

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

TESIS

**CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN PLASMA Y
MÚSCULO EN ANIMALES NUTRIDOS Y DESNUTRIDOS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

GILDA CRISTINA CANSECO LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

Octubre 2007



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.

Jurado asignado

Presidente	Prof. ANGELA SOTELO LOPEZ
Vocal	Prof. LUCIA GABRIELA BASCUÑAN TERMINI
Secretario	Prof. LUCIA CORNEJO BARRERA
1er. Suplente	Prof. LETICIA GIL VIEYRA
2°. Suplente	Prof. ILIANA ELVIRA GONZALEZ HERNANDEZ

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 111. Departamento de Farmacia. Conjunto E. Facultad de Química, Ciudad Universitaria

Asesor: M. en C. Angela Sotelo López

Supervisor técnico: M. en C. Rosa María Argote Espinosa

Sustentante: Gilda Cristina Canseco López

Agradecimientos

A Dios por darme la vida y llenarme de bendiciones al darme la oportunidad de culminar esta etapa.

A mis Padres Joaquín y Cristina porque siempre me han brindado su cariño, apoyo, comprensión, han sido mi guía y me han dado su ejemplo de constancia y esfuerzo para lograr el éxito.

A mis hermanos Joaquín, Raymundo y Viviana porque juntos hemos encontrado la manera de cumplir nuestras metas.

A mis abuelitos por las vivencias que tuve con ellos que me enseñaron a ver con entusiasmo cada momento de la vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme los elementos de una educación integral para formarme como profesionista.

A la maestra Angela Sotelo por su apoyo y asesoría para realizar este trabajo.

A mis profesores de la Facultad de Química por transmitirme sus conocimientos de gran utilidad para aplicar en mi carrera profesional.

A la maestra Rosita, por su ayuda y consejo al realizar la parte experimental de este proyecto.

A mi tía Rosa Elena y mi tío Pedro por su ayuda incondicional en todo momento que la he necesitado.

A mis amigas Ale, Vane, Faby, Liz y Sarah por los momentos alegres e inolvidables que pasamos juntas.

A Eli, Susanita y Clau por su amistad y su compañía durante la carrera.

A Lety, Ili y Arge por su valiosa ayuda en el laboratorio.

A mis tíos y primos porque siempre me han brindado su apoyo y cariño.

A la Señora Vicky por su alegría y sus valiosos consejos.

A Lili, Allan, Liz, Cuahutémoc, Edith y mis amigos y compañeros del grupo 9 por los momentos agradables en la facultad desde el comienzo de la carrera.

INDICE

Contenido	Página
Introducción	1
Objetivos	2
Antecedentes	4
Consumo de energía	4
Proteínas	5
Relaciones Proteína-Energía	6
Aminoácidos	7
Aminoácidos esenciales y no esenciales	7
Calidad proteínica	9
Metabolismo de los aminoácidos	10
Digestión y absorción de las proteínas	13
Distribución de los aminoácidos en los líquidos corporales	16
Los aminoácidos en la sangre	16
Los aminoácidos en el plasma	16
Los aminoácidos en el músculo	18
Estado de ayuno y la inanición	18
Desnutrición	21
Tipos de desnutrición: Marasmo y Kwashiorkor	22
a) Marasmo	22
b) Kwashiorkor	23
Desnutrición en adultos	24
Hipótesis	26
Parte experimental	27
Metodología	
Las muestras	28
Determinación de proteína por el método de Lowry	29
Extracción de aminoácidos libres	33
Cuantificación de α -aminoácidos libres totales	35
Resultados y discusión	38
Cuantificación de proteína en plasma y músculo	38
Extracción de aminoácidos libres en plasma y músculo	41
Conclusiones	46
Bibliografía	47
Anexos	50

INTRODUCCIÓN

La desnutrición es un problema grave a nivel mundial pues por esta causa la calidad de vida de millones de personas de todas las edades se encuentra deteriorada; sufren consecuencias fisiológicas y psicológicas irreversibles, y la problemática se acentúa debido a la susceptibilidad de adquirir infecciones.

Esta situación afecta principalmente a los países en vías de desarrollo; en América Latina se considera como uno de los factores importantes que afectan a la infancia¹. En México este problema aqueja en gran medida a la población rural, teniendo como principal blanco a los niños menores de cinco años.

Entre las causas de la desnutrición se encuentran la pobreza, la marginación social, la ignorancia, etc. Por ello se realizan esfuerzos para favorecer la nutrición de la población, con mayor énfasis en los grupos vulnerables. En México se mejoran continuamente los programas y políticas alimentarias² para combatir el problema a través de diferentes acciones, tratando de impulsar una perspectiva integral.

Desde hace varias décadas el desarrollo de técnicas analíticas dentro de la investigación científica ha colaborado para generar los conocimientos acerca de la desnutrición tanto a nivel fisiológico como a nivel bioquímico. El análisis de aminoácidos se considera una de las aplicaciones de importancia en las ciencias biológicas, principalmente en los campos bioquímico y biomédico. La cuantificación de estos compuestos en tejidos y fluidos biológicos es de gran utilidad en estudios acerca de la desnutrición, ya que son sensibles al estado de nutrición del individuo por la relación que existe entre la ingestión del alimento, su absorción y utilización por las células del organismo que los incorporan al tejido proteínico.

Cabe resaltar que las deficiencias nutrimentales de aminoácidos individuales o de la ingestión total de proteína causan deficiencia en el crecimiento, desarrollo y otros efectos dañinos principalmente en niños.

En el presente estudio se estableció una metodología rápida y sencilla ya conocida que permite la cuantificación rutinaria de los aminoácidos libres totales a partir de tejidos y fluidos fisiológicos, y posteriormente se aplicó a muestras provenientes de tejido muscular y plasmático de animales nutridos y desnutridos para observar la diferencia cuantitativa de los aminoácidos libres totales que existe entre ellos.

ANTECEDENTES

La nutrición es el conjunto de procesos biológicos, psicoemocionales y socioculturales involucrados en la obtención por el organismo y en la asimilación y utilización metabólica por cada una de sus células, de las sustancias energéticas, estructurales y catalíticas necesarias para la vida. La nutrición comprende e integra numerosos procesos, que se pueden comprender en su esencia subcelular (metabólica) y celular, o ser integrada a nivel del organismo completo y hasta de toda una población (social).

El mantenimiento de la salud exige una nutrición correcta que se puede lograr a través de una buena alimentación. La relación de alimentos para obtener la salud del cuerpo humano implica que sean adecuados en cantidad y variedad, de manera que el organismo pueda obtener los nutrimentos que requiere. Como la alimentación es en esencia modificable, su mejora o su corrección tienen una gran utilidad en el cuidado de la salud y en la prevención de la enfermedad, tomando en cuenta que la salud puede perderse por uno o más defectos de la nutrición.

Los nutrimentos son sustancias con función energética, estructural o catalítica que provienen del medio. Para que se alcance el estado de nutrición, se requiere que todos los nutrimentos -carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas, minerales y agua- sean suministrados y utilizados en un balance adecuado.³

Consumo de energía.

