

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



TESIS DOCTORAL

**Adaptación del metabolismo proteico hepático al stress en  
ratas con malnutrición proteica y calórica-proteica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Ascensión Marcos Sánchez**

Madrid, 2015

ada

**AUTOR: ASCENSION MARCOS SANCHEZ.**

**TITULO DE LA TESIS DOCTORAL: "ADAPTACION DEL METABOLISMO PROTEICO  
HEPatico AL STRESS, EN RATAS CON MALNUTRICION PROTEICA Y CALORICO-  
PROTEICA"**

**DIRECTOR: EMILIA MUÑOZ MARTINEZ.**

**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA ANIMAL  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.  
AÑO: 1982.**



R36.759

A Jordi y  
a mis padres.



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Gregorio Varela, por haberme permitido realizar la Tesis en el Departamento que dirige, así como por la confianza depositada en este trabajo.

Al Departamento entero, a todos aquellos que me brindaron su apoyo y ayuda incondicionales, encontrando en ellos no sólo unos buenos compañeros, sino unos verdaderos amigos; a todos aquellos que no sólo me han formado en el aspecto científico, sino también en el humano.

Al Dr. José Luis Rey de Viñas, por su tan estimada y valiosa ayuda en la realización de las técnicas para separar y detectar los ácidos nucleicos (DNA y RNA).

A la Dra. Ma Teresa Unzaga, que día a día, durante estos cuatro años ha permanecido a mi lado, ayudándome y alentándome en todo momento.

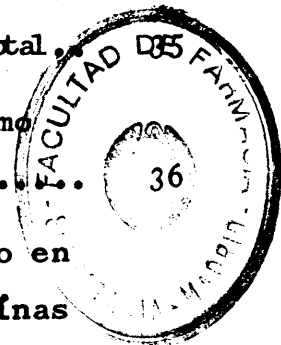
A la Dra. Emilia Muñoz, que con tanto acierto, me ha introducido en el estudio de ese mundo fascinante y aún misterioso de la INMUNIDAD. Gracias Emilia, por ayudarme en los momentos más difíciles ofreciéndome tu amistad.

Por último, quiero agradecer a la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid la concesión de una Beca en Tecnología de los Alimentos.

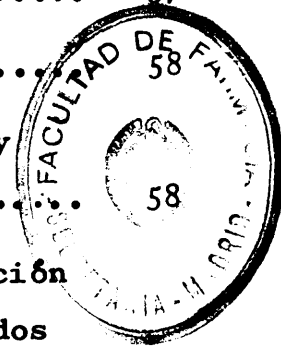
1.- OBJETO .....	1
2.- SITUACION BIBLIOGRAFICA .....	7
2.1.- Aspectos generales sobre la deficiencia en proteínas y calorías .....	9
2.1.1.- Adaptación a la deficiencia en proteínas y/ó calorías .....	10
2.2.- Metabolismo proteico corporal total en malnutrición .....	14
2.3.- Mecanismos hepáticos de adaptación a la dieta ..	17
2.3.1.- Efecto de la malnutrición proteica y/ó calórica sobre el crecimiento hepático .....	17
2.3.2.- Efecto de la deficiencia a corto plazo en proteínas sobre el turnover proteico hepático .....	20
2.3.3.- Influencia de la deficiencia prolongada en proteínas sobre la síntesis proteica del hígado .....	22
2.3.3.1.- Efecto sobre las denominadas proteínas endógenas fijas hepáticas .....	22
2.3.3.2.- Efecto sobre las proteínas exportables hepáticas .....	24



2.3.4.- Influencia de la deficiencia en energía de la dieta sobre las proteínas hepáticas .....	26
2.3.4.1.- Efecto sobre las denominadas proteínas endógenas fijas ....	26
2.3.4.2.- Efecto sobre las proteínas exportables .....	27
2.3.5.- Influencia de la malnutrición proteica y proteico-calórica sobre el metabolismo del RNA hepático .....	29
2.3.5.1.- Efectos sobre la síntesis de RNA .....	29
2.3.5.2.- Influencia de la síntesis de proteínas exportables sobre la actividad ribosómica total.	
2.3.5.3.- Efecto sobre el catabolismo del RNA .....	36
2.3.6.- Importancia del catabolismo proteico en la regulación del turnover de proteínas en hígado. Intervención de los enzimas lisosómicos .....	38
2.4.- Respuesta metabólica del organismo al stress ...	42
2.4.1.- Respuesta metabólica al stress en individuos bien alimentados .....	43
2.4.1.1.- Respuesta catabólica al stress .....	44



2.4.1.2.- La respuesta anabólica al stress. Puesta en marcha de los mecanismos de defensa ....	46
2.4.2.- El papel básico del hígado en las respuesta metabólicas al stress .....	48
2.4.2.1.- Comparación entre la adaptación a la inanición y la respuesta metabólica a la infección aguda .....	50
2.4.3.- Aspectos metabólicos de la infección crónica .....	53
2.4.4.- Influencia de la malnutrición en la respuesta al trauma ó la infección .....	53
3.- MATERIAL Y METODOS .....	57
3.1.- Diseño experimental .....	58
3.1.1.- Estudio de la deficiencia proteica y proteico-calórica en la dieta .....	58
3.1.2.- Estudio del efecto de la administración del antígeno en los animales sometidos a los distintos niveles dietarios estudiados .....	60
3.2.- Desarrollo de los experimentos .....	62
3.2.1.- Composición de las dietas utilizadas ...	64



	<u>Pág.</u>
3.3.3.2.- Determinaciones en plasma ....	77
3.3.3.2.1.- Proteínas plasmáticas totales ....	77
3.3.3.2.2.- Fracciones proteicas plasmáticas ..	78
3.3.3.3.- Determinaciones en orina .....	79
3.3.3.3.1.- Urea .....	79
4.- RESULTADOS .....	80
4.1.- Presentación de resultados .....	81
5.- DISCUSION .....	131
5.1.- Variaciones en peso corporal .....	135
5.1.1.- Efecto de la dieta .....	135
5.1.2.- Efecto del antígeno .....	139
5.2.- Modificaciones en la ingesta .....	139
5.2.1.- Cambios debidos a la dieta .....	140
5.2.2.- Cambios debidos al antígeno .....	142
5.3.- Efectos del déficit en proteínas sobre el crecimiento hepático .....	142
5.3.1.- Variaciones en peso, peso órgano/peso corporal y proteína soluble .....	142
5.3.2.- Variaciones en DNA, proteína/DNA, tamaño celular, número de núcleos y actividad DNasa ácida .....	143



5.4.- Efecto de la deficiencia en proteínas dietarias sobre el metabolismo del RNA ..... 148

5.4.1.- Variaciones en RNA total, RNA/DNA, RNA/proteína y actividad RNasa ácida ... 148

5.5.- Efecto de la dieta restringida sobre el crecimiento hepático ..... 151

5.5.1.- Variaciones en peso, peso órgano/peso corporal y proteína soluble ..... 151

5.5.2.- Variaciones en DNA, proteína/DNA, tamaño celular, número de núcleos y actividad DNasa ácida ..... 152

5.6.- Efecto de la dieta restringida sobre el metabolismo del RNA ..... 155

5.6.1.- Variaciones en RNA total, RNA/DNA, RNA/proteína y actividad RNasa ácida ...

5.7.- Efecto de la deficiencia proteica y la restricción en la dieta sobre la actividad de los enzimas hidrolásicos: Fosfatasa alcalina, Fosfatasa ácida y  $\beta$ -glucuronidasa ..... 158

5.8.- Efecto de la deficiencia proteica sobre la excreción urinaria de urea y sobre las actividades enzimáticas de transaminasas y GDH ... 162

5.9.- Efecto de la dieta restringida sobre la excreción urinaria de urea y sobre las actividades enzimáticas de transaminasas y GDH ..... 166



5.10.- Efecto del déficit proteico y de la dieta restringida sobre las proteínas totales plasmáticas y sus fracciones ..... 170

5.11.- Efecto de la administración antigénica sobre el crecimiento hepático de ratas alimentadas con dieta balanceada ..... 173

5.11.1.- Variaciones en peso, peso órgano/peso corporal y proteína soluble ..... 173

5.11.2.- Variaciones en DNA, proteína/DNA, tamaño celular, número de núcleos y actividad DNasa ácida ..... 174

5.12.- Efecto de la administración antigénica sobre el metabolismo del RNA hepático en ratas alimentadas con dieta balanceada ..... 178

5.12.1.- Variaciones en RNA total, RNA/DNA, RNA/proteína y actividad RNasa ácida ..... 178

5.13.- Efecto de la administración antigénica sobre la actividad de los enzimas hidrolásicos Fosfatasa alcalina, Fosfatasa ácida y -glucuronidasa de ratas alimentadas con dieta balanceada ..... 181

5.14.- Efecto de la administración antigénica sobre la excreción urinaria de urea y sobre las actividades enzimáticas de transaminasas y GDH en ratas alimentadas con dieta balanceada ..... 184



5.15.- Efecto de la administración antigénica sobre el crecimiento hepático de ratas deficientes en proteína ..... 187

5.16.- Efecto de la administración antigénica sobre el metabolismo del RNA hepático en ratas deficientes en proteína ..... 190

5.16.1.- Variaciones en RNA total, RNA/DNA, RNA/proteína y actividad RNasa ácida .. 190

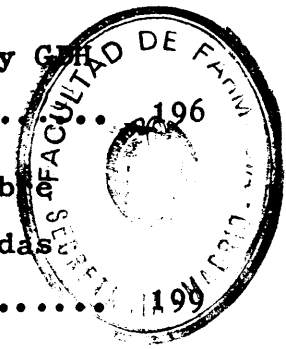
5.17.- Efecto de la administración antigénica sobre la actividad de los enzimas hidrolásicos: Fosfatasa alcalina, Fosfatasa ácida y -glucuronidasa de ratas deficientes en proteína ..... 193

5.18.- Efecto de la administración antigénica sobre la excreción urinaria de urea y sobre las actividades enzimáticas de transaminasas y GPT en ratas deficientes en proteína ..... 196

5.19.- Efecto de la administración antigénica sobre el crecimiento hepático en ratas alimentadas con dieta restringida ..... 198

5.20.- Efecto de la administración antigénica sobre el metabolismo del RNA hepático en ratas alimentadas con dieta restringida ..... 201

5.21.- Efecto de la administración antigénica sobre la actividad de los enzimas hidrolásicos: Fosfatasa alcalina, Fosfatasa ácida y -glucuronidasa en ratas alimentadas con dieta restringida.. 203



5.22.- Efecto de la administración antigénica sobre  
la excreción urinaria de urea y sobre las  
actividades enzimáticas de transaminasas  
y GDH en ratas alimentadas con dieta  
restringida ..... 205

5.23.- Variaciones de las proteínas totales y sus  
fracciones durante estimulación antigénica  
en ratas en las diversas situaciones  
nutritivas ..... 207

6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES ..... 209

7.- BIBLIOGRAFIA ..... 215.



1.- OBJETO



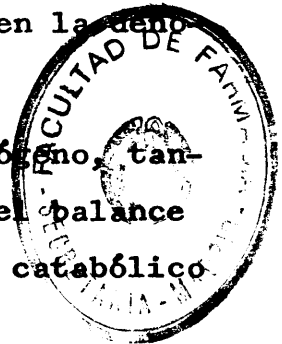
La entrada de un antígeno en el organismo da lugar a un fenómeno de stress, frente al cual, el individuo sufre profundos cambios metabólicos a fin de adaptarse y rechazar, en último extremo, la agresión.

Hoy se sabe que cualquier tipo de stress (infecciones, quemaduras, fracturas, etc.) provoca efectos deletéreos en el estado nutritivo del huésped, a través bien de lesiones locales en los tejidos ó de cambios fisiológicos y metabólicos generalizados, los cuales alteran la homeostasis corporal y constituyen la denominada respuesta metabólica al stress.

Así, el incremento en la eliminación de nitrógeno, tanto por vía gastrointestinal como urinaria, compromete el balance nitrogenado que se hace negativo y determina un estado catabólico en el individuo.

No obstante, en una etapa posterior y mediante la aparición de un elevado anabolismo proteico, se consigue la reparación de los tejidos dañados y en consecuencia, la supervivencia del organismo agredido.

Es de importancia capital este incremento en la síntesis proteica, puesto que de ella depende la participación de las



nuevas proteíñas, en dos procesos básicos para lograr la recuperación: el desarrollo de los mecanismos de defensa, fundamentalmente la respuesta inmune específica y la reorganización de los tejidos lesionados.

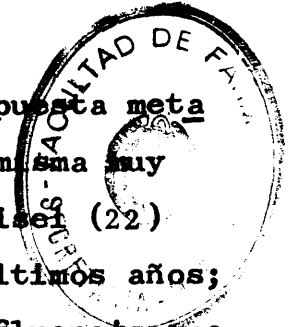
Es preciso pues, para que la puesta en marcha de estos mecanismos sea satisfactoria, la existencia de un aporte de sustratos adecuados y especialmente, de aquellos de carácter exógeno procedentes de la dieta. De esta manera, el estado nutritivo se convierte en un factor de primera importancia, que influye a su vez, en la capacidad de respuesta al stress. Por el contrario, los estados de agresión condicionan los depósitos corporales, comprometiendo otras funciones dependientes de aquellos.

Se comprende fácilmente, por lo tanto, que cualquier déficit en cantidad ó calidad en la ingestión de nutrientes puede comprometer la respuesta metabólica a la agresión, puesto que el metabolismo proteico total y especialmente el hepático, se encuentran seriamente alterados en el curso de los procesos que conducen a la adaptación a una dieta deficiente.

Aunque actualmente los estudios sobre la respuesta metabólica al stress, son numerosos y el interés sobre la misma muy grande, como muestran las importantes revisiones de Beiser (22) y de Wilkinson y Cuthbertson (304) aparecidas en los últimos años; sin embargo, es poco conocida y mal comprendida, la influencia que tienen los déficits nutritivos en dicha respuesta.

En nuestro laboratorio previamente se ha observado, que la malnutrición proteica no impide la transformación blástica de los linfocitos, sensibilizados a un antígeno particulado, proceso que necesita un incremento en la síntesis proteica.

Así, a pesar de la deplección de los órganos linfoides



en estas condiciones, aparece un aumento de la funcionalidad de las células linfoides restantes, lo que indica que la respuesta inmunológica adquiere carácter prioritario durante el déficit.

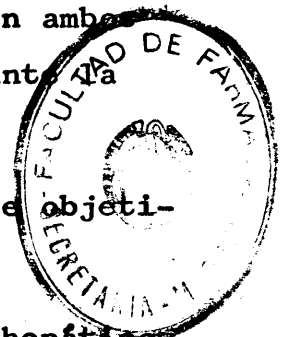
Intimamente relacionado con estos trabajos, nuestro objetivo actual, se dirige al estudio de las modificaciones metabólicas - especialmente las que conciernen al metabolismo proteico hepático - producidas durante la reacción al stress, el cual es provocado por la administración de eritrocitos de carnero (SRBC) por vía intravenosa, en animales con malnutrición proteica y proteico-calórica.

La elección del hígado en este estudio se basa en su papel primordial, tanto en la adaptación a la dieta, como en el período anabólico de la respuesta a la agresión.

Por su parte, consideramos de gran interés poder deslindar totalmente, los posibles efectos de la falta única de proteínas, del fallo en la combinación de proteínas y calorías en la dieta, ya que se producen modificaciones metabólicas muy distintas en ambos casos, las cuales pueden tener repercusiones importantes ante la agresión.

Las cuestiones que nos surgen a la vista de este objetivo pueden resumirse a grandes rasgos en las siguientes:

- ¿Cuales son las modificaciones del metabolismo proteico hepático, que influyen en los mecanismos de adaptación a las dietas deficientes estudiadas?
- ¿Es el hígado de los animales deficitarios capaz de responder al stress, provocado por el antígeno?
- ¿Cómo se altera el metabolismo proteico hepático de los animales deficitarios, en la respuesta al stress, una vez modificado por la adaptación a la dieta?



- ¿Es prioritaria la reacción a la agresión, en los animales depleccionados por la malnutrición?

- ¿Es ó no semejante la respuesta metabólica del hígado al stress, en los animales sometidos a las distintas dietas utilizadas?

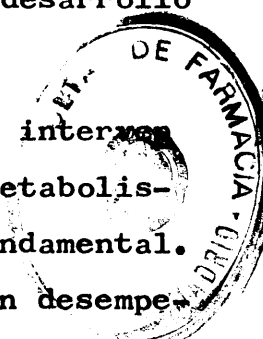
A fin de poder contestar a estas preguntas, nos proponemos conocer el metabolismo proteico del hígado, en cada una de las situaciones experimentales antes indicadas, bajo las siguientes premisas:

En primer lugar, es fundamental determinar las modificaciones que se efectúan en el número y tamaño de los hepatocitos, para deducir si se afecta ó no el crecimiento celular del hígado. Para ello, se valorará la tasa de DNA, número de núcleos, peso hígado/número de núcleos y otros parámetros relacionados.

La determinación de la tasa de RNA y de la razón RNA/proteína, nos señalará las modificaciones en la síntesis proteica del órgano. Este dato es de gran interés, puesto que como ya se indicó, la formación de nuevas proteínas es básica para el desarrollo de la reacción al stress.

En relación con esto, el estudio de la posible intervención de los enzimas hidrolásicos en la modificación del metabolismo hepático por la agresión y por la dieta, nos parece fundamental. Esto es así, a consecuencia del papel crucial que parecen desempeñar dichos enzimas en los mecanismos de remodelación tisular y en especial como reguladores del catabolismo proteico. Así, se determinarán los enzimas deoxiribonucleasa ácida (DNasa), ribonucleasa ácida (RNasa), fosfatasas alcalina y ácida y  $\beta$ -glucuronidasa.

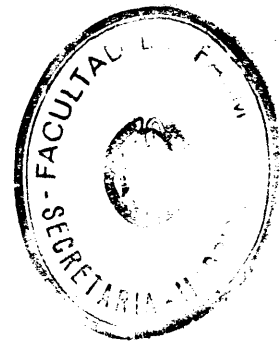
Por otra parte, la función del hígado relativa a la degradación de aminoácidos extrahepáticos y la formación de urea, así como su posible reconversión en sustratos energéticos básicos (glu-



coneogénesis), se estudian a través de la valoración de las actividades enzimáticas de glutamato oxalacetato transaminasa (GOT), glutamato piruvato transaminasa (GPT) y glutamato deshidrogenasa (GDH) hepáticas y de la tasa de urea excretada por orina.

En última instancia el estudio de las proteínas plasmáticas y sus fracciones, nos pueden poner de manifiesto el estado de formación de las proteínas exportables en el hígado, tanto durante la adaptación a la dieta, como en la respuesta metabólica al stress.

2.- SITUACION BIBLIOGRAFICA

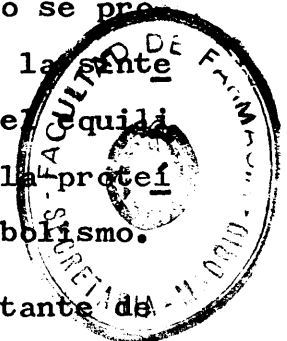


Las proteínas están íntimamente relacionadas con los procesos vitales y por ello, la regulación de su metabolismo está integrada dentro del mantenimiento de la función corporal.

La cantidad de proteína corporal total presente en cada momento, representa un equilibrio dinámico entre la tasa de síntesis y de catabolismo proteico. Durante el ciclo vital de un individuo, el punto exacto de este equilibrio cambia con la edad e influye decisivamente sobre su crecimiento y desarrollo. Cuando se produce la acumulación de proteína, el equilibrio favorece a la síntesis, mientras que cuando se produce pérdida de la misma, el equilibrio se desplaza hacia la degradación. La homeostasis de la proteína se produce pues, por medio de la regulación de su metabolismo.

La proteína de la dieta aporta una parte importante de aminoácidos que se integran en las proteínas corporales y que contribuyen al buen funcionamiento celular, por depender de las mismas la base estructural de las células.

Por ello, cualquier variación en el contenido proteico dietario, tiene consecuencias importantes en el turnover de proteínas, tanto a nivel corporal total, como en la contribución de los distintos órganos al nuevo "status" metabólico proteico.



2.1.- ASPECTOS GENERALES SOBRE LA DEFICIENCIA DIETARIA EN PROTEINAS  
Y CALORIAS.

Puede entenderse la deplección proteica, como una reducción en la concentración ó en la cantidad absoluta de proteína corporal.

Bajo cualquiera de ambos aspectos, se debe tener en cuenta que la pérdida proteica, depende de varios factores: la edad del individuo, la especie animal, la naturaleza de la dieta, el órgano considerado y sobre todo, el tiempo de duración de la deficiencia.

El mayor número de manifestaciones que se producen por déficit proteico ó proteico-calórico en la dieta, se basan en cambios en el metabolismo de proteínas. El estudio de los mismos en sus aspectos clínicos, epidemiológicos y bioquímicos, tanto en relación al hombre como a animales de laboratorio ha dado lugar a numerosos trabajos (153) (144) (289) (298).

Se reconocen hoy en clínica dos síndromes por déficit proteico dietario, especialmente en niños en crecimiento: Marasmo y Kwashiorkor.

El primero, se caracteriza por una disminución en proteínas y calorías en la ingesta, así como de otros nutrientes, mientras que el kwashiorkor depende de una deficiencia tanto cualitativa como cuantitativa de proteínas y en la cual, la ingesta de energía es adecuada (71). Las proteínas corporales en enfermos con marasmo se emplean para paliar el gasto energético y por ello, este síndrome es el que determina síntomas más severos.

Sin embargo, es muy variable el grado de deficiencia en proteínas y calorías y sus combinaciones que aparecen en clínica, y de ahí la dificultad de su diagnóstico (298).



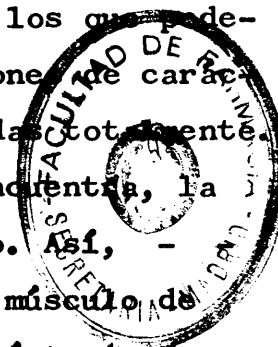
### 2.1.1.- ADAPTACION A LA DEFICIENCIA EN PROTEINAS Y/O CALORIAS.

El organismo tiende a mantener un equilibrio dinámico a través de una serie de mecanismo fisiológicos, incluso en estados que alteran su homeostasis. El conjunto de estos mecanismos mediante los cuales, el cuerpo conserva su estructura y función en condiciones adversas, constituye para Waterlow (290) el fenómeno de la adaptación. Durante períodos largos de restricción proteica y/o calórica, el cuerpo progresivamente se adapta, a fin de mantener el "status" funcional que le permite el limitado aporte de nutrientes. A este fin se produce una menor demanda de los mismos, adquiriendo un equilibrio nutritivo, compatible con el bajo nivel de su aprovechamiento.

En consecuencia, según Viteri (275) (276) muchas funciones se alteran en estas circunstancias, por lo que el individuo malnutrido es funcionalmente frágil, siendo el grado de alteración paralelo al grado de deplección proteica.

En la adaptación al déficit proteico y proteico-calórico, están implicados varios mecanismos metabólicos, entre los que podemos destacar: servomecanismos a nivel celular, reacciones de carácter hormonal y reacciones generalizadas, no comprendidas totalmente. Entre las variaciones detectadas a nivel celular se encuentra, la disminución de la síntesis proteica a nivel ribosómico. Así, Wannemacher (280) en hígado y Von der Decken (277) en músculo de ratas con deficiencia proteica, encuentran una menor síntesis de proteínas a nivel del proceso de iniciación.

También Pain y Garlick (198) señalan cambios en el contenido de ribosomas tisulares durante malnutrición, que afectan a su vez la tasa de síntesis proteica. En consecuencia, se produce



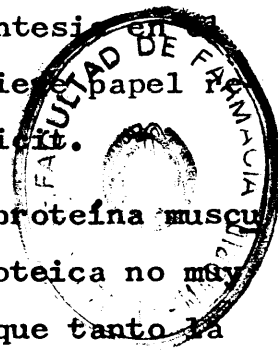
una disminución en el crecimiento corporal, el cual puede llegar a detenerse.

Por otra parte, la aparición de un incremento en los niveles de hormona del crecimiento y de glucocorticoides (6), así como la disminución de los niveles de insulina plasmática (156), en estas circunstancias, señalan la alteración hormonal durante la adaptación.

La conjunción de ambos mecanismos origina cambios en el metabolismo proteico, entre los que debe destacarse, el aumento en el catabolismo proteico muscular (65), el cual da lugar a la pérdida estructural y de masa muscular, así como un aumento relativo en la disponibilidad de aminoácidos a nivel visceral, cuya proteína lábil inicialmente se reduce, como señala Waterlow (290).

En estos procesos adaptativos, el hígado tiene un papel fundamental, puesto que en él se produce entre otras funciones, la transformación del nitrógeno a urea (290). Su estado puede determinar qué proporción del nitrógeno aminoacídico puede convertirse en urea y qué proporción se retiene en el pool de aminoácidos. A su vez, éste entra a formar parte de los procesos de síntesis en el turnover proteico tisular, por lo que el hígado adquiere un papel regulador del metabolismo de proteínas, durante el déficit.

Además, según Addis (1), las pérdidas de proteína muscular son muy extensas en el hombre con deficiencia proteica no muy severa, mientras que en pequeños animales, debido a que tanto la piel como las vísceras pueden servir como órganos de reserva energética, sólo se observan caídas en el músculo esquelético como resultado de inanición crónica ó restricción proteica crónica. Al mismo tiempo, aparece un decrecimiento en la concentración de aminoácidos plasmáticos de cadena ramificada, como señala Lunn (142), mientras que los aminoácidos no esenciales se incrementan (240).



En estas circunstancias, la tasa de proteínas plasmáticas, sufre una disminución neta durante malnutrición proteica, en relación a individuos bien alimentados. Ello se debe fundamentalmente a la drástica caída de la tasa de albúmina (110), la cual para Whitehead (299) es un índice muy sensible del estado de deplección proteica.

Sin embargo, la concentración de las gammaglobulinas es alta, a consecuencia de infecciones concomitantes en los individuos deficitarios (65).

En estas condiciones, el individuo tiende a sacrificar algunas funciones y las reservas de nutrientes y por ello, según Chandra (57) se hace más susceptible a los traumas y enfermedades que los individuos bien nutridos.

Por último, sólo señalaremos en esta pequeña revisión general, la disminución de la tasa de urea en plasma y su menor excreción por orina, lo que está determinado por una baja cifra catábolica de proteínas corporales y la disminución de la síntesis de urea, característico como señala Picou (208), de la deficiencia de proteína.

Cuando se produce la descompensación en la deficiencia proteica, aparece el fracaso de la función visceral, que resulta en la subutilización de los aminoácidos y en un incremento del catabolismo de los tejidos.

En el caso de ser las calorías el factor limitante en la dieta, la producción de urea por el contrario, se incrementa, debido a la elevación del catabolismo proteico muscular (224).

Mientras los mecanismos adaptativos se mantienen, el impacto de la malnutrición disminuye y se prolonga el período en que



aparece un grado más grave de la deficiencia. Si en este momento, el aporte dietario continua siendo bajo, el cuerpo es incapaz de mantener la adaptación y sobreviene la muerte.

## 2.2.- METABOLISMO PROTEICO CORPORAL TOTAL EN MALNUTRICION.

Los estudios del metabolismo proteico a nivel tisular han sido numerosos, pero la interpretación de los mecanismos producidos en el animal total, han sido muy difíciles partiendo de algunos resultados parciales. Actualmente, sin embargo, contamos sobre este particular con dos excelentes revisiones de Waterlow y col., la publicada en 1978 (293) bajo el título: "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body" y la aparecida en 1981 (294) sobre "Nitrogen metabolism in man", a donde remitimos a los interesados en el tema. No obstante, indicaremos aquí los datos más fundamentales.

Como hemos visto anteriormente, existe una relación directa entre los niveles de proteína en la dieta y la variación en la síntesis y degradación de las proteínas corporales.

En individuos normales bien alimentados, el nivel de proteína en la ingesta, según Waterlow (289), tiene poco efecto sobre la tasa de turnover proteico. Sin embargo, en individuos obesos la presencia ó ausencia de proteína dietaria parece tener un profundo efecto.

Así Sender (251), señala que en pacientes obesos aparece una disminución del 50% en el turnover proteico, cuando se someten a una dieta baja en energía.

Ahora bien, aunque el turnover proteico total depende del estado nutritivo del individuo, existen datos contradictorios tanto clínicos como experimentales, en relación a los efectos de la disminución de la proteína dietaria sobre dicho turnover.

En general, si una ingesta dietaria normal se reemplaza por una dieta baja en proteínas, se produce una caída de la excre-



ción de nitrógeno. En este sentido Sprinson (258) señala una menor excreción de  $N^{15}$  en individuos sometidos a una dieta deficiente en proteínas, comparados con controles.

También Read (222) (223) administrando dosis únicas de varios aminoácidos marcados con  $N^{15}$  a niños malnutridos y realimentados, señala una caída en la eliminación de nitrógeno en los primeros. Asimismo, Golden (98) también en niños señala un menor nivel de turnover proteico, con un descenso del 40% tanto en la tasa de síntesis como en la degradación durante el déficit.

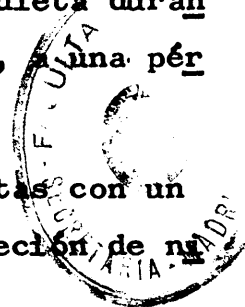
Por el contrario, Picou (207) utilizando infusión continua de glicina marcada con  $N^{15}$ , encuentra un incremento tanto en la síntesis como en el catabolismo total de niños malnutridos, antes de la realimentación.

También en estudios experimentales con animales malnutridos, aparecen generalmente cifras reducidas de turnover proteico (292) (93). Sin embargo, Waterlow (290) mediante medidas con lisina  $C^{14}$ , muestra que el flujo de aminoácidos no cambia apreciablemente en ratas, a los 10 días de someterlas a una dieta deficiente en proteínas. No obstante, la prolongación de la dieta durante cinco semanas, conduce según este mismo autor (289), a una pérdida del 50% en el flujo aminoacídico.

Asimismo, Das (63) en ratas que ingieren dietas con un 5% de proteína, observa una reducción del 5% en la excreción de nitrógeno, en sólo 30 horas.

A este respecto, Millward (158) sugiere que la disminución de la excreción nitrogenada en estas condiciones puede producirse, bien por un fallo en el flujo total de aminoácidos, ó bien por la pérdida de una fracción del flujo excretado.

Das y Waterlow (63) apoyan este último aserto y añaden



que la reducción de la salida de nitrógeno, se debe a una disminución en el ciclo de la urea, la cual representa una reducción en la proporción en la que se excreta el flujo.

Esta situación es totalmente reversible en la rata, la cual mediante rehabilitación con una dieta adecuada, restablece los niveles normales del flujo de aminoácidos en ocho días.

Ahora bien, la disminución en la tasa de metabolismo proteico corporal total durante malnutrición proteica, viene determinada por cambios metabólicos de cada tejido, individualmente considerados.

En este sentido, Waterlow (289) indica que los cambios en la composición corporal incluyen pérdidas generalizadas de los tejidos blandos, en relación a las de los tejidos conectivo y esquelético, así como, variaciones en los pesos relativos de órganos con tasas diferentes de turnover proteico, como ha demostrado este mismo autor (289).

En estas condiciones, el cerebro aumenta de tamaño (94) mientras que el músculo se reduce (261) y la proteína hepática puede variar en cualquier dirección.

Vemos pues, que el aporte de nitrógeno dietario en cantidad suficiente, es elemento indispensable en el mantenimiento de un turnover proteico correcto. La disminución del mismo, supone una reorganización del turnover de los distintos tejidos de la economía, los cuales colaboran en mayor ó menor medida en la readaptación metabólica a la nueva situación e influyen por ende, en el metabolismo proteico total del cuerpo.

El hígado constituye en este contexto, uno de los órganos más importantes, cuya adaptación a la disponibilidad de aminoácidos, influye más decisivamente en la reacción del organismo a las variaciones de la dieta.

## 2.3.- MECANISMOS HEPATICOS DE ADAPTACION A LA DIETA.

Entre los mecanismos adaptativos en respuesta a los déficits dietarios se encuentran, como ya se ha señalado, los que se verifican en el tejido hepático.

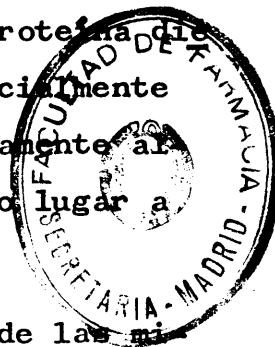
Durante dicha respuesta, se mantienen las funciones indispensables para luchar y adaptarse a la nueva situación, en detrimento de otras no indispensables, como por ejemplo el crecimiento.

En consecuencia, en la revisión bibliográfica hacemos énfasis en los efectos producidos durante la adaptación a la dieta sobre el crecimiento, tomando como base la tasa de DNA hepático, así como las modificaciones del metabolismo del RNA y su influencia sobre el turnover proteico. Los procesos de síntesis y catabolismo de proteínas, durante la malnutrición proteica y/o calórica también son considerados.

### 2.3.1.- EFECTO DE LA MALNUTRICION PROTEICA Y/O CALORICA SOBRE EL CRECIMIENTO HEPATICO.

La disminución en el aporte de energía ó de proteína dietaria, afecta gravemente el crecimiento del hígado. Especialmente en los animales en desarrollo, el crecimiento es profundamente alterado e incluso cesa, como indica Widdowson (301), dando lugar a una disminución de tamaño del órgano.

Este efecto se acompaña por el decrecimiento de las mitosis, fenómeno que ya fué señalado por Morpurgo (168) y Leduc (133) en hígado de ratas con inanición y en ratones alimentados con una dieta baja en proteínas respectivamente.



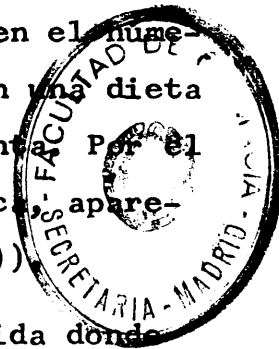
Más recientemente, Najdal (185) y Wheatley (296) señalan que el retardo en la aparición de células binucleares y poliploides en hígado de animales sometidos a dietas sin proteínas, se relaciona con la parada en el crecimiento que se produce en estas condiciones. Esto contrasta con el aumento en la poliploidía encontrada en animales controles en crecimiento y que para Epstein (82), es proporcional al incremento de la masa citoplasmática.

Estos efectos se acompañan de la caída del peso del hígado (195) (132), así como de variaciones en la tasa y en la síntesis de DNA, cuya dotación, nos indica el número de células de un órgano y por lo tanto, se considera un índice de crecimiento del mismo.

En este sentido, Anthony (9) muestra que en ratas jóvenes alimentadas durante 8 a 12 semanas con dietas conteniendo diversos niveles de proteína, así como con dietas restringidas, se produce una disminución del contenido total de DNA y de proteína hepática.

También Hill (107) indica que la variación dietaria en energía ó en proteína, da lugar a diferencias marcadas a nivel celular. Asimismo, Graystone (100) señala una disminución en el número de células en hígado de ratas jóvenes, alimentadas con una dieta baja en energía, aún cuando el tamaño celular se incrementa. Por el contrario, en ratas adultas sujetas a deficiencia proteica, aparece reducido el tamaño celular (Widdowson y Mc Cance (300)).

Es sin embargo, en períodos tempranos de la vida donde se afecta más el crecimiento por malnutrición. Así, Lau (130) indica que durante el primer período del crecimiento, tanto la restricción energética como la proteica, reducen la tasa de división celular puesto que disminuye el contenido de DNA hepático (considerando que el nivel de DNA en los núcleos diploides de las ratas es constante).



Por consiguiente, el crecimiento del hígado de rata durante los primeros 20 días de vida, es susceptible de variación influido por los niveles proteicos y energéticos dietarios, de tal modo que al prolongar la restricción, se determina un daño más severo al crecimiento y al desarrollo de los animales recién nacidos. También Lau (130) señala que las ratas proteín-deficientes sufren un mayor grado de decrecimiento y muestran menor capacidad de rehabilitación durante la realimentación, que aquellas sometidas a una deficiencia en energía. Por ello sugiere, que la proteína puede ser el factor limitante que afecte al número normal de células y al tamaño de los órganos, durante el primer período de la vida.

La causa directa de la disminución en la tasa de DNA durante malnutrición, es la caída de la síntesis del nucleótido, que se produce en estas condiciones. Dallman (61) en estudios con ratas jóvenes alimentadas con dietas bajas en proteína, señala una disminución del 40% en la incorporación de timidina tritiada por el DNA hepático, dentro de las 12 horas del comienzo del régimen dietario. Estos resultados concuerdan, con la reducción en la actividad específica del DNA hepático, encontrada en ratas sometidas a ayuno ó a malnutrición proteica por Montecuccoli (167).

Asimismo, la disminución de la síntesis de DNA se corresponde, según los trabajos de Tagliamante (266) y Jasper (140), con una caída de la actividad enzimática de la timidina-quinasa, la cual interviene en la regulación de dicha síntesis, lo que parece confirmar la pérdida real en su capacidad de formación.

Por otra parte, también Dallman (62) en animales desprovistos de proteína ó sometidos a ayuno, demuestran un incremento en el marcaje isotópico del DNA mitocondrial, el cual aparece paralelo con la disminución en la incorporación de timidina tritiada en el DNA nuclear hepático. Ello parece ser debido a un remodelamiento de



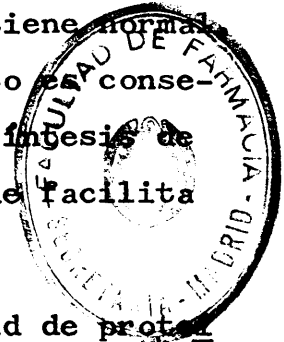
las funciones del órgano ante la privación proteica, de tal modo, que se favorecen las funciones que requieren energía sobre las proliferativas, a consecuencia del déficit en sustratos nutritivos. Es to coincide con lo señalado por Munro (180), en el sentido de la existencia de una prioridad de funciones esenciales para la supervivencia del animal, en detrimento de su crecimiento, cuando es so metido a malnutrición proteico-calórica.

Actualmente se piensa que el lugar de actuación de la malnutrición proteica sobre la síntesis de DNA, se verifica a nivel de la DNA polimerasa, dado que se han encontrado variaciones en su actividad en estas circunstancias (111). Sin embargo, puesto que el papel exacto de este enzima en la síntesis "in vivo" de DNA no se conoce todavía, es preciso nuevas investigaciones para dilucidar su intervención en el proceso.

### 2.3.2.- EFECTO DE LA DEFICIENCIA A CORTO PLAZO EN PROTEINAS SOBRE EL TURNOVER PROTEICO HEPATICO.

La proteína del hígado es sensible a las modificaciones en el aporte de nutrientes. Cuando la ingesta es adecuada, la velocidad de síntesis fraccional de la proteína fija se mantiene normal al mismo tiempo que la proteína total se incrementa. Esto es consecuencia, junto a la insensibilidad a la ingesta, de la síntesis de proteína fija y de la supresión en la proteólisis, lo que facilita el crecimiento del órgano.

Por consiguiente, la regulación de la cantidad de proteína endógena en el hígado, en condiciones normales de alimentación, depende de factores nutricionales y se verifica a través de la disminución en la cifra de catabolismo.



Por otra parte, la síntesis proteica no es sensible a los cambios a corto plazo, en el aporte de proteína ó energía dietaria. Así, durante pequeños períodos de inanición ó en animales sometidos a una dieta sin proteínas, Garlick ( 93) indica que la velocidad de síntesis de la proteína fija hepática, se mantiene durante períodos cortos de tiempo y que la disminución en la masa proteica que resulta, se debe al aumento en la tasa de catabolismo. Este autor llega a esta conclusión mediante medida de la síntesis proteica, por infusión constante de tirosina C<sup>14</sup>.

En este mismo sentido, Mortimore y Ward (170), estudiando la influencia del catabolismo proteico en hígado perfundido, afirman que la pérdida de proteína en este caso, también se debe al aumento de su degradación, la cual tiene lugar en ausencia de insulina y aminoácidos.

La respuesta inmediata a la deficiencia proteica ó energética a corto plazo es pues, un incremento en la tasa de catabolismo de la proteína hepática. En este período de tiempo, según Waterlow (285) la masa proteica parece actuar como reserva para facilitar el mantenimiento de la síntesis de las proteínas plasmáticas, aún cuando este efecto tiene un valor limitado, a consecuencia de que la proteína total hepática, es sólo doble que la masa de albúmina.



2.3.3.- INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA PROLONGADA EN PROTEINAS SOBRE LA SINTESIS PROTEICA DEL HIGADO.

2.3.3.1.- Efecto sobre las denominadas proteínas endógenas fijas hepáticas.

La prolongación de una ingesta pobre en proteínas, determina la disminución drástica de la proteína hepática total, puesto que la tasa normal no puede ser mantenida más que por un tiempo corto. Así, Addis (1) encuentra una pérdida del 28% en hígado de ratas después de 10 días de someterlas a una dieta sin proteínas, e indica que la deplección se verifica casi totalmente en los dos primeros días.

También en ratas proteín-deficientes, cuya dieta es adecuada en energía, Coward (54) señala una caída de un 20 a un 30% en la proteína hepática a las dos semanas de ingesta. Después de la primera semana, la pérdida se hace más lentamente, con descensos del 5% por día ó menos.

A pesar de ello, la velocidad en la síntesis de la proteína endógena se mantiene, gracias a la puesta en marcha de un fenómeno de adaptación. Entre los mecanismos puestos en juego durante esta fase, se encuentra el aumento de la velocidad de síntesis fraccional proteica, como señala Munro (179), la cual es paralela al incremento en la degradación.

También, Waterlow (285) empleando el método de infusión constante con lisina C<sup>14</sup>, señala que la síntesis proteica fraccional del hígado, en ratas con malnutrición proteica durante 10 días, ó bien sometidas a períodos de inanición por 48 horas, es igual ó mayor que las controles. Sin embargo, la prolongación de la dieta origina una disminución de la síntesis.



