

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

32

"ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS GLUCOSA - 6 - FOSFATASA,
FOSFOGLUCOMUTASA Y FOSFORILASA EN EL HIGADO DE
RATAS DESNUTRIDAS Y EN RECUPERACION".

T E S I S
Que para obtener el titulo de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a
BLANCA ROSA LÓPEZ CASTRO

México, D. F.

1 9 7 7



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tesis 1977

M- [REDACTED]

FECHA [REDACTED]

PROC [REDACTED]

[REDACTED]

236



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof.: Angela Sotelo López.
Vocal Prof.: Victoria E. Valles de Bourges.
Secretario Prof.: Carmen Reyna Bordes.
1er. Suplente Prof.: Mario Miranda Castro.
2°. Suplente Prof.: Guillermo Rendón Padilla.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Fisiología de la Nutrición y Tecnología.
de alimentos. División de Nutrición. I.N.N.

Sustentante: Blanca Rosa López Castro,
Asesor del Tema: Dra. Victoria E. Valles de Bourges.
Asesor Técnico: Dr. Hector Bourges R.

Dedico este trabajo:

A mis padres con gran cariño
y gratitud, por todo lo bello
que supieron darme.

A mi esposo y a mi hijito,
por lo feliz que he sido
a su lado.

A mis hermanos: Ma Luisa,
Eduardo, Enrique, Carmen,
Ma Nieves, Elena y Rocío.

A mis amigos y compañeros
del laboratorio de la Divi
sión de Nutrición. A mis
Maestros y compañeros de
estudios.

El costo de este trabajo fué patrocinado parcialmente por el Instituto Nacional de la Nutrición y por un donativo al Programa Nacional de Alimentación del CONACYT y Secretaría de la Presidencia.

El presente trabajo fué dirigido por la Dra Victoria E. Valles de Bourges, Jefe del Laboratorio de Investigación de la Clínica de Diabetes del I.N.N. y asesorado por el Dr. Hector Bourges R. Jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición y Tecnología de Alimentos de la División de Nutrición I.N.N. a quienes en una forma sincera agradezco su valiosa colaboración y apoyo, así como su acertada dirección en desarrollo de este trabajo.

Con agradecimiento a la Q.F.B.
Elsa Muñoz de H. por su ayuda
y cooperación.

Con agradecimiento al Dr. Adolfo
Chavez V. por las facilidades con
cedidas para la realización de este
trabajo.

I N D I C E.

	página
1.- Resumen.	1
2.- Introducción:	
Desnutrición.	3
Gausas de la desnutrición.	4
Desnutrición en México	5
Etapas de la desnutrición.	9
Cuadro clínico de la desnutrición	11
Consecuencias de la desnutrición.	14
Recuperación de la desnutrición.	17
Síndrome de recuperación nutricia.	17
Hepatomegalia.	20
Metabolismo de Carbohidratos.	24
Relación con otras enfermedades que producen hepatomegalia.	31
Metabolismo de lípidos.	35
3.- Hipótesis del trabajo.	39
4.- Objetivos de la tesis.	41
5.- Diseño del experimento.	43
6.- Material y Métodos:	
Material biológico.	47
Métodos.	51
Determinaciones enzimáticas.	58
Análisis estadístico.	67
7.- Resultados y Discusión:	
Experimento I.	68
Experimento II.	76
Experimento III.	88
Experimento de recuperación nutricia.	114
8.- Conclusiones.	127
9.- Bibliografía.	129

A B R E V I A T U R A S

ADP	ADENOSINDIFOSFATO
AMP	ADENOSINMONOFOSFATO
ATP	ADENOSINTRIFOSFATO
ATC	ACIDO TRICLOROACETICO
cAMP	ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO
DNA	ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
EDTA	ACIDO ETILENDIAMINO TETRA ACETICO
G-6-PO ₄	GLUCOSA - 6 - FOSFATO
G-1-PO ₄	GLUCOSA - 1 - FOSFATO
H ACT	HORMONA ADRENOCORTICOTROPICA
H E T	HORMONA ESTIMULANTE DE TIROIDES
K _i	CONSTANTE DE INHIBICION
K _m	CONSTANTE DE MICHAELIS
NADH	NICOTINAMIDA ADENIN DINUCLEOTIDO
P _i	FOSFORO INORGANICO
PPI	PIROFOSFATO
RNA	ACIDO RIBONUCLEICO
rpm	REVOLUCIONES POR MINUTO
REP	RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA
UDP	URIDINDIFOSFATO
UDPG	URIDINDIFOSFATOGLUCOSA

RESUMEN

Se ha observado que los niños desnutridos, durante la recuperación a base de una dieta hiperprotéinica "ad libitum", desarrollan una serie de síntomas y signos incluyendo los del síndrome de hipertensión portal, agrupados con el nombre de "Síndrome de recuperación nutricia". Se ha propuesto que el síndrome de hipertensión portal se debe a una acumulación excesiva de glucógeno en el hígado. Considerado esta hipótesis como muy posible, se esperaba encontrar una actividad elevada de las enzimas glucogenéticas (Fosfoglucomutasa) y una actividad disminuída de las enzimas glucogenolíticas (Glucosa-6-fosfatasa y Fosforilasa).

Debido a la dificultad que existe para reproducir en la rata la desnutrición como se observa en el ser humano, se hicieron estudios para determinar las condiciones experimentales - en cuanto a tipo de dieta, período de desnutrición, período de recuperación etc. Las condiciones encontradas fueron:

a) Grupo experimental: ratas desnutridas durante 12 días a base de una dieta de maíz con un aporte proteínico del 5% y recuperadas durante tres días con Caseína al 12.5%.

b) Grupo testigo: ratas desnutridas durante 12 días con dieta de maíz cuyo aporte proteínico es del 5%.

c) Grupos testigos secundarios I y II; ratas alimentadas con Caseína al 12.5% durante 12 y 15 días.

Para la determinación enzimática fué necesario estudiar la cinética de las tres enzimas mencionadas anteriormente a fin de poder medir la actividad en condiciones óptimas.

En los resultados se observó una clara diferencia entre el grupo experimental y el grupo testigo; las ratas alimentadas con Maíz produjeron resultados negativos de R.E.P., el grupo recuperado obtuvo una R.E.P. positiva mayor que la obtenida en las ratas no desnutridas. En lo que se refiere al peso del hígado en relación al peso corporal al momento del sacrificio, se encontró una franca hepatomegalia en el grupo recuperado. El contenido de glucógeno en el hígado del grupo recuperado alcanzó las mayores concentraciones en comparación con los otros grupos. La actividad específica de la Glucosa-6-fosfatasa y de la Fosforilasa fué menor en el grupo recuperado, siendo significativa diferencia con el grupo desnutrido. La actividad específica de la Fosfoglucomutasa alcanzó su mayor nivel en el grupo recuperado con diferencias significativas respecto al grupo desnutrido.

Los datos anteriores permiten concluir que la recuperación de ratas desnutridas se ve acompañada de una tendencia anabólica, de hepatomegalia, de acumulación de glucógeno en el hígado, de una mayor actividad de la Fosfoglucomutasa y de una menor actividad de la Fosforilasa y de la Glucosa-6-fosfatasa.

I N T R O D U C C I O N .

DESNUTRICIÓN.

La desnutrición se encuentra difundida en todas partes del mundo, pero en general se encuentra en mayor proporción en -- donde la pobreza es la regla y no la excepción y en donde la ignorancia y la superstición están en su apogeo. Un grupo de exper--tos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos elaboró un presupuesto alimenticio mundial en 1966 (1) de donde concluyeron que únicamente 40 países contaban con las provisiones alimenticias adecuadas. Estos países se encuentran en las zonas templadas e incluyen: América del Norte, la U.R.S.S., Oceanía, las regiones meridionales de Sudamérica, Sudáfrica y el Japón. En cambio Setenta naciones fueron clasificadas como países de déficit alimenticio; entre ellos se encuentran, algunos de América Latina, - Africa, Asia Occidental, Asia Comunista y el Lejano Oriente. Se ha calculado que en estas regiones en déficit alimenticio viven - alrededor de dos terceras partes de la población total del mundo.

En México la mala nutrición representa uno de los problemas sociales más importantes, localizándose de una manera más marcada en el medio rural, principalmente en las zonas Sur y Sureste del país (2) en donde se consume una dieta monótona y pobre en calidad, escasa en proteínas y deficiente en varias vitaminas (3). Esta alimentación repercute más desfavorablemente en los niños; cuyas demandas de alimentos de buena calidad están proporcionalmente elevadas, y por consecuencia presentan problemas serios en su crecimiento, maduración y desarrollo psicobiológico, además de que con frecuencia se enferman gravemente y mueren, ya sea por la desnutrición misma, o por varias enfermedades infecciosas relacionadas con la desnutrición, como las digestivas y las respiratorias.

En términos generales se denomina individuo mal nutrido a aquel que no ingiere las cantidades suficientes y en las proporciones adecuadas de los nutrimentos (1).

Ramos Galván y colaboradores (4) definieron a la desnutrición como un "estado patológico, sistemático e inespecífico, reversible dentro de ciertos límites y que resulta de un deficiente aporte celular de los nutrimentos que le son indispensables. - La desnutrición es un fenómeno dinámico y evolutivo cuyo cuadro clínico tiene manifestaciones muy variadas dependiendo del momento ecológico y particular del caso".

CAUSAS DE LA DESNUTRICION.

Las raíces de la desnutrición son muy complejas encontrándose fuertemente influenciadas por factores sociales, económicos y políticos. Las causas de la desnutrición están muy relacionadas entre sí y son interdependientes. Bourges (5) clasifica a los factores que determinan la desnutrición de la siguiente manera:

a) Factores relativos al agente.- El agente se refiere a la ausencia ó deficiencia, absoluta o relativa, de nutrimentos y es determinado por la calidad nutricia de los alimentos, las formas de baja disponibilidad y los desequilibrios.

b) Factores relativos al huésped.- Son aquellos que tienen su origen en el individuo mismo y están determinados por: edad, sexo, actividad y estados patológicos.

c) Factores relativos al ambiente.- Son aquellos que se relacionan con el medio ambiente que rodea al individuo, pudiéndose dividir en:

1.- Disponibilidad de alimentos, que depende de los factores geográficos, sociales, económicos, culturales y biológicos; del almacenamiento y conservación de los alimentos, del transporte e industrialización así como de la exportación e importación.

2.- Consumo de alimentos, el cual es fuertemente influenciado por el poder adquisitivo y los hábitos alimentarios.

DESNUTRICION EN MEXICO.

Aplicando la clasificación anterior a la situación nutricia en México se encuentra lo siguiente:

Con respecto al agente, en México se pueden distinguir tres grandes tipos de dietas (6).

a) Dieta indígena, que predomina en las zonas habitadas por poblaciones autóctonas y en la mayoría de las zonas rurales del país. Se caracteriza por un consumo predominante del maíz al que se agrega escasamente frijol y otros alimentos y solo ocasionalmente algunos alimentos de origen animal. En general es una alimentación hipocalórica y sobre todo hipoprotéica con grandes deficiencias específicas.

b) Dieta Meztiza, propia de las comunidades semirurales en las que además de tortilla y frijoles, se incluyen en su alimentación: trigo, arroz, carne, leche y sus derivados. El es

tado de nutrición es mejor que en el grupo anterior; aunque se presentan deficiencias, su frecuencia y gravedad es menor.

c) Dieta Occidental, prevalece en las zonas urbanas del país, se caracteriza por un consumo mayor de alimentos de origen animal y una mayor diversificación; en general es una dieta rica y variada.

Tradicionalmente el maíz sigue siendo el alimento principal de la mayoría de los habitantes del área rural. El maíz tiene una concentración protéica de sólo 8.9% con predominio de la zeína que es una proteína de baja calidad nutritiva (7). Esta proteína podría satisfacer las necesidades nutritivas de un adulto sano, si lo consumiera en cantidades importantes y sobretodo si se complementa con otros alimentos, pero resulta siempre défi-ciente para los niños en crecimiento, las mujeres embarazadas y en período de lactancia y para los enfermos. Todo esto da como resultado que más del 50% de la población mexicana sufra de una ali-mentación hipocalórica, hipoprotéica y pobre en hierro, vitamina A, Rivo flavina, ácido ascórbico, y eventualmente otros nutrime-ntos (8).

Con respecto al huésped predominan las siguientes caracte-rísticas:

-Embarazos frecuentes.- Las necesidades nutritivas de la madre embarazada aumentan pues tiene que formar un nuevo indivi-duo que crece a gran velocidad; posteriormente viene la lactancia, en donde las necesidades de la madre aumentan aún más pues tiene que producir de 800 a 1000 ml de leche en un contenido de 1.1 a

1.2% de proteínas, 3 a 4 % de grasa y 7% de carbohidratos además de vitaminas y minerales. Bajo estas circunstancias la madre que no recibe una dieta adecuada, se desnutre cada vez más después de cada embarazo, lo cual va no sólo en detrimento suyo, si no también del producto de los siguientes embarazos. El resultado es que aproximadamente el 40% de los niños del medio rural nacen pesando menos de 2.5 kg debido a desnutrición de la madre (43); además de que la madre tiene bajos volúmenes de producción de leche, al inicio de la lactancia producen $433 \pm$ ml alcanzando un máximo de 650 ± 113 ml (9).

-Una mayoría de población joven. Las necesidades nutritivas están de acuerdo a la etapa de desarrollo en que se encuentra el individuo. En la etapa preescolar las necesidades son aún relativamente altas y hay una elevada frecuencia de enfermedades infecciosas, durante este período el criterio y los gustos del niño no son tomados en cuenta y es forzado a consumir una dieta pobre, debido a temores infundidos por parte de la madre.

Finalmente en lo que respecta al ambiente se puede mencionar; a) que la disponibilidad de alimentos en México tiene las siguientes características:

-Los medios de producción como son las obras hidráulicas, mecanización, insecticidas y fertilizantes, así como el crédito y los recursos tecnológicos y de infraestructura han logrado grandes avances en la producción de alimentos, a pesar de que son utilizados desigualmente en el país, siendo en el norte en donde se utilizan en forma más adecuada. Por otro lado, existen en México

centros de investigación agropecuaria como el CIMMIT, en donde se han desarrollado variaciones genéticas de mayor resistencia y calidad y que se adaptan mejor a nuestro clima.

-En la década 1960-1970 la producción de alimentos aumentó alrededor de 7 - 8% anual (10) que es superior al incremento de la población, sin embargo la producción de alimentos está condicionada al mercado nacional e internacional y solo secundariamente a los requisitos nutritivos de la población, existiendo deficiencias en la disponibilidad de alimentos que son consumidos por los grupos mayoritarios del país.

b) El consumo de los alimentos varía de acuerdo a las - distintas zonas geográficas en que habita el mexicano, pudiéndose observar lo siguiente:

-El D.F. dispone por habitante de siete veces más carne de aves, más de tres veces de huevos, pescado y mariscos, y más del doble de leche y carne que el resto del país (11).

-Más del 75% de la población mexicana carece de los recursos económicos necesarios (menos de 1,500.00 pesos de ingreso familiar mensual) y en ocasiones de los patrones culturales necesarios para adquirir y consumir los alimentos de una dieta correcta, existiendo tabúes y prejuicios que limitan el consumo de alimentos de alto valor biológico, además de preferencias que se dan a ciertos miembros de la familia descuidando a los escolares y a los preescolares (12).

ETAPAS DE LA DESNUTRICION

El factor directamente responsable de la desnutrición es el balance negativo de uno o más nutrimentos, provocando en el organismo una adaptación que se traduce en una enorme variedad de cuadros clínicos, dependiendo del órgano o tejido que se vea más afectado según las deficiencias y necesidades del individuo.

Analizando a la desnutrición como un proceso continuo y progresivo, vemos que el individuo pasa a través de una serie de etapas que pueden dividirse de la siguiente manera (5):

1.- Etapa de buena nutrición.- Es la etapa previa a la desnutrición en la que se encuentra perfectamente establecido un equilibrio dentro del organismo entre la ingestión, las necesidades y sus reservas nutritivas.

2.- Etapa de depleción de nutrimentos.- Se caracteriza por una disminución de las reservas nutricias, y de la resistencia al stress, acompañada de algunos cambios bioquímicos.

3.- Etapa de mala nutrición.- El metabolismo se vuelve anormal originando alteraciones funcionales y posteriormente anatómicas, que constituyen una lucha del organismo para adaptarse a condiciones nutricias cada vez más precarias.

La etapa de mala nutrición, puede dividirse a su vez en varias subetapas que constituyen los procesos patogénicos de la desnutrición:

a) Homeostasis inmediata.- Implica una desarmonía en relación a los patrones considerados como normales; se caracteriza por pérdida de peso, fenómeno de dilución, y atrofia de las masas musculares.

b) Homeostasis mediata.- Es interpretada como una tendencia a mantener la armonía bioquímica, funcional y anatómica previamente alcanzada la cual es acompañada por: detención del crecimiento, de la talla, del desarrollo óseo, y del desarrollo neuromotor.

c) Homeostasis tardía.- Es acompañada de los siguientes fenómenos: piel atrófica, caída del cabello, "Facies de Cushing", metabolismo basal bajo, temperatura corporal disminuída, anemia normocítica y normocrómica, gamaglobulina elevada y tal vez algunos aspectos neuróticos de la conducta.

d) Homeorresis.- Cuando los factores que determinan la desnutrición, continúan actuando en forma moderada, de modo que - la homeostasis tardía no se ve alterada por una súbita agresión que agudice el cuadro, se presenta un equilibrio nuevo y final, u Homeorresis, en el que el peso va de acuerdo al nivel somático, mientras más pronto se alcance la homeorresis, menor será el daño final en el crecimiento.

CUADRO CLINICO DE LA DESNUTRICION

Dentro de la patología de la desnutrición se pueden distinguir tres tipos de signos clínicos:

- I - Signos Universales
- II - Signos Circunstanciales
- III - Signos Agregados

I.- Signos Universales están siempre presentes independientemente del tipo y grado de desnutrición. Ellos son: a) Dilución, b) modificaciones funcionales y c) Atrofia.

a) Dilución.- La relación sólidos/agua corporal total, es menor que la que corresponde a la edad del desnutrido; si la grasa subcutánea no desaparece durante las primeras etapas de la desnutrición se desarrollará edema (7). Se presentan cambios en el metabolismo del agua y los electrolitos que se caracteriza por: aumento en el espacio intra y extra celular, la concentración y distribución de los electrolitos en plasma se encuentra alterada, habiendo dilución de la hemoglobina, albúmina, sodio, cloro, potasio, magnesio y zinc; acidosis grave, presencia de poliuria, y disminución de la osmolaridad. Intracelularmente hay una depleción en potasio, magnesio y fosfatos, mientras que el sodio y el cloro aumentan. Las proteínas de la sangre sufren cambios muy notables tendiendo a disminuir a expensas de la albúmina la cual en casos graves llega hasta un 50% de lo normal; las gamaglobulinas por el contrario aumentan. Las proteínas del líquido cefalorraquídeo disminuyen lo mismo que la hemoglobina.

b) Modificaciones funcionales.- Son un reflejo de los cambios bioquímicos que ocurren en el desnutrido, pudiéndose mencionar las siguientes modificaciones:

-Diarrea con grado y duración variable, acelerado tránsito intestinal que agrava la desnutrición e incrementa la diarrea. Las enzimas digestivas decrecen en el lumen intestinal, disminuye la absorción de grasa produciendo esteatorrea y la diarrea se vuelve permanente y grave.

-Hay una pequeña reducción en el metabolismo de proteínas (13); la síntesis de proteínas no hepáticas principalmente en la piel y en músculo disminuye, mientras que las proteínas hepáticas se mantienen a expensas de una reutilización incrementada de aminoácidos liberados por el catabolismo de proteínas tisulares.

-Se presenta hipoglicemia durante el ayuno e intolerancia a las cargas de glucosa; en éstos casos se ha observado un decremento de la actividad de insulina en plasma (18). Hay evidencias de que la liberación de insulina por el páncreas está disminuida durante la desnutrición, debido a cambios estructurales temporales en las células del páncreas; su recuperación ocurre meses o años después del período de desnutrición (18,19).

-La absorción de grasa disminuye debido probablemente a trastornos en la síntesis de lipoproteínas, que es la forma en que los lípidos se transportan en la sangre.

-Dentro del hígado hay una serie de trastornos importantes. Los hepatocitos muestran una reducción en el retículo endoplásmico liso y rugos (14) disminuyen los polisomas y por lo tanto la síntesis de proteínas (15). Existe una selección en la síntesis de proteínas enzimáticas, las que se asocian al proceso anabólico aumentan mientras que las del proceso catabólico disminuyen (16). Esto explica la acumulación por parte del hígado de sustancias de reserva tales como lípidos (17) y glucógeno (18). El hígado con frecuencia no trabaja bien y disminuye su tamaño (7) sin embargo se han informado casos en los que el hígado suele aumentar de tamaño (28).

-También se presentan trastornos en el metabolismo de vitaminas como el ácido fólico, la tiamina y la cianocobalamina no se absorben adecuadamente. La absorción y el transporte de hierro y cobre también se ven afectados.

-Existen además trastornos hormonales que juegan un papel muy importante en la adaptación del desnutrido como son: hipertrofia adrenal con una consecuente disminución de corticosteroides, lo cual puede estimular el almacenamiento de glucógeno (20), la hipófisis y el timo también sufren daños durante la desnutrición (4).

c) Atrofia.- Se presenta en forma generalizada en los distintos órganos y tejidos, variando la intensidad según sea el metabolismo protéico-energético de cada uno de ellos.

II.- Signos Circunstanciales. No siempre se presentan y van en función de las peculiaridades de cada caso, del sexo, de la edad, del estado previo de nutrición, de la dieta, del saneamiento ambiental y del clima donde vive el desnutrido. Para fines de este trabajo no se describen detalladamente estos signos; si se desea conocer más al respecto se puede consultar la referencia #4 y 5 de la bibliografía.

III.- Signos agregados. No se deben a la desnutrición misma sino al padecimiento de diversa índole que, aunados a la desnutrición agravan el cuadro ocasionando confusiones. Estos pueden ser: infecciones, desequilibrio hidroelectrolítico agudo, signos debidos al ambiente social y cultural del desnutrido etc.

CONSECUENCIAS DE LA DESNUTRICION.

Hay ciertos períodos en la vida en que el alimento se requiere en mayor proporción como son: el período perinatal, el que va de los 3 a los 18 meses, el de la adolescencia, y durante el embarazo y la lactancia. Si durante uno o varios de ellos, el individuo no recibe lo necesario, seguramente se originará en él un subdesarrollo físico, intelectual, social y emocional, por acción directa en contra del organismo y por dificultar la interacción humana. El potencial genético de cada individuo puede ser lesionado por la mala nutrición y sus capacidades se desarrollan en forma muy limitada.

Las consecuencias de la desnutrición son muy complejas (dependen de la edad, del sexo, de la duración y gravedad de la desnutrición, tipo de alimentación, etc.) pudiéndose mencionar principalmente las siguientes:

1.- Índices elevados de mortalidad.- La desnutrición preescolar es básicamente la responsable de la muerte de millones de niños. De cada dos millones de niños que aproximadamente nacen en México al año 350,000 mueren ántes de cumplir los cuatro años (21)

Si se compara el índice de mortalidad de 1 a 4 años, en México es de 12.7 y en E.U.A. de 1/1,000 (22). Aún dentro de la República se presentan grandes diferencias, en el D.F. hay una mortalidad de 6.4/1000 mientras que en la zona rural, sobretodo las que tienen mayores problemas como en el estado de Oaxaca, el índice es de 32.0/1000 preescolares (3).

2.- La morbilidad aumenta.- La mala nutrición agrava las enfermedades debido a la menor resistencia a los agentes patógenos; las enfermedades que en condiciones normales pasan inadvertidas, en los desnutridos asumen formas francamente graves.

Los individuos afectados por una desnutrición crónica son especialmente vulnerables a las enfermedades infecciosas, provocando un aumento en la morbilidad y en la mortalidad. En un estudio efectuado en Monterrey se encontraron los siguientes índices de mortalidad por deficiencias como causa básica asociada (23):

Niños menores de un año	1003/100 000
Niños de un año	247/100 000
Niños de 2 a 4 años	178/100 000

3.- Deterioro físico y mental.- Los signos más notorios de la desnutrición en el niño son, detención del crecimiento y disminución en el peso. Por medio de estudios somatométricos y radiológicos, se ha comprobado que la detención del crecimiento afecta

el 25% de los niños del campo y el 6% de los de la ciudad (21).

La desnutrición durante las primeras etapas del crecimiento retarda el desarrollo y funcionamiento de cerebro, se producen cambios en el número de células del cerebro, en la configuración de las células y de los lípidos mielínicos, pudiéndose ocasionar daños irreparables (22).

El retraso del desarrollo mental no solo limita a los componentes motores de la conducta; también la capacidad para resolver problemas, el lenguaje, el desarrollo sociopersonal, la inteligencia en general, la integración intersensorial y la competencia visual perceptual están por debajo del nivel obtenido por testigos semejantes (22)

4.- Repercusiones en el desarrollo cultural social y económico.- Las sociedades contituidas por individuos mal nutridos, su fren como consecuencia de un subdesarrollo social, cultural y económico.

La desnutrición impide el progreso de las comunidades en de sarrrollo; debilitando la capacidad productiva de los adultos, que han logrado sobrevivir de los daños irreparables causados por la - desnutrición durante las etapas de formación. Los sobrevivientes son adultos que carecen de vigor e iniciativa indispensables para el progreso.