El organismo utiliza el combustible metabólico principalmente para mantener las funciones fisiológicas básicas como la respiración y la circulación sanguínea, el procesamiento de los alimentos que se consumen y realizar actividad física. Otros costos energéticos incluyen el crecimiento, el mantenimiento de temperatura en ambientes fríos, traumas físicos, fiebre, estrés psicológico.⁴

La cantidad mínima de un nutrimento que un determinado individuo necesita ingerir diariamente es el resultado de la combinación de numerosas variables anatómicas, fisiológicas y metabólicas,

que a su vez son el producto de la información genética del individuo y su historia ambiental particular.⁵

La grasa es una importante fuente de energía concentrada, que proporciona 9 kcal/g, mientras que los carbohidratos y proteínas proporcionan alrededor de 4 kcal/g.⁶

La principal función de los carbohidratos es proveer una fuente de energía, y cerca del 50-60% del requerimiento de energía proviene de esta fuente en la dieta. La grasa además de ser una importante fuente de energía, sirve como un acarreador para las vitaminas liposolubles y ciertos ácidos grasos que son nutrimentos esenciales. Los ácidos grasos se requieren para formar estructuras celulares y son precursores de prostaglandinas. Estos requerimientos se pueden alcanzar con una dieta que contenga 20-25 g de grasa, y no hay otro requisito específico para la grasa como nutrimento.⁷

A continuación se expondrá con mayor detalle el papel de las proteínas, y la unidad formadora de éstas, los aminoácidos, en la nutrición, por ser el tema principal del presente estudio.

Proteínas

Las proteínas son polímeros lineales que se sintetizan a partir de monómeros denominados aminoácidos, por condensación para formar el enlace peptídico; éste se forma al reaccionar el grupo amino de un aminoácido con el grupo carboxílico de un segundo aminoácido.^{6,8}

Las proteínas son primordiales en el crecimiento y desarrollo de todos los tejidos del organismo. También se requieren para la formación de enzimas, hormonas y anticuerpos.⁸ Además de su papel estructural y funcional, pueden utilizarse como combustible, aunque se prescinde de esta función energética cuando se tiene una suficiente cantidad de carbohidratos y grasas en la dieta.⁹

Las proteínas, como los demás componentes orgánicos, especialmente la grasa, experimentan continuas degradaciones y renovaciones, incluso en los animales adultos. Los procesos de síntesis proteínica en los tejidos a partir de aminoácidos, y la degradación de las proteínas tisulares hasta aminoácidos, tienen lugar simultáneamente. El continuo catabolismo de las

proteínas del tejido crea la necesidad de la proteína en la dieta para reemplazar las proteínas del tejido que se perdieron, aun en un adulto que no está en crecimiento. Adicionalmente, relativamente grandes cantidades de proteína se pierden de la mucosa intestinal, enzimas y otras proteínas que se secretan hacia el tracto gastrointestinal y no son completamente digeridas y reabsorbidas.^{10,11}

La tasa de renovación de la proteína es cuantitativamente grande, puede llegar a 5-10 veces la ingestión diaria de proteína. Varía considerablemente entre los tejidos, incluso en la misma especie. El hígado, a pesar de su rápida tasa de renovación, contiene relativamente poca proteína y, por tanto, sólo participa en un 10% en la síntesis proteínica total en el organismo del cerdo y la rata. Por el contrario, los músculos del esqueleto representan el mayor órgano del cuerpo, pero tienen un ritmo lento de síntesis. La tasa de renovación proteínica está controlada por el estado nutritivo y hormonal del animal; la hormona de crecimiento y la insulina estimulan la síntesis proteínica, en tanto que los glucocorticoides determinan la degradación proteínica.¹¹

El proceso de degradación proteínica es una hidrólisis enzimática para liberar los aminoácidos, como ocurre en el tracto gastrointestinal en la digestión. La degradación de proteína de los tejidos ocurre a una velocidad más o menos constante durante el día y un adulto cataboliza o reemplaza 3-6 g de proteína por kg peso corporal por día.¹⁰

Cuando la ingesta es adecuada para cubrir los requerimientos, las proteínas que se degradaron pueden ser reemplazadas y cualquier ingesta excedente de proteína puede ser utilizada como combustible metabólico para el anabolismo.¹² El exceso del grupo amino de los aminoácidos suele excretarse en el corto plazo (horas o a lo mucho días) de manera que la ingestión de una cantidad ligeramente mayor que el requerimiento carece de consecuencias indeseables.⁵

Relaciones Proteína-Energía.

Es importante proveer de los niveles óptimos de energía en la dieta; sólo cuando la demanda de energía del organismo se ha cubierto, con nutrimentos como los lípidos y los carbohidratos, la proteína de la dieta puede ser utilizada para la síntesis de tejidos, protegiendo así a los aminoácidos de su utilización para el metabolismo energético.^{10, 13}

El equilibrio de nitrógeno permite valorar si el individuo está en un estado anabólico (retención de nitrógeno) o catabólico (pérdida de nitrógeno). La ingestión proteínica diaria debe ser igual, cuando menos, a la cantidad de nitrógeno que se pierde, con el objeto de conservar el equilibrio de nitrógeno, o que éste sea positivo. Cuando la ingestión de proteína es inferior a la cantidad de nitrógeno que se elimina, es decir, existe pérdida de nitrógeno, el equilibrio es negativo.

El equilibrio de nitrógeno está relacionado tanto con la ingestión de energía como con el contenido proteínico de la dieta. Cuando ésta es deficiente en proteínas, no se logra el equilibrio de nitrógeno, independientemente de la ingestión de energía. Con ingestión baja de energía (17 a 50% de los requerimientos), a pesar del incremento de la ingestión proteínica del equivalente de 4 a 9 g de nitrógeno por día, la persona permanece en equilibrio negativo de nitrógeno. En individuos sanos que comen normalmente, la relación caloría a nitrógeno óptima se aproxima a 300:1.¹²

Aminoácidos.

La unidad formadora de las proteínas son los aminoácidos. Existen alrededor de veinte aminoácidos que se presentan comúnmente en las proteínas y son denominados aminoácidos “estándar”. Se conocen como α -aminoácidos ya que, con excepción de la prolina, poseen un grupo amino primario y un grupo ácido carboxílico como sustituyentes en el mismo átomo de carbono. La prolina, la única excepción de esta estructura general, posee un grupo amino secundario y es, por tanto, un α -iminoácido aunque corrientemente se menciona como un aminoácido. Además de su papel en las proteínas, los aminoácidos y sus derivados desempeñan muchas funciones biológicas importantes.^{6,9}

Aminoácidos esenciales y no esenciales.

De los veinte aminoácidos que se encuentran normalmente en el organismo animal, algunos pueden sintetizarse, especialmente en las células hepáticas, mientras que otros se deben obtener de la dieta; así los aminoácidos se pueden dividir en dos grupos: esenciales y no esenciales.^{10,11}

a) **Aminoácidos esenciales.** Muchos aminoácidos son sintetizados mediante rutas que están sólo presentes en las plantas y en los microorganismos. Dado que los mamíferos deben obtener estos aminoácidos de sus dietas, estas sustancias son conocidas como aminoácidos esenciales.⁹

b) **Aminoácidos no esenciales.** Los otros aminoácidos, que pueden ser sintetizados por los mamíferos a partir de intermediarios comunes, y no requieren ser administrados en la dieta son denominados aminoácidos no esenciales. Todos los aminoácidos no esenciales excepto la tirosina y la cisteína son sintetizados mediante rutas simples a partir de uno de estos cuatro intermediarios metabólicos comunes: piruvato, oxalacetato, α -cetoglutarato y 3-fosfoglicerato.⁶

Los aminoácidos esenciales y no esenciales para el hombre se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Aminoácidos esenciales y no esenciales en el hombre.⁹

Esenciales	No esenciales
Arginina	Alanina
Fenilalanina	Asparagina
Histidina	Aspartato
Isoleucina	Cisteína
Leucina	Glicina
Lisina	Glutamato
Metionina	Glutamina
Treonina	Prolina
Triptofano	Serina
Valina	Tirosina

Cabe aclarar que la arginina está clasificada como esencial, a pesar de que es sintetizada en el ciclo de la urea, porque se necesita en mayor cantidad de la que puede producirse por esta ruta durante el crecimiento normal y el desarrollo del niño (pero no para los adultos).