En el mismo sentido, Haider y Tarver (101), encuentran una relación inversa muy clara entre el contenido proteico dietario y la tasa fraccional de síntesis proteica hepática. Esta cae desde un 70% en las ratas con dietas sin proteínas, hasta un 28% en las alimentadas con una alta cantidad de este nutriente, aún cuando la relación RNA/proteína no varía en la misma proporción.

Por último, los estudios de Garlick (93) y Millward (160), utilizando tirosina marcada en infusión constante, también muestran que la tasa de síntesis fraccional de las proteínas en hígado, se mantiene a niveles control tanto con dietas bajas en proteína, en energía, como en las desprovistas totalmente de proteína.

El mantenimiento de la síntesis proteica, puede favorecer que se produzca una menor pérdida de la proteína hepática, durante un déficit prolongado. Ello podría explicarse según Garlick (93), por la existencia de un equilibrio entre la tasa de síntesis y de degradación, las cuales llevarían al turnover proteico a un nuevo equilibrio, el cual se alcanzaría durante el proceso de adaptación a la nueva situación metabólica. La disminución en el catabolismo de la proteína, parece coincidir con el momento en que la pérdida de la proteína muscular es más baja.

Además, la necesidad de conservación de la proteína corporal, ante la insuficiencia en la disponibilidad de aminoácidos, hace disminuir la degradación de los mismos a urea. Así, Santidrián (239) observa una disminución de la eliminación urinaria de urea durante la adaptación a la ingesta baja en proteína.



### 2.3.3.2.- Efecto sobre las proteínas exportables hepáticas.

En contraste con la síntesis de las proteínas fijas, la albúmina hepática sufre un claro descenso en su mecanismo de formación, a consecuencia de la malnutrición proteica prolongada.

Así, James y Hay (110) demuestran en niños malnutridos y Kirsch (123) y Waterlow (293) en ratas sometidas a dietas bajas en proteína, tasas de síntesis de albúmina menores que en ratas controladas, alimentadas con dietas balanceadas.

Este efecto parece estar determinado, según Pain (199), con la pérdida selectiva en el hígado del RNA mensajero activo, necesario en la síntesis de albúmina. El resultado es una drástica disminución de las proteínas exportables y especialmente, de la albúmina sérica en estas circunstancias (293).

Es precisamente, el decrecimiento en la síntesis hepática de las proteínas exportables, la que en un principio, condujo a confusión en el conocimiento del comportamiento del hígado frente a la malnutrición proteica.

Así, los estudios de Conde y Scornik (45) y de Morgan (165) muestran un decrecimiento en la síntesis total de proteínas hepáticas, debido a la drástica reducción en la síntesis de albúmina, la cual enmascara el resultado.

Sin embargo, los niveles de albúmina se regulan, no sólo a través de alteraciones en su síntesis, sino también mediante cambios en la degradación y en la distribución de esta proteína entre los compartimentos intra y extracelular.

A este respecto se ha demostrado, que existe en estas condiciones, una caída del catabolismo de la albúmina asociado con una hipoalbuminemia como señalan los trabajos de Kirsch (123) y

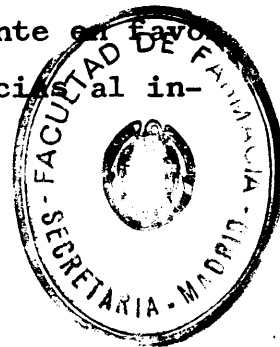


Hoffenberg (109). Los primeros, indican que la velocidad de degradación no varía durante la primera semana, pero posteriormente decrece, de forma paralela a la disminución en la síntesis.

Para explicarlo, se ha postulado la existencia de un nivel mucho más bajo en la razón cortisol/insulina que la encontrada durante la deficiencia en energía. Por ello, Millward (160) indica que no se verifica una movilización grande de aminoácidos de los tejidos periféricos (necesarios en la formación de la albúmina) y en consecuencia, las tasas de esta proteína en suero son bajas.

La deficiencia proteica determina por otra parte, según Coward (54) y Deo (70), una caída en la concentración de albúmina menor que la pérdida total de albúmina corporal. A este respecto Freeman (90) señala que ello se debe, a cambios en la redistribución de albúmina entre los compartimentos intra y extravasculares, de tal modo, que se producen reducciones en la masa de la albúmina extravascular, en una etapa temprana de la malnutrición proteica.

De lo dicho hasta aquí, se deduce que si la prolongación de la dieta deficitaria en proteínas se mantiene largo tiempo, la síntesis de proteínas exportables, disminuye drásticamente en favor del mantenimiento de la proteína endógena hepática, gracias al incremento en la síntesis de dicha proteína.



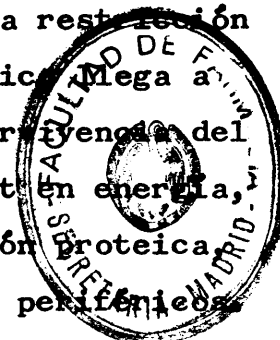
## 2.3.4.- INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA EN ENERGIA DE LA DIETA SOBRE LAS PROTEINAS HEPATICAS.

### 2.3.4.1.- Efecto sobre las denominadas proteínas endógenas fijas.

La disminución en energía en la dieta, hace necesario aportar ésta de las propias proteínas corporales. Esto se produce mediante el incremento del catabolismo en los tejidos periféricos, especialmente en el muscular, cuyos aminoácidos pueden entrar en el hepatocito por vía gluconeogénica, a formar nuevas moléculas de glucosa.

Los drásticos efectos que sobre la proteína tisular se producen en estas condiciones, fueron ya estudiados por Addis (1) quien, en ratas sometidas a inanición, observó un decrecimiento del 40% en la proteína hepática, es decir, mucho mayor que el observado bajo la influencia de una dieta sin proteínas. Esta pérdida es también observada, utilizando dietas restringidas de mayor ó menor valor proteínico. Así, Coward (54) señala que cuando la restricción calórica es muy severa, la caída en el nitrógeno hepático llega a ser del 60% respecto al control, lo que impide la supervivencia del animal. Todo ello nos señala, que el efecto del déficit en energía, tiene consecuencias mucho más graves que la malnutrición proteica, a pesar de la liberación de aminoácidos de los tejidos periféricos. A este respecto, el posible papel de los aminoácidos como protectores de la masa hepática proteica, está en discusión.

La deplección hepática en proteínas endógenas parece depender en este caso, al igual que con el déficit de proteína, de un incremento en la tasa de catabolismo, puesto que durante períodos prolongados, el déficit en energía no afecta la velocidad de síntesis fraccional proteica, la cual se mantiene a nivel normal según Millward y Bates (161).



#### 2.3.4.2.- Efecto sobre las proteínas exportables.

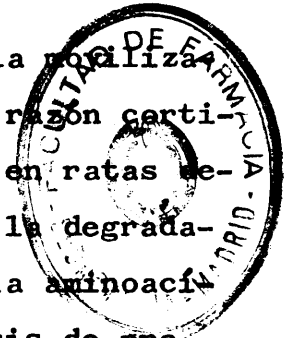
En contraste con la caída de los valores de las proteínas plasmáticas y sus fracciones durante malnutrición proteica, se ha demostrado que el déficit en energía dietaria (con el mantenimiento de una cantidad de proteína adecuada), no modifica la tasa de albúmina plasmática, cuyo valor es normal ó alto con relación a los controles.

Este dato se ha encontrado tanto en experimentos animales como en clínica humana. Así, Waterlow (293) indica, que el síndrome marásmico en malnutrición infantil, caracterizado por una deficiencia energética básica, origina una alta concentración de albúmina plasmática, a pesar de la gran reducción en la masa proteica del hígado.

La elevación de la albuminemia parece estar determinada por una incrementada liberación de aminoácidos, a partir de la degradación de la proteína muscular.

A este respecto, Millward (162) señala que la movilización muscular depende básicamente, del incremento en la razón cortisol/insulina plasmática, observada tanto en niños como en ratas deficientes en energía, la cual, induciría el aumento en la degradación de la proteína muscular. De este modo, la suplencia aminoacídica sería suficiente para permitir continuar la síntesis de proteínas exportables en el hígado.

Sin embargo, debido a que gran parte del pool de aminoácidos musculares liberados, está constituido por glutamina y alanina, los cuales sufren transformación a urea en el hígado, como indica Aoki (10) y dado además, según Lunn (142), que la relación de aminoácidos esenciales a no esenciales es normal en condiciones



de restricción energética, no es fácilmente explicable su posible utilización en la síntesis de albúmina, y por ende, los valores no modificados de esta proteína. En este sentido Lunn (142) ha sugerido, que es el patrón de aminoácidos plasmáticos más que sus concentraciones absolutas, el que tiene efecto protector.

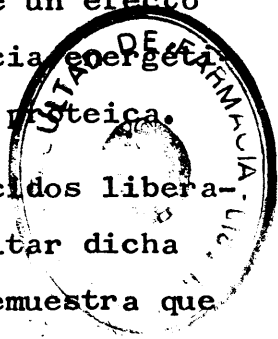
Por otra parte, también son contradictorios los datos existentes sobre las modificaciones de la síntesis de albúmina en el déficit. Así, se ha observado la disminución en la síntesis, tanto en el animal total, como indica Peters (206), como en hígado perfundido (232), mientras que Pain (198) encuentra la estabilización del proceso en la misma proporción que la síntesis proteica total hepática.

Ahora bien, a pesar de este mantenimiento de la síntesis de albúmina, la masa hepática celular no queda protegida y tiende a ser menor, e incluso mucho más pequeña que durante deficiencia proteica.

Por ello, es difícil reconciliar la idea de un efecto protector de la síntesis de albúmina durante deficiencia proteica, con la simultánea eliminación de la masa hepática proteica.

Como ya se ha visto más arriba, los aminoácidos liberados por el músculo, ofrecerían el sustrato para facilitar dicha síntesis; pero sin embargo, Prozefsky en 1976 (216) demuestra que en hombres adultos sometidos a ayuno, la cantidad de aminoácidos de cadena ramificada liberados a partir de tejido muscular, no es suficiente para cubrir las necesidades de dicha síntesis.

También Adibi (2) postula que los aminoácidos sintetizadores pueden proceder de los  $\alpha$ -cetoácidos liberados por músculo, los cuales a su vez, aparecen mediante un mecanismo de desaminación a partir de los aminoácidos ramificados. Sin embargo, no se conoce



cual es la extensión con que se produce la transaminación hepática.

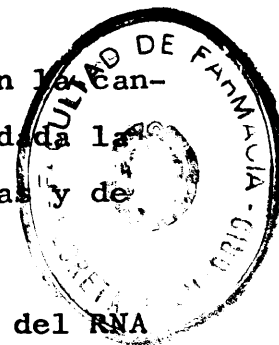
Además, no es sólo las variaciones en la síntesis de albúmina las que parecen afectarse durante deficiencia energética dietaria, sino que también parece existir un fallo marcado en la tasa del catabolismo. Además aparece una alteración en la distribución de las albúminas en los distintos compartimentos corporales, de tal modo, que se mantiene su concentración intravascular, según Millward (162) y Kirsch(123), por paso de la proteína desde el pool extravascular al intravascular. Dados los complicados mecanismos puestos en juego, en la hora actual, son precisas nuevas investigaciones para aclarar estos fenómenos.

### 2.3.5.- INFLUENCIA DE LA MALNUTRICION PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA SOBRE EL METABOLISMO DEL RNA HEPATICO.

#### 2.3.5.1.- Efectos sobre la síntesis de RNA.

Es difícil relacionar la síntesis proteica, con la cantidad y con la actividad de RNA ribosómico en el hígado, dada la dualidad en la formación de proteínas fijas citoplasmáticas y de proteínas exportables.

Existen numerosos datos acerca de la respuesta del RNA del hígado frente a diversos estados nutricionales. Una disminución en la cantidad total del mismo, ha sido descrita por Davidson (64) y Thomson (268) en estados de ayuno y por Munro (175) y Winick (306) durante deficiencia proteica. Estos últimos autores señalan que la pérdida puede llegar a ser de un 50% con respecto al valor control, después de la cual, se estabiliza. Esta deplección, según Anthony (9), indica una caída en el contenido citoplasmático celular y no la eliminación de las propias células.



De acuerdo con esta idea, Sidransky (253) y Webb (295) han comprobado en hígado de ratas con malnutrición proteica y sometidas a ayuno, una rápida disgregación de polisomas y el consecutivo incremento en la proporción de ribosomas, lo que demuestra los efectos deletéreos sobre el nucleótido.

De modo similar, Wunner (311) en hígado de ratas deficientes en triptófano y Mandel (150), también en ratas alimentadas con dietas sin proteínas, señalan la aparición de una gran proporción de ribosomas en estado libre.

Todo ello determina un cambio ultraestructural en el hígado, según Enwonwu (79), que afecta fundamentalmente al retículo endoplásmico, el cual muestra señales de destrucción.

Según Anthony (9), la disgregación de los ribosomas se relaciona con la reducción en la incorporación "in vitro" de precursores marcados sobre los mismos, en relación a controles y viene determinado, por un cambio cualitativo de los ribosomas a consecuencia de la deficiencia proteica.

En este sentido los trabajos de Enwonwu (79), señalan un incremento inmediato del catabolismo de RNA, seguido a los dos días de una disminución en la tasa fraccional, tanto de la tasa de degradación como de la síntesis del RNA. Esta disminución se corrobora, por el decrecimiento de la actividad de RNA polimerasa, señalado por Munro (181), durante cambios agudos en la dieta, así como, con un retardo en la maduración de las subunidades precursoras, las cuales reducen la tasa de síntesis de RNA ribosómico.

Por consiguiente, durante alteraciones agudas en el aporte de aminoácidos, la tasa de síntesis proteica disminuye así como la de RNA.

Por el contrario, durante malnutrición prolongada, - Waterlow (293) observa el mantenimiento de una tasa normal ó elevada en la razón RNA/proteína y lo relaciona, con niveles normales ó altos en la velocidad de síntesis proteica de las proteínas fijadas hepáticas.

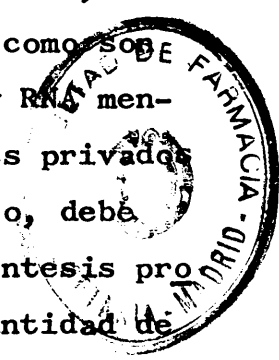
También en este sentido Schimke (244) señala, que el estado dinámico del turnover proteico en las células hepáticas, continúa constante ó se incrementa en condiciones de malnutrición.

En apoyo de este dato, los estudios de Wannemacher (279), Shaw y Fillios (246) y Lewis y Winick (135), entre otros, indican un incremento en la incorporación de precursores radiactivos, sobre el RNA de hígado de animales sometidos a deficiencia prolongada en proteínas.

Por otra parte, los estudios de Quirin-Stricker y Mandel (218) (150), además de señalar un aumento en la actividad específica del RNA total de hígado de ratas con carencia en proteínas, demuestran, que las diferentes fracciones del RNA celular, como RNA de los polisomas, RNA de transferencia, RNA nuclear y RNA mensajero, se renuevan mucho más intensamente en los animales privados de nitrógeno dietario que en los normales. A este respecto, debe recordarse que según Clifford (40) la intensidad de la síntesis proteica, depende además del aporte de aminoácidos, de la cantidad de RNA de transferencia y RNA mensajero existentes así como de factores de iniciación y reguladores tipo feed-back, determinados por la cantidad de proteína sintetizada.

Se ha sugerido (218) que dicha actividad incrementada de RNA puede deberse a dos causas fundamentales:

- 1) La existencia en la célula de diversos tipos de polisomas, con RNA mensajeros de diferente duración de vida, sobre los que la ca-



rencia nitrogenada determinaría un acortamiento vital y por ende, una renovación más rápida y

2) La modificación de la estructura de los ribosomas, determinada bien, por cambios a nivel de la fracción proteica, ó bien por defectos en el mecanismo de deslizamiento a lo largo del RNA mensajero, con lo que la estabilidad de los polisomas durante la inanición proteica, se hace menor y son rápidamente degradados y renovados.

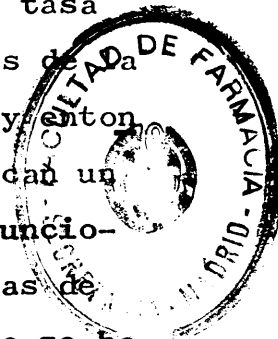
Además, esta rápida degradación del RNA ribosómico y del RNA mensajero entrañaría, según Quirin-Stricker (218), quizá por un mecanismo de retrocontrol, una estimulación de la síntesis de RNA, la cual refleja el aumento de la biosíntesis de los RNA nucleares.

Se trataría por lo tanto de una desrepresión de la biosíntesis del RNA; simultáneamente el DNA tendría un mejor "templado" y sería más accesible a la RNA polimerasa.

También Rozovski (233) confirma el aumento en la tasa total de RNA hepático durante malnutrición proteica, después de una caída inicial, la cual se prolonga hasta la tercera semana y entonces cesa el aumento. Para este autor, estos resultados indican un proceso de adaptación a la malnutrición, en donde algunas funciones indispensables se conservan (síntesis de RNA), a expensas de otras menos necesarias (crecimiento ó síntesis de DNA), como se ha indicado anteriormente.

Una vez cumplidos los requerimientos, el metabolismo de RNA vuelve a valores normales.

Esta interpretación viene apoyada por la observación de Shaw y Fillios (246) y Dallman (61) quienes encuentran un aumento en la actividad de la RNA polimerasa en hígado de ratas durante los primeros días de una dieta con un 5% de proteína. Sin embargo, cuando



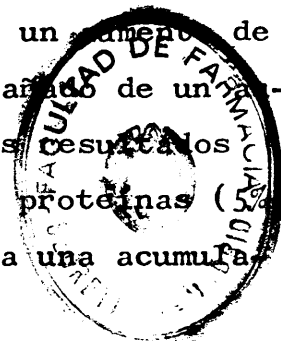
do la malnutrición se prolonga, estos parámetros vuelven a la normalidad. A los mismos resultados llegan Butterworth y Millward (30).

Asimismo, Lewis y Winick (135) encuentran una mayor captación de precursores marcados en el RNA nuclear, a consecuencia de la síntesis incrementada de RNA mediante el aumento en la transcripción del DNA. Ello significa según estos autores, que la célula regula la síntesis de RNA, a través de la regulación de la actividad de RNA polimerasa.

Llegan a esta conclusión, estudiando la síntesis del RNA ribosómico, la cual en los mamíferos, comprende una compleja serie de procesos que incluyen una transcripción y modificaciones post-transcripcionales. También Lewis (134) sugiere que este incremento en la síntesis de RNA ribosómico puede estar estimulada por el incremento simultáneo de su catabolismo.

Actualmente se piensa que los nutrientes juegan un papel importante en la regulación de la síntesis del RNA ribosómico. A este respecto Stenram (264) y Munro (178) señalan, que la ingestión de una dieta sin proteínas prolongada, produce un aumento de tamaño del nucleolo de las células hepáticas, acompañado de un aumento en el contenido de RNA nucleolar. A los mismos resultados llega Wannemacher (279) con una dieta deficiente en proteínas (5%). Por consiguiente, la manipulación dietaria determina una acumulación de RNA ribosómico en el núcleo.

Posteriormente, Lewis (135) confirma estos datos y además encuentra un aumento en la incorporación de ácido oróico ( $C^{14}$ ), tanto por el RNA nucleolar, como por el RNA nucleoplásmico de ratas alimentadas con una dieta con un 6% de caseína, durante una semana. También encuentra un incremento en el precursor RNAr45S en estas mismas ratas, lo que coincide con la elevación en la actividad de la RNA polimerasa.

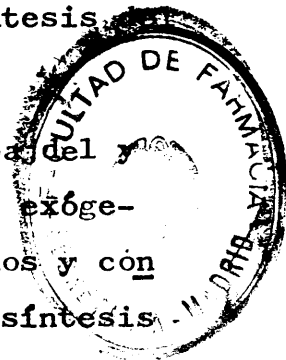


Por otra parte, sugiere que el incremento de RNA nucleolar, podría resultar de una disminución en la degradación del RNA en las ratas malnutridas. Pero sin embargo, dicha posibilidad es in compatible con el incremento en la tasa del turnover del RNA nucleolar señalada por Kawada (114), así como por la existencia de un aumento en el catabolismo del RNA, puesto de manifiesto durante el dé ficit proteico.

Por último, Lewis (135) asume la evidencia de que no só lo el procesamiento del pre-RNAr 45S es el mismo que en ratas con troles, sino que el tiempo de transporte de las subunidades desde el nucleolo al citoplasma no se altera por la malnutrición y viene determinado, por el aumento de la síntesis del RNA nucleolar.

En contraste con el RNA ribosómico, el procesamiento del RNA nucleoplásmico no es bien conocido, aunque se ha sugerido que parte del mismo, que permanece en el núcleo, puede regular la trans cripción y que jugaría un papel en la regulación de la síntesis de RNA ribosómico.

De todo lo expuesto se deduce, de acuerdo con Sadel y Jacob (235) que la síntesis de RNA es sensible a estímulos exóge nos, como son las modificaciones en el aporte de aminoácidos y con secuentemente, es un importante mecanismo para alterar la síntesis proteica.



### 2.3.5.2.- Influencia de la síntesis de proteínas exportables sobre la actividad ribosómica total.

La velocidad de síntesis fraccional proteica y la concentración de RNA, pueden no ser comparadas directamente, sin separar la tasa de síntesis que corresponde a las proteínas exportables.

Hay que tener en cuenta, de modo similar a lo que hemos señalado en relación a la síntesis de las proteínas hepáticas, que la actividad ribosómica total en los animales malnutridos, es menor que en los animales controles.

Este resultado depende de los efectos contrarios del déficit dietario, sobre los ribosomas que sintetizan la proteína endógena hepática y de aquellos que forman la proteína exportable.

Como se señaló, esta última sufre más severamente los efectos de la falta nitrogenada, por lo que la actividad de su RNA disminuye mucho, en contraste con el RNA de las proteínas fijas, que se mantiene.

Por consiguiente un valor decreciente en este mecanismo, depende de que se mida una actividad RNA total cuya disminución, sea consecuencia de la baja síntesis de proteínas plasmáticas.

En este sentido, los trabajos de Morgan y Peters (165) y de Conde y Scornik (45) señalan una caída en la actividad ribosómica del 25 al 30%, con dietas sin proteínas durante 6 y 10 días respectivamente, aún cuando otros datos (105) indican pocos cambios en las mismas circunstancias.

Para Shore y Tata (248) esta distinción en la síntesis proteica hepática, depende de la existencia de dos clases de ribosomas; los que se encuentran unidos a las membranas del retículo ergastoplásmico, responsables de la síntesis de proteínas plasmá-

ticas y los ribosomas libres, de los que depende la formación de las proteínas celulares.

El efecto desproporcionado sobre la síntesis de las proteínas exportables, puede deberse a la alteración bien de la cantidad relativa ó bien de la actividad de los ribosomas fijos.

Ya hemos indicado la disgregación producida de los ribosomas hepáticos en las ratas proteín-deficientes. Estudios en este mismo sentido, se han realizado para aclarar cómo la población de ribosomas unidos al retículo, son más sensibles al déficit nutritivo.

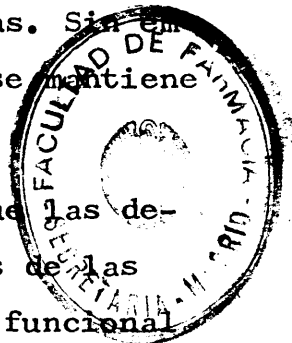
Así, Enwonwu (80) señala que se produce una rotura del retículo endoplásmico, lo que conduce a una disminución de la síntesis de las proteínas exportables.

También Gaetani (92), en ratas alimentadas sin proteínas ó con dietas bajas en energía, encuentra disgregación de los polisomas, preferentemente de la población unida a las membranas. Sin embargo, también señala que con dietas bajas en proteína, se mantiene la agregación de los polisomas.

Por consiguiente, de estos datos se deduce, que las deficiencias nutritivas afectan primordialmente la síntesis de las proteínas exportables, puesto que disminuye la actividad funcional de los ribosomas unidos al retículo, a consecuencia de su disgregación.

#### 2.3.5.3.- Efectos sobre el catabolismo del RNA.

La rápida pérdida del RNA hepático frente a un déficit proteico dietario más ó menos prolongado, no se inicia sin embargo, con las modificaciones en la síntesis del nucleótido, sino en el proceso de degradación, lo que coincide con el elevado catabolismo



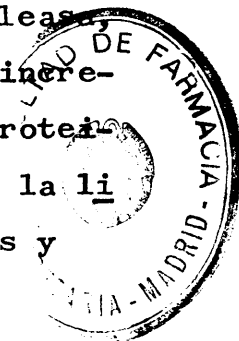
proteico antes mencionado. Así, Clark (39) indica que la rápida caída en el contenido en RNA del hígado, durante las primeras 24 a 48 horas de la ingesta de una dieta proteín-deficiente, se debe más que a una reducción de la síntesis proteica, a un catabolismo acelerado. En el mismo sentido Wunner (311) y Munro (178) llegan a la conclusión de que la cantidad total de RNA hepático, está de terminada en parte, por cambios en la velocidad de su degradación a consecuencia de las variaciones en la suplenia de aminoácidos. Asimismo, la inanición conduce según Hirsch y Hiatt (108) a una elevación en el catabolismo del RNA ribosómico, lo que determina la rápida pérdida del nucleótido.

Este aumento en la tasa de degradación del RNA, origina según Munro (177), la disgregación polisomal ya mencionada, con el resultado de la elevación de la cantidad de monosomas y la pérdida de RNA ribosómico.

Enwonwu (78) sugiere que la actividad de ribonucleasas asociada con subunidades nativas de RNA, es responsable del incremento en la degradación, puesto que durante la deficiencia proteica se acumulan estas subunidades. Simultáneamente se acelera la lisis de RNA, hasta que el equilibrio entre polisomas, monosomas y subunidades se establece de nuevo.

Sin embargo, Norman (189), indica que este mecanismo puede no explicar bien el fenómeno, puesto que durante el ayuno se acumulan ribosomas más frecuentemente que subunidades.

Para este autor (189) la degradación podría resultar, de una actividad lisosomal incrementada, fenómeno que suele ocurrir en estos estados, aún cuando actualmente no se conoce la posible interacción entre ribosomas y lisosomas. A este respecto Conde y Scornik (45) señalan, que la pérdida de RNA se produce por el aumento en su degradación, a consecuencia de un incremento en la ac-



tividad de los lisosomas, los cuales se relacionan con los ribosomas durante control dietario.

Se puede considerar por consiguiente, que el hígado presenta una respuesta bifásica a la privación proteica y al ayuno.

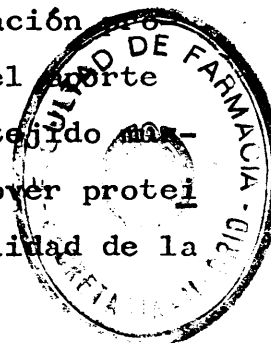
En una primera etapa se incrementa el catabolismo proteico y del RNA, mientras que se mantiene ó se reduce la síntesis, lo que conduce a la pérdida de RNA y proteína. Posteriormente, aunque la degradación sigue acelerada, la síntesis proteica se incrementa hasta compensar aquella, por lo que se alcanza un nuevo equilibrio del turnover proteico, más estable que define el mecanismo de adaptación a la deficiencia.

### 2.3.6.- IMPORTANCIA DEL CATABOLISMO PROTEICO EN LA REGULACION DEL TURNOVER DE PROTEINAS EN HIGADO. INTERVENCION DE LOS ENZIMAS LISOSOMICOS.

Es evidente de lo ya expuesto, que la degradación proteica hepática es muy sensible a las alteraciones en el aporte de aminoácidos. Se constituye así, en contraste con el tejido muscular, en el mecanismo principal de regulación del turnover proteico en el hígado, en respuesta a cualquier cantidad ó calidad de la dieta.

Existen cada vez más pruebas de la intervención de los lisosomas, como mediadores del mecanismo de regulación del turnover proteico hepático.

En hígado perfundido, Mortimore y Neely (169) señalan que el aumento en la degradación de la proteína, se acompaña de un incremento simultáneo de grandes cuerpos densos, con fragilidad somática incrementada.



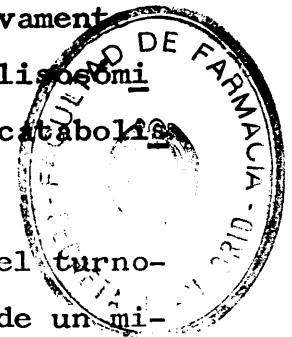
Asímismo Dean (67), describe que los lisosomas están im  
plicados en este mecanismo y demuestra la intervención de la cateps  
ina D en el hígado perfundido. También durante deficiencia proteic  
a, Pokrovsky (209) señala que el incremento en la actividad de  
los enzimas lisosómicos, principalmente catepsina, es responsable  
de la elevación en el catabolismo proteico. Además, este mismo aut  
or (209), indica que el estado definitivo de la deficiencia en prot  
eínas, puede ser denominado, como de activación marcada de un comp  
lejo enzima-lisosoma.

El mecanismo por el cual se produce la degradación prot  
eica, está para Poole y Wibo (213), determinado por una selectivid  
ad proteolítica, que resulta gracias a la afinidad en la unión de  
diferentes proteínas, con la membrana del lisosoma. Estos autores  
demuestran también, que sustancias inhibitoras de enzimas lisosó  
micos inhiben asímismo el catabolismo proteico.

Por otra parte, Ballard (15) piensa que existe un camin  
o dual, en el que los lisosomas no participarían selectivamente  
en una degradación acelerada, mientras que un sistema no lisosó  
mico selectivo actuaría colaborando con el anterior, en el catabolismo  
acelerado y durante procesos de proteolisis basal.

Millward (162) concibe que las variaciones en el turnov  
er proteico en distintos tejidos corporales, dependería de un mic  
roambiente proteolítico relativo del propio tejido, el cual puede  
ser óptimo para el papel particular que tenga el órgano en el sist  
ema.

Por ejemplo, el turnover alto del hígado requiere conc  
entraciones altas de enzimas proteolíticos, los cuales permiten  
un rápido metabolismo de las proteínas tisulares. Por consiguient  
e, para cada tejido ó tipo celular, la cifra de turnover relativo  
de cada proteína, se determina por la susceptibilidad al sistema de  
degradación.



Sin embargo, actualmente no se conoce la causa del incremento en la tasa de degradación, durante el déficit de proteínas en la dieta. Para Wannemacher (279) y Adibi (3), el mecanismo depende de la variabilidad de las concentraciones de los aminoácidos en hígado, a consecuencia de la dieta. En este mismo sentido Mortimore y Neely (169) y Woodside y Mortimore (310), han mostrado trabajando con hígado perfundido, que concentraciones altas de aminoácidos, así como la adición al medio de insulina, disminuyen el catabolismo proteico.

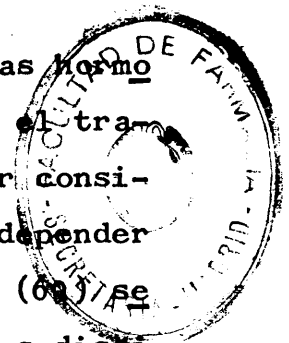
Por consiguiente un fallo en la concentración de aminoácidos ó de insulina, puede constituir la señal que incrementa la tasa de catabolismo proteico, sin afectar a la síntesis, aún cuando los resultados contradictorios obtenidos hasta ahora, hacen de este supuesto una interesante vía de investigación.

Esta regulación pues, está directamente influenciada por factores hormonales, a pesar de que el mecanismo mediante el cual se produce, no se conoce.

En la misma, parecen estar implicadas también las hormonas tiroideas, puesto que Goldberg (97) ha demostrado que el tratamiento con tiroxina estimula la proteólisis hepática. Por consiguiente, los niveles de las proteasas lisosómicas parecen depender de las hormonas del tiroides y a este respecto, De Martino (69) señala que durante tiroidectomía, los niveles de estos enzimas disminuyen un 50% en relación a los hígados de las ratas control.

Todo ello parece sugerir, que la inducción de estos enzimas, es responsable de la aceleración del catabolismo proteico y la pérdida de la proteína hepática durante el hipertiroidismo.

Por último, Mortimore (169) señala que el glucagón, junto con los niveles de insulina y aminoácidos antes mencionados, se



correlacionarían con variaciones en las propiedades de los lisosomas hepáticos, por lo que deduce la existencia de un control hormonal de la degradación proteica hepática mediada por los lisosomas.

#### 2.4.- RESPUESTA METABOLICA DEL ORGANISMO AL STRESS.

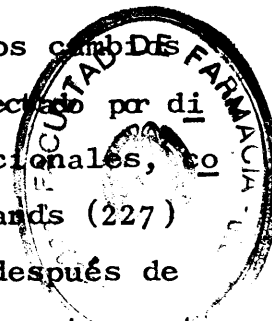
Hasta hace poco tiempo no se ha estudiado de forma sistemática, el importante papel que los factores dietéticos tienen sobre la modulación de la respuesta inmune y en consecuencia, sobre la alteración de la susceptibilidad a la infección bacteriana y a otros tipos antigénicos.

Recíprocamente, la entrada de un antígeno en el huésped, especialmente de tipo bacteriano ó el desarrollo de cualquier otro tipo de trauma, determinan alteraciones en el organismo, en especial sobre el sistema inmune y en su estado nutritivo.

En este sentido, Scrimshaw (241) señala, que las enfermedades infecciosas deplecionan los depósitos nutritivos del huésped por varias vías y recíprocamente, que los factores nutritivos influyen la susceptibilidad del huésped a la infección. Se establece pues, una compleja interacción tridimensional entre estos tres factores: nutrición, respuesta inmune e infección.

Asimismo, se han realizado estudios sobre los cambios metabólicos que se suceden en el organismo cuando es afectado por diversos tipos de stress y en diversas situaciones nutricionales, como los de Ballantyne (14) en ratas con fracturas, Richards (227) en ratas con quemaduras y Wilkinson (302) en animales después de cirugía abdominal. Todos ellos encuentran, que las respuestas metabólicas son similares a las señaladas en la reacción frente a agentes bacterianos.

Esta respuesta se caracteriza por un aumento general del metabolismo, con la aparición de un balance de nitrógeno negativo y un flujo acelerado de sustratos entre diferentes órganos, los cuales a su vez, son consecuencia de una serie de respuestas bioquímicas, metabólicas y hormonales, que inician cambios nutritivos, los



cuales varían en magnitud e importancia, en proporción a la severidad y duración del trauma ó de la enfermedad.

Una vez instaurado éste, la supervivencia frente al mismo, el cual provoca la alteración de los mecanismos homeostáticos reguladores, depende según Moore (166) de una respuesta coordinada de los sistemas cardiovascular, renal, hematológico, respiratorio, neural y endocrino, capaces de proveer de oxígeno y de los necesarios nutrientes a las células de órganos vitales. De ahí, la importancia del estado nutritivo del individuo, para lograr dicha supervivencia y la influencia que sobre la respuesta metabólica pueda tener el déficit dietario.

En el presente capítulo haremos mención especial, de los mecanismos metabólicos que se establecen en el huésped frente a la invasión por microorganismos, por ser el trauma más estudiado y del que más datos podemos obtener en la literatura actual, sin dejar de hacer constar las modificaciones determinadas por otros tipos de stress.

#### 2.4.1.- RESPUESTA METABOLICA AL STRESS EN INDIVIDUOS BIEN ALIMENTADOS.

Cuthbertson (56) dividió la respuesta metabólica al trauma, en dos fases: la primera ó temprana, en donde la vitalidad del paciente se encuentra deprimida y una segunda, de resurrección de la vitalidad, que parece semejante al período de inflamación.

Esta última fase puede considerarse, a su vez, formada de un período catabólico que dura de días a semanas y un período de anabolismo, que dura semanas ó meses en el hombre.

#### 2.4.1.1.- Respuesta catabólica al stress.

La respuesta catabólica al trauma está caracterizada, no sólo por la pérdida de peso y la debilidad general, sino también por el hipermetabolismo en reposo, el incremento de la excreción de nitrógeno, la intolerancia a los carbohidratos y una alta movilización de las grasas.

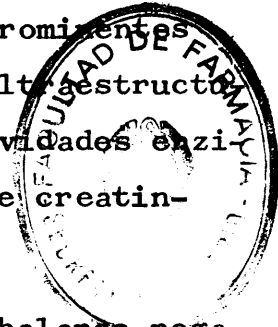
La magnitud de la respuesta catabólica parece ser generalmente proporcional a la severidad del daño celular ó del trauma tisular, como sucede según Clark (39) en individuos con quemaduras extensas, lo que constituye el ejemplo más extremo de stress hiper catabólico.

La lesión celular, masiva, inicia respuestas catabólicas secundarias, las cuales resultan en un consumo acelerado de nutrientes corporales, con deplección de la masa muscular y la pérdida absoluta de constituyentes corporales.

A este respecto, Friman (91) señala que en el músculo esquelético, se producen los cambios catabólicos más prominentes en las infecciones a corto término, con alteraciones ultraestructurales, que se acompañan de una disminución de las actividades enzimáticas en el órgano y la aparición de niveles altos de creatin-fosfoquinasa en suero.

Por otra parte, Beisel (21) indica, que el balance negativo de nitrógeno ya señalado, se puede explicar por la reducción de la ingesta dietaria, en combinación con una utilización acelerada de los aminoácidos hacia gluconeogénesis, provocada por el trauma.

Estos aminoácidos proceden de proteínas somáticas, especialmente de las musculares y sus grupos aminos se pierden en forma de amonio ó urea.

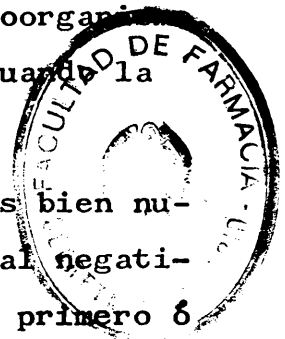


Este aumento en la excreción de nitrógeno urinario, no parece depender de un decrecimiento del anabolismo, sino del aumento en la degradación de las proteínas. Así, Reiss (225) en estudios en ratas infectadas, señala que la incorporación de aminoácidos a las proteínas, ó es normal ó está incrementada en el período álgido de la enfermedad.

En este mismo sentido Cuthbertson (56) demuestra, que la pérdida ponderal que se produce en las ratas traumatizadas, depende fundamentalmente de la pérdida de las proteínas, si bien Kinney (121) encuentra, que en estas condiciones, es la caída de la grasa corporal, el factor primordial que determina la pérdida de peso. Esta pérdida nitrogenada, que llega a ser de 20 g/día en procesos infecciosos según Beisel (22) está corroborada por la pérdida de la proteína contráctil muscular, la cual a su vez se refleja, por el incremento en 3-metilhistidina urinaria como indican los trabajos de Wannemacher (281) y Long (138). Estas respuestas catabólicas a la infección, no se inician cuando el microorganismo invade los tejidos del huésped, sino que son evidentes cuando la fiebre se ha desarrollado.

Beisel (22) en 1967 demostró que en individuos bien nutridos con infecciones experimentales, el balance corporal negativo, comienza después de la instauración febril y cesa al primero ó segundo día de que la fiebre desaparezca.

Por otra parte, la energía durante infección aguda ó después de un trauma, parece proceder también de la degradación de la proteína. Así, Cuthbertson (56) indica que la movilización de las grasas, no puede proporcionar fragmentos de dos carbonos para la síntesis de carbohidratos intermediarios, como son piruvato y glucosa. Por ello, la formación de nueva glucosa debe depender, en gran manera, de la degradación de la proteína corporal, particularmente de la muscular.



De acuerdo con esto, Kinney (121) señala que en los mamíferos pequeños y el hombre, durante el trauma, hay un continuo requerimiento de intermediarios de carácter carbohidrato con fines sintéticos, para lo cual la deaminación de aminoácidos es la principal fuente endógena.

También Beisel (22) señala, que la energía derivada de los depósitos grasos, no parece incrementarse y que la capacidad del hígado para producir cetonas, a partir de ácidos grasos como fuente de energía alternativa, también se reduce durante infección aguda.

#### 2.4.1.2.- La respuesta anabólica al stress. Puesta en marcha de los mecanismos de defensa.

Aunque el efecto nutritivo más visible de cualquier stress sobre la composición corporal, es de tipo catabólico, aparece concomitantemente una actividad anabólica proteica acelerada.

Esto se debe, a que los mecanismos defensivos empleados por el huésped para prevenir ó eliminar el antígeno, dependen de aspectos moleculares básicos de las células, relacionados especialmente con la síntesis de proteínas.

Así, Suskind (265) señala que todos los mecanismos de defensa del huésped, requieren síntesis de nuevas proteínas.

Muchas variedades de proteínas son necesarias para la creación de células que como linfocitos, macrófagos y neutrófilos, intervienen en los procesos inmunitarios así como, para la formación de organelas especializadas imprescindibles para su desarrollo. A este respecto, en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (236) hemos encontrado en timo y bazo de ratas inmunizadas

a eritrocitos isólogos y alimentadas con dieta stock, una serie de cambios estructurales y funcionales, entre los que destacan, el incremento en tamaño y en la actividad fagocítica de las células macrofágicas, así como de la transformación blástica de los linfocitos a inmunoblastos, lo que requiere una activa síntesis proteica.

Por otra parte, se requieren proteínas citoplasmáticas para reparar los tejidos dañados. Así, pueden ser sintetizados en las células apropiadas, enzimas intracelulares que dan lugar a cambios moleculares, que son esenciales en las respuestas metabólicas secundarias a los procesos infecciosos. En este sentido, también en nuestro laboratorio (273), se han encontrado alteraciones enzimáticas en los tejidos linfoides, las cuales facilitan la adaptación metabólica de los mismos frente al antígeno, para llevar a cabo una buena respuesta inmunológica; por ejemplo, podemos destacar un acusado incremento en la glicolisis anaerobia en bazo de ratas inmunizadas a eritrocitos isólogos.

Además, otras proteínas pueden ser sintetizadas en los fluidos corporales, como las inmunoglobulinas, las glicoproteínas reactivas de fase aguda, algunas hormonas proteicas y varios componentes de los sistemas del complemento y de la coagulación, las cuales intervienen en procesos especializados, rando en la respuesta al stress.

Por consiguiente, es necesario aumentar la actividad anabólica celular y la capacidad molecular para síntesis proteica, para contribuir a la supervivencia.

