G.P.:** Growth hormone regulates the level of insulin-like growth factor-I mRNA in rat skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 120: 107-112. 1989.
- Isley, W.L.; Underwood, L.E. y Clemmons, D.R.:** Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. *J. Clin. Inves.* 71: 175-182. 1983.
- Issad, T.; Coupé, C.; Pastor-Anglada, M.; Ferré, P. y Girard, J.:** Development of insulin-sensitivity at weaning in the rat. Role of the nutritional transition. *Biochem. J.* 251: 685-690. 1988.
- Ivy, R.E.; Baldwin, C.D.; Wolfrom, G.W. y Mouzin, D.E.:** Effect of various levels of recombinant porcine growth hormone (pGH) injected intramuscularly in barrows. *J. Anim. Sci.* 63 (1): 218 (Abs.). 1986.

- Aberle, E.D. y Doolittle, D.P.:** Skeletal muscle cellularity in mice selected for large body size and in controls. *Growth* 40: 133-145. 1976
- Addis, T.; Poo, L.J. y Lew, W.:** The quantities of protein lost by the various organs and tissues of the body during a fast. *J. Biol. Chem.* 115: 111-116. 1936.
- Adeniyi-Jones, S.K.; Suskind, R.; Polombo, J.; Pena-Cruz, L. y Khaw, K.T.:** Effect of increased energy-intake alone on whole body protein turnover during catch up growth in cystic fibrosis. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. exp. Biol.* 38: 708. 1979.
- Adlar, P.F.; Dobbing, J. y Smart, J.L.:** An alternative animal model for the full term small for dates human body. *Biol. Neonate* 23: 95-108. 1973.
- Agis, A.:** Efectos de la administración exógena de rhGH sobre la ingesta, composición corporal y eficacia de depósito de sustratos en ratón BALB/c, entre el destete y la pubertad. Influencia de su interacción con la edad, la dieta y el sexo. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1994.
- Agricultural Research Council (ARC):** The nutrient requirements of pigs. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough. U.K. 1981.
- Albertsson-Wikland, K.; Eden, S.; Ahren, K. y Isaksson, O.:** Analysis of refractoriness of the effects of GH on amino-acid transport and protein-synthesis in diaphragm of young normal rat. *Endocrinology* 106(1):298-305. 1980.
- Allen, R.E.; Merker, R.A. y Young, R.D.:** Cellular aspects of muscle growth: myogenic cell proliferation. *J. Anim. Sci.* 49: 115. 1979.
- Allen, R.E.; Dodson, M.V. y Luiten, L.S.:** Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation by bovine pituitary fibroblast growth factor. *Exp. Cell Res.* 152: 154. 1984.
- Allen, R.E.; Dodson, M.V.; Boxhorn, L.K.; Davis, S.L. y Hossner, K.L.:** Satellite cell proliferation in response to pituitary hormones. *J. Anim. Sci.* 62: 1596-1601. 1986.
- Allen, R.E.:** Muscle cell culture as a tool in animal growth research. *Fed. Proc.* 46 (2): 290-294. 1987.
- Allison, J.B.; Wannemacher, R.W.Jr.; Banks, W.L. y Wunnimer, W.H.:** The magnitude and significance of the protein reserves in rats fed at various levels of nitrogen. *J. Nutr.* 84: 383-389. 1964.
- American Institute of Nutrition.** Ad Hoc committee on standards for nutritional studies. Report of the committee. *J. Nutr.* 107: 1340-1351. 1977.
- Anson, M.L.:** The estimation of peptin, tripsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-82: 1938.
- A.O.A.C.** Association of official analytical chemists. *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* 15th (ed. Washington D.C.). 1990.

- Klevecz, R.R.:** The clock in animal cells in a limit cycle oscillator. In: *Cell reproduction*. pp: 139-146. (Dirksen E.R.; Prescott, D.M. y Fox. C.F. eds.). Academic. Press. New York. 1978.
- Knapka, J.J.; Smith K.P. y Judge, F.J.:** The effects of various levels of dietary fat and apple supplementation on growth of golden hamsters. *Lab. Anim. Sci.* 24 (2): 318-325. 1974.
- Knapka, J.J.; Smith K.P. y Judge, F.J.:** Effect of crude protein on reproduction and weanling growth in four strains of inbred mice *J. Nutr.* 107: 61-69. 1977.
- Knizetova, H.; Knize, B.; Kopečný, V. y Fulka, J.:** Concentration of nuclei in chicken muscle fiber in relation to intensity of growth. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 12: 321-328. 1972.
- Korsrud, G.O.:** *Nutritive value of solvent extracted crambe and camelina meal*. M.S. Thesis University of Sas Katcheman. Canada. 1966.
- Kostyo, J.L. y Nutting, D.F.:** Growth hormone and protein metabolism. In: *Handbook of physiology endocrinology. The pituitary gland and its neuroendocrine control*. (Washington D.C. ed.) Sec. 7 vol. IV (2). Chapt 29: 187-210. 1974.
- Kowalski, C.J. y Guire, K.E.:** Longitudinal data analysis. *Growth.* 38:131-169. 1974.
- Krebs, H.A.; Bennett, A.H.; Degasquet, P.; Gascoyne, T. y Yoshida, T.:** The effect of diet on the gluconeogenesis capacity of rat kidney-cortex slices. *Biochem. J.* 86: 22-27. 1963.
- Landing, B.H.; Dixon, C.G. y Wells, T.R.:** Studies on isolated human skeletal muscle fibers, including a proposed pattern of nuclear distribution and a concept of nuclear territories. *Human Pathol.* 5: 441-461. 1974.
- Laurent G.J.; Sparrow, M.P.; Bates, P.C. y Millward, D.J.:** Muscle protein turnover in the adult fowl changes in rates of synthesis and breakdown during hypertrophy of the anterior and posterior longissimus dorsi muscles. *Biochem. J.* 176: 107-117. 1978a.
- Laurent G.J.; Sparrow, M.P.; Bates, P.C. y Millward, D.J.:** Turnover of muscle protein in the fowl: rates of protein synthesis in fast and slow skeletal, cardiac and smooth muscle of the adult fowl. *Biochem. J.* 176: 393-405. 1978b.
- Laurent, G.J.; Bates, P.C.; Sparrow, M.P. y Millward, D.J.:** Muscle protein turnover on the adult fowl III. Collagen content and turnover in cardiac and skeletal muscle in the adult fowl and changes during stretch-induced growth. *Biochem. J.* 176: 419-427. 1978c.
- Laurent, G.J. y Millward, D.J.:** Protein turnover during skeletal muscle hypertrophy. *Fed. Proc.* 39: 42-47. 1980.
- Layman, D.K.; Rica, G.A.; Richardson, A.:** The effect of age on protein synthesis and ribosome aggregation to messenger RNA in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 173: 246-254. 1976.