La tirosina y la cisteína ocupan una posición intermedia, ya que pueden ser sintetizados en el organismo, pero solo a partir de un aminoácido esencial.¹⁰ La tirosina es sintetizada mediante la hidroxilación de una etapa del aminoácido esencial fenilalanina. En efecto, los requerimientos de fenilalanina en la dieta reflejan también la necesidad de tirosina. La presencia de tirosina en la dieta hace disminuir, al mismo tiempo, la necesidad de fenilalanina. El mismo caso se presenta con la cisteína, pues su grupo sulfhidrilo deriva del aminoácido esencial metionina.⁹

La relación de aminoácidos esenciales y no esenciales varía algo con las distintas especies, edad y función de los animales. Los aminoácidos esenciales para el hombre adulto, son también esenciales para el crecimiento de la rata.¹¹

Las necesidades en aminoácidos de los animales en crecimiento están estrechamente relacionadas con la composición en aminoácidos de los tejidos. La proporción de aminoácidos esenciales requerida en las proteínas que provienen de la dieta, como una fuente de nitrógeno para las funciones celulares varía, de cuando menos el 20%, para conservar la salud en los adultos, a 36-43%, para la salud y el crecimiento en lactantes y niños. Es importante la cantidad de nitrógeno no esencial de la dieta, y debe ser la adecuada para evitar la degradación de aminoácidos esenciales con destino al metabolismo del nitrógeno.^{12, 13}

Calidad proteínica

La composición de una proteína o las cantidades relativas de cada uno de los aminoácidos que la componen se conoce como <<perfil de aminoácidos>>. En términos de nutrición, la importancia de una proteína se basa en su capacidad de administrar los aminoácidos particulares que necesitan las células corporales, esto es, la equivalencia de la proteína dietética con el perfil de aminoácidos del contenido de proteínas. La calidad de las proteínas individuales depende de si contienen o no los aminoácidos esenciales en las cantidades requeridas.⁶

Aunque la calidad proteínica es importante cuando se consideran las proteínas individuales de la dieta, no es particularmente relevante cuando se considera el total de estas, porque diferentes

proteínas son limitadas por ciertos aminoácidos y tienen un relativo exceso de otros aminoácidos esenciales.¹⁰

La capacidad de una proteína dietética de proporcionar el equilibrio de aminoácidos está controlada por varios factores:

- La cantidad de proteína ingerida.
- La cantidad de cada aminoácido proporcionado por esa proteína.
- La facilidad de digestión de las proteínas conforme pasan por el tracto digestivo.
- Cambios químicos entre proteínas y otros componentes de los alimentos, que se llevan a cabo al calentar los alimentos como ocurre en la reacción de Maillard.⁶

Metabolismo de los aminoácidos

Los aminoácidos funcionan en el organismo como un pozo o pool único, independiente de su origen a partir de las tres fuentes principales:

- (1) Los aminoácidos liberados de las proteínas de la ración durante la digestión, son absorbidos a través de la pared intestinal y por la sangre circulante son transportados hasta los órganos.
- (2) Los aminoácidos liberados por degradación de las proteínas tisulares también pasan al sistema circulatorio, donde se mezclan con los aminoácidos procedentes de la ración y con ellos son transferidos a los órganos;
- (3) Los aminoácidos no esenciales sintetizados en los tejidos también pertenecen al pool común de aminoácidos.

El pool de aminoácidos libres en el organismo representa sólo el 0.2-2.0% de la cantidad total de aminoácidos que se encuentran ligados principalmente a las proteínas (una pequeña cantidad de aminoácidos ligados, se encuentra en los péptidos). El pool de aminoácidos libres no representa

una reserva de precursores para la síntesis proteínica y disminuye rápidamente si la entrada de aminoácidos al pool cesa bruscamente, por ejemplo, por escasez de proteína en la ración.¹¹

El pool de aminoácidos intracelular no está determinado por movimiento pasivo de los aminoácidos sino está regulado por transporte activo transmembrana. La consecuencia de esto es que el pool libre de los tejidos es hasta cierto grado defendido contra cambios bruscos de concentración.¹⁴

Los aminoácidos presentes en el pool experimentan las siguientes reacciones bioquímicas:

- la síntesis de proteínas para los tejidos;
- síntesis de hormonas, enzimas y otros compuestos nitrogenados biológicamente importantes;
- degradación de los aminoácidos que han cumplido sus funciones en el organismo o de los ingeridos que superan las necesidades.¹¹

Casi inmediatamente después de su entrada en las células, los aminoácidos se combinan mediante enlaces peptídicos, bajo la dirección del ARN mensajero y del sistema de los ribosomas, para formar proteínas celulares. Por tanto, las concentraciones de aminoácidos libres dentro de las células suelen permanecer bajas. El crecimiento rápido se relaciona con un transporte acelerado de aminoácidos.^{15, 16}

La cantidad de aminoácidos presente como proteínas en los tejidos, es de 30 a 60 veces mayor que la correspondiente cantidad de aminoácidos libres.¹³

Ciertos aminoácidos, además de su función principal como componentes de las proteínas, son precursores esenciales para una gran variedad de productos metabólicos importantes que incluyen:

- Purinas y pirimidinas para la síntesis de ácidos nucleicos.
- El grupo hemo, sintetizado de la glicina.

- Los neurotransmisores dopamina, norepinefrina y epinefrina, sintetizados de tirosina.
- Las hormonas tiroxina y triyodotironina, sintetizadas de la tirosina.
- Melanina, un pigmento de la piel y el cabello, sintetizados de la tirosina.
- El anillo nicotinamídico de las coenzimas NAD⁺ y NADP⁺, sintetizados de triptofano.
- El neurotransmisor serotonina, sintetizado del triptofano.
- El neurotransmisor histamina, sintetizado de la histidina.
- El neurotransmisor GABA (ácido γ -aminobutírico), sintetizado del glutamato.
- Carnitina, sintetizada de la lisina y la metionina.
- Colina, para la síntesis de los fosfolípidos, y del neurotransmisor acetilcolina, sintetizada de la serina y la metionina.
- Taurina, sintetizada de la cisteína.

En general, la cantidad de nitrógeno requerida para formar estas biomoléculas es pequeña en comparación con la cantidad necesaria para mantener el balance de nitrógeno y la síntesis de proteína.