RECUPERACION DE LA DESNUTRICION

El correcto tratamiento de la desnutrición debe estar bien fundamentado en el diagnóstico etiopatogénico adecuado, considerando las variantes debidas a la intensidad del padecimiento y a las condiciones agregadas.

En forma general la secuencia del tratamiento es la siguiente (5):

- 1.- Tratamiento de los trastornos producidos por el desequilibrio hidroelectrolítico, comunes en desnutridos infectados.
- 2.- Tratamiento de las infecciones.
- 3.- Proporcionar al enfermo una dieta suficiente, completa y equilibrada.

La primera respuesta del organismo es un balance positivo de los nutrimentos, posteriormente el individuo va recorriendo en forma inversa las etapas que sufrió al desnutrirse.

En estudios realizados en México durante la etapa de recuperación en niños que reciben una dieta "ad libitum", se ha encontrado un cuadro al cual se le ha dado el nombre de "Síndrome de Recuperación Nutricia", que no corresponde al estado de buena salud ni al de desnutrición por lo que se le considera una entidad aparte.

SINDROME DE RECUPERACION NUTRICIA.

Este síndrome fué descrito por primera vez en 1948 por Ramos Galván (26) quien informó que los niños con cuadros graves de desnutrición internados en el Hospital Infantil desarrollaban hepatomegalia más o menos intensa después de 10 días de tratamiento.

En 1949 (5) se describió este síndrome de recuperación nutricia como "un conjunto de manifestaciones que ocurren durante la recuperación de los niños con desnutrición crónica, si se les observa durante suficiente tiempo y si la dieta que reciben es "ad libitum". Posteriormente en 1951 se presentó un informe de Gomez et al. hecho en el Hospital Infantil (25) del estudio de un grupo de 106 niños con un promedio de 35 ± 17 meses de edad y con un peso promedio del 54% del correspondiente a su edad. Estos niños presentan durante su tratamiento las peculiaridades clínicas y de laboratorio que constituyen el síndrome de recuperación nutricia; las manifestaciones clínicas encontradas en este grupo según el orden cronológico de aparición son las siguientes:

- 1.- Pérdida transitoria del peso, por pérdida de agua; se sigue de un aumento progresivo e ininterrumpido. A los 30 días se encuentra un peso equivalente al 112.69% del inicial y a los 50 días representaba el 122.75%.
- 2.- El edema desaparece a los 18 ± 9 días en el 90% de los casos.
- 3.- A los 20 ± 11 días presencia de hepatomegalia más o menos perceptible y progresivamente mayor. El hígado es de consistencia normal, de borde cortante no deformado ni doloroso.
- 4.- A los 35 ± 12 días se observa:
 - a) Hepatomegalia más considerable en el 100% de los casos.
 - b) Abdomen marcadamente globoso; de paredes blandas y no timpánico.
 - c) Red venosa colateral medianamente intensa.
 - d) En el 78% de los niños menores de tres años y en 93%

de los mayores se presenta ascitis a los 31 ± 14 días.

5.- En el 70% de los casos hay hipertricosis iniciada a los 62 ± 20 días que en orden de frecuencia e intensidad invade la cintura escapular, frente, mejillas, dorso y muslo.

6.- En el 7.25% se observa Telangiectasis en las mejillas.

7.- Todas estas manifestaciones se observaron en forma paralela a la recuperación de los niños, hasta ir decreciendo en importancia y desaparecer a los 89 ± 17 días.

Este síndrome se observa tanto en niños marasmáticos, como en niños con Kwashiorkor, aunque su intensidad es menor en los niños con Kwashiorkor.

Durante la recuperación hay una ruptura del equilibrio previo alcanzado en la desnutrición, que trae como consecuencia inmediata un aumento en la velocidad de crecimiento no solamente del cuerpo en general, sino también un crecimiento preponderante de algunos órganos y tejidos ocasionando una desarmonía temporal en el crecimiento. La situación metabólica cambia totalmente, el organismo adaptado a una ingesta baja de alimentos tiene ahora que metabolizar los nutrimentos que le llegan en cantidades no acostumbradas, dando como resultado un nuevo cuadro metabólico.

El líquido extracelular aumenta, modificándose el hematocrito. Hay acentuación de la hipergamaglobulinemia y turbidez en la prueba de timol (25).

A medida que avanza la recuperación el comportamiento del organismo también va cambiando. La esteatosis presente en el desnutrido va desapareciendo a medida que avanza la recuperación (4), en re-

lación inversa a la hepatomegalia; hay una elevación más rápida de las alfa globulinas que de la albúmina hasta llegar a un nivel en que las alfa globulinas bajan a niveles subnormales y la albúmina continúa subiendo; este descenso coincide con la presencia de ascitis y máxima hepatomegalia. Las proteínas hepáticas presentan un patrón de "depleción protéica" a medida que avanza el síndrome hasta alcanzar un máximo que coincide con el máximo de hepatomegalia; posteriormente las proteínas vuelven a la normalidad.

Uno de los aspectos más importantes del síndrome de recuperación es la hipertensión porta-intra-hepática acompañada de la hepatomegalia, la cual se presenta en forma intensa y progresiva guardando relación inversa a la esteatosis hepática (25). El primer juicio de esta situación lleva a pensar que el hígado es el órgano que se ve más afectado durante esta nueva etapa de adaptación, pues es allí en donde toman sendero todos los nutrimentos que llegan al organismo y en donde se almacena el glucógeno que en un momento dado mantendrá la glicemia. Es también en el hígado en donde a expensas de proteínas se formará glucosa (gluconeogénesis) y en donde son sintetizados y posteriormente liberados distintas proteínas plasmáticas, algunas de ellas enzimas que son muy importantes para el metabolismo de todas las células del organismo.

HEPATOMEGALIA.

El fenómeno de la hepatomegalia en la desnutrición se presenta con distinta frecuencia en los diferentes países (28) pero en México solamente un 10% de los casos presentan este signo, el resto lo presentan de una manera más clara durante la recuperación (5).

Las causas del crecimiento del hígado pueden ser un conjunto de factores como son: aumento en la cantidad de agua del hígado o acumulación de sustancias de reserva tales como grasa o glucógeno. Esta acumulación puede ser debida a una síntesis elevada propiciada por un aumento de glucosa en hígado debido a:

- síntesis elevada de glucosa vía gluconeogénesis.
- que la glucosa que entra al hígado, no salga de él y se acumule en forma de sustancias de reserva.

Varios autores han estudiado este fenómeno y ha dado como explicación una acumulación exagerada de glucógeno (4,5,24). Las causas no están totalmente esclarecidas; se ha hablado mucho de disturbios hormonales, de fallas en la actividad de las enzimas que sintetizan y degradan el glucógeno y de hecho se han llevado a cabo una serie de trabajos con animales de laboratorio para explicar los cambios metabólicos presentes en un organismo desnutrido durante la etapa de recuperación nutricia, sin llegar a una conclusión definitiva.

Para poder explicar el fenómeno de la hepatomegalia es necesario tener una idea clara de que es lo que sucede metabólicamente en el hígado de un individuo normal, ver cuales son los sitios clave del control metabólico; situar dentro de esta imagen todos los hallazgos clínicos y de laboratorio que de algún modo expliquen este fenómeno y en base a esto elaborar una hipótesis que posteriormente será probada en el laboratorio. En el cuadro I se presenta en forma resumida la información que se encontró acerca de los resultados de experimentos que de una forma u otra pudieran relacionarse con el cuadro de recuperación.

RESUMEN DE LOS EXPERIMENTOS
INFORMADOS EN LA LITERATURA QUE TIENEN RELACION
CON ESTE TRABAJO Y SUS RESULTADOS.

Ref.	Regimen alimenticio	Especie y # de animales	Edad y peso	Conc. de Glucógeno hepático	Peso del hígado	Conc. de Proteínas hepáticas	Actividad en el hígado de:		
							Fosforilasa	Glucosa-6-fos- fatasa	Fosfogluco- mutasa
44	Dieta balanceada	4 ratas	200 g	5.6g/100g de hígado	7.6g	0.63g/100g P. corp.	100%	100%	100%
	100% maltosa-dextrina durante 6 días.	16 ratas	181 g	8.9g/100g	5.8g	0.41g/100g	94%	66%	70%
51	Ayuno 10 días y re- alimentación 4 días.	8 ratas 2 ratas	161 g 194 g	24.9mg/g 6.8mg/g	Se observa una lipogénesis subnormal en hígado corazón y riñones de las ratas en ayuno. En la realimentación esta lipogénesis es mucho mayor.				
20	Dieta deficiente en leucina ó metionina	8 ratas	500 g	Se incre- menta	Las ratas desarrollan características patológicas, cambios en el hígado y otros tejidos, el glucógeno hepático se incrementa.				
52	Ayuno 9-12 días y realimentación.	ratas	Adultas	Se incre- menta en realimen- ta.c.a 15.7% en 24 h.	El peso del hígado se incrementó al doble y declinó a lo normal a las 96 horas de realimentación.				
53	Cafeína al 6% por 4-7 semanas. Reali- ta.c. con dieta stock por: 3,6,8 y 12 días	12 ratas de 3-13 ratas	jovenes		Se midió la actividad de Arginosuccinato liasa en hígado, y las enzimas activadoras de aminoácidos en hígado y en músculo. Las enzimas activadoras de aminoácidos se incrementan marcadamente en hígado después de la depleción, pasados 4-6 días de realimentación volvieron a niveles normales. En músculo no hubo esta disminución. La arginosuccinato liasa tuvo la mitad de actividad de las ratas control y se elevó otra vez lentamente en la recuperación. Las ratas macho no observaron estos patrones.				

El hígado es el órgano que por su tamaño, y por el número, variedad y complejidad de sus funciones ocupa el primer lugar. Los hepatocitos, que son las células que constituyen el tejido hepático, llevan a cabo transformaciones químicas por medio de las cuales los productos de la digestión se transforman en las sustancias constituyentes del organismo (30).

En el hepatocito existe todo un conjunto de vías metabólicas bien descritas:

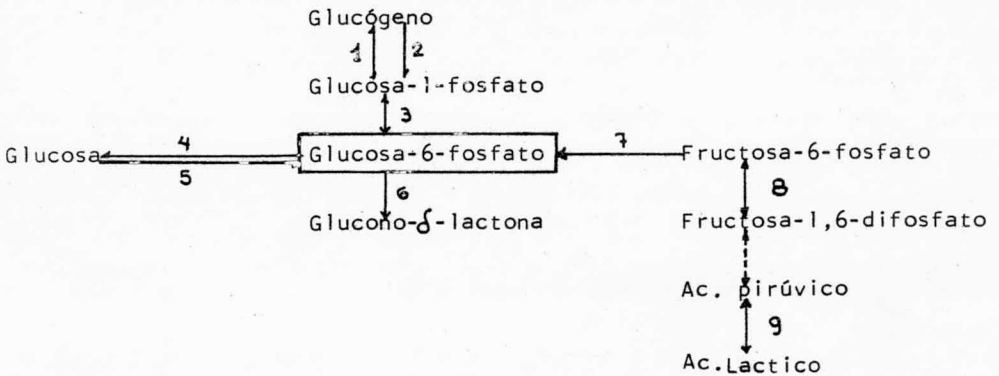
- Vía glucolítica, que degrada el glucógeno y la glucosa hasta ácido pirúvico y láctico.
- La glucogénesis, o síntesis de glucógeno hepático.
- La gluconeogénesis, que convierte en glucosa a sustancias que originalmente no son carbohidratos (aminoácidos provenientes de las proteínas).
- Lipogénesis; es la síntesis de grasa a partir de acetyl Co A.
- Lipólisis; degradación de grasas para la obtención de la energía.
- Ciclo colateral de las pentosas.
- Ciclo de los ácidos tricarboxílicos; es el sitio en donde concurren diferentes metabolitos (provenientes de proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos) para ser oxidados hasta CO_2 , H_2O y energía liberada en forma de ATP que es la moneda del metabolismo energético de las células.
- Síntesis y degradación de proteínas y ácidos nucleicos.

El conjunto de todas estas vías constituye lo que entendemos por metabolismo intermedio. Para fines de éste trabajo se revisará únicamente el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.

Después de la absorción intestinal los carbohidratos pasan por la vena porta hacia el hígado, atraviesan los capilares y llegan al líquido intersticial, de donde son luego tomados por las células para ser distribuidos hacia distintas vías según las necesidades del organismo (31). En los mamíferos la glucosa es ascequible para el metabolismo únicamente después de su activación por fosforilación en la presencia de glucocinasa y ATP, siendo el producto de la reacción la glucosa-6-fosfato más ADP.

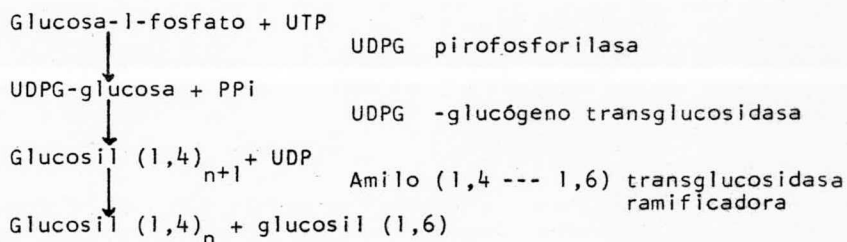
En el hígado las principales rutas metabólicas son: glucogénesis, glucogenólisis, gluconeogénesis y liberación de la glucosa; la oxidación directa y la glicólisis están en un segundo plano (32). El esquema ilustrativo es el siguiente.



- 1.- Enzimas que sintetizan el glucógeno { Transglucosidasa ramificadora
UDPG-glucógeno-transglucosidasa
UDPG-pirofosforilasa
- 2.- Fosforilasa
- 3.- Fosfoglucomutasa
- 4.- Glucosa-6-fosfatasa

- 5.- Glucocinasa hepática
- 6.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- 7.- Fosfohexosa isomerasa
- 8.- Fosfofructocinasa
- 9.- Deshidrogenasa láctica.

1.- En el paso número uno se obtiene la formación de glucógeno a partir de glucosa-1-fosfato. Las enzimas que intervienen en este paso necesitan un iniciador y la reacción es activada por la presencia de glucosa-6-fosfato (33), la termodinámica de la reacción es muy favorable para la formación de glucógeno, se transforma el 99%. La secuencia de la reacción es la siguiente:



La UDPG-glucógeno transglucosidasa existe en dos formas (35):

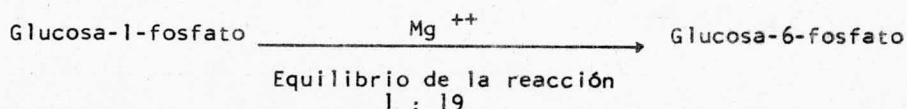
- (a) activa in vivo.
- (b) inactiva in vivo.

La conversión de la forma activa en la forma inactiva es llevada a cabo por la fosforilasa-b-cinasa que a su vez es regulada por el AMP cíclico, de manera que el AMP cíclico puede malograr la síntesis de glucógeno.

c) Por último aquellas hormonas que no parecen tener acción directa o inmediata sobre el AMP cíclico, pero influyen sobre la sensibilidad de las hormonas del primer grupo ej: tiroxina y hormona de crecimiento.

La presencia del AMP cíclico favorece las reacciones catabólicas. La actividad glucogenolítica de los tejidos del hígado, parece ser directamente proporcional a su contenido de su fosforilasa fosforilada.

3.- La Fosfoglucomutasa cataliza la siguiente reacción:

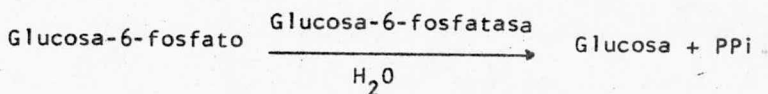


y requiere como cofactor a la glucosa-1,6-difosfato.

Durante el proceso de síntesis de glucógeno cuando hay una acumulación de Glucosa-6-fosfato dentro de la célula, se fuerza a la formación de glucosa-1-fosfato contra el equilibrio desfavorable de la reacción (53).

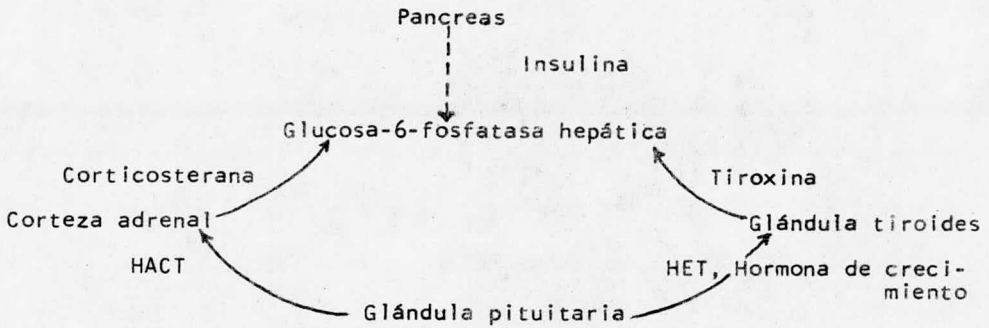
Se piensa que no es un sitio de regulación fisiológica (35) pero algunos investigadores que han estudiado la actividad de esta enzima en enfermedades de acumulación de glucógeno (36), han visto que se encuentra altamente incrementada. La actividad glucogenética aumentada se refleja en una elevación marcada del nivel de fosfoglucomutasa.

4.- La glucosa-6-fosfatasa representa el paso común final de la glucogenolisis y gluconeogénesis (37)

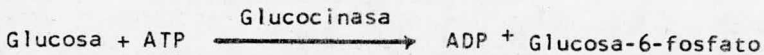


Dentro de las enzimas que utilizan como sustrato a la glucosa-6-fosfato: Glucosa-6-fosfatasa, Fosfoglucomutasa, Fosfohexosamerasa, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; (32) la más lenta es la Glucosa-6-fosfatasa. Cuando hay una carencia de esta enzima se presenta una acumulación de glucógeno. La capacidad del glucógeno hepático de proveer de glucosa al torrente sanguíneo, es casi completamente dependiente de la presencia o especificidad relativa de la Glucosa-6-fosfatasa. Su actividad se eleva con el ayuno; una hiperalimentación o administración de insulina provocan una caída en la actividad de la enzima (33).

En enfermedades de acumulación de glucógeno se presenta una ausencia de enzimas responsables de la liberación de glucosa como es la Glucosa-6-fosfatasa. Por otro lado los trabajos experimentales sobre la conducta fisiológica y patológica del metabolismo de la glucosa-6-fosfato no respaldan el concepto de una necesaria correlación entre la actividad de la Glucosa-6-fosfatasa hepática y el contenido de glucógeno; la ausencia de esta enzima no es la única causa de la acumulación de glucógeno hepático (36). La regulación hormonal de la Glucosa-6-fosfatasa es la siguiente:

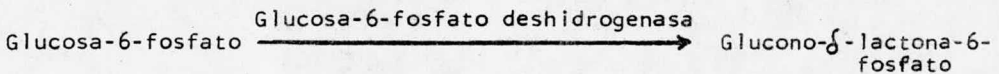


5.- La Glucocinasa hepática es la enzima encargada de la fosforilación de la glucosa en el hígado.



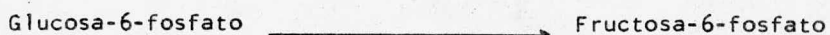
La glucocinasa hepática es regulada por la presencia o ausencia de insulina (24).

6.- La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa tiene como función enviar a la glucosa-6-fosfato hacia el ciclo de las pentosas por medio de la siguiente reacción:



En algunas enfermedades de almacenamiento de glucógeno, esta enzima no presenta actividad y provoca una acumulación de glucosa-6-fosfato la cual se dirige hacia síntesis de glucógeno (36). Durante el ayuno su actividad disminuye (38).

7.- La fosfohexosa isomerasa cataliza la siguiente reacción:



Un aumento en la actividad de esta enzima sugiere una elevación de la gluconeogénesis. Asimismo en algunas enfermedades de acumulación de glucógeno esta enzima junto con la fosfoglucomutasa, fructosa-1,6-difosfatasa y deshidrogenasa láctica se encuentran altamente incrementadas (36).

8.- La fosfofructocinasa cataliza la conversión irreversible de fructosa-1,6-difosfato. En tejidos con concentraciones normales de sustrato, la fosforilación de fructosa-6-fosfato es un paso que controla la glicólisis (35).

9.- La deshidrogenasa láctica es la enzima que se encarga de la interconversión entre lactato y piruvato; un aumento en la concentración de piruvato puede provocar un aumento en la gluconeogénesis (36). En algunas enfermedades de acumulación de glucógeno esta enzima se encuentra incrementada.

El punto crucial en el mantenimiento de la homeostasis es la capacidad del organismo de disminuir o aumentar la velocidad de varias reacciones. La presencia y disponibilidad de diferentes componentes de la maquinaria de síntesis protéica como son: RNA mensajero, DNA de transferencia y el complejo amino acil RNA, en la concentración adecuada; aunados a la influencia coordinada de sustratos, productos, y hormonas actuando sobre varios puntos de ataque en este complejo sistema dan por resultado el mantenimiento de la población enzimática en un tejido.

La actividad enzimática depende del tamaño de la población enzimática, de las condiciones del medio bioquímico y biofísico y de la disponibilidad y concentración de cofactores, coenzimas, sustratos y productos (32).

RELACION CON OTRAS ENFERMEDADES QUE PRODUCEN HEPATOMEGALIA.

Similares al cuadro del Síndrome de Recuperación Nutricia se encuentran otros dos, que al estudiarlos nos darán una posible explicación de lo que está sucediendo en el niño desnutrido ya en etapa de recuperación y que son:

- 1) Enfermedades de acumulación de glucógeno.
- 2) Hipertensión portal por cirrosis.

1.- Enfermedades de acumulación de glucógeno.-

Algunos defectos congénitos hereditarios pueden afectar el nivel de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de glucógeno, presentándose un amplio espectro clínico que es agrupado en ocho tipos de enfermedades de acumulación de glucógeno (35).

a) Tipo I o enfermedad de Von Gierke's.- Ausencia de Glucosa-6-fosfatasa que da como resultado hepatomegalia masiva por acumulación de glucógeno.

b) Tipo II.- Ausencia de α -1,4-glucosidasa lisosomal que produce: cardiomegalia e hipotonía y aumento de glucógeno en casi todos los tejidos.

c) Tipo III.- Deficiencia de la enzima desramificadora; produciéndose hepatomegalia masiva de menor intensidad que el de Von Gierke's.

d) Tipo IV.- Deficiencia de la enzima ramificadora que da como resultado una acumulación de glucógeno anormal, cirrosis progresiva con esplenomegalia y ascitis.

e) Tipo V.o enfermedad de Mc-Ardle.- Ausencia de fosforilasa en músculo, que produce un incremento en el glucógeno muscular.

f) Tipo VI.- Ausencia de fosforilasa hepática con la consiguiente acumulación de glucógeno.

g) Tipo VII.- Se presenta un cuadro clínico semejante al tipo V por deficiencia de fosfofructocinasa de manera que el glucógeno se incrementa.

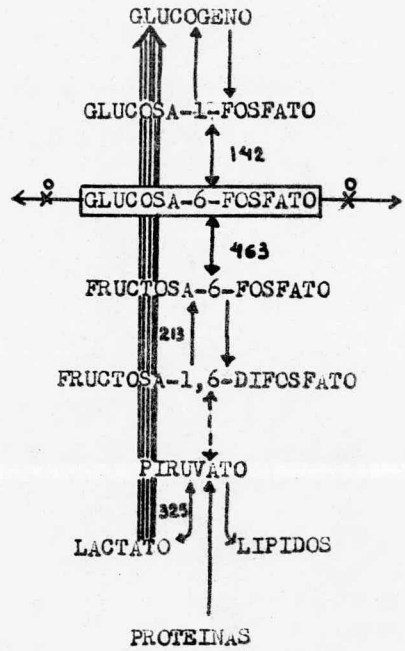
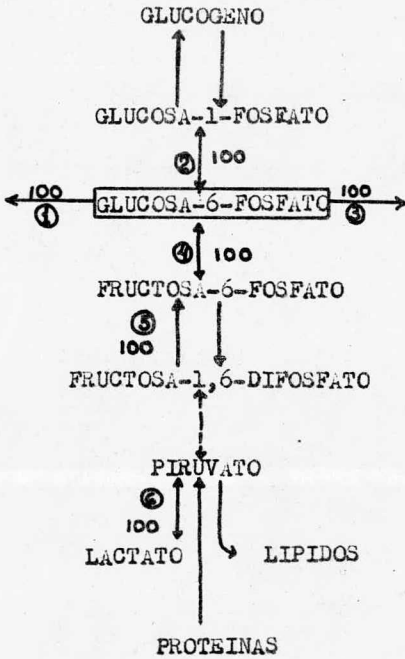
h) Tipo VIII.- Deficiencia de la fosforilasa b cinasa en leucocitos dando como resultado una elevación en el glucógeno hepático.

En el diagrama I se compara el sistema enzimático de la síntesis de glucógeno en hígado normal y en enfermedades de acumulación de glucógeno (32).