- Layman, D.K.; Hegarty, P.V.J. y Swan, P.B.: Comparison of morphological and biochemical parameters of growth in rat skeletal muscles. *J. Anat.* 130: 159-171. 1980.
- Layman, D.K.; Swan, P.B. y Hegarty, P.V.J.: The effect of caute restriction on muscle fibre number in weanling rats. *Br. J. Nutr.* 43: 475-481. 1981.
- Leblond, C.P.: In: *Regulation of organ and tissue growth*. pp 13-39. (Goss, R.J. ed.) Academic. Press. New York and London. 1972.
- Lee, M.O. y Schaffer, N.K.: Anterior pituitary growth hormone and the composition of growth. *J. Nutr.* 7: 337. 1934.
- Lemons, J.A.; Adcock, E.W.; Jones, M.D.; Naughton, M.A.; Meschia, G. y Battaglia, F.C.: Umbilical uptake of amino acids in unstress fetal lamb. *J. Clin. Invest.* 58: 1428-1434. 1976.
- Lewis, S.E.M.; Kelly, F.J. y Goldspink, D.F.: Pre and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow and fast-twitch skeletal muscles of the rat. *Biochem. J.* 217: 517-526. 1984.
- Li, J.B.: Protein synthesis and degradation in skeletal muscle of normal and dystrophic hamsters. *Am. J. Physiol.* 239: E401-E406. 1980.
- Li, J.B. y Goldberg A.L.: Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 231 (2): 441-448. 1976.
- Libby, P. y Goldberg, A.L.: Leupeptin: a protease inhibitor decreases protein degradation in normal or diseased muscles. *Science* 199: 534-536. 1978.
- Lindahl, A.; Isgaard, J.; Carlsson, L. y Isaksson, O.G.P.: Different effects of growth hormone and insulin like growth factor-I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages. *Endocrinology* 121: 1061-1069. 1987.
- Lobley G.E. y Lovie, J.M.: Synthesis of myosin, actin and the major protein fractions in rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.* 182: 867-874. 1979.
- Lobley, G.E.; Milne, V.; Lovie, J.M.; Reeds, P.J. y Pennie, K.: Whole body and tissue protein synthesis in cattle. *Br. J. Nutr.* 43: 491-502. 1980.
- Lodge, G.A., Sarkev, N.K. y Kramer, J.K.E.: Fat deposition and fatty and composition in the neonatal pig. *J. Anim. Sci.* 47: 487-504. 1978.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randeel, R.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275. 1951.
- Louveau, I. y Etherton, T.D.: Characterization of somatotropin binding sites in pig skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 70: 1801-1805. 1992.
- Lowell, B.B.; Ruderman, N.B. y Goodman, M.N.: Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. *Biochem. J.* 234: 237-240. 1986.

- Lunn, P.G. y Austin, S.:** Differences in nitrogen metabolism between protein-deficient and energy-deficient rats with similarly restricted growth rates. *Ann. Nutr. Metab.* 27: 242-251. 1983.
- MacLennan, P.A.; Brown, R.A. y Rennie, M.J.:** A positive relationships between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS. Letters* 215 187. 191.1987.
- MacRae, J.C.; Bruce, C.A.; DeB. Hovell, F.D.; Hart, I.C.; Inkster, J.; Walter, A. y Atkinson, T.:** Influence of protein nutrition on the response of growing lambs to exogenous bovine growth hormone. *J. Endocrinol.* 130: 53-61. 1991.
- Machlin, L.J.:** Effects of porcine growth hormone on growth and carcass composition of the pig. *J. Anim. Sci.* 35: 794. 1972.
- Magnusson, K.; Wahren, J. y Ekman, L.:** Protein synthesis in skeletal muscle during starvation and refeeding: Comparison of data from intact muscle biopsy material. *Metabolism.* 39 (11): 1113-1117. 1990.
- Magri, K.A.; Gopinath, R. y Etherton, T.D.:** Inhibition of lipogenic enzyme activities by porcine growth hormone (pGH). *J. Anim. Sci.* 65 (suppl. 1): 258 (abstr.). 1987.
- Marliss, E.B.; Aoki, T.T.; Pozefsky, T.; Most, A.S. y Cahill, G.F.:** Muscle and splanchnic glutamine and glutamate metabolism in postabsortive and starved men. *J. Clin. Invest.* 50: 814-817. 1971.
- Martin, T.E. y Young F.G.:** An in vitro action of human growth hormone in the presence of actinomycin D. *Nature* 208: 684-685. 1965.
- Mascarello, F.; Stecchini, M.L.; Rowlerson, A. y Balloccchie, E.:** Tertiary myotubes in postnatal growing pig muscle detected by their myosin isoform composition. *J. Anim. Sci.* 70: 1806-1823. 1992.
- Mathews, L.S.; Norstedt, G. y Palmiterr, D.:** Regulation of Insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 9434-9347. 1986.
- Mauro, A.:** Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 493-494. 1961.
- Mayanskaya, N.N.; Schcherbakov, V.I. y Pain, L.E.** Changes in the lysosome apparatus in regenerating liver following partial hepatectomy. *Tsitologiya*, 19: 1189-1193. 1977.
- McCance, R.A. y Widdowson, E.M.:** Fat. *Pediatric Res.* 11: 1081-1086. 1977.
- McCance, R.A. y Widdowson, E.M.:** Glimpses of comparative growth and development. In: *Human Growth.* vol. I (Falkner F. y Tanner eds.). Plenum Press. New. York. 1978.
- McCusker, R.H. y Champion, D.R.:** Effect of growth hormone-secreting tumours on skeletal muscle cellularity in the rat. *J. Endocrinol.* 111: 279-285. 1986.