Cada tipo particular de célula tiene un límite superior para la cantidad de proteínas que puede almacenar.¹⁵ Después de que las células han alcanzado este límite, el exceso de aminoácidos en la circulación que no son requeridos inmediatamente para síntesis de proteínas es oxidado, aunque algunos pueden ser reutilizados. La degradación de los aminoácidos los convierte en intermediarios del ciclo del ácido cítrico o sus precursores, de modo que pueden ser metabolizados a CO₂ y H₂O o utilizados en la gluconeogénesis. La degradación oxidativa de los aminoácidos representa entre el 10 y el 15% de la energía metabólica generada por los animales.
9, 10

La primera reacción en la degradación de los aminoácidos es casi siempre la eliminación de su grupo α -amino con el objeto de excretar el exceso de nitrógeno y degradar el esqueleto de carbono restante. Para eliminar el grupo α -amino se lleva a cabo la reacción de transaminación, catalizada por enzimas denominadas transaminasas o aminotransferasas, existentes en la mayoría de los tejidos de los animales, y en especial en el hígado, que permiten la transformación de unos aminoácidos en otros. Se trata de una reacción reversible en la que se transfiere un grupo amino a un α -oxoácido para producir el α -oxoácido del aminoácido original y un nuevo aminoácido.

Los grupos amino de la mayoría de los aminoácidos son dirigidos a la formación de glutamato o aspartato. La desaminación ocurre principalmente a través de la desaminación oxidativa del glutamato mediante la glutamato deshidrogenasa produciéndose amoníaco. El amoníaco liberado en la desaminación se excreta en forma de urea.

Los esqueletos de carbono de los aminoácidos son degradados a uno de estos siete intermediarios metabólicos: piruvato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato, oxalacetato, acetil-CoA o acetoacetato.

Los aminoácidos que producen acetyl CoA o acetoacetato se denominan cetogénicos. El acetyl CoA y acetoacetato que procede de aminoácidos puede ser utilizado para la síntesis de ácidos grasos o puede ser oxidado como combustible metabólico, pero no puede ser usado para la síntesis de glucosa. Los aminoácidos que producen intermediarios que pueden ser usados para la gluconeogénesis se denominan glucogénicos. Sólo dos aminoácidos son puramente cetogénicos: leucina y lisina. Los aminoácidos isoleucina, fenilalanina, treonina, triptofano y tirosina son tanto cetogénicos como glucogénicos. Los 13 aminoácidos restantes son puramente glucogénicos.^{9,10}

La degradación desaminativa de los aminoácidos de cadena ramificada como la leucina, isoleucina y valina representa aproximadamente el 40% de las necesidades mínimas diarias de los aminoácidos esenciales en los mamíferos monogástricos. Aparte de su papel en la síntesis de proteína, en especial en los músculos, son importantes como combustible metabólico durante las condiciones de estrés por privación de energía (ayuno) o necesidades energéticas incrementadas. A diferencia con las rutas metabólicas de los otros aminoácidos esenciales que tienen lugar en el hígado, los aminoácidos de cadena ramificada, como algunos aminoácidos no esenciales, se degradan principalmente en los músculos.¹¹

Digestión y absorción de las proteínas.

Las proteínas, compuestos de alto peso molecular, sólo pueden absorberse por las células de la mucosa intestinal después de haber sido degradadas hasta compuestos de bajo peso molecular, principalmente aminoácidos. La digestión de las proteínas tiene lugar en el estómago y porción

superior del intestino, por enzimas de tres orígenes: la mucosa del estómago, la mucosa del intestino y el páncreas. Las enzimas son segregadas inicialmente como precursores inactivos llamados zimógenos. La transformación de los zimógenos en enzimas activas supone la eliminación (también por un proceso enzimático) de un pequeño péptido que protege y bloquea el centro activo de la enzima. La hidrólisis completa de las proteínas de la ración se logra por enzimas que son específicas para ciertos enlaces, actuando en una secuencia definida.¹¹

Tabla 2. Enzimas proteolíticas, lugares de producción y especificidad de acción.¹¹

Enzima	Lugar de producción	Rompe enlaces peptídicos adyacentes a:	pH para la actividad óptima
Pepsina	Mucosa del estómago	Triptofano, fenilalanina, tirosina, metionina, leucina	1.8-2.0
Tripsina	Páncreas	Arginina, lisina	8-9
Quimotripsina	Páncreas	Aminoácidos aromáticos y metionina	8-9
Elastasa	Páncreas	Aminoácidos alifáticos	8-9
Carboxipeptidasa	Páncreas	Grupos carboxilo α libres de los aminoácidos	7.2-8.0
Aminopeptidasa	Mucosa del intestino	Aminoácidos con grupos NH_3 libres	7.4

La digestión de las proteínas se inicia en el estómago con la desnaturalización por el ácido clorhídrico, seguida de la digestión por la pepsina. De esta forma las proteínas de la ración son divididas en grandes polipéptidos, liberándose una pequeña cantidad de aminoácidos libres. La pepsina es responsable por cerca del 10 al 20% de la digestión proteínica.⁴

Las moléculas proteínicas resistentes a la acción del estómago con los grandes fragmentos peptídicos resultantes de la digestión péptica, llegan al duodeno, en donde se lleva a cabo la mayor parte de la digestión proteínica, para continuar la hidrólisis por las enzimas pancreáticas. En el intestino, el tripsinógeno es convertido en tripsina por la eliminación de un fragmento hexapeptídico desde el N-terminal, proceso catalizado por la enteroquinasa, otra enzima que se secreta en pequeñas cantidades por la mucosa intestinal. La tripsina es responsable de la activación del quimotripsinógeno, procarboxipeptidasa y proelastasa. Las enzimas pancreáticas

liberan pequeños péptidos (cadenas de 2 a 6 aminoácidos) y cantidades abundantes de aminoácidos libres.¹¹

Los pequeños péptidos son hidrolizados, teniendo lugar su degradación en pequeña cantidad en la luz del intestino, por acción de las peptidasas segregadas por el páncreas. Las dipeptidasas de la mucosa intestinal actúan sobre enlaces de fragmentos de dipéptidos. La mayoría de los pequeños péptidos formados en el intestino son hidrolizados por peptidasas asociadas a la superficie externa del borde en brocha de las células epiteliales. Sin embargo, el borde en brocha de la membrana realiza una doble función: la absorción de aminoácidos y péptidos y la hidrólisis enzimática de pequeños peptidos hasta aminoácidos libres. Los aminoácidos libres son absorbidos en los capilares de las vellosidades y transportados al hígado por la vena porta y de ahí son liberados a la circulación general. Más del 99% de las proteínas entran a la corriente sanguínea como aminoácidos individuales.

El ritmo de absorción de los aminoácidos a la sangre portal depende de la composición en aminoácidos de la digesta presente en el intestino. La absorción de aminoácidos y péptidos sencillos por el epitelio intestinal es un proceso relativamente rápido y existe un aumento postprandial en el contenido en aminoácidos en la sangre portal.^{4, 11}

Algunos aminoácidos pueden ser absorbidos vía difusión facilitada; sin embargo, las moléculas de casi todos los aminoácidos son demasiado grandes para difundir a través de los poros de las membranas celulares. Por tanto, cantidades significativas de los aminoácidos absorbidos en el intestino delgado se pueden transportar a través de la membrana sólo mediante transporte activo utilizando mecanismos transportadores que, en la mayoría de los casos, son sodio dependiente.¹³ Aunque hay varios mecanismos de transporte activo, los aminoácidos similares comparten el mismo sistema. Pueden clasificarse en tres grupos principales, para aminoácidos neutros, básicos y ácidos. Los miembros de cada grupo compiten entre sí, pero no con los de otros grupos para la absorción. El sistema de transporte de los aminoácidos grandes, neutros a través de las membranas celulares, incluye tanto a los aminoácidos de cadena ramificada como a los aminoácidos aromáticos, que compiten por sitios de fijación.^{11, 12, 15}

Distribución de los aminoácidos en los líquidos corporales.