Como puede verse en el diagrama I en la parte correspondiente a enfermedades de acumulación de glucógeno, hay una ausencia de la enzima que libera la glucosa (glucosa-6-fosfatasa) y una disminución de la actividad de la enzima que envía a la glucosa hacia el ciclo oxidativo de las pentosas (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Por otro lado la actividad específica de: fosfoglucomutasa, fosfohexosa isomerasa y deshidrogenasa láctica aumentan notablemente. Todo esto sugiere una gluconeogénesis aumentada que provoca un incremento en la poza de glucosa-6-fosfato lo cual en ausencia de enzimas oxidativas favorece la síntesis de glucógeno.

HIGADO NORMAL

ENFERMEDADES DE ACUMULACION DE
GLUCOGENO



- 1.- Glucosa-6-fosfatasa.
- 2.- Fosfoglucmutasa.
- 3.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- 4.- Fosfohexosa Isomerasa.
- 5.- Fructosa Difosfatasa.
- 6.- Deshidrogenasa láctica.

DIAGRAMA I .(tomado de:Advances in Enzyme Regulations.- Weber G., Simposium Publications Division. Vol I .-Pergam Press, Oxford 1963)

2) Hipertensión portal por cirrosis.-

Constituye otra de las enfermedades relacionadas al cuadro del Síndrome de Recuperación Nutricia que se caracteriza por un bloqueo en el flujo de sangre del lecho portal hacia la vena cava, y - puede producirse en cualquier parte a lo largo de su curso (41). El bloqueo intrahepático puede ser producido por varias causas (42): - a) Cirrosis, b) Obstrucción de la vena cava hepática y vena cava inferior, c) Trastornos cardiacos que dan origen a hipertensión portal.

a) El bloqueo hepático en forma de cirrosis es la causa más común. El resultado de la necrosis hepática y de la hipertensión portal es generalmente la ascitis cuya patogenia es la siguiente (41):

1) Incremento de la presión hidrostática dentro del hígado

2) Disminución de la presión osmótica coloidal del plasma causada por hipoalbuminemia en plasma.

3) Permeabilidad alterada de las células hepáticas. Una excesiva producción de linfa favorece la producción de ascitis.

4) Alteraciones en el metabolismo de sodio y agua.

Los trastornos característicos de la cirrosis son:

-Hipertensión portal

-Hipoalbuminemia

-Alteraciones en el flujo de la linfa

-Retención renal de sodio y agua

b) La obstrucción de vena hepática y vena cava inferior desarrollan las siguientes características:

1) Ascitis

2) Hepatomegalia.

c) La hipertensión portal de origen cardíaco ocasiona un impedimento funcional en el flujo venoso con las siguientes anomalías:

- 1) Fatiga
- 2) Ascitis
- 3) Tendencia a hepatomegalia
- 4) Edema periférico

En resumen la ascitis en las enfermedades del hígado parece ser favorecida por una combinación de (41): hipertensión venosa portal y deficiencia del hígado para sintetizar suficiente albúmina. El fluido que se acumula en la cavidad peritoneal depleta los fluidos del organismo lo suficiente, para estimular los túbulos renales secundariamente y reabsorber sodio.

Debido a la relación que existe entre el metabolismo de lípidos y carbohidratos, es conveniente revisar algunos aspectos del metabolismo de lípidos.

METABOLISMO DE LIPIDOS.

La digestión y absorción de las grasas ingeridas en forma de triglicéridos involucra:

- 1.- Un paso de hidrólisis de los triglicéridos hacia un mezcla compleja de: tri, di y monoglicéridos así como ácidos grasos libres y glicerol.
- 2.- Una emulsificación de los productos.

La hidrólisis de grasa en el estómago es mínima, es en el intestino en donde con la ayuda de la Lipasa pancreática y de las sales biliares, las grasas son emulsificadas e hidrolizadas para posteriormente ser absorbidas.

Los ácidos grasos tales como el palmítico y los triglicéridos formados por dichos ácidos, son absorbidos en un 70-90% y posteriormente transportados en forma de pequeñísimas gotas llamadas quilomicrones a través de los conductos linfáticos, para posteriormente pasar al hígado o a otros órganos en donde se depositan para formar tejido adiposo.

Por otro lado los triglicéridos y ácidos grasos de cadena más corta que constituyen los componentes minoritarios de la mayoría de las dietas son absorbidos por el intestino de donde pasan directamente al torrente sanguíneo vía vena porta hacia el hígado y posteriormente distribuidos a todo el organismo.

Al llegar al hígado los ácidos grasos, triglicéridos y quilomicrones se combinan con proteínas que se sintetizan en el hígado para formar las lipoproteínas. Cuando existe una falla en la síntesis de proteínas hepáticas viene como consecuencia una acumulación de grasa en el hígado. Las lipoproteínas pasan a la circulación para ser utilizadas por otros tejidos con la ayuda de una lipasa lipoproteínica, que es liberada por las distintas células que forman los tejidos y que hidrolizan sin preferencia los triglicéridos unidos a las lipoproteínas.

En condiciones normales hay un flujo continuo de ácidos grasos libres provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos por acción de la lipasa. Los ácidos grasos libres se transportan en el plasma unidos a la albúmina, hacia el hígado y otros tejidos donde desaparecen en pocos minutos.

El hígado desempeña un papel especialmente importante en el metabolismo de las grasas; habitualmente contiene del 3-5% de lípidos de los cuales entre 1/3 y 2/3 son fosfolípidos y el resto glicéridos.

La grasa contenida en el hígado depende de un equilibrio entre la que se deposita o forma en este órgano y la que desaparece de él (31).

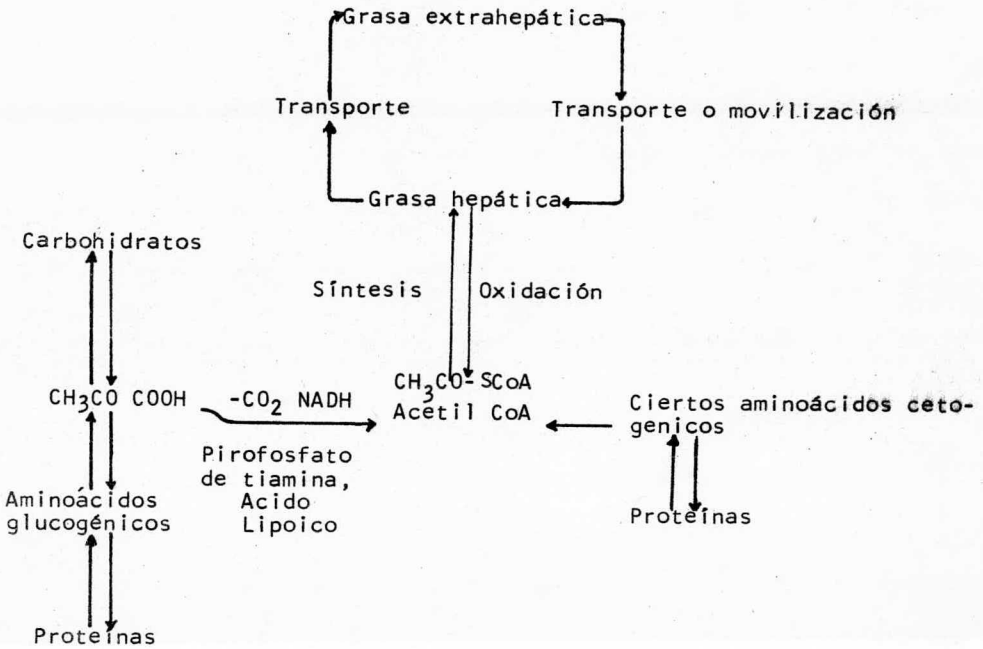
La grasa del hígado proviene de:

- 1.- La que contiene la dieta.
- 2.- La que procede de los depósitos.
- 3.- La que se sintetiza en el hígado.

Las grasas pueden ser utilizadas por el hígado de varias maneras (39).

- 1.- Los ácidos grasos pueden ser completamente oxidados hasta CO_2 y H_2O .
- 2.- Pueden ser incorporados en lípidos hepáticos.
- 3.- Pueden irse hacia la formación de lipoproteínas y entrar en el plasma para ser transportados a los depósitos por vía sanguínea.
- 4.- En estado de ayuno puede haber otro camino que es la producción de cuerpos cetónicos, los cuales son ampliamente utilizados por otros tejidos.

Los mamíferos son capaces de sintetizar grasa y ácidos grasos a partir de moléculas de origen no graso tales como acetato, acetil coenzima A, piruvato y glucosa. Los órganos y tejidos que poseen considerablemente esta actividad son: el hígado, el intestino, los riñones la piel y el tejido adiposo (39).



En ciertos casos el hígado presenta una infiltración grasa; dentro de las principales causas que lo producen son (31):

- 1.- Factor dietético.- Dieta excesivamente rica en grasa o colesterol, ayuno, insuficiencia de colina o metionina u otras sustancias lipotrópicas, exceso de cistina, de tiamina o de biotina.
- 2.- Extirpación amplia del hígado.- se observa un acentuado aumento de grasa en las primeras horas y días siguientes a la operación.
- 3.- Factores endócrinos.-
 - a) La diabetes pancreática, clínica y todas las diabetes experimentales.
 - b) Inyección de extracto anterohipofisario, de somatotrofina y de corticotrofina.



c) Durante el embarazo aumentan los glicéridos, los fosfolípidos y el colesterol.

d) En el comienzo de la madurez sexual.

4.- Factores tóxicos: fósforo, florizidina, cloroformo, y alcohol.

5.- Factores infecciosos o degenerativos: hepatitis infecciosa o degenerativa ejem. fiebre amarilla.

6.- Factores ambientales.- Temperaturas muy bajas o muy altas, hipoxia.

La infiltración grasa favorece los procesos degenerativos y a la larga produce cirrosis. Pueden darse casos de infiltración grasa y acumulación glucógeno en forma simultánea. Las dietas ricas en grasa y deficientes en proteínas, cisteína o metionina pueden producir necrosis en el hígado.

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, estamos en posibilidades de elaborar la siguiente HIPOTESIS DE TRABAJO:

"La hepatomegalia que se observa en las primeras etapas del síndrome de recuperación nutricia, es debida a acumulación excesiva de glucógeno y por lo tanto debe encontrarse una disminución en la actividad de la α -glucano Fosforilasa y de la Glucosa-6-fosfatasa, así como un aumento en la actividad de la Fosfoglucomutasa".

Nota:

La acumulación de glucógeno puede deberse a una menor degradación o a una mayor síntesis, pero los cambios supuestos en la actividad de las enzimas, no permitirán esclarecer cual de las dos alternativas es la correcta o si ambas lo son, ya que existen otras enzimas involucradas.

Sería ideal para los fines de este trabajo poder estudiar fragmentos de hígado de niños en recuperación, pero ello presenta obstáculos importantes, destacándose la dificultad para justificar la agresión implicada en una biopsia hepática. Por ello se escogió a la rata como un modelo aproximado de lo que ocurre en el ser humano, sin desconocerse las dificultades para la extrapolación de los resultados que se obtengan.

OBJETIVOS DE LA TESIS

a) Objetivo final:

Probar o rechazar la hipótesis del trabajo.

b) Objetivos mediatos:

1.- Determinar las variaciones en el contenido de glucógeno en el hígado de ratas, durante la recuperación de la desnutrición causa da experimentalmente.

2.- Medir las variaciones en la actividad de las enzimas Glucosa-6-fosfatasa (D-glucosa-6-fosfato fosfohidrolasa), Fosfoglucomutasa (α -D-glucosa-1,6-difosfato: α -D-glucosa-1-fosfato, fosfotransferasa) y α -glucano fosforilasa (α -1,4-glucano:ortofosfato glucosil tansferasa) en el hígado de ratas durante la recuperación de la desnutrición causada experimentalmente y ver si se relacionan estos cambios enzimáticos con las variaciones en la concentración de glucógeno hepático.

c) Objetivos inmediatos:

1.- Determinar el tipo de dieta y duración de la misma, que permita producir desnutrición en las ratas, con cambios apreciables en la concentración hepática de glucógeno.

2.- Establecer el tiempo mínimo de recuperación de las ratas desnutridas, que permita encontrar cambios apreciables en la concentración hepática de glucógeno.

3.- Estudiar la cinética enzimática de la Glucosa-6-fosfatasa, Fosfoglucomutasa y Fosforilasa, para determinar las condiciones ópti mas de reacción que permitan medir su actividad en el hígado de ratas.

OBJETIVOS DE LA TESIS.

4.- Establecer las condiciones óptimas de ayuno antes del sacrificio de las ratas, dado que las enzimas escogidas son muy sensibles al ayuno.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir los objetivos inmediatos del estudio se realizaron respectivamente, los siguientes experimentos preliminares:

Experimento I

(Objetivo I: Determinar el tipo de dieta y duración de la misma que permita producir desnutrición en las ratas, con cambios apreciables en la concentración hepática de glucógeno.)

Elección de las dietas.- Dado que se requería provocar un cuadro de desnutrición protéica, se pensó en dos posibles dietas con -- una concentración de 5 g de proteína por 100 g de dieta, una de ellas a base de Caseína como proteína de alta calidad y la otra en base a proteína de Maíz que es de baja calidad. Para la dieta testigo, equilibrada y completa, se escogió como base la Caseína a una concentración de 12,5 g de proteína por 100 g de dieta. Tanto las dietas experimentales como la testigo fueron suficientes en todos los demás nutrimentos.

En un primer experimento, de carácter meramente exploratorio, se administraron las tres dietas mencionadas durante 21 días a 3 grupos de 3 ratas cada uno. Al término de dicho período y después de 16 horas de ayuno, se midió el contenido hepático de glucógeno, proteínas y humedad y se calculó la Relación de Eficiencia Protéica -- (R.E.P.). En éste experimento se concluyó que un mes de consumo de las dietas hipoprotéicas, producía un deterioro extremo en las ratas y que lo prolongado del ayuno (18 horas) dificultaba excesivamente las determinaciones planteadas.

Así en el experimento I se administraron las tres dietas mencionadas durante 2, 6, 9, 12 y 15 días a 15 grupos de 5 ratas hembra recién destetadas cada uno. Al término de dichos períodos y después de una hora de ayuno, se sacrificaron los animales y se midió el contenido hepático de glucógeno, proteínas y humedad; así mismo se calculó la R.E.P. a lo largo del experimento.

Experimento II.

(Objetivo II: Establecer el tiempo mínimo de recuperación de las ratas desnutridas, que permita encontrar cambios apreciables en la concentración de glucógeno en el hígado).

Una vez elegido el período óptimo de desnutrición mediante el experimento I, que fué de 12 días, se formaron 3 grupos de 20 ratas cada uno, que recibieron respectivamente las dietas de Caseína al 5%, Maíz al 5% y Caseína 12.5% durante 12 días, al cabo de los cuales los dos primeros grupos fueron alimentados con una dieta de recuperación de Caseína al 12.5% durante 1, 3, 5 y 7 días. Al terminar dichos períodos y después de una hora de ayuno, se sacrificaron las ratas (5 para cada período de recuperación y para cada dieta) y se midió el contenido hepático de glucógeno, proteínas y humedad así como la R.E.P. a lo largo del experimento.

Experimento III.

(Objetivo III: Estudiar la cinética enzimática de la Glucosa-6-fosfatasa, Fosfoglucomutasa y α -glucano Fosforilasa para determinar las condiciones óptimas de reacción que permitan medir su actividad en el hígado de las ratas).

Se llevaron a cabo los experimentos básicos de cinética enzimática a fin de determinar las condiciones óptimas de reacción (concentración de la enzima, concentración del sustrato, pH, y efecto del tiempo de incubación) de las tres enzimas. Las técnicas se describen en el capítulo de Material y Métodos.

Experimento IV

(Objetivo IV: Establecer las condiciones óptimas de ayuno antes del sacrificio de las ratas dado que estas enzimas son muy sensibles al ayuno).

Se formaron 5 grupos de 5 ratas hembras de aproximadamente 60 g de peso, alimentadas previamente a base de Purina⁽¹⁾ "ad libitum". Estos grupos se sometieron a un período de ayuno de, respectivamente, 0, 1, 2, 3 y 18 horas y se determinó el contenido hepático de glucógeno así como la actividad de α -glucano Fosforilasa y Glucosa-6-fosfatasa. Se hicieron comparaciones con los resultados y se optó por no llevar a cabo el ayuno antes del sacrificio.

Experimento de Recuperación Nutricia.

(Objetivos mediatos (ver página 31)

Para determinar las variaciones en el contenido de glucógeno y en la actividad de las enzimas Glucosa-6-fosfatasa, Fosfoglucomutasa y α -Glucano Fosforilasa en el hígado de ratas durante la recuperación de la desnutrición causada experimentalmente, se formaron 4 grupos de 5 ratas hembras recién destetadas como sigue:

(1) Purina Laboratory Chow, Ralston Purina Company.

Grupo "A" o Experimental (ratas desnutridas y recuperadas). Se alimentaron durante 12 días con la dieta de Maíz al 5% y 3 días más con la dieta de recuperación de Caseína al 12.5%.

Grupo "B" o Testigo (ratas desnutridas no recuperadas).- Se alimentaron con una dieta de Maíz al 5% durante 12 días.

Grupo "C" o Testigo Secundario I (ratas adecuadamente alimentadas durante 15 días).- Se alimentaron con una dieta de Caseína al 12.5% durante 15 días.

Grupo "D" o Testigo Secundario II (ratas adecuadamente alimentadas durante 12 días).- Se alimentaron con una dieta de Caseína al 12.5% durante 12 días.

Una vez transcurridos los períodos señalados se sacrificaron los animales y se determinó el peso del hígado, la concentración hepática de glucógeno, proteínas y humedad así como la actividad de la α -glucano Fosforilasa, Fosfoglucomutasa y Glucosa-6-fosfatasa. Para ver si se relacionan los cambios enzimáticos con las variaciones en la concentración de glucógeno hepático.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

MATERIAL BIOLÓGICO

Ante la imposibilidad de realizar este estudio en humanos, se utilizaron como sujetos de experimentación ratas hembra Wistar recién destetadas, de 21 a 25 días de nacidas (excepto en los casos en que se especifica otra edad) debido a que en animales jóvenes - el efecto de dietas deficientes en proteínas es más rápido y severo, a causas de las demandas de crecimiento y mantenimiento (53) - por otra parte, su metabolismo de carbohidratos (29) y protéico (54) es semejante al del hombre.

Las dietas a base de Caseína, utilizadas para alimentar a las ratas, se elaboraron de acuerdo con las siguientes formulaciones:

COMPONENTES	CASEINA 5g/100 g	CASEINA 12.5g/100 g
Caseína*	5.62	14.04
Mezcla de sales minerales (1)	4.00	4.00
Mezcla de vitaminas (2)	2.20	2.20
Celulosa	4.00	4.00
Aceite de Maíz	20.00	20.00
Almidón de Maíz	21.39	18.58
Glucosa	21.39	18.59
Sacarosa	21.39	18.59
Total	100.00	100.00

*Caseína,- Vitamin - Free test Casein, General Biochemicals.
Proteínas 89g /100 g

La dieta a base Maíz utilizada para alimentar a las ratas se elaboró de acuerdo a la siguiente formulación:

Dieta de Maíz.- (Maíz amarillo, crudo, molido en molino de martillos hasta polvo. Protefna 9.15 g/100 g)

COMPONENTES	5 g de protefna/100 g
Maíz	55.55
Mezcla de sales minerales (1)	4.00
Mezcla de vitaminas (2)	2.20
Célulosa	4.00
Aceite de Maíz	15.00
Almidón de Maíz	6.41
Glucosa	6.41
Sacarosa	6.42
Total	<u>100.00</u>

(1) Mezcla de sales minerales

COMPONENTES	CANTIDAD EN GRAMOS
Fosfato de calcio tribásico	57.996
Cloruro de Sodio	25.000
Cloruro de potasio	15.000
Citrato de fierro·5 H ₂ O	0.600
Carbonato de magnesio	0.550
Cloruro de manganeso	0.550
Carbonato de cobre	0.140
Carbonato de Zinc	0.160
Yodato de sodio	0.002
Fluoruro de sodio	0.002
Total	<u>100.000</u>

(2) Mezcla de vitaminas.- (Vitamin Diet Fortification Mixture NBCo).

COMPONENTES	CANTIDAD EN GRAMOS
Vitamina A (200,000 U/g)	4.50
Vitamina D (400,000 U/g)	0.25
Alfa tocoferol	5.00
Acido ascórbico	45.00
Inositol	5.00
Cloruro de colina	75.00
Menadiona (vitamina K)	2.25
Acido p-aminobenzoico	5.00
Niacina	4.50
Riboflavina	1.00
Clorhidrato de Piridoxina	1.00
Clorhidrato de Tiamina	1.00
Pantotenato de calcio	3.00
Biotina	20.00
Acido Fólico	90.00
Vitamina B ₁₂	1.35
Dextrosa c.b.p.	1,000.00

MANEJO DE LOS ANIMALES.-

1) Dependiendo del grupo experimental de que se trató (ver Diseño del Experimento) se seleccionó un número de ratas con el mismo promedio en peso corporal para cada grupo de animales, con el objeto de que los resultados fueran comparables.

2) Se colocaron separadamente en jaulas de metal y se les alimentó "ad libitum".

3) Se controló periódicamente el incremento en peso corporal y la dieta consumida desde el inicio del experimento hasta que se cumplió el tiempo requerido de acuerdo al diseño experimental; finalmente se les privó de alimentación durante el tiempo de ayuno necesario en cada caso.

4) Se sacrificaron las ratas por decapitación, lavando con agua corriente el exceso de sangre, inmediatamente se extrajo el hígado se lavó con agua desionizada, para eliminar los residuos de sangre y se secó sobre papel filtro; se pesó y se cortaron pequeños pedacitos de hígado (100 mg aproximadamente). Toda la operación se realizó a bajas temperaturas (4°C) para evitar desnaturalización.

5) Para las determinaciones se pesaron los fragmentos, se aforaron a 2 ml con distintas soluciones según el caso: para la determinación de Glucosa-6-fosfatasa y para proteínas se utilizó solución isotónica de NaCl 0.85%, para la Fosfoglucomutasa solución amortiguadora de acetato de sodio y para la α -glucano Fosforilasa solución de NaF 0.1 M. Se homogeneizaron en un homogeneizador Potter-Elvehjem (75), a 0°C y 600 r.p.m. durante 2 minutos.

MATERIAL DE VIDRIO Y APARATOS.-

Los reactivos utilizados en las determinaciones fueron del más alto grado de pureza y el material de vidrio fué el de uso común en el laboratorio Vg: pipetas serológicas y volumétricas, tubos de centrifuga graduados, tubos de ensayo, gradillas, mecheros, etc.; aparatos como: centrifuga, espectrofotómetro, agitador eléctrico para tubos, baño de agua, etc.

- METODOS -

DETERMINACION DE GLUCOGENO.-

El glucógeno fué determinado según el método de Good y Kramer que se describe a continuación (54).

FUNDAMENTO.-

El glucógeno es estable al álcali y precipita en solución acuosa de etanol, posteriormente puede ser hidrolizado en medio ácido hasta glucosa, que se determina cuantitativamente.

REACTIVOS:

KOH al 30%, NaSO_4 0.5%

Etanol al 95%

Etanol al 66%

HCl 2N

Fenolftaleina

H_2SO_4 1N.

PROCEDIMIENTO:

1) Se pesa el tejido hepático (0.1 a 0.5 g) y se pone en un tubo de centrifuga graduado que contenga 2 ml de una solución compuesta de KOH al 30% y Na_2SO_4 al 5%.

2) Se ponen los tubos tapados con canicas, en un baño de agua a ebullición hasta lograr la digestión completa (aproximadamente 10 minutos).

3) Se añaden 5 ml de etanol al 95% y se colocan nuevamente en baño de agua hasta que el contenido de los tubos llegue a ebullición.

4) Se deja durante la noche en el congelador y posteriormente se centrifuga durante 10 minutos a 600xg.

5) Se lava el precipitado una vez con 1 ml de etanol al 66%

6) Se resuspende cuidadosamente con varilla de vidrio en 2 ml de HCl 2 N y se deja hervir por 60 min.

7) Se titula con fenolftaleina hasta neutralizar con NaOH 2N y después hasta acidez con H_2SO_4 1N.

8) Se lleva el volumen a 10 ml con agua

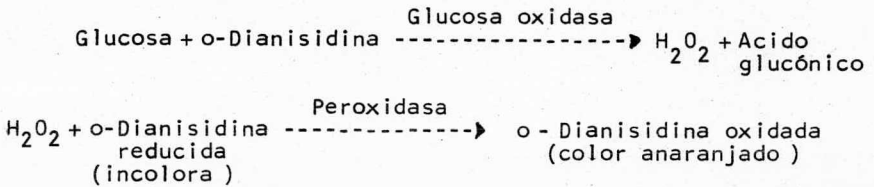
9) Se toma una alícuota y se hacen las diluciones necesarias para la determinación de glucosa por el método de la Glucosa-Oxidasa.

METODO DE LA GLUCOSA OXIDASA PARA LA ESTIMACION DE GLUCOSA (56).

Este método tiene como ventajas su exactitud y especificidad en la cuantificación de glucosa.

FUNDAMENTO.-

Se basa en medir espectrofotométricamente la o-Dianisidina oxidada producida en la siguiente reacción.



REACTIVOS:

- Solución patrón de glucosa 100 $\mu\text{g/ml}$
- Glucosa Oxidasa tipo II (Sigma, actividad 16, 500 unidades / g)
- Peroxidasa tipo I (Sigma, actividad 70 purpurogallin unidades / mg).
- Solución amortiguadora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 M ajustando el pH con NaOH al 40% a 7.