El hígado tiene según Sobocinski (256) un importante papel anabólico en la defensa del huésped, a través de su producción de enzimas hepáticos intracelulares y una gran variedad de proteínas plasmáticas, como las lipoproteínas, ó la proteína C reactiva. Asimismo Beisel (22) indica que el hígado, también provee sustratos



a otras células corporales, para utilizarlos como fuente de energía y además facilita la captación de hierro y zinc.

Estas reacciones anabólicas son paralelas a la degradación proteica y se deben según Powanda (214), a que las células corporales utilizan los sustratos que les quedan, en producir productos fundamentales en el desarrollo de sus prioridades funcionales, que se realizan al mismo tiempo en que se incrementan las pérdidas de muchos elementos constituyentes del cuerpo.

Estos cambios funcionales parecen ocurrir como respuestas fisiológicas corporales y son manifestadas a menudo, por la redistribución de nutrientes esenciales dentro de los pools corporales, ó por el reordenamiento de prioridades, las cuales regulan la entrada de nutrientes en algunas vías metabólicas.

#### 2.4.2.- EL PAPEL BASICO DEL HIGADO EN LAS RESPUESTAS METABOLICAS AL STRESS.

Es muy reciente, la evidencia del importante papel que tiene el hígado en la nueva dirección que toman las funciones metabólicas corporales, como respuesta secundaria a stress por enfermedades infecciosas. Por ejemplo, Wannemacher (282) señala, que el triptófano se incrementa y se metaboliza por la vía de la kinurenina en las células hepáticas durante estos procesos.

Entre estas respuestas se encuentran, la acelerada captación hepática de aminoácidos y de metales como hierro y zinc desde el suero y la reorientación de los procesos de síntesis proteica para la producción de las ya mencionadas glicoproteínas reaccionantes de fase aguda.

También Tilstone y Cuthbertson (269) encuentran un consumo disminuído de oxígeno en el hígado durante el trauma, lo que

haría disminuir la síntesis de proteínas sensibles al mismo, sin afectar la formación incrementada de proteínas reaccionantes que deben intervenir en la respuesta.

También en el curso de un trauma quirúrgico Liu y Newhaus (136) observan que el incremento de la síntesis de glicoproteína es paralelo al aumento en la agregación de polisomas, lo que coincide con una elevada captación de aminoácidos por los microsomas hepáticos.

Estos investigadores sugieren que el trauma estimula la síntesis de nuevos RNA ribosómico y RNA mensajero, lo que conduce a una síntesis proteica incrementada.

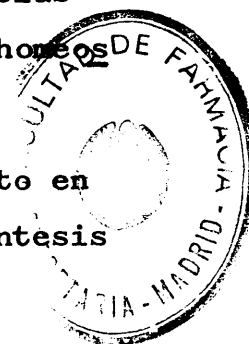
Por otra parte, Young y Huang (312) llegan a la conclusión de que en estos procesos, existe una depresión general de la síntesis proteica en músculo, mientras que puede estar incrementada en el hígado.

Simultáneamente, el hígado está sujeto a influencias hormonales múltiples, las cuales dan lugar a cambios en la homeostasis de los carbohidratos.

Así, Long (137) indica la existencia de un aumento en la degradación del glucógeno hepático a glucosa y de una síntesis acelerada de nueva glucosa en los hepatocitos.

Entre los sustratos para la gluconeogénesis, este mismo autor (137) incluye lactato, piruvato y algunos aminoácidos, especialmente alanina y glutamina los cuales, son liberados en grandes cantidades desde el músculo esquelético, a consecuencia de los cambios catabólicos en las proteínas contráctiles actina y miosina.

También los mecanismos moleculares del hígado, relacionados con los lípidos, se alteran durante infección, entre los que destacan la liberación hepática de lipoproteínas y aquellos que regulan tanto la degradación como la síntesis de las grasas.



2.4.2.1.- Comparación entre la adaptación a la inanición y la respuesta metabólica a la infección aguda.

A pesar de la complejidad de los cambios inducidos por la infección sobre el metabolismo de aminoácidos y de proteínas, Wannemacher (282), ha tratado de estimar las cifras del metabolismo proteico de órganos clave del organismo y compararlos, con las variaciones que tienen lugar a consecuencia de la inanición.

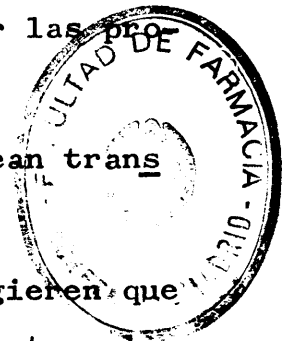
Un adulto que esté adaptado al ayuno pierde aproximadamente 4 mg de nitrógeno por orina diarios. Este nitrógeno es derivado del catabolismo de aproximadamente 25 g de proteína corporal, de los que unos 20 g del total, proceden de músculo esquelético.

En estas condiciones, se conservan tanto la proteína como los aminoácidos, ya que los depósitos de grasa pueden proveer las necesidades energéticas del metabolismo, a través de la conversión hepática de ácidos grasos en cetonas, según señala Owen y Reichard (197), las cuales, sirven directamente como combustible celular. De esta manera, el organismo puede conservar sus pools de proteínas lábiles y mantener su capacidad para sintetizar las proteínas leucocitarias y viscerales más importantes.

De aquí que solamente unos 15 g de proteína sean transferidos a glucosa cada día por el hígado y los riñones.

Estudios recientes de Sherwin y col. (247) sugieren que los sustratos, particularmente las cetonas, pueden suministrar la señal para el ahorro proteico en tejido muscular. Por ello, las cetonas parecen tener un papel doble en la última fase de la inanición, sirviendo tanto de sustrato como de "señal".

La insulina puede jugar también un papel importante, favoreciendo el efecto ahorrativo de la proteína, ya que la degradación proteica se acelera en la hipercetonuria de la acidosis diabética.



tica severa.

En contraste con esto, durante infección aguda no se suprime la excreción de nitrógeno urinario y grandes cantidades de proteína muscular y de piel, son degradadas. Hay un turnover acelerado de proteínas leucocitarias y una rápida síntesis de globulinas reactivas de fase aguda en el hígado.

Además, las proteínas contráctiles del músculo esquelético sirven, como hemos indicado más arriba, como el mayor pool de proteínas lábiles que pueden ser usadas como fuente de aminoácidos, para las necesidades corporales, entre ellas, proveer de energía metabolizable al organismo durante infección.

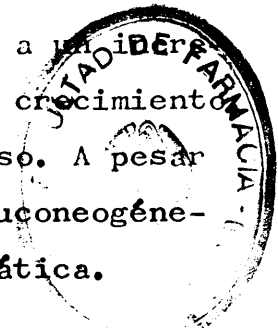
Así, en una enfermedad moderadamente catabólica, aproximadamente 75 g de proteína muscular esquelética puede ser degradada cada día, para la utilización de los aminoácidos como primer sustrato en la síntesis de glucosa por el hígado.

Ello se debe a que la respuesta inicial del huésped, es un consumo incrementado de glucosa por las células corporales periféricas y una producción alta de glucosa hepática.

Según Ryan (234) y Long (137), ello se debe a un aumento en las tasas plasmáticas de glucagón, hormona de crecimiento, glucocorticoides, catecolaminas e insulina en el proceso. A pesar de la elevación de los niveles de insulina, la gluconeogénesis acelerada conduce a un aumento de la glucosa plasmática.

A este respecto, Clowes en 1976 (42) demuestra, que en estados sépticos, existe una menor captación de glucosa por el músculo esquelético a pesar de la presencia de hiperglicemia e hiperinsulinemia.

Este mismo autor (41) sugiere que la "resistencia a la insulina" por parte del músculo, con la disminución de su lipólisis



y niveles bajos de ácidos grasos libres, daría lugar a un déficit en la combustión del tejido muscular, con disminución de la producción de energía.

Además, la pequeña cantidad de glucosa que es metabolizada en el músculo no es completamente oxidada. Según Clowes (41), gran parte es degradada a lactato, aún en presencia de una irrigación adecuada y con consumo normal de oxígeno.

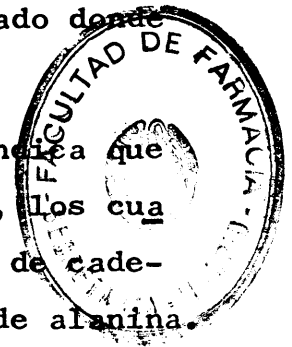
Por otra parte, la grasa no puede ser utilizada como fuente energética efectiva por el músculo "insulin resistente", debido a la reducción en la liberación de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos, ya enumerada.

Esta caída en la producción de energía es compensada por una oxidación directa de los aminoácidos musculares de cadena ramificada como leucina, valina e isoleucina, derivados de su propia estructura proteica.

Según Odessey en 1974 (192), esto conduce a la transaminación de estos aminoácidos a piruvato, el cual genera niveles incrementados de alanina en sangre, la cual junto al exceso de lactato, glicerol y otros aminoácidos, son captados por el hígado donde entran en la formación de nueva glucosa.

De acuerdo con esto, O'Donnell (193) también indica que los sustratos utilizados, son aminoácidos gluconeogénicos, los cuales, a su vez, derivan de la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada en el músculo y la subsiguiente liberación de alanina.

Por otra parte, a este cambio metabólico general hay que añadir la de la propia lesión. Así, Wilmore (305) ha demostrado, que se produce también lactato a través del metabolismo anaerobio de la lesión, ya que en pacientes no infectados pero lesionados, la mayor parte de la glucosa hepática va al área traumatizada. Sin em-



bargo, la razón para el incremento en la tasa de glucosa después del trauma, permanece sin determinar actualmente.

#### 2.4.3.- ASPECTOS METABOLICOS DE LA INFECCION CRONICA.

Las respuestas metabólicas que acompañan la transición desde una enfermedad aguda a su fase subaguda ó crónica, es poco conocida, al igual que las de naturaleza cualitativa ó cuantitativa que estas respuestas pueden desarrollar en individuos malnutridos.

En general en procesos crónicos, la cantidad de nitrógeno corporal perdido disminuye progresivamente cada día. Se establece eventualmente, un nuevo estado de equilibrio metabólico con una predominante caquexia, en donde predominan la deplección de las proteínas lábiles y los depósitos lipídicos corporales.

Para Beisel (22) además de estas alteraciones, aparece un metabolismo basal disminuido (en ausencia de fiebre), al que acompañan, la caída de la tasa de la secreción hormonal de tiroxina y corticosteroides, lo que conduce a una depresión del crecimiento y de la maduración tisular.

#### 2.4.4.- INFLUENCIA DE LA MALNUTRICION EN LA RESPUESTA AL TRAUMA O LA INFECCION.

El efecto negativo que los déficits en el estado nutricional tienen sobre los procesos infecciosos ó el stress en general, ha sido señalado por numerosos investigadores. Así, Ratcliffe y Merrick (220) indican que la infección por Mycobacterium tuberculosis en el hamster, progresa más rápidamente con un 6% de proteína en la dieta, que con un 30%. Asimismo, Rao y Gopalan (219) encuen-

tran que el balance de nitrógeno se hace inmediatamente positivo en cobayas con tuberculosis, alimentados con un 18% de proteína, en relación a los que tienen un nivel del 5% en este nutriente.

Por otra parte, Siegel (254) estudiando el efecto del nivel proteico dietario sobre la tuberculosis de las aves, señala que las dietas bajas en proteína, conducen a la pérdida de peso corporal así como, al incremento en el peso de bazo e hígado. Sin embargo, demuestra que los niveles excesivamente altos de proteína, también afectan de forma adversa la respuesta a la enfermedad.

Asimismo, Mc Guire (147) en ratas alimentadas con una proporción muy baja de proteína dietaria, encuentra una menor resistencia a *Salmonella typhimurium* y que este efecto, se relaciona con un incremento de las pérdidas urinarias de nitrógeno, comparadas con ratas malnutridas pero no infectadas. Sin embargo, en relación a la dieta control, los valores son significativamente menores.

La mayor capacidad de resistencia a la infección por parte de los animales bien alimentados señalada por Newberne (188), puede explicarse parcialmente, a través de los resultados de los estudios de Young (313), el cual observa que el metabolismo proteico del músculo esquelético de ratas infectadas y alimentadas con dietas bajas en proteína, es diferente de las controles infectadas.

Así, indica que ya que el músculo esquelético es la principal fuente de proteína durante el stress, puesto que proporciona aminoácidos para la síntesis proteica y como fuente de energía y como la infección deprime la síntesis proteica ribosómica, quizás, haya menos cantidad de proteínas y aminoácidos capaces de ser usados en un momento crítico, en los mecanismos defensivos en animales previamente malnutridos.

Por ello, los cambios en la cantidad de proteína lábil

corporal, que se producen a consecuencia de existir diferentes niveles de proteína en la ingesta, condicionan las pérdidas urinarias de nitrógeno, consecutivas a un trauma.

Esto se debe, a que dichas pérdidas urinarias dependen del depósito de proteína lábil corporal.

A este respecto, Munro y Cuthbertson ( 173 ), en ratas sometidas a una dieta sin proteína antes de una fractura, señalan que no aparece el incremento de nitrógeno urinario característico del trauma.

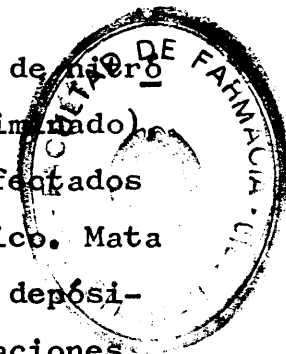
Posteriormente, también Munro (174 ), muestra que la pérdida adicional urinaria de nitrógeno después del trauma, es proporcional a los niveles pretraumáticos.

En el mismo sentido, individuos con malnutrición proteico-calórica, que adquieren una enfermedad séptica, pueden responder con pérdidas de nitrógeno corporal proporcionalmente menores.

Sin embargo, a pesar de ello, Mata (152) indica que la caída de masa corporal, puede ser sustancialmente mayor que la encontrada en los pacientes bien nutridos.

El hecho de que se pierdan muy pocas cantidades de nitrógeno (después de que el pool de proteínas lábiles se ha eliminado), no puede hacernos pensar que los huéspedes malnutridos, infectados crónicamente, se encuentran en un favorable estado metabólico. Mata (152) señala de acuerdo con ello, que la deplección de los depósitos de proteínas lábiles es un signo peligroso, con implicaciones potencialmente graves, ya que la pérdida de las fuentes de nitrógeno no movilizable, hacen que la capacidad funcional para responder a complicaciones adicionales sea inadecuada.

Por consiguiente, en pacientes con deficiencia proteica, las pérdidas de nitrógeno corporal no están ligadas directamente a



la presencia de fiebre en el proceso infeccioso.

Sin embargo, algunos fenómenos anabólicos, como la formación de nuevas proteínas, se producen igualmente en presencia de una deplección proteica y/o calórica, como indica Pawardhan (204) y Cockerell (43).

También se ha postulado que la producción de proteínas de fase aguda puede ser responsable, al menos parcialmente, de la disfunción de la homeostasis en kwashiorkor. En niños con este síndrome, se encuentran altos niveles de  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina y la razón de  $\alpha_1$ -antitripsina a albúmina es también elevada. Dado que ambas proteínas son inhibidoras de proteinasas, Schelp (242), insinúa que la producción de los mismos en niños malnutridos, puede determinar la disminución del catabolismo proteico muscular. Ello resultaría en una movilización inadecuada de aminoácidos endógenos, los cuales, son necesarios para mantener la síntesis proteica hepática.

Por consiguiente las infecciones, en los niños subnutridos pueden precipitar la aparición de los síntomas de kwashiorkor, cerrando así el circuito nutrición-infección-inmunidad.

### 3.- MATERIAL Y METODOS



### 3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.1.1.- ESTUDIO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA EN LA DIETA.

##### EXPERIMENTO 1.

##### - Lote 1.1.: Lote CONTROL TESTIGO

Dieta BALANCEADA (10% protefna)

10 ratas Wistar machos

Edad: 60 días

Peso inicial aproximado: 135 g

Período de ingesta: 30 días

Administración (v.i) de solución salina fisiológica estéril en dosis de 0,5 ml/100 g peso, en el día 20 del estudio.

Sacrificado a los 30 días

Toma de muestras: hígado, sangre y orina.

##### - Lote 1.2.: Lote PROTEIN-DEFICIENTE TESTIGO

Dieta DEFICIENTE EN PROTEINA (1% protefna), e isocalórica con la dieta balanceada

10 ratas Wistar machos

Edad: 60 días

Peso inicial aproximado: 135 g

Período de ingesta: 30 días

Administración (v.i) de solución salina fisiológica estéril en dosis de 0,5 ml/100 g peso, en el día 20 del estudio

Sacrificado a los 30 días

Toma de muestras: hígado, sangre y orina.



- Lote 1.3.: Lote RESTRINGIDO TESTIGO

Dieta RESTRINGIDA: Dieta balanceada, ingerida en un 50% de la del lote control.

10 ratas Wistar machos

Edad: 60 días

Peso inicial aproximado: 135 g

Período de ingesta: 30 días

Administración (v.i) de solución salina fisiológica estéril en dosis de 0,5 ml/100 g peso en el día 20 del estudio

Sacrificado a los 30 días

Toma de muestras: hígado, sangre y orina.

Para el estudio del efecto de la deficiencia proteica, se comparan los resultados obtenidos en los lotes TESTIGOS: 1.1. (CONTROL) y 1.2. (PROTEIN-DEFICIENTE).

Para el estudio del efecto de la deficiencia en proteínas y calorías se comparan los resultados obtenidos en los lotes TESTIGOS: 1.1. (CONTROL) y 1.3. (RESTRINGIDO).



3.1.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACION DEL ANTIGENO EN  
LOS ANIMALES SOMETIDOS A LOS DISTINTOS NIVELES DIETARIOS  
ESTUDIADOS.

EXPERIMENTO 2.

- Lote 2.1.: Lote CONTROL ESTIMULADO

Dieta BALANCEADA (10% protefna)

10 ratas Wistar machos

Edad: 60 días

Peso inicial aproximado: 135 g

Período de ingesta: 30 días

Administración (v.i) de eritrocitos de car-  
nero(SRBC) en dosis de  $15,5 \times 10^8$  SRBC/0,5  
ml solución salina/100 g peso en el día 20  
del estudio

Sacrificado a los 30 días

Toma de muestras: hígado, sangre y orina.

- Lote 2.2.: Lote PROTEIN-DEFICIENTE ESTIMULADO

Dieta DEFICIENTE EN PROTEINA (1% protefna),  
e isocalórica con la dieta balanceada

10 ratas Wistar machos

Edad: 60 días

Peso inicial aproximado: 135 g

Período de ingesta: 30 días

Administración (v.i) de SRBC en dosis:  $15,5$   
 $\times 10^8$  SRBC/0,5 ml solución salina/100 g peso  
en el día 20 del estudio

Sacrificado a los 30 días

Toma de muestras: hígado, sangrè y orina.



- Lote 2.3.: Lote RESTRINGIDO ESTIMULADO

Dieta RESTRINGIDA: Dieta balanceada, ingerida en un 50% de la del lote control

10 ratas Wistar machos

Edad: 60 días

Peso inicial aproximado: 135 g

Período de ingesta: 30 días

Administración (v.i) de SRBC en dosis:  $15,5 \times 10^8$  SRBC/0,5 ml solución salina/100 g peso en el día 20 del estudio

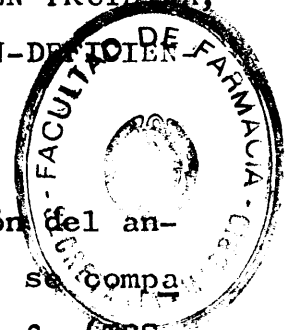
Sacrificado a los 30 días

Toma de muestras: hígado, sangre y orina.

Para el estudio del efecto de la administración del antígeno en los animales alimentados con dieta BALANCEADA, se comparan los resultados obtenidos en los lotes CONTROLES: 1.1. (TESTIGO) y 2.1. (ESTIMULADO).

Para el estudio del efecto de la administración del antígeno en los animales alimentados con dieta DEFICIENTE EN PROTEINA, se comparan los resultados obtenidos en los lotes PROTEIN-DEFICIENTES: 1.2. (TESTIGO) y 2.2. (ESTIMULADO)

Para el estudio del efecto de la administración del antígeno en los animales alimentados con dieta RESTRINGIDA, se comparan los resultados obtenidos en los lotes RESTRINGIDOS: 1.3. (TESTIGO) y 2.3. (ESTIMULADO).



### 3.2.- DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS

Los animales utilizados, ratas Wistar machos de 21 días de edad, proceden del criadero del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de Madrid.

Se mantienen con dieta stock de laboratorio, hasta que alcanzan un peso medio de 135 g aproximadamente, momento en el cual son agrupadas dependiendo de la dieta a ingerir, de acuerdo con la descripción de nuestro diseño experimental. La composición de las dietas utilizadas se relaciona en el siguiente apartado.

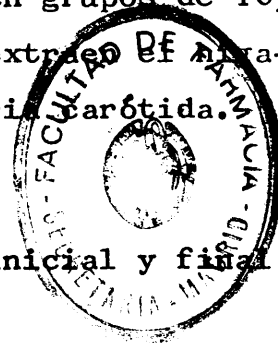
La experiencia transcurre con las ratas instaladas en jaulas individuales, dispuestas para la recogida de orina, no contaminada, las cuales se ubican en una habitación iluminada de 8 a 20 horas y mantenida a 23° C.

A lo largo del estudio (30 días), el agua es suministrada "ad libitum" y la cantidad de alimento ingerido es controlada diariamente a lo largo de la experiencia y la orina se recoge en el último día del estudio, a los 30 días.

Los animales son pesados y sacrificados en grupos de 10, entre las 9 y las 12 horas del día. Previamente se extrae el hígado y la sangre, ésta mediante canulación de la arteria carótida.

Los parámetros estudiados son:

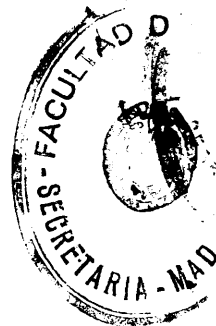
- a) En animal total: Ingesta y peso corporal (Pesos inicial y final e incremento de peso).
- b) En homogenados de hígado: Peso hígado, peso hígado/peso corporal ó índice hepato-somático), proteínas solubles, las tasas de los nucleótidos DNA y RNA, las fracciones correspondientes al DNA (proteína/DNA, tamaño celular y número de núcleos), las fracciones correspondientes al RNA (RNA/proteína y RNA/DNA), las actividades en



zimáticas DNasa, RNasa, fosfatasas alcalina y ácida,  $\beta$ -glucuronidasa, GOT, GPT y GDH.

c) En plasma: Proteínas totales y sus fracciones albúmina,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -globulinas.

d) En orina: Urea.



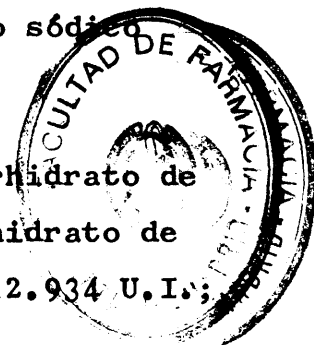
### 3.2.1.- COMPOSICION DE LAS DIETAS UTILIZADAS<sup>1</sup>

INGREDIENTES	BALANCEADA % (s.s.s.)	DEFICIENTE % (s.s.s.)
Caseína	10,53	0,83
D,L-metionina	0,23	0,23
Azúcar	33,92	38,77
Almidón	33,92	38,77
Celulosa	8,00	8,00
Aceite de oliva	3,91	3,91
Corrector mineral <sup>2</sup>	4,50	4,50
Corrector vitamínico <sup>3</sup>	5,00	5,00

<sup>1</sup>Según Mitchell (163)

<sup>2</sup>El corrector mineral contiene (g/100 g dieta): Cloruro sódico 0,7370; Fosfato monocálcico.H<sub>2</sub>O 1,9698; Bicarbonato potásico 1,4713; Carbonato magnésico 0,2546; Sulfato ferroso.7H<sub>2</sub>O 0,0623; Sulfato magnésico 0,0079; Fosfato dipotásico 0,4824; Sulfato cúprico.5H<sub>2</sub>O 0,0011; Sulfato aluminico potásico.12H<sub>2</sub>O 0,0005; Ioduro potásico 0,0040; Carbonato de zinc 0,0003; Fluoruro sódico 0,0005.

<sup>3</sup>El corrector vitamínico contiene (g/100 g dieta): Clorhidrato de tiamina 0,075; Riboflavina 0,010; Niacina 0,100; Clorhidrato de piridoxina 0,010; Pantotenato cálcico 0,015; Retinol 12.934 U.I.; Ergocalciferol 43.200 U.I.



El control de la composición de las dietas se realiza por medio de las técnicas de rutina, determinando nitrógeno total, (Kjeldahl) (202), grasa (Soxhlet) (26), humedad y cenizas.

### 3.3.- DETERMINACIONES ANALITICAS

#### 3.3.1.- PREPARACION DE MUESTRAS

Para la realización de las determinaciones analíticas, el hígado inmediatamente después de su extracción, es ultracongelado por inmersión en un vaso de Dewar que contiene nitrógeno líquido a una temperatura de  $-130^{\circ}$  C.

Después de pesado se suspende en una solución tampón a  $0^{\circ}$  C, a pH 7,4, constituida por ClNa 0,1 M y  $\text{CO}_3\text{HNa}$  0,005 M en una proporción del 20% (W/V). Posteriormente, se homogeniza en un homogenizador ultraturax a 20.000 U/minuto durante 15 segundos.

El homogenado se centrifuga a 550 xg durante 15 minutos y el sobrenadante, se introduce en baño de hielo para impedir las pérdidas enzimáticas. Partes alícuotas de estos sobrenadantes se utilizan para las determinaciones analíticas.



### 3.3.2.- APARATOS UTILIZADOS

La homogenización del hígado para determinar las actividades enzimáticas se ha efectuado en un homogenizador Ultraturrax Janke & Kunkle K.G.

La homogenización del hígado para determinar los ácidos nucleicos, se ha realizado mediante un potter Elvehjen con pistilo de teflon.

La centrifugación se lleva a cabo en una centrífuga refrigerada "MSE high speed 18".

Las pesadas se realizan en balanza eléctrica de precisión "Mettler" y en balanza August Sauter.

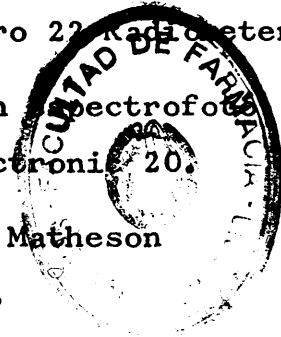
Los ajustes de pH se hicieron en un pHmetro 22 Radiometer.

Las actividades enzimáticas, se leyeron en espectrofotómetros Perkin-Elmer y Zeiss y un fotocolorímetro Spectronic 20.

Los agitadores magnéticos son de la marca Matheson Scientific y los agitadores mecánicos de Whirlimixer.

El medidor de electroforesis es Esaton.

Las incubaciones se han efectuado en un baño con agitador Atom, modelo T-tronic 135.



### 3.3.3.- TECNICAS UTILIZADAS

#### 3.3.3.1.- Determinaciones en homogenados de hígado

##### 3.3.3.1.1.- Proteínas.

Se utiliza el método colorimétrico de Lowry (139).

#### FUNDAMENTO:

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

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

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

#### TECNICA:

A 0,1 ml de homogenado diluido al 1/10 (V/V), se añaden 5 ml de reactivo cupro-alcalino ( $\text{CO}_3\text{Na}$  al 2% en NaOH 0,1 N y  $\text{SO}_4\text{Cu}$  al 0,5% en tartrato sódico-potásico al 1%).

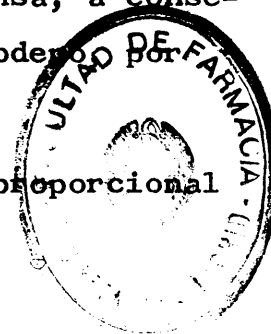
A los 20 minutos se adicionan 0,5 ml de reactivo fenol.

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

#### CALCULOS:

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

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



3.3.3.1.2.- Deoxiribonucleasa ácida (Deoxiribonucleato-3'-nucleótido hidrolasa E.C. 3.1.4.6.)

El método utilizado es el de Mc Donald modificado (146).

FUNDAMENTO:

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

Su actuación sobre las cadenas de ácido deoxiribonucleico, 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.

TECNICA:

Se utiliza como sustrato 1,25 mg de DNA de tornera tipo I al 0,05% en solución buffer de acetato sódico 0,1 M a pH 5,0 y 39 mmol de  $SO_4$  Mg en un volumen final de 3 ml. La reacción se lleva a cabo a 37° C.

El DNA no digerido, se precipita con 1,25 mg de acetato de uranilo al 0,25% en ácido perclórico al 60%.

Las mezclas de ensayo se mantienen 15 minutos a 0° C y se centrifugan posteriormente durante 20 minutos.

La absorción de los oligonucleótidos liberados se miden a 260 nm.

CALCULOS:

Los resultados se llevan a una curva de calibración construida con soluciones patrón de DNasa ácida.



Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de solubilizar una unidad de absorción a 260 nm de nucleótido por minuto a 37° C.

La actividad específica del enzima se expresa en unidades relacionadas a mg de proteína y a órgano total.

3.3.3.1.3.- Ribonucleasa ácida (Ribonucleato pirimidín-nucleótido-2' transferasa ciclizante E.C. 2.7.7.16).

El método utilizado es el de Lazzari modificado (131).

#### FUNDAMENTO:

El enzima ribonucleasa estudiada 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.

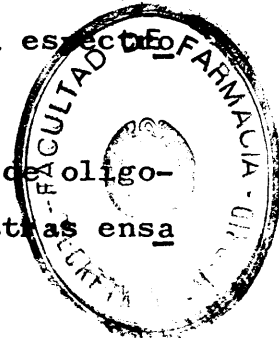
Las lecturas son proporcionales a la cantidad de oligonucleótidos, y ésta a la actividad enzimática de las muestras ensayadas.

#### TECNICA:

Para un volumen de 1 ml se mezclan 10 mg de sustrato de RNA tipo XI al 1%, en solución tampón de acetato sódico 0,1 M a pH 5,0 con 0,2 ml de homogenado y se completa el volumen con tampón acetato 0,1 M. La reacción se lleva a cabo a 37°C.

El RNA no digerido se precipita con 1,25 mg de acetato de uranilo al 0,25% en perclórico del 60%.

La mezcla del ensayo se mantiene 2 horas a 0° C y se centrifuga posteriormente durante 20 minutos.



La absorbancia de los oligonucleótidos liberados se lee a 260 nm.

#### CALCULOS:

Los resultados se llevan a una curva de calibración, construida con soluciones patrón de RNasa ácida.

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

La actividad específica del enzima se expresa en unidades en relación a órgano total y en miliunidades en relación a mg de proteína.

#### 3.3.3.1.4.- Fosfatasa alcalina (Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa E.C. 3.1.3.1.)

El método utilizado es el de Besey modificado

#### FUNDAMENTO:

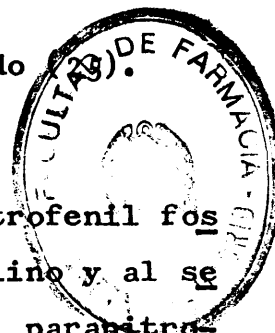
Se basa en utilizar como sustrato el paranitrofenil fosfato. La fosfatasa hidroliza el sustrato en medio alcalino y al separarse el grupo fosfato, se mide colorimétricamente el paranitrofenol liberado, cuyo color es proporcional a la actividad de fosfatasa.

#### TECNICA:

5,5  $\mu$ M de p-nitrofenil fosfato en 50 mM de tampón glicina a pH 10,5, se llevan a un volúmen de 1,1 ml con la prueba.

El ensayo se realizó a una temperatura de 37° C.

La actividad enzimática específica, se expresa en micro moles de p-nitrofenol liberado por minuto, después de la adición de NaOH 0,02 M.



La absorbancia de este producto se determina a 405 nm.

CALCULOS:

Los resultados se llevan a una curva de calibración, construida con p-nitrofenol a diferentes concentraciones.

La actividad específica del enzima se expresa en  $\mu\text{mol}/$  órgano total y en  $\text{nmol}/\text{mg}$  de proteína.

3.3.3.1.5.- Fosfatasa ácida. (Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa E.C. 3.1.3.2.)

El método utilizado es el de Besey modificado (25).

FUNDAMENTO:

Se basa en utilizar como sustrato el p-nitrofenil fosfato, que se desdobra mediante la fosfatasa en fosfato y p-nitrofenol, en medio ácido. La intensidad del color amarillo obtenida por la liberación del p-nitrofenol, es proporcional a la concentración de fosfatasa.

TECNICA:

5,5  $\mu\text{M}$  de p-nitrofenil fosfato en 50 mM de tampón citrato a pH 4,8, se llevan a un volumen de 1,2 ml con la prueba.

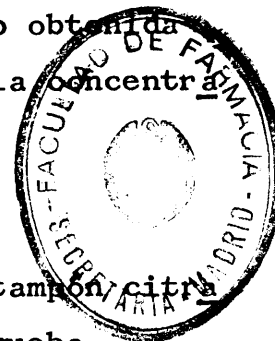
El ensayo se realizó a una temperatura de 37° C.

La actividad enzimática específica se expresa en micro moles de p-nitrofenol liberado por minuto, después de la adición de NaOH 0,02 M.

La absorbancia de este producto se determina a 405 nm.

CALCULOS:

Los resultados se llevan a una curva de calibración,



construída con p-nitrofenol a diferentes concentraciones.

La actividad específica del enzima se expresa en  $\mu\text{mol}/$  órgano total y en  $\text{nmol}/\text{mg}$  de proteína.

3.3.3.1.6.- $\beta$ -D-Glucuronidasa ( $\beta$ -D-glucurónido-glucuronohidrolasa E.C. 3.2.1.31.)

El método utilizado es el de Bergmeyer modificado (24).

#### FUNDAMENTO:

El enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa actúa sobre el sustrato 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosidurónico (4-nitrofenil glucurónido) y le desdobra en glucopiranosiduronato (Glucuronato) y 4-nitrofenol.

Este último, en medio alcalino da lugar a una reacción amarillenta valorable colorimetricamente a 405 nm.

#### TECNICA:

Para un volúmen de 1,03 ml se mezclan 2,9  $\mu\text{M}$  de 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucurónido al 3,15% en tampón acetato 0,2 M a pH 4 con 94  $\mu\text{M}$  de acetato de sodio como solución tampón a pH 4.

La reacción se lleva a cabo a 37° C.

La absorbancia, producida por el p-nitrofenol liberado al añadir NaOH 2M y glicina 0,2 M a pH 10,4, se mide a 405 nm.

#### CALCULOS:

Los resultados se llevan a una curva de calibración, construída con distintas concentraciones de sustrato.

Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un micromol de sustrato por minuto a 37° C.



La actividad específica del enzima se expresa en unidades en relación a órgano total y mg de proteína.

3.3.3.1.7.- Glutamato-oxalacetato-transaminasa (L-aspartato: 2-oxo-glutarato aminotransferasa E.C. 2.6.1.1.) (GOT).

El método utilizado es el de Reitmann y Frankel (226).

**FUNDAMENTO:**

El enzima GOT actúa sobre un sustrato formado por  $\alpha$ -cetoglutarato y L-aspartato, dando lugar por transaminación a la formación de glutamato y oxalacetato. Este último en medio alcalino forma hidrazonas con la dinitrofenilhidrazina.

La absorbancia del color desarrollado es proporcional a la actividad enzimática.

**TECNICA:**

A 1 ml de solución conteniendo 0,1 mmol de L-aspartato, 2  $\mu$ mol de  $\alpha$ -cetoglutarato y 0,1 mmol de tampón fosfato a pH 7,4, se le añaden 0,2 ml de la prueba.

La incubación se realiza a 37°C durante 1 hora.

La absorbancia producida después de la adición de 1  $\mu$ mol de 2,4 dinitrofenil hidrazina y de NaOH 0,4 M se mide a 546 nm.

**CALCULOS:**

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

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



3.3.3.1.8.- Glutamato-piruvato-transaminasa (L-alanina:2-oxoglutarato aminotransferasa E.C. 2.6.1.2.) (GPT).

El método utilizado es el de Reitmann y Frankel (226).

FUNDAMENTO:

El enzima GPT actúa sobre un sustrato formado por  $\alpha$ -cetoglutarato y D,L-alanina, lo que determina por medio de aminotransferencia, la formación de glutamato y piruvato. Este último en medio alcalino, forma hidrazonas con la dinitrofenil-hidrazina y el color desarrollado es proporcional a la actividad enzimática.

TECNICA:

A 1 ml de solución conteniendo 0,2 mmol de D,L-alanina, 2  $\mu$ mol de  $\alpha$ -cetoglutarato y 0,1 mmol de fosfato a pH 7,4, se añaden 0,2 ml de la prueba. La incubación se realiza a 37<sup>o</sup> C en 30 minutos.

La absorbancia producida después de la adición de 2  $\mu$ mol de 2,4-dinitrofenil hidrazina y de NaOH 0,4 M, se mide a 546 nm.

CALCULOS:

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

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

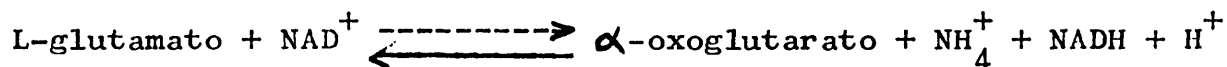


3.3.3.1.9.- Glutamato deshidrogenasa (L-glutamato:NAD óxido reductasa E.C. 1.4.1.2.)

El método utilizado es el de Schmith (249).

FUNDAMENTO:

Este enzima se encuentra primordialmente en la fracción mitocondrial y cataliza la reacción:



Esta reacción es reversible, pero su constante de equilibrio está muy desplazada en el sentido de formación de glutamato.

La absorción producida por la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup> es proporcional a la actividad enzimática.

TECNICA:

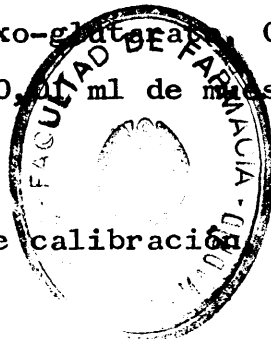
Para un volumen de 1,35 ml se mezclan 0,25 mmol de tampón fosfato, 0,1 mmol de ClNH<sub>4</sub>, 0,02 mmol de α-oxo-glutarato, 0,28 μmol de NADH, 1,25 μmol de ADP y se completa con 0,21 ml de muestra.

CALCULOS:

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

La unidad internacional de actividad enzimática se define como una disminución de la extinción de 0,001/minuto/ml de homogenado a 25° C y 340 nm.

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





## TECNICA:

La extracción del RNA del hígado se lleva a cabo mediante la precipitación de las proteínas del homogenado con ácido tricloroacético. Al extracto se le añade  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  al 0,1% en  $\text{ClH}$  concentrado y el reactivo de orcinol al 10% en etanol. Después de llevarlo a  $100^\circ\text{C}$  durante 40 minutos se mide la absorbancia del color desarrollado a 670 nm.

## CALCULOS:

Los resultados se llevan a una curva patrón de RNA tipo XI.

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

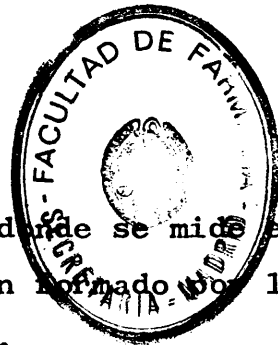
### 3.3.3.2.- Determinaciones en plasma

#### 3.3.3.2.1.- Proteínas plasmáticas totales.

Se utiliza el método de Henry (106).

## FUNDAMENTO:

Se basa en la reacción del biuret, en donde se mide el color desarrollado por el complejo de coordinación formado por las proteínas con iones cúpricos en solución alcalina.



## TECNICA:

A 0,1 ml de plasma se le añaden 5 ml del reactivo biuret que contiene 0,35 mM de  $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 4 mM de citrato sódico y 5 mM de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ .

La absorbancia producida se lee a 545 nm y se compara con un blanco de reactivos y un standard, que contiene la solución patrón de proteínas al 6%.

## CALCULOS:

El cálculo de la concentración de proteínas totales en plasma viene dado por:

$$\text{g proteína/100 ml} = \frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. standard}} \times \frac{100}{0,1} \times \text{g proteína del patrón}$$

### 3.3.3.2.2.- Fracciones proteicas plasmáticas.

Se utiliza la técnica de electroforesis de zona (270).

#### FUNDAMENTO:

Cuando a una mezcla proteica, dispuesta en la extremidad de un soporte adecuado, se le aplica una diferencia de potencial entre las dos extremidades de la banda, se produce una migración de los constituyentes con una velocidad propia de cada uno de ellos lo que permite su separación y medida.

#### TECNICA:

Se utilizan tiras de acetato de celulosa empleando como tampón veronal sódico a pH 9. Se somete a la muestra a una diferencia de potencial de 200 voltios durante 45 minutos. Posteriormente se tiñe con negro amido y se decolora con una mezcla de metanol (45%), ácido acético (10%) y agua destilada (45%). El transparentado se lleva a cabo con metanol, fenol y ácido acético.

La determinación cuantitativa de las fracciones se realiza con un densitómetro, usando filtro rojo y lámpara de infrarrojos y cuyas densidades ópticas determinan la curva de electroforesis de las proteínas. El área de cada pico es proporcional a la concentración de la fracción proteica considerada.

#### CALCULOS:

Los resultados se expresan en g/100 ml. plasma

### 3.3.3.3.- Determinaciones en orina.

#### 3.3.3.3.1.- Urea.

Se utiliza el método de Fawcett y Scott (83).

#### FUNDAMENTO:

La urea es hidrolizada, dando lugar a amonio y dióxido de carbono por acción de la ureasa. El amoníaco se determina a su vez mediante la reacción del fenol-hipoclorito de Berthelot. El color desarrollado por el p-indofenol resultante es proporcional a la cantidad del metabolito.