Los cambios en la concentración de los aminoácidos libres en el plasma y en el tejido además de ser apreciados por su significado nutricional, son de utilidad potencial como una herramienta sensible para la evaluación de la calidad proteínica, del estado nutricional y de los requerimientos de aminoácidos esenciales. Existe una gran correlación entre los patrones de aminoácidos esenciales de la dieta y del plasma, y se sabe que los aminoácidos libres del tejido son afectados por la calidad proteínica de la dieta. El perfil óptimo de aminoácidos de la dieta dependerá del requerimiento de aminoácidos para la síntesis proteínica y el uso de aminoácidos individuales como sustrato para energía o para otros propósitos.¹⁷

En estudios realizados en ratas se ha encontrado que los niveles de aminoácidos en sangre y tejidos son ampliamente determinados por la absorción de aminoácidos desde el intestino y del metabolismo endógeno de estos compuestos. Después de alimentarse y durante el periodo de absorción hay flujos de aminoácidos desde el intestino al hígado y otros tejidos incrementando significativamente los niveles de varios aminoácidos en plasma y tejido.¹⁸

Los aminoácidos en la sangre

La contribución de los diferentes aminoácidos en la sangre depende hasta cierto punto de los tipos de proteínas ingeridas, pero las concentraciones de al menos algunos aminoácidos individuales están reguladas por una síntesis selectiva en las diferentes células.¹⁵

Los aminoácidos en el plasma

El plasma, solución acuosa que constituye el 55% de una muestra de sangre transporta los materiales nutritivos como las sustancias provenientes del aparato digestivo, además de sustancias de desecho producidas en los tejidos, y hormonas. El plasma también contiene gases disueltos.¹⁹

La concentración total de aminoácidos libres en plasma en los mamíferos es aproximadamente 2 mM, mientras la cantidad de aminoácidos formando proteínas plasmáticas es unas 300 veces mayor. La concentración de aminoácidos libres en el espacio intracelular es aproximadamente 10 veces mayor que en el agua plasmática.¹³ La concentración de aminoácidos libres en el plasma sanguíneo se modifica a medida que aumenta la edad cronológica.²⁰

Los factores dietéticos desempeñan un papel complejo en la determinación de aminoácidos del plasma. Una muestra de plasma obtenida al azar presentará una distribución de aminoácidos libres que será meramente un reflejo de su tránsito durante la diaria economía del metabolismo celular.^{12, 13} El contenido proteínico y energético de los alimentos influye sobre la constitución del patrón de aminoácidos, por lo tanto los aminoácidos plasmáticos son buenos indicadores del estado de nutrición proteínica del organismo. La concentración de los aminoácidos libres en el plasma sanguíneo es reflejo de un estado de equilibrio entre su adición y su remoción.²⁰ Estudios en animales de experimento indican que ingesta excesiva o inadecuada de aminoácidos esenciales individuales son reflejados en un cambio correspondiente en la cantidad de aminoácidos en el plasma.²¹

Debido a que las proteínas celulares en el hígado (y, en mucho menor grado, en otros tejidos) se pueden sintetizar rápidamente a partir de aminoácidos plasmáticos y muchas de ellas a su vez pueden ser degradadas y los aminoácidos liberados devueltos al plasma casi con la misma rapidez, existe un equilibrio constante entre los aminoácidos plasmáticos y las proteínas lábiles de las células del cuerpo.¹⁵

Entre otros factores que afectan el perfil plasmático de aminoácidos se encuentran algunas hormonas secretadas por las glándulas endócrinas que son capaces de alterar el equilibrio entre las proteínas tisulares y los aminoácidos circulantes. La hormona del crecimiento y la insulina aumentan la formación de proteínas tisulares, mientras que los glucocorticoides suprarrenales aumentan la concentración de aminoácidos circulantes.

El conocimiento de los niveles normales de aminoácidos, es esencial para poder reconocer las variaciones fisiológicas normales, así como las patológicas. A pesar de algunas limitaciones en la

extrapolación de los valores de los aminoácidos del plasma al metabolismo intracelular, el perfil de éstos proporciona información importante sobre los trastornos y deficiencias del metabolismo de los aminoácidos y la nutrición.¹³

Los aminoácidos en el Músculo

La masa proteínica del músculo está determinada por el balance entre la velocidad de síntesis y degradación proteínica. El ritmo de síntesis proteínica en el músculo está considerablemente afectado por el estado de nutrición que presente el animal.^{11,22}

El tejido muscular sirve como almacén de energía porque durante el estado de ayuno sus proteínas son degradadas a aminoácidos, muchos de los cuales son convertidos a piruvato que, a su vez, es transaminado a alanina. La alanina es entonces exportada a través de la corriente sanguínea al hígado, que transamina de nuevo a piruvato, un precursor de la glucosa.⁹

La glucosa dietética estimula la liberación de insulina, a su vez esta última actúa sobre el músculo para promover el ingreso de los aminoácidos de cadena ramificada; aumenta la síntesis de proteína en el músculo y disminuye su desdoblamiento. Sin embargo con la disminución de la actividad insulínica se reduce la utilización de aminoácidos de cadena ramificada por el músculo, convirtiéndose en el principal sitio donde se efectúa el catabolismo de estos aminoácidos.¹²

Estado de ayuno y la inanición

El estado de ayuno y la inanición privan al organismo de la energía necesaria para mantener sus funciones. La prioridad del organismo es preservar el tejido dependiente de glucosa: células rojas de la sangre, células cerebrales y el resto del sistema nervioso central. En segundo lugar está el mantener la masa muscular.

Durante la inanición, la velocidad metabólica disminuye ya que el organismo retarda funciones básicas para así conservar la energía y prolongar la supervivencia.⁴

Las etapas se describen a continuación:

1. El ayuno nocturno

El organismo almacena una provisión de glucosa para menos de un día. Al disminuir la concentración sanguínea de glucosa por debajo del nivel normal de 5 mM, el hígado libera glucosa al torrente sanguíneo a partir de la degradación de glucógeno, proceso mediado por la hormona glucagón. Las rutas gluconeogénicas en el hígado se intensifican mientras comienzan a producir glucosa de los aminoácidos circulantes. Por otro lado, para satisfacer sus propias necesidades energéticas, el hígado utiliza ácidos grasos generando ATP a partir de acetyl-CoA a través del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa. Debido a la reducción de las concentraciones de insulina, se inhibe la incorporación de glucosa por el tejido muscular. Al disminuir el suministro de glucosa, las células musculares comienzan a utilizar triglicéridos para la producción de energía.^{4,9}

2. Los primeros días

Durante los primeros días, la grasa y la proteína son los combustibles primarios.⁴ El desdoblamiento de triglicéridos del tejido adiposo proporciona cinco sextas partes de las calorías. La degradación de proteínas, sobre todo del músculo produce el resto. La gluconeogénesis es un destino importante para esqueletos carbonados de aminoácidos, la tasa de síntesis de reemplazo es menor a la de degradación, así se observa una pérdida neta de tejido proteínico.