PREPARACION DEL REACTIVO DE GLUCOSA OXIDASA.

Se pesan 10 mg de Glucosa Oxidasa y 0.5 mg de Peroxidasa, se añaden 80 ml de solución amortiguadora de fosfatos se disuelve perfectamente y se agrega 0.5 ml de o-Dianisidina al 5%. Se aforra a 100 ml con la solución amortiguadora de fosfatos y finalmente se filtra a través de papel Whatman # 54 .

PROCEDIMIENTO:

Diluir las muestras de glucosa para que contengan de 10 a 60 μg de glucosa por ml, (el método es más sensible en estas concentraciones) y pasar una alícuota de 1 ml a un tubo de ensaye. Tomar alícuotas de la solución patrón de glucosa que contengan de 10 a 60 μg de glucosa/ml, colocarlas en un tubo de ensaye y aforar con agua destilada a 1 ml. En otro tubo se pondrá 1 ml de H_2O , a fin de que sirva como testigo.

Adicionar a todos los tubos 2 ml del reactivo de Glucosa Oxidasa; mezclar bien, tapar los tubos con canicas, e incubar en baño de agua a 37°C por 45 a 60 minutos. Leer en espectrofotómetro Baush & Lomb a 440 nm.

CALCULOS:

Se calcula la concentración de glucosa extrapolando en la curva tipo. La cantidad de glucógeno presente en la muestra original se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de glucógeno} = \frac{\text{concentración de glucosa (g)} \times 100 \times \text{factor de dilución}}{\text{alícuota} \times 1.1 \times \text{g de muestra}}$$

El factor de conversión de glucosa a glucógeno es de 1/1.1

DETERMINACION DE PROTEINAS.-

La determinación de proteínas se hizo por el método de Lowry modificado por Hartree para obtener una respuesta fotométrica lineal (61).

FUNDAMENTO:

La reacción con el reactivo de Folin, que da como resultado final un color azul, puede ser analizada en dos pasos (62):

1.- Reacción de la proteína con iones de cobre en solución alcalina.

2.- Reducción del reactivo fosfomolibdato-fosfotungsteno por la proteína tratada con cobre y que contiene residuos de tirosina y triptofano.

REACTIVOS:

Se utilizaron los mismos reactivos y en la misma proporción que en la técnica descrita por Hartree.

Para la solución tipo se utilizó una solución de Albúmina Bovina (Ortho Diagnostic, Ortho Pharm Corp.) al 22% de la cual se tomó una alícuota de 50 λ y se aforó a 100 ml para obtener una concentración final de 110 μ g/ml.

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA. (R.E.P.)

La relación de Eficiencia Protéica es uno de los métodos utilizados para evaluar la calidad biológica de la proteína, se basa en la relación de ganancia en peso corporal (g) y la cantidad de proteína ingerida (g) (54). La función primaria de las proteínas en la dieta es la de proveer de aminoácidos al organismo para la construcción de nuevos tejidos, si la dieta contiene cantidades insuficientes de uno o más aminoácidos, la velocidad de crecimiento va a ser disminuída, por consiguiente la velocidad de crecimiento (aumento en peso) de un animal bajo condiciones controladas, constituye una forma simple de medir la calidad de

las proteínas en la dieta.

$$\text{R.E.P.} = \frac{\text{Ganancia en peso} \times 100}{\text{Proteína ingerida.}} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial} \times 100}{\text{g de dieta consumida} \times \% \text{ Proteína en la dieta.}}$$

DETERMINACION DE HUMEDAD (71)

En un pesafiltro o caja de Petri (tarado a 100-105°C), se pesan con exactitud aproximadamente 100 mg de hígado fresco. Se coloca en una estufa de vacío previamente calentada a 70°C con un vacío de 15 lb de presión, hasta obtener un peso constante.

El % de humedad se calcula relacionando a 100 la pérdida de peso.

DETERMINACION DE FOSFORO. (58)

Modificación de P.S. Chen, Jr., T.Y. Toribara, y H. Warner

FUNDAMENTO:

El complejo de fosfomolibdato es reducido por el ácido ascórbico. Este método es alrededor de 7 veces más sensible que el de Fieske-Subbarow e involucra menos pipeteo; se pueden determinar fácilmente 0.01 micromoles de fósforo.

REACTIVOS:

A) Acido ascórbico al 10% (debe ser puesto en refrigeración y dura alrededor de un mes).

B) Molibdato de amonio $\cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ al 0.42% en H_2SO_4 1 N. Esta solución es estable a temperatura ambiente.

MEZCLA.- Una parte de A por seis partes de B. Esta mezcla debe prepararse el mismo día en que se va a usar y mantenerse en hielo.

C) Solución Standard (57).- 1.7558 g de K_2HPO_4 analíticamente puro se disuelve en 1,000 ml de H_2O , se añaden unas gotas de cloroformo; y la solución se almacena en refrigerador. Para usarla se diluye 1:100 de modo que la solución final contenga $0.1 \mu\text{m/ml}$ de fósforo (P_i).

PROCEDIMIENTO:

Pipetear en sendos tubos de centrifuga las alícuotas de la solución problema calculando previamente una dilución adecuada y 0.15, 0.30, 0.45 y 0.60 ml de la solución patrón de fósforo, aforar con agua desionizada a 0.9 ml y añadir 2.1 ml de la mezcla de reactivos (para el tubo testigo pipetear 0.9 ml de agua y 2.1 ml de la mezcla de reactivos). Incubar 20 minutos a 45°C o una hora a 37°C . Leer a 820 nm , $0.03 \mu\text{m}$ de fosfato inorgánico dan una lectura de 0.260 de absorvencia. El color es estable durante varias horas y las lecturas son proporcionales a la concentración de fósforo - hasta una densidad óptica de 1.8.

DETERMINACIONES ENZIMATICAS

Los estudios de cinética enzimática se hicieron tomando como base las técnicas descritas por Nordlie R.C. & Arion W.C. para Glucosa-6-fosfatasa (63), Victor A. Najjar para Fosfoglucomutasa (68) y Neufeld & Ginsburg para α -glucano Fosforilasa (60) correspondientes a trabajos anteriores. En este capítulo de Material y Métodos se describe la técnica original; en el capítulo de Resultados se describen los experimentos de cinética enzimática para optimizar las determinaciones de actividad, las variaciones que se hicieron a la técnica original y las técnicas definitivas para cada determinación enzimática.

El paso final de todas las determinaciones enzimáticas, es la determinación de fósforo inorgánico liberado durante la reacción enzimática, por ello es muy importante para la exactitud del método y la reproducibilidad de los datos, eliminar todo el fósforo inorgánico presente en el material de vidrio y así mismo utilizar agua desionizada tanto en la preparación de los reactivos como durante la prueba enzimática y dilución del extracto hepático.

GLUCOSA-6-FOSFATASA (E.C.3.1.3.9.) (59).

(D - Glucosa-6-fosfato fosfohidrolasa)



La Glucosa-6-fosfatasa es una fosfomonoesterasa, la cual actúa preferentemente sobre la glucosa-6-fosfato, pero también hidroliza a velocidad más baja otros ésteres tales como: α -glicerofosfatos, fructosa-6-fosfato y fenil fosfato (60).

En preparaciones crudas la Glucosa-6-fosfatasa es completamente inactivada cuando se somete a pH 5 y a 37°C durante algunos minutos.

El citrato y el oxalato ejercen una inhibición competitiva para la Glucosa-6-fosfato ($K_i 6 \times 10^{-3}$); funcionan también como inhibidores pero en menor grado otros ácidos tricarbóxicos, la glucosa y otros azúcares análogos (59).

La determinación de actividad de la Glucosa-6-fosfatasa se basa en la hidrólisis de glucosa-6-fosfato por la enzima, liberando glucosa y fosfato inorgánico, el cual se mide colorimétricamente (Método de Nordlie & Arion ref. 63).

REACTIVOS:

- Solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M pH6.5
- Solución de glucosa-6-fosfato de sodio 0.15 m pH 6.5 (D-glucosa-6-fosfato sal monosódica grado Sigma).
- Acido tricloroacético en solución al 10% (P /V).
- Solución salina de NaCl al 0.85%
- E.D.T.A. 0.002 M pH 6.5

Se preparó un extracto de hígado al 5% en solución salina de NaCl al 0.85%.

Los tubos de prueba contenían:

- 0.6 ml de la solución amortiguadora de cacodilato.
- 0.2 ml de la solución de glucosa-6-fosfato.
- 0.1 ml de E.D.T.A.
- Agua desionizada suficiente para alcanzar 1.5 ml después de la adición de la enzima.

Los tubos fueron preincubados a 30°C por 5 minutos. La reacción fué iniciada por la adición de la preparación enzimática e incubada a 30°C por 30 minutos en un baño metabólico Dubnoff con temperatura controlada y agitación continua.

Para parar la reacción se añadieron 0.1 ml de ácido tricloroacético; en los tubos de control de tiempo cero se añadió primero el ácido y después la enzima. Se aforaron los tubos a 10 ml con agua desionizada y se centrifugó durante 10 minutos a 600 xg para sedimentar proteína desnaturalizada. Se tomaron alícuotas de 0.10 ml de solución del sobrenadante y fueron transferidos a tubos de prueba para medir fósforo por el método ya descrito.

La hidrólisis de glucosa-6-fosfato se calculó como la diferencia de fósforo inorgánico entre los tubos incubados y los tubos de control de tiempo cero.

Según informes de Neufeld & Ginsburg (60) se encontró que cuando se tienen actividades bajas de Glucosa-6-fosfatasa en extractos crudos es particularmente importante corregir la hidrólisis del sustrato por fosfatasa inespecíficas.

La determinación de fosfatasa inespecíficas fué hecha corriendo un experimento control, en el cual la Glucosa-6-fosfatasa fué inactivada por incubación a pH 5, mezclando 0.2 ml del extracto de hígado al 5% con la misma cantidad de solución amortiguadora de acetato 0.1 M pH 5 y se incubó a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó la solución amortiguadora de cacodilato, el E.D.T.A. y se inició la reacción por la adición del sustrato; se dejó progresar la reacción durante 30 minutos a 30°C.

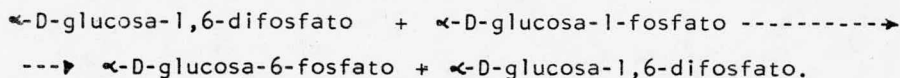
La actividad real de la Glucosa-6-fosfatasa para extractos crudos de hígado corresponde a la resta de actividad de Glucosa-6-fosfatasa y la obtenida por la acción de fosfatasa inespecíficas.

Las unidades de actividad enzimática se expresaron como μm de fósforo inorgánico liberados por gramo de hígado por minuto. La actividad específica se expresó como unidades de actividad enzimática por gramo de proteína.

FOSFOGLUCOMUTASA (E.C.2.7.5.1.).

(α -D-glucosa-1, 6-difosfato: α -D-glucosa-1-fosfato, fosfotransferasa).

La fosfoglucomutasa es la enzima que cataliza la conversión reversible de glucosa-1-fosfato a glucosa-6-fosfato (65).



Se ha visto que esta enzima es específica para los ésteres que se mencionan arriba, pero también cataliza la transferencia reversible de fosfato de los carbonos 1 y 6 de los azúcares que a continuación se mencionan (64).

Especificidad

Glucosa-1-fosfato -----	(1.00)
Ribosa-1-fosfato -----	(0.10)
Glucosamina-1-fosfato -----	(0.10)
Manosa-1-fosfato -----	(0.05)
Galactosa-1-fosfato -----	(0.02)
N,acetilglucosamina-1-fosfato -----	(0.01)

En todos los casos se utilizó el azúcar difosfato como coenzima. La especificidad se expresó tomando como unidad la glucosa-1-fosfato.

La Fosfoglucomutasa es activada por algunos metales como: Mg^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , Cd^{++} y Zn^{++} en orden decreciente de actividad formando un complejo enzima metal 1:1. Parece ser que éstos metales juegan un doble papel: sirven como entidad catalítica y modifican la velocidad de la enzima por medio de sus efectos en la estructura protéica (67).

La enzima es inhibida por altas concentraciones de sustrato ($K_i 1 \times 10^{-6}$).

La determinación de actividad de la Fosfoglucomutasa por el método de Najjar se basa en la desaparición de glucosa-1-fosfato (sustrato) después de la incubación, en un paso analítico simple en el cual la glucosa-1-fosfato con el fosfato lábil al ácido es hidrolizado, mientras que la glucosa-6-fosfato formada permanece por tener el fosfato estable al ácido; el fosfato liberado se determina colorimétricamente, en presencia de ácido ascórbico y molibdato como se explica en la determinación de fósforo.

Debido a que en extractos crudos la presencia de fosfatasas inespecíficas invalida la prueba es necesario llevar a cabo una purificación parcial para evitar la interferencia de fosfatasas inespecíficas. Originalmente se utilizó el método de Norma -- Perez et al (44), que consistía en preparar un extracto de hígado al 5% en una solución que contenía KCl 0.10 M, E.D.T.A. 0.006 M, 6×10^{-3} M $MgCl_2$, glicil-glicina 0.025 M, pH 7.5 y someterlo a ultracentrifu

gación a 105 000 x g durante 20 minutos a 4°C. Con este método se lograba separar en el sobrenadante la Fosfoglucomutasa y en el sedimento las fosfatasas inespecíficas; por problemas de disponibilidad de equipo no fué posible continuar con este método y se utilizó un método basado en los primeros pasos de aislamiento de la Fosfoglucomutasa por Victor A. Najjar (65) que consistía en calentar a 65°C el extracto de tejido ajustado a pH 5 con ácido --acético e inmediatamente introducirlo en hielo hasta alcanzar --4°C. Con esto la Fosfoglucomutasa que es una enzima termorresistente mantiene su actividad, mientras que ciertas enzimas como las fosfatasas se desnaturalizan y precipitan pudiendo ser separadas por centrifugación.

En el capítulo de resultados se describen los experimentos para montar esta técnica de separación parcial que se describe a continuación:

Se preparó un extracto de tejido hepático al 5% en solución amortiguadora de acetato 0.2 M pH 5 adicinada de KCl 0.10 M, E.D.T.A. 0.006 M, y MgCl₂ 0.006 M para proteger a la enzima (44). Se calentó a 45-50°C, inmediatamente se puso en hielo hasta alcanzar 4°C y se separó la proteína desnaturalizada (fosfatasas) por centrifugación a 4°C y 600 x g.

La determinación de actividad por el método de Najjar, se hizo pipeteando en un tubo de centrifuga graduado: 0.1 ml de los reactivos que se mencionan a continuación:

-Solución de glucosa-1-fosfato 0.02 M (Glucosa-1-fosfato cristalina, sal dipotásica grado Sigma). Enzimáticamente preparada, contiene normalmente 2.5×10^{-4} μm de glucosa-1,6-difosfato. Bajo las condiciones de prueba es suficiente para saturar la enzima y consecuentemente produce una actividad máxima.

-Solución de cistefina 0.10 M pH 7.5 recientemente preparada.

Después de equilibrar la temperatura en baño de agua a 30°C , la reacción fué comenzada por la adición de 0.1 ml de la dilución de la enzima, se dejó progresar la reacción por cinco minutos y se paró con 1 ml de H_2SO_4 8 N. El volumen fué llevado a 5 ml con agua desionizada y los tubos se pusieron a ebullición en un baño de agua durante 3 minutos para hidrolizar el remanente de glucosa-1-fosfato. En el tubo testigo, se pipetearon los mismo reactivos pero la reacción fué parada a tiempo cero con H_2SO_4 8 N. Finalmente se centrifugaron los tubos para sedimentar proteína y se tomaron alcuotas de 0.1 ml del sobrenadante para la determinación de fósforo.

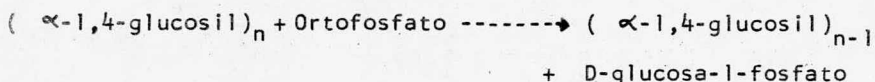
La cantidad de fósforo estable formado que representa el producto de la reacción (glucosa-6-fosfato), es la resta del fósforo hidrolizable del substrato (glucosa-1-fosfato) menos el que queda después de cinco minutos de reacción.

Las unidades de actividad enzimática se expresaron como μm de fósforo estable formado por gramo de hígado por minuto. La actividad específica se expresó como unidades de actividad enzimática por gramo de proteína.

α- GLUCANO FOSFORILASA (E.C.2.4.1.1.) (69)

(α-1,4- glucano: ortofosfato glucosil transferasa)

La fosforilasa cataliza la transferencia reversible de una unidad de glucosilo de la parte terminal no reductora de glucógeno, a un fosfato inorgánico.



La cinética de la α-glucano Fosforilasa es muy compleja, en varios tejidos existe en dos formas interconvertibles: fosforilasa "a" y fosforilasa "b". En ausencia de AMP, la fosforilasa "a" tiene sólo el 60-70% de su actividad máxima y la fosforilasa "b" es inactiva: en presencia de AMP las dos formas son activadas.

La enzima es inhibida por arsenato que compite con el ortofosfato, en cuyo caso la reacción es irreversible y se lleva a cabo a velocidad lenta. Otros inhibidores de la Fosforilasa "b" del músculo incluyendo a la glucosa-6-fosfato y ADP, ninguno de estos afecta la actividad de la fosforilasa "a". El AMP y el ortofosfato actúan conjuntamente para antagonizar la inhibición del ATP.

Aunque la Fosforilasa puede efectuar "in vitro" la síntesis del glucógeno en presencia de glucosa-1-fosfato, su acción -- "in vivo es totalmente opuesta, invariablemente cataliza la degradación de glucógeno y nunca la síntesis de glucógeno.

La determinación de actividad de la α -glucano Fosforilasa por el método de Neufeld (60) fué medida en dirección a la síntesis de glucógeno, por la liberación de fosfato inorgánico de la glucosa -1-fosfato en la presencia de glucógeno y AMP.

El sistema constaba de:

- Glucosa-1-fosfato 0.10 M (Glucosa-1-fosfato cristalina sal dipotásica grado I Sigma)
- Glucógeno al 1% (Glucógeno para fines bioquímicos Merck)
- AMP 0.03 M (Acido adenosín-5-monofosfórico para fines bioquímicos Merck)
- NaF 0.2M

Todo esto a pH 6.1

El extracto de tejido hepático se preparó al 5% en solución de fluoruro de sodio 0.1 M (70).

Para la determinación de actividad, se pipetearon en un tubo de centrífuga 0.05 ml del sistema ántes mencionado y se puso en baño de agua a 37°C, se añadieron 0.05 ml del extracto hepático y se incubaron 10 minutos; para el control de tiempo cero se añadió el ácido ántes que el extracto hepático; la reacción fué parada por la adición de 0.5 ml de ácido tricloroacético 1 M helado. Posteriormente se aforó a 10 ml con agua desionizada, se centrifugó para sedimentar proteínas y se tomaron alícuotas de 0.1 ml para la determinación de fósforo.

La hidrólisis de la glucosa-1-fosfato se calculó como la diferencia de fósforo inorgánico entre los tubos incubados por 10 minutos y los tubos de control de tiempo cero.

Las unidades de actividad se expresaron como μm de fósforo inorgánico liberados por gramo de hígado por minuto. La actividad específica se expresó como unidades de actividad enzimática por gramo de proteína.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico para establecer la significación de las diferencias entre los distintos grupos se llevó a cabo utilizando la prueba de "t" de "Student" unilateral no pareada.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N .

RESULTADOS Y DISCUSION

EXPERIMENTO I

En un experimento exploratorio, con 3 grupos de tres ratas cada uno, alimentadas con las 3 dietas descritas en capítulos anteriores, se encontró que el consumo de las dietas hipoprotéicas durante 21 días deterioraba considerablemente a los animales produciendo: R.E.P. negativos de -1.3 a -1.8, disminución de más del 50% en el tamaño del hígado y disminución importante de la concentración de proteínas en dicho órgano; la concentración de glucógeno fué extremadamente baja.

En el experimento I (Distintos períodos de desnutrición), se encontraron los resultados que se describen a continuación:

Comparando los cuadros II (testigo), IV y VI (dietas hipoprotéicas) se muestra que las 2 dietas hipoprotéicas ocasionaron R. E. P. negativos especialmente a partir del 9° día del experimento. El peso del hígado fué mucho mayor con la dieta testigo que con las dietas hipoprotéicas; el peso del hígado en relación al peso corporal mostró, en el grupo testigo, una tendencia también ligera a disminuir y en el grupo alimentado con la dieta de Maíz al 5% prácticamente se mostró estable.

Por lo que toca al contenido de glucógeno por 100 gramos de hígado, en la dieta testigo se observó un ligero incremento (no significativo) hasta el 9° día, seguido de una tendencia decreciente; con la dieta de Caseína al 5% y de Maíz al 5% se observó un patrón semejante pero el pico ocurrió al 12° día y alcanzó cifras más altas que en el grupo control.

El contenido hepático de proteínas y humedad se muestra en los cuadros III, V y VII. Como puede observarse tanto en el grupo testigo (cuadro III) como en los grupos con dietas hipoprotéicas (cuadros V y VII) se encontró una elevación en la -- concentración de proteínas por 100 gramos de hígado a partir del 6° día, mientras que el contenido hepático de humedad se mantuvo a lo largo del experimento sin diferencias importantes entre los grupos.

Particularmente por los datos de contenido hepático de glucógeno, se consideró que al 12° día se tenían las mejores con condiciones experimentales de desnutrición.

CUADRO II

RELACION DE EFICIENCIA PROTICA (R.E.P.) PESO DEL HIGADO Y CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5% (GRUPO TESTIGO).

Duración de la alimentación experimental (días).	R.E.P.	Peso del hígado		Contenido hepático de glucógeno		
		(g)	g/100g de peso corp.	(g)	g/100g de hígado	g/100g de peso corp.
2	4.8 ± 1.0	1.73±0.29	4.94±0.651	0.103±0.026	5.42±1.17	0.303±0.081
6	3.5 ± 0.5	2.08±0.38	4.76±0.280	0.161±0.040	7.76±0.80	0.369±0.060
9	2.8 ± 0.4	2.45±0.27	4.96±0.403	0.200±0.050	8.20±1.75	0.400±0.070
12	2.7 ± 0.3	3.06±0.49	5.35±0.477	0.242±0.060	7.85±0.76	0.422±0.081
15	2.9 ± 0.2	3.22±0.67	5.72±0.382	0.231±0.031	6.47±0.89	0.362±0.060

CUADRO III

CONTENIDO HEPÁTICO DE PROTEÍNAS Y HUMEDAD EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5% (GRUPO TESTIGO).

Duración de la alimentación experimental. (días)	Proteínas			Humedad		
	(g)	g/100 g de hígado.	g/100g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.
2	0.236±0.039	13.74±0.95	0.678±0.094	1.06±0.170	61.76±6.68	3.048±0.419
6	0.281±0.060	12.99±1.85	0.645±0.074	1.30±0.206	59.15±3.45	3.022±0.289
9	0.487±0.036	20.00±2.20	0.993±0.142	1.43±0.209	58.09±3.69	2.883±0.279
12	0.540±0.137	17.51±1.49	0.943±0.168	1.92±0.364	62.71±1.80	3.362±0.389
15	0.540±0.058	17.09±2.15	0.809±0.143	2.17±0.434	67.76±1.50	3.274±0.817

CUADRO IV

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA, PESO DEL HIGADO Y CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 5%.

Duración de la alimentación experimental. (días)	R.E.P.	Peso del hígado		Contenido hepático de glucógeno		
		(g)	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.
2	+0.13±2.28	1.46±0.173	4.59±0.263	0.071±0.017	4.85±0.87	0.234±0.046
6	-0.93±0.24	1.30±0.200	4.10±0.516	0.086±0.032	6.76±1.88	0.282±0.107
9	-1.62±1.53	1.34±0.150	4.44±0.473	0.094±0.073	7.00±0.23	0.313±0.084
12	-1.93±1.17	1.32±0.110	4.18±0.497	0.126±0.011	9.58±0.49	0.399±0.043
15	-1.96±1.06	1.22±0.140	4.02±0.530	0.088±0.008	7.25±0.98	0.290±0.028

CUADRO V

CONTENIDO HEPATICO DE PROTEINAS Y HUMEDAD EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE

DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 5%.

Duración de la alimentación experimental. (días)	Proteínas			Humedad		
	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.
2	0.175±0.019	12.13±1.99	0.550±0.082	0.94±0.150	67.86±2.74	3.074±0.312
6	0.140±0.021	11.73±0.85	0.442±0.048	0.82±0.115	63.13±2.92	2.593±0.361
9	0.231±0.043	17.20±3.03	0.761±0.122	0.83±0.089	61.94±1.77	2.756±0.365
12	0.217±0.015	16.49±1.62	0.686±0.058	0.92±0.050	68.90±2.97	2.882±0.318
15	0.209±0.031	17.07±1.63	0.682±0.086	0.84±0.104	68.60±1.31	2.763±0.387

CUADRO VI

RELACION DE EFICIENCIA PROTÉICA (R.E.P.), PESO DEL HIGADO Y CONTENIDO HE
PATICO DE GLUCOGENO EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON
UNA DIETA A BASE DE MAIZ AL 5%.