#### TECNICA:

En un volumen de 0,3 ml se mezclan 1 unidad de ureasa en 50 nmol/ml de tampón fosfato a pH 6,5 y la muestra a analizar. Posteriormente, se añaden 0,53  $\mu$ mol de fenol, 0,85 nmol de nitroprusiato sódico, 55 nmol de hipoclorito sódico y 615 nmol de NaOH en un volumen total de 10,3 ml. El color desarrollado se lee a una longitud de onda de 546 nm.

#### CALCULOS:

Los resultados se llevan a una curva de calibración construida con una concentración de urea de 2 mg/100 ml.

La eliminación de urea se expresa en mg en 48 horas.



#### **4.- RESULTADOS**

#### 4.1.- PRESENTACION DE RESULTADOS

Los resultados se relacionan en Tablas, siguiendo el orden previamente establecido en el diseño experimental:

1) Datos que conciernen al estudio del efecto de la deficiencia proteica y proteico-calórica en la dieta (LOTES TESTIGOS). Estos resultados están comprendidos en las Tablas números 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

2) Datos que conciernen al estudio del efecto de la administración del antígeno en los animales sometidos a los distintos niveles dietarios estudiados (LOTES ESTIMULADOS).

A su vez estos resultados se agrupan dependiendo de la dieta considerada:

a) Los resultados obtenidos en los animales alimentados con dieta balanceada (Lotes 1.1. y 2.1.) aparecen en las Tablas 2, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 43 y 46.

b) Los resultados obtenidos en los animales proteín-deficientes (Lotes 1.2. y 2.2.) se relacionan en las Tablas 3, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 44 y 47.

c) Los resultados obtenidos en los animales alimentados con dieta restringida (Lotes 1.3 y 2.3.) figuran en las Tablas 4, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45 y 48.

Las Tablas han sido encabezadas con el nombre de los parámetros en estudio. En las tablas relativas al efecto de las deficiencias dietarias, se observan columnas de los valores medios de 10 animales con el correspondiente error standard, de cada uno de los lotes TESTIGOS estudiados, cada uno de los cuales tiene, por lo tanto, un nivel dietario diferente.



Por otra parte, en las tablas que contienen el efecto del antígeno, se puede observar, los datos en valores medios, situados en dos filas, que corresponden a los lotes TESTIGOS y ESTIMULADOS de la dieta estudiada. En todas las tablas aparece la unidad de medida de cada parámetro.

El tratamiento estadístico de los datos se lleva a cabo mediante la  $t$  de Student. La probabilidad encontrada en cada caso se incluye en las tablas y es considerada significativa cuando es menor de 0,05.



Tabla 1

EFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA  
 SOBRE LA INGESTA Y EL PESO CORPORAL EN RATAS .

	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
Ingesta (g) (s.s.f)	18,43 $\pm$ 0,36	7,89 $\pm$ 0,28	9,21 $\pm$ 0,18	P < 0,001 P' < 0,01 P'' < 0,001
Peso inicial (g)	135,06 $\pm$ 2,52	138,56 $\pm$ 2,56	135,27 $\pm$ 1,93	P > 0,05 P' > 0,05 P'' > 0,05
Peso final (g)	253,10 $\pm$ 4,15	99,98 $\pm$ 2,95	157,81 $\pm$ 1,50	P < 0,001 P' < 0,001 P'' < 0,001
Incremento peso (g)	118,05 $\pm$ 3,31	-38,58 $\pm$ 3,62	22,54 $\pm$ 1,57	P < 0,001 P' < 0,001 P'' < 0,001

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.

P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.

P'' : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

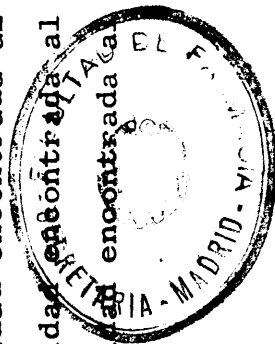


Tabla 2

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA INGESTA Y EL PESO CORPORAL  
DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA BALANCEADA

	Ingesta (g) (s.s.f)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Incremento (g)
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	18,43 $\pm$ 0,36	135,06 $\pm$ 2,52	253,10 $\pm$ 4,15	118,05 $\pm$ 3,31
ESTIMULADOS	19,91 $\pm$ 0,31	134,60 $\pm$ 1,87	262,04 $\pm$ 4,41	127,44 $\pm$ 1,70
	$P_A < 0,01$	$P_A > 0,05$	$P_A < 0,05$	$P_A < 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados, que ingieren la dieta balanceada.



Tabla 3

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA INGESTA Y EL PESO CORPORAL  
EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA PROTEIN-DEFICIENTE.

	Ingesta (g) (s.s.f)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Incremento (g)
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	7,89 $\pm$ 0,28	138,56 $\pm$ 2,56	99,98 $\pm$ 2,95	38,58 $\pm$ 3,62
ESTIMULADOS	7,22 $\pm$ 0,25	135,21 $\pm$ 1,92	95,51 $\pm$ 1,78	42,10 $\pm$ 1,22
	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefna.



Tabla 4

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA INGESTA Y EL PESO CORPORAL  
EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RESTRINGIDA

	Ingesta (g) (s.s.f)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Incremento (g)
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	9,21 $\pm$ 0,18	135,27 $\pm$ 1,93	157,81 $\pm$ 1,50	22,54 $\pm$ 1,57
ESTIMULADOS	9,96 $\pm$ 0,15	132,76 $\pm$ 1,14	153,19 $\pm$ 1,78	20,43 $\pm$ 1,06
	$P_A'' < 0,01$	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' > 0,05$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales  
testigos y estimulados, que ingieren la dieta restringida.

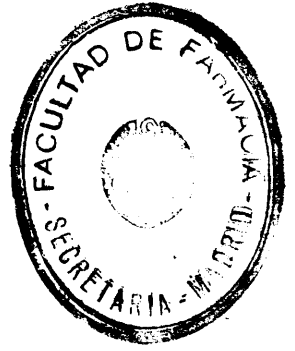


Tabla 5

EFEECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA  
 SOBRE PARAMETROS PONDERALES Y PROTEINAS HEPATICOS EN RATAS

	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
Peso hígado (g)	7,69 ± 0,36	4,38 ± 0,24	4,72 ± 0,12	P < 0,001 P' > 0,05 P'' < 0,001
<u>Peso hígado</u> Peso corporal	30,63 ± 1,41	43,84 ± 2,39	29,92 ± 0,73	P < 0,001 P' < 0,001 P'' > 0,05
Proteínas (mg/hígado)	1260,00 ± 64,00	388,00 ± 28,00	490,00 ± 17,00	P < 0,001 P' < 0,01 P'' < 0,001

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.  
 P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.  
 P'' : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

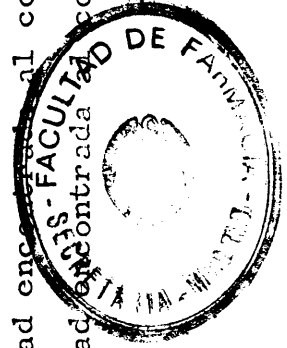


Tabla 6

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA SOBRE LA TASA DE  
DNA, PROTEINA/DNA, TAMAÑO CELULAR Y NUMERO DE NUCLEOS EN HIGADO DE RATA

	<u>CONTROL</u>		<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>		<u>RESTRINGIDO</u>		<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
DNA (mg/hgado)	33,39 $\pm$ 1,00	25,58 $\pm$ 1,22	32,84 $\pm$ 0,73				P < 0,001 P' < 0,001 P'' > 0,05
Protefna/DNA	38,01 $\pm$ 1,02	15,50 $\pm$ 0,86	14,98 $\pm$ 0,33				P < 0,001 P' > 0,05 P'' < 0,001
Tamaño celular <sup>1</sup> ( $\frac{\text{Peso hgado}}{\text{n}^{\circ} \text{ núcleos}} \times 1000$ )	1,44 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,02				P < 0,001 P' < 0,01 P'' < 0,001
Número núcleos <sup>2</sup> ( $\frac{\text{DNA} \times 1000}{6,2}$ )	5386 $\pm$ 161	4126 $\pm$ 197	5297 $\pm$ 117				P < 0,001 P' < 0,001 P'' > 0,05

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.  
P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.  
P'' : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

(1) : ng. (2) : millones.

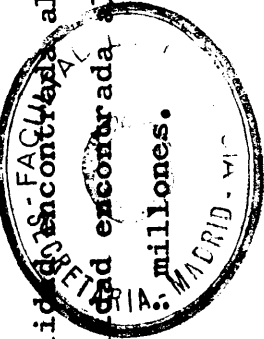


Tabla 7

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA  
 SOBRE LA ACTIVIDAD DNasa<sup>1</sup> ACIDA EN HIGADO DE RATA

	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
DNasa/órgano	161,33 $\pm$ 12,11	41,44 $\pm$ 2,64	53,99 $\pm$ 3,91	P < 0,001 P' < 0,05 P'' < 0,001
DNasa/mg prot.	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	P > 0,05 P' > 0,05 P'' > 0,05
DNasa/DNA	4,83 $\pm$ 0,36	1,62 $\pm$ 0,10	1,65 $\pm$ 0,12	P < 0,001 P' > 0,05 P'' < 0,001

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.

P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.

P'' : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

(1) : Unidades Internacionales

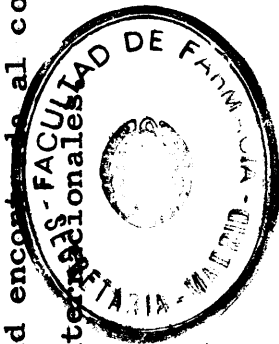


Tabla 8

EFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA  
 SOBRE EL METABOLISMO DEL RNA EN HIGADO DE RATA

	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
RNA (mg/higado)	40,14 $\pm$ 1,73	16,90 $\pm$ 1,10	14,89 $\pm$ 0,57	P < 0,001 P' > 0,05 P" < 0,001
RNA/protefna	31,86 $\pm$ 1,37	43,53 $\pm$ 2,84	30,41 $\pm$ 1,17	P < 0,01 P' < 0,001 P" > 0,05
RNA/DNA	1,20 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,02	P < 0,001 P' < 0,001 P" < 0,001

- P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.
- P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.
- P" : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.



Tabla 9

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA  
 SOBRE LA ACTIVIDAD RNasa<sup>1</sup> ACIDA EN HIGADO DE RATA

	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
RNasa/órgano	21,77 $\pm$ 0,97	9,08 $\pm$ 0,51	6,63 $\pm$ 0,84	P < 0,001 P' < 0,05 P'' < 0,001
RNasa/mg prot.	17,42 $\pm$ 0,86	23,81 $\pm$ 1,86	13,78 $\pm$ 1,18	P < 0,01 P' < 0,001 P'' < 0,05
RNasa/RNA	0,56 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,06	P > 0,05 P' > 0,05 P'' > 0,05
RNasa/DNA	0,65 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,03	P < 0,001 P' < 0,001 P'' < 0,001

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.

P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.

P'' : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

(1) : Unidades Internacionales.

Tabla 10

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOSFATASA ALCALINA, FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN HIGADO DE RATA

<u>Actividad/órgano</u>	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
Fosf. alcalina (ug p-nitrofenol)	7,36 $\pm$ 0,53	18,89 $\pm$ 2,24	9,79 $\pm$ 0,52	P < 0,001 P' < 0,001 P" < 0,01
Fosf. ácida (ug p-nitrofenol)	150,95 $\pm$ 5,69	54,64 $\pm$ 4,45	67,30 $\pm$ 4,34	P < 0,001 P' < 0,05 P" < 0,001
$\beta$ -glucuronidasa (U.I.)	5,50 $\pm$ 0,40	2,55 $\pm$ 0,10	4,11 $\pm$ 0,21	P < 0,001 P' < 0,001 P" < 0,01

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.

P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.

P" : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

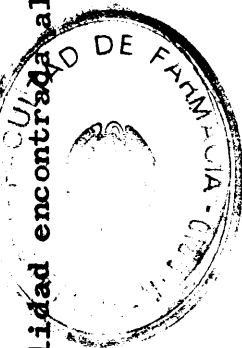


Tabla 11.

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOSFATASA ALCALINA, FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN HIGADO DE RATA

<u>Actividad/mg prot.</u>	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
Fosf. alcalina (ng p-nitrofenol)	5,76 $\pm$ 0,43	45,16 $\pm$ 3,93	19,98 $\pm$ 1,65	P < 0,001 P' < 0,001 P'' < 0,001
Fosf. ácida (ng p-nitrofenol)	120,06 $\pm$ 5,56	145,03 $\pm$ 18,08	135,77 $\pm$ 15,58	P > 0,05 P' > 0,05 P'' > 0,05
$\beta$ -glucuronidasa (mU.I.)	4,43 $\pm$ 0,36	7,04 $\pm$ 0,47	8,36 $\pm$ 0,29	P < 0,001 P' < 0,05 P'' < 0,001

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.

P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.

P'' : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

Tabla 12

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE UREA Y SOBRE LAS ACTIVIDADES DE GOT, GPT Y GDH EN HIGADO DE RATA

	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
Urea (mg/48 h)	25,61 $\pm$ 0,72	3,57 $\pm$ 0,66	13,79 $\pm$ 1,93	P < 0,001 P' < 0,001 P'' < 0,001
GOT <sup>1</sup> (U.I.)	272,80 $\pm$ 11,09	46,33 $\pm$ 3,17	183,01 $\pm$ 10,43	P < 0,001 P' < 0,001 P'' < 0,001
GPT <sup>1</sup> (U.I.)	51,76 $\pm$ 3,74	6,76 $\pm$ 0,51	29,43 $\pm$ 2,60	P < 0,001 P' < 0,001 P'' < 0,001
GDH <sup>1</sup> (U.I.)	243,61 $\pm$ 17,50	170,42 $\pm$ 8,80	170,61 $\pm$ 5,54	P < 0,01 P' > 0,05 P'' < 0,001

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.

P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.

P'' : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

(1) : Actividad/órgano.



Tabla 13

EFEECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA  
 SOBRE LAS ACTIVIDADES DE GOT, GPT Y GDH EN HIGADO DE RATA

<u>Actividad/mg prot</u>	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
GOT (U.I.)	0,21 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,02	P < 0,05 P' < 0,001 P" < 0,001
GPT (mU.I.)	40,79 $\pm$ 1,45	17,87 $\pm$ 1,58	59,99 $\pm$ 1,87	P < 0,001 P' < 0,001 P" < 0,001
GDH (U.I.)	0,19 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,02	P < 0,001 P' < 0,05 P" < 0,001

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.  
 P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.  
 P" : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.



Tabla 14

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA SOBRE LA TASA DE  
 PROTEINAS TOTALES Y DE LAS FRACCIONES ALBUMINA Y  $\alpha_1$ -GLOBULINA PLASMATICAS DE RATA

	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
Proteinas (g/100 ml)	5,92 $\pm$ 0,06	3,37 $\pm$ 0,16	5,44 $\pm$ 0,23	P < 0,001 P' < 0,001 P'' > 0,05
Albumina (g/100 ml)	2,76 $\pm$ 0,05	1,43 $\pm$ 0,06	2,85 $\pm$ 0,12	P < 0,001 P' < 0,001 P'' > 0,05
$\alpha_1$ -globulina (g/100 ml)	1,02 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,05	0,86 $\pm$ 0,05	P < 0,001 P' < 0,001 P'' < 0,05

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.

P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.

P'' : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

Tabla 15

EFEECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y PROTEICO-CALORICA  
 SOBRE LAS FRACCIONES PROTEICAS  $\alpha_2$ ,  $\beta$  Y  $\delta$ -GLOBULINAS PLASMATICAS DE RATA

	<u>CONTROL</u>	<u>PROTEIN-DEFICIENTE</u>	<u>RESTRINGIDO</u>	<u>SIGNIFICACION</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	
$\alpha_2$ -globulina (g/100 ml)	0,29 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02	P < 0,01 P' > 0,05 P'' > 0,05
$\beta$ -globulina (g/100 ml)	0,99 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,05	P < 0,001 P' > 0,05 P'' < 0,01
$\delta$ -globulina (g/100 ml)	0,90 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,08	P < 0,01 P' < 0,05 P'' < 0,05

P : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y deficientes.  
 P' : Probabilidad encontrada al comparar los animales deficientes y restringidos.  
 P'' : Probabilidad encontrada al comparar los animales controles y restringidos.

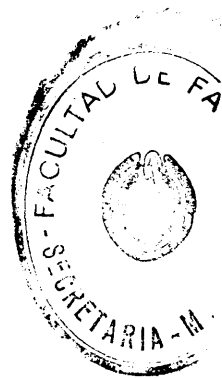


Tabla 16

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE PARAMETROS PONDERALES  
Y PROTEINAS HEPATICOS EN RATAS CONTROLES

	<u>Peso hígado (g)</u>	<u>Peso hígado/Peso corporal</u>	<u>Proteínas (mg/hígado)</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	7,69 ± 0,36	30,63 ± 1,41	1260 ± 64
ESTIMULADOS	9,65 ± 0,33	36,83 ± 1,20	1116 ± 61
	$P_A < 0,001$	$P_A < 0,01$	$P_A > 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

Tabla 17

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA TASA DE DNA,  
 PROTEINA/DNA, TAMAÑO CELULAR Y NUMERO DE NUCLEOS EN HIGADO DE RATAS CONTROLES

	DNA (mg/órgano)	Proteína/DNA	Tamaño celular <sup>1</sup> ( $\frac{\text{Peso hígado}}{\text{ns núcleos}} \times 1000$ )	Número núcleos <sup>2</sup> ( $\frac{\text{DNA} \times 1000}{6,2}$ )
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	33,39 $\pm$ 1,00	38,01 $\pm$ 1,02	1,44 $\pm$ 0,04	5386 $\pm$ 161
ESTIMULADOS	50,93 $\pm$ 1,47	22,07 $\pm$ 0,62	1,18 $\pm$ 0,03	8214 $\pm$ 238
	$P_A < 0,001$	$P_A < 0,001$	$P_A < 0,001$	$P_A < 0,001$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales  
 testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

(1) : mg

(2) : millones

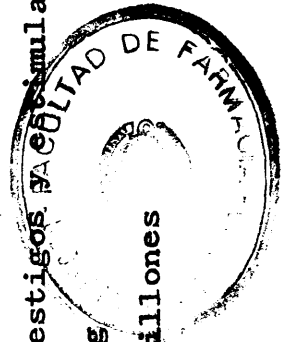


Tabla 18

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA ACTIVIDAD  
DNasa<sup>1</sup> ACIDA EN HIGADO DE RATAS CONTROLES

	<u>DNasa/órgano</u>	<u>DNasa/mg protefina</u>	<u>DNasa/DNA</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	161,33 $\pm$ 12,11	0,13 $\pm$ 0,01	4,83 $\pm$ 0,36
ESTIMULADOS	238,95 $\pm$ 9,43	0,21 $\pm$ 0,01	4,69 $\pm$ 0,19
	$P_A < 0,001$	$P_A < 0,001$	$P_A > 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

(1) : Unidades Internacionales.

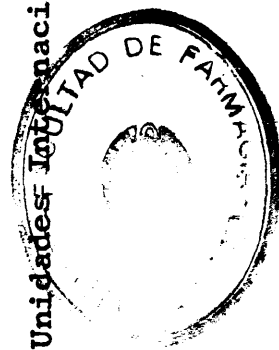


Tabla 19

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE EL  
METABOLISMO DEL RNA<sup>1</sup> EN HIGADO DE RATAS CONTROLES

	<u>RNA</u>	<u>RNA/proteína</u>	<u>RNA/DNA</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	40,14 $\pm$ 1,73	31,86 $\pm$ 1,37	1,20 $\pm$ 0,05
ESTIMULADOS	50,77 $\pm$ 3,39	45,51 $\pm$ 3,03	1,00 $\pm$ 0,07
	$P_A < 0,05$	$P_A < 0,001$	$P_A < 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

(1)  $\mu$ : mg/órgano.



Tabla 20

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA ACTIVIDAD  
RNasa<sup>1</sup> ACIDA EN HIGADO DE RATAS CONTROLES

	<u>RNasa/órgano</u>	<u>RNasa/mg proteína</u>	<u>RNasa/RNA</u>	<u>RNA/DNA</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	21,77 $\pm$ 0,97	17,42 $\pm$ 0,86	0,56 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,03
ESTIMULADOS	28,84 $\pm$ 1,84	25,70 $\pm$ 1,18	0,57 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,04
	$P_A < 0,01$	$P_A < 0,001$	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

(1) : Unidades fraccionales.



Tabla 21

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE FOSFATASA ALCALINA,  
FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN HIGADO DE RATAS CONTROLES

<u>Actividad/órgano</u>	<u>Fosfatasa alcalina<sup>1</sup></u>	<u>Fosfatasa ácida<sup>1</sup></u>	<u><math>\beta</math>-glucuronidasa<sup>2</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	7,36 $\pm$ 0,53	150,95 $\pm$ 5,69	5,50 $\pm$ 0,40
ESTIMULADOS	11,76 $\pm$ 0,75	269,14 $\pm$ 15,40	5,08 $\pm$ 0,37
	$P_A < 0,001$	$P_A < 0,001$	$P_A > 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

(1) :  $\mu$ g de p-nitrofenol/órgano

(2) : Unidades Internacionales/órgano.



Tabla 22

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE FOSFATASA ALCALINA,  
FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN HIGADO DE RATAS CONTROLES

Actividad/mg prot.	Fosfatasa alcalina <sup>1</sup> $\bar{x} \pm E$	Fosfatasa ácida <sup>1</sup> $\bar{x} \pm E$	$\beta$ -glucuronidasa <sup>2</sup> $\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	5,76 $\pm$ 0,43	120,06 $\pm$ 5,56	4,43 $\pm$ 0,36
ESTIMULADOS	10,52 $\pm$ 0,48	248,55 $\pm$ 19,74	4,59 $\pm$ 0,34
	$P_A < 0,001$	$P_A < 0,001$	$P_A > 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

(1) : ng de p-nitrofenol/mg protefina

(2) : mUnidades Internacionales/mg protefina.



Tabla 23

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE UREA  
Y SOBRE LAS ACTIVIDADES DE GOT, GPT Y GDH EN HIGADO DE RATAS CONTROLES

	<u>Urea<sup>1</sup></u>	<u>GOT<sup>2</sup></u>	<u>GPT<sup>2</sup></u>	<u>GDH<sup>2</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	25,61 $\pm$ 0,72	272,80 $\pm$ 11,09	51,76 $\pm$ 3,74	243,61 $\pm$ 17,50
ESTIMULADOS	30,88 $\pm$ 1,36	322,39 $\pm$ 17,51	64,60 $\pm$ 4,37	512,46 $\pm$ 21,87
	$P_A < 0,01$	$P_A < 0,05$	$P_A < 0,05$	$P_A < 0,001$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

(1) : mg excreta en 48 horas.

(2) : U.I./órgano. DE FARMACIA



Tabla 24

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE  
GOT, GPT Y GDH EN HIGADO DE RATAS CONTROLES

<u>Actividad/mg prot.</u>	<u>GOT<sup>1</sup></u>	<u>GPT<sup>2</sup></u>	<u>GDH<sup>1</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	0,21 ± 0,01	40,79 ± 1,45	0,19 ± 0,01
ESTIMULADOS	0,30 ± 0,02	58,27 ± 2,86	0,46 ± 0,02
	$P_A < 0,05$	$P_A < 0,001$	$P_A < 0,001$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

(1) : U.I./mg de protefna

(2) : mU.I./mg de protefna.



Tabla 25

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE PARAMETROS PONDERALES  
Y PROTEINAS HEPATICOS EN RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

	<u>Peso hígado (g)</u>	<u>Peso hígado/Peso corporal</u>	<u>Proteínas (mg/hígado)</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	4,38 $\pm$ 0,24	43,84 $\pm$ 2,39	388 $\pm$ 28
ESTIMULADOS	4,25 $\pm$ 0,20	44,55 $\pm$ 2,12	348 $\pm$ 23
	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefina.



Tabla 26

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA TASA DE DNA, PROTEINA/DNA,  
TAMAÑO CELULAR Y NUMERO DE NUCLEOS EN HIGADO DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

	DNA (mg/órgano)	Proteína/DNA	Tamaño celular <sup>1</sup> ( $\frac{\text{Peso hígado}}{\text{n}^\circ \text{ núcleos}} \times 1000$ )	Número núcleos <sup>2</sup> ( $\frac{\text{DNA} \times 1000}{6,2}$ )
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	25,58 ± 1,22	15,50 ± 0,86	1,09 ± 0,06	4126 ± 197
ESTIMULADOS	25,17 ± 1,10	14,06 ± 0,70	1,07 ± 0,05	4060 ± 178
	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales  
testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefna.

(1) : ng  
(2) : m



Tabla 27

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA ACTIVIDAD  
 DNasa<sup>1</sup> ACIDA EN HIGADO DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

	<u>DNasa/órgano</u>	<u>DNasa/mg protefina</u>	<u>DNasa/DNA</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	41,44 $\pm$ 2,64	0,13 $\pm$ 0,01	1,62 $\pm$ 0,10
ESTIMULADOS	85,81 $\pm$ 1,46	0,26 $\pm$ 0,02	3,41 $\pm$ 0,06
	$P'_A < 0,001$	$P'_A < 0,001$	$P'_A < 0,001$

$P'_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefina.

(1) : Unidades Internacionales.

Tabla 28

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE EL METABOLISMO  
DEL RNA<sup>1</sup> EN HIGADO DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

	<u>RNA</u>	<u>RNA/proteína</u>	<u>RNA/DNA</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	16,90 $\pm$ 1,10	43,53 $\pm$ 2,84	0,66 $\pm$ 0,04
ESTIMULADOS	21,38 $\pm$ 1,49	61,46 $\pm$ 2,62	0,85 $\pm$ 0,06
	$P'_A < 0,05$	$P'_A < 0,001$	$P'_A < 0,05$

$P'_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefna.

1/órgano.



Tabla 29

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA ACTIVIDAD  
RNasa<sup>1</sup> ACIDA EN HIGADO DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

	<u>RNasa/órgano</u>	<u>RNasa/mg protefna</u>	<u>RNasa/RNA</u>	<u>RNA/DNA</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	9,08 ± 0,51	23,81 ± 1,86	0,54 ± 0,03	0,35 ± 0,02
ESTIMULADOS	13,59 ± 0,92	38,90 ± 1,29	0,64 ± 0,04	0,50 ± 0,05
	$P_A^1 < 0,001$	$P_A^1 < 0,001$	$P_A^1 > 0,05$	$P_A^1 < 0,01$

$P_A^1$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefna  
Unidades Internacionales.



Tabla 30

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE FOSFATASA ALCALINA,  
FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN HIGADO DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

<u>Actividad/órgano</u>	<u>Fosfatasa alcalina<sup>1</sup></u>	<u>Fosfatasa ácida<sup>1</sup></u>	<u><math>\beta</math>-glucuronidasa<sup>2</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	18,89 $\pm$ 2,24	54,64 $\pm$ 4,45	2,55 $\pm$ 0,10
ESTIMULADOS	15,12 $\pm$ 1,39	67,69 $\pm$ 3,96	3,47 $\pm$ 0,31
	$P_A > 0,05$	$P_A < 0,05$	$P_A < 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefna.

$\mu$ g de p-nitrofenol/órgano  
Unidades Internacionales/órgano.

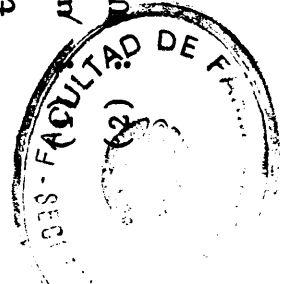


Tabla 31

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE FOSFATASA ALCALINA  
FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN HIGADO DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

<u>Actividad/mg prot.</u>	<u>Fosfatasa alcalina<sup>1</sup></u>	<u>Fosfatasa ácida<sup>1</sup></u>	<u><math>\beta</math>-glucuronidasa<sup>2</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	45,16 $\pm$ 3,93	145,03 $\pm$ 18,08	7,04 $\pm$ 0,47
ESTIMULADOS	43,40 $\pm$ 3,97	351,41 $\pm$ 27,91	9,96 $\pm$ 0,69
	$P'_A > 0,05$	$P'_A < 0,001$	$P'_A < 0,01$

$P'_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefina

(1) : ng de p-nitrofenol/mg protefina

(2) : Unidades Internacionales/mg protefina.

Tabla 32

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE UREA  
Y SOBRE LAS ACTIVIDADES DE GOT, GPT Y GDH EN HIGADO DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

	<u>Urea<sup>1</sup></u>	<u>GOT<sup>2</sup></u>	<u>GPT<sup>2</sup></u>	<u>GDH<sup>2</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	3,57 ± 0,66	46,33 ± 3,17	6,76 ± 0,51	170,42 ± 8,80
ESTIMULADOS	3,16 ± 0,33	73,53 ± 4,00	7,06 ± 0,53	353,22 ± 19,17
	$P_A > 0,05$	$P_A < 0,001$	$P_A > 0,05$	$P_A < 0,001$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefina.

(1) : mg excretados en 48 horas.

(2) : U.I./órgano.

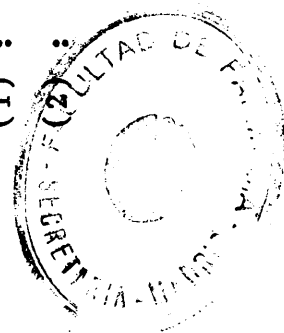


Tabla 33

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE  
GOT, GPT Y GDH EN HIGADO DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

<u>Actividad/mg prot.</u>	<u>GOT<sup>1</sup></u>	<u>GPT<sup>2</sup></u>	<u>GDH<sup>1</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	0,13 $\pm$ 0,02	17,87 $\pm$ 1,58	0,43 $\pm$ 0,03
ESTIMULADOS	0,22 $\pm$ 0,02	20,69 $\pm$ 1,23	1,03 $\pm$ 0,06
	$P'_A < 0,01$	$P'_A > 0,05$	$P'_A < 0,001$

$P'_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefna.

(1) : U.I./mg de protefna

(2) : mU.I./mg de protefna.

Tabla 34

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE PARAMETROS PONDERALES  
Y PROTEINAS HEPATICOS EN RATAS RESTRINGIDAS

	<u>Peso hígado (g)</u>	<u>Peso hígado/Peso corporal</u>	<u>Proteínas (mg/hígado)</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	4,72 ± 0,12	29,92 ± 0,73	490 ± 17
ESTIMULADOS	4,76 ± 0,12	31,05 ± 0,78	678 ± 49
	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' < 0,01$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

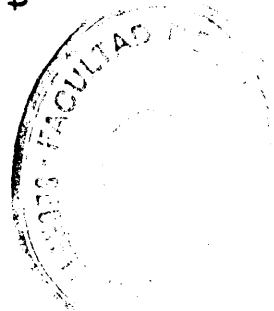


Tabla 35

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA TASA DE DNA, PROTEINA/DNA,  
TAMAÑO CELULAR Y NUMERO DE NUCLEOS EN HIGADO DE RATAS RESTRINGIDAS

	DNA (mg/órgano)	Proteína/DNA	Tamaño celular <sup>1</sup> ( $\frac{\text{Peso hígado}}{\text{n}^{\circ} \text{ núcleos}} \times 1000$ )	Número núcleos <sup>2</sup> ( $\frac{\text{DNA} \times 1000}{6,2}$ )
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	32,84 ± 0,73	14,98 ± 0,33	0,90 ± 0,02	5297 ± 117
ESTIMULADOS	30,98 ± 1,34	22,30 ± 1,09	0,97 ± 0,05	4996 ± 216
	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' < 0,001$	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' > 0,05$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

ng  
millones.

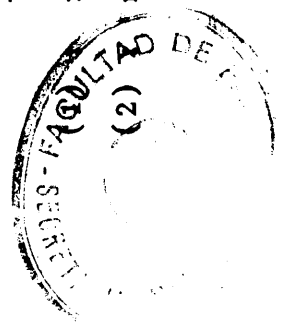


Tabla 36

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA ACTIVIDAD  
DNasa<sup>1</sup> ACIDA EN HIGADO DE RATAS RESTRINGIDAS.

	<u>DNasa/órgano</u>	<u>DNasa/mg proteína</u>	<u>DNasa/DNA</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	53,99 ± 3,91	0,13 ± 0,02	1,65 ± 0,12
ESTIMULADOS	6,34 ± 0,41	0,01 ± 0,001	0,21 ± 0,01
	$P_A'' < 0,001$	$P_A'' < 0,001$	$P_A'' < 0,001$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

(1) : Unidades Internacionales.

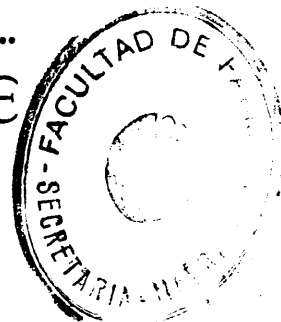


Tabla 37

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE EL METABOLISMO  
DEL RNA<sup>1</sup> EN HIGADO DE RATAS RESTRINGIDAS

	<u>RNA</u> $\bar{x} \pm E$	<u>RNA/proteína</u> $\bar{x} \pm E$	<u>RNA/DNA</u> $\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	14,89 ± 0,57	30,41 ± 1,17	0,45 ± 0,02
ESTIMULADOS	16,23 ± 1,19	23,95 ± 1,76	0,52 ± 0,04
	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' < 0,01$	$P_A'' > 0,05$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales  
testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

(1) : mg/órgano.

Tabla 38

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA ACTIVIDAD  
 RNasa<sup>1</sup> ACIDA EN HIGADO DE RATAS RESTRINGIDAS

	<u>RNasa/órgano</u>	<u>RNasa/mg protefna</u>	<u>RNasa/RNA</u>	<u>RNA/DNA</u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	6,63 ± 0,84	13,78 ± 1,18	0,45 ± 0,06	0,21 ± 0,03
ESTIMULADOS	17,85 ± 1,40	26,51 ± 1,53	1,10 ± 0,09	0,58 ± 0,05
	$P_A'' < 0,001$	$P_A'' < 0,001$	$P_A'' < 0,001$	$P_A'' < 0,001$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.  
 Unidades Internacionales.



Tabla 39

EFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE FOSFATASA ALCALINA,  
FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN HIGADO DE RATAS RESTRINGIDAS

<u>Actividad/órgano</u>	<u>Fosfatasa alcalina<sup>1</sup></u>	<u>Fosfatasa ácida<sup>1</sup></u>	<u><math>\beta</math>-glucuronidasa<sup>2</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	9,79 $\pm$ 0,52	67,30 $\pm$ 4,34	4,11 $\pm$ 0,21
ESTIMULADOS	10,16 $\pm$ 0,69	205,11 $\pm$ 17,51	3,22 $\pm$ 0,18
	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' < 0,001$	$P_A'' < 0,01$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

(1) :  $\mu$ g de p-nitrofenol/órgano

(2) : Unidades Internacionales/órgano.

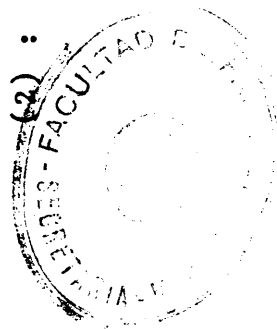


Tabla 40

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE FOSFATASA ALCALINA,  
FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN HIGADO DE RATAS RESTRINGIDAS

<u>Actividad/mg prot.</u>	<u>Fosfatasa alcalina<sup>1</sup></u>	<u>Fosfatasa ácida<sup>1</sup></u>	<u><math>\beta</math>-glucuronidasa<sup>2</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	19,98 $\pm$ 1,65	135,77 $\pm$ 15,58	8,36 $\pm$ 0,29
ESTIMULADOS	15,27 $\pm$ 1,15	230,18 $\pm$ 24,34	4,81 $\pm$ 0,27
	$P_A'' < 0,05$	$P_A'' < 0,01$	$P_A'' < 0,001$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

(1) : ng de p-nitrofenol/mg protefina

(2) : mUnidades Internacionales/mg protefina.



Tabla 41

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE UREA  
Y SOBRE LAS ACTIVIDADES DE GOT, GPT Y GDH EN HIGADO DE RATAS RESTRINGIDAS

	<u>Urea<sup>1</sup></u>	<u>GOT<sup>2</sup></u>	<u>GPT<sup>2</sup></u>	<u>GDH<sup>2</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	13,79 $\pm$ 1,93	183,01 $\pm$ 10,43	29,43 $\pm$ 2,60	170,61 $\pm$ 5,54
ESTIMULADOS	19,29 $\pm$ 0,98	42,55 $\pm$ 2,88	32,47 $\pm$ 1,59	148,77 $\pm$ 4,68
	$P_A'' < 0,05$	$P_A'' < 0,001$	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' < 0,01$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

(1) : mg excretados en 48 horas.

(2) : U.I./órgano.

Tabla 42

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE  
GOT, GPT Y GDH EN HIGADO DE RATAS RESTRINGIDAS.

<u>Actividad/mg prot.</u>	<u>GOT<sup>1</sup></u>	<u>GPT<sup>2</sup></u>	<u>GDH<sup>1</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	0,37 $\pm$ 0,02	59,99 $\pm$ 1,87	0,35 $\pm$ 0,02
ESTIMULADOS	0,30 $\pm$ 0,03	48,93 $\pm$ 2,77	0,22 $\pm$ 0,02
	$P_A'' < 0,05$	$P_A'' < 0,05$	$P_A'' < 0,001$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales  
testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

(1) : U.I./mg protefina  
mU.I./mg protefina.



Tabla 43

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA TASA DE PROTEINAS TOTALES Y DE LAS  
FRACCIONES ALBUMINA Y  $\alpha_1$ -GLOBULINA PLASMATICAS DE RATAS CONTROLES

	<u>Protefnas<sup>1</sup></u>	<u>Albumina<sup>1</sup></u>	<u><math>\alpha_1</math>-globulina<sup>1</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	5,92 $\pm$ 0,06	2,76 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,05
ESTIMULADOS	5,66 $\pm$ 0,15	2,60 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,04
	$P_A > 0,05$	$P_A > 0,05$	$P_A < 0,01$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales  
testigos y estimulados, que ingieren la dieta balanceada.

(1) : g/100 ml.

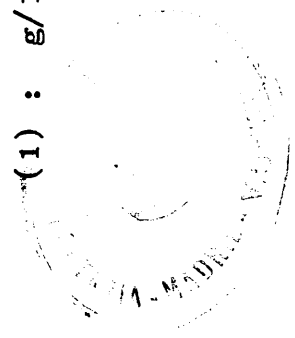


Tabla 44

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA TASA DE PROTEINAS TOTALES Y DE LAS  
FRACCIONES ALBUMINA Y  $\alpha_1$ -GLOBULINA PLASMATICAS DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

	<u>Proteínas<sup>1</sup></u>	<u>Albumina<sup>1</sup></u>	<u><math>\alpha_1</math>-globulina<sup>1</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	3,37 $\pm$ 0,16	1,43 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,05
ESTIMULADOS	3,72 $\pm$ 0,14	1,81 $\pm$ 0,17	0,37 $\pm$ 0,04
	$P'_A > 0,05$	$P'_A > 0,05$	$P'_A > 0,05$

$P'_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefina.

(1) : g/100 ml.

Tabla 45

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LA TASA DE PROTEINAS TOTALES Y DE LAS  
FRACCIONES ALBUMINA Y  $\alpha_1$ -GLOBULINA PLASMATICAS DE RATAS RESTRINGIDAS

	<u>Protefnas<sup>1</sup></u>	<u>Albumina<sup>1</sup></u>	<u><math>\alpha_1</math>-globulina<sup>1</sup></u>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	5,44 $\pm$ 0,23	2,85 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,05
ESTIMULADOS	4,96 $\pm$ 0,14	2,55 $\pm$ 0,08	0,74 $\pm$ 0,07
	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' > 0,05$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales  
testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

(1) FACULTAD DE...



Tabla 46

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS FRACCIONES PROTEICAS  
 $\alpha_2$ ,  $\beta$  Y  $\gamma$ -GLOBULINAS PLASMATICAS DE RATAS CONTROLES

	$\alpha_2$ -globulina <sup>1</sup>	$\beta$ -globulina <sup>1</sup>	$\gamma$ -globulina <sup>1</sup>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	0,29 $\pm$ 0,02	0,99 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,09
ESTIMULADOS	0,32 $\pm$ 0,03	1,16 $\pm$ 0,06	0,74 $\pm$ 0,05
	$P_A > 0,05$	$P_A < 0,05$	$P_A > 0,05$

$P_A$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta balanceada.

g/100 ml.



Tabla 47

EFEECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS FRACCIONES PROTEICAS

$\alpha_2$ ,  $\beta$  Y  $\gamma$ -GLOBULINAS PLASMATICAS DE RATAS PROTEIN-DEFICIENTES

	$\alpha_2$ -globulina <sup>1</sup>	$\beta$ -globulina <sup>1</sup>	$\gamma$ -globulina <sup>1</sup>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	0,20 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,05
ESTIMULADOS	0,22 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,03
	$P_A^! > 0,05$	$P_A^! > 0,05$	$P_A^! > 0,05$

$P_A^!$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta deficiente en protefna.

(1) : g/100 ml.



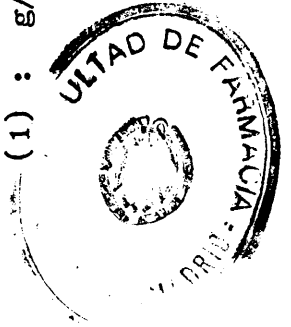
Tabla 48

EFFECTO DEL ANTIGENO SOBRE LAS FRACCIONES PROTEICAS  
 $\alpha_2$ ,  $\beta$  Y  $\gamma$ -GLOBULINAS PLASMATICAS DE RATAS RESTRINGIDAS

	$\alpha_2$ -globulina <sup>1</sup>	$\beta$ -globulina <sup>1</sup>	$\gamma$ -globulina <sup>1</sup>
	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$	$\bar{x} \pm E$
TESTIGOS	0,23 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,08
ESTIMULADOS	0,18 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,04
	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' > 0,05$	$P_A'' > 0,05$

$P_A''$  : Probabilidad encontrada al comparar los distintos parámetros entre animales testigos y estimulados que ingieren la dieta restringida.