- McDonald M.R.:** In: *Methods in enzymology*. pp. 437-447. (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. eds.) vol II Acad. Press. New York. 1955.
- McLeod, K.I.; Goldrick, R.B. y White, H.M.:** Effect of maternal malnutrition on the progeny in the rat. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 50: 435-446. 1972.
- McNurlan, M.A. y Garlick, P.J.:** Contribution of rat liver and gastrointestinal tract to whole-body protein synthesis in the rat. *Biochem. J.* 186: 381-383. 1980.
- Meier, P.R.; Peterson, R.G.; Bouds, D.R.; Meschia, G. y Battaglia, F.C.:** Rates of protein synthesis and turnover in fetal life. *Am. J. Physiol.* 240: E320-E324. 1981.
- Mendes, G.B. y Waterlow, J.A.:** The effect of low-protein diet, and of refeeding on the composition of liver and muscle in the weanling rat. *Br. J. Nutr.* 12: 74-88. 1953.
- Merimée, T.J.; Zapf, J. y Froesch, E.R.:** Insulin-like growth factors in the fed and fasted states. *J. Clin. Endocrinol.* 55 (5): 999-1002. 1982.
- Merrill, G.F.; Florini, J.R. y Dulak, N.C.:** Effects of multiplication stimulating activity (MSA) on AIB transport into myoblast and myotube cultures. *J. Cell Physiol.* 93: 173-182. 1971.
- Messier, B. y Leblond, C.P.:** Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H₃ into male rats and mice. *Am. J. Anat.* 106: 247-285. 1960.
- Miller, S.A.:** In: *Mammalian protein metabolism*. vol. 3. pp. 183-227. (Munro, H. N. ed.). Academic Press. New York. 1969.
- Millward, D.J.; Garlick, P.J.; James, W.P.T.; Nnanyelugo, D.O. y Ryatt, J.S.:** Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle. *Nature* 241: 204-205. 1973.
- Millward, D.L.; Nnanyelugo, D.O.; James, W.P.T.; Garlick, P.J.:** Protein metabolism in skeletal muscle: The effect of feeding and fasting on muscle RNA, free amino acids and plasma insulin concentrations. *Br. J. Nutr.* 32: 127. 1974.
- Millward, D.J.; Garlick, P.J.; Stewart, R.J.C.; Nnanyelugo, D.O. y Waterlow, J.C.:** Skeletal muscle growth and protein turnover. *Biochem. J.* 150: 235-243. 1975.
- Millward, D.J.; Nnanyelugo, D.O.; Bates, P.O. y Heard, R.C.:** Muscle and liver protein metabolism in rats treated with glucocorticoids. *Proc. Nutr. Soc.* 35. 47A. 1976a.
- Millward, D.J.; Garlick, P.J.; Nnanyelugo, D.O. y Waterlow, J.C.:** The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochem. J.* 156: 185-188. 1976b.
- Millward, D.J. y Waterlow, J.C.:** Effect of nutrition on protein turnover in skeletal muscle. *Fed. Proc.* 37: 2283. 1978.
- Millward, D.J.; Bates, P.C.; Laurent, G.I. y Lo, C.C.:** In: *Protein turnover and lysosomal function* (Segal H.L. y Dayle, D. eds.). Academic Press. New York. London. 1978.

Millward, D.J.: Protein turnover in cardiac and skeletal muscle during normal growth and hypertrophy. In: *Degradative process in heart and skeletal muscle*. pp. 161-190. (Ed. Wildenthal, K.). Elsevier North Holland. Amsterdam. 1980a.

Millward, D.J.: Protein degradation in muscle and liver. In: *Comprehensive biochemistry*. Vol 19 (2): 153-232. (eds. Florkin, M.; Neuberger, A. y Van Deenan, L.L.M.). Elsevier North Holland. Amsterdam. 1980b.

Millward, D.J.; Bates, P.C. y Rosochacki, S.R.: The extent and nature of protein degradation in the tissues during development. *Reprod. Nutr. Develop.* 21 (2): 265-277. 1981a.

Millward, D.J.; Bates, P.C.; Brown, J.C.; Cox, M.; Waterlow, J.C. y Stephen, S.M.L.: In: *Nitrogen metabolism in man*. (J.C. Waterlow y J.M.L. Stephen) Applied Science Publ. London. 1981b.

Millward, D.J.; Odedra, B.; Bates, P.C.: The role of insulin, corticosterone and other factors in the acute recovery of muscle protein synthesis on refeeding of food deprived rats. *Biochem. J.* 216: 383-387. 1983a.

Millward, D.J.; Bates, P.C.; DeBenoist, B.; Brown, J.G.; Cox, M.; Halliday, D.; Odedra, B. y Rennie, M.J.: Protein turnover: The nature of the phenomenon and its physiological regulation. *IVth Int. Symp. Protein metabolism and nutrition*. Clermont-Ferrand (France). (Ed. Inra Publ.). 1983b.

Millward, D.J.; Bates, P.C.; Brown, J.G.; Cox, M.C.; Giuliano, R.; Jepson, M. y Pell, J.: In: *Intracellular Protein Catabolism*. pp.: 531-542 (E.E. Knaivallah, J.S. Boud y J.W.C. Bird. eds.). Alanliss. New York. 1984.

Millward, D.J.: In: *Substrate and Energy Metabolism in Man*. pp.: 135-144. (D. Halliday y J. S. Garrow eds.) Libbey. London and Parfs. 1985.

Mirsky, A.E. y Ris, H. Variable and constant components of chromosomas. *Nature*. 163: 666-667. 1949.

Montgomery, R.D.: Growth of human striated muscle. *Nature*, 195: 194. 1962.

Montgomery, R.D.; Dickerson, J.M.T. y McCance, R.A.: Severe undernutrition in growing and adult animals. *Brit. J. Nutr.* 18: 587-593. 1964.

Moon, W.Y. y Kirksey, A.: Cellular growth during prenatal and early postnatal periods in progeny of pyridoxine-deficient rats. *J. Nutr.* 102: 123-133. 1973.

Morgan, P.N.; Keen, C.L.; Calvert, C.Ch. y Lönnerdal, B.: Effect of varying dietary zinc intake of weanling mouse pup during recovery from early undernutrition on growth, body composition and composition of gain. *J. Nutr.* 118: 690-698. 1988a.

Morgan, P.N.; Keen, C.L. y Lönnerdal, B.: Effects of varying dietary zinc intake of weanling mouse pups during recovery from early undernutrition on tissue mineral concentrations, relative organ weight, hematological variables and muscle composition. *J. Nutr.* 118: 699-711. 1988b.

- Mortimore, G.E. y Mondon, L.E.:** Inhibition by insulin of valine turnover in liver. *J. Biol. Chem.* 245: 2375-2383. 1970.
- Mortimore, G.E. y Pösö, A.E.:** Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *An. Rev. Nutr.* 7: 539-564. 1987.
- Morton, D.J. y Rowe, R.W.D.:** Ultrastructural modification of mitochondria of rat soleus muscle surgically induced to hypertrophy. *Protoplasma* 81: 335-348. 1974.
- Moseley, W.M.; Krabill, L.F. y Olsen R.F.:** Effects of bovine growth hormone administered in various patterns on nitrogen metabolism in the Holstein steer. *J. Anim. Sci.* 55: 1062. 1982.
- Mosier, H.D. y Jansons, R.A.:** GH during catch-up growth and failure of catch-up growth in rats. *Endocrinology* 98: 251-253. 1976.
- Mosier, H.D.:** The control of catch-up growth. *Acta Endocrinologica.* 113 (S279): 1-7. 1986.
- Mosier, H.D.; Jansons, R.A.; Swingle, K.F. y Dearden L.C.:** Dissociation of catch-up growth control and neuronal control of GH secretion in the stunted head-irradiated rat. *Pediatr. Res.* 20 (3): 262-264. 1986.
- Moss, F.P.:** The relationship between the dimensions of the fibers and the number of nuclei during restricted growth, growth and compensation growth. *Am. J. Anat.* 122: 555-564. 1968.
- Moss, F.P. y Leblond, C.P.** Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat. Rec.* 170: 421. 1971.
- Motil, K.J.; Matthews, D.E.; Bier, D.M.; Burke, J.F.; Young, V.R.:** Whole-body leucine and lysine metabolic response to dietary protein intake in young men. *Metabolism* 30: 783. 1981.
- Munro, H.N.:** The origin and growth of our present concepts of protein metabolism. In: *Mammalian protein metabolism. Vol. I*, Munro, M.N. (ed), Academic Press. New York and London. 1964.
- Munro, H.N.:** In (R.I.C. Wesdorp, P.B. Soeters Eds.) *Clinical Nutrition 81* Churchill-Livingsstone, Edimburgh: 181-189. 1982.
- Muñoz-Martínez, E.; Marcos, A. Unzaga, M.T.:** Effect of protein deficiency on the lysosomal enzyme activities of the spleen and thymus of weanling rats. *J. Nutr.* 111: 2133-2141. 1981.
- Muñoz-Martínez, E.; Marcos, A.; Unzaga, M.T. y Varela, G.:** Cambios en enzimas lisosómicos hidrolíticos del hígado asociados a malnutrición protéica y calórico-protéica. *Rev. Esp. Fisiol.* 38: 327-334. 1982.