Hay un modelo de utilización de aminoácidos por el músculo que da como resultado que con la producción de alanina y de glutamina, éstos excedan a los demás aminoácidos glucogénicos. La captación de alanina y glutamina es específica, pues el intestino utiliza glutamina, y la alanina es captada sólo por el hígado para la gluconeogénesis. Los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) son utilizados de preferencia por el músculo, proporcionando la principal fuente de nitrógeno para la síntesis de alanina.¹² Un grupo de aminotransferasas musculares aceptan al piruvato derivado del metabolismo de la glucosa como su α -oxoácido sustrato produciendo alanina, este aminoácido es liberado del músculo al torrente sanguíneo y es transportado al hígado donde sufre transaminación para producir piruvato que es utilizado en la

gluconeogénesis. La glucosa resultante vuelve al músculo donde será degradada glucolíticamente a piruvato. El grupo amino termina en amoniaco o aspartato para la biosíntesis de la urea.⁹

Durante los primeros días de la inanición, la producción de alanina del músculo aumenta, como también la extracción fraccional por el hígado. La producción de glucosa por este mecanismo proporciona este azúcar principalmente para el encéfalo.¹²

Durante los primeros 7 a 10 días de inanición, la pérdida de nitrógeno del organismo está en el rango de 10 a 12 g/día, excretado principalmente como urea en la orina.²³

Cabe destacar que un día de ayuno no afecta notablemente la homeostasis general de aminoácidos de la mayoría de los tejidos y solo pocos aminoácidos son afectados; los órganos individuales tienen mecanismos reguladores muy fuertes que la mantienen. Se ha sugerido que existe una participación importante de los compuestos en los que hay cambios en la concentración durante este estado.¹⁸

3. Las primeras semanas

Al continuar la inanición el organismo realiza algunas estrategias para la conservación de la energía como la disminución de la temperatura corporal, pulso, presión sanguínea y metabolismo basal, es decir, el organismo se torna letárgico reduciendo la cantidad de energía para la actividad.⁴

Debido a que las proteínas tienen funciones celulares y estructurales vitales, la degradación de proteína disminuye drásticamente con el propósito de reducir al mínimo su consumo. La velocidad de degradación del músculo disminuye hasta un 25% de su velocidad. Se duplica la velocidad del catabolismo de la grasa para proveer ácidos grasos como combustible y glicerol para glucosa. El 90% de las calorías es proporcionado por las grasas, y las proteínas se conservan.^{4,12}

La gluconeogénesis ha consumido tanto oxalacetato del hígado que la capacidad de este órgano para metabolizar acetil-CoA mediante el ciclo del ácido cítrico se encuentra muy disminuída, por tanto la gluconeogénesis cae a dos tercios o más. En su lugar, el hígado convierte el acetil-CoA a

cuerpos cetónicos que son liberados al torrente sanguíneo; los cuerpos cetónicos son una fuente de energía ahorradora de glucosa para el cerebro y las células rojas de la sangre. Después de cerca de 10 días de ayuno, los cuerpos cetónicos cumplen con la mayoría de las necesidades energéticas del sistema nervioso.⁹ La hipercetonemia inhibe la oxidación preferencial de los aminoácidos ramificados en el músculo, por esto la concentración de alanina circulante y la producción de alanina del músculo están reducidas de manera desproporcionada y en grado muy evidente.

El corazón, la corteza renal y el músculo esquelético utilizan los ácidos grasos liberados del tejido adiposo o los cuerpos cetónicos producidos por el hígado. El cerebro se adapta gradualmente a la utilización de cuerpos cetónicos como combustible, mediante la síntesis de las enzimas apropiadas; por esto, los cuerpos cetónicos proporcionan 50 a 60% de los requerimientos encefálicos de combustible. Sin embargo, algunas células cerebrales solo pueden utilizar glucosa. Para mantener un pequeño, pero esencial, suministro de glucosa en la sangre, se degrada proteína, abasteciendo de aminoácidos para la gluconeogénesis. Por esto, aunque los tejidos tratan de conservar proteínas y limitan la degradación de proteína tanto como es posible, el peso y el contenido de proteína de los órganos disminuyen durante la inanición.¹⁸

En esta etapa también se tienen signos detectables de deficiencias vitamínicas.

4. Varias semanas de ayuno:

En esta etapa hay una gran susceptibilidad a las enfermedades e infecciones. La deficiencia severa de nutrimentos se agrega al deficiente estado de salud. Las personas promedio tienen cerca de tres semanas de almacén de grasa y la velocidad de disminución de la grasa es constante. Al agotar los últimos almacenes de grasa, el cuerpo utiliza las proteínas, la última fuente de combustible. Algunos efectos de la acelerada degradación proteínica se pueden observar en niños que sufren de kwashiorkor.⁴

Desnutrición.

La desnutrición se dice que es el producto de desequilibrios entre rasgos genéticos, entre influencias ambientales o entre ambos.

Tipos de desnutrición: Marasmo y Kwashiorkor.

Las formas graves de desnutrición proteico-calórica como el marasmo y desnutrición proteínica como el kwashiorkor tienen antecedentes y características clínicas que las distinguen y se presentan a continuación. Es importante destacar que aun en la desnutrición severa, la velocidad de degradación proteínica se mantiene más o menos constante, mientras la velocidad de síntesis de reemplazo disminuye, como resultado de la baja disponibilidad de combustible metabólico.

10, 24

a) Marasmo

El marasmo es el problema nutricional más frecuente en países en desarrollo, generalmente se presenta en lactantes menores de un año de edad. Las situaciones que predisponen marasmo son una ingestión dietética muy deficiente prolongada además de infección, que suele ser de vías respiratorias inferiores, lo que produce carencia de proteínas y energía, que conservan su relación.

Los lactantes con este tipo de desnutrición tienen déficit de peso para la edad mayor a 40% o déficit del peso para la talla mayor a 30%, los tejidos muscular y adiposo están francamente consumidos o ausentes. El desarrollo es deficiente que conduce a falta de crecimiento. Hay una reducción general en la síntesis de proteína, que tiene como resultado deterioro considerable en la respuesta inmune. Mientras la condición avanza, hay pérdida de proteína del corazón, hígado y riñones, aunque se protegen las proteínas de tejidos esenciales, tanto como es posible.¹⁰

Un efecto más importante de la desnutrición proteico-calórica es el deterioro de la regeneración de la mucosa intestinal. Las vellosidades del intestino son más cortas que lo normal y en casos severos la mucosa intestinal es casi plana. De esta forma se reduce el área superficial de la mucosa intestinal, disminuyendo la absorción de los nutrientes disponibles en la dieta. Como resultado, la diarrea es una característica común.

A menudo hay alteraciones de líquidos y electrolitos, con deshidratación. La albúmina del suero se acerca a 2.5 g/dL. Hay hipotermia, retardo motor y debilidad. La atrofia muscular causa profusión abdominal. Hay predisposición a la hipoglucemia, con semblante característico de “viejito”, que se debe a la atrofia muscular y al consumo de la grasa de la bola adiposa de Bichat.^{12, 24}

Aunque la deficiencia de vitamina E y de biotina es rara en mamíferos incluyendo seres humanos, puede ocurrir en la desnutrición proteíno-energética grave. La deficiencia de biotina ocasiona la acumulación de compuestos acil-coenzima A muy tóxicos en el momento en que se ingieren proteínas al inicio de la recuperación.⁵

La prevención del marasmo se logra con la ingestión adecuada de leche materna, suplementada, a los tres meses, con alimentos apropiados.¹²

b) Kwashiorkor

El Kwashiorkor se presenta después del destete, es causado específicamente por falta de proteínas en la dieta, en relación al contenido de energía. La ingestión de alimentos amiláceos, como plátano, yuca o mandioca, y otras raíces y tubérculos es excesiva; esta dieta es producto de la pobreza, falta de conocimiento y desorganización familiar principalmente.¹² Se presenta generalmente en niños mayores de un año de edad a los que se les sustituye la leche por atoles principalmente de cereales, sin alimentación complementaria adecuada.