Duración de la alimenta ción experi mental. (días)	R.E.P.	Peso del hígado		Contenido hepático de glucógeno		
		(g)	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado.	g/100 g de peso corp.
2	-1.49±4.00	1.38±0.22	4.26±0.267	0.064±0.015	4.76±0.79	0.197±0.032
6	-0.42±1.89	1.32±0.22	4.12±0.451	0.090±0.043	7.50±2.70	0.276±0.117
9	-1.64±1.19	1.25±0.28	4.03±0.565	0.088±0.038	6.80±1.61	0.280±0.096
12	-0.78±2.00	1.53±0.28	4.35±0.394	0.145±0.045	9.45±2.03	0.413±0.101
15	-1.00±0.78	1.48±0.18	4.38±0.573	0.115±0.006	7.27±0.18	0.346±0.017

CUADRO VII

CONTENIDO HEPATICO DE PROTEINAS Y HUMEDAD EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE MAIZ AL 5%.

Duración de la alimentación experimental. (días)	Proteínas			Humedad		
	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.
2	0.178±0.015	13.30±2.88	0.561±0.085	0.89±0.150	61.11±1.88	2.733±0.187
6	0.142±0.019	11.16±3.02	0.451±0.066	0.81±0.146	61.04±5.31	2.515±0.290
9	0.209±0.040	17.16±3.28	0.682±0.109	0.75±0.117	60.90±4.88	2.439±0.187
12	0.254±0.071	16.14±1.26	0.715±0.126	1.00±0.169	66.10±3.00	2.880±0.196
15	0.218±0.017	14.89±1.82	0.644±0.034	0.98±0.129	66.50±1.32	2.922±0.415

EXPERIMENTO II

Este experimento se llevó a cabo para determinar las condiciones más propicias de recuperación de la desnutrición. Conviene comentar los resultados de un experimento exploratoria previo, en el que se alimentaron grupos de 3 ratas con cada una de las dietas previamente descritas, durante 21 días seguidos de períodos de recuperación de 15 y 30 días con la dieta de Caseína al 12.5%. Los resultados con 15 días de recuperación se muestran en la cuadro VIII. Se puede observar el profundo efecto, que las condiciones experimentales tuvieron sobre la Eficiencia Protéica durante los 21 días del período de desnutrición. Al administrar la dieta de recuperación la R.E.P. de los grupos previamente alimentados con las dietas hipoprotéicas se elevó en forma importante; así mismo el peso del hígado por 100 g de peso corporal y el contenido hepático de glucógeno fué mucho mayor en los grupos previamente desnutridos. Los datos anteriores indican que es posible reproducir en las ratas la hepatomegalia de la recuperación. Los datos de contenido hepático de glucógeno, aún cuando muestran una acumulación significativamente mayor en las ratas recuperadas especialmente aquellas que habían sido desnutridas con la dieta de Maíz al 5%, no pueden interpretarse adecuadamente debido a que fueron obtenidas después de un ayuno muy prolongado con la consiguiente depleción de glucógeno.

Los datos con 30 días de recuperación se muestran en el cuadro IX. El aumento en la R.E.P. al cabo de la recuperación durante 30 días fué un poco mayor que en las ratas recuperadas durante 15 días. Se observa nuevamente el fenómeno de clara he-

patomegalia y acumulación de glucógeno especialmente en las ratas desnutridas con la dieta de Caseína al 5%.

Cabe notar que después de 30 días de recuperación los animales a los que se les había provocado desnutrición con la dieta de Maíz al 5% mostraban datos muy sugestivos de normalización es decir de adecuada recuperación. Por lo tanto se puso en evidencia la necesidad de explorar períodos mucho menos prolongados de recuperación.

CUADRO VIII

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS DE CASEINA AL 12.5 %, al 5 % Y MAIZ AL 5 % DURANTE 21 DIAS Y EN SU RECUPERACION CON DIETA DE CASEINA AL 12.5 % POR 15 DIAS. PESO HEPATICO, CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO Y PROTEINAS AL FINAL DEL EXPERIMENTO.

Proteína en la dieta.	R.E.P. 21 días. Desnutri - ción.	R.E.P. 15 días. Recupera - ción.	Peso del hígado		Contenido hepático de:	
			(g)	g/100 g de peso corp.	Glucógeno g/100 g de hígado.	Proteínas g/100 g de hígado.
Caseína 12.5%	2.66±0.21	1.45±0.30	2.55±0.04	2.80±0.07	0.016±0.007	19.99±0.08
Caseína 5.0%	-0.38±0.85	2.02±0.37	1.95±0.15	3.33±0.36	0.022±0.004	17.02±1.00
Maíz 5.0%	-0.89±0.56	2.14±0.62	2.19±0.19	3.18±0.38	0.031±0.003	17.62±0.29

CUADRO IX

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS DE CASEINA AL 12.5 %, AL 5 % Y MAIZ AL 5 % DURANTE 21 DIAS Y EN SU RECUPERACION CON DIETA DE CASEINA AL 12.5 % POR 30 DIAS. PESO HEPATICO, CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO Y PROTEINAS AL FINAL DEL EXPERIMENTO.

Proteína en la dieta.	R.E.P. 21 días. Desnutrición.	R.E.P. 30 días. Recuperación.	Peso del hígado		Contenido hepático de:	
			(g)	g/100 g de peso corp.	Glucógeno g/100 g de hígado	Proteínas. g/100 g de hígado.
Caseína 12.5%	2.03±0.21	2.11±0.06	2.64±0.19	2.43±0.28	0.032±0.021	20.33±0.26
Caseína 5.0%	-1.15±0.56	2.17±0.55	2.58±0.49	3.44±0.78	0.060±0.041	19.74±4.07
Maíz 5.0%	-0.46±0.67	2.75±0.65	2.80±0.31	2.96±0.49	0.014±0.007	18.50±1.85



QUINUA

El experimento II propiamente dicho se llevó a cabo con 3 grupos de 20 ratas cada uno, de peso y características similares, a las que se les administraron respectivamente, las dietas de Maíz al 5% Caseína al 5.0% y Caseína al 12.5% durante 12 días, período previamente seleccionado como el más adecuado. Al cabo de los doce días los dos primeros grupos fueron alimentados con una dieta de "recuperación" a base de Caseína al 12.5%. Se sacrificaron 5 ratas de cada grupo a las 24 horas, 3 días, 5 días y 7 días manteniéndose a los animales en ayuno durante la última hora antes del sacrificio.

Los resultados de éste experimento se pueden observar en los cuadros X, XI (grupo testigo), XII, XIII (Caseína 5%), XIV, XV (Maíz 5%). En los cuadros X y XI se puede observar los resultados con el grupo testigo. Vale la pena hacer notar una ligera tendencia, significativamente no estadística, a una mayor masa hepática con respecto al peso corporal con el transcurso de la recuperación, tendencia que no estuvo acompañada de cambios importantes en la concentración hepática de glucógeno y humedad.

En los cuadros XII y XIII se presentan los resultados obtenidos en las ratas desnutridas con la dieta de Caseína al 5.0% y realimentadas con una dieta de Caseína al 12.5%. Puede observarse el gran incremento de la R.E.P. a medida que los animales pasan mayor tiempo en período de recuperación; el peso del hígado/100 g de peso corporal sufre un importante incremento mientras que la concentración de glucógeno/100 g de hígado alcanza su mayor valor en los tres primeros días y después cae en forma significativa

En los cuadros XIV y XV se presentan los datos obtenidos en las ratas alimentadas durante 12 días con una dieta a base de Maíz al 5.0% y realimentadas, con una dieta a base de Caseína al 12.5% en este grupo el valor más alto de R.E.P se alcanza al tercer día de recuperación. La masa hepática/100 g de peso corporal aumenta conforme transcurre el período de recuperación pero las diferencias no fueron significativas excepto cuando se comparan la masa hepática del primer día contra la del séptimo día. El contenido hepático de glucógeno aumenta en forma muy importante al tercer día de recuperación y, después disminuyó en forma significativa. El contenido hepático de glucógeno aumenta en forma muy importante al tercer día de recuperación y, después disminuyó en forma significativa. El contenido hepático de proteínas y humedad se mantuvo esencialmente estable durante todo el experimento.

Del experimento anterior se concluye que tres días de recuperación es suficiente para obtener un aumento en la concentración hepática de glucógeno con cierta hepatomegalia y que la prolongación del tratamiento de recuperación no permite demostrar cambios más claros.

CUADRO X

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA (R.E.P.), PESO DEL HIGADO, Y CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO, EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE 12 DIAS CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5% Y REALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5% (GRUPO TESTIGO).

Duración de la realimentación experimental. (días)	R.E.P. 12 días Desnutrición.	R.E.P. Recuperación.	Peso del hígado		Contenido hepático de glucógeno		
			(g)	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.
1	2.17±0.48	1.66±0.82	2.56±0.42	4.65±0.80	0.177±0.051	5.93±2.24	0.318±0.050
3	2.80±0.40	1.84±1.03	3.04±0.64	4.60±0.46	0.180±0.041	5.97±1.32	0.277±0.071
5	2.31±0.29	2.15±1.09	3.46±0.77	5.20±1.06	0.177±0.084	5.20±1.61	0.260±0.082
7	2.47±0.81	2.60±0.38	4.25±0.47	5.37±0.48	0.221±0.042	5.34±1.29	0.283±0.075

CUADRO XI

CONTENIDO HEPATICO DE PROTEINAS Y HUMEDAD EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE 12 DIAS CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5% Y REALIMENTADAS DURANTE DIFERENTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5% (GRUPO TESTIGO).

Duración de la realimentación experimental. (días)	Proteínas			Humedad		
	(g)	g/100 g de hígado.	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado.	g/100 g de peso corp.
1	0.462±0.0374	18.13±3.86	0.825±0.113	1.74±0.313	68.86±1.16	3.15±0.575
3	0.429±0.0318	14.70±1.22	0.645±0.082	2.06±0.423	65.59±1.03	3.10±0.310
5	0.492±0.0129	14.06±0.98	0.756±0.172	2.25±0.513	65.26±1.55	3.47±0.754
7	0.614±0.0351	14.89±1.66	0.780±0.055	2.75±0.364	64.77±1.63	3.51±0.328

CUADRO XII

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA (R.E.P.); PESO DEL HIGADO Y CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO, EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE 12 DIAS CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 5.0% Y REALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5%.

Duración de la realimentación experimental. (días)	R.E.P 12 días. Desnutrición.	R.E.P. Recuperación.	Peso del hígado		Contenido hepático de glucógeno		
			(g)	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.
1	-1.60±0.67	0.21±1.30	1.56±0.23	4.22±0.64	0.115±0.041	7.63±1.30	0.331±1.00
3	-0.21±0.94	1.81±1.57	1.69±0.28	4.20±0.49	0.124±0.024	7.39±1.34	0.311±0.59
5	-0.82±0.65	2.84±1.18	2.24±0.52	5.14±0.81	0.086±0.020	3.96±1.05	0.199±0.50
7	-0.11±0.13	2.58±0.79	2.66±0.28	5.21±0.47	0.083±0.041	3.04±1.21	0.161±0.78

CUADRO XIII

CONTENIDO HEPATICO DE PROTEINAS Y HUMEDAD EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE 12 DIAS CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 5.0% Y REALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5%.

Duración de la realimentación experimental. (días)	Proteínas			Humedad		
	(g)	g/100 g de hígado.	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado.	g/100 g de peso corp.
1	0.211±0.038	14.2±1.49	0.613±0.106	1.00±0.189	68.5±1.26	2.91±0.426
3	0.252±0.041	14.5±0.96	0.618±0.047	1.12±0.150	66.9±4.25	2.80±0.182
5	0.305±0.065	13.7±0.77	0.700±0.094	1.54±0.372	69.1±0.99	3.56±0.585
7	0.431±0.038	16.0±1.23	0.825±0.055	1.79±0.185	67.4±0.70	3.50±0.323

CUADRO XIV

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA (R.E.P.), PESO DEL HIGADO, Y CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO, EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE 12 DIAS CON UNA DIETA A BASE DE MAIZ AL 5.0% Y REALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5%.

Duración de la reálimentación experimental. (días)	R.E.P. 12 días. Desnutrición.	R.E.P. Recuperación.	Peso del hígado		Contenido hepático de glucógeno		
			(g)	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.
1	-0.93±1.34	1.25±3.14	1.62±0.28	4.33±0.55	0.097±0.028	6.00±1.31	0.261±0.060
3	-0.28±0.65	3.30±1.43	2.15±0.26	4.79±0.37	0.174±0.033	8.08±0.70	0.383±0.055
5	-1.93±2.14	2.94±0.48	2.14±0.52	4.92±0.43	0.111±0.003	4.95±1.21	0.207±0.068
7	-1.51±1.41	3.19±0.57	2.73±0.41	5.26±1.03	0.125±0.090	5.77±2.50	0.248±0.164

CUADRO XV

CONTENIDO HEPATICO DE PROTEINAS Y HUMEDAD EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE 12 DIAS CON UNA DIETA A BASE DE MAIZ AL 5.0% Y REALIMENTADAS DURANTE DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO CON UNA DIETA A BASE DE CASEINA AL 12.5%.

Duración de la realimentación experimental. (días)	Proteínas			Humedad		
	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.	(g)	g/100 g de hígado	g/100 g de peso corp.
1	0.265±0.078	15.88±2.25	0.717±0.172	1.09±0.167	67.9±1.97	2.95±0.300
3	0.344±0.074	16.13±3.39	0.752±0.126	1.44±0.184	66.9±3.43	3.15±0.211
5	0.297±0.064	14.05±1.67	0.689±0.070	1.44±0.354	67.6±2.07	3.33±0.327
7	0.414±0.262	15.40±2.34	0.792±0.068	1.78±0.233	68.4±3.49	3.54±0.767

EXPERIMENTO III

Para encontrar las condiciones óptimas de reacción de las enzimas Glucosa-6-fosfata, Fosfoglucomutasa y α -glucano Fosforilasa, que permitan medir los cambios de actividad en hígado de ratas sujetas a distintas condiciones nutricias, se estudiaron algunos aspectos de la cinética enzimática de cada una de ellas como son:

- Concentración de enzima.
- Concentración de sustrato.
- pH
- Tiempo de incubación.

Con las técnicas que han sido descritas en el capítulo de Material y Métodos se obtuvieron los resultados para cada una de las enzimas.

En todos los casos, las determinaciones de cinética enzimática se repitieron hasta obtener buena reproducibilidad y resultados constantes. Todas las pruebas fueron corridas por duplicado y las variaciones entre los duplicados fueron menores al 5%.

GLUCOSA -6- FOSFATASA (EC 3.1.3.9)

Debido a que se utilizaron extractos crudos de hígado, fué necesario hacer la determinación de actividad correspondiente a -fosfatasa inespecíficas en todos los casos (ver capítulo de Material y Métodos) y restarla a la actividad total para obtener la actividad real de la Glucosa-6-fosfatasa. La actividad determinada para estas fosfatasa inespecíficas fué de un 7% de la actividad total

Al montar la técnica de actividad enzimática se observó que 0.1 ml de ácido tricloroacético al 10% como indica la técnica original no eran suficientes para parar la reacción, por lo que se probaron distintos volúmenes de A.T.C.: 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 ml y se encontró que el óptimo fué de 0.5 ml del ácido al 10% para parar la reacción.

- Concentración de enzima.

Se probaron distintas cantidades de enzima: 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 y 0.50 ml de un extracto crudo de hígado al 5% en solución isotónica de NaCl (0.85%) con una concentración constante de sustrato (7.5 μ m de glucosa-6-fosfato); la reacción se corrió a pH 6.5, y 30°C durante 10 minutos. Los resultados se encuentran en la gráfica I.

De las concentraciones probadas se eligió 0.2 ml del extracto crudo de hígado al 5.0%, como la más adecuada para la determinación.

- Concentración de sustrato.

Se determinó la actividad enzimática con 0.2 ml de un extracto crudo de hígado al 5% y cantidades crecientes de sustrato: 3.00, 3.25, 7.50, 10.50, 22.50, 30.00, 45.00 y 60.00 μ m de glucosa-6-fosfato, durante 20° a 30°C y pH 6.5. Los resultados se observan en la gráfica II.

Como se puede apreciar en la gráfica, la velocidad de reacción inicial es proporcional a la cantidad de sustrato presente de 3.00 a 7.50 μ m, después empieza a disminuir hasta que la curva llega a ser de orden cero en 10 μ m y la velocidad de la reacción se aproxima en forma asintótica a una velocidad constante que es la velocidad máxima de reacción. La cantidad elegida para obtener la velocidad

máxima fué de 20 μm de glucosa-6-fosfato.

Con los datos de la gráfica II y utilizando la ecuación de Lineweaver Burk (73) se hizo el cálculo para determinar la constante de Michaelis-Menten. Bajo las condiciones de reacción ya descritas, la K_m de la glucosa-6-fosfatasa fué de 1.61×10^{-4} M; en condiciones semejantes la K_m reportada por Nordlie (76) para glucosa-6-fosfatasa aislada de hígado de rata fué de 4.2×10^{-4} M.

-Curva de pH.

En la gráfica III se observan las variaciones de actividad correspondientes a distintos pHs: 6.0, 6.2, 6.7, 7.0, 7.5 y 8.0 para obtener estos valores de pH se utilizó una solución amortiguadora de glicil-glicina de pH 6.0 a 6.7 y solución amortiguadora de cacodilato de sodio de pH 6.7 a 8.0, introduciéndose un punto de ensamble entre las dos soluciones amortiguadoras de pH 6.7 con el fin de evitar variaciones de distintas especies iónicas.

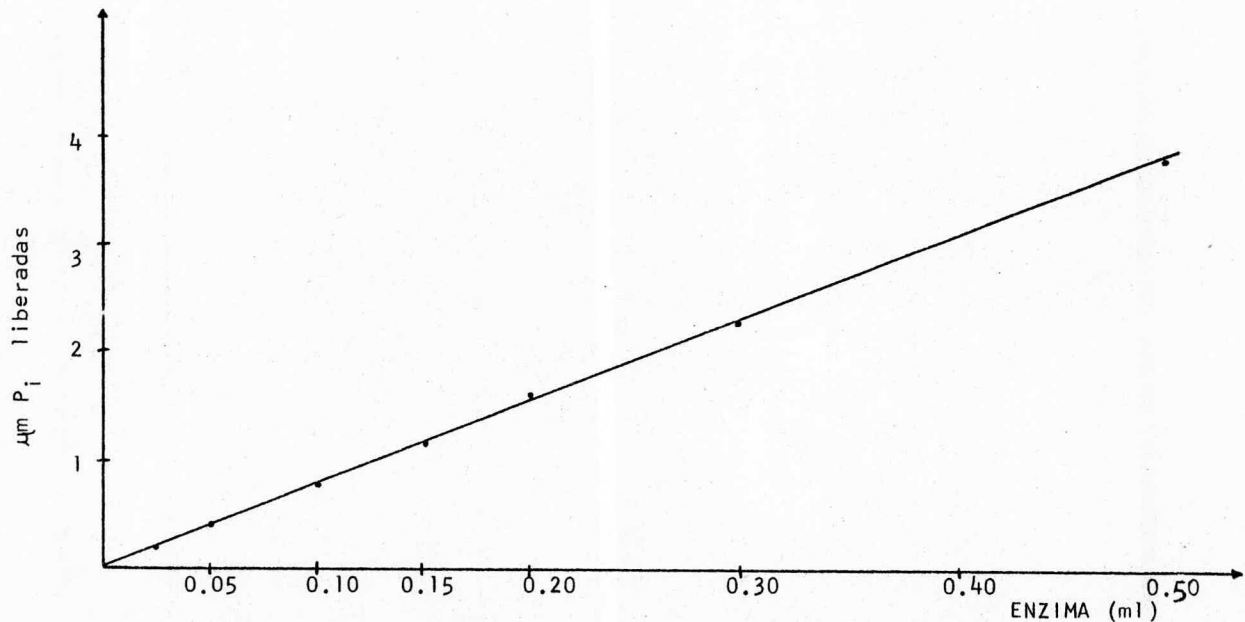
El pH óptimo de reacción para la Glucosa-6-fosfatasa con 0.2 ml del extracto crudo de hígado al 5%, 7.5 μm de glucosa-6-fosfato, a 30°C durante 20 minutos fué de 6.5.

-Tiempo de incubación.

A fin de obtener resultados de actividad de la Glucosa-6-fosfatasa que den buena sensibilidad al método se probaron tiempos de reacción de 5', 10', 20' y 30'; con 0.2 ml de extracto crudo de hígado al 5.0%, 7.5 μm de glucosa-6-fosfato a pH 6.5 y 30°C. Los resultados se muestran en la gráfica IV.

La actividad fué lineal con el tiempo hasta 30 ; en otros experimentos se midió la actividad hasta 60 minutos, observándose una disminución a partir de los 45 minutos. El tiempo elegido para hacer las determinaciones de actividad de la Glucosa-6-fosfatasa fué de 30 minutos, punto hasta el cual no hay inactivación de la enzima.

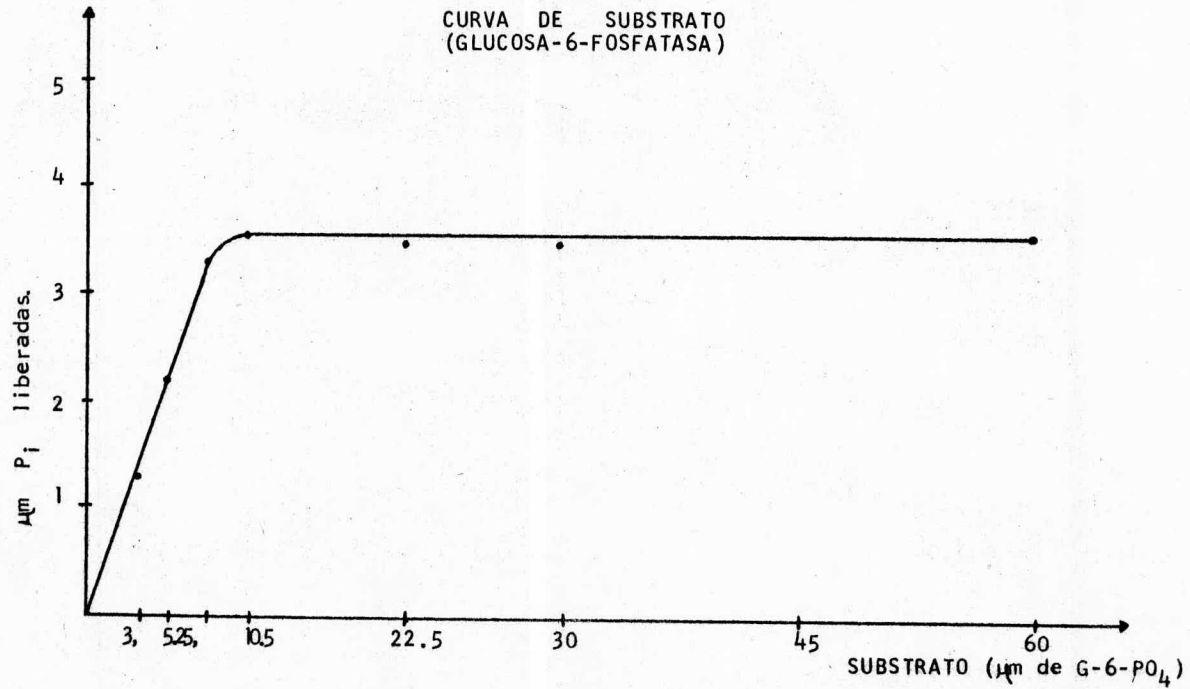
GRAFICA I
CURVA DE ENZIMA
(GLUCOSA-6-FOSFATASA)



[E] Extracto de tejido hepático al 5.0 % en solución isotónica de NaCl.
[S] 7.5 μm de glucosa-6-fosfato.
pH 6.5
Tiempo de incubación 10 a 30°C.

GRAFICA II

CURVA DE SUBSTRATO
(GLUCOSA-6-FOSFATASA)

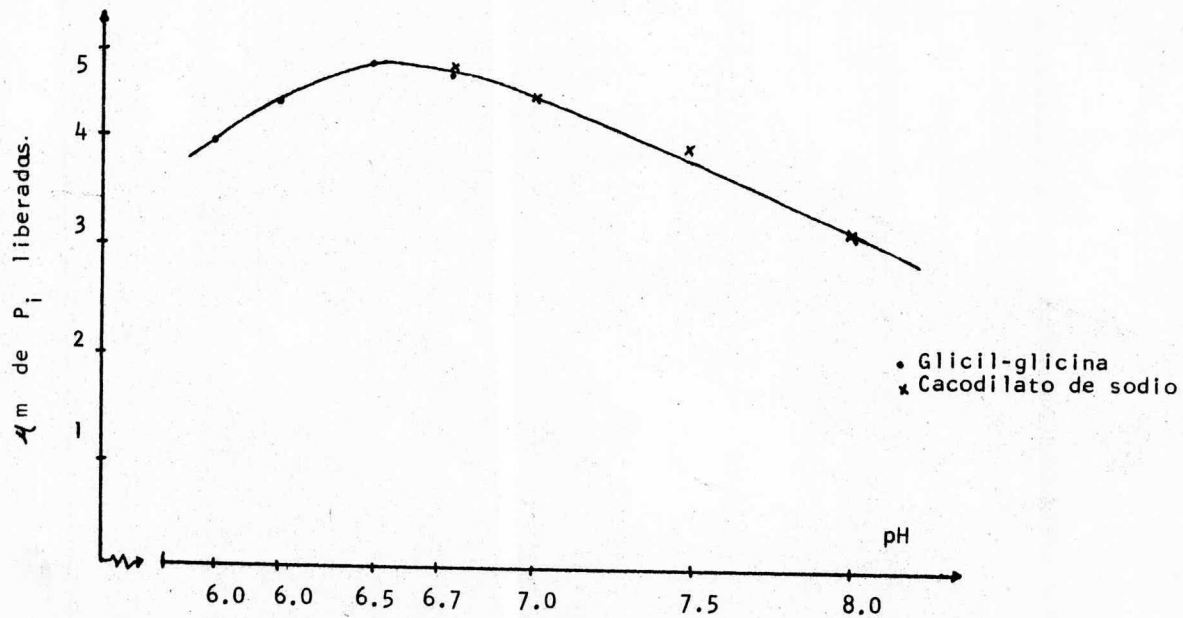


[E] 0.2 ml de extracto de tejido hepático al 5.0 %.

pH 6.5.