- Muñoz-Martínez, E.; Marcos, A. Unzaga, M.T. y Varela, G.:** Effect of experimental protein malnutrition on the hepatic response to stress; participation of hydrolytic enzymes. In: *IVth Int. Symp. Protein metabolism and nutrition*. Clermont-Ferrand (France). Ed. Inra Publ. 1983.
- Muñoz-Martínez, E.; Unzaga, M.T. y Jiménez Gancedo, B.:** Crecimiento celular del músculo esquelético como índice de los requerimientos de la proteína en la rata adulta. *Rev. Esp. Fisiol.* 48 2: 137-144. 1989.
- Muñoz-Martínez, E.; Unzaga M.T.; Agis, A.; López-Oliva, M.E.:** Muscle cell growth in protein deficient rats following administration of sheep red blood cells. *Rev. Esp. Fisiol.* 48 (2): 121-126. 1992.
- Muramatsu, T.; Oayagi, Y. Okumura, J y Tasaki, I.:** Contribution of whole-body protein synthesis to basal metabolism in layer and broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 57: 269-277. 1987a.
- Muramatsu, T.; Tasaku, O.; Furuse, M.; Tasaki, I. y Okumura, J.I.:** Influence of the gut microflora on protein-synthesis in tissues and in the role whole-body of chicks. *Biochem. J.* 246 (2): 475-479. 1987b.
- Murphy, L.J.; Bell, G.I.; Duckworth, M.L. y Friesen, H.G.:** Identification, characterization and regulation of the complementary deoxyribonucleic acid which encodes insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 121: 684-691. 1987.
- Muruyama, K.; Sunde, M.L. y Swiek, R.W.:** Growth and muscle protein turnover in the chick. *Biochem. J.* 176: 573-582. 1978.
- Nicholas, G.A.; Lobley, G.E. y Harris, C.I.:** Use of the constant infusion technique for measuring rates of protein synthesis in the Zealand white rabbit. *Br. J. Nutr.* 38: 1-7. 1977.
- Nilsson, A.; Isgaard, J.; Lindahl, A.; Dahlström, A.; Skottner, A. y Isaksson, O.G.P.:** Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science* 233: 571-574. 1986.
- Nixon, B.T. y Green, H.:** Growth hormone promotes the differentiation of myoblasts and preadipocytes generated by azacytidine treatment of 10T1/2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 3429-3432. 1984.
- Nnanyelugo, D.O.:** Changes in RNA content during chronic protein deprivation in the hind limbs of rats. *Nutr. Rep. Int.* 14: 209. 1976.
- Norušis, M.J.:** *SPSS/PC+ Statistics Guide*. SPSS Inc. Chicago, IL. 1986.
- Odedra, B. y Millward, D.J.:** Effect of corticosterone treatment on muscle protein turnover in adrenalectomized rat maintained on insulin *Biochem. J.* 204: 663-672. 1982.
- Odedra, B.; Dalal, S.S. y Millward, D.J.:** Muscle protein synthesis of the streptozotocin diabetic rat. A possible role for corticosterone in the insensitivity to insulin infusion in vivo. *Biochem. J.* 202: 363-368. 1982.

- Odedra, B.; Bates, P.C. y Millward, D.J.:** Time course as the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver. *Biochem. J.* 214: 616-700. 1983.
- Ogata, E.S.; Foung, S.K. y Holliday, M.A.:** The effects of starvation and refeeding on muscle protein synthesis and catabolism in the young rat. *J. Nutr.* 108: 759-765. 1978.
- Omstedt, P.T. y Von der Decken, A.:** The influence of the nutritive value of proteins on the level of protein synthesis in vitro in rat skeletal muscle. *Br. J. Nutr.* 27: 467-474. 1972.
- Ong, J.; Yamashita, S. y Melmed, S.:** Insulin-like growth factor I induces c-fos messenger ribonucleic acid in L6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology.* 120: 355-357. 1987.
- Pain, V.M. y Garlick, P.J.:** Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat in vivo. *J. Biol. Chem.* 249: 4510-4514. 1974.
- Palmer, R.M.; Bain, P.A.; Reeds, P.S.:** The effect of insulin and intermittent mechanical stretching on rates of protein synthesis and degradation in isolated rabbit muscle. *Biochem. J.* 230: 117-123. 1985.
- Palmer, R.M.:** The role of prostaglandins in the hormonal control of protein turnover. *Ph. D. Thesis University of Aberdeen.* 1987.
- Patureau-Mirand, P.; Bernard, O.; Prugnand, J. y Arnal, M.:** *Journées métabolismes de l'Association Française de Nutrition,* Clermont Ferrand. 1982.
- Payne, P.N. y Waterlow, J.C.:** Relative energy requirements for maintenance, growth and physical activity. *Lancet:* 210-211. 1971.
- Pell, J.M. y Bates, P.C.:** Collagen and non collagen protein turnover in skeletal muscle of growth hormone treated lambs. *J. Endocrinol.* 115: R1-R4. 1987.
- Pell, J.M.; Johnsson, J.D.; Pullar, R.A.; Morrell, D.J.; Hart, I.C.; Holder, A.T. y Anson, R.:** Potentiation of GH activity in sheep using monoclonal antibodies. *J. Endocrinol.* 120 (2): R15-R18. 1989.
- Peters, J.P.:** Consequences of accelerated gain and growth hormone administration for lipid metabolism in growing beef steers. *J. Nutr.* 116: 2490-2503. 1986.
- Peterson, G.L.:** Review of the folin-phenol protein quantitation method Lowry, Rosebrough, Ferr and Randall. *Anal. Biochem.* 100: 210-220. 1979.
- Pimstone, B.L.; Barbezat, G.; Hansen J.D.L. y Murray, P.:** Studies on growth hormone secretion in protein-calorie malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 21: 482-487. 1968.
- Pinney, D.F.; Pearson-White, S.H.; Konieczny, S.F.; Latham, K.E. y Emerson, C.R.Jr.:** Myogenic lineage determination and differentiation: evidence for a regulatory gene pathway. *Cell.* 53: 781-793. 1988.
- Pitts, G.C. y Bull, L.S.:** Exercise, dietary obesity and growth in the rat. *Am. J. Physiol.* 232: R38- R44. 1977.