(1) : g/100 ml.



5.- DISCUSION



El estado nutritivo del individuo condiciona de forma fundamental la respuesta metabólica al stress. En dicha respuesta, el papel desempeñado por el hígado es de primera magnitud, ya que su intervención en la misma se realiza bajo dos aspectos: 1) La adaptación metabólica del tejido hepático a los aportes insuficientes de proteínas y/o calorías en la dieta y 2) Su función de aclaramiento del antígeno, que le involucra como participante directo en la reacción al stress. Ello a su vez, condiciona la redistribución de sustratos para facilitar su disponibilidad en los procesos de reparación de los mecanismos de defensa, para los que resulta de máxima importancia, según Richards (228), el mantenimiento de una adecuada síntesis proteica.

Puesto que el aporte suficiente de proteínas y calorías en la dieta, es esencial en los procesos bioquímicos y metabólicos, que llevan a la puesta en marcha de una buena respuesta inmunológica se comprende fácilmente, que su disminución afectará profundamente dichos procesos y viceversa, la respuesta antigénica modificará el metabolismo proteico en el hígado, dependiendo de su disponibilidad de proteínas y/o calorías.

Los efectos de la deficiencia dietaria se consiguen en nuestro estudio mediante el aporte a los animales de experimentación de dos dietas tipo, una proteín-deficiente (1% proteína)



otra, restringida al 50% de la control, cuyo fin es limitar tanto la cantidad de proteínas como la de calorías ingerida.

Por otra parte, la situación de stress, depende de la administración por vía intravenosa, de eritrocitos de carnero (SRBC ) a dosis de  $15,5 \times 10^8$  células/0,5 ml solución salina/100 g peso, la cual determina la puesta en marcha de una reacción inmune, que a su vez ocasiona una profunda alteración del metabolismo hepático.

La utilización de la vía intravenosa es, a nuestro juicio, fundamental para modular la respuesta del huésped, ya que selecciona en parte, los órganos que entrarán en contacto con el antígeno. En estas circunstancias, el hígado según Morton (171), retira un 70% de eritrocitos que le llegan por esta vía y ello condiciona la magnitud de la respuesta hepática.

A este respecto Wilkinson (303) señala que la respuesta metabólica al trauma está relacionada con la severidad y la naturaleza del mismo, mientras que para Davis-Lijeadahl (66) es el grado del stress del que depende aquella.

El hígado pues participa de forma considerable en la reacción frente al antígeno y por ello la situación experimental planteada, es idónea para el estudio de las modificaciones metabólicas que se producen en el órgano.

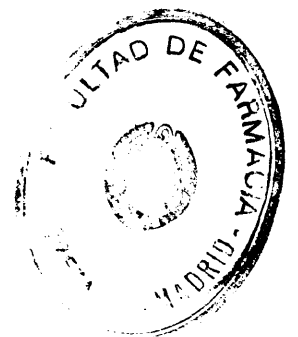
Como se observará en esta discusión, se ha podido comprobar los profundos efectos que tiene el déficit dietario en proteínas y/ó calorías sobre el metabolismo hepático, y cómo estas modificaciones afectan a la respuesta del órgano ante el stress causado por la administración de SRBC.

Entre las modificaciones que se producen durante la adaptación hepática a la dieta, observamos que se afecta fundamentalmente el crecimiento del órgano, así como el metabolismo del RNA, el

cual se relaciona a su vez, con variaciones en los procesos de sí  
ntesis y catabolismo proteicos.

Estos mismos parámetros se alteran por la administración antigénica modificando la situación metabólica hepática según el tipo de dieta ingerido, lo que condiciona la función de aclaramien  
to del antígeno.

Asimismo, tanto el peso corporal total como la ingesta de alimentos, se modifican en las distintas condiciones de la experiencia.



## 5.1.- VARIACIONES EN PESO CORPORAL.

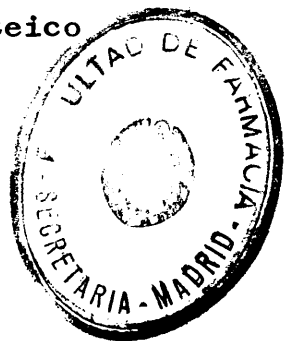
### 5.1.1.- EFECTO DE LA DIETA (Tabla 1)

La variación ponderal de los animales bien nutridos a lo largo del estudio, es consecutiva a un proceso normal de crecimiento, mediante el cual el peso se incrementa en un 87% sobre sus valores iniciales (Tabla 1). Ello está en consonancia con los estudios de Elder (77), quien señala que la rata nunca llega a un estado adulto definitivo, sino que continúa creciendo a través de su vida y reteniendo nitrógeno, permaneciendo en un balance de nitrógeno positivo.

Por el contrario, el crecimiento se detiene en las ratas sometidas a la deficiencia proteica dietaria. La intensa deplección ponderal, llega a hacer negativo el incremento de peso ( $-38,58 \pm 3,62$ ), tanto en relación a su propio valor inicial ( $138,56 \pm 2,56$ ), como respecto al peso de las ratas controles ( $253,10 \pm 4,15$ ) a los 30 días. Así, la pérdida es de un 28% en el primer caso y de hasta un 60% en el segundo como se puede observar en la Tabla 1 ( $P < 0,001$ ).

También en ratas jóvenes adultas sometidas a una dieta con un 3% de proteínas, Von der Decken (278), señala la pérdida del peso corporal.

La detención en el crecimiento, viene determinada por la deplección de estructuras proteicas, a consecuencia del déficit de sustratos, que impiden la función plástica de las proteínas. En este sentido, Mc Lean y Graham (148) señalan que la pérdida de peso en niños sometidos a dietas adecuadas en energía pero deficientes en proteína, es debida al decrecimiento del almacén proteico lábil, lo que conduce a un estado de kwashiorkor.



Esta caída en el peso corporal, consecutiva a una ingesta inadecuada, ha sido relacionada por Catt (37) con la aparición de una baja insulinemia. Igualmente, Lunn (142) encuentra una correlación positiva entre los niveles de insulina en plasma y el crecimiento, expresados en peso y altura, mientras que la correlación es negativa con la tasa de cortisol plasmático. La participación de esta hormona en la degradación proteica parece señalar su acción favorecedora de la caída ponderal.

Por otra parte, la ingestión de la dieta restringida, también determina una caída del 38% del peso corporal como se indica en la Tabla 1, en relación al valor de las ratas controles. Esto significa que la pérdida, es menos drástica que durante la malnutrición proteica y permite a los animales alcanzar un incremento ponderal, positivo, de un 17% sobre su valor inicial que es de  $135,27 \pm 1,93$  g.

También en ratas alimentadas con dietas que contienen 3/4 partes de la dieta control, Gold y Costello (96) señalan una pérdida de peso del 15%, lo que está de acuerdo con nuestros datos.

Por consiguiente, la ingestión de la dieta deficiente al 1% de proteína, provoca una pérdida de peso superior a la ocasionada por la dieta restringida. Por ello, pensamos que el mantenimiento de un 50% en calorías y proteínas dietarias, son suficientes para que las estructuras corporales puedan alcanzar un cierto grado de desarrollo. No obstante, la pérdida de los depósitos grasos utilizados para proveer las necesidades energéticas deficitarias, parecen ser los más primordialmente afectados.

Así, Alleyne (7) señala que los ácidos grasos movilizados del tejido adiposo y los aminoácidos liberados del tejido muscular contribuyen a la deplección ponderal en niños con marasmo. Sin embargo, en clínica humana, la deplección ponderal provocada por el ayuno, es atribuida por Young (312) a la pérdida de agua, en los primeros estadios de la malnutrición.

5.1.2.- EFECTO DEL ANTIGENO (Tablas 2, 3 y 4).

La administración antigénica, sólo produce variabilidad ponderal en las ratas alimentadas con dieta balanceada, como se comprueba en la Tabla 2. Este incremento de peso ( $P_A < 0,05$ ), parece corresponder a la etapa anabólica de la respuesta al stress, dado el tiempo (10 días) que ha transcurrido desde la iniciación de la reacción. En esta etapa se incrementa la síntesis proteica, para facilitar la formación de sustratos y células capaces de actuar en el proceso y que pueden explicar el aumento ponderal.

A este respecto, Cuthbertson (55) señala que en hombres afectados por diversos traumas (quemaduras ó fracturas) aparece una elevación de peso, en la primera semana post-trauma. En este incremento se podría incluir el observado en el hígado y del que se hablará más adelante.

También los órganos inmunocompetentes, fundamentales en la reacción inmunológica, elevan su peso en estas circunstancias. Así en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (236), se ha observado un aumento ponderal y proteico en órganos linfoides de ratas alimentadas con dieta de sostenimiento y sometidas a un antígeno isólogo.

También, hay que tener en cuenta una posible acción neurohormonal a través del hipotálamo, que modularía el peso del individuo. Así, Fleck (88) indica, que durante procesos infecciosos se producen mediadores endógenos leucocitarios, los cuales a su vez, incrementan la producción de hormona somatotropa (STH), lo que puede estar relacionado con la elevación ponderal. También Basedovsky (19) señala un incremento de los potenciales de acción en las neuronas hipotalámicas relacionadas con la ingesta de ali-  
mentos, antes de la máxima respuesta de las células esplénicas a



la inmunización, lo que demuestra la interrelación entre el hipotálamo y la respuesta inmune.

Durante la malnutrición, los animales deficitarios de ambas dietas e inmunizados no presentan variación alguna de peso, a diferencia de las ratas bien alimentadas (Tablas 3 y 4). La causa inmediata parece ser el déficit de proteínas, que hace imposible la formación de nuevas estructuras. A este respecto, Munro (176) señala, que en estados de malnutrición, se reordenan los sustratos para facilitar las funciones prioritarias, en este caso las de defensa, en detrimento del propio crecimiento del animal.

## 5.2.- MODIFICACIONES EN LA INGESTA

### 5.2.1.- CAMBIOS DEBIDOS A LA DIETA (Tabla 1)

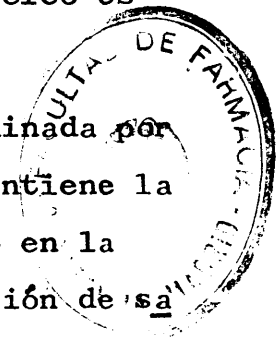
La variación ponderal está en cada caso relacionada con el tipo de dieta ingerida, puesto que tanto la composición como la cantidad de aquella, desempeña un papel de primera importancia en el desarrollo corporal del individuo.

Durante períodos de crecimiento, en los animales alimentados con dietas que contienen suficiente cantidad y calidad de nutrientes, la regulación de la ingesta, se verifica según - - Radcliffe (220) para soportar una tasa máxima de acúmulo proteico. En nuestro estudio, el lote control mantiene un crecimiento normal, gracias a la ingestión de una dieta, que es suficiente, para formar nuevas estructuras, e incrementar la tasa ponderal, como hemos observado anteriormente.

Sin embargo, la cantidad de alimento ingerido por las ratas sometidas a la dieta baja en proteínas (1%), disminuye significativamente en relación a los valores controles de la misma edad, como aparece en la Tabla 1, lo que condiciona obviamente el desarrollo anormal del animal.

También Mc Cance y Widdowson (145) indican que las ratas alimentadas con dietas deficientes en proteína, comen menos y por tanto crecen más lentamente, que cuando el contenido proteico es óptimo.

La disminución en la ingesta puede estar determinada por la elevación en la cantidad de hidratos de carbono que contiene la dieta deficiente; esto nos hace suponer que el incremento en la utilización de glucosa en estas condiciones, daría sensación de sariedad por vía hipotalámica. En apoyo de esta idea, Heard (103) se



ñala que un mayor nivel de carbohidratos en la dieta origina un de crecimiento del 50% en la ingesta, porcentaje al cual se acerca la disminución observada en este estudio.

En los animales con dieta restringida, la obligatoriedad en la toma de una cantidad fija de ingesta, determina su total con sumo por parte del animal, y por consiguiente se enmascara este pa rámetro (Tabla 1).

La particularidad encontrada con esta dieta se relaciona con el período de toma del alimento, el cual, se efectúa inmediata mente después del suministro del mismo, dado el estado de necesi- dad en que se hallan estos animales.

Por el contrario, tanto las ratas balanceadas como las deficientes en proteína, consumen su dieta en períodos separados en las 24 horas del día, principalmente de noche, siguiendo el rit- mo circadiano normal. A estos mismos resultados llegan Gold y - Costello (96), en ratas en semiaayuno.

#### 5.2.2.- CAMBIOS DEBIDOS AL ANTIGENO (Tablas 2, 3 y 4).

El incremento ponderal producido en los animales inmuni zados y bien alimentados, es paralelo a la elevación significati- va en la cantidad ingerida de alimento (Tabla 2).

Esta elevación en el suministro de sustratos, facilita ría el depósito de proteínas para nuevas estructuras, así como pa- ra la síntesis de mediadores que actuarían en la etapa anabólica frente al stress.

En trabajos previos (272) hemos observado en órganos lin foides de ratas inmunizadas, una disminución en la glicolisis aeró bica, con incremento de las tasas de lactato; esto puede represen- tar un decrecimiento de la utilización de la glucosa y su posible



influencia a nivel hipotalámico con la elevación subsiguiente de la ingesta. Sin embargo, la causa real de este aumento es desconocida y precisa de una mayor investigación.

En el caso de los animales malnutridos (ver Tabla 3), la estimulación antigénica no provoca cambio alguno sobre los niveles de ingesta, predominando la acción frenadora de la propia malnutrición proteica.



### 5.3.- EFECTOS DEL DEFICIT EN PROTEINAS SOBRE EL CRECIMIENTO

#### HEPATICO

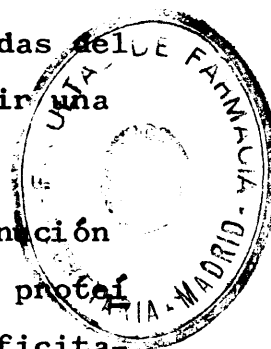
##### 5.3.1.- VARIACIONES EN PESO, PESO ORGANO/PESO CORPORAL Y PROTEINA SOLUBLE (Tabla 5).

La disminución en el crecimiento de los animales deficientes en proteína, se acompaña como ya se ha señalado, de la caída en peso del hígado, la cual llega a ser un 43% menor que en controles ( $P < 0,001$ ), lo que está de acuerdo con los trabajos de Munro (176).

La pérdida ponderal es también señalada por Angeleli (8) quien indica, la rapidez con que ésta se produce en el hígado en relación a otros órganos. No obstante, Waterlow y Stephen (287) señalan que la rata pierde proteína, a partir de la piel, en mayor proporción que de cualquier otro órgano, durante el déficit proteico.

El sustrato que sufre una mayor pérdida durante la malnutrición proteica en el hígado, es la proteína, la cual a consecuencia de la severidad de la dieta, desciende un 69% del valor control, llegando a un valor de  $388 \pm 28$  mg/hígado, lo que está de acuerdo con los datos de Coward (52) quien indica pérdidas del 20 al 30% de proteína hepática, a las dos semanas de ingerir una dieta deficiente en proteína (Tabla 5).

Esta caída es consecuencia inmediata de la disminución en las disponibilidades de aminoácidos para la síntesis de proteínas, la cual disminuye según Waterlow (287), con dietas deficitarias prolongadas durante cinco semanas, aún cuando el proceso primario parece ser el incremento del catabolismo proteico. Ahora bien, los niveles de proteína hepática encontrados en las condiciones experimentales pueden ser consecuencia, de acuerdo con Garlick



(93) del equilibrio existente entre la tasa de síntesis y de degradación.

Por otra parte, la disminución en valores absolutos del peso del hígado, se acompaña de un incremento en la relación peso hígado/peso corporal de un 43% frente a controles, como se puede apreciar en la Tabla 5. Este dato nos indica, que la pérdida de peso corporal es superior a la del hígado, por lo que éste mantiene un tamaño proporcionalmente mayor, que el de las ratas bien alimentadas, en relación al tamaño total del animal.

Pensamos que esta elevación en el índice hepatosomático se relaciona, con la posible existencia de un proceso de degeneración grasa del hígado. En este sentido, Anthony (9) encuentra en ratas que consumen una dieta con un 0,5% de lactalbúmina "ad libitum", una infiltración grasa del hígado, con vacuolización del parénquima. También en niños con kwashiorkor Halliday (102), señala un incremento del 110% en la cantidad de grasa hepática, lo que parece estar de acuerdo con lo ya señalado.

### 5.3.2.- VARIACIONES EN DNA, PROTEINA/DNA, TAMAÑO CELULAR, NUMERO DE NUCLEOS Y ACTIVIDAD DNasa ACIDA (Tablas 6 y 7).

La pérdida ponderal hepática en los animales malnutridos, se confirma con las variaciones encontradas en los componentes intracelulares del órgano, en especial del DNA, cuya variación nos orienta sobre el grado de crecimiento del tejido. A este respecto, Castro (35) indica, que los componentes individuales de la  cromatina como el DNA, son influenciados por la ingesta. De acuerdo con esto, nuestros resultados señalan una disminución del 23% en la tasa del DNA hepático de los animales deficientes en proteína, como señala la Tabla 6 en relación a las ratas controles. De ello se de

duce que el número de células del hígado en estas condiciones decrece, y que ello da lugar a una disminución en peso y tamaño del órgano. También Zeman (318) señala que la malnutrición proteica afecta tanto al tamaño del animal como al desarrollo celular.

Por otra parte, la menor tasa de DNA, implica una disminución en el número de núcleos del hígado, cuyo valor desciende igualmente un 23%, siempre en relación al control, como podemos observar en la Tabla 6. A los mismos resultados llega Wannemacher (280) quien en hígado de ratas sometidas a una dieta con un 6% de proteína, encuentra que el número total de núcleos es de un 72,2% en relación a controles con dietas del 18% de proteína.

Este valor sin embargo, no es muy exacto en el hígado, pues supone que el órgano sólo tiene células binucleadas. En realidad, entre las 8 y 17 semanas de vida, el hígado de la rata, según Najdal y Zajdela (185), tiene una mezcla de células mono y binucleadas, las cuales pueden ser di, tetra u octaploides. Por ello, no se puede adscribir de modo absoluto el número de núcleos al número de células del órgano.

Sin embargo, asumiendo que el nivel de DNA en los núcleos de hígado de rata es constante, su variación nos puede corroborar la disminución del número de células del tejido durante la deficiencia.

Ambos valores, los descensos en DNA y en el número de núcleos, nos señalan además que la tasa de división celular hepática está comprometida en estas circunstancias. De acuerdo con esto, Wheatley (296) indica que en ratas sometidas a una dieta sin proteínas, la aparición de la poliploidía y de células binucleares, se retarda en estos animales.

También Rozovski (233) señala el cese de la tasa de división celular, en hígado de ratas sometidas a una dieta con un 6%

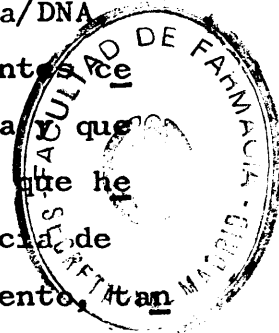
de caseína.

Por consiguiente, la disminución de la proteína dietaria conduce a una aplasia del hígado, con deplección celular y la pérdida de su capacidad mitótica.

A su vez, la aplasia se acompaña de un fenómeno de atrofia, a consecuencia de la disminución del tamaño celular. Esto se pone de manifiesto por la disminución en la razón proteína/DNA del hígado de las ratas proteína-deficientes, que llega a ser un 59% menor que en el control, como se puede observar en la Tabla 6. Ello significa, que la cantidad de proteína por célula ha disminuido drásticamente durante el déficit y que la disminución del tamaño celular, se debe primordialmente a la pérdida proteica. También, Winick y Rosso (308) señalan que la masa media celular por cada "célula diploide" disminuye en estas condiciones, perdiéndose los constituyentes celulares, especialmente las proteínas.

La disminución general de todos los constituyentes celulares, se pone de manifiesto por la caída de la razón peso hígado/número de núcleos, que nos indica también el decrecimiento del tamaño celular. Sin embargo, el descenso, es en este caso, sólo de un 24% en relación al control, como podemos apreciar en la Tabla 6, es decir, menor que el encontrado para la razón proteína/DNA. Ello nos señala a nuestro juicio, la existencia de componentes celulares que se encuentran en mayor cantidad que la proteína y que enmascaran el profundo descenso de este sustrato. Al igual que hemos discutido previamente, consideramos la posible existencia de un acúmulo de grasa del hígado, lo que determinaría el incremento del índice hepatosomático como de la razón peso órgano/número de núcleos.

De lo señalado anteriormente, se deduce que la intensidad del déficit dietario (1% de proteína) junto a la prolongación del mismo, son factores primordiales para el profundo efecto de



desgaste encontrado en el proceso de crecimiento hepático y en el que se involucran, según hemos comprobado, tanto el número de células como su tamaño.

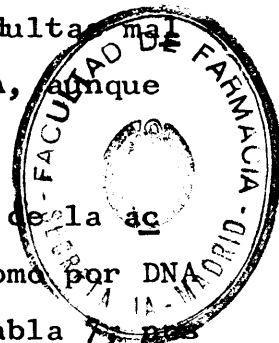
Ahora bien, debemos también tener en cuenta la etapa de desarrollo en la que se encuentran los animales en estudio, puesto que la consideramos fundamental para explicarnos los resultados obtenidos. También para Jasper (111), constituye un determinante crítico de los efectos de la malnutrición sobre el crecimiento celular.

Las ratas en experiencia cuya edad oscila entre 60 y 100 días de vida, se encuentran según Leblond (132) en un período de crecimiento de carácter hipertrófico, aunque todavía existe formación de nuevas células.

Por ello pensamos, que la atrofia y la aplasia encontradas en nuestros datos, coinciden justamente con este período, puesto que incluso la pérdida del tamaño celular (atrofia) es más intensa en razón a ser muy lábil el depósito de sustratos citoplasmáticos en este momento. De acuerdo con esto Winick y Noble (306), indican que cuando la malnutrición se impone durante el período hipertrófico del crecimiento, cesa de inmediato el aumento de tamaño celular.

Asímismo Campbell (32), trabajando con ratas adultas malnutridas, no encuentra variación alguna en la tasa de DNA, aunque sí se modifica el tamaño de los hepatocitos.

En otro orden de cosas, el importante descenso de la actividad del enzima DNasa en el órgano total (74%), así como (66%) respecto al control, como podemos observar en la Tabla 7, indica la pérdida del enzima durante la deplección proteica, que es mucho más intensa que la del nucleótido. Sin embargo, su actividad catabólica no se modifica en estas condiciones, puesto que la

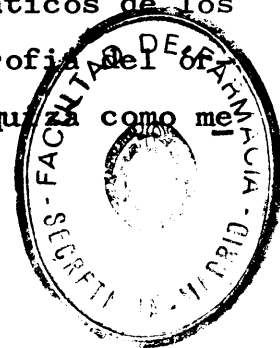


tasa de DNasa/mg de proteína no sufre alteración, lo que demuestra que la pérdida de DNA no depende de un aumento en su degradación, a través de la acción enzimática de la DNasa. Podemos pues, sugerir de acuerdo con Dallman (61) que la menor tasa de DNA en estos animales se debe más bien a una disminución en su formación, que al incremento del catabolismo.

Así, este autor (62) encuentra un decrecimiento en la tasa de síntesis de DNA en ratas sometidas a malnutrición proteica, la cual se prolonga durante los 14 días del estudio. En el mismo sentido Motecuccoli (167) señala una actividad específica de DNA reducida, en ratas con las mismas condiciones dietarias.

Podríamos pensar que la disminución en el proceso degradativo del DNA sería una reacción del hígado, a fin de proteger la tasa de DNA, depleccionada por la dieta, impidiendo su eliminación. A este respecto, Castro (36) indica que el porcentaje de DNA susceptible de digestión por nucleasa microcócica "in vitro", varía en función de la dieta.

De todo ello se deduce, por lo tanto, que la sensibilidad del hígado a la dieta deficiente en proteína, determina efectos drásticos sobre los componentes nucleares y citoplasmáticos de los hepatocitos, que conducen a fenómenos de aplasia y atrofia del órgano. Sin embargo, el catabolismo del DNA se reduce, que ta como mecanismo protector frente a la deficiencia.



5.4.- EFFECTO DE LA DEFICIENCIA EN PROTEINAS DIETARIAS SOBRE EL METABOLISMO DEL RNA.

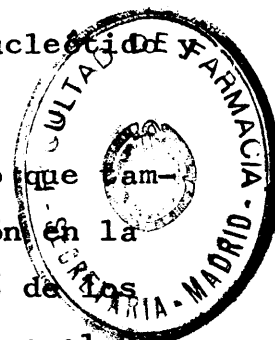
5.4.1.- VARIACIONES EN RNA TOTAL, RNA/DNA, RNA/PROTEINA Y ACTIVIDAD RNasa ACIDA (Tablas 8 y 9).

De modo similar a la deplección provocada sobre el crecimiento celular, el déficit dietario en proteínas, conduce a una profunda alteración del metabolismo del RNA hepático. La tasa del nucleótido en el hígado total, desciende un 58% con  $P < 0,001$ , como podemos observar en la Tabla 8, sobre los valores basales, de acuerdo con los datos de Winick y Noble (306) quienes indican que en las mismas condiciones experimentales, se produce una pérdida del 50% en RNA. Esta caída está relacionada según Enwonwu (81) (79), con la disgregación de los polisomas, producida a consecuencia de la degradación incrementada del RNA ribosómico, lo que da lugar a la aparición en forma de dímeros y monómeros de un 50% del contenido en ribosomas.

Clark (38) indica, que esta reducción del contenido hepático en RNA, se debe a un catabolismo acelerado del nucleótido y no a una reducción en la síntesis.

No sólo decrece el RNA en el órgano total sino que también lo hace por célula. Esto se deduce de la disminución en la razón RNA/DNA ( $P < 0,001$ ), la cual llega a ser de un 45% de los controles, según se indica en la Tabla 8 y nos sugiere que el RNA es uno de los componentes citoplasmáticos perdidos durante la malnutrición. Este mismo dato es señalado por Millward (157) en hígado de ratas alimentadas con dietas sin proteína.

Sin embargo, la caída en RNA es menor que la producida en el contenido proteico, por lo que la relación RNA/proteína re-



sulta en un 37% superior al existente en las ratas balanceadas, con valores que llegan a  $43,53 \pm 2,84$  (Tabla 8).

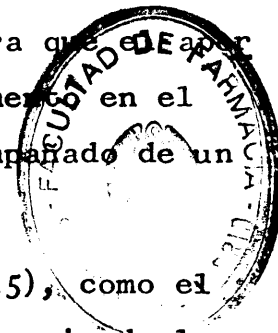
Dado que esta razón nos señala, según Millward (159), la capacidad de síntesis proteica, su incremento nos sugiere la conservación de la potencialidad funcional de la célula, pese a la deplección del órgano. Por consiguiente, a los 30 días de un régimen bajo en proteínas, parece incrementarse la capacidad de formación de este sustrato. Este aumento en la razón RNA/proteína también se relaciona con una elevación en el RNA total del hígado a lo largo de la malnutrición, lo que ha sido señalado por Rozovski (233), aunque siempre por debajo de los niveles basales, debido al aumento en la síntesis de RNA durante estas condiciones.

En este sentido, Quirin-Stricker (218) ha señalado que la actividad específica del RNA total hepático en ratas sometidas a carencia proteica, durante dos a cuatro semanas, es aproximadamente dos veces superior a la encontrada en hígado de ratas normales.

Además Stenram (264), por su parte, demuestra que, aparte de una dieta prolongada sin proteínas, causa un aumento en el tamaño de los nucleolos de las células hepáticas, acompañado de un incremento del contenido en RNA nucleolar.

Este resultado es interpretado por Lewis (135), como el incremento de la síntesis del RNA nucleolar, a consecuencia de la disminución de la proteína dietaria.

Por otra parte, de nuestros resultados deducimos, que el mantenimiento de la tasa de RNA resultante, se debe no sólo a un probable aumento de su síntesis, sino también a la activación de su catabolismo. En efecto, a pesar de la disminución muy significativa ( $P < 0,001$ ) en la actividad de RNasa ácida total (58%) así como en la celular (RNasa/DNA, 46%) en relación con los controles,

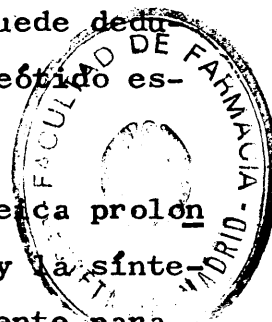


el incremento del 37% encontrado en la razón RNasa/mg proteína, nos induce a pensar en el aumento de la activación de su función degradativa (Tabla 9).

También Girija (95) y Rosso (231) encuentran una elevación en la actividad de ribonucleasa alcalina en estas condiciones. Este último autor (230), indica además que el incremento del enzima está mediado aparentemente, por una reducción marcada de su propio inhibidor y no por el aumento de su síntesis. Además, de acuerdo con el postulado de Kraft (126), según el cual, un sistema inhibidor-RNasa podría regular la cantidad de RNA, influyendo sobre la tasa de degradación del mismo, se puede sugerir, que incrementos de RNasa darán lugar a la disminución del contenido celular de RNA.

Sin embargo, en nuestro estudio la acción catabólica del RNA no parece predominar sobre su síntesis, puesto que la invariabilidad de la razón RNasa/RNA en relación a los controles ( $P > 0,05$ ) nos señala un equilibrio entre ambos componentes y se puede deducir, que tanto la síntesis como la degradación del nucleótido están niveladas en el período de la experiencia.

Por consiguiente, durante la deficiencia proteica prolongada parece existir un equilibrio entre el catabolismo y la síntesis de RNA que determina un nivel del nucleótido suficiente para mantener la síntesis proteica.



## 5.5.- EFFECTO DE LA DIETA RESTRINGIDA SOBRE EL CRECIMIENTO HEPATICO

### 5.5.1.- VARIACIONES EN PESO, PESO ORGANO/PESO CORPORAL Y PROTEINA SOLUBLE (Tabla 5).

La pérdida de peso hepático provocada por la ingestión de un 50% de la dieta control, es de la misma magnitud que en el caso de la deficiencia proteica.

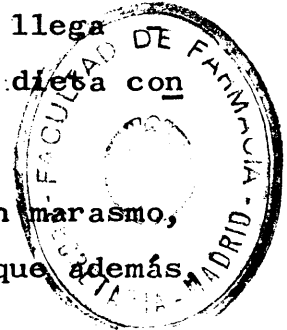
Sin embargo, la razón peso hígado/peso corporal es menor significativamente que la encontrada para la dieta baja en proteína, e igual al índice de las ratas con dieta balanceada, según se puede apreciar en la Tabla 5 ( $P^* < 0,001$ ).

Ello nos pone de manifiesto que en nuestras condiciones experimentales, el decrecimiento del hígado es paralelo al del cuerpo y que por lo tanto, los sustratos celulares se pierden, sin que aparezca la degeneración grasa. A los mismos resultados llega Anthony (9) utilizando ratas restringidas al 25% de una dieta con con teniendo un 18% de lactalbúmina.

También Waterlow (291) indica que en niños con marasmo, se pierde menos proteína hepática que en kwashiorkor y que además no se incrementan los lípidos en el órgano.

Sin embargo, la caída proteica es en nuestra situación experimental, muy significativa (61%) en relación a los niveles con troles ( $P^* < 0,001$ ), como figura en la Tabla 5, y aunque menor que la encontrada en las ratas proteín-deficientes ( $P^* < 0,01$ ), su entidad se puede considerar de la misma magnitud.

Disminuciones en la tasa proteica hepática, son citadas por Coward (52) en hígado de ratas sometidas a dietas restringidas de distinto valor proteico y señala, que la pérdida llega a ser del



60% a las dos semanas de una dieta muy severa. La causa inmediata de la deplección parece ser el incremento en la tasa del catabolismo, puesto que durante períodos prolongados del déficit, la velocidad de síntesis fraccional proteica según Millward y Bates (161) se conserva a niveles normales, lo que ha sido comprobado por nosotros y discutiremos más adelante.

Por consiguiente la ingesta de la dieta restringida, conduce por la disminución combinada de proteínas y calorías, a una pérdida de la proteína del hígado similar a la del déficit proteico experimentado.

Este resultado puede depender del mantenimiento de la síntesis proteica, gracias al acceso al hígado de aminoácidos de procedencia muscular en estas condiciones, como señala Jaya Rao (112).

#### 5.5.2.- VARIACIONES EN DNA, PROTEINA/DNA, TAMAÑO CELULAR, NUMERO DE NUCLEOS Y ACTIVIDAD DNasa ACIDA (Tablas 6 y 7).

Los efectos sobre el hígado de la ingestión de la dieta deficiente en proteínas y calorías, están ligados a alteraciones en el crecimiento a nivel celular, las cuales son diferentes de las encontradas con la deficiencia proteica.

La dieta restringida no determina variación alguna en la tasa de DNA, ni en el número de núcleos del hígado, cuando se compara con controles, según indica la Tabla 6. Por consiguiente, no parece afectarse en este caso ni el número de células ni su dotación cromosómica.

También en ratas con dieta restringida, Anthony (9) señala un alto contenido en DNA/g de hígado, aunque el DNA total no se modifica a las ocho semanas de experiencia, lo que está de acuerdo con nuestros datos.

Sin embargo, Winick y Noble (306) en ratas alimentadas con la mitad de la ingesta normal durante tres ó seis semanas, en encuentran una disminución del DNA hepático, que no se corrige por realimentación.

Sin embargo, la drástica caída encontrada en las razones proteína/DNA (61%) y peso hígado/número de núcleos (38%) con relación al control, según se reseña en la Tabla 6, nos indican que el tamaño de la célula sufre una involución por pérdida de constituyentes celulares, tanto proteicos como de otra naturaleza, aún cuando la proteína es la más afectada.

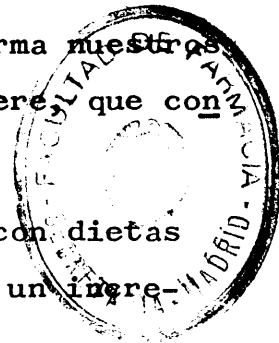
La deplección hepática es pues, en este caso consecutiva a una atrofia, por disminución del tamaño celular.

Esta disminución en el tamaño de las células hepáticas, es también indicada por Anthony (9) quien indica además, que la proteína ingerida es utilizada en este caso como fuente de energía, llegando su caída a las mismas tasas que en ratas que consumen una dieta al 1% de lactalbúmina "ad libitum", lo cual confirma nuestros datos. También en niños con marasmo Jaya Rao (112) sugiere, que consumen sus propios tejidos como fuente de energía.

Por el contrario, Graystone (100) indica que con dietas bajas en energía pero adecuadas en proteína, se produce un inere-mento del tamaño de las células hepáticas.

A nuestro juicio, la atrofia post-dieta restringida, se debe basicamente a la mayor labilidad en que los sustratos citoplasmáticos se encuentran en la etapa de desarrollo de los animales de experimentación, al igual que ya se ha indicado durante deficiencia proteica.

Por otro lado, la atrofia se acompaña de una pérdida enzimática de DNasa por órgano total (67%), así como por DNA (66%),



como se puede observar en la Tabla 7, en relación a las ratas bien nutridas, al igual que señalamos en deficiencia proteica.

Sin embargo, dado que la actividad por mg de protefna no se modifica, podemos establecer que el catabolismo del DNA no se afecta por la dieta restringida y concuerda con la tasa del nucleóo tido no modificada en el proceso.

Por consiguiente, el DNA se hace poco susceptible a la acción de la nucleasa de acuerdo con Castro (36), quien indica que las dietas bajas en carbohidratos y sin protefnas, disminuyen la cantidad de DNA capaz de degradarse por la nucleasa microcócica.

## 5.6.- EFFECTO DE LA DIETA RESTRINGIDA SOBRE EL METABOLISMO DEL RNA

### 5.6.1.- VARIACIONES EN RNA TOTAL, RNA/DNA, RNA/PROTEINA Y ACTIVIDAD RNasa ACIDA (Tablas 8 y 9).

La tasa de RNA total hepático, desciende un 63% a consecuencia de la restricción dietaria en calorías y proteínas, respecto a controles, según se puede observar en la Tabla 8 ( $P < 0,001$ ). De acuerdo con esto, Winick y Noble (306) en ratas alimentadas con el 50% de la dieta normal, encuentran una reducción del RNA hepático, que no se corrige después de la realimentación. Asimismo, - Garlick (93) en ratas en ayuno, durante períodos cortos de tiempo, encuentra una disminución de la tasa de RNA/g de hígado. El decremento parece estar ligado según Hirsch y Hiatt (108) a un aumento del catabolismo del RNA, puesto que la velocidad de degradación fraccional del RNA se incrementa, mientras que la de la síntesis desciende en hígado de ratas sometidas a ayuno. Sin embargo, como más adelante discutimos, en el período del estudio, la degradación del RNA no parece estar aumentada en nuestras condiciones experimentales.

Por otra parte y al contrario de lo señalado para el déficit proteico, la razón RNA/proteína, se mantiene a nivel control (Tabla 8), lo que nos indica que la pérdida del nucleótido es proporcional a la de la proteína, al igual que señala Millward (159) en ratas en ayuno.

Además, considerando a esta razón RNA/proteína como un índice de la síntesis proteica, su invariabilidad parece señalar el mantenimiento de su función a pesar del déficit.

Por otra parte, la pérdida de ambos sustratos, proteína

y RNA, contribuye a la deplección citoplasmática y confirma la disminución del tamaño celular y la atrofia del órgano ya citados. Este efecto, se demuestra claramente por la disminución de la razón RNA/DNA, la cual desciende un 63% sobre los valores basales, según indica la Tabla 8 y nos señala la profunda caída de la tasa del nucleótido por célula y con ella la deplección del contenido citoplasmático ( $P'' < 0,001$ ).

El decrecimiento de la razón RNA/DNA en comparación con las ratas deficientes en proteína ( $P' < 0,001$ ), demuestra una menor cantidad de RNA/célula en este caso, lo que se corresponde con un número proporcionalmente mayor de células, puesto que no existe aplasia en estas condiciones (Tabla 8).

Además, de nuestros resultados deducimos que, a los 30 días de experiencia disminuye el proceso degradativo del RNA, puesto que existe una menor actividad de RNasa. Este dato se observa en la RNasa total (70%), en RNasa/mg de proteína (21%) y en RNasa/DNA (68%), según señala la Tabla 9, siempre en relación a valores basales, lo que parece indicar una pérdida de la actividad catabólica del enzima. Por lo tanto, a nuestro juicio, la acción degradativa de la RNasa sobre el RNA cae en el período del estudio, lo que parece señalar una posible disminución en el turnover del RNA.

Sin embargo, la relación RNasa/RNA no sufre variación alguna, al comparar con controles ( $P'' > 0,05$ ), lo que significa que ambos parámetros decrecen de forma paralela.

Onishi (194), por su parte, tampoco encuentra variaciones en la actividad RNasa libre ó total, en hígado de ratas con inanición y después de sufrir la pérdida del 20 al 25% de peso corpo-

ral, junto con la caída del RNA citoplasmático.

Consideramos pues, que en contraste con los resultados obtenidos con la dieta deficitaria en proteínas, la restricción al 50% de la dieta control, determina una disminución en el catabolismo del RNA, con pérdida de la actividad de RNasa. Ello podría colaborar para mantener constante la razón RNA/proteína, a pesar de la caída en la tasa del nucleótido.

5.7.- EFFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA Y LA RESTRICCIÓN EN LA DIETA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS HIDROLASICOS: FOSFATASA ALCALINA, FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA.  
(Tablas 10 y 11).

No sólo se modifican las actividades de nucleasas durante el déficit dietario, sino que otros enzimas lisosómicos como fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y  $\beta$ -glucuronidasa también sufren variaciones significativas a consecuencia del efecto de la eliminación de sustratos adecuados.

Si consideramos la actividad enzimática en valores absolutos, es decir, expresados por órgano total, vemos que tanto la fosfatasa ácida como la  $\beta$ -glucuronidasa disminuyen drásticamente ( $P < 0,001$ ), en especial en las ratas con dieta deficiente en proteína (Tabla 10). Ello se debe a la deplección celular, que determina la pérdida de sustratos citoplasmáticos y la disminución del tamaño celular.

Por el contrario, la actividad de fosfatasa alcalina, se incrementa muy significativamente sobre sus niveles basales ( $P < 0,001$ ), destacándose así como una de las hidrolasas más activas en tejido hepático, durante la malnutrición. Dicho aumento es más acusado en los animales que consumen la dieta pobre en proteínas.

No obstante, es la elevación de la actividad enzimática, en términos relativos, es decir, expresados por mg de proteína (Tabla 11), la que nos indica el incremento en la capacidad degradativa de las hidrolasas estudiadas. Estos enzimas, por lo tanto, participan en la formación del nuevo "status" celular, que se produce a consecuencia de la adaptación a la dieta y que determina un incremento del catabolismo tisular. Se destacan de este modo, los enzimas lisosómicos, como los mediadores en el proceso degradativo

que tiene lugar en el hepatocito a consecuencia de la malnutrición.

A este respecto Adibi (2) señala que el aumento en el catabolismo de la protefna hepática, se relaciona con la pérdida de la concentración de los aminoácidos hepáticos, en respuesta a una dieta baja en proteínas.

De nuestros datos deducimos que en consecuencia, la disminución de las proteínas y/ó calorías dietarias, determina un aumento del catabolismo en hígado, a través de la actividad incrementada de los enzimas hidrolásicos.

A la misma conclusión llega Srivastava (263). También Pokrovsky (210) indica que las actividades de los enzimas lisosómicos se incrementan durante malnutrición y sugiere que intervienen en la remodelación de sustratos, durante el mecanismo de adaptación a la dieta. En el mismo sentido Ward (283), atribuye a estos enzimas un papel regulador en el turnover proteico, a través de cambios en la tasa del catabolismo.

Inciendiendo en este punto Krustev (128) por su parte, señala que a medida que se prolonga la dieta deficitaria, aparecen en el hígado señales de autolisis, con una gran alteración en el sistema lisosomal, lo que contribuye a la involución celular. Sin embargo, también indica que la actividad autofágica puede a su vez, determinar un proceso de adaptación y reconstrucción del hepatocito.