Tiempo de incubación 20' a 30°C.

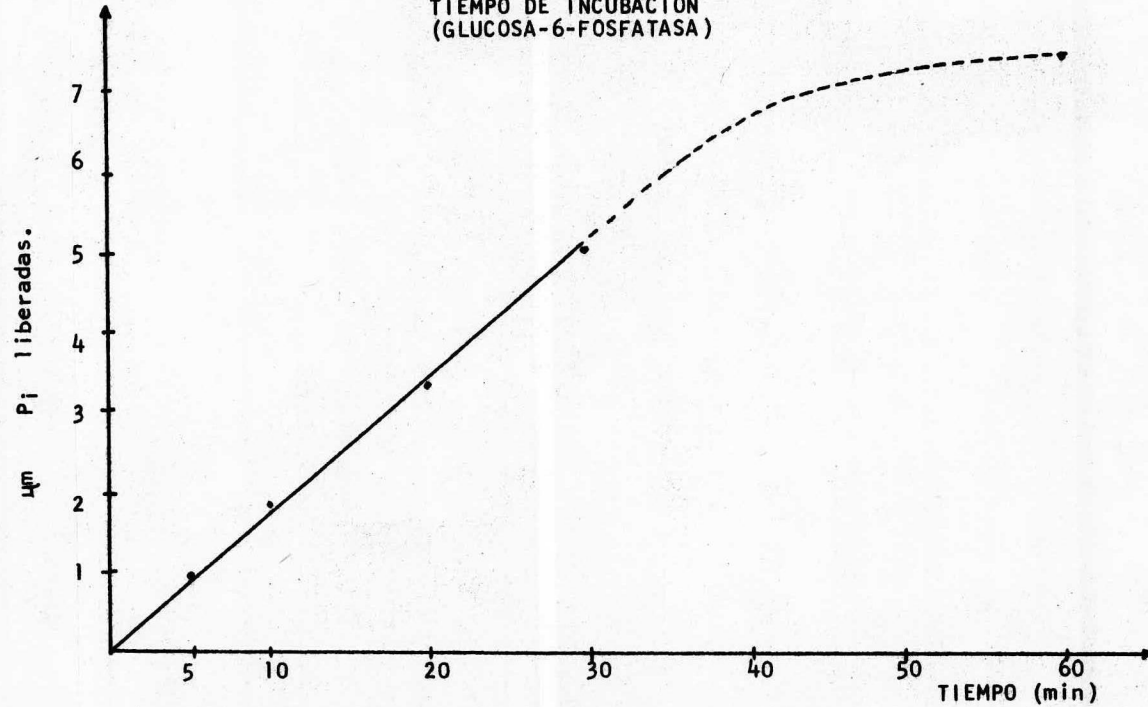
GRAFICA III
CURVA DE pH
(GLUCOSA-6-FOSFATASA)



[E] 0.1 ml de extracto de tejido hepático al 5%.
[S] $7.5 \mu\text{m}$ de glucosa-6-fosfato.
Tiempo de incubación 30' a 30°C.

GRAFICA IV

TIEMPO DE INCUBACION
(GLUCOSA-6-FOSFATASA)



(E) 0.2 ml de extracto de tejido hepático al 5.0 %.
(S) 7.5 µm de glucosa-6-fosfato.
pH 6.5 a 30°C.

Según los resultados obtenidos de los parámetros estudiados, las condiciones óptimas de reacción para la glucosa-6-fosfatasa fueron las siguientes:

-Concentración de enzima: extracto crudo de tejido hepático al 5%, 0.2 ml.

-Concentración de sustrato: 20 μm de glucosa-6-fosfato.

-Tiempo de incubación: 30 minutos a 30°C.

-pH óptimo: 6.5. Buffer de cacodilato 0.1 M.

La técnica definitiva para la determinación enzimática fue la siguiente:

1) Pipetear en un tubo de centrifuga graduado:

-0.6 ml (60 μm) de la solución amortiguadora de cacodilato pH 6.5,

-0.14 ml (21 μm) de la solución de glucosa-6-fosfato

-0.1 ml de E.D.T.A. (0.2 μm)

-0.46 ml de agua desionizada

2) Preincubar a 30°C durante algunos minutos e iniciar la reacción con la adición de 0.2 ml del extracto crudo de tejido hepático

3) Después de incubar 30 minutos parar la reacción con 0.5 ml de ácido tricloroacético al 10%.

4) Aforar a 10 ml con agua desionizada.

5) Centrifugar a 600 x g y tomar alícuotas de 0.1 ml para determinar fósforo inorgánico por el método ya descrito.

6) Corregir la actividad restando la que corresponde a las fosfatasas inespecíficas.

FOSFOGLUCOMUTASA (EC.2.7.51.)

Como ya se mencionó en la descripción de la técnica para esta enzima, es necesario separar la Fosfoglucomutasa de las fosfatasa presentes en el extracto hepático. Desde luego, el primer método que se describió en Material y Métodos y que corresponde al de ultracentrifugación era el más adecuado, pero por problemas de disponibilidad de equipo, fué necesario cambiar a un método que consistió en calentar el extracto de tejido hepático preparado en un medio que contenía KCl 0.10 M, E.D.T.A. 0.006 M, $MgCl_2$ 0.006 M y solución amortiguadora de acetato 0.2 M pH 5 a distintas temperaturas: 20°, 37°, 45°, 50°, 55° y 60°C; enfriarlo inmediatamente en hielo a 4°C y centrifugarlo a 600 x g para sedimentar la proteína desnaturalizada. En el sobrenadante se determinó actividad de Fosfoglucomutasa, y de proteínas, y se compararon los resultados de actividad específica y actividad total para ver el avance de purificación.

En este experimento se encontró que la actividad específica aumentó con el incremento de temperatura hasta los 50°C, a partir de la cual comenzó a disminuir la actividad de la Fosfoglucomutasa.

Los resultados indican una purificación parcial en la que la Fosfoglucomutasa por ser una enzima resistente al calor conserva su actividad hasta un calentamiento de 50°C. El decremento en la actividad total indica desnaturalización de otras enzimas termolábiles como son las fosfatasa inespecíficas. En base a estos resultados se seleccionó un calentamiento de 45°C del extracto hepático a pH 5 para obtener un extracto más puro de la Fosfoglucomutasa. Como el extracto de tejido hepático se encuentra a pH 5 es necesario ajustar a pH 7.5 que es el óptimo de la reacción.

En el extracto de tejido tratado en las condiciones mencionadas se hicieron los experimentos correspondientes a cinética enzimática.

-Concentración de enzima.

Se prepararon extractos con distintas proporciones de hígado: 1.0%, 2.0%, 3.0%, 5.0%, 7.0% y 10.0% (equivalentes a 1, 2, 3, 5, 7 y 10 mg de tejido hepático en solución isotónica de NaCl respectivamente), se tomaron alícuotas de 0.1 ml y se determinó la actividad enzimática con $4 \mu\text{m}$ de glucosa-1-fosfato durante 5 minutos a 30°C y pH 7.5. los resultados se observan en la gráfica V.

La actividad enzimática aumentó en forma directamente proporcional a la cantidad de enzima eligiéndose 0.1 ml del extracto de tejido hepático al 5.0% (equivalente a 5 mg de tejido hepático) como una concentración adecuada para la determinación.

-Concentración de substrato.

Utilizando 0.1 ml de un extracto de hígado al 5.0% se determinó la actividad enzimática con cantidades crecientes de glucosa-1-fosfato: 1,2,4,6,10,14 y $18 \mu\text{m}$ a pH 7.5 y 30°C durante 10 minutos. Los resultados se observan en la gráfica VI.

La velocidad de reacción de la enzima aumenta con la concentración de substrato hasta $6 \mu\text{m}$ de glucosa-1-fosfato en donde la curva de actividad enzimática empieza a ser de orden cero. Debido a que la enzima es inhibida por altas concentraciones de substrato (glucosa-1-fosfato), se eligieron $6 \mu\text{m}$ de glucosa-1-fosfato para hacer las determinaciones enzimáticas.

Con los datos de la gráfica VI y utilizando la ecuación de Lineweaver Burk (73) se hizo el cálculo para determinar la constante

de Michaelis - Menten. Bajo las condiciones ya descritas la K_m fué de $2.63 \times 10^{-5}M$. El valor de K_m reportado por Ray (74) para músculo de conejo es de $6.3 \times 10^{-5}M$.

-Curva de pH.

En la gráfica VII se observan las variaciones de actividad correspondientes a distintos pHs: 6.5, 7.0, 7.2, 7.5, 7.7, 8.0. Para obtener estos valores de pH se utilizó solución amortiguadora de cacodilato de sodio de pH 6.5 a 7.2, y una solución amortiguadora de glicilglicina de pH 7.2 a 8.0, introduciéndose un punto de ensamble entre las dos soluciones amortiguadoras para evitar variaciones de distintas especies iónicas.

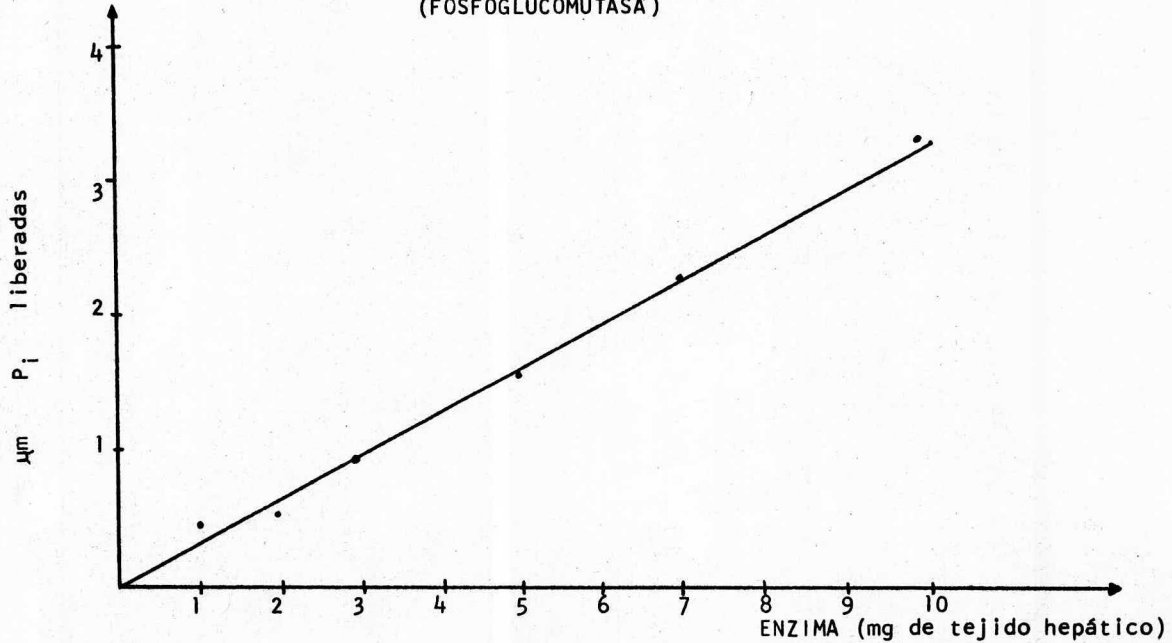
-Tiempo de incubación.

Con 0.1 ml de extracto de tejido hepático al 5.0%, 4 μm de glucosa-1-fosfato a pH 7.5 y 30°C, se determinó la actividad enzimática a distintos tiempos de reacción: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Los resultados se observan en la gráfica VII.

Aunque se presentan sólo los datos de 5 y 10 minutos, hubo experimentos en donde se pudo apreciar que la reacción es lineal con el tiempo hasta 15 minutos, por lo cual se eligió 10 minutos como tiempo de incubación para tener una velocidad de reacción que permita medir las variaciones introducidas por el diseño experimental probado.

GRAFICA V

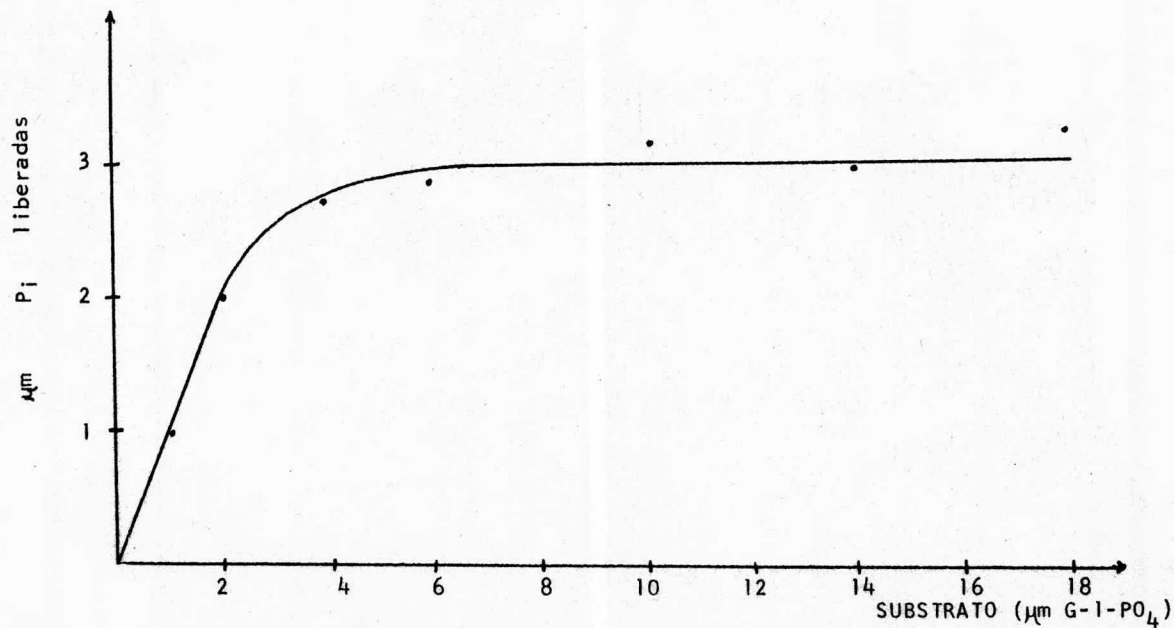
CURVA DE ENZIMA
(FOSFOGLUCOMUTASA)



- [E] 0.1 ml de extracto de tejido hepático a las concentraciones indicadas en solución isotónica de NaCl.
[S] 4 μm de glucosa-1-fosfato.
p H 7.5.
Tiempo de incubación 5' a 30° C.

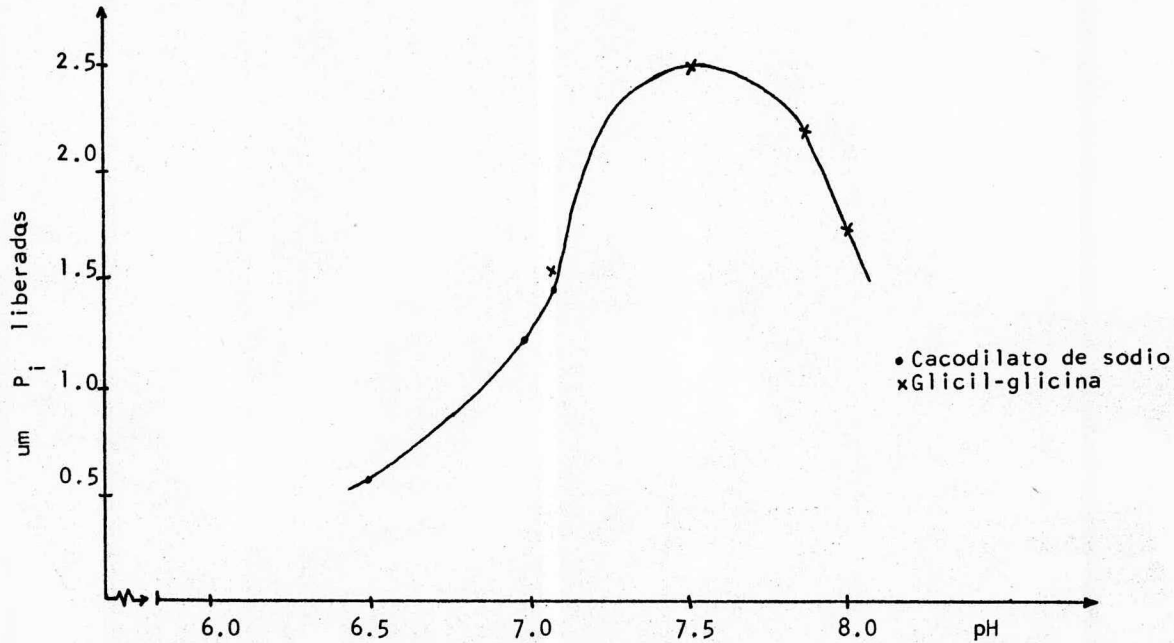
GRAFICA VI

CURVA DE SUBSTRATO
(FOSFOGLUCOMUTASA)



(E) 5 mg de tejido hepático (0.1 ml de extracto de tejido hepático al 5% en solución isotónica de NaCl).
pH 7.5.
Tiempo de incubación 10' a 30° C.

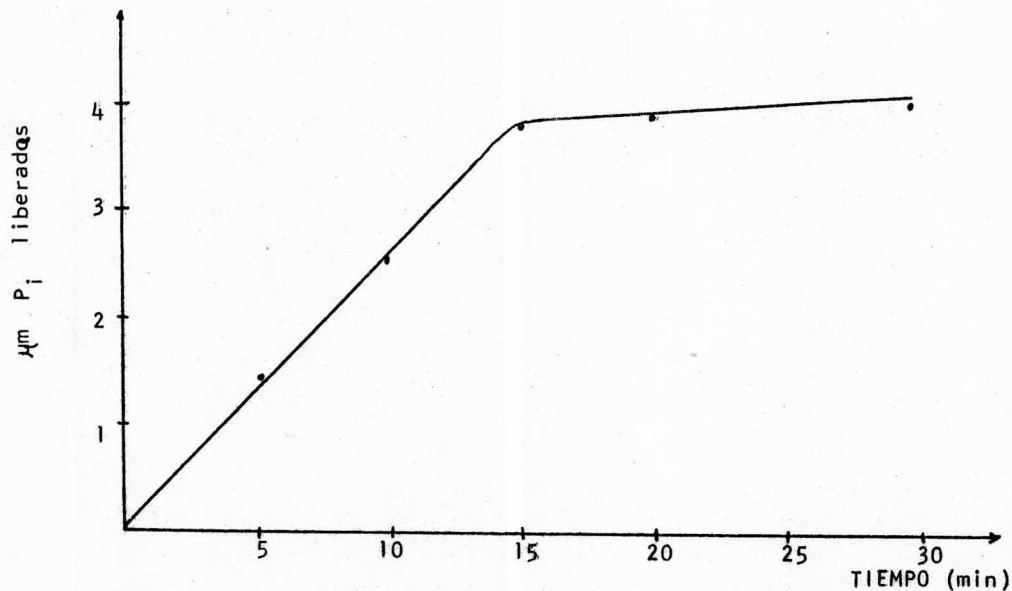
GRAFICA VII
CURVA DE pH
(FOSFOGLUCOMUTASA)



[E] 5 mg de tejido hepático (0.1 ml de extracto de tejido hepático al 5% en solución isotónica de NaCl).

[S] 4 μ m de glucosa-1-fosfato.
Tiempo de incubación 10' a 30° C.

GRAFICA VIII
TIEMPO DE INCUBACION
(FOSFOGLUCOMUTASA)



[E] 5 mg de tejido hepático (0.1 ml de extracto de tejido hepático al 5% en solución isotónica de NaCl).
[S] 4 μm de glucosa-1-fosfato.
pH 7.5, a 30° C.

De los resultados obtenidos de los parámetros estudiados se eligieron las siguientes condiciones de reacción para las determinaciones enzimáticas:

-Concentración de enzima: 0.1 ml del extracto de hígado al 5% pH 5 (lo que en la gráfica se expresa como 5 mg de tejido hepático), tratado previamente con un calentamiento a 45°C, enfriado a 4°C y centrifugado a 600 x g.

-Concentración de sustrato: 6 μ m de glucosa-1-fosfato.

-Tiempo de reacción: 10 minutos a 30°C.

-pH óptimo: 7.5. Debido a que el extracto de hígado estaba a pH 5 fué necesario en todos los casos ajustar el pH a 7.5 con solución amortiguadora de glicil-glicina. Se observó que con 0.1 ml de extracto pH 5 era necesario agregar 1 ml de la solución amortiguadora de glicil-glicina para obtener un pH final de 7.5.

La técnica definitiva para la determinación enzimática fué la siguiente:

1) Pipetear en un tubo de centrifuga graduado:

-0.2 ml (6 μ m) de glucosa-1-fosfato 0.03 M pH 7.5

-1 ml de buffer de glicil-glicina 0.0025 M pH 7.5

-0.1 ml de cisteina 0.1 M pH 7.5

2) Preincubar a 30°C en un baño de agua e iniciar la reacción por la adición de 0.1 ml del extracto de tejido hepático al 5% pH 5

3) Después de incubar por 10 minutos parar la reacción con 1 ml de H₂SO₄ 8 N.

4) Llevar el volumen a 5 ml con agua desionizada.

5) Poner los tubos a hervir en baño de agua durante 3 minutos para hidrolizar el remanente de glucosa-1-fosfato.

6) Centrifugar para sedimentar la proteína desnaturalizada a 600 x g.

7) Tomar alicuotas de 0.5 ml del sobrenadante para la determinación de fósforo inorgánico por el método ya descrito.

α -GLUCANO FOSFORILASA (E.C.2.4.1.1.)

-Concentración de enzima.

Utilizando 0.05 ml de extracto de tejido hepático con distintas proporciones de hígado: 1.0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0% y 12.5% (equivalentes a 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 mg de hígado es solución isotónica de NaCl respectivamente) se determinó actividad enzimática con 5 μ m de glucosa-1-fosfato, pH 6.1, durante 10 minutos a 37°C. Los resultados se observan en la gráfica IX.

De las concentraciones probadas se eligió 0.05 ml de un extracto de hígado al 5.0% equivalente a 5 mg de tejido hepático como la adecuada para la determinación.

-Concentración de sustrato.

Se determinaron las variaciones de actividad enzimática con cantidades crecientes de glucosa-1-fosfato: 1, 2, 3, 4 y 5 μ m y 0.05 ml de extracto de hígado al 5% se observó una saturación aparente de la enzima a partir de 3 μ m de glucosa-1-fosfato; eligiéndose 5 μ m para hacer la determinación enzimática.

Con los datos de la gráfica y utilizando el método de Lineweaver Burk (74). Se determinó la constante de Michaelis Menten para la α -glucano Fosforilasa que resultó ser de 2.2×10^{-6} M. la K_m

reportada por Brow (77) para la Fosforilasa "a" de músculo de conejo a pH 6.8 y 30°C y utilizando glucosa-1-fosfato como sustrato - fué de $5 \times 10^{-3}M$.

-Curva de pH.

Con variaciones en el pH de reacción de: 5.3, 5.7, 6.1, 6.5 y 6.8 y utilizando $5 \mu m$ de glucosa-1-fosfato se determinó la actividad de las α -glucano Fosforilasa a 37°C durante 10 minutos. (en este caso el ajuste del pH se hizo directamente en la solución que contenía el sustrato; glucosa-1-fosfato 0.1 M, glucógeno al 2%, AMP 0.03 M y NaF 0.2 M pH 6.1). Los resultados se observan en la gráfica XI.