Pitts, G.C.: Body composition in the rat: interactions of exercise, age, sex and diet. *Am. J. Physiol.* 246: R495-R501. 1984.

Pitts, G.C.: Cellular aspects of growth and catch-up growth in the rat. A reevaluation. *Growth.* 50: 419-436. 1986.

Pocknee, R.C. y Heaton, F.W.: Changes in organ growth with feeding pattern: the influence of feeding frequency on circadian rhythm of protein synthesis in the rat. *J. Nutr.* 108: 1266-1273. 1978.

Preedy, V.R.; McNurlan, M.A. y Garlick, P.J.: Protein synthesis in skin and bone of the young rats. *Br. J. Nutr.* 49: 517-523. 1983.

Preedy, V.R. y Garlick, P.J.: The response of muscle protein-synthesis to nutrient intake in postabsorptive rats. The role of insulin and amino acids. *Bios. Rep.* 2: 177-183. 1986.

Prescott, D.M.: Relation between cell growth and cell division II. The effect of cell size on cell growth rate and generation time in *Amoeba proteus*. *Exper. Cell. Res.* 11: 86-94. 1956.

Prescott, D. M.: Control of the initiation of DNA synthesis in mammalian cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci. Cell Proliferation, Cancer therapy.* (Ed. Baserga, R.) 397: 101-109. 1982.

Prewitt, T.E.A.; D'Ercole, A.J.; Switzer, B.R. y Van Wyk, J.J.: Relationships of serum immunoreactive somatomedin-C to dietary protein and energy in growing rats. *J. Nutr.* 112: 244-150. 1982.

Pryor-Jones, R.A. y Jenkins J.S.: Effects of excessive secretion of growth hormone on tissues of the rat, with particular reference to the heart and skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 85: 75-82. 1980.

Rahman, V.E.; Cerney, E.A. y Peraino, C.: Studies on liver ribonuclease in fed and partially hepatectomized rats. *Biochim. Biophys. Acta* 50: 31. 1969.

Rannels, D.E.; McKee, E.E. y Morgan, H.E.: Regulation of protein synthesis and degradation in heart and skeletal muscle. Review. *Biochem. Actions Horm.* 4: 135-195. 1977.

Rannels, S.R.; Pegg, A.E.; Rannels, D.E. y Jefferson L.S.: Effects of starvation on initiation of protein synthesis in skeletal muscle and heart. *Am. J. Physiol.* 235 (2): E130-E133. 1978a.

Rannels, S.R.; Rannels, D.E.; Pegg, A.E. y Jefferson, L.S.: Glucocorticoid effects on peptide-chain initiation in skeletal muscle and heart. *Am. J. Physiol.* 235 E134-E139. 1978b.

Ratray, P.V.; Robinson, D.W.; Garrett, W.N. y Ashmore, C.R.: Cellular changes in tissues of lambs during fetal growth. *J. Anim. Sci.* 40: 783-788. 1975.

Rayne, J. y Crawford, G.N.C.: Increases in fiber numbers of the rat polyploid muscles during postnatal growth. *J. Anat.* 119: 347-357. 1976.

- Reeds, P.J.; Jackson, A.; Picou, D. y Poulter, N.: Muscle mass and composition in malnourished infants and children and changes seen after recovery. *Pediatric Res.* 12: 603-618. 1978.
- Reeds, P.J.; Cadenhead, J.A.; Fuller, M.F.; Lobley, G.E. y McDonald, J.D.: Protein turnover in growing pigs. The effects of age and food intake. *Br. J. Nutr.* 43: 445. 1980.
- Reeds, P.J. y Harris, C.I.: Protein synthesis in animals. In: *Nitrogen Metabolism in man.* pp: 391-407. (eds. J.C. Waterlow y J.M.L. Stephen). Applied Science. London. 1981.
- Reeds, P.J.; Fuller, M.F.; Cadenhead, J.A.; Lobley, G.E. y McDonald, J.D.: Effects of changes in the intakes of protein and non-protein energy on whole-protein turnover in growing. *Br. J. Nutr.* 45: 539-546. 1981.
- Reeds, P.J.; Haggarty, P.; Wahle, K.V.S. y Fletcher, J.M.: Tissue and whole-body protein synthesis in mature Zucker rats and their relationship to protein depletion. *Biochem. J.* 204: 393-398. 1982.
- Reeds, P.J. y Fuller, M.F.: Nutrient intake and protein turnover. *Proc. Nutr. Soc.* 42: 463-471. 1983.
- Reeds P.J.; Fuller, M.L. y Nicholson B.A.: Metabolic basis of energy expenditure with particular reference to protein. In: *Sustrate and energy metabolism in man.* pp. 46-67 (J.S. Garrow y D. Halliday eds.) John Libbey and Son. London. 1985.
- Reeds, P.J. y Palmer, R.M.: The role of prostaglandin in the control of muscle protein turnover. In: *Control and manipulation of animal growth.* pp. 161-185. (P.J. Butterworths ed.) London. 1986.
- Reeds, P.J. y Fiorotto, M.L.: Growth in perspective. *Proc. Nutr. Soc.* 49: 411-420. 1990.
- Rennie, M.J.; Edwards, R.H.T.; Halliday, D.; Matthews, D. E.; Wolman, S.L. y Millward, D.J.: Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man. The effect of feeding and fasting. *Clin. Sci.* 63: 519-523. 1982.
- Reznik, M.: Etude autoradiographique du muscle strié en régénération in vivo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 19: 283-240. 1969.
- Richardson, A.; Birchenal-Spark, M.C.; Staecker, J.L. Hardwick, J.P y Liuds, H.: The transcription of various types of RNA by hepatocytes isolated from rats of various ages. *J. Gerontol.* 37 (6): 666-672. 1983.
- Riebow, J.H. y Young, R.B.: Effect of leupeptin on protein turnover in normal and dystrophic chicken skeletal muscle cells in culture. *Biochem. Med.* 23: 316-323. 1980.
- Robinson, D.W. y Bradford, G.E.: Cellular response to selection for rapid growth in mice. *Growth.* 33: 221-229. 1969.
- Robinson, D.W. y Lambourne, J.L.: The influence of growth rate and retardation on the nuclei acid and nitrogen concentration in skeletal muscles and whole body composition of the mouse. *Growth* 34: 235-255. 1970.