Por su parte, nuestros resultados indican que el enzima hidrolítico más activo en hígado durante malnutrición proteica es la fosfatasa alcalina, la cual se incrementa tanto por órgano - (157%) como por mg de protefna (684%) (Tabla 11), en relación a los valores controles. Dado que según Lundgreen (141), la fosfatasa alcalina es inducida durante el retardo en el crecimiento, producido por la administración de hidrocortisona en fibroblastos de

feto humano, es posible que el incremento en su actividad, contribuya a retardar el crecimiento en las ratas malnutridas y que el mecanismo pueda estar mediado por los glucocorticoides. Este efecto inductor de la hidrocortisona sobre el enzima fosfatasa alcalina, ha sido también observado en cultivos de células Hela por La-Litha (129).

Asimismo, en nuestro laboratorio (182) hemos observado una elevada actividad de fosfatasa alcalina en timo y bazo de ratas con malnutrición proteica.

Por otra parte, la intervención de la fosfatasa ácida en el proceso es de mucha menor entidad en nuestras condiciones experimentales, puesto que los valores relativos, aunque elevados, no son significativos (Tabla 11). Ello, contrasta con los resultados obtenidos por Roobol (229) y Pokrovsky (211) en ratas malnutridas, quienes indican una elevación de la actividad de fosfatasa ácida tanto durante déficit proteico como calórico-proteico. Este mismo resultado ha sido encontrado por nosotros (182) en bazo de ratas sometidas a una dieta baja en proteína.

Por su parte, el incremento en la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa/mg de proteína (Tabla 11), nos señala su intervención en el fenómeno adaptativo a la dieta, alcanzando sus valores más altos en las ratas con dieta restringida (89%) en comparación con controles ( $P < 0,001$ ). También, en estados de malnutrición proteica, Pokrovsky (212) encuentra en hígado de ratas, una elevación de hasta un 60% en la actividad de este enzima, lo que coincide con nuestros datos (59%). Sin embargo, Krustev (128) en estudios histológicos, señala que después de 20 días de subnutrición, disminuye la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa, contenida en los numerosos lisosomas secundarios existentes.

El aumento de  $\beta$ -glucuronidasa, no sólo señala su parti

cipación en la adaptación a la dieta, sino también, la existencia de un posible daño del hepatocito, a consecuencia de la malnutrición. Canónico (33) a este respecto indica, que la liberación de este enzima se produce a consecuencia de la existencia de daño celular. Por lo tanto, la lesión parenquimatosa que acompaña a la infiltración grasa en el hígado de ratas proteín-deficientes, puede contribuir al aumento de la actividad hidrolásica. Asimismo, pensamos que la alta actividad del enzima en las ratas con dieta restringida, indica una mayor lesión del hepatocito.

Por otra parte, la actividad incrementada de los enzimas hidrolásicos, está relacionada con la disminución de la razón proteína/DNA, antes señalada en ambas dietas deficitarias (Tabla 6), puesto que el aumento del catabolismo favorecería la eliminación de los constituyentes celulares.

De acuerdo con esto Roobol (229) indica que el incremento en hidrolasas lisosómicas, ocurre solamente en tejidos que tienen razones proteína/DNA subnormales.

Por lo tanto, a los 30 días de la disminución en proteínas y/ó calorías dietarias, se incrementa la actividad de los enzimas hidrolásicos del hígado. Estos se convierten así, en mediadores de la reconversión de los sustratos durante el proceso adaptativo, a través del aumento en la actividad degradativa. Además, de los datos se deduce, que el déficit proteico determina un efecto más acusado que la dieta restringida, lo que puede estar relacionado con la necesidad de disponer de aminoácidos para su incorporación a la síntesis proteica, y que podrían proceder de la propia proteína endógena hepática.

Por el contrario, durante la malnutrición proteico-calórica, la síntesis de proteína puede utilizar sustratos extrahepáticos, tanto endógenos como exógenos y por consiguiente, no necesita aumentar tanto la lisis de la propia proteína.

5.8.- EFECTO DE LA DEFICIENCIA PROTEICA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE UREA Y SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE TRANSAMINASAS Y GDH (Tablas 12 y 13).

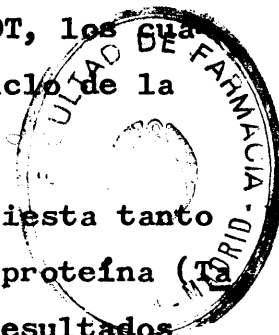
A fin de conservar al máximo la proteína, durante el proceso adaptativo al déficit, el incremento en el catabolismo proteico está contrarrestado por una menor degradación de los aminoácidos a urea. Así, se produce una disminución en la tasa de urea excretada en 48 horas del 86% en relación a controles, como se puede observar en la Tabla 12. Este resultado concuerda con lo señalado por Aebi (4) quien indica una producción mínima de urea de aproximadamente un 25% de los valores controles, en ratas alimentadas con dietas sin proteínas.

También Arroyave (11) en niños con malnutrición proteica, encuentra una baja excreción urinaria de nitrógeno en forma de urea.

Esta disminución en el catabolismo de los aminoácidos se corresponde con una capacidad de transaminación menor, a consecuencia de la caída en la actividad de los enzimas GPT y GOT, los cuales permiten la entrada de los grupos amino hacia el ciclo de la ornitina para formar urea.

El decrecimiento de dicha actividad, se manifiesta tanto en valores por órgano total (Tabla 12), como por mg de proteína (Tabla 13) de ambos enzimas y el mismo, coincide con los resultados encontrados por Schinke (243) en hígado de ratas alimentadas con dietas sin ó con un bajo contenido en proteínas. Estas mismas variaciones son señaladas por Muramatsu y Ashida (184) en ratas y por Stephen y Waterlow (262) en clínica humana.

Posteriormente Das (63) indica que la disminución de las transaminasas, así como de los enzimas que participan en el ciclo



de la urea, se produce en forma simultánea y que el período que transcorre, para llegar a un nuevo estado estable de los sistemas enzimáticos, después del cambio de una dieta balanceada a otra baja en proteínas, es sólo de seis horas.

Este mismo autor, señala que el mecanismo de adaptación a la dieta deficiente, conlleva cambios enzimáticos para lograr mantener un margen de seguridad, ante la escasez de proteína, con tendencia a la disminución de la pérdida de nitrógeno.

No está muy claro, por otra parte, si la variación enzimática depende de cambios en la cantidad de proteína, como señala Kenrey (117) ó si se producen a consecuencia de la alteración en la síntesis del enzima, como se deduce de los trabajos de Das (63), quien además sugiere que el catabolismo de la misma parece mantenerse durante el proceso.

Por otra parte, la disminución de la actividad de GDH por órgano total (30%) (Tabla 12) está de acuerdo con los datos de Schimke (245) quien encuentra también descensos en la actividad de GDH durante déficit proteico. Por su parte, Cheek y Hill (59), en hígado de ratas malnutridas indican que la actividad de GDH fluctúa con la tasa de RNA, lo que está de acuerdo con nuestros datos. Sin embargo, la actividad del enzima por mg de proteína se incrementa (126%) sobre los basales ( $P < 0,001$ ), según aparece en la Tabla 13, lo que resulta contradictorio con lo antedicho y de no fácil explicación.

Esto es así, puesto que la función primordial de la GDH es la de desaminación del glutamato, el cual a su vez procede de otros aminoácidos, mediante procesos de transaminación.

De ello se deduciría, que la cantidad de glutamato desaminado e incorporado a urea es alto, mientras que la capacidad de transaminación disminuye, lo que no parece concordante.

Por otra parte, la cantidad de nitrógeno que entra en el ciclo de la urea, no sólo depende del sistema degradativo de

los aminoácidos aportados por la dieta, sino también según Das (63), de su competición con los enzimas que catalizan su incorporación a la síntesis de proteínas.

En relación con esto, Mariani (151) encuentra durante el déficit proteico una actividad incrementada de los enzimas activantes de aminoácidos, los cuales aumentan la fracción de los mismos que pueden ser introducidos en la síntesis proteica. Asimismo, en nuestro estudio, ya hemos señalado el posible incremento en la sintesis proteica hepática en estas condiciones, determinado por la elevación en la razón RNA/proteína (Tabla 8).

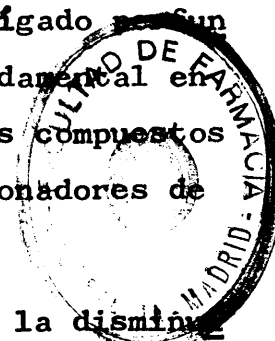
Además puesto que, se efectúa una elevación de la actividad catabólica de las proteínas hepáticas, por la mediación de los enzimas lisosómicos, pensamos que el hígado podría utilizar los aminoácidos procedentes de la degradación de su propia proteína, en la síntesis de nueva proteína, a fin de mantener la función hepática en estas circunstancias.

A este respecto, Parrilla (203) señala en hígado de un muerto de ratas, que la proteólisis es el mecanismo fundamental en la provisión de aminoácidos para la síntesis de varios compuestos nitrogenados, cuando ésta se realiza en ausencia de donadores de nitrógeno.

En otro orden de cosas podemos señalar, que la disminuda actividad de GOT y GPT, también puede estar relacionada con un proceso gluconeogénico, poco activo en los animales proteín-deficientes, a consecuencia de la mayor proporción de hidratos de carbono de la dieta.

De acuerdo con esto, Heard (104) señala, que la vía gluconeogénica es suprimida en estas condiciones.

Además, Broadbent (28) trabajando con ratas sometidas a



dietas bajas en proteínas y altas en carbohidratos, muestran un elevado contenido en la razón de aminoácidos no esenciales/esenciales plasmáticos, lo que según Heard (104) parece depender de la supresión de la gluconeogénesis.

Bajo estas mismas circunstancias, Felig (87) señala la elevación de los niveles plasmáticos de alanina, lo que corresponde a la disminución en el turnover de este aminoácido y concuerda con el descenso encontrado en la actividad de GPT.

Además, Carlberger (34) sugiere que la ingestión de los hidratos de carbono sirve para reducir los requerimientos para gluconeogénesis, resultando en un decrecimiento de la captación por el hígado de la alanina, y la consecuente acumulación de este aminoácido en sangre.

5.9.- EFFECTO DE LA DIETA RESTRINGIDA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE UREA Y SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE TRANSAMINASAS Y GDH. (Tablas 12 y 13).

La excreción de urea en los animales sometidos a la dieta restringida es un 47% menor que en controles, como se puede apreciar en la Tabla 12.

Esta disminución en la urea excretada por orina, significa la tendencia del hígado a impedir la degradación de los aminoácidos y por consiguiente, el ahorro de la proteína. Sin embargo, en períodos de ayuno, Schinke (245) señala un incremento tres veces superior al control de la concentración de los enzimas involucrados en la síntesis de urea, con el consiguiente aumento en la excreción de la misma.

Para este autor, la proteína se pierde a consecuencia de que las necesidades energéticas en la primera etapa de la inanición se derivan de la grasa ó de los hidratos de carbono ingeridos.

Sin embargo, nuestros resultados, creemos que dependen básicamente de la prolongada ingesta de la dieta restringida, la cual provoca en este momento la necesidad del ahorro de la proteína, al no tener suficiente cantidad de otros principios inmediatos para utilizarlos en el suministro de energía. De acuerdo con esto, Felig (84) indica que durante ayuno prolongado de días ó semanas, la supervivencia depende de la minimización del catabolismo proteico, puesto que la pérdida de un tercio a un medio del almacén de la proteína corporal, da lugar a la muerte del animal. Según este mismo autor (87), esta variación en el metabolismo nitrogenado corresponde a las últimas etapas de la inanición.

Por su parte Owen (196) señala que la disminución en el catabolismo protéico, se pone de manifiesto por un fallo en la ex



creción urinaria de nitrógeno, lo que está de acuerdo con nuestros datos.

En este caso, la actividad de los enzimas de la transamnación GOT y GPT, así como de la GDH, sufren una disminución, considerados sus valores en términos absolutos, como se refleja en la Tabla 12, a consecuencia de la deplección de los constituyentes intracitoplasmáticos hepáticos por la dieta.

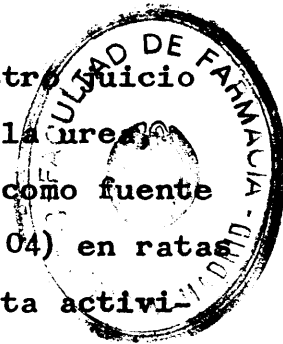
Sin embargo, considerados en valores relativos, es decir, por mg de proteína, todos ellos se incrementan significativamente con relación a controles (Tabla 13). El aumento es de un 76% en la GOT ( $P < 0,001$ ), de un 47% en GPT ( $P < 0,001$ ) y de un 84% en la GDH ( $P < 0,001$ ).

En este mismo sentido, Soberon (257) y Brin (27) encuentran una alta actividad de GPT y GOT en ratas en ayuno, mientras que Allard (6) señala la elevación de la GDH en las mismas condiciones. Asimismo, Cheek y Graystone (58) indican también incrementos de GDH en ratas con restricción calórica, pero con ingesta proteica adecuada.

Este incremento enzimático, no depende a nuestro juicio de la intervención de estos enzimas en la formación de la urea, sino en su función en la conversión de los aminoácidos como fuente energética, por la vía gluconeogénica. También Heard (104) en ratas alimentadas con una dieta restringida, encuentra una alta actividad de la alanina-aminotransferasa y de aspartato-aminotransferasa y lo relaciona con una elevada gluconeogénesis.

Por su parte, Broadbent (28) señala su dependencia con un valor normal de la razón aminoácidos no esenciales/esenciales plasmáticos y una disminución específica en la alanina plasmática.

La alanina parece proceder en períodos de inanición se-



gún Snell (255), a partir de la proteólisis muscular, de donde es liberada a la circulación, para poder ser utilizada en el hígado mediante gluconeogénesis.

También Felig (86) señala, que los aminoácidos alanina y glutamato son sintetizados "de novo" en el músculo y que la producción de alanina muscular, juega un papel importante en el mantenimiento de la glucosa plasmática. Sobre esta base, Felig (85), (87) y Mallette (149), proponen la existencia de un ciclo de la glucosa-alanina, en el cual la alanina transporta los grupos amino, derivados del metabolismo de aminoácidos musculares al hígado, para su conversión en urea y glucosa.

Sin embargo, también Felig (86) indica, que durante la inanición prolongada, se produce además de la disminución en el catabolismo proteico, una disminución de la gluconeogénesis con una menor captación hepática de alanina y el decrecimiento consecutivo de este aminoácido plasmático.

Esta idea está en discrepancia con los elevados niveles de GOT y GPT encontrados, los cuales pueden sin embargo, ser consecuencia de los niveles calórico-proteicos de la dieta utilizada y que en contraste con el ayuno total, puede determinar, el mantenimiento de suficientes sustratos proteicos todavía, para su utilización energética.

A este respecto, Felig (86) señala que el límite de la disminución en la gluconeogénesis por ayuno prolongado, parece estar determinado por la viabilidad de los sustratos con el fin de entrar en el proceso y no por la inhibición en los enzimas hepáticos involucrados en el mismo.

De todo lo que hemos expuesto, se deduce por consiguiente, que la restricción dietaria en calorías y proteínas, durante

30 días, conduce a una disminución de la degradación de aminoácidos en el hígado, con la aparición de una menor excreción urinaria de urea. A esto se le añade, un posible aumento de la transformación de los aminoácidos extrahepáticos en glucosa, como fuente energética.



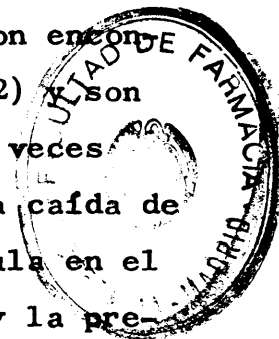
5.10.- EFECTO DEL DEFICIT PROTEICO Y DE LA DIETA RESTRINGIDA SOBRE LAS PROTEINAS TOTALES PLASMATICAS Y SUS FRACCIONES (Tablas 14 y 15).

Uno de los índices esenciales que denota el estado de malnutrición, es la existencia de hipoalbuminemia. La menor cantidad de albúmina plasmática determina a su vez, el mayor porcentaje en la pérdida de proteínas plasmáticas, que se produce en estas condiciones.

Nuestros resultados coinciden plenamente con la literatura (Pain (199); Kirsch (123) y Waterlow (293) y basados en ella, creemos que la disminución de las proteínas totales plasmáticas, depende básicamente de una disminución en la síntesis de proteínas exportables, que se produce en el hígado a consecuencia de la deplección, especialmente de síntesis de albúmina. A este respecto, Alberts (5), señala que su disminución, depende de la menor estabilidad del RNA mensajero, formador específico de albúmina.

Una severa hipoproteïnemia e hipoalbuminemia son encontradas normalmente en kwashiorkor, como señala Coward (52) son factores desencadenantes del desarrollo del edema, que a veces acompaña al síndrome. Así, según Alleyne (7) aparece una caída de la presión oncótica del plasma. A su vez el agua se acumula en el espacio extracelular, que compromete el débito cardíaco y la presión de perfusión e incrementa la presión tisular, con la retención sódica consiguiente y la aparición del edema.

Esta situación para Mulrow (172), no difiere de la encontrada durante estados edematosos asociados a enfermedades hepáticas crónicas, en las cuales el defecto, no es una deficiencia de aminoácidos, sino una destrucción del retículo ergastoplásmico del hepatocito con lo que se reduce su capacidad para sintetizar proteínas plasmáticas.



Whitehead y Alleyne (298) sugieren que la hipoalbuminemia es el resultado de un alto contenido en carbohidratos en la dieta, los cuales, induciendo la liberación de insulina, causan una distribución preferencial del limitado aporte de aminoácidos hacia el músculo, mientras que el hígado queda depleccionado y comprometida su síntesis.

Sin embargo, datos de nuestro laboratorio muestran que la tasa proteica muscular, desciende muy significativamente en las ratas proteín-deficientes, lo que no se corresponde con lo anteriormente dicho.

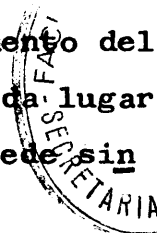
En este sentido, Coward (53) señala reducciones no compensadas en la tasa de síntesis y catabolismo muscular en estados de restricción proteica severa, lo que parece coincidir con nuestros datos.

Por otra parte, la ingesta de la dieta restringida, no determina variación alguna, ni en la tasa total de proteínas plasmáticas, ni en la concentración de albúmina (Tabla 14).

Este resultado está en consonancia con las observaciones de Jaya Rao (112), quien indica el efecto protector del aumento del catabolismo muscular, producido en estas condiciones y que da lugar a un aporte suficiente de aminoácidos al hígado, el cual puede sin tetizar albúmina.

Asimismo, Millward (162) señala que este incremento en la degradación de la proteína muscular viene proporcionado por una razón alta de cortisol/insulina en plasma.

El resto de las fracciones proteicas (Tablas 14 y 15), sufren también una clara disminución, tanto durante deficiencia proteica como calórico-proteica, a excepción de la  $\alpha_2$ -globulina cuyos valores se mantienen en este último caso (Tabla 15).



De acuerdo con estos datos en niños con malnutrición proteico-calórica, Monckeberg (164) y Senecal (252) encuentran una menor tasa de  $\beta$ -globulinas, mientras que Coward (50), también en niños con kwashiorkor señala pérdidas en la concentración de  $\alpha_2$  y  $\beta$ -globulinas.

Teniendo en cuenta que las  $\beta$ -lipoproteínas, forman parte de la fracción de las  $\beta$ -globulinas, debemos señalar que en estudios previos (238) hemos encontrado una clara disminución de las lipoproteínas LDL y VLDL durante malnutrición proteica. También Flores (89) indica este descenso en procesos de kwashiorkor. Ello nos sugiere, que dicha pérdida puede relacionarse con la acumulación de grasa en el hígado, como consecuencia de una menor síntesis de las lipoproteínas transportadoras y contribuir así al aumento de la razón peso hígado/peso total, en los animales con deficiencia proteica.

Por otra parte, la disminución en la tasa de gammaglobulinas, puede depender de una menor actividad secretora por parte de las células plasmáticas, productoras de las mismas. Además, del resultado se deduce que los animales en estudio no parecen presentar ningún proceso de carácter infeccioso. A este respecto, Dricot (76) indica que en niños malnutridos aparecen concentraciones incrementadas de gammaglobulinas. Coward (51) señala, además, que existe una relación recíproca entre la albúmina sérica y la concentración global de globulina, provocada precisamente, por el aumento de esta fracción.

Sin embargo, los datos son conflictivos, puesto que también Cooper (47), Kenney (118) y Nalder (186) encuentran tasas de crecientes de  $\gamma$ -globulinas en malnutrición, lo que está de acuerdo con nuestros datos.



## RESPUESTA METABOLICA DEL HIGADO A LA ADMINISTRACION ANTIGENICA

La administración de eritrocitos de carnero por vía intravenosa produce cambios muy profundos sobre el crecimiento y metabolismo proteico hepático, tanto en animales alimentados con la dieta balanceada como en sometidos a deficiencia dietaria, no obstante, estas variaciones son muy distintas, dependiendo de la dieta de que se trate como veremos en esta discusión.

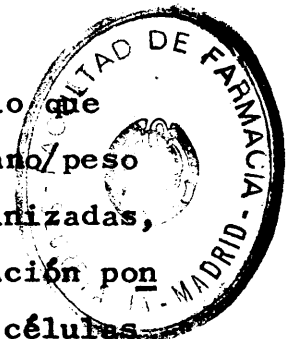
### 5.11.- EFFECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE EL CRECIMIENTO HEPATICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA BALANCEADA

#### 5.11.1.- VARIACIONES EN PESO, PESO ORGANO/PESO CORPORAL Y PROTEINA SOLUBLE (Tabla 16).

Los índices relacionados con el crecimiento del hígado, nos señalan que la inmunización conduce al incremento ponderal del órgano, el cual es paralelo al aumento en el peso corporal y por consiguiente a la aparición de hepatomegalia.

Sin embargo, el hígado alcanza un mayor desarrollo que el cuerpo durante el proceso, puesto que la razón peso órgano/peso animal se hace un 20% mayor que las ratas controles no inmunizadas, como podemos observar en la Tabla 16 ( $P_A < 0,01$ ). Esta variación ponderal, se relaciona a su vez con un incrementado número de células así como, con cambios metabólicos que afectan, como después veremos, a la función de aclaramiento del antígeno.

En apoyo de estos datos, Seidel (250) señala que en ratos CBA/J infectados con virus de leucemia, se produce un aumento del peso y del tamaño del hígado y lo relaciona con una capacidad fagocítica incrementada. Asimismo, Kokoshis (125) encuentra un aumento ponderal hepático, después de la administración de glucano.



La hepatomegalia está además correlacionada según Squibb (260) con el grado de complicación de la enfermedad y es independiente de la ingesta.

Sin embargo, y a pesar del aumento en peso, la proteína hepática no se modifica en nuestro estudio (Tabla 16).

Por el contrario, en pollos infectados con *Mycobacterium avium*, Squibb (260) encuentra junto a hepatomegalia, un incremento en la tasa de proteínas y lo relaciona con una elevada síntesis proteica. A resultados similares llega Powanda (214) quien indica, que este aumento se lleva a cabo, a fin de favorecer la producción de proteínas tanto estructurales, como citoplasmáticas y exportables que colaboran en el proceso defensivo. En este mismo sentido, en trabajos anteriores (183), utilizando ratas alimentadas con dieta stock, se ha encontrado en nuestro laboratorio un aumento en la tasa proteica en hígado, después de la administración de eritrocitos isólogos.

#### 5.11.2.- VARIACIONES EN DNA, PROTEINA/DNA, TAMAÑO CELULAR, NUMERO DE NUCLEOS Y ACTIVIDAD DNasa ACIDA (Tablas 17 y 18).

La hepatomegalia viene determinada por el aumento del número de células, puesto que la tasa de DNA total del órgano se incrementa en un 53% según se observa en la Tabla 17, sobre los valores controles, lo que significa que durante la inmunización, existe un proceso de hiperplasia, con formación de nuevas células hepáticas, de tipo parenquimatoso y macrofágico.

Un aumento en la tasa de DNA también ha sido señalado por Squibb (259), en pollos infectados con virus Newcastle y ello le sugiere que el número de células parenquimatosas por gramo de tejido aumenta.

Pensamos que esta elevación de la tasa de DNA, puede estar determinada por un incremento en su formación. A este respecto, Ashworth (12) encuentra un aumento en la captación de timidina tritiada, por células del sistema retículo-endotelial hepático durante estimulación antigénica, lo que parece indicar una mayor actividad sintética.

La aparición de este nuevo componente celular, se acompaña además de un aumento del 53% en el número de núcleos siempre considerando a las células hepáticas como diploides (Tabla 17).

La inmunización por lo tanto, condiciona el desarrollo del hígado, afectando a su cromatina y favoreciendo el aumento en la tasa de división celular.

A nuestro juicio, la hiperplasia viene determinada especialmente, por la aparición de nuevas células del sistema retículo-endotelial hepático, donde tiene lugar la función de aclaramiento del antígeno.

Como es sabido, las células de Kupffer situadas en la periferia de los lóbulos hepáticos, son capaces de captar y eliminar las sustancias nocivas, que acceden por vía intravenosa al hígado. Así, Di Luzio (72) señala, que durante el aclaramiento de varios agentes particulados, se produce un incremento en el número de macrófagos hepáticos, así como un aumento de su función.

También Lozzio (140) señala que el exceso de productos derivados de células rojas, procedentes de un proceso de anemia hemolítica inducida por aminoazobenceno, conduce a una hiperplasia de las células macrofágicas hepáticas y esplénicas.

Además, la replicación local de las células de Kupffer, ha sido señalada por Kelly (116) y por North (190), quien indica que dichas células, se dividen "in situ" en respuesta a Listeria y

confirman la capacidad mitótica de las células del sistema retículo endotelial.

En general, los macrófagos juegan un importante papel en el catabolismo de las células rojas y especialmente, el sistema retículo-endotelial hepático capta según Keene y Jaudl (115), las células rojas más alteradas.

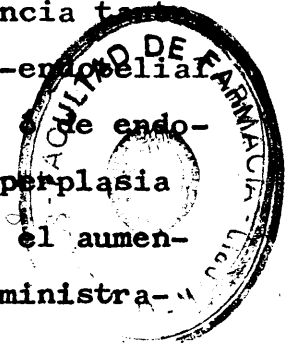
Por otra parte, el hecho de que la tasa proteica no se modifique, lleva a la disminución en la razón proteína/DNA ( $P_A < 0,001$ ), y en consecuencia a la aparición de células con un menor tamaño celular (Tabla 17), lo que para Squibb (260) se relaciona con el índice de gravedad de la enfermedad.

La pérdida de otros sustratos citoplasmáticos también coadyuva al nuevo tamaño celular, como se deduce de la disminución en la razón peso hígado/número de núcleos, en relación con controles, como podemos apreciar en la Tabla 17.

Por consiguiente, pensamos que la multiplicación celular no va acompañada en la misma proporción por la síntesis de sustratos.

Sin embargo, Nothdurft (191) señala la existencia tanto de hiperplasia como de hipertrofia del sistema retículo-endotelial hepático, en respuesta a la administración de estradiol o de endotoxina. También Wooles (309) indica la hipertrofia e hiperplasia de los macrófagos del hígado, lo que se manifiesta, por el aumento en tamaño y peso del órgano, a consecuencia de la administración de glucano.

Por su parte, Squibb (259) indica, que un proceso infeccioso va seguido de un cambio degenerativo de las células de los cordones hepáticos, un incremento en leucocitos de los sinusoides y una hipertrofia de las células de Kupffer; a esto se suma poste



riormente, un aumento en número y tamaño de los hepatocitos.

Junto al incremento del DNA, se produce en hígado una elevación en la actividad de la DNasa ( $P_A < 0,001$ ), tanto por órgano como por mg de proteína, que llega a ser en el primer caso del 48% y en el segundo del 62% en relación al control, mientras que la tasa de DNasa por DNA no se modifica (Tabla 18).

Estos resultados indican la existencia de un proceso degradativo del DNA hepático, activado durante la inmunización. Este aumento en el catabolismo del nucleótido parece señalar, una gran rapidez en la renovación de la cromatina durante el mecanismo de defensa y por consiguiente en el turnover celular.

Por otra parte, también puede estar relacionado con una menor capacidad mitótica en el período considerado del estudio, ya que el incremento en la actividad de DNasa ha sido asimilado por Mayanskaya (154), con una disminución en la tasa de división celular.

De todo lo antedicho puede deducirse, que el incremento en la tasa del DNA hepático, en respuesta a la administración anti-génica, es debido probablemente a un incremento de su síntesis, por encima de la tasa de degradación, puesto que la elevada actividad de la DNasa, impediría el aumento del nucleótido.

5.12.- EFFECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE EL METABOLISMO DEL RNA HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA BALANCEADA

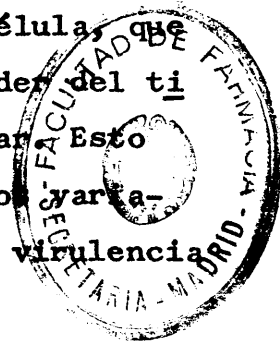
5.12.1.- VARIACIONES EN RNA TOTAL, RNA/DNA, RNA/PROTEINA Y ACTIVIDAD RNasa ACIDA (Tablas 19 y 20).

De forma paralela al incremento en DNA, la inmunización con eritrocitos de carnero (SRBC) provoca en el hígado un aumento del 26% en la tasa de RNA total, en relación al encontrado en las ratas no inmunizadas, como aparece en la Tabla 19. Este resultado parece indicar, una elevación en el contenido ribosómico, a causa probablemente, del aumento en la síntesis del nucleótido. A este respecto, Liu (136) después de un trauma quirúrgico, encuentra un incremento en la agregación de polisomas hepáticos, que se acompaña del aumento en la síntesis del RNA mensajero y del RNA ribosómico, lo que está de acuerdo con nuestros datos.

Sin embargo, la tasa de RNA es menor que la de DNA, pues to que la razón de RNA/DNA, disminuye un 17% en las ratas inmunizadas (Tabla 19).

Este decrecimiento en la cantidad de RNA por célula, que favorece la disminución en el tamaño celular puede depender del tipo de antígeno utilizado y de su capacidad de daño tisular. Esto está de acuerdo con Squibb (260) que encuentra incrementos variables en la razón RNA/DNA, y lo relaciona con el grado de virulencia del antígeno y la raza del animal inoculado.

Por otra parte y correlativamente a la tasa de RNA total, la administración antigénica determina un aumento muy significativo en la relación RNA/proteína hepática, que representa un 43% respecto al control de las ratas no inmunizadas, como se indica en la Tabla 19. Esta elevación parece señalar una mayor capacidad funcio



nal del hepatocito durante el mecanismo de defensa, puesto que dicha razón nos indica la intensidad de la síntesis proteica. También Young (313) sugiere que la síntesis proteica hepática se incrementa durante el stress, mientras que la formación de proteínas musculares pueda estar deprimida.

A nuestro juicio, tanto el aumento en RNA total como la capacidad de síntesis proteica, se corresponden con la hiperplasia hepática ya citada más arriba, en la que están involucradas tanto las células parenquimatosas, como las macrofágicas que intervienen en el proceso fagocítico.

Mediante la elevación en la síntesis proteica, las células parenquimatosas aumentan su dotación en sistemas enzimáticos especializados, cuya función es la reestructuración metabólica del hígado. Entre estos sistemas podemos destacar, por una parte, los que catalizan el incremento en la gluconeogénesis hepática y la formación de urea y por otra, los que intervienen en la remodelación de los sustratos, por medio de su capacidad hidrolítica.

Por lo tanto, la mayor actividad en la formación de proteínas, puesta de manifiesto en nuestro estudio, se orienta básicamente hacia la formación de proteínas citoplasmáticas de carácter enzimático, cuya actividad representa uno de los mecanismos puestos en juego por el tejido hepático en respuesta a la inmunización. En este sentido Beisel (22) (23) indica que en procesos infecciosos, el hígado reordena sus funciones metabólicas en la respuesta secundaria al stress, mediante un aumento en la síntesis acelerada de RNA mensajero productor de enzimas hepáticos intracelulares.

Además, puesto que estos enzimas hidrolásicos están intimamente relacionados con la función de aclaramiento del antígeno, pensamos, que el aumento de la síntesis proteica también determina la hiperfunción del sistema retículo-endotelial hepático. En apoyo

de esta idea Kirkpatrick (122) con inyecciones repetidas de oro coloidal, induce un incremento en el tamaño de las células de Kupffer, con aumento simultáneo de la cantidad de ribosomas y de los sistemas de membrana de su citoplasma. Asimismo, Papadimitriou (200) indica que durante inflamación crónica, los macrófagos y células epiteliales, se acumulan en granulomas y presentan un incremento en la síntesis de RNA, el cual se relaciona especialmente con la síntesis de enzimas lisosómicos.

Una de las actividades enzimáticas lisosómicas modificadas por el antígeno es la de RNasa, la cual aumenta significativamente tanto por órgano (32%) como por mg de proteína (48%) respecto a los valores controles no inmunizados (Tabla 20). Este aumento de la actividad enzimática, que por otra parte no presenta cambios en relación a la tasa de RNA ( $P_A > 0,05$ ), indica el incremento en la degradación del nucleótido en el período del estudio y por lo tanto la existencia de un elevado turnover del RNA durante inmunización.

La actividad de RNasa intervendría así, en el aumento del catabolismo del RNA hepático en respuesta al stress.

Por otra parte, su actividad lítica puede también llevarse a efecto en las células fagocíticas, mediante hidrólisis de las nucleoproteínas de las células rojas administradas, participando en la función de aclaramiento. A este respecto, Meyer (155) señala un incremento en la actividad de este enzima en macrófagos durante fagocitosis.

Por consiguiente, en respuesta al antígeno el hígado parece incrementar, tanto la formación como la degradación del RNA, aún cuando la elevación de la tasa del nucleótido señalaría el predominio de la síntesis sobre el catabolismo.

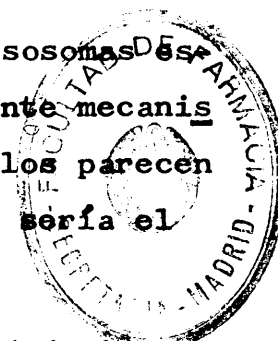
5.13.- EFFECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS HIDROLASICOS: FOSFATASA ALCALINA, FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA BALANCEADA (Tablas 21 y 22).

Como ya se ha visto anteriormente, la inmunización determina un incremento en la síntesis de los enzimas lisosómicos, cuya función primordial es la de intervenir en los procesos degradativos. Este aumento se ve reflejado, no sólo en las actividades de RNasa y DNasa ácidas ya citadas, sino también en otros enzimas, como son las fosfatasas alcalina y ácida, cuyas actividades se incrementan cerca del 100% por mg de proteína (Tabla 22). Mientras que por órgano total, la fosfatasa alcalina alcanza un 60% y la fosfatasa ácida un 78% sobre valores control (Tabla 21).

Todas ellas participan a nuestro juicio en la creación de un alto turnover de la proteína hepática necesario para determinar un nuevo "status" metabólico, mediante el incremento en la tasa del catabolismo. En este último proceso, la actividad de los enzimas hidrolásicos interviene como mediador quizá a través de un fenómeno de regulación de la proteólisis endógena.

A este respecto, Dean (68) señala que los lisosomas están implicados en la degradación de la proteína, mediante mecanismo de autofagia y Ballard (17) indica que estos orgánulos parecen participar en procesos de degradación acelerada, lo que sería el caso, después de un stress.

Sin embargo, de nuestros resultados podemos deducir que aunque la síntesis y la degradación se incrementan en el proceso, la tasa proteica no cambia, lo que está en consonancia con los trabajos de Kinney (121) quien señala que en ratas quemadas, el turnover proteico de órganos como el hígado se incrementa marcadamente



pero su contenido en proteínas cambia muy poco, mientras que el de la carcasa disminuye.

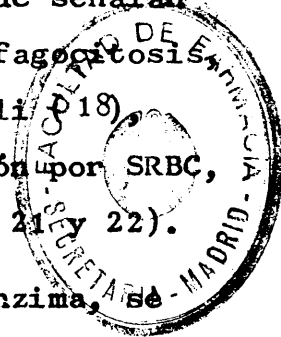
Por otra parte, esta alta actividad hidrolásica se relaciona íntimamente también, con una exacerbada actividad funcional de las células hepáticas de carácter macrofágico, puesto que según Unanue (271), las actividades hidrolásicas de las mismas, son de crucial importancia en la degradación de material extraño.

Esto está de acuerdo con las ideas de Waschstein (284), quien sugiere que la fosfatasa ácida refleja el estado funcional de las células del sistema retículo-endotelial del hígado. Por su parte, Knook (124) indica que las células de Kupffer, tienen actividades lisosómicas mucho mayores que las parenquimatosas y que esta distribución enzimática, refleja el papel de estas células en el aclaramiento y degradación de sustancias extrañas.

Así, la captación de las células rojas de carnero por macrófagos peritoneales, ha sido demostrado por Pugh-Humphreys (217), quien indica que son posteriormente solubilizadas por la actividad de los lisosomas.

Por otra parte y aún cuando existen estudios que señalan incrementos en la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa durante fagocitosis en macrófagos estimulados como por ejemplo, los de Bar-Eli (18) nuestros resultados demuestran que durante la inmunización por SRBC, la actividad del enzima no se modifica en hígado (Tablas 21 y 22).

Ahora bien, puesto que la liberación de este enzima, se atribuye a la existencia de daño tisular en el parénquima, como se ha señalado anteriormente, pensamos que la administración de SRBC, aún cuando altera su función conserva la integridad del hepatocito en estas condiciones nutritivas.



Indicaremos además, que según Dingle (73) tampoco las células fagocíticas sufren lesión, aunque se produzca la liberación de enzimas lisosómicos en los mecanismos de defensa.

Por ello, pensamos que el hígado responde con una actividad funcional incrementada al antígeno, tanto por parte de las células macrofágicas como parenquimatosas, pero con el mantenimiento de su total integridad.

5.14.- EFEECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE UREA Y SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE TRANSAMINASAS Y GDH EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA BALANCEADA (Tablas 23 y 24).

Durante la respuesta metabólica al antígeno (SRBC) se incrementa la degradación de los aminoácidos a urea, lo que origina una excreción urinaria de la misma un 21% superior a las ratas controles no inmunizadas, como se ve en la Tabla 23.

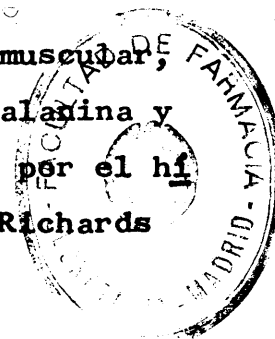
Se produce por lo tanto, un aumento de la pérdida de nitrógeno urinario, a consecuencia de la caída de la proteína corporal extrahepática, puesto que como ya hemos indicado, la proteína del hígado se mantiene, a pesar del alto turnover proteico del órgano. A este respecto, Young (314) indica que la eliminación nitrogenada después del stress, se realiza en su mayor parte en forma de urea y que el origen de la misma parece ser la proteína muscular.

Este mismo autor (317) encuentra, que la máxima eliminación de urea se produce entre los 8 y 10 días post-trauma, lo que parece coincidir con nuestros datos.

Existe por lo tanto un acelerado catabolismo muscular, el cual determina según Kinney (121), el incremento de alanina y de otros aminoácidos, los cuales a su vez, son captados por el hígado y sus grupos amino, convertidos a urea como indica Richards (227).

Por el contrario, en traumas físicos sin gravedad, Young (316) encuentra que, la tasa de 3-metil histidina urinaria no se modifica, y por ello sugiere que la tasa del catabolismo muscular, no sufre alteración alguna.

El aumento de la eliminación de urea encontrado en el es



tudio, se relaciona además, con la modificación en la actividad de los enzimas GPT, GOT y GDH, los cuales se incrementan significativamente tanto por órgano como por mg de proteína. Así, la elevación es de un 25% en GPT, de un 18% en GOT y de 110% en GDH, considerados en términos absolutos (Tabla 23). Por su parte, el aumento por mg de proteína, es de 43% en la actividad de GPT, del 43% en la GOT y de un 142% en la GDH (Tabla 24).

A consecuencia del stress, estos enzimas al facilitar la entrada de los grupos amino al ciclo de la urea en el hígado, confirman la elevada formación de este producto, así como la función de las células parenquimatosas hepáticas, cuya síntesis se orienta hacia proteínas específicas que toman parte en la respuesta al antígeno.

Estas proteínas proceden en gran parte, según Cahill (31) y Owen (196), de los aminoácidos procedentes del músculo, que también son utilizados por el hígado para síntesis proteica.

Además, la alta actividad de la GDH puede relacionarse con un posible aumento en la producción de amonio, el cual se encuentra elevado según Beisel (23) durante la respuesta metabólica a las infecciones.

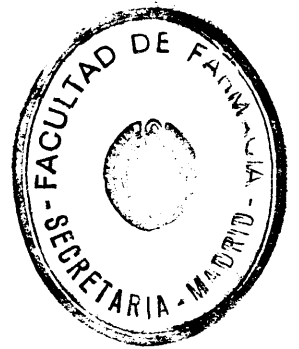
Por otra parte, la actividad elevada de los enzimas de la transaminación, puede también intervenir en la conversión de los aminoácidos hacia glucosa, lo que nos indica el posible incremento en la tasa de gluconeogénesis, para aportar sustratos energéticos necesarios en el mecanismo de defensa. A este respecto, Kinney (121) señala que la degradación proteica se produce fundamentalmente para proveer carbohidratos intermediarios en la gluconeogénesis hepática.

Además, la cantidad de glucosa liberada depende, según Wilmore (305) de la gravedad, la extensión y el tiempo transcurrido después del trauma.

De los resultados se deduce por lo tanto, que durante la inmunización con SRBC, se produce un aumento en la eliminación de nitrógeno corporal en forma de urea. Así como un probable incremento en la producción de glucosa por medio de la transformación gluconeogénica de los aminoácidos extrahepáticos.