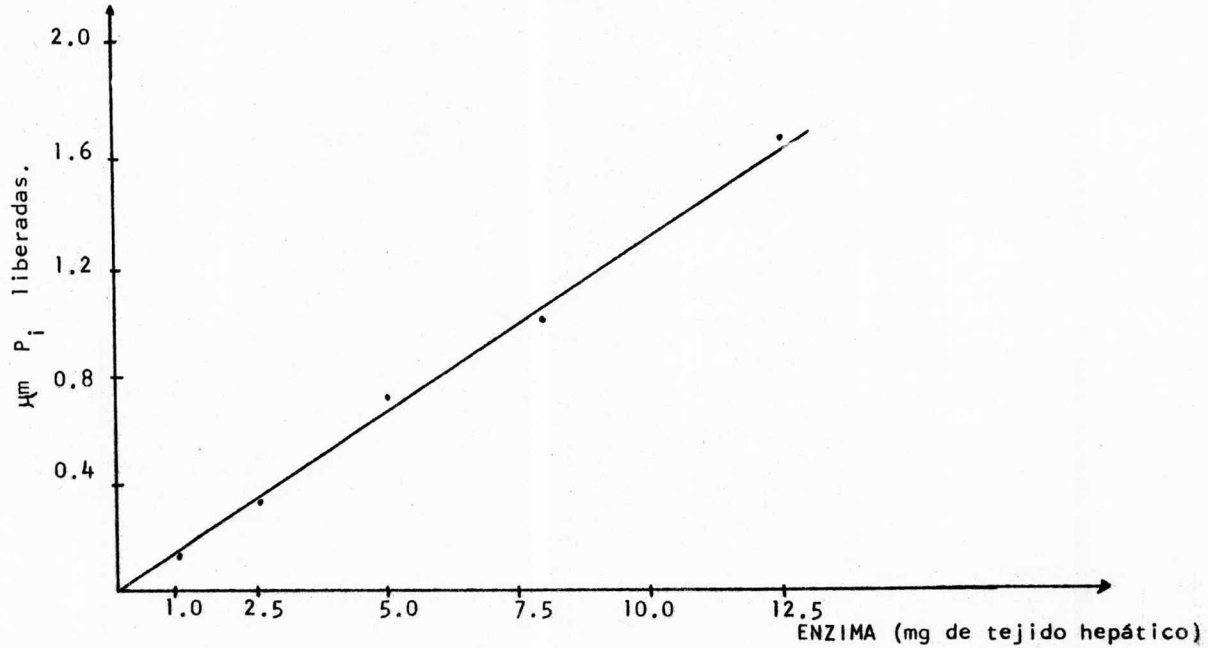
De los pH_s probados se eligió como pH óptimo de reacción 6.1.

-Efecto del tiempo de incubación.

Se determinó la actividad enzimática a distintos tiempos de reacción: 5; 10; 20; 30' y 40' con 0.05 ml de extracto de tejido hepático al 5%, $5 \mu m$ de glucosa-1-fosfato, a pH 6.1 y 37°C, los resultados se encuentran en la gráfica XII.

La actividad fué lineal con el tiempo hasta 20 minutos en donde se establece una meseta, debido probablemente a desnaturación de la enzima; por ello se eligió 10 minutos como tiempo de incubación.

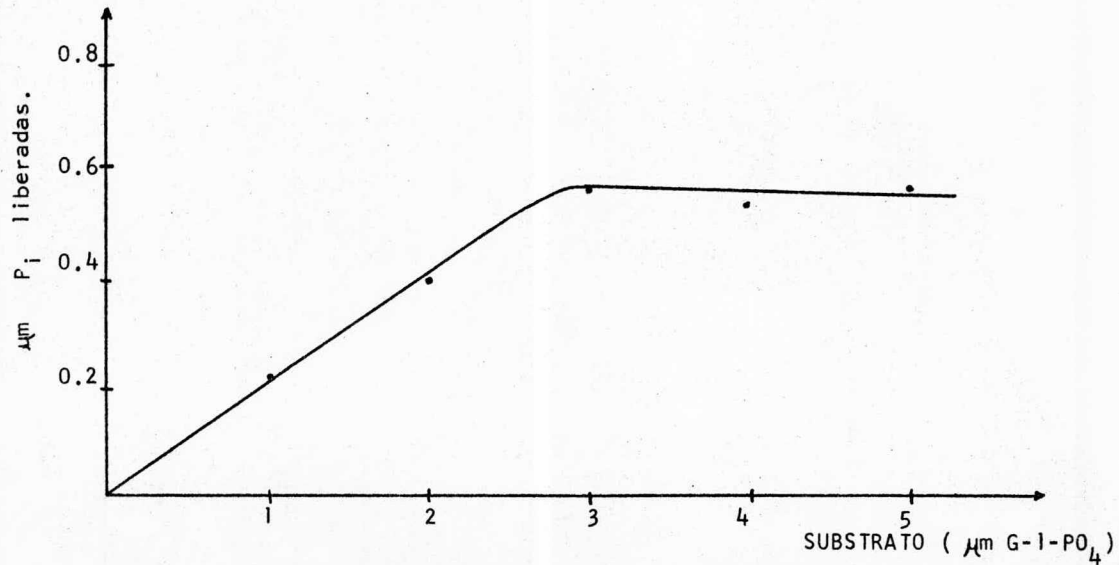
GRAFICA IX
CURVA DE ENZIMA
(α -GLUCANO FOSFORILASA)



- [E] 0.05 ml de extracto de tejido hepático en solución salina de NaCl a las concentraciones indicadas.
[S] 5 μm de glucosa-1-fosfato.
pH 6.1.
Tiempo de incubación 10' a 37° C.

GRAFICA X

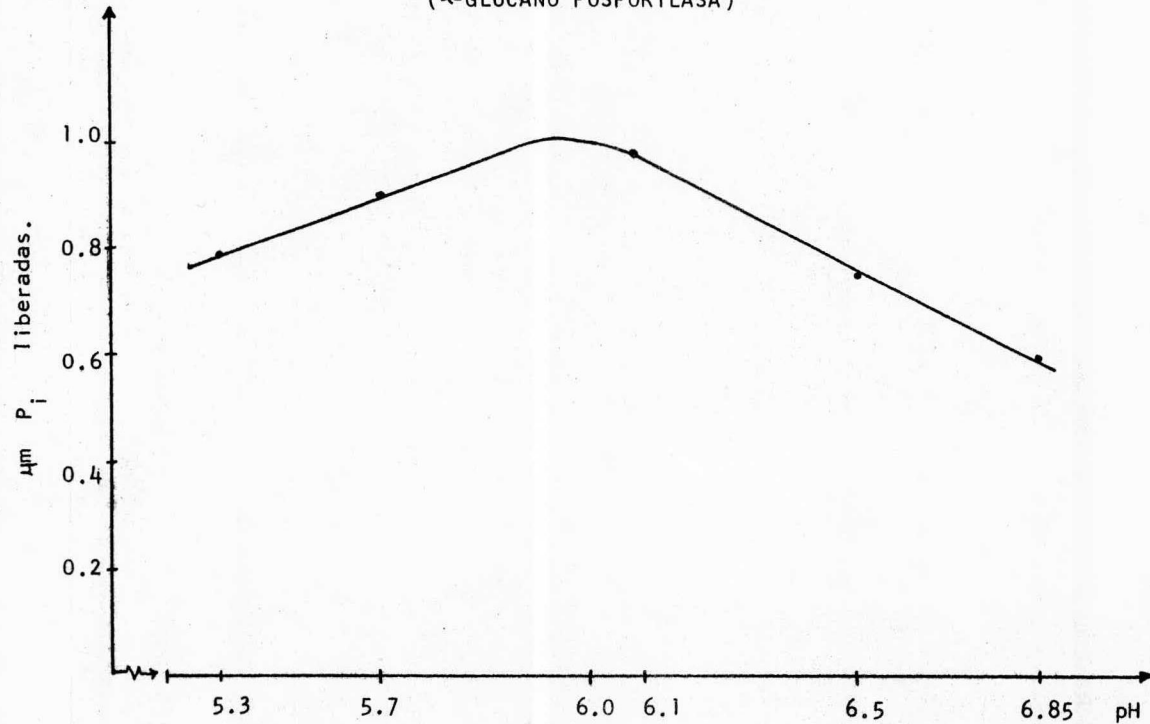
CURVA DE SUBSTRATO
(α -GLUCANO FOSFORILASA)



[E] 5 mg de tejido hepático (0.05 ml de extracto de tejido hepático al 5%
en solución isotónica de NaCl).
pH 6.1.
Tiempo de incubación 10 a 37° C.

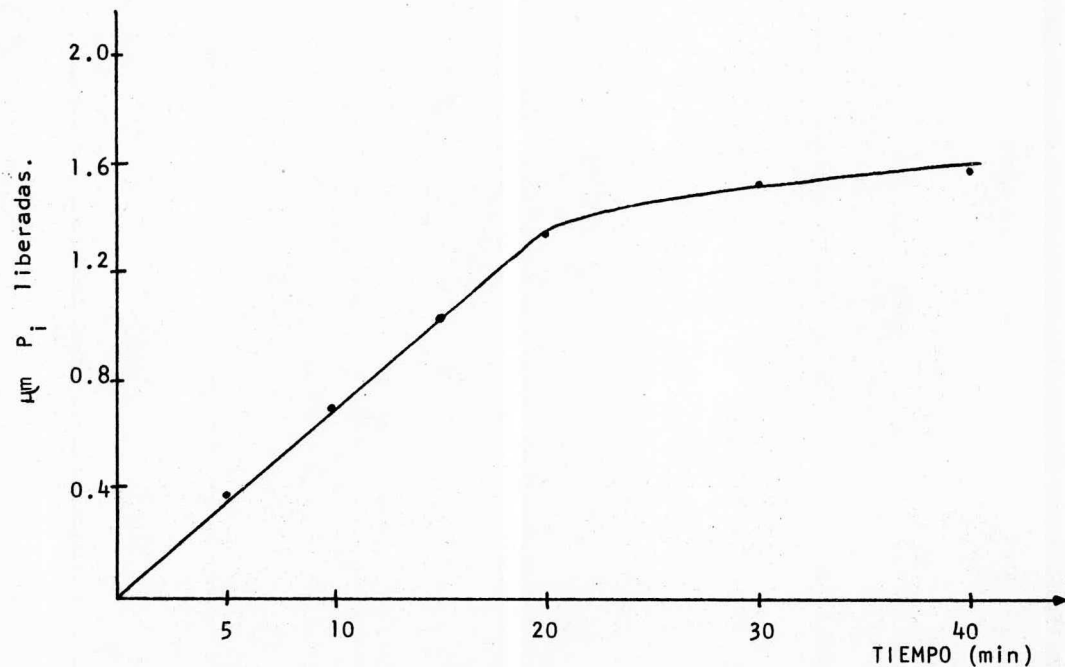
GRAFICA XI

CURVA DE pH
(α -GLUCANO FOSFORILASA)



(E) 5 mg de tejido hepático (0.05 ml de extracto de tejido hepático al 5%).
(S) 5 μm de glucosa-1-fosfato.
Tiempo de incubación, 10' a 37°C.

GRAFICA XII
TIEMPO DE INCUBACION
(α -GLUCANO FOSFORILASA)



(E) 5 mg de tejido hepático (0.05 ml de extracto de tejido hepático al 5%).
(S) 5 μm de glucosa-1-fosfato.
pH 6.1, a 37°C.

De los resultados obtenidos de los parámetros estudiados para la α -glucano Fosforilasa, se eligieron las siguientes condiciones de reacción para las determinaciones enzimáticas:

-Concentración de enzima: 0.05 ml de un extracto de tejido hepático al 5% (lo que en la gráfica se expresa como 5 mg de tejido hepático).

-Concentración de sustrato: 5 μ m de glucosa-1-fosfato.

-pH óptimo: 6.1.

-Tiempo de incubación: 10 minutos a 37°C.

La técnica definitiva para la determinación de actividad enzimática fué la siguiente:

1) Pipetear en un tubo de centrifuga graduado:

- 0.05 ml de la solución que contiene (glucosa-1-fosfato 0.1 M, glucógeno al 2%, AMP 0.03 M y NaF 0.2M pH 6.1)

2) Preincubar a 37°C durante algunos minutos e iniciar la reacción con la adición de 0.05 ml del extracto de hígado al 5%.

3) Después de 10 minutos parar la reacción con 0.5 ml de ácido tricloroacético 0.1 M helado.

4) Aforar a 10 ml y centrifugar a 600 x g.

5) Tomar alícuotas de 0.1 ml para determinar fósforo inorgánico por el método ya descrito.

EXPERIMENTO IV

En el experimento IV, diseñado para establecer las condiciones más adecuadas de ayuno antes del sacrificio se utilizaron 5 grupos de 3 ratas hembras de aproximadamente 60 g de peso, previamente alimentadas con purina "ad libitum" y se les sujetó respectivamente a 0, 1, 2, 3 y 18 horas de ayuno, después del cual se sacrificaron y se determinó el contenido hepático de glucógeno; asimismo se midió la actividad de las enzimas α -glucano Fosforilasa, Fosfoglucomutasa y Glucosa-6-fosfatasa en el hígado. Los resultados se presentan en el cuadro XVI.

Puede observarse que, en este experimento, la concentración de glucógeno hepático se mantuvo estable durante la primera hora de ayuno, descendió en forma importante en las siguientes horas como era de esperarse. Paralelamente hubo un aumento de Glucosa-6-fosfatasa durante la primera y segunda hora, después una caída en la tercera hora y, en la muestra de 18 horas de ayuno se observó un aumento importante. Estos datos no permiten asegurar si los resultados obtenidos a las tres horas reflejan un fenómeno real o un artificio técnico, pero muestra la similitud entre valores de 1 hora y cero horas de ayuno. La Fosforilasa mostró valores estables durante las dos primeras horas, luego una caída y de nuevo aumentó a las 18 horas. Estos resultados son congruentes entre sí y permiten concluir sobre la conveniencia de no llevar a cabo el procedimiento de ayuno antes del sacrificio.

CUADRO XVI

CONTENIDO DE GLUCÓGENO Y ACTIVIDAD DE
GLUCOSA-6-FOSFATASA Y α -GLUCANO FOSFORILASA EN EL
HIGADO DE RATAS SUJETAS A DISTINTOS PERIODOS DE
AYUNO.

Tiempo de ayuno. (horas).	Glucógeno g/100 g de hígado.	Glucosa-6-fosfatasa*	α Glucano * Fosforilasa.
Cero	3.55 \pm 0.350	11.60 \pm 1.003	12.8 \pm 3.55
1	3.67 \pm 0.463	10.68 \pm 1.045	13.4 \pm 4.53
2	2.43 \pm 0.297	19.12 \pm 5.170	13.2 \pm 1.08
3	1.58 \pm 0.255	13.49 \pm 0.020	5.8 \pm 2.66
18	0.075 \pm 0.049	24.99 \pm 6.470	10.7 \pm 1.73

*La actividad de las enzimas esta expresada en μ mPi/g de hígado/min.

EXPERIMENTO DE RECUPERACION NUTRICIA

Como ya se indicó anteriormente se formaron 4 grupos de 5 ratas hembras recién destetadas como sigue:

Grupo "A" o Experimental (ratas desnutridas y recuperadas).- Se alimentaron durante 12 días con la dieta de Maíz al 5% y tres días más con la dieta de recuperación de Caseína al 12.5%.

Grupo "B" o Testigo (ratas desnutridas no recuperadas).- Se alimentaron durante 12 días con una dieta de Maíz al 5%.

Grupo "C" o Testigo secundario I (ratas adecuadamente alimentadas durante 15 días).- Se alimentaron con una dieta de Caseína al 12.5% durante 15 días.

Grupo "D" o Testigo secundario II (ratas adecuadamente alimentadas durante 12 días).- Se alimentaron con una dieta de Caseína al 12.5% durante 12 días.

Una vez transcurridos los períodos señalados se sacrificaron los animales y se determinó el peso del hígado, la concentración hepática de glucógeno proteínas y humedad así como la actividad de la α -glucosa Fosforilasa, Fosfoglucomutasa y Glucosa-6-fosfatasa.

En el cuadro XVII se pueden ver el peso inicial, el peso final, el consumo de proteínas y la R.E.P. tanto durante los primeros doce días como de los 3 últimos días de cada grupo.

Puede apreciarse que los pesos iniciales, fueron homogéneos. El grupo "A" tuvo una pérdida de peso de casi 7 g durante los 12 días de desnutrición, pero en los tres días de recuperación tuvo un aumen-

to de 7.3 g; el consumo de proteínas "ad libitum" con la dieta de Maíz fué de sólo 1.76 g en 12 días aumentando a 2.27 g en sólo 3 días con la dieta de recuperación. Así la eficiencia Protéica durante el período de desnutrición fué negativo (-3.8) volviéndose positivo en una magnitud semejante en los tres días de recuperación. Puede verse también que el grupo "C", alimentado durante 15 días con Caseína al 12.5 %, tuvo un aumento de casi 20 g durante los primeros 12 días y de 5.5 g más en los tres últimos días; el consumo total de proteínas en el período completo fué de 10.5g y la Eficiencia proteica fué de 2.4, valor habitual para la Caseína, pero notablemente inferior al obtenido durante la recuperación por las ratas previamente desnutridas.

En el cuadro XVIII se presenta el peso del hígado y su contenido de glucógeno, proteínas y humedad. Puede observarse que las ratas alimentadas con Maíz (grupo "B") alcanzaron solamente 1.2 g de peso hepático en comparación con 2.32 g que alcanzaron las ratas alimentadas con Caseína al 12.5% durante 12 días; las ratas desnutridas y recuperadas alcanzaron casi 2 g de masa hepática.

Expresando el peso en relación al peso corporal es evidente que las ratas recuperadas de un período de desnutrición (grupo "A") alcanzan la relación más alta, lo que es equivalente a hepatomegalia.

En cuanto al contenido de glucógeno por 100 g de hígado, las ratas desnutridas tuvieron los valores más bajos mientras que las desnutridas y recuperadas tuvieron una concentración prácticamente del doble.

La concentración de proteínas por 100 g de hígado fué semejante en todos los grupos excepto en el alimentado con Caseína al 12.5% por 15 días que fué ligeramente más bajo. Similarmente el contenido de humedad por 100 g de hígado fué ligeramente más alto en los grupos "A" y "C" que estuvieron 15 días en experimentación, pero debido a la variabilidad de los resultados obtenidos las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En el cuadro XIX se muestra la actividad específica de la α -glucano Fosforilasa, Fosfoglucomutasa y glucosa-6-fosfatasa en el hígado de los diferentes grupos de animales. Puede observarse que los valores más altos de α -glucano Fosforilasa y glucosa-6-fosfatasa son los correspondientes al grupo de ratas desnutridas durante 12 días (no recuperadas) y que estos valores disminuyen en forma importante en el grupo de ratas desnutridas durante 12 días y recuperadas durante 3 días. Inversamente, los valores más bajos de Fosfoglucomutasa corresponden a las ratas desnutridas y los más altos a las ratas desnutridas y recuperadas.

En el cuadro XX se comparan estadísticamente los resultados obtenidos en los grupos "B" y "D" lo que permite ver el efecto de la desnutrición. Son notables las diferencias, tanto en cambio de peso como en consumo de proteínas y eficiencia protéica. Conviene comentar que el consumo de proteínas fué 3.5 veces menor con la dieta de Maíz pese a que la concentración protéica de la dieta de Caseína era solamente 2.5 veces mayor. Este consumo anormalmente inferior de proteínas se debe no solamente al exceso relativo de calorías en la dieta de Maíz sino muy probablemente, a anorexia debida a la baja calidad de la proteína, respuesta adaptativa que ha sido sugerida por Harper (78).

El peso del hígado por 100 g de peso corporal fué semejante en ambos grupos mostrando ausencia de hepatomegalia. La concentración de glucógeno por 100 g de hígado fué mucho mayor en las ratas alimentadas con Caseína, fenómeno para el cual no se tiene una explicación adecuada. La concentración de proteínas y humedad por 100 g de hígado fué muy similar en ambos grupos.

Aunque el grupo alimentado con la dieta a base de proteína de Maíz al 5% mostró una actividad específica de α -glucan Fosforilasa y glucosa-6-fosfatasa ligeramente mayor y una actividad específica de Fosfoglucomutasa menor que en el grupo bien alimentado, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

De estos datos puede concluirse, que la desnutrición no produjo hepatomegalia ni cambios en el contenido de proteínas y humedad por 100 g de hígado y que no hubo cambios significativos en el patrón de las enzimas estudiadas. No obstante la falta de significancia estadística de los datos de actividad enzimática, los datos son congruentes con una mayor glucogenolisis en el grupo desnutrido que se ven confirmados por un menor contenido hepático de glucógeno.

En el cuadro XXI se comparan los principales resultados obtenidos en los grupos "A" y "B" y se muestra el valor estadístico de las diferencias. Al compararse estos dos grupos se observan los cambios debidos a la recuperación. Puede verse que ambos grupos perdieron peso durante los doce días de desnutrición y que su consumo de proteínas fué sumamente bajo obteniéndose relaciones de eficiencia protéica con signo negativo; en estos tres índices no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

Durante los tres días de recuperación del grupo "A" se logró un aumento promedio de más de 7 gramos en el peso corporal y una ingestión de proteínas correspondientemente elevada y que, en sólo tres días, fué superior en un 30% a la obtenida en los 12 días previos. La Relación de Eficiencia Protéica que había sido de -3.8 en los primeros 12 días, cambió a +3.8 en los 3 días de recuperación. Cabe notar que este valor de Eficiencia Protéica fué el más alto encontrado en todos los grupos, confirmando el hecho ya conocido de que el organismo desnutrido es capaz de una mayor eficiencia de aprovechamiento de una dieta adecuada que los organismos normales.

El peso del hígado por 100 g de peso corporal aumentó en forma importante durante la recuperación ($p < 0.005$), es decir, que hubo franca hepatomegalia. Esto revela que fué posible, en las condiciones de este experimento, reproducir el fenómeno de hepatomegalia que se encuentra en la recuperación de los niños desnutridos. La concentración de glucógeno por 100 g de hígado fué dos veces mayor en el grupo recuperado ($p < 0.005$) lo que permite establecer un paralelismo entre la acumulación de glucógeno y la hepatomegalia y permite confirmar la hipótesis de que durante la recuperación existe dicha acumulación.

La concentración de Proteínas y Humedad en 100 g de hígado fué estadísticamente semejante en ambos grupos.

La actividad específica en el hígado de la α -glucamFosforilasa y Glucosa-6-fosfatasa fué significativamente menor en las ratas recuperadas mientras que la actividad específica de la Fosfoglucomutasa fué significativamente mayor en las ratas recuperadas. Este patrón es el esperado en el caso de la acumulación hepática de glucógeno y confirma la hipótesis del experimento.

Por último en el cuadro XXII se comparan los grupos "A" y "C" es decir el grupo de ratas recuperadas de desnutrición y el de ratas alimentadas adecuadamente durante 15 días.

Puede verse que durante los primeros 12 días las ratas bien alimentadas aumentaron 19 g mientras que las alimentadas con Maíz perdieron 7 g de peso y que el consumo de proteínas fué de casi 8 g en el grupo bien nutrido contra menos de 2 g en el alimentado con la dieta de Maíz.

Durante los tres días de recuperación las ratas desnutridas subieron 7.3 g de peso mientras que las ratas bien nutridas solamente 5.5g. Es notable la diferencia entre la R.E.P. alcanzada de las ratas en recuperación y la que muestran las ratas alimentadas con Caseína, lo cual indica la eficiencia mucho mayor de utilización de la proteína de la dieta en las ratas previamente desnutridas y que ya fué comentada.

El peso del hígado por 100 g de peso corporal fué significativamente mayor en las ratas recuperadas confirmando la hepatomegalia, no sólo en relación con las ratas desnutridas sino también en relación con las ratas bien alimentadas. Aun cuando la concentración de glucógeno por 100 g de hígado fué mayor en el grupo recuperado, con respecto al grupo bien nutrido (caseína 15% durante 15 días) las diferencias no son estadísticamente significativas debido a la variabilidad del fenómeno. La concentración de proteínas por 100 g de hígado fué significativamente mayor en el grupo recuperado; no se tiene una clara explicación de las razones de este hallazgo pero cabe suponer que el valor para el grupo bien alimentado no es correcto ya que, si se consideran los otros dos grupos, se puede ver que es inferior. La concentración de humedad por 100 g de hígado fué muy similar en ambos grupos.

La actividad específica de las 3 enzimas fué estadísticamente similar en ambos grupos, lo cual significa que el patrón enzimático en las ratas recuperadas no es realmente anormal sino que se normaliza después de un patrón anormal durante la desnutrición

CÁMBIOS EN EL PESO CORPORAL, CONSUMO DE PROTEÍNAS Y RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA EN GRUPOS DE RATAS BLANCAS SUJETAS A CUATRO DIFERENTES ESQUEMAS DE ALIMENTACION (PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR).

Grupos de ratas según el esquema de alimentación (1)	Peso Corporal Inicial ⁽²⁾ (g)	Peso Corporal Final ⁽²⁾ (g)	Cambio de peso Corporal ⁽²⁾ (g)	Consump de Proteínas ⁽²⁾ (g)	R.E.P. Durante los 12 días iniciales.	R.E.P. Durante los 3 días finales.
A.-Ratas de ^g nutridas y re ^g cuperadas.	33.4 ± 2.57 26.6 ± 2.05	26.6 ± 2.05 33.9 ± 2.08	-6.8 ± 1.66 7.3 ± 2.58	1.76 ± 0.38 2.27 ± 0.74	-3.84 ± 0.44	3.18 ± 0.46
B.-Ratas de ^g nutridas no recuperadas.	32.2 ± 2.92	28.5 ± 3.36	-4.7 ± 2.11	1.90 ± 0.26	-2.50 ± 1.27	
C.-Ratas a- ^g decuadamente alimentadas (15 días)	33.4 ± 2.41 52.4 ± 7.53	52.4 ± 7.53 57.9 ± 8.87	19.0 ± 5.41 5.5 ± 1.81	7.87 ± 1.47 2.65 ± 0.92	2.41 ± 0.33	1.91 ± 0.17
D.-Ratas a- ^g decuadamente alimentadas (12 días)	32.2 ± 2.92	48.5 ± 5.72	15.1 ± 5.98	6.78 ± 1.85	2.27 ± 0.67	

1.- Para mayores detalles sobre los esquemas de alimentación consultese el capítulo de Diseño Experimental.