- Rompala, A.; Jones, S.D.M.; Buchaman, J.G. Wilton, J.W. y Burton, J.H.:** Growth and carcass characteristics of late fattening steers on different feeding systems. *Can. J. Anim.* 64 (2): 313-322. 1984.
- Rosso, P.; Nelson, M. y Winick, M.:** Changes in cellular RNA content and alkaline ribonuclease activity in rat liver during development. *Growth* 37: 341. 1973.
- Rowe, R.W.P. y Goldspink, G.:** Muscle fiber growth in five different muscles in both sexes of mice. *J. Anat.* 104: 519-530. 1969.
- Rozovski, S.J. y Winick, M.:** Nutrition and cellular growth. In: *Human nutrition vol. I.* (Alfin-Slater, R.B. y Kritchevsky, D. eds) pp: 61-102. Plenum Press, New York and London. 1979.
- Ruderman, N.B.:** Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. *Ann. Rev. Red.* 26: 245-258. 1975.
- Rudklidge, G.J.:** Differences in body composition growth and food intakes between mice that have been selected for a small and large body size. *Br. J. Nutr.* 46: 441-447. 1981.
- Saleenn, M. y Nicholls, D.M.:** Protein synthesis in muscles from normal and dystrophic hamsters. *Biochem. J.* 180: 51-58. 1979.
- Salmon, R.K.; Davis, C.B.; Weingart, R. y Roy, T.B.:** Growth efficiency in mice for increased body weight. *Can. J. Anim. Sci.* 70: 371-382. 1990.
- Salomon, F.R.; Cuneo, R.; Hesp; R. y Sönksen, P.H.:** The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *N. Engl. J. Med.* 321: 1797-1803. 1989.
- Salomon, F.R.; Cuneo, R. y Sönksen, P.H.:** Growth hormone and protein metabolism. *Horm. Res.* 36 (suppl. 1): 41-43. 1991.
- Sandles, L.D. y Peel, C.J.:** Growth and carcass composition of pre-puberal dairy heifers treated with bovine growth hormone. *Anim. Prod.* 44: 21. 1987.
- Sands, J.; Dobbing, J. y Gratrix, C.A.:** Cell number and cell size: organ growth and development and the control of catch-up growth in rats. *Lancet* 8 (2): 503-505. 1979.
- Schmidt, G. y Tannhauser, S.J.:** A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phospho-protein in animal tissue. *J. Biol. Chem.* 161:83-89. 1945.
- Schwartz, W.N. y Bird, J.W.C.:** Degradation of myofibrillar proteins by cathepsin B and D. *Biochem. J.* 167: 811-820. 1977.
- Searle, T.W.; Murray, J.D. y Baker, P.J.:** Effect of increased production of growth hormone on body composition in mice: transgenic versus control. *J. Endocrinol.* 132: 285-291. 1992.

Seglen, P.O.; Grimble, D.M. y Solheim, A.E.: Inhibition of the lysosomal pathway of protein-degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin. *Eur. J. Biochem.* 95: 215-225. 1979.

Sève, B.; Peignier, Y. y Lebreton, Y.: Protein-synthesis in the weanling piglet. *Diabète et Métabolism.* 12 (2): 118. 1986a.

Sève, B.; Reeds, P.J.; Fuller, M.F.; Candenhed, A. y Hay, S.M.: Protein synthesis and retention in some tissues of the young pig as influenced by dietary protein intake after early weaning. Possible connection to the energy metabolism. *Reprod. Nutr. Develop.* 26 (3): 849-861. 1986b.

Sève, B.; Ballèvre, O.; Ganier, P.; Noblet, J.; Prugnaud, J. y Obled, Ch.: Recombinant porcine somatotropin and dietary protein enhance protein synthesis in growing pigs. *J. Nutr.* 123: 529-540. 1993.

Shall, S.: Control of cell reproduction. *Br. Med. Bull.* 37: 209-214. 1981.

Siebrits, F.K. y Barnes, P.M.: The change in the rate of muscle protein metabolism of rats from weanling to 90 days of age. *Comp. Biochem. Physiol.* 92 (4): 485-488. 1989.

Sillence, M.N. y Etherton, T.D.: Determination of the temporal relationships between porcine growth hormone, serum insulin like growth factor-I and cortisol concentrations in pigs. *J. Anim. Sci.* 4: 1019. 1987.

Sillence, M.N. y Etherton, T.D.: Cortisone arrests growth but enhances the inductive effect of porcine growth hormone on plasma IGF-I concentration in female rats. *J. Anim. Sci.* 69: 2815-2821. 1991.

Sinha, Y.N.; Wilkins, J.N.; Selby, F y Vaderlaan, W.P.: Pituitary and serum growth hormone during undernutrition and catch-up growth in young rats. *Endocrinology* 92: 1768-1771. 1973.

Sinnet-Smith, P.A.; Dumelow, N.W. y Buttery, P.J.: The effects of trembolone acetate and zeranol on protein metabolism in male castrate and female lambs. *Br. J. Nutr.* 50: 225-234. 1983.

Smallridge, R.C.; Glass, A.R.; Wartofsky, L.; Latham, K.R. y Burman, K.D.: Investigation into the etiology of elevated serum T₃ levels in protein-malnourished rats. *Metabolism.* 31: 538-542. 1982.

Smith, C.K.; Durschlag, R.P. y Layman, D.K.: Response of skeletal muscle protein synthesis and breakdown to levels of dietary protein and fat during growth in weanling rats. *J. Nutr.* 112: 255-262. 1982.

Smith, D.M. y Sugden, P.H.: Effects of insulin and lack of effect on workload and hypoxia on protein degradation in the perfused working rat heart. *Biochem. J.* 210: 55-61. 1983.

Smith, V.G.; Kasson, C.W.; Ash, K.A. y Chung, J.B.: The relationships between CP concentration and recombinant porcine somatotropin (rpGH) on growth and carcass quality of pigs. *J. Anim. Sci.*: 67 (supply 1): 193. (Abst). 1989.

- Smith, V.G. y Kasson C.W.:** The interrelationship between crude protein and exogenous porcine somatotropin on growth, feed and carcass measurements of pigs. *J. Anim. Sci.* 69: 571-577. 1991.
- Snow, M.H.L. y Bennett, D.:** Gastrulation in the mouse. The establishment of cell population in the epiblast of t^{w18}/t^{w18} embryos. *J. Embriol. Exp. Morph.*, 47: 39-52. 1978.
- Sola, O.M.; Christensen, D.L. y Martin, A.W.:** Hypertrophy and hyperplasia of adult chicken anterior longissimus dorsi muscles following stretch with and without denervation. *Exp. Neurol.* 41: 76-100. 1973.
- Solomon, M.B.; Campbell, R.G.; Caperna, T.J. y Steele, N.C.:** Effect of animal sex and exogenous growth hormone administration (pGH) on longissimus muscle fiber characteristics of swine. *Fed. Proc.* A1258. 1987. (Abstr.)
- Solomon, M.B.; Campbell R.G. y Steele, N.C.:** Effects of sex and exogenous porcine somatotropin on longissimus muscle fiber characteristics of growing pig. *J. Anim. Sci.* 68: 1176. 1990.
- Soltesz, G.; Joyce, J. y Young, M.:** Protein synthesis rate in newborn lamb. *Biol. Neonate.* 23: 139-148. 1973
- Spanier, A.M.; Bird, J.W.C. y Triener, R.E.:** Degradation of myofibrillar proteins by lysosome rich fractions from vitamin E deficient guinea pig muscle. *Fed. Proc.* 36: 555 A. 1977.
- Speck, P.A.; Wynn, P.C.; O'Grady, J. y Hinch, G.N.:** Enhanced growth in oGH transgenic mice is not due to increased efficiency of feed utilization. *Proc. Nutr. Soc. Austr.* 13: 96. 1988.
- Srivastava, V.O.:** Polyribosome concentration of mouse skeletal muscle as a function of age. *Arh. Biochem. Biophys.* 130: 129-139. 1969.
- Statistical Analysis System. GLM procedure. User's Guide.** Version 6, 4th Ed. SAS Institute Inc. Cary, N.C. 1990.
- Staun, H.:** The nutritional and genetic influence on number and size of muscle fibers and their response to carcass quality in pigs. *World Rev. Anim. Prod.* 8: 3-13. 1972.
- Stephens, D.N.:** Growth and the development of dietary obesity in adulthood of rats which have been undernourished during development. *Br. J. Nutr.* 44: 215-227. 1980.
- Stickland, N.C. y Goldspink, G.:** Possible indicator muscle for fiber content and growth characteristic of porcine muscle. *Anim. Prod.* 16: 135-146. 1973.
- Stickland, N.C.; Widdowson, E.M. y Goldspink, G.:** Effects of severe energy and protein deficiencies on the fibers and nuclei in skeletal muscle of pigs. *Br. J. Nutr.* 34: 421-438. 1975.
- Stocdale, F.E. y Holtzer, H.:** DNA synthesis and myogenesis. *Exp. Cell Res.* 24: 508-520. 1961.