En resumen, el hígado tiene un papel anabólico en el proceso a través de la producción de enzimas intracelulares hepáticas, que colaboran en el mecanismo de defensa. Para ello, el turnover proteico del órgano se acelera incrementándose tanto la síntesis como el catabolismo, en el cual, juegan un importante papel los enzimas lisosómicos.

Se produce a nuestro juicio, una redistribución de la proteína en orden a aumentar aquellos aspectos de la respuesta al stress, que sean beneficiosos, por ejemplo la síntesis proteica, esencial en los fenómenos de reparación.



5.15.- EFEECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE EL CRECIMIENTO HEPATICO DE RATAS DEFICIENTES EN PROTEINA (Tablas 25, 26 y 27).

El hígado de las ratas con malnutrición proteica, no presenta variación ponderal alguna, después de la administración del antígeno, en relación con las ratas malnutridas no inmunizadas. De forma similar, el índice peso órgano/peso animal no se modifica, como aparece en la Tabla 25.

La razón para esta invariabilidad la encontramos a nivel celular, puesto que no se altera ningún parámetro celular ( $P_A > 0,05$ ). Así ocurre con la tasa total de DNA, el número de núcleos y con las razones proteína/DNA y peso hígado/número de núcleos (Tabla 26).

Por consiguiente, podemos deducir que la disminución en la disponibilidad de aminoácidos por parte de estos animales malnutridos, hace imposible la multiplicación celular, que se ha efectuado en los animales con dieta balanceada frente al stress.

Ello parece ser debido a la intensidad de la depleción causada por el déficit proteico que, como hemos visto, origina un fenómeno de aplasia y atrofia del hígado, lo que impide la hepatomegalia consecutiva a la administración antigénica.

Debemos señalar además, que aunque el tamaño de las células no varía, la tasa de proteínas tiene una tendencia al descenso, que no llega a ser significativo. Sin embargo, pensamos que podría tener relación con el aumento del catabolismo existente, y que después comentaremos.

A consecuencia de la aplasia, el hígado pierde tanto células parenquimatosas como células del sistema retículo-endotelial.



A este respecto, Coovadia (48) señala que ambos tipos celulares se pierden paralelamente durante privación nutritiva e indica, que la caída ponderal que resulta de dicha pérdida, puede ocasionar la reducción funcional de los macrófagos individuales. También durante malnutrición proteica en ratones, Price (215), encuentra un menor número de macrófagos en la cavidad peritoneal, con relación a controles del mismo peso, y señala además que ello refleja una caída dramática del potencial fagocítico corporal. Asimismo, demuestra un decrecimiento del número de fagocitos, capaces de ingerir partículas extrañas cuando los ratones son sometidos a oro coloidal.

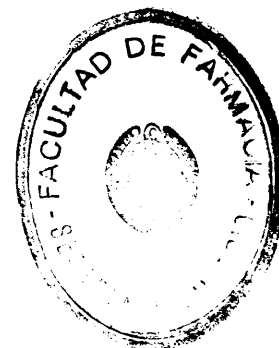
En otro orden de cosas podemos señalar, que la aparición en nuestros resultados de una alta actividad del enzima DNasa, nos indica que el hígado reacciona ante el antígeno (al igual que en los animales bien alimentados) con una elevación en el catabolismo del DNA y por lo tanto, con el aumento del turnover del nucleótido, lo que contrasta con su invariabilidad durante el déficit proteico.

La elevación en la actividad enzimática se registra tanto en órgano total (107%) como por mg de proteína (100%) y por DNA (110%) en relación a las ratas malnutridas no inmunizadas, con una probabilidad altamente significativa. (Tabla 27).

Esta degradación de la cromatina, relacionada con la disminución en la capacidad de división celular, es a nuestro juicio un acontecimiento claramente desfavorable para el hígado en las circunstancias deficitarias en que se encuentra y nos inclina a pensar, en que este aumento del turnover del nucleótido, puede determinar la propia autólisis del órgano.

Debemos señalar a este respecto, que la actividad cata-bólica de la DNasa, es en los animales deficitarios más intensa que en los controles, lo que apoya nuestra idea.

Podemos establecer, de lo anteriormente expuesto, que la deficiencia proteica, condiciona la respuesta hepática al antígeno, sin permitirle la hiperplasia que se produce en condiciones de dita control, pero sí incrementando el proceso degradativo sobre el DNA.



**5.16.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE EL METABOLISMO DEL RNA HEPATICO EN RATAS DEFICIENTES EN PROTEINA**

**5.16.1.- VARIACIONES EN RNA TOTAL, RNA/DNA, RNA/PROTEINA Y ACTIVIDAD RNasa ACIDA (Tablas 28 y 29).**

A pesar de la deplección estructural hepática, las células restantes, son todavía capaces de incrementar su funcionalidad, ante la necesidad de eliminación del antígeno. Así se produce un incremento de la tasa de RNA total (27%) y de la cantidad de RNA por célula, es decir, de la fracción RNA/DNA (29%), siempre considerando la variación relativa, a los valores de las ratas deficitarias no inmunizadas (Tabla 28).

En el primer caso, parece existir un incremento considerable de la síntesis de RNA en un órgano, que como ya se señaló, había perdido el nucleótido a consecuencia de la malnutrición. Este fenómeno coincide con la idea de Rozovski (233), el cual indica que durante la adaptación a la malnutrición, las funciones indispensables se preservan, entre las que destaca la síntesis de RNA. Ya discutimos en su momento, cómo el hígado de los animales malnutridos parece mantener la capacidad de síntesis de RNA, la cual se destina ahora a una necesidad metabólica prioritaria, como es la reacción al stress.

La elevación del RNA coincide con la de la razón RNA/DNA y nos confirma la aparición de un incremento por célula del nucleótido, en un órgano, cuyo número de células permanece igual a sus controles no inmunizados.

En general un aumento en la razón RNA/DNA, se ha descrito en condiciones en las que se requiere el incremento de la síntesis proteica. Así, Karp (113) encuentra elevada dicha razón en el



útero, después de la administración de estrógenos. También Winick (307) señala su ascenso, durante el ligamento de la arteria umbilical y sugiere que este mecanismo, sirve para facilitar la síntesis proteica ante el stress producido por la insuficiencia vascular.

El trauma conduce, asimismo, al aumento en la formación de proteínas, según se deduce de la fracción RNA/proteína, cuyo incremento muy significativo, alcanza un 41% sobre los valores de las ratas con malnutrición proteica sin inmunizar (Tabla 28).

Este aumento en la síntesis de proteínas nos indica una elevada funcionalidad de las células hepáticas restantes, mucho mayor que durante la deficiencia proteica, e involucra en la misma a ambos tipos celulares del hígado: el propio hepatocito y las células de carácter fagocitario.

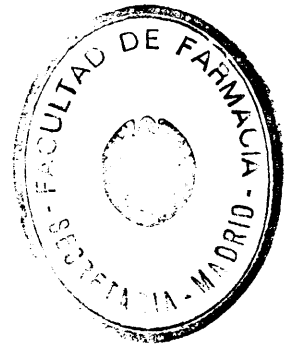
El fenómeno es análogo al encontrado en las ratas sometidas a dieta balanceada, puesto que se produce un aumento en la formación de proteínas enzimáticas especializadas, que ejercen su actividad en la respuesta metabólica al stress: Por una parte, los enzimas lisosomales, y por otra los que llevan a cabo la transaminación y la desaminación oxidativa.

En el primer caso, encontramos en relación al metabolismo del RNA, un aumento considerable de la actividad RNasa ácida por órgano (49%), por DNA (43%) y por mg de proteína (63%) en relación, no sólo con los animales proteína-deficientes testigos (Tabla 29), sino también con los controles estimulados en el caso de expresar la actividad por mg de proteína (Tabla 20).

Aparece por lo tanto, a consecuencia de la inmunización, una elevada degradación del RNA, de forma similar a la encontrada en los animales controles.

Este incremento del catabolismo del RNA forma parte de un proceso general de aumento del catabolismo hepático, producido por el stress y que es mucho más intenso que el encontrado durante la propia malnutrición proteica.

Hay pues un elevado turnover del RNA en estas condiciones y ello está en consonancia con los datos de Velasco (274), quien señala, una alta actividad de RNasa en placenta después del ligamento de la arteria umbilical.



5.17.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS HIDROLASICOS: FOSFATASA ALCALINA, FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA DE RATAS DEFICIENTES EN PROTEINA  
(Tablas 30 y 31)

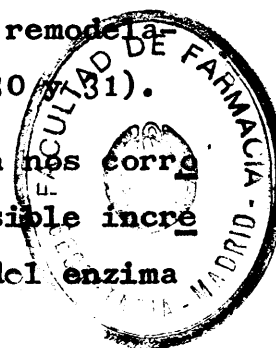
El acelerado catabolismo se pone de manifiesto por el incremento en la actividad de los enzimas fosfatasa ácida y  $\beta$ -glucuronidasa, hallado en el hígado de las ratas con malnutrición proteica y estimuladas y cuyas actividades son muy superiores tanto por órgano ( $P_A^! < 0,05$ ) (Tabla 30), como por mg de proteína ( $P_A^! < 0,01$ ) (Tabla 31), en relación a las encontradas en las ratas proteín-deficientes testigos.

Por consiguiente, la lisis de los sustratos sobre los que actúan estos enzimas, es superior a la producida durante malnutrición proteica, por lo que pensamos que la acción del antígeno, hace incrementar la intervención de estas hidrolasas en el stress. Por el contrario, la actividad de fosfatasa alcalina no sufre variación alguna ( $P_A^! > 0,05$ ), quizá a consecuencia de que su función sea más específica, durante la malnutrición y no en la remodelación de sustratos para la respuesta al stress (Tablas 30 y 31).

Además, la alta actividad de  $\beta$ -glucuronidasa nos corrobora que el efecto del antígeno puede determinar un posible incremento del proceso de autofagia, puesto que el aumento del enzima nos marca una alteración en la integridad de la célula.

Por otra parte, la intervención de los enzimas hidrolásicos en el proceso fagocítico, nos lleva a considerar la situación de las células del sistema retículo-endotelial en nuestro estudio.

Puesto que la función de aclaramiento, depende de la integridad del sistema retículo-endotelial y el hígado deficitario contiene un número muy bajo de células defensivas en comparación



con controles, pensamos que puede existir un déficit global de su capacidad fagocítica, como ya se ha señalado anteriormente.

En este mismo sentido, Coovadia (49), encuentra una disminución en la capacidad de aclaramiento total de los macrófagos de ratas proteín-deficientes, ensayados frente a polivinil-pirrolidona marcada comparada con controles. También Keusch (120), señala que en condiciones "in vivo", la función bactericida de los macrófagos puede disminuir durante malnutrición proteica.

Sin embargo, este mismo autor (119) indica que a pesar de ello, muchas funciones celulares involucradas en el proceso fagocítico se conservan durante el déficit. Así, los mecanismos de migración celular, la ingestión del látex, la formación de vacuolas y la degranulación, se mantienen intactas después de cuatro semanas de la ingestión de una dieta muy baja en proteínas.

Ello corrobora los resultados obtenidos por nosotros, en relación a la alta actividad de los enzimas hidrolásicos ya citados, puesto que la formación de vacuolas fagocíticas y el mecanismo de degranulación, dependen fundamentalmente de la formación y liberación de enzimas hidrolásicos de carácter lisosomal, capaces de lisar el antígeno durante el proceso digestivo.

Por consiguiente, se deduce de los datos obtenidos que la función de aclaramiento se mantiene e incluso se incrementa, a pesar de la desnutrición, en el sistema retículo-endotelial hepático.

Este resultado es similar al encontrado por Coovadia (49) en ratones con restricción proteica, cuya función macrofágica en hígado es estimada por el aclaramiento "in vitro" de polivinil-pirrolidona marcada con  $I^{125}$ . El autor indica que la capacidad funcional individual de los macrófagos, así como la de todo

el sistema fagocítico en conjunto que queda después de la deplección, es mucho mayor que en los ratones malnutridos no inmunizados.

En este mismo sentido, Douglas (75) señala mediante observación ultramicroscópica de polimorfonucleares de niños con kwashiorkor, que la formación de vacuolas y la degranulación es cualitativamente normal, frente a antígenos del tipo de *Streptococcus aureus* ó *Escherichia coli*.

Asimismo, Avila (13) encuentra una elevada actividad de fosfatasa ácida en fagocitos de niños con kwashiorkor y Tejada (267) por su parte, en las mismas circunstancias, señala una elevación de la actividad de fosfatasa alcalina, aunque hemos visto ya en nuestro estudio, que no parece intervenir en el proceso.

En resumen, las células hepáticas incrementan su funcionalidad a pesar de la deplección causada por el déficit proteico, con la elevación de la síntesis de proteínas específicas, capaces de originar un nuevo "status" metabólico, el cual, adquiere carácter prioritario en la respuesta al stress.

5.18.- EFEECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE UREA Y SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE TRANSAMINASAS Y GDH EN RATAS DEFICIENTES EN PROTEINA  
(Tablas 32 y 33).

El acelerado metabolismo proteico del hígado en respuesta a un antígeno, en los animales proteín-deficientes, no parece acompañarse de un incremento del catabolismo en los tejidos extra hepáticos, como se producía durante la dieta control. Esto se deduce, de la tasa de urea eliminada por orina en el período del stress, la cual no se modifica en absoluto y permanece en el mismo nivel de los animales malnutridos no inmunizados.

La proteína, por lo tanto es ahorrada, en estas condiciones, al igual que ocurría cuando el animal estaba afectado exclusivamente por la deficiencia proteica.

Ante la exigua cantidad de proteína de que dispone, el animal la ahorra para poder así, hacer frente al stress, puesto que la proteína lábil corporal se ha perdido en su mayor parte.

De acuerdo con esto, Munro (173) indica que en ratas sometidas a dietas sin proteínas y con fracturas óseas, no se produce el incremento de nitrógeno urinario característico del trauma. Por el contrario, durante infección por *Salmonella tiphymorium* en individuos malnutridos, Mc Guire (147) indica un aumento en la cantidad de nitrógeno excretado por orina.

Esta diferencia podría ser atribuida a nuestro juicio, a los distintos tipos de stress estudiados, en el cual es importante la existencia en el último caso de fiebre.

Sin embargo, la disminuida excreción de urea, encontrada en nuestro estudio, que parece indicar un decrecimiento concomitan

te en su síntesis, está en discordancia con la elevada actividad enzimática en GOT y GDH hepáticos.

Este aumento es significativo, tanto por órgano total ( $P_A^! < 0,001$ ), así como por mg de proteína ( $P_A^! < 0,01$ ) en relación a los niveles de las ratas malnutridas testigos (Ver Tablas 32 y 33).

El incremento, confirma la elevación en la actividad funcional del hepatocito en estas condiciones y la concomitante síntesis de proteínas, que favorece la respuesta al stress.

Ahora bien, puesto que los bajos niveles de urea nos indican que las actividades enzimáticas no intervienen en su formación, pensamos que es el mecanismo de la gluconeogénesis el que puede encontrarse incrementado.

Dado que son las actividades de GOT y de GDH, las incrementadas en el estudio, podemos suponer que el aminoácido más utilizado en el aporte de energía es el glutamato, actuando la GDH en este caso en el sentido de la reaminación reductora.

Parece por consiguiente, que el antígeno conduce a un mayor consumo de energía, el cual es proporcionado a partir de los aminoácidos gluconeogénicos, puesto que el aporte dietario en carbohidratos y lípidos, no parece ser tampoco suficiente. A este respecto, Neufeld (187) señala, que durante procesos infecciosos, las demandas de energía corporal están aumentadas y que en ausencia de nutrientes adecuados, la rata tiende a compensar la disminución en su capacidad de oxidación de los sustratos.

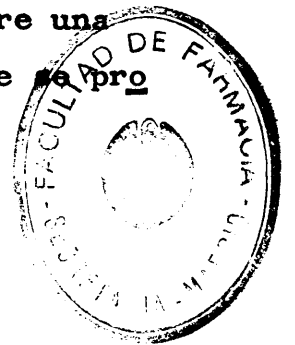
Sin embargo, nos surge una pregunta, ante la intensa deplección proteica existente. ¿De dónde proceden los aminoácidos para la gluconeogénesis, teniendo en cuenta la existencia de un incremento en la síntesis proteica hepática?

Podemos pensar en el aporte de aminoácidos a partir de una mayor degradación proteica muscular, pero a este respecto, Schelp (242) ha señalado, que en niños con kwashiorkor se produce la disminución del catabolismo del músculo, lo que resultaría en una movilización inadecuada de aminoácidos endógenos.

Asimismo, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la cantidad de proteína muscular no se modifica en ratas malnutridas y sometidas a SRBC, por lo que los aminoácidos musculares no parecen participar en el proceso.

Este dato nos inclina a pensar, dado el excesivo aumento en el catabolismo proteico hepático antes señalado, en la posibilidad de que sean los propios aminoácidos del hígado, los que vuelvan a entrar en la síntesis de las proteínas específicas antes mencionadas.

La disminución en la tasa de nitrógeno eliminada, parece por consiguiente, originar un sistema de ahorro de proteína somática. Pero sin embargo, ello no resulta en una situación favorable del metabolismo en estos animales, puesto que el hígado sufre una alteración de su metabolismo, que puede afectar a medida que se prolonga el efecto del stress, la estabilidad del hepatocito.



5.19.- EFFECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE EL CRECIMIENTO HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RESTRINGIDA (Tablas 34, 35 y 36).

En contraste con el mantenimiento en el peso, en el número de células y tamaño del hígado observado en los animales proteín deficientes e inmunizados, la administración del antígeno en las ratas sometidas a la dieta restringida en un 50% de la control, determina un aumento en el tamaño celular, expresado mediante la razón proteína/DNA, y por consiguiente, se produce un fenómeno de hipertrofia. Este efecto es consecutivo al incremento en la tasa de proteínas citoplasmáticas, cuya elevación es de un 38% sobre los valores de las ratas con malnutrición proteico-calórica no inmunizadas, con una  $P_A'' < 0,01$  (Tabla 34).

Este aumento proteico, se lleva a cabo sin modificación alguna en el número de células hepáticas, puesto que tanto la tasa de DNA total como el número de núcleos, permanece igual al encontrado en las ratas restringidas testigos (Tabla 35).

De aquí se deduce que la razón proteína/DNA, indicadora del tamaño celular, se incrementa y su valor alcanza un 49% sobre el de las ratas restringidas testigos, como se puede apreciar en la Tabla 35. Sin embargo, este aumento no se refleja en el peso hepático en valores absolutos, ni en la razón peso órgano/peso corporal (Tabla 34), aún cuando hay que señalar, la tendencia a incrementarse de este último valor.

Además, puesto que la razón peso hígado/número de núcleos no se modifica, es probable que exista paralelamente al incremento proteico, una reducción de otro sustrato celular que podría ser hidrocarbonado. Esta idea se basa en la disminución del proceso glu-

coneogénico que tiene lugar por efecto del antígeno, como después veremos y que es un fenómeno contrario al producido por la adaptación a la dieta restringida, lo que nos hace pensar en una posible pérdida de glucógeno, que compensaría la elevación proteica celular.

De lo señalado se deduce que el hígado de las ratas con dieta restringida, reacciona al antígeno con el aumento de la tasa citoplasmática proteica, lo que incrementaría el tamaño celular, a pesar de la atrofia desarrollada por la dieta. De acuerdo con esto, Cockerell (43) indica que aparece un aumento de las proteínas de fase aguda, en animales infectados después de inanición prolongada.

Por otra parte, las células hepáticas, tanto las parenquimatosas como las del sistema retículo-endotelial, aunque en menor número que en controles, parecen poder iniciar un pequeño desarrollo ante el stress.

Este fenómeno podría deberse a la adaptación de la actividad enzimática de la DNasa durante el proceso (Tabla 36). Así, encontramos una disminución muy acentuada de la misma por órgano (88%), por mg de proteína (93%) y por DNA (87%) en relación a las ratas testigos restringidas ( $P_A^n < 0,001$ ), la cual parece indicar una degradación del DNA muy reducida y por lo tanto una inhibición en la destrucción de cromatina.

Todo ello favorecería a nuestro juicio, el mantenimiento del número de células y quizá también de su potencial mitótico.

Por consiguiente, el catabolismo del DNA se reduce en este caso, en contraposición con el aumento en el mismo ya señalado para las ratas proteína-deficientes, frente al stress.

5.20.- EFEECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE EL METABOLISMO DEL RNA HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RESTRINGIDA

(Tablas 37 y 38).

No obstante, el incremento de proteínas ya indicado, la razón RNA/proteína, disminuye un 21% en relación a los animales testigos con dieta restringida ( $P_A'' < 0,01$ ). Este efecto se debe al mantenimiento en la tasa de RNA total al mismo nivel que en aquellos y que condiciona también, la invariabilidad de la razón RNA/DNA (Tabla 37).

Por otra parte, la disminución en el índice RNA/proteína ( $P_A'' < 0,01$ ) indica, que la síntesis proteica disminuye durante la respuesta al stress, lo cual parece paradójico en relación a la tasa proteica encontrada.

Además, aparece un significativo incremento en la actividad catabólica de la RNasa ácida, la cual mediante su acción de degradativa sobre el RNA, podría limitar su función sintetizadora de proteínas. La elevación en la actividad enzimática alcanza un 169% por órgano total, un 92% por mg de proteína y aumentos de 144% y 176% en relación al RNA y al DNA respectivamente. Estas cifras dan idea de la alta renovación del nucleótido, que origina la respuesta al antígeno (Tabla 38).

Sin embargo, y a pesar de esta actividad lítica, la tendencia de la tasa de RNA es la de incrementarse, aún sin significación, por lo que se puede especular, con la existencia de un aumento de la síntesis de RNA, que facilitaría su elevado turnover.

Por consiguiente, el catabolismo exacerbado del RNA puede impedir, a nuestro juicio, una mejor respuesta al antígeno por parte de estos animales, con malnutrición calórico-proteica, a pesar del aumento en la proteína hepática.

El acúmulo de proteína originado por el antígeno, en las ratas restringidas, podría estar determinado por un reducido catabolismo proteico.

5.21.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS ENZIMAS HIDROLASICOS: FOSFATASA ALCALINA, FOSFATASA ACIDA Y  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RESTRINGIDA (Tablas 39 y 40)

De hecho, las actividades enzimáticas lisosómicas en general, disminuyen ó no se modifican, a excepción de la fosfatasa ácida, en estas condiciones, lo que justifica una menor degradación.

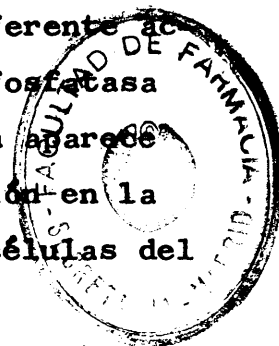
Así, en las Tablas 39 y 40 podemos observar que la  $\beta$ -glucuronidasa disminuye tanto por órgano (22%) como por mg de proteína (42%) y la fosfatasa alcalina desciende en este último caso (24%), respecto a las ratas restringidas testigos. Como vemos, se produce una modulación de las actividades enzimáticas lisosómicas, ante la administración antigénica, que varía dependiendo de la dieta.

A nuestro juicio, la caída de estos enzimas, tiene como fin disminuir la actividad catabólica de los mismos, y facilitar así el mantenimiento de los sustratos en el hepatocito.

En otro orden de cosas, debemos indicar la diferente actuación de las hidrolasas estudiadas. El incremento en fosfatasa ácida por órgano (205%) y por mg de proteína (70%), según aparece en las Tablas 39 y 40, podría ser debido a su intervención en la función de aclaramiento del antígeno, por parte de las células del sistema retículo-endotelial.

Por el contrario, la disminución en las actividades enzimáticas de fosfatasa alcalina y  $\beta$ -glucuronidasa ya citada, impide su colaboración en el mecanismo de defensa.

Por consiguiente, la intervención de estos enzimas en la función fagocítica del sistema retículo-endotelial, es de mucha menor entidad que en cualquiera de las otras dos dietas.



A este respecto, Keusch (119) señala que aunque el número total de células fagocíticas sanguíneas en niños con marasmo, es similar a los controles, parece existir una disminución en su capacidad bactericida frente a *Staphylococcus aureus*.

5.22.- EFFECTO DE LA ADMINISTRACION ANTIGENICA SOBRE LA EXCRECION URINARIA DE UREA Y SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE TRANSAMINASAS Y GDH EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RESTRINGIDA (Tablas 41 y 42).

A pesar de la disminuci3n en el catabolismo proteico hepático, a fin de conservar una mejor tasa proteica, la administraci3n antigénica determina la aparici3n de un incremento en la degradaci3n de las proteínas somáticas. Esto se desprende del incremento en la eliminaci3n de urea por orina, que llega a ser de un 40% sobre los valores de las ratas con dieta restringida no inunizadas, según podemos observar en la Tabla 41.

Tambi3n Park (201) señaala que durante ayuno mantenido después de un stress quirúrgico, se acentúa el decrecimiento en la proteína corporal y la excreci3n de urea es mayor que durante inanici3n simple.

El antígeno pues, induce en estos animales una p3rdida de nitr3geno urinario, que compromete todavía más el estado de salud del animal.

Esta proteína parece proceder fundamentalmente de musculo y a este respecto, en nuestro laboratorio se ha encontrado previamente que en ratas en las mismas circunstancias, se produce una disminuci3n de la proteína muscular, lo que confirma nuestra idea.

Los aminoácidos musculares, por otra parte, además de ingresar hacia la formaci3n de urea según se ha indicado, pueden ser utilizados para mantener la síntesis hepática de proteínas indispensables.

Así, Beisel (22) indica que el cuerpo es capaz de sacrificar su proteína somática, para preservar la capacidad de síntesis



de proteínas viscerales, durante infección.

Por otra parte, el decrecimiento en las actividades enzimáticas de GPT, GOT y GDH por mg de proteína (Tabla 42) y de estas dos últimas consideradas en valores absolutos (Tabla 41) en relación a sus testigos, nos señala una menor capacidad gluconeogénica, proceso que en ratas con malnutrición proteico-calórica era un fenómeno esencial.

Por ello pensamos que parte de los aminoácidos que serían destinados a la formación de nueva glucosa, pueden ser introducidos hacia un proceso de síntesis proteica ó bien a la formación de urea.

Esta disminución en la conversión de los aminoácidos en glucosa, está en consonancia con los datos de Krebs (127) quien indica, que durante períodos de trauma al que se le añade un semiaayuno, la energía procede de los depósitos grasos y que estos precursores, aportan además esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos no esenciales y su incorporación a proteínas.

En definitiva, la dieta restringida condiciona la respuesta al antígeno, en el sentido de un incremento en la degradación de la proteína somática, con la disminución concomitante del aporte energético proporcionado por la gluconeogénesis, lo que a nuestro juicio compromete la resistencia hepática al stress.

Esto se manifiesta por la menor capacidad de sintetizar proteínas específicas, que por lo tanto no pueden participar en la respuesta.

5.23.- VARIACIONES DE LAS PROTEINAS TOTALES Y SUS FRACCIONES  
DURANTE ESTIMULACION ANTIGENICA EN RATAS EN LAS DIVERSAS  
SITUACIONES NUTRITIVAS (Tablas 43, 44, 45, 46, 47 y 48).

La administración del antígeno no determina variación alguna sobre la tasa de proteínas totales plasmáticas, en ninguna de las dietas estudiadas, lo que nos sugiere la inexistencia de un proceso infeccioso, en los animales estudiados (Tablas 43, 44 y 45).

Las infecciones febriles y otros tipos de traumas, conducen al incremento en la tasa de globulinas totales con una concomitante disminución en la cantidad de albúmina. Así, Peterman (205) describe este resultado en animales con quemaduras, fracturas e incluso después de operaciones quirúrgicas.

Sin embargo, de la observación de los datos obtenidos en los animales bien nutridos, destacan esencialmente las variaciones en la distribución de las fracciones plasmáticas. Así, aparece una clara disminución en las  $\alpha_1$  (Tabla 43) y  $\gamma$ -globulinas, y un incremento en la tasa de  $\beta$ -globulinas (Tabla 46). Este resultado puede deberse al aumento en la producción de inmunoglobulina M (Ig M), la cual se encuentra en el rango de las  $\beta$ -globulinas. En este sentido, podemos señalar que durante la primera respuesta a un antígeno timo-dependiente, como es el utilizado en este estudio, se producen anticuerpos que corresponden a inmunoglobulinas M de poca afinidad por el antígeno, lo que está de acuerdo con nuestros resultados. Es solamente en la segunda exposición al antígeno, cuando se produce un aumento de las gammaglobulinas del tipo Ig G, propiamente dichas.

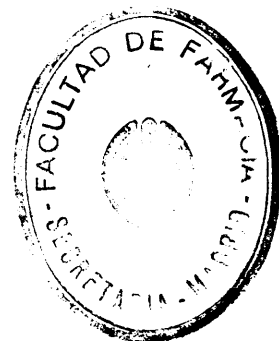
La disminución en la tasa de  $\alpha_1$ -globulina, puede relacionarse con la función que se le atribuye como inhibidor de una gran variedad de proteinasas, según indica Powanda (214).

Ello estaría en consonancia con la actividad incrementada del catabolismo proteico que hemos encontrado en estos animales.

Por lo que respecta a los resultados de las ratas con deficiencia proteica y calórico-proteica e inmunizadas, siguen la misma pauta que lo ya señalado para las bien nutridas, aún cuando no se aprecian variaciones significativas en las primeras (Tablas 44, 45, 47 y 48).

De los resultados se deduce pues, que aún cuando la tasa de proteínas totales no se modifica, la distribución de las fracciones, indica la respuesta a una primera administración del antígeno timo-dependiente.

A este respecto, Cooper (47) señala que durante malnutrición proteica ó calórico-proteica crónicas, se producen efectos inhibitorios, tanto sobre la producción de anticuerpos, como sobre el desarrollo de las células productoras de los mismos, después de inmunización con SRBC. También indica, que la cantidad de anticuerpos formados, varía directamente con la ingesta proteica ó calórico proteica, lo que está de acuerdo con nuestros datos.



6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

## RESUMEN:

En este trabajo se comprueba cómo el estado nutritivo del individuo, influye decisivamente en la capacidad de respuesta del mismo ante un fenómeno de stress, el cual da lugar a una respuesta metabólica generalizada.

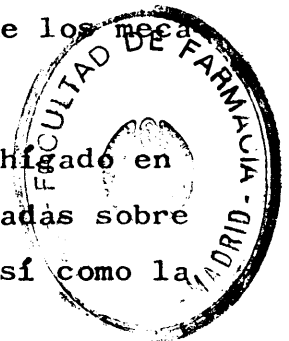
El hígado se presenta como uno de los órganos cuya modificación metabólica consecutiva a la deficiencia en proteínas y/o calorías en la dieta, es fundamental en la adaptación de este tejido a la agresión.

La situación experimental de malnutrición se consigue, mediante el aporte a ratas Wistar machos de 135 g de peso, durante 30 días, de tres tipos de dieta: Balanceda (10% proteína), Proteín-deficiente (1% proteína) y Restringida (50% de la dieta balanceada). Paralelamente, a los animales de cada situación nutritiva se les administra (v.i.) a los 20 días de estudio, una suspensión de eritrocitos de carnero (SRBC) en dosis de  $15,5 \times 10^8$  células/0,5 ml solución salina/100 g peso, lo que conlleva la puesta en marcha de los mecanismos de defensa.

A fin de observar la respuesta metabólica del hígado en estas situaciones, se estudian las modificaciones efectuadas sobre el crecimiento celular, la tasa y catabolismo del RNA, así como la síntesis proteica hepática.

La influencia de las hidrolasas en esta remodelación tisular, se observa por la determinación de los enzimas deoxiribonucleasa ácida, ribonucleasa ácida, fosfatasas alcalina y ácida y  $\beta$ -glucuronidasa.

Además, la intervención hepática en la formación de urea, mediante los enzimas de transaminación GOT, GPT, así como la GDH,



se relaciona con la tasa de excreción de este metabolito.

Por último, las proteínas totales plasmáticas y sus fracciones, nos señalan la capacidad del hígado en su formación en estas circunstancias.

Los resultados obtenidos en la experiencia, nos han permitido formular las siguientes conclusiones:

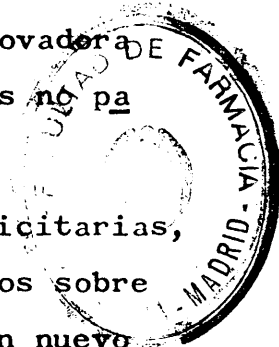
1.- La ingestión de una dieta isocalórica al 1% de proteína determina un cuadro de malnutrición proteica mientras que el aporte de una dieta restringida al 50% de la control, origina un déficit de tipo proteico-calórico.

2.- La aparición de aplasia y atrofia hepáticas, durante el déficit proteico, son consecuencia de la pérdida de células y de constituyentes intracelulares (proteína, DNA, RNA), que afectan al crecimiento celular. Por su parte, la dieta restringida determina la caída del tamaño celular (atrofia), pero sin la modificación del número total de células.

3.- A pesar de la deplección hepática, producida por la deficiencia en proteína dietaria, las células restantes conservan su potencial de síntesis proteica y una alta actividad renovadora de RNA. Sin embargo, la restricción en calorías y proteínas no parece incrementar estas funciones.

4.- En la adaptación hepática a ambas dietas deficitarias, colaboran los enzimas lisosómicos, remodelando los sustratos sobre los que actúan. Este mecanismo, favorece la aparición de un nuevo "status" metabólico que es fundamental en el proceso.

5.- La disminución de la tasa de proteínas plasmáticas y la menor excreción de urea, son índices del proceso adaptativo a las dietas deficitarias estudiadas. Por otra parte, la ingestión de la dieta restringida provoca a su vez, el incremento en mecanismos de transaminación, a fin de aportar nuevos sustratos energéticos.



6.- La administración por vía intravenosa de una dosis de  $15,5 \times 10^8$  SRBC/0,5 ml solución salina/100 g de peso, provoca un estado de stress en el animal, que desencadena cambios metabólicos hepáticos en respuesta al mismo.

7.- En los animales bien nutridos, la respuesta del hígado a la agresión se caracteriza por el incremento de su anabolismo. Así, junto a un fenómeno de hiperplasia, aparece el aumento del metabolismo de los ácidos nucleicos y de la síntesis de proteínas enzimáticas.

8.- Entre los enzimas sintetizados, el incremento de la actividad de las hidrolasas, demuestran su intervención en la reordenación de los sustratos hepáticos ante el stress. Asimismo, la elevada actividad de GOT, GPT y GDH, se relaciona tanto con el incremento de la eliminación de nitrógeno ureico, como con un intenso proceso de gluconeogénesis.

9.- Los efectos de la dieta deficiente en proteína, sobre el crecimiento celular, impiden el desarrollo hiperplásico del hígado frente al stress. Paralelamente, se incrementa la degradación del DNA.

10.- El hígado de las ratas deficientes en proteína, reordena los sustratos a fin de incrementar las funciones involucradas en la respuesta al stress, que se convierten así en prioritarias. La reacción metabólica desarrollada es de carácter anabólico, de forma similar a los animales alimentados con dieta control.

11.- La reacción anabólica se ve favorecida, en estados de deficiencia proteica por el ahorro de proteína que se deriva de la disminución en la pérdida de nitrógeno ureico.

12.- La respuesta a la agresión en estados de deficiencia calórico-proteica (dieta restringida) determina la hipertrofia del hígado debido al incremento en la proteína soluble. Por otra parte, la disminución en el catabolismo del DNA, podría depender de un mecanismo protector, frente a la deplección provocada por la dieta.

13.- La malnutrición proteico-calórica disminuye la capacidad funcional de las células restantes del hígado. Así, la caída en la síntesis proteica, determina un decrecimiento en las actividades enzimáticas que colaboran en la respuesta.

14.- El efecto negativo del stress sobre el metabolismo proteico de los animales con malnutrición calórico-proteica se acentúa, debido al aumento en la eliminación de nitrógeno urinario en forma de urea.

15.- CONCLUSION GENERAL: La modificación de los niveles en proteínas y/o calorías en la dieta, al provocar alteraciones profundas en el metabolismo hepático, condiciona en gran medida la capacidad de respuesta de este órgano, ante la agresión provocada por la administración de eritrocitos de carnero por vía intravenosa.



7.- BIBLIOGRAFIA



- 1.- ADDIS, T., POO, L.J. y LEW, W. J. Biol. Chem. 115, 111-116. (1936).
- 2.- ADIBI, S.A., MODESTO, T.A., MORSE, E.L. y AMIN, P.M. Am. J. Physiol. 225, 408. (1973).
- 3.- ADIBI, S.A. Metabolism. 25, 1287-1302. (1976).
- 4.- AEBI, H. "Coordinated changes in enzymes of the ornithine cycle and response to dietary conditions" en The urea cycle. (Grisolia, S., Baguena, R. y Mayor, F. eds.) N.Y. pp. 275-299. (1976).
- 5.- ALBERTS, A.W., STRAUSS, A.W., HENNESSY, S. y VAGELOS, P.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 3956-3960. (1975).
- 6.- ALLARD, C., DE LAMERANTE, G. y CANTERO, A. Exptl. Cell. Research. 13, 69. (1957).
- 7.- ALLEYNE, G.A.O. y YOUNG, V.H. Clin. Sci. 33, 189-200. (1967).
- 8.- ANGELELI, A.Y.O., BURINI, R.C. y CAMPANA, A.O. J. Nutr. 108, 1147-1154. (1978).
- 9.- ANTHONY, L.E. y EDOZIEN, J.C. J. Nutr. 105, 631-648. (1975).
- 10.- AOKI, T.T., BRENNAN, M.F., MULLER, W.A. y CAHILL, G.F. Adv. Enzyme Reg. 12, 3. (1974).
- 11.- ARROYAVE, G. "Proposed methodology for the biochemical evaluation of protein malnutrition in children" en Protein calorie - - malnutrition. (Von Muralt, A. ed.) Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y. pp. 48-62. (1969).

- 12.- ASHWORTH, A. *Proc. Nutr. Soc.* 38, 89. (1979).
- 13.- AVILA, J.L., VELAZQUEZ AVILA, G., CORREA, C., CASTILLO, C. y CONVIT, J. *Clin. Chim. Acta.* 19, 5. (1973).
- 14.- BALLANTYNE, F.C. y FLECK, A. *Clin. Chim. Acta.* 44, 341. (1973).
- 15.- BALLARD, F.J. *Biochem. J.* 121, 169-178. (1971).
- 16.- BALLARD, F.J., HOPGOOD, M.F., RESHEF, L. y HANSON, R.W. *Biochem. J.* 140, 531-538. (1974).
- 17.- BALLARD, F.J., HOPGOOD, M.F., KNOWLES, S.E. y FRANCIS, G.L. *Acta Biol. Med. Germ. (Intracellular Protein Catabolism 3rd. Symposium).* (1978).
- 18.- BAR-ELI, M. y GALLILY, R. *J. Reticuloendothel. Soc.* 18, 6. 317-328. (1975).
- 19.- BASEDOVSKY, H.E., SORKIN, E., FELIX, D. y HASS, H. *Europ. J. Immunol.* 7, 323-325. (1977).
- 20.- BEISEL, W.R., SAWYER, W.D., RYLL, E.D. y CROZIER, D. *Ann. Intern. Med.* 67, 744. (1967).
- 21.- BEISEL, W.R. "Malnutrition as a consequence of stress" en: *Malnutrition and immune response.* (Suskind, R.M. ed.) Raven Press. N.Y. pp. 21-26. (1977).
- 22.- BEISEL, W.R. "Infectious diseases: Effects on food intake and nutrient requirements" en: *Human nutrition. A comprehensive treatise.* Vol. 4. (Hodges, R.E. ed.) Plenum Press. N.Y. London. pp. 329-346. (1979).
- 23.- BEISEL, W.R. *Fed. Proc.* 39, 3105-3108. (1980).
- 24.- BERGMAYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis.* Bergmeyer, H.U. ed.) Verlag. Acad. Press. N.Y. London. pp. 941. (1963).

- 25.- BESEY, O.A., LOWRY, O.H., BROCK, M.J. J. Biol. Chem. 164, 321. (1946).
- 26.- BLOOR, W.R. J. Biol. Chem. 77, 53. (1928).
- 27.- BRIN, N. y Mc KEE, R.W. Arch. Biochem. Biophys. 61, 384. (1956).
- 28.- BROADBENT, P.G. y HEARD, C.R.C. Proc. Nutr. Soc. 32, 48A.(1973).
- 29.- BURTON, K. Biochem. J. 62, 315-323. (1956).
- 30.- BUTTERWORTH, J. y MILLWARD, D.J. en Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body. (Waterlow, J.C., Garlick, P.J. y Millward, D.J. eds.) North Holland. Publ. Company. Amsterdam. pp. 720. (1978).
- 31.- CAHILL, G.F. y OWEN, O.E. en Carbohydrate metabolism and its disorders. (Dickens, F., Randle, P.J. y Welan, W.J. eds.) Acad. Press. N.Y. London. Vol. 1. pp. 497-522. (1968).
- 32.- CAMPBELL, R.M. y KOSTERLITZ, H.W. J. Endocrinol. 6, 171-176. (1949).
- 33.- CANONICO, P.G., POWANDA, M.C., COCKERELL, G.L. y MOE, J.B. Infect. Immunol. 12, 42. (1975).
- 34.- CARLBERGER, G., EINARSSON, K., FELIG, P., HELLSTROM, K., WAHREN, J., WENGLE, B. y ZETTERSTROM, J. Nutr. Metab. 13, 100-113. (1971).
- 35.- CASTRO, C.E. y SANDERS, J. Nutr. Rev. 38, 1. 1-8. (1980).
- 36.- CASTRO, C.E. y SEVALL, J.S. J. Nutr. 110, 105-116. (1980).
- 37.- CATT, K.J. Lancet. ii, 353. (1970).
- 38.- CLARK, C.M., NAISMITH, D.J. y MUNRO, H.N. Biochim. Biophys. Acta. 23, 587. (1957).
- 39.- CLARK, R. Br. J. Surg. 54, 445. (1967).