2.- Para los grupos "A" y "C" se dan dos resultados, arriba los correspondientes a los primeros 12 días y abajo los correspondientes a los 3 últimos días del experimento.

CUADRO XVIII

PESO DEL HIGADO Y CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO, PROTEINAS Y HUMEDAD EN GRUPOS DE RATAS SUJETAS A CUATRO DIFERENTES ESQUEMAS DE ALIMENTACION (PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR).

Grupos de ratas según el esquema de alimentación (1)	Peso de hígado (g)	Peso de hígado /100g de peso corporal.	Glucógeno hepático g/100 hígado.	Glucógeno hepático g/100g de Peso corp.	Proteínas hepáticas g/100g de hígado.	Proteínas hepáticas g/100g de Peso corp.	Humedad hepática g/100g de hígado.	Humedad hepática g/100g de Peso corp.
A.-Ratas de <u>g</u> nutridas y <u>re</u> uperadas.	1.93±0.096	5.74±0.259	8.35±1.17	0.486±0.091	14.74±1.19	0.841±0.055	71.28±5.65	4.08±0.36
B.-Ratas des- <u>nutridas no</u> recuperadas.	1.21±0.125	4.28±0.378	4.06±0.72	0.169±0.029	14.24±2.02	0.597±0.096	68.61±1.36	2.96±0.29
C.-Ratas ade- <u>cuadamente a-</u> limentadas (15 días).	2.93±0.482	5.07±0.281	6.78±1.56	0.331±0.075	12.82±1.65	0.636±0.065	71.38±1.76	3.62±0.16
D.-Ratas ade- <u>cuadamente a-</u> limentadas (12 días).	2.32±0.468	4.76±0.733	7.03±0.88	0.351±0.085	14.84±1.72	0.709±0.153	68.72±0.95	3.27±0.51

1.- Para mayores detalles sobre los esquemas de alimentación consultese el capítulo de Diseño Experimental.

CUADRO XIX

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS ENZIMAS α -GLUCANO FOSFORILASA
 FOSFOGLUCOMUTASA Y GLUCOSA-6-FOSFATASA EN EL HIGADO DE GRUPOS DE RA-
 TAS SUJETAS A CUATRO DIFERENTES ESQUEMAS DE ALIMENTACION (PROMEDIO
 Y DESVIACION ESTANDAR).

Grupos de ratas según el esquema de alimentación (1)	Fosforilasa μ m de Pi/g hígado / min / g de proteína.	Fosfoglucomutasa μ m de Pi/g hígado / min / g de proteína.	Glucosa-6-fosfatasa μ m de Pi / g de hígado / min / g de proteína.
A.- Ratas degnutridas y recuperadas.	138.17 \pm 23.20	1245.6 \pm 209.91	91.99 \pm 9.43
B.-Ratas desnutridas no recuperadas	168.00 \pm 12.79	718.0 \pm 291.30	118.46 \pm 22.28
C.- Ratas adecuadamente alimentadas. (15 días)	145.68 \pm 24.43	985.2 \pm 218.00	93.88 \pm 9.25
D.-Ratas adecuadamente alimentadas (12 días)	153.63 \pm 50.70	930.8 \pm 209.70	105.34 \pm 5.34

1.- Para mayores detalles sobre los esquemas de alimentación consúltase el capítulo de Diseño Experimental.

CUADRO XI

EFEECTO DE LA DESNUTRICION EN EL PESO CORPORAL, CONSUMO PROTEICO, RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA, PESO DEL HIGADO, CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO, PROTEINAS Y HUMEDAD, Y ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS ENZIMAS α -GLUCANO FOSFORILASA, FOSFOGLUCOMUTASA Y GLUCOSA-6-FOSFATASA EN EL HIGADO DE RATAS. COMPARACION ESTADISTICA DE UN GRUPO DE RATAS BIEN NUTRIDAS Y UNO DE RATAS MAL NUTRIDAS.*

Esquema de alimentacion.	Cambio de peso. (g)	Consumo de proteina (g)	R.E.P. 12 días	Peso hígado/100 g de peso corporal.	Glucógeno hepático. g/100 g de hígado.	Proteínas hepáticas g/100 g de hígado	Humedad hepática g/100 g de hígado	μ m Pi / g de hígado / min. / g de proteína.		
								Fosforilasa	Fosfoglucomutasa	Glucosa-6-fosfatasa.
^{mp} Maíz 5% 12 días.	-4.74±2.11	1.90±0.26	-2.50±1.27	4.28±0.378	4.06±0.72	14.24±2.02	68.61±1.36	168.5±12.79	718.0±291.3	118.46±22.28
^{mp} Caseína 12.5% 12 días.	15.11±5.98	6.78±1.85	6.78±1.85	4.76±0.733	7.03±0.88	14.84±1.72	68.72±0.95	153.6±50.70	930.8±209.7	105.34±5.34
Valor de ^{nt} de Student.	6.23	5.08	6.72	1.15	4.49	0.413	0.111	0.56	1.18	1.14
P	<0.005	<0.005	<0.005	NS	<0.005	NS	NS	NS	NS	NS

* Los grupos están formados por 10 ratas cada uno

CUADRO XXI

EFFECTO DE LA RECUPERACION EN EL PESO CORPORAL, CONSUMO PROTEICO, RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA, PESO DEL HIGADO, CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO, PROTEINAS Y HUMEDAD, Y ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS ENZIMAS α -GLUCANO FOSFORILASA, FOSFOGLUCOMUTASA Y GLUCOSA-6-FOSFATASA EN EL HIGADO DE RATAS. COMPARACION ESTADISTICA DE UN GRUPO DE RATAS MAL NUTRIDAS Y UNO DE RATAS EN RECUPERACION NUTRICIA.

Esquema de alimentación.	Cambio de peso ¹ . (g)	Consumo de proteína ¹ . (g)	R.E.P. 12 días	R.E.P. 3 días más.	Peso hígado/ 100 g de peso corporal.	Glucógeno hepático g/100 g hígado.	Proteínas hepáticas g/100 g de hígado.	Humedad hepáticas g/100 g de hígado	µm FI/ g de hígado/ min/ g de proteína		
									Fosforilasa	Fosfoglucomutasa	Glucosa-6-fosfatasa
"B" Maíz 5% 12 días	-4.7±2.11	1.90±0.26	-2.57±1.27		4.28±0.378	4.06±0.72	14.24±2.02	68.61±1.36	168.5±12.79	718.0±291.3	118.46±22.28
"A" Maíz 5%, 12 días; Caseína 12.5%, 3 días	-6.8±1.66 7.3±2.58	1.76±0.38 2.27±0.74	-3.84±0.44	3.18±0.46	5.74±0.259	8.35±1.17	14.74±1.19	71.28±5.65	138.17±23.2	1245.6±209.9	91.99±9.43
Valor de "t" de Student	1.56	0.595	1.85		6.36	4.61	0.038	0.91	1.86	2.93	2.18
p	N S	N S	N S		< 0.005	< 0.005	N S	N S	= 0.05	< 0.01	< 0.05

1.- Para el grupo "A" se dan dos valores para cambio de peso y consumo de proteínas, arriba los correspondientes a los primeros 12 días y abajo los correspondientes a los últimos 3 días del experimento.

CUADRO XXII

COMPARACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS (PESO CORPORAL, CONSUMO PROTEICO, RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA, PESO DEL HIGADO, CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO, PROTEINAS, Y HUMEDAD, Y ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS ENZIMAS α -GLUCANO FOSFORILASA, FOSFOGLUCOMUTASA Y GLUCOSA-6-FOSFATASA EN HIGADO) OBTENIDOS EN UN GRUPO DE RATAS BIEN NUTRIDAS Y OTRO DE MAL NUTRIDAS EN RECUPERACION NUTRICIA.

Esquema de alimentación.	Cambio de peso ¹ (g)	Consumo de proteína ¹ . (g)	R.E.P. 12 días	R.E.P. 3 días más.	Peso hígado/100 g de peso corporal.	Glucógeno hepático g/100 g hígado	Proteínas hepáticas g/100 g de hígado.	Humedad hepática g/100 g de hígado	En Fl / g de hígado / min / g de proteína		
									Fosforilasa	Fosfoglucomutasa	Glucosa-6-fosfatasa.
"A" Maíz 5%, 12 días; Caseína 12.5%, 3 días.	-6.8±1.66 7.3±2.58	1.76±0.38 2.27±0.74	-3.84±0.44	3.18±0.46	5.74±0.26	8.35±1.17	14.74±1.19	71.28±5.65	138.17±23.20	1245.6±209.9	91.99±9.43
"B" Caseína 12.5% 15 días.	19.0±5.41 5.5±1.81	7.87±1.47 2.65±0.92	2.41±0.33	1.91±0.17	5.07±0.28	6.78±1.56	12.82±1.65	71.38±1.76	145.68±24.43	985.2±218.0	93.88±9.25
Valor de "t"	9.11 1.14	8.025 0.615	22.58	5.77	3.54	1.37	1.93	0.0317	0.370	1.71	0.285
P	<0.005 N S	<0.005 N S	<0.005	<0.005	<0.005	N S	<0.05	N S	N S	N S	N S

1.- Para el grupo "A" se dan dos valores para cambio de peso y consumo de proteínas, arriba los correspondientes a los primeros 12 días y abajo los correspondientes a los últimos 3 días del experimento.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

1.- Se encontró que, en las condiciones de estos experimentos, 12 días de consumo de una dieta a base de proteínas de Maíz al 5% produjo un grado importante de desnutrición.

2.- Bajo las condiciones señaladas anteriormente, el consumo durante 3 días de una dieta a base de Caseína al 12.5% por ratas previamente desnutridas provoca un aumento en la concentración hepática de glucógeno y cierto grado de hepatomegalia; la prolongación del período de recuperación no provoca mayor acumulación de glucógeno e inclusive el contenido de glucogeno tiende a disminuir.

3.- Se montaron las técnicas para medir la actividad de las enzimas α -glucano Fosforilasa, Glucosa-6-fosfatasa y Fosfoglucomutasa en el hígado de la rata, obteniéndose una sensibilidad suficiente para detectar cambios debidos a variaciones en la dieta y en el estado nutricional de los animales. Algunos pasos de dicha técnica fueron modificados de acuerdo a las condiciones de este estudio, para ello; fue necesario realizar el punto 4.

4.- Se estudiaron algunos aspectos de la cinética de estas enzimas con el objeto de establecer las condiciones óptimas de reacción en cada caso, estos fueron: concentración de enzima, concentración de sustrato, pH y tiempo de incubación.

5.- Se encontró que para medir adecuadamente las variaciones que se buscaba determinar en este estudio, no es conveniente realizar las determinaciones después de un período de ayuno.

6.- Se comprobó que la recuperación de ratas desnutridas, según el esquema establecido a través de este estudio, produce una impor

tante hepatomegalia.

7.- Se comprobó que dicha hepatomegalia coincide con una acumulación importante de glucógeno en el hígado.

8.- Se comprobó que esta acumulación de glucógeno va acompañada de una disminución en la actividad de α -glucanoFosforilasa y Glucosa-6-fosfatasa y de un aumento en la actividad de la Fosfoglucomutasa.

9.- En base a las conclusiones anotadas se considera que la hipótesis de este trabajo quedó probada.

B I B L I O G R A F I A .

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Lowenberg M., Wilson E., Todhunter E., Freeney M., Savage J. Los Alimentos y el Hombre.- Limusa Wiley, pp 191-244. México 1970
- 2.- Pérez Hidalgo C., Chávez A., Madrigal H.- Recopilación Sobre el Consumo de Nutrientes en Diferentes Zonas de México. 1) Consumo Calórico Protéico.- Separata de Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 20 (4): diciembre 1970.
- 3.- Balam G., Chávez A., Fajardo J.- Las Zonas del País con Mayores Problemas Nutricionales.- Sobretiro de la Revista Mexicana de Sociología, 19 (1): mayo 1967.
- 4.- Ramos Galván R., Mariscal C., Viniegra A., Pérez Ortiz B.- Desnutrición en el Niño.- Hospital Infantil de México, México 1969.
- 5.- Bourges H. - Nosología Básica Integral.- Vol. II Mendez Oteo, pp. 644. México 1971.
- 6.- Zubirán S., Chávez A. -Algunos Aspectos Sobre la Situación Nutricional en México.- Bol. of San. Pan. 54: pp 101 (1963)
- 7.- Wohl M.G., Goodhart R.S. - Modern Nutrition in Health and Disease, 4ª edición Lea & Febiger. Filadelfia 1968.
- 8.- Zubirán S., Martínez P.D. y Chávez A. - Características de la Desnutrición en México.- Rev. Inv. Clín. Méx., 14:pp359, (1962)
- 9.- Martínez Miranda C. Chávez A., Bourges H.- La Lactancia en el Medio Rural. Estudios Cuantitativos Sobre Producción y Valor Nutritivo de la Leche Humana.- Monografía 26; I.N.N., División de Nutrición, México 1975.
- 10.- Ramírez J. Chávez A.- La Disponibilidad de Alimentos en el Último Cuarto de Siglo.- Comercio Exterior 18: pp 1976 (1968).
- 11.- Ramírez J., Chávez A.- La Concentración de Alimentos en México en el D.F.- Rev. Comer. Ext. 21: pp 42 (1971).
- 12.- Zubirán S., Martínez P.D., Ramos Galván R., Chávez A., Ramírez J., Pérez Hidalgo, C., Arroyo P., Yashine T., Díez C., y Bourges H.- Programa Nacional de Nutrición, Situación Actual y Soluciones. Anales I, Convención Nacional de Salud. México D.F., julio 1973.

- 13.- Waterlow J.C. - Observaciones Sobre el Mecanismo de Adaptación a una Ingesta Baja de Proteínas.- Arch. Lat. de Nutrición, 16 (2) pp 175-200 diciembre (1968).
- 14.- Patrick R.S. y Mackay A.M. -Experimental Protein Energy Malnutrition in Baby Baboons. Liver Pathology.- Br. J. Nutr. 30 (20): pp 171 (1973).
- 15.- Gaetan S., Mengheru E., y Spandoni M.A. - Free and Membrane Bound Rat Liver Ribosomes, After Long Term Protein Starvation.- Nutr. Rep. Internac., 6 (6): pp 313 diciembre (1972).
- 16.- Soberón G. y Snachez E. -Changes in Effective Enzyme Concentration in the Growing Rat Liver. Effects of Fasting Followed by Repletión.- J. Biol. Chem. 236: pp 1602 diciembre (1961).
- 17.- Cravioto J. - Ciertos Aspectos Del Metabolismo de los Lípidos en Niños Crónicamente Desnutridos.- Bol. Med. Hosp. Inf. 15: pp 806 (1958).
- 18.- Milner R.G.D.- Insuline Secretion in Human Protein - Calorie Deficiency.- Proc. Nutr. Soc. 31: pp 219 (1972).
- 19.- Alleyne G.A., Trust P.M., Flores H., Robinson H. - Glucose Tolerance and Insuline Sensivity in Malnourished Children.- Br.J. of Nutr., 27: pp 585 (1972).
- 20.- Clark A.J., Barran M.C. - Plasma Corticosterone Levels and Hepatic Glicogen Metabolism in Young and Old Rats Fed Diets devots of an Essential Aminoacid.- J. of Nutric. 102 (11): pp 1407 (1972).
- 21.- Zubirán S., Chávez A., Bonfil G., Aguirre G., Cravioto J., de la Vega J.- La Desnutrición del Mexicano.- Colección Testimonios del Fondo (4), 1^a edición Fondo de Cultura Económica.- México D.F., 1974.
- 22.- Octavo Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Nutrición.- Ginebra Suiza 9-18 Nov. 1970.- Ed. FAO/OMS, pp 54. Italia 1972.
- 23.- Aceves S. Dionisio.- Investigación Interamericana de Mortalidad en la Niñes. Resultados Seleccionados del Proyecto Realizado en Monterrey, N.L., México.- Bol. of San. Pan. 79 (6):pp 845 (1976)

- 24.- Proceedings of the Eastern African Conference on Nutrition and Child Feedings Nairobi Kenya, 19-23 pp 182 mayo. 1969.
- 25.- Gomez F., Ramos Galván R. y Cravioto J. - Estudios Sobre el Niño Desnutrido VIII "El Síndrome de Recuperación Nutricional".- Bol. Méd. Hosp. Infant. (Méx.) 8: pp 503 (1951).
- 26.- Ramos Galván R. - La Desnutrición Infantil en México; sus Aspectos Estadísticos, Clínico, Dietético y Social.- Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.) 5: pp 804 (1948).
- 27.- Ramos Galván R. y García Alonso H. - El Síndrome de Recuperación Nutricional en Niños con Desnutrición Crónica de Tercer Grado, Sin Edema Clínicamente Demostrable, ni Lesiones Dérmicas de Tipo Pelagroso.- Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.) 15: pp 965 (1958).
- 28.- J.C. Waterlow.- Protein Malnutrition, Proceedings of a Conference in Jamaica (1953).- University Press, Cambridge (1955).
- 29.- Pérez Ortíz B. y Flores Rico E. - Modificaciones de Glucógeno Hepático Durante la Recuperación Nutricional de las Ratas.- Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.) 24: pp 67 (1967).
- 30.- Ramírez M., Soberón G., Rojas E., Jinich H. - Hígado y Vías Biliares.- U.N. A.M. e I.N.N., Ciudad Universitaria, pp 18-44. México (1968)
- 31.- Hussay B.A.- Fisiología Humana 4ª edición.- El Ateneo México 1972 pp 504.
- 32.- Weber G. - Advances in Enzyme Regulations.- Symposium Publications Division Vol. 1.- Pergam Press, pp 1-35. Oxford (1963).
- 33.- Stanbury J.B., Wingaarden J.B., Fredrickson D.S. - The Metabolica Basis of Inherited Disease.- Mc. Graw Hill Book Co. Inc. pp 147 New York (1960).
- 34.- Ball Erick G.- Energy Metabolism. Energy Mobilization and Glucogenesis. cap. VIII.- Addison-Wesley Publishing Co., Advanced Book Program. pp 61. London (1973).
- 35.- Stanbury J.B. Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S. - The Metabolica Basis of Inherited Disease.- Mc. Graw Hill Co. pp 149-173 (1972).

- 36.- Weber G., Harpur H.E. - Liver Enzymes in Glycogen Storage Disease. *Metabolism* 9: pp 880 (1960)
- 37.- Cantarow and Schtepartz.- *Biochemistry*.- W.B. Saunders Company Philadelphia and London pp 386 (1954).
- 38.- Szepesi B., Bernadier C.- Time Course of the Starve-Refeed Response in Rats, Possible Role of Insuline. *J. Nutr.* 101, (11): pp 1563 (1971).
- 39.- Garfield G., Duncan M.D.- *Diseases of Metabolism*.- Saunders Co, pp 191-232. Filadelfia (1964).
- 40.- Rafelson M.E. Jr, Ph. D.; Binkley S.B., Ph. D. - *Basic Biochemistry*.- Mc. Millan Co, New York 1965.
- 41.- Howard M., Spiro M.D. - *Clinical Gastroenterology*.- Mac. Millan Co., pp 932-951. E.U. (1970).
- 42.- Sleisenger M.H., Fortran J.H., M.D. - *Gastrointestinal Disease*.- Saunders Co. 1973.
- 43.- Guía de Educación Nutricional, Unidades Educativas para Uso Práctico en México.- I.N.N., División de Nutrición, Departamento de Educación Nutricional, Publicación L-19, Unidad V, pp 46, (1974)
- 44.- Pérez N., Clarck-turry L., Rabajille E. y Niemeyer H. - Regulation of Rat Liver Enzymes by Natural Components of the Diets.- *J. Biol. Chem.* 239 (8); pp 2420 (1964).
- 45.- Burch H., Lowey O., Kuhlman A., Skerjance D., Diamant E., Lowey R. y Von Dippe P.- Changes in Patterns of Enzymes of Carbohydrate Metabolism in Developing Rat Liver.- *J. Biol. Chem.* 238 (9): pp 2267 (1963).
- 46.- Herschel Sidransky, D.S. Wagle, Bongiorno M. y Verney E. - Chemical of Acute Aminoacid Deficiencies.- *J. Nutr.* 100: pp 678 (1970)
- 47.- Niemeyer H., González C., Rozzi R.- The Influence of Diet on Liver Phosphorilase.- *J. Biol. Chem.* 236 (3) pp 610 (1970).
- 48.- Camus J., Vandermeers M.C., Wondon C. Cristopher J.-Activite de Treize Enzymes du Metabolism Intermediaire dans la Foie du Jeune Rat qui Recupere d'une Malnutrition Protidique.- *Europ. J. Biochem.* 11: pp 225-233 (1969).

- 49.- Heard R.C., Frangi S.M., Wright P.M. - Biochemical Characteristics of Different Forms of Protein-Energy Malnutrition in Rats. The Proc. of the Nutr. Soc. 32 (1):47 A (1973).
- 50.- Bruno R. - Blood Sugar and Liver Glucose-6-phosphatase, Phosphoglucomutase and Phosphorylase in Adult Sheep After Fasting for 10 Days.- Bull. Soc. Ital. Biol. Speer 45: pp 1151 (1969).
- 51.- Smith G.S., y Johnson B.C.-Glucose Metabolism in the Rat During Starvation and Refeeding Following Starvation.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115: pp 438 (1964).
- 52.- Mac. Donald B.E. y Johnson C. - Metabolic Response to Realimentation Following Chronic Starvation in the Adult Male Rat.- J. of Nutr. 87: pp 161 (1965).
- 53.- Stephen M.L. Hoan .- Adaptative Enzyme Changes in the Liver and Muscle of Rats During Protein Depletion and Refeeding.- Br. J. Nutr. 22 (2): pp 153 (1968).
- 54.- Good C.A., Kramer H. y Somogyi M.- J. Biol. Chem. 100: pp 485 (1968).
- 55.- White A., Handler P. y Smith L.E. Principles of Biochemistry Mac. Graw Hill Book Co. N.Y., Toronto, London (1964)
- 56.- Huggett A. St G. y Nixon D.A.- Use of Glucose Oxidase, Peroxidase, and o-diamisidine in Determination of Blood and Urinary Glucose.- Lancet ii: 368 (1957).
- 57.- Fiske C.H. y Subbarow Y.- The Colorimetric Determination of Phosphorus.- J. Biol. Chem. 66 pp 375 (1925).
- 58.- Chen P.S. Jr., Toribara T.Y. y Warner H. - Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases.- Anal. Chem. 28: pp 1756 (1956)
- 59.- Barman Th. E. - Enzyme Handbook clave 3.1.3.9. Vol. II. New York 1969.
- 60.- Neufeld E.F. y Ginsburg Victor.- Complex Carbohydrates.- Methods in Enzymology Vol. VIII.- Academic Press 1966 pp 525 - 532.

- 61.- Hartree E.F.- Determination of Protein. A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. *Anal. Biochem.* 48: pp 422 - 427 (1972).
- 62.- Joslyn A. Maynard.- *Methods in Food Analysis.*- 2^a Ed. Academic Press New York pp 630-654. (1970).
- 63.- Nordlie R.C., Arion W.C. - Glucose-6-phosphatase.- *J. Biol. Chem.* 240: pp 2155 (1965).
- 64.- Item 59, clave 2.7.5.1. pp 302 Vol. 1. (1969).
- 65.- Najjar A. Victor.- The Isolation and Properties of Phosphoglucomutase.- *J. Biol. Chem.* 175: pp 281 (1948).
- 66.- Lowry, O.H., Passonneau J.V.- Phosphoglucomutase Kinetics with the Phosphates of Fructose, Glucose, Mannose, Ribose and Galactose. *J. Biol. Chem.* 244: 910 (1969).
- 67.- Villar-Palasi, C. y Larner J.- Glycogen Metabolism and Glycolitic Enzymes.- *Ann. Rev. Biochem* 39: pp 733 (1970)
- 68.- Najjar A. Victor.- Phosphoglucomutase From Muscle.- *Methods in Enzimology* 1: pp 294 (1965).
- 69.- Item 59, clave 2.4.1.1. Vol. 1. (1969).
- 70.- Sutherland W. Earl.- Polissaccharide Phosphorylase liver.- *Methods in Enzimology* 111: 215 (1967).
- 71.- Pearson D.- *The Chemical Analysis of Foods.*- 6 th Ed, J. and A. Churchill, London 1970.
- 72.- McLaughlan J.M. and Campbell J.A. - *The Mamalian Protein Metabolism.* Vol. III cap. 29.- Academic Press Inc. pp 399. New York (1969).
- 73.- Lehninger L. Albert.- *Biochemistry, The Molecular Basis of Cell Structure and Function.*- 6th Edition, Worth publishers, Inc., pp 157 New York (1972).
- 74.- Ray W.J. and Roscelli G.A. - A Kinetic Study of The Phosphoglucomutase Pathway.- *J. of Biol. Chem.* 239: pp 1228 (1964).

- 75.- Van R. Potter.- Tissue Homogenates.- Methods in Enzimology
1: pp 16 (1958).
- 76.- Nordlie R.C. and Lygrei D.C. - J. Biol. Chem. 241, pp 3136 (1966)
- 77.- Brown D.H. & Cori C.F. - The Enzymes 5: pp 207 (1961).
- 78.- Harper A.E. - Aminoacid Toxicities and Imbalances.- The Mammalian Protein Metabolism. Vol. II Cap. 13, Academic Press pp 110. New York (1964).

IMPRESO EN
EDITORIAL JUAREZ
Ciprés 134-1
Tel. 547-70-21