Tischler, M.E. y Goldberg, A.L.: Leucine degradation and release of glutamine and alanine by adipose tissue. *Biol. Chem.* 255: 8074-8081. 1980.

Tollefsen, S.E.; Lajara, R.; McCusker, R.H.; Clemmons, D.R. y Rotwein, P.: Insulin-like growth factors (IGF) in muscle development. Expression of IGF-I, the IGF-I receptor, and an IGF binding protein during myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 264: 13810-13817. 1989a.

Tollefsen, S.E.; Sadow, J.L. y Rotwein, P.: Coordinate expression of insulin-like growth factor-II and its receptor during muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 1543-1547. 1989b.

Tomas, F.M.; Munro, H.N.; Young, V.R.: Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein. *Biochem. J.* 178: 139-146. 1979.

Trenkle, A.: Hormonal and nutritional interrelationships and their effects on skeletal muscle breakdown in vivo in rats as measured by urinary excretion of N⁵-methylhistidine. *J. Anim. Sci.* 38: 1142-1152. 1974.

Trenkle, A.: Estimates of the kinetic parameters of growth hormone metabolism in fed and fasted calves and sheep. *J. Anim. Sci.* 43: 1035-1043. 1976.

Tulp, O.L.; Krupp, P.P.; Danforth, E.Jr. y Horton, E.S.: Characteristics of thyroid function in experimental protein malnutrition. *J. Nutr.* 109: 1321-1322. 1979.

Turner, J.C.: Modern applied mathematic probability-statistics operational research. In: *The English Universities*. Press London, 1970.

Turner, L.V. y Garlick, P.J.: The effect of unilateral phrenectomy on the rate of protein synthesis in rat diaphragm in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* 349: 109-113. 1974.

Uauy, R.; Winterer, J.C.; Bilmazes, C.; Haverberg, L.N.; Scrimshaw N.S.; Munro, H.N. y Young, V.R.: The changing pattern of whole body protein metabolism in aging humans: Relationships among rates of total body protein breakdown, body composition. N⁵-Methylhistidine excretion and obligatory urinary nitrogen losses. *J. Gerontol.* 1978.

Underwood, L.E.; Clemmons, D.R.; Maes, M.; D' Ercole, A.J. y Ketelslegers, J.M.: Regulation of somatomedin-C/IGF-I by nutrients. *Horm. Res. (Basel)* 24: 166-176. 1986.

Vandelaar, M.J.; Moats-staats, B.M.; Davenport, M.L.; Walker, J.L.; Ketelslegers, J.M.; Sharma, B.K. y Underwood, L.E.: Reduced serum concentrations of IGF-I in protein-restricted growing rats are accompanied by reduced IGF-I mRNA levels in liver and skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 130: 305-312. 1991.

Vassilopoulos, D.; Lumb, E.M. y Emery, A.E.H.: Karyometric changes in human muscle with age. *Eur. Neur.* 16: 31-34. 1977.

Veldhuis, J.D.; Iranmanesh, A.; HO, K.L.; Waters M.J.; Johnson, M.L. y Lizarralde, A.: Dual defects in pulsatile growth hormone secretion and clearance observed during obesity in man. *J. Clin. Endocr. Metab.* 72: 51-59. 1991.

- Voronov, B.G. y Buttery, P.J.: Protein turnover in rats treated with trembolone acetate. *Br. J. Nutr.* 36: 575-579. 1976.
- Von der Decken, A. y Omstedt, P.T.: Protein feeding of rats after protein starvation incorporation of amino acid into polypeptide by skeletal muscle polyribosomes. *J. Nutr.* 100: 118. 1970.
- Von der Decken, A. y Omstedt, P.T.: Dietary protein quality measured by in vitro protein synthesis in rats skeletal muscle ribosomes. *J. Nutr.* 102: 1555-1562. 1972.
- Wahl, P.E.; Etherton, T.O. y Chung, C.S.: Exogenous pituitary and recombinant growth hormone induce insulin and IGF-I resistance in pig adipose tissue. *Danest. Anim. Endocrinol.* 4 (3): 183-194. 1987.
- Wallace, T.D. y Silver, J.L.: *Econometrics, an Introduction*. Addison-Wesley Publishing. Massachusetts. 1988.
- Ward, H.C.; Halliday, D. y Sim, A.J.W. Protein and energy metabolism with biosynthetic human growth hormone after gastrointestinal surgery. *Ann. Surg.* 206: 56-61. 1987.
- Wassner, S.J.; Orloff, S. y Holliday, M.A.: Protein degradation in muscle: response to feeding and fasting in growing rats. *Am. J. Physiol.* 233 (2): E119-E123. 1975.
- Waterlow, J.L. y Stephen, J.M.L.: The effects of a low protein diet on the turnover rate of serum liver and muscle protein in the rat measured by the constant infusion of L (¹⁴C) lysine. *Clin. Sci.* 35: 287-305. 1968.
- Waterlow, J.C.; Garlick, P.J. y Millward, D.J.: In: *Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body*. Elsevier. North Holland. Amsterdam. 1978.
- Watt, P.W.; Kelly, F.J.; Golspink, D.F. y Goldpink, G.: Morphological and biochemical changes in skeletal muscles of the rat. *J. Appl. Physiol.* 53: 1144-1151. 1982.
- Webster, A.J.F.: The energetic efficiency of metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 40: 121-128. 1981.
- Webster, A.J.F.: Selection for leanness and energetic efficiency of growing and adult animals. *Proc. Nutr. Soc.* 45: 45-53. 1986.
- Wechsler, W.: Elektronenmikroskopische befunde am atrophischem skelettmuskel der ratte nach chronischer mangelernahrung. *Naturwissen* 51 (4): 91. 1964.
- Welbourne, T.; Joshi, S. y McVie, R.: Growth hormone effects on hepatic glutamate handling in vivo. *Am. J. Physiol* 257: E959-E929. 1989.
- Wernerman, J.; Von der Decken, A. y Vinnars, E.: Size distribution of ribosomes in biopsy specimens of human skeletal muscle during starvation. *Metabolism.* 34: 665-669. 1985.
- Whalen, R.G.; Schwartz, K.; Bouveret, P.; Sell, J.M. y Gros, F.: Contractile protein isozymes in muscle development identification of an embryonic form myosin heavy a chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 5197-5201. 1979.