- 40.- CLIFFORD, A., RIUMALLO, J., BALIGER, B., MUNRO, H.N. y BROWN, D. *Biochim. Biophys. Acta.* 277, 443-458. (1972).
- 41.- CLOWES, G.H.A.Jr., O'DONNELL, T.F.Jr., RYAN, N.T. y BLACKBURN, G.L. *Ann. Surg.* 179, 684. (1974).
- 42.- CLOWES, G.H.A.Jr., O'DONNELL, T.F.Jr., BLACKBURN, G.L. y MAKI, T.N. *Surg. Clin. N. Am.* 56, 1169. (1976).
- 43.- COCKERELL, G.L. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142, 1072-1076. (1973).
- 44.- COHN, Z.A., FEDORKO, M.E. y HIRSCH, J.G.J. *Exptl. Med.* 123, 757. (1966).
- 45.- CONDE, R.D. y SCORNIK, O.A. *Biochem. J.* 158, 385-390. (1976).
- 46.- CONNOR, R. y KOHN, J. *Nature.* 183, 1512. (1959).
- 47.- COOPER, W.C., GOOD, R.A. y MARIANI, T. *Am. J. Clin. Nutr.* 27, 647-664. (1974).
- 48.- COOVADIA, H.M. y SOOTHILL, J.F. *Clin. Exp. Immunol.* 23, 373-377. (1976).
- 49.- COOVADIA, H.M. y SOOTHILL, J.F. *Clin. Exp. Immunol.* 23, 562-567. (1976).
- 50.- COWARD, B.W. y WHITEHEAD, R.G. *Brit. J. Nutr.* 27, 383-394. (1972).
- 51.- COWARD, B.W., WHITEHEAD, R.G. y COWARD, D.G. *Brit. J. Nutr.* 28, 433-441. (1972).
- 52.- COWARD, W.A. *Brit. J. Nutr.* 34, 459-467. (1975).
- 53.- COWARD, W.A. y SAWYER, M.B. *Brit. J. Nutr.* 37, 127-134. (1977).
- 54.- COWARD, W.A., WHITEHEAD, R.G. y LUNN, P.G. *Brit. J. Nutr.* 38, 115-126. (1977).

- 55.- CUTHBERTSON, D.P. *Lancet.* i, 433. (1942).
- 56.- CUTHBERTSON, D.P. en *Energy metabolism in trauma.* (Porter, R. y Knight, J. eds.) Ciba Foundation Symposium. Churchill. London. pp. 155. (1970).
- 57.- CHANDRA, R.K. *J. Pediatr.* 81, 1194-1200. (1972).
- 58.- CHEEK, D.B. y GRAYSTONE, J.E. *Ped. Res.* 3, 433. (1969).
- 59.- CHEEK, D.B. y HILL, D.E. *Fed. Proc.* 29, 1. 1503-1509. (1970).
- 60.- DALLMAN, P.R. *J. Nutr.* 101, 669-676. (1971).
- 61.- DALLMAN, P.R. y MANIES, E.C. *J. Nutr.* 103, 257-266. (1973).
- 62.- DALLMAN, P.R. y MANIES, E.C. *J. Nutr.* 103, 1311-1318. (1973).
- 63.- DAS, T.K. y WATERLOW, J.C. *Brit. J. Nutr.* 32, 353-373. (1974).
- 64.- DAVIDSON, J.N. *Cold Spring Harborg Symp. Quant. Biol.* 12, 50. (1947).
- 65.- DAVIDSON, S., PASMORE, R., BROCK, J.F. y TRUSWELL, A.S. en *Human nutrition and dietetics.* (Davidson, S., Pasmore, R., Brock, J.F. y Truswell, A.S. eds.) 7<sup>o</sup> ed. Churchill Livingstone N.Y. pp. 71. (1979).
- 66.- DAVIS, J.W.L. y LIJEADAH, S.O. en *Energy metabolism in trauma.* (Porter, R. y Knight, J. eds.) Ciba Foundation Symposium. Churchill. London. pp. 59. (1970).
- 67.- DEAN, R.T. *Nature.* 257, 414-416. (1975).
- 68.- DEAN, R.T. *Fed. Proc.* 39, 15-19. (1980).
- 69.- DE MARTINO, G.N. y GOLDBERG, A.L. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* 75, 1369-1373. (1978).
- 70.- DEO, M.G., BHAN, A.K. y RAMALINGASWAMI, V. *J. Nutr.* 104, 858-864. (1974).



- 71.- DEO, M.G. Wld. Rev. Nutr. Diet. 32, 49-95. (1978).
- 72.- DI LUZIO, N.R. y MORROW, S.H. J. Reticuloendothel. Soc. 9, 273. (1971).
- 73.- DINGLE, J.T. Br. Med. J. 24, 141. (1968).
- 74.- DISCHE, Z. Mikrochemie. 8, 4. (1930).
- 75.- DOUGLAS, S.D., SCHOPFER, K. "The fagocyte in protein-calorie malnutrition. A review" en: Malnutrition and the immune response. (Suskind, R.M. ed.) Raven Press. N.Y. pp.231-244. (1977).
- 76.- DRICOT, C., BEHEYT, P. y CHARLES, P. Annl. Soc. Belge. Med. Trop. 31, 581. (1951).
- 77.- ELDER, H.Y. en: Metabolism and the response to injury. (Willinson, A.W. y Cuthbertson, D. eds.) Pitman Medical Publishing. London. pp. 142. (1975).
- 78.- ENWONWU, C.O. y MUNRO, H.N. Archs. Biochem. Biophys. 132, 532-539. (1970).
- 79.- ENWONWU, C.O. y SCREEBNEY, L.M. J. Nutr. 101, 501-510. (1971).
- 80.- ENWONWU, C.O. Lab. Invest. 26, 626-636. (1972).
- 81.- ENWONWU, C.O. y JACOBSON, K. J. Nutr. 103, 290-301. (1973).
- 82.- EPSTEIN, C.J. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 57, 327. (1967).
- 83.- FAWCETT, J.K. y SCOTT, J.E. J. Clin. Path. 13, 156. (1960).
- 84.- FELIG, P., OWEN, O.E., WAHREN, J. y CAHILL, G.F. Jr. J. Clin. Invest. 48, 584-594. (1967).
- 85.- FELIG, P., MARLISS, E., OWEN, O.E. y CAHILL, G.F. Jr. Arch. Intern. Med. 123, 293-298. (1969).
- 86.- FELIG, P., POZEFSKY, T., MARLISS, E. y CAHILL, G.F. Jr. Science. 167, 1003-1004. (1970).



- 87.- FELIG, P. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 933-955. (1975).
- 88.- FLECK, A. *Proc. Nutr. Soc.* 39, 125-132. (1980).
- 89.- FLORES, H., PARK, N., MACCIONI, A. y MOCKENBERG, F. *Brit. J. Nutr.* 24, 1005-1012. (1970).
- 90.- FREEMAN, T. y COHEN, S. en *Protides of the biological fluids. Proc. 8th. Colloquium. Bruges. 1960.* (Peeters, H. ed.) Elsevier. Amsterdam. pp. 230-234. (1961).
- 91.- FRIMAN, G. *Acta. Univ. Ups. Abstr. Upps. Diss. Fac. Med.* 245, 1. (1976).
- 92.- GAETANI, S., MASSOTTI, D. y SPADONI, M.A. *J. Nutr.* 99, 307-314. (1969).
- 93.- GARLICK, P.J., MILLWARD, D.J., JAMES, W.P.T. y WATERLOW, J.C. *Biochim. Biophys. Acta.* 414, 71-84. (1975).
- 94.- GARROW, J.S., FLETCHER, K. y HALLIDAY, D. *J. Clin. Invest.* 44, 417. (1965).
- 95.- GIRIJA, N.S., PRADHAM, D.S. y SREENIVASAN, A. *Indian J. Biochem.* 2, 85-90. (1965).
- 96.- GOLD, A.J. y COSTELLO, L.C. *J. Nutr.* 105, 208-214. (1975).
- 97.- GOLDBERG, A.L. y CHANG, T.W. *Fed. Proc.* 37, 2301-2307. (1978).
- 98.- GOLDEN, M.H.N. y WATERLOW, J.C. *Clin. Sci. Mol. Med.* 53, 277-288. (1977).
- 99.- GOLDSTONE, A. y KOENIG, H. *Biochem. J.* 141, 527-535. (1974).
- 100.- GRAYSTONE, J.E. y CHEEK, D.B. *Pediatr. Res.* 3, 66. (1969).
- 101.- HAIDER, M. y TARVER, H. *J. Nutr.* 99, 433-445. (1969).
- 102.- HALLIDAY, D. *Clin. Sci.* 33, 365-370. (1967).
- 103.- HEARD, C.R.C., FRANGI, S.M., WRHIGHT, P.M. y Mc CARTNEY, P.R. *Brit. J. Nutr.* 37, 1-21. (1977).

- 104.- HEARD, C.R.C. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* 30, 107-147. (1978).
- 105.- HENSHAW, E.C., HIRSCH, C.A., MORTON, B.A. y HIATT, H.H.  
*J. Biol. Chem.* 246, 436-446. (1971).
- 106.- HENRY, R.J., SOBEL, C. y BERKMAN, S. *Anal. Chem.* 29, 1491.  
(1957).
- 107.- HILL, D.E., HOLT, A.B., PARRA, A. y CHEEK, D.B. *Johns.  
Hopkins. Hosp. Bull.* 127, 146-163. (1970).
- 108.- HIRSCH, G.A. y HIATT, H.H. *J. Biol. Chem.* 241, 5936-5940.  
(1966).
- 109.- HOFFENBERG, R. en *Plasma protein metabolism.* (Rotschill, M.A.  
y Waldmann, T.A. eds.) Chap. 15. Acad. Press. N.Y. London.  
(1970).
- 110.- JAMES, W.P.T. y HAY, A.M. *J. Clin. Invest.* 47, 1958. (1968).
- 111.- JASPER, H.L. y BRASEL, J.A. *J. Nutr.* 104, 405-414. (1974).
- 112.- JAYA RAO, K.S. *Lancet.* 1, 709-711. (1974).
- 113.- KARP, R. y BRASEL, J.A. *Am. J. Dis. Child.* 121, 186. (1971).
- 114.- KAWADA, T., FUGISAWA, T., IMAI, K. y OGATA, K. *J. Biochem.*  
81, 143-152. (1977).
- 115.- KEENE, W.R. y JAUDL, J.M. *Blood.* 26, 127-175. (1965).
- 116.- KELLY, L.S. y DOBSON, E.L. *Br. J. Exp. Path.* 52, 88-99. (1971).
- 117.- KENNEY, F.T. "Hormonal regulation of synthesis of liver enzymes"  
en: *Mammalian protein metabolism.* (Munro, H.N. ed.) Vol. 4.  
Acad. Press. N.Y. pp. 131-175. (1970).
- 118.- KENNEY, M.A., MAGEE, J.L. y PIEDAD-PASCUAL, F. *J. Nutr.* 100,  
1063-1072. (1970).
- 119.- KEUSCH, G.T. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1211-1214. (1977).



- 120.- KEUSCH, G.T., URRUTIA, J.J., FERNANDEZ, R., GUERRERO, O. y CASTAÑEDA, G. "Humoral and cellular aspects of intracellular bacterial killing in Guatemalan children with protein-calorie malnutrition" en: Malnutrition and the immune response. (Suskind, R.M. ed.) Raven Press. N.Y. pp. 245-252. (1977).
- 121.- KINNEY, J.M., DUKE, J.H.Jr., LONG, C.L. y GUMP, F.E. J. Clin. Path. 23 (Suppl. 4) Roy. Coll. Path. 65. (1970).
- 122.- KIRKPATRICK, J.B. y SORENSON, G.D. Exp. Mol. Path. 4, 627-639. (1965).
- 123.- KIRSCH, R.E., FRITH, L., BLACK, E. y HOFFENBERG, R. Nature. 217, 578-579. (1968).
- 124.- KNOOK, D.L. y SLEYSER, E.Ch. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90. 1, 250-257. (1980).
- 125.- KOKOSHIS, P., COOK, J.A. y DI LUZIO, N.R. Physiologist. 20 52. (1977).
- 126.- KRAFT, N. y SHORTMAN, K. Biochim. Biophys. Acta. 217, 164-175. (1970).
- 127.- KREBS, H.A. "The metabolic fate of amino acids" en: M protein metabolism. (Munro, H.N. y Allison, J.B. eds.) Acad. Press. N.Y. pp. 125-176. (1964).
- 128.- KRUSTEV, L.P. Biblthca. Nutr. Diet. 23, 145-154. (1976).
- 129.- LA-LITHA, N. y NAJARAJAN, B. Indian J. Biochem. Biophys. 14, 247-250. (1977).
- 130.- LAU, H.C. y RITCHEY, S.J. J. Nutr. 107, 2091-2099. (1977).
- 131.- LAZZARI, E.P., SULLIVAN, E. y MURRAY, D.R. Texas. Rep. Biol. Med. 28, 4. (1970).
- 132.- LEBLOND, C.P. en Regulation of organ and tissue growth.(Gross, R.J. ed.) Acad. Press. N.Y. pp. 13-39. (1972).



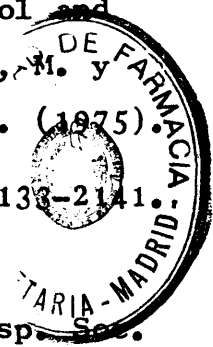
- 133.- LEDUC, E.H. *Am. J. Anat.* 84, 397. (1949).
- 134.- LEWIS, Ch. G. y WINICK, M. *Fed. Proc.* 36, 4677 (Abst). (1977).
- 135.- LEWIS, Ch. G. y WINICK, M. *J. Nutr.* 108, 329-340. (1978).
- 136.- LIU, A.Y. y NEWHAUS, O.W. *Biochim. Biophys. Acta.* 166, 195. (1965).
- 137.- LONG, C.L. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1301-1310. (1977).
- 138.- LONG, C.L., SCHILLER, W.R., BLAKEMORE, W.S., GEIGER, J.W., O'DELL, M. y HENDERSON, K. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1349-1352. (1977).
- 139.- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDEEL, R. *J. Biol. Chem.* 193, 265. (1951).
- 140.- LOZZIO, B.B. *J. Reticuloendothel. Soc.* 4, 85-108. (1967).
- 141.- LUNDGREEN, E. *Exp. Cell. Res.* 110, 25-30. (1977).
- 142.- LUNN, P.G., WHITEHEAD, R.G. y BAKER, B.A. *Brit. J. Nutr.* 36, 219-230. (1976).
- 143.- LUNN, P.G., WHITEHEAD, R.G., COLE, T.J. y AUSTIN, S. *Brit. J. Nutr.* 41, 73-84. (1979).
- 144.- Mc CANCE, R.A. "Malnutrition in the children underdeveloped countries" en *Recent advances in pediatries*. Churchill, A. ed.) London. pp. 479-525. (1971).
- 145.- Mc CANCE, R.A. y WIDDOWSON, E.N. *Proc. R. Soc. B.* 185, 1. (1974).
- 146.- Mc DONALD, M.R. en *Methods in enzymology*. (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. eds.) Vol. II. Acad. Press. N.Y. pp. 437-447. (1955).
- 147.- Mc GUIRE, E.A., YOUNG, V.R., NEWBERNE, P.M. y PAYNE, B.J. *Arch. Pathol.* 86, 60. (1968).

- 148.- Mc LEAN, W.L. y GRAHAM, G.G. Am. J. Clin. Nutr. 32, 1381-1387. (1979).
- 149.- MALLETT, L.E., EXTON, J.H. y PARK, C.R. J. Biol. Chem. 244, 5713-5723. (1969).
- 150.- MANDEL, P., QUIRIN, C., BLOCH, M. y JACOB, M. Life Sci. 5, 325. (1966).
- 151.- MARIANI, A., SPADONI, M.A. y TOMASSI, G. Nature. 27, 199. 378-379. (1963).
- 152.- MATA, L.J., KROMAL, R.A., URRUTIA, J.J. y GARCIA, B. Am. J. Clin. Nutr. 30, 1215-1227. (1977).
- 153.- MAY, J.M. y LEMONS, H. J. Am. Med. Ass. 207, 2401-2405. (1969).
- 154.- MAYANSKAYA, N.N., SCHERBAKOV, V.I. y PANIN, L.E. Tsitologiya. 19. 10, 1189-1193. (1977).
- 155.- MEYER, R.R. y SIMPSON, M.V. J. Biol. Chem. 245, 3426-3435. (1970).
- 156.- MILNER, R.D.G. Phys. Ther. 31, 219. (1972).
- 157.- MILLWARD, D.J., GARLICK, P.J., JAMES, W.P.T. y NNANYELUGO, D.O. Brit. J. Nutr. 32, 127-142. (1974).
- 158.- MILLWARD, D.J., GARLICK, P.J. y NNANYELUGO, D.O. Proc. Nutr. Soc. 34, 33A. (1974).
- 159.- MILLWARD, D.J., GARLICK, P.J., STEWART, R.J.C., NNANYELUGO, D.O. y WATERLOW, J.C. Biochem. J. 150, 235. (1975).
- 160.- MILLWARD, D.J., NNANYELUGO, D.O. y CHATTERJEE, A.K. Proc. Nutr. Soc. 34, 95-96. (Abst) (1975).
- 161.- MILLWARD, D.J. y BATES, S. en Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body. (Waterlow, J.C., Garlick, P.J. y Millward, D.J. eds.) North Holland Publishing Company. Amsterdam. pp. 710. (1968).



- 162.- MILLWARD, D.J. *Proc. Nutr. Soc.* 38, 89. (1979).
- 163.- MITCHELL, H.H. en *Comparative nutrition of man and domestic animals.* (Mitchell, H.H. ed.) Acad. Press. Inc. London. Vol. 2, pp. 403. (1964).
- 164.- MONCKEBERG, F. en *Calorie deficiencies and protein deficiency.* (Mc Cance, R.A. y Widdowson, E.M. eds.) London. pp. 91. (1968).
- 165.- MONTECUCCOLI, G., NOVELLO, F. y STIRPE, F. *J. Nutr.* 102, 507-514. (1972).
- 166.- MOORE, F.D. en *Davis Christopher textbook of surgery: The biological basis of modern surgical practice.* (Sabiston, D. C. ed.) Saunders. Philadelphia. London. pp. 27. (1977).
- 167.- MORGAN, E.H. y PETERS, T. *J. Biol. Chem.* 240, 3500-3505. (1971).
- 168.- MORPURGO, B. *Arch. Ital. Biol.* 11, 118. (1889).
- 169.- MORTIMORE, G.E. y NEELY, A.N. "Regulatory effects of insulin, glucagon and amino acids on hepatic protein turnover in - association with alterations of the lysosomal system" en: *Intracellular protein turnover.* (Schimke, R.T. y Katunuma, N. eds.) Acad. Press. N.Y. pp. 265-279. (1975).
- 170.- MORTIMORE, G.E. y WARD, W.F. en *Lysosomes in Biology and - Pathology.* (Dingle, J.T. y Dean, R.T. eds.) North Holland. Amsterdam. pp. 157-184. (1976).
- 171.- MORTON, J.A., PICKLES, M.M., SUTTON, L. y SKOV, F. *Vox. Sang.* 21, 141. (1971).
- 172.- MULROW, P.J. en *Duncan's diseases of metabolism.* (Bondy, P.K. y Rosenberg, L.E. eds.) 2, Saunders. Philadelphia. London. pp. 1431-1458. (1974).
- 173.- MUNRO, H.N. y CUTHBERTSON, D.P. *Biochem. J.* 37, 12. (1943).
- 174.- MUNRO, H.N. y CHALMERS, M.I. *Brit. J. Exp. Path.* 26, 396. (1945).

- 175.- MUNRO, H.N., NAISMITH, D.J. y WIKRAMANAYAKE, T.W. Biochem. J. 54, 198-205. (1953).
- 176.- MUNRO, H.N. "General aspects of the regulation of protein metabolism by diet and by hormones" en Mammalian protein metabolism. (Munro, H.N. y Allison, J.B. eds.) Acad. Press. N.Y. Vol. 2. pp. 381-481. (1964).
- 177.- MUNRO, H.N., WADDINGTON, S. y BEGG, D.J. J. Nutr. 85, 319-328. (1965).
- 178.- MUNRO, H.N. en Mammalian protein metabolism (Munro, H.N. ed.) Acad. Press. N.Y. Vol. 4. pp. 237-262. (1968).
- 179.- MUNRO, H.N. en Mammalian protein metabolism (Munro, H.N. ed.) Acad. Press. N.Y. Vol. 3. pp. 267-319. (1969).
- 180.- MUNRO, H.N. "A general survey of mechanisms regulating protein metabolism" en Mammalian protein metabolism. (Munro, H.N. ed.) Acad. Press. N.Y. Vol. 4. pp. 3-130. (1970).
- 181.- MUNRO, H.N., HUBERT, C. y BALIGA, B.S. "Regulation of protein synthesis in relation to amino acid supply" en Alcohol and abnormal protein synthesis. (Rothschild, M.A., Oratz, M. y Schreiber, S.S. eds.) Pergamon Press. N.Y. pp. 33-66. (1975).
- 182.- MUÑOZ, E., MARCOS, A. y UNZAGA, M.T. J. Nutr. 111, 2133-2141. (1981).
- 183.- MUÑOZ, E., MARCOS, A. y UNZAGA, M.T. II Cong. Fed. Esp. Biol. Exp. pp. 285. (1981).
- 184.- MURAMATSU, K. y ASHIDA, K. J. Nutr. 76, 143-150. (1962).
- 185.- NAJDAL, C. y ZAJDELA, F. Exp. Cell. Res. 42, 117. (1966).
- 186.- NALDER, B.N., MAHONEY, A.N., RAMAKRISHNAN, R. y HENDRICKS, D.G. J. Nutr. 102, 535-541. (1972).



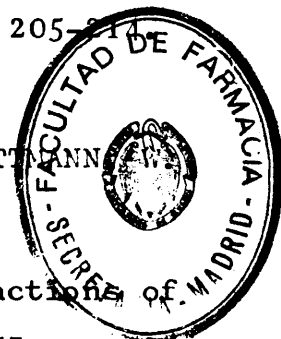
- 187.- NEUFELD, H.A., PACE, J.A. y WHITE, F.E. *Metabolism*. 25, 877-884. (1976).
- 188.- NEWBERNS, P.M. "Effects of folic acid B<sub>12</sub> choline and methionine on immunocompetence and cell-mediated immunity" en: *Malnutrition and the immune response*. (Suskind, R.M.ed.) Raven Press. N.Y. pp. 374. (1977).
- 189.- NORMAN, M., GAMULIN, S. y CLARK, K. *Biochem. J.* 134, 387-398. (1973).
- 190.- NORTH, R.J. *J. Exp. Med.* 130, 315-326. (1969).
- 191.- NOTHDURFT, W. y FLEMMING, K. "Quantitative study of sex difference in R.E. phagocytosis" en: *The reticuloendothelial system and immune phenomena*. (Di Luzio, N.R. y Flemming, K. eds.) Plenum Press. N.Y. pp. 95. (1971).
- 192.- ODESSEY, R., KHAIRALLAH, E.A. y GOLDBERG, A.L. *J. Biol. Chem.* 249, 7623-7629. (1974).
- 193.- O'DONNELL, T.F., CLOWES, G.H.A., BLACKBURN, G.L., RYAN, N.T., BENOTTI, P.N. y MILLER, J.D.B. *Surgery*. 80, 192-200. (1976).
- 194.- ONISHI, T. *J. Biochem.* 67, 577-585. (1970).
- 195.- ORTEGA, R.M. Tesis Doctoral. "Cortisol y algunos parámetros nutricionales en ratas: Influencia de la orquidectomía". Facultad de Farmacia. Madrid. (1981).
- 196.- OWEN, O.E., FELIG, P., MORGAN, A.P., WAHREN, J. y CAHILL, G. F.Jr. *J. Clin. Invest.* 48, 574-583. (1969).
- 197.- OWEN, O.E. y REICHARD, G. *J. Clin. Invest.* 50, 1536. (1971).
- 198.- PAIN, V.M. y GARLICK, P.J. *J. Biol. Chem.* 249, 4510. (1974).
- 199.- PAIN, V.M., CLEMENS, M.J. y GARLICK, P.J. *Biochem. J.* 172, 129. (1978).

- 200.- PAPADIMITRIOU, J.M. y ARCHER, M. J. *Ultrast. Res.* 49, 372. (1974).
- 201.- PARK, G.R., MALLET, L.E., FRIEDMAN, N. y EXTON, J.H. *Proceeding of the Sixth Congress of International Diabetes Federation Stockholm 1967. Excerpta. Medica Foundation. Amsterdam.* pp. 354. (1969).
- 202.- PARNAS, J. y WAGNER, R. *Biochem. Ztschr.* 125, 253. (1921).
- 203.- PARRILLA, R., AYUSO PARRILLA, M.S. y GOODMAN, M.N. *Anal. Biochem.* 54, 362-369. (1973).
- 204.- PAWARDHAN, V.N., MAGHRABI, R.H., MCUSA, W., GABR, M.K. y MARAGHY, S.E. *Am. J. Clin. Nutr.* 24, 906-912. (1971).
- 205.- PETERMAN, M.L. en *The plasma proteins.* (Putman, F.W. ed.) *Acad. Press. N.Y. London. Vol. 2.* pp. 310. (1960).
- 206.- PETERS, T. y PETERS, J.C. *J. Biol. Chem.* 247, 3858. (1972).
- 207.- PICOU, D. y TAYLOR-ROBERTS, T. *Clin. Sci.* 36, 283-296. (1967).
- 208.- PICOU, R.J. *Biochim. Biophys. Acta.* 273, 80. (1972).
- 209.- POKROVSKY, A.A., GAPAROV, M.M. *Tsitilogiya.* 10, 1133-1170. (1968).
- 210.- POKROVSKY, A.A. *Nutrition and cell. Proc. 8th. Int. Congr. on Nutr. Prague.* pp. 27-31. (1969).
- 211.- POKROVSKY, A.A. *Akad. Med. Nank. SSSR.* 8, 31-44. (1974).
- 212.- POKROVSKY, A.A. *Biblitheca. Nutr. Diet.* 23, 34-50. (1976).
- 213.- POOLE, B. y WIBO, M. *J. Biol. Chem.* 248, 6221-6226. (1973).
- 214.- POWANDA, M.C. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1254. (1977).
- 215.- PRICE, P. y BELL, R.G. *J. Reticuloendothel. Soc.* 18. 4, 230-243. (1975).

MACIA-D

- 216.- PROZEPSKY, T., FELIG, P., TOBIN, J.D., SOELDNER, J.S. y CAHILL, G.F. *J. Clin. Invest.* 48, 2273-2282. (1976).
- 217.- FUGH-HUMPHREYS, R.G.P. y THOMSON, A.W. *J. Reticuloendothel. Soc.* 25, 1. (1979).
- 218.- QUIRIN-STRICKER, C. y MANDEL, P. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 31-45. (1968).
- 219.- RAO, B.S.N. y GOPALAN, C. *Indian J. Med. Res.* 46, 93. (1958).
- 220.- RATCLIFFE, H.L. y MERRICK, J.V. *Am. J. Pathol.* 33, 107. (1957).
- 221.- RATCLIFFE, J.D. y WEBSTER, A.J.F. *Brit. J. Nutr.* 41, 111-124. (1979).
- 222.- READ, W.W.C., Mc LAREN, D.S. y TCHALIAN, M. *Clin. Sci.* 40, 357-380. (1971).
- 223.- READ, W.W.C., Mc LAREN, D.S. y TCHALIAN, M. *Clin. Sci.* 42, 139-143. (1973).
- 224.- REDDY, M.K., ETLINGER, J.D., RABINOWITZ, M., FISCHMAN, D.A. y ZAK, R. *J. Biol. Chem.* 250, 4278-4284. (1975).
- 225.- REISS, E. *Metabolism.* 8, 151. (1959).
- 226.- REITMANN, S. y FRANKEL, S. *Amer. J. Clin. Path.* 28, 56. (1957).
- 227.- RICHARDS, J.R., HARLAND, W.A. y ORR, J.S. en *Hormones, metabolism and stress: Recent Progress Slovak Academy of Sciences. Bratislava.* pp. 151. (1973).
- 228.- RICHARDS, J.R. *Proc. Nutr. Soc.* 39, 113-123. (1980).
- 229.- ROOBOL, A. y ALLEYNE, G.A.O. *Brit. J. Nutr.* 32, 189-197. (1974).
- 230.- ROSSO, P., NELSON, M. y WINICK, M. *Growth.* 37, 143-151. (1973).

- 231.- ROSSO, P. y WINICK, M. J. Nutr. 105, 1104-1110. (1975).
- 232.- ROTHSCHILD, M.A., ORATZ, M., MONGELLI, J. y SCHEREIBER, S.S.  
J. Clin. Invest. 47, 2591-2599. (1968).
- 233.- ROZOVSKI, S.J., ROSSO, P. y WINICK, M. J. Nutr. 108, 1680-  
1690. (1978).
- 234.- RYAN, N.T., BLACKBURN, G.L. y CLOWES, G.H.A. Metabolism. 23,  
1081-1089. (1974).
- 235.- SAJDEL, E.M. y JACOB, S.T. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45,  
707. (1971).
- 236.- SANCHEZ-MUNIZ, F.J. Tesis Doctoral. "Contribución al estudio  
"in vivo" de la inmunidad celular". Facultad de Farmacia de  
Madrid. (1976).
- 237.- SANCHEZ-MUNIZ, F.J., MUÑOZ-MARTINEZ, E., UNZAGA-MARCO, M.T.  
y LUCAS-GALLEGO, J. I.R.C.S. Med. Sci. 5, 275. (1977).
- 238.- SANCHEZ-MUNIZ, F.J., MARCOS, A., MUÑOZ, E., ACEVEDO, P.,  
UNZAGA, M.T. y CUESTA, C. II Cong. Fed. Esp. Soc. Biol. Exp.  
pp. 247. (1981).
- 239.- SANTIDRIAN, S. y YOUNG, V.R. Rev. Esp. Fisiol. 36, 205-214  
(1980).
- 240.- SAUNDERS, S.J., TRUSWELL, A.S., BARBEZAT, G.O., WITTMANN  
y HANSEN, J.D.L. Lancet. 2, 795. (1967).
- 241.- SCRIMSHAW, N.S., TAYLOR, C.E. y GORDON, J.E. Interactions of  
nutrition and infection W.H.O. Monograph. Ser. Nº 57. pp. 39.  
(1968).
- 242.- SCHELP, F.P., MIGASENA, P., PONGPAEW, P. y SCHRURS, W.H.  
Am. J. Clin. Nutr. 31, 451-456. (1978).
- 243.- SCHIMKE, R.T. J. Biol. Chem. 237, 1921-1924. (1962).



- 244.- SCHIMKE, R.T. "Regulation of protein degradation in mammalian tissues" en: **Mammalian protein metabolism.** (Munro, H.N. ed.) Acad. Press. N.Y. Vol. 4. pp. 178-228. (1964).
- 245.- SCHIMKE, R.T. y DOYLE, D. "Control of enzymes levels in animal tissues" en: **Animal Review of Biochemistry Annual Reviews Inc.** (Snell, E.E., Boyer, P.D., Meister, A. y Sinsheurer, R.L. eds.) Palo Alto, California. pp. 929-976. (1970).
- 246.- SHAW, C. y FILLIOS, L.C. *J. Nutr.* 96, 327-336. (1968).
- 247.- SHERWIN, R.S., HENDLER, R.G. y FELIG, P. *J. Clin. Invest.* 55, 1382-1390. (1975).
- 248.- SHORE, G. y TATA, J.R. "The effects of nutrition and hormones on protein turnover in the liver" en: **Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body.** (Waterlow, J.C., Garlick, P.J. y Millward, D.J. eds.) Elsevier. North Holland. Amsterdam. pp. 697-746. (1978).
- 249.- SCHMITH, E. en *Methoden der enzymatischen analyse.* (Bergmeyer, H.U. ed.) 3rd. ed. II. Verlag Chemie. Weinheim. pp. 490. (1974).
- 250.- SEIDEL, H.J. y NOTHDURFT, W.J. *Reticuloendothel. Soc.* 19, 3. (1976).
- 251.- SENDER, P.M., JAMES, W.P.T. y GARLICK, P.J. "Proceedings of the second Congress on energy regulation in man" en: **Regulation of energy balance in man.** (Sequier, E. ed.) *Medicine et Higiene.* Geneve. 1974. (1975).
- 252.- SENEAL, J. y ANBRY, L. *Bull. Méd. Afr. Occid. Fr.* 3, 9. (1958).
- 253.- SIDRANSKY, H., EPSTEIN, S.M., VERNEY, E. y VERBIN, R.S. *J. Nutr.* 106, 930-939. (1976).
- 254.- SIEGEL, H., SQUIBB, R.L., SOLOTOVSKY, M. y OTT, W.H. *Am. J. Pathol.* 52, 349-367. (1968).

- 255.- SNELL, K. y DUFF, D.A. *Biochem. J.* 162, 399-403. (1977).
- 256.- SOBOCINSKI, P.Z., CANTERBURY, W.J.Jr., MAPES, C.A. y DINTERMAN, R.E. *Am. J. Physiol.* 234, E399-E406. (1978).
- 257.- SOBERON, G. y SANCHEZ, Q.E. *J. Biol. Chem.* 236, 1602-1609. (1961).
- 258.- SPRINSON, D.B. y RITTEMBERG, D. *J. Biol. Chem.* 180, 707-714. (1949).
- 259.- SQUIBB, R.L. *J. Nutr.* 82, 422-426. (1964).
- 260.- SQUIBB, R.L., SIEGEL, H. y SOLOTOROVSKY, M. *J. Nutr.* 86, 133-142. (1965).
- 261.- STANDARD, K.L., WILLIS, V.G. y WATERLOW, J.C. *Am. J. Clin.* 7, 271. (1959).
- 262.- STEPHEN, J.M.L. y WATERLOW, J.C. *Lancet.* 118-119. (1968).
- 263.- SRIVASTAVA, U., SPACH, C. y ASCHKENASY, A. *J. Nutr.* 105, 924-938. (1975).
- 264.- STENRAM, U. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 44, 239-246. (1958).
- 265.- SUSKIND, R.M. en *Malnutrition and the immune response.* (Suskind, R.M. ed.) Raven Press. N.Y. (1977).
- 266.- TAGLIAMANTE, B., BENEDETTI, C.P. y SPADONI, M.A. *Nut. Res. Int.* 5, 305. (1972).
- 267.- TEJADA, C., ARGUETA, V., SANCHEZ, M. y ALBERTAZZI, C. *J. Pediatr.* 64, 753-761. (1964).
- 268.- THOMSON, R.Y., HEAGY, R.C., HUTCHISON, W.C. y DAVIDSON, J.N. *Biochem. J.* 53, 460. (1953).
- 269.- TILSTONE, W.J. y CUTHBERTSON, D.P. en *Energy metabolism in trauma.* (Porter, R. y Knight, J. eds.) Ciba Foundation Symposium. Churchill. London. pp. 166. (1970).



- 270.- TISELIUS, A. y FLODIN, P. "Zone electrophoresis". en *Advances in protein chemistry*. Vol. 8. Acad. Press. N.Y. pp. 461. (1953).
- 271.- UNANUE, E.R. *Adv. Immunol.* 15, 95. (1972).
- 272.- UNZAGA, M.T., MUÑOZ, E., SANCHEZ-MUNIZ, F.J. y LUCAS, J. *I.R.C.S. Med. Sci.* 4, 69. (1976).
- 273.- UNZAGA, M.T., SANCHEZ-MUNIZ, F.J., MUÑOZ, E. y LUCAS, J. *I.R.C.S. Med. Sci.* 5, 48. (1977).
- 274.- VELASCO, E.G., BRASEL, J.A., SIGULEM, D.M., ROSSO, P. y WINICK, M. J. *Nutr.* 103, 213-217. (1973).
- 275.- VITERI, F.E. y ALVARADO, M. *Rev. Col. Med. (Guatemala)*. 21, 175. (1970).
- 276.- VITERI, F.E. y TORUN, B. en *Modern nutrition in health and disease*. 6th ed. (Goodhart, R.S. y Shils, M.E. eds.) Acad. Press. N.Y. pp. 697-720. (1980).
- 277.- VON DER DECKEN, A. y OMSTEDT, P.T. *J. Nutr.* 102, 1555-1562. (1972).
- 278.- VON DER DECKEN, A., LUND, B. y O'TOOLE, C. *J. Nutr.* 108, 1274-1280. (1978).
- 279.- WANNEMACHER, R.W.Jr. y ALLISON, J.B. en *Protein nutrition and free amino acid patterns*. (Leathem, J.H. y New Brunswick, N.J. eds.) Rutgers. University. (1968).
- 280.- WANNEMACHER, R.W.Jr., WANNEMACHER, C.F. y YATVIN, M.B. *Biochem. J.* 124, 385-392. (1971).
- 281.- WANNEMACHER, R.W.Jr., DINTERMAN, R.E., PEKAREK, R.S., BARTELLONI, P.J. y BEISEL, W.R. *Am. J. Clin. Nutr.* 28, 110-118. (1975).
- 282.- WANNEMACHER, R.W.Jr. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1269. (1977).

- 283.- WARD, W.F. y MORTIMORE, G.B. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 37, 1331. (1978).
- 284.- WASCHSTEIN, M. en: The liver. Vol. 2. Acad. Press. N.Y.London. pp. 137-194. (1963).
- 285.- WATERLOW, J.C., BRAS, G. y DE PASS, E. J. Trop. Pediatr. 2, 189-195. (1957).
- 286.- WATERLOW, J.C., CRAVIOTO, J. y STEPHEN, J.M.L. Advan. Protein. Chem. 15, 131-238. (1960).
- 287.- WATERLOW, J.C. y STEPHEN, J.M.L. Brit. J. Nutr. 20, 461-484. (1966).
- 288.- WATERLOW, J.C. y STEPHEN, J.M.L. Clin. Sci. 33, 489-506. (1967).
- 289.- WATERLOW, J.C. y STEPHEN, J.M.L. Clin. Sci. 35, 287-305. (1968).
- 290.- WATERLOW, J.C. y ALLEYNE, G.A.O. Adv. Protein. Chem. 25, 117-241. (1971).
- 291.- WATERLOW, J.C. Lancet. 2, 712. (1974).
- 292.- WATERLOW, J.C. "Adaptation to low protein intakes" en: Protein calorie malnutrition. (Olson, R.E. ed.) Acad. Press. N.Y. pp. 23-25. (1975).
- 293.- WATERLOW, J.C., GARLICK, P.J. y MILLWARD, D.J. en: Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body. North Holland, Amsterdam. N.Y. Elsevier. (1978).
- 294.- WATERLOW, J.C. y STEPHEN, J.M.L. en: Nitrogen metabolism in man. (Waterlow, J.C. y Stephen, J.M.L. eds.) App. Sci. Publ. Ltd. London. New Jersey. (1981).
- 295.- WEBB, T.E., BLOBEL, G. y POTTER, V.R. Cancer. Res. 26, 253. (1966).
- 296.- WHEATLEY, D.N. Exp. Cell. Res. 74, 455. (1972).

- 297.- WHITEHEAD, R.G. en: Calorie deficiencies and protein deficiency. (Mc Cance, E. y Widdowson, N. eds.) London. Churchill. pp. 109-117. (1968).
- 298.- WHITEHEAD, R.G. y ALLEYNE, G.A.O. Brit. Med. Bull. 28, 72-78. (1972).
- 299.- WHITEHEAD, R.G. Proc. Nutr. Soc. 39, 227-231. (1980).
- 300.- WIDDOWSON, E.M. y Mc CANCE, R.A. Brit. J. Nutr. 11, 198-206. (1957).
- 301.- WIDDOWSON, E.M. y Mc CANCE, R.A. Proc. Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sci. 158, 329-342. (1963).
- 302.- WILKINSON, A.W., BILLING, B.H., NAGY, G. y STEWART, C.P. "Body Fluids" en Surgery 2nd. ed. (1960).
- 303.- WILKINSON, A.W. en Wound Healing. (Illing-Worth, C. ed.) Churchill. London. pp. 153. (1966).
- 304.- WILKINSON, A.W. y CUTHBERTSON, D. en: Metabolism and the response to injury. (Wilkinson, A.W. y Cuthbertson, D. eds.). Pitman Medical. Publishing. Ltd. London. (1976).
- 305.- WILMORE, D.W. Am. J. Clin. Nutr. 30, 1355-1356. (1977).
- 306.- WINICK, M. y NOBLE, A. J. Nutr. 89, 300-306. (1966).
- 307.- WINICK, M., FISH, I. y ROSSO, P. J. Nutr. 95, 623-626. (1968).
- 308.- WINICK, M. y ROSSO, P. "Brain DNA synthesis" en Protein calorie malnutrition. (Olson, R.E. ed.) Acad. Press. N.Y. pp. 93-105. (1975).
- 309.- WOOLLES, W.R. y DI LUZIO, N.R. Science. 142, 1078. (1963).
- 310.- WOODSIDE, K.H. y MORTIMORE, G.E. J. Biol. Chem. 247, 6474-6481. (1972).
- 311.- WUNNER, W.H., BELL, J. y MUNRO, H.N. Biochem. J. 101, 417. (1966).

- 312.- YOUNG, V.R. y HUANG, P.C. Brit. J. Nutr. 23, 271. (1968).
- 313.- YOUNG, V.R., CHANG, S.C. y NEWBERNE, P.M. J. Nutr. 94, 361. (1968).
- 314.- YOUNG, V.R. "The role of skeletal and cardiac muscle in the regulation of protein metabolism" en: Mammalian protein metabolism. (Munro, H.N. ed.) Acad. Press. N.Y. Vol. 4. pp. 585-674. (1970).
- 315.- YOUNG, V.R. y SCRIMSHAW, N.S. Sci. Am. 225, 14-21. (1971).
- 316.- YOUNG, V.R., STEFFEE, W.P., PENCHARZ, P.B., WINTERER, J.C. y SCRIMSHAW, N.S. Nature, London. 253, 192-193. (1975).
- 317.- YOUNG, V.R. y MUNRO, H.N. Fed. Proc. 37, 2291-2300. (1978).
- 318.- ZEMAN, F.J., SHARADER, R.E. y ALLEN, L.H. Nutr. Rep. Int. 7, 421-436. (1973).