- Whitmore, J.N.; Bertonini, T.E. y Mendell, J.R.: Immunocytochemical studies of cathepsin D in human skeletal muscles. *Ann. Neurol.* 14: 133-142. 1983.
- Whitmore, C.T.: An approach to pig growth modeling. *J. Anim. Sci.* 63: 615-626. 1986.
- Wittmann, M. y Poole, B.: Protein degradation in cultured cells 2. Uptake of chloroquine by rat fibroblast and inhibition of cellular protein degradation and cathepsin-B1. *J. Cell. Biol.* 63: 430-440. 1974.
- Widdowson, E.M.: Changes in pigs due to undernutrition before birth and for one, two and three years afterwards, and the effects of rehabilitation. In: *Nutrition and malnutrition*. pp: 165-181. (eds A.F. Roche y F. Falkner) New York. Plenum Press. 1973.
- Wienthal, K. y Crie, J.S.: The role of lysosomes and lysosomal enzymes in cardiac protein turnover. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 39: 37-41. 1980.
- Williams, P.E y Goldspink, G.: Longitudinal growth of striated-muscle fibers. *J. Cell. Sci.* 9: 751-769. 1971.
- Winfree, A.T.: In: *The Geometry of Biological Time*. Springer Verlag. New York: 435-449. 1980.
- Winick, M. y Noble, A.: Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Dev. Biol.* 12: 451-468. 1965.
- Winick, M. y Noble, A.: Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr.* 89: 300-306. 1966.
- Winick, M. y Noble, A.: Cellular response with increased feeding in neonatal rats. *J. Nutr.* 91: 179-182. 1967.
- Winick, M.; Fish, I. y Rosso, P.: Cellular recovery in rat tissue after a brief period of neonatal malnutrition. *J. Nutr.* 95: 623-626. 1968.
- Winick, M.: Fetal malnutrition and growth process. *Hosp. Pract.* 34: 33-24. 1970.
- Winick, M.; Rosso, P. y Watterlow, J.: Cellular growth of cerebrum, cerebellum and brain stem in normal and marasmic children. *Exp. Neurol.* 26: 393. 1970.
- Wyn, P.C. y Thwaites, C.J.: The relative growth and development of the carcass tissues of Merino and crossbred rams and wethers. *Aust. J. Agric. Res.* 32: 957-963. 1981.
- Yacob, R.E.; Barrett, E.; Plewe, G.; Fagin, K.D. y Scherwin, R.S.: Acute effects of insulin-like growth factor-I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. *J. Clin. Invest.* 83: 1717-1723. 1989.
- Yahya, Z.A.H.; Bates, P.C.; Dalal, S.S.; Morell, D.; Holder, A.T.; Taylor, A. y Millward, D.J.: The effect of dietary-protein concentration on bone and muscle growth and immunoreactive somatomedin C in the rat. *Proc. Nutr. Soc.* 45: 107A. 1986.

Young, V.R. y Alexis, S.D.: In vitro activity of ribosomes and RNA content of skeletal muscle in young rats fed adequate or low protein. *J. Nutr.* 96: 255-265. 1968.

Young, V.R.; Chen, S.C.; Mc Donald, J.: Sedimentation of rat skeletal muscle ribosomes effect of hydrocortisone insulin and diet. *Biochem. J.* 106: 913-919. 1968.

Young V.R.: The role of skeletal and cardiac muscle in the regulation of protein metabolism. In: *Mammalian protein metabolism*. pp: 585-674. (Munro H.N. ed.) Academic Press Inc. New York. 1970.

Young, V.R.; Stuthers, S.C. y Vilaire, C.: Synthesis and degradation of mixed proteins and composition changes in skeletal muscle of malnourished and refeed rats. *J. Nutr.* 10 (10): 1379. 1971.

Young, V.R.; Haverberg, L.N.; Bilmazes, C. y Munro, H.N.: Potential use of 3-methylhistidine excretion as an index of progressive reduction in muscle protein catabolism during starvation. *Metabolism.* 22: 1429-1436. 1973.

Young, V.R.; Winterer, J.C.; Munro, H.N. y Scrimshaw, N.S.: Muscle and whole body protein metabolism with special reference to man. In: *Special review aging research*. pp: 217-252. (eds. M.F. Elias; B.F. Eleftherio y P.K. Elias) Bar Harbor M.E.: EAR Inc. 1976.

Young, V.R. y Munro, H.N.: N^ε- Methylhistidine and muscle protein turnover: an overview. *Fed. Proc.* 37: 2291-2300. 1978.

Young, V.R.; Nahapeti, A. y Janghorb, B.: Selenium bioavailability with reference to human-nutrition. *Am. J. Clin Nutr.* 35 (5): 1076-1088. 1982.

Zeman, R.J.; Kameyama, T.; Matsumoto, K.; Bernstein, P. y Etlinger, J.D.: Regulation of protein degradation in muscle by calcium. Evidence for enhanced nonlysosomal proteolysis asociated with elevated cytosolic calcium. *J. Biol. Chem.* 260: 13619. 1985.

Zeman, R.J.; Bernstein, P.L.; Ludemann, R. y Etlinger, J.D.: Regulation of calcium dependent protein turnover in skeletal muscle by thyroxine. *Biochem. J.* 240: 269. 1986.

7. ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNasa	Desoxirribonucleasa ácida.
IACM	Incremento acumulado de crecimiento de peso muscular.
IAPrM	Incremento acumulado de crecimiento de proteína muscular.
IE	Ingesta energética global.
IMS	Índice miosomático.
IP	Ingesta proteica global.
NN	Número de núcleos.
NT	Animales no tratados.
PCF	Peso corporal final.
PM	Peso muscular.
PrA	Proteína muscular absoluta.
PrR	Proteína muscular relativa.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNasa	Ribonucleasa ácida.
T	Tratados con rhGH.
VACM	Velocidad absoluta de crecimiento de peso muscular.
VAPrM	Velocidad absoluta de crecimiento de proteína muscular.
VFCM	Velocidad fraccional de crecimiento de peso muscular.
VFPPrM	Velocidad fraccional de crecimiento de proteína muscular.