Además de la pérdida de tejido muscular, pérdida de mucosa intestinal y deterioro en la respuesta inmune, los niños con Kwashiorkor presentan características que distinguen esta enfermedad. La temperatura corporal puede ser subnormal, y presentan diarrea y vómitos intermitentes después de las comidas. El desarrollo motor está retardado y es común que haya infecciones.

Presentan retención de líquido o sea edema severo, asociado con una disminución en la concentración de proteínas del plasma; el edema subcutáneo oculta el desgaste muscular. Los

niños suelen tener cara de luna, con ojos, manos y pies hinchados. La albúmina del suero varía de 0.7 a 2 g/dL.

También muestra crecimiento del hígado por acumulación de cantidades anormales de grasa en el hígado. Puede haber o no deficiencia de peso y sí falta de crecimiento. La piel está afectada con diversas dermatosis, principalmente por deficiencia de niacina, vitamina A, infecciones bacterianas y/o micóticas. El pelo es escaso, reseco, áspero, decolorado, quebradizo y fácilmente desprendible. El niño casi siempre está muy irritable y/o indiferente al medio, con una expresión característica de miseria y lo que es muy importante hay falta de apetito.^{10, 24}

Hay una forma mixta de desnutrición, el **marasmo-kwashiorkor**; esta forma recoge características clínicas de las dos anteriores; las principales son el edema presente en el kwashiorkor, con o sin sus lesiones en la piel, y la pérdida de músculo y disminución de grasa subcutánea del marasmo. Cuando el edema desaparece durante tratamiento temprano, la apariencia del paciente se asemeja a la de marasmo. Se observan características bioquímicas de ambos, marasmo y kwashiorkor, pero predominan las alteraciones de la deficiencia proteínica severa. La mayoría de los niños con la forma mixta tiene alrededor de un año de edad y su pronóstico es malo ya que se trata generalmente de una forma crónica agudizada más grave y descompensada.^{23, 24}

Desnutrición en adultos.

La desnutrición es más frecuente en niños menores de cinco años, pues sus requerimientos nutrimentales se incrementan por el crecimiento, y este grupo no puede obtener alimento por sus propios medios, además de que si vive en condiciones poco higiénicas puede sufrir infecciones. Sin embargo, la población adolescente y adulta puede presentar desnutrición como desorden primario bajo ciertas condiciones de extrema privación de alimento, aunque es más frecuente que se presente como desorden secundario a otra enfermedad. Entre las situaciones en las que estos grupos se ven afectados destacan:

- Las hambrunas, que involucran a toda la población de un lugar en específico.
- El alcoholismo y la drogadicción.

- Las enfermedades que afectan el consumo de alimentos, o bien la absorción, utilización y excreción de nutrientes como el cancer, SIDA, enfermedades del hígado y endócrinas.
- Los padecimientos que condicionan el ingreso a una unidad hospitalaria. En este caso, la desnutrición puede ser producto de la anorexia inducida por la enfermedad o por el estrés catabólico debido a los procedimientos quirúrgicos o a situaciones postraumáticas (que tienen como resultado un aumento en el gasto metabólico y en la utilización de proteínas, un balance negativo de nitrógeno y alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono).
- La moda que se inclina por un culto a la delgadez.

En la desnutrición del adulto tipo kwashiorkor se presenta edema, hay una reducción visceral, en donde se afecta la albúmina sérica a pesar del mantenimiento de las medidas antropométricas. En el adulto con desnutrición tipo marasmo hay agotamiento de la proteína esquelética y la grasa pero con la conservación de la albúmina sérica y es producto de hambrunas.^{23, 25}

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Establecer la concentración de aminoácidos libres en plasma y en tejido muscular de dos grupos de ratas; el primero alimentado con una dieta de buena calidad proteínica denominado grupo Nutrido y el segundo con una dieta de mala calidad proteínica, o grupo Desnutrido.

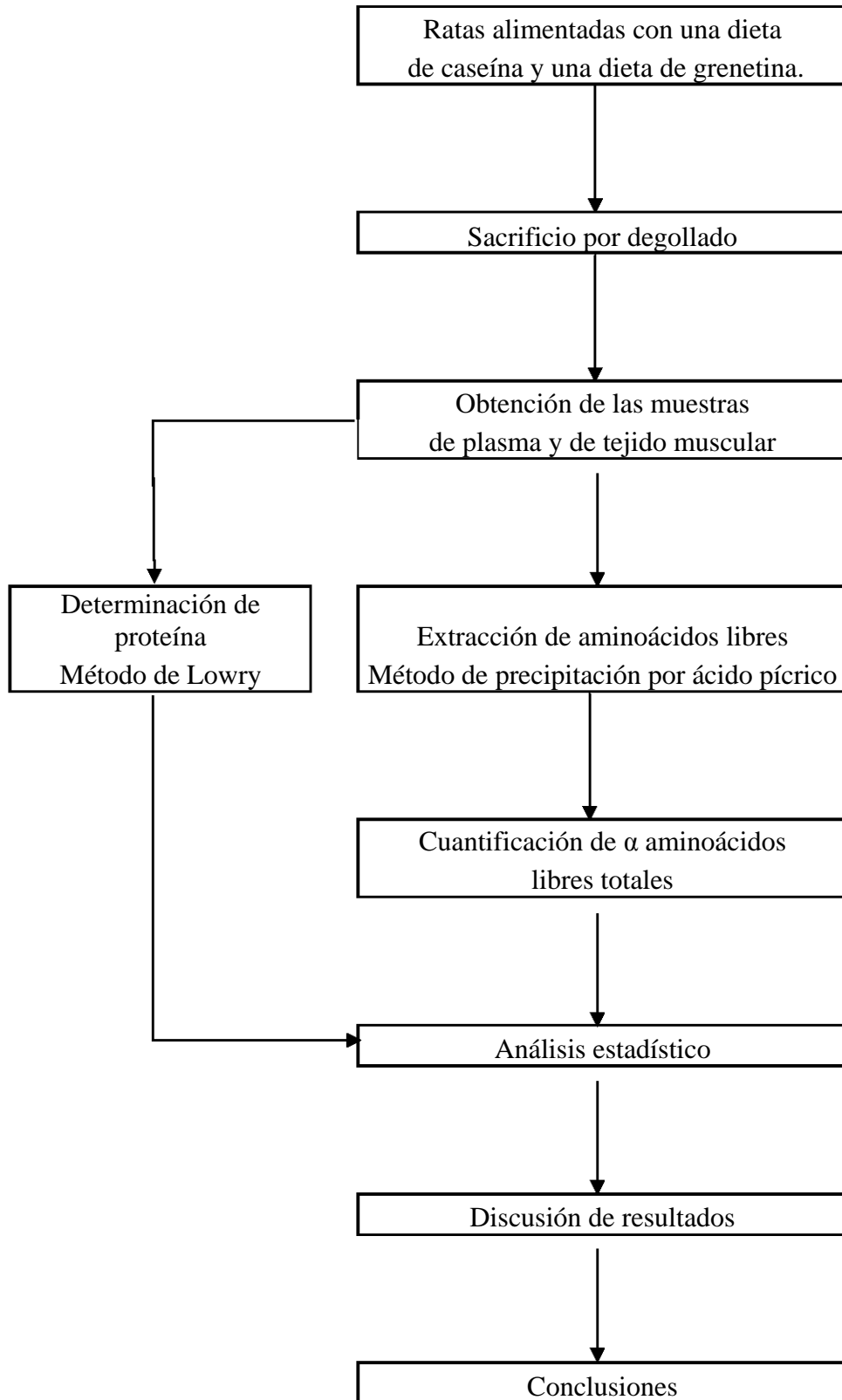
Objetivos particulares:

- Establecer una metodología sencilla para la extracción de aminoácidos libres de muestras biológicas.
- Realizar un procedimiento sencillo y rápido para la cuantificación de α -aminoácidos libres totales.
- Aplicar la metodología para la extracción y cuantificación de α -aminoácidos libres totales a muestras de tejido plasmático y muscular proveniente de ratas nutridas y desnutridas.
- Comparar los valores de α -aminoácidos libres totales obtenidos de las muestras de animales nutridos y desnutridos.

HIPÓTESIS

Si existe deficiencia en la calidad proteínica de las dietas con que se alimentan las ratas se provocará la aparición de los signos de desnutrición y también se encontrarán alteraciones en la cantidad de aminoácidos libres en el músculo y principalmente en el plasma del grupo desnutrido con respecto al grupo control.

PARTE EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

Determinación de la concentración de aminoácidos libres en plasma y músculo de rata

1. Las muestras

Para evaluar el efecto de la desnutrición en la concentración de aminoácidos libres se utilizaron dos grupos de ratas alimentadas con 2 diferentes tipos de dietas, cuya diferencia radicó en la calidad proteínica de cada una de ellas. El primer grupo denominado “Control” o “Nutrido”, compuesto por 9 ratas, fue alimentado con una dieta a base de caseína, considerada como una dieta de alta calidad proteínica. El segundo grupo nombrado “Desnutrido”, integrado por 12 ratas, fue alimentado con una dieta de gretina, de baja calidad proteínica. (Ver Anexos)

Esta evaluación biológica se llevó a cabo por alumnos de la asignatura de Nutrición I de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, siguiendo el método denominado REP (relación de eficiencia proteínica), el cual bajo condiciones estandarizadas da una medida confiable del valor nutricional de una dieta proteínica.²⁶

Las ratas se alimentaron durante 21 días, después de este tiempo se procedió a la obtención de las muestras de plasma y músculo de los dos grupos.

Es importante aclarar que la cantidad de animales en el grupo desnutrido fue mayor debido a que de antemano se sabía que las ratas de este grupo crecería de menor tamaño con respecto al control, y por tanto la cantidad de muestra que se podía obtener de ellas también era menor, además de que existía gran probabilidad de que hubiera algún deceso en este grupo.

1.1 Obtención de la muestra de plasma

Las 9 ratas del grupo control y las 10 ratas del grupo desnutrido (dos ratas del último grupo murieron antes de finalizar el periodo de alimentación) fueron sacrificadas por degollado. La sangre se recolectó en tubos que contenían heparina, para evitar la coagulación de la misma. Para el caso del grupo desnutrido, se obtuvo un pool de la sangre de 2 ratas para tener suficiente

cantidad de muestra, mientras que para el grupo control se obtuvo una muestra de sangre de cada rata. Posteriormente se centrifugó 15 minutos y se separó la fracción del plasma. El plasma se congeló a -70°C hasta el momento del análisis.

1.2 Obtención de la muestra de músculo

Inmediatamente después del sacrificio se removió el tejido muscular de las piernas tanto de las ratas del grupo control como las del grupo desnutrido. Para este último grupo, se juntó el tejido de 2 ratas sólo en 6 casos. El tejido muscular se congeló a -70°C hasta el momento del análisis.

2. Determinación de proteína por el método de Lowry²⁷

2.1 Fundamento

El método de Lowry es un método colorimétrico para cuantificar proteínas que consta de dos etapas. En la primera los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. El complejo cobre-proteína es de color azul claro. Con el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína se exponen los residuos de tirosina y triptofano que participan en el siguiente paso de la reacción.

La segunda etapa consiste en la reducción en medio alcalino del reactivo Folín-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico), de color amarillo, por los residuos de tirosina y triptofano actuando el cobre como catalizador, dando lugar a una coloración azul intenso. El complejo puede ser detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.²⁸

2.2 Material

- Balanza analítica Sartorius Mod. 022605
- Espectrofotómetro Sequoia Turner Mod. 340, con celdas de 1 cm
- Vortex.

- Matraces volumétricos de 10, 25, 50 y 100 mL
- Probeta graduada de 100 mL
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL
- Pipeta automática Finnpipette (100 µL)
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm
- Tubos de microfuga Eppendorff

2.3 Reactivos

- Albúmina sérica bovina (Sigma A 3425)
- Solución de hidróxido de sodio 0.8 M
- Reactivo A
- Reactivo B
- Reactivo mezcla
- Reactivo C

- **Solución estándar de albúmina sérica bovina (1 mg/mL)**

Disolver 10.43 mg de albúmina sérica bovina en agua destilada, llevando al aforo lentamente para evitar la formación de burbujas a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Almacenar en pequeños volúmenes la solución estándar que no vaya a ser usada de inmediato a -70°C.

- **Solución de hidróxido de sodio (0.8 mol NaOH/L)**

Disolver 32 g de NaOH en agua destilada y llevar al aforo a 1000 mL con el mismo disolvente.

- **Reactivo A**

Disolver 0.2 g de tartrato disódico dihidratado y 10 g de carbonato de sodio en 69 mL de NaOH 0.8 M, llevar al aforo a 100 mL con agua destilada.

- **Reactivo B**

Disolver 2 g de tartrato disódico dihidratado y 1 g de sulfato de cobre pentahidratado en 12.5 mL de NaOH 0.8 M, llevar al aforo a 100 mL con agua destilada.

Almacenar protegido de la luz.

- **Reactivo mezcla**

Incorporar 25 volúmenes de solución de NaOH 0.8 M, con 18 volúmenes del reactivo A y 2 volúmenes de reactivo B. Preparar al momento.

- **Reactivo C**

Diluir 1 volumen del reactivo comercial de Folín-Ciocalteu con 2 volúmenes de agua destilada. Preparar al momento.

2.4 Preparación de la curva patrón de albúmina

Para determinar el contenido de proteína se prepara una curva de calibración usando albúmina sérica bovina, cada vez que se realice el ensayo, ya que puede presentar comportamientos no lineales debido al mecanismo de reacción.

A partir de la solución estándar de albúmina (1 mg/mL) se prepara una solución de 100 µg/mL colocando 2.5 mL en un matraz de 25 mL y llevando al aforo con agua destilada. Se realizan diluciones con esa solución para obtener concentraciones de 5, 20, 40, 60 y 80 µg/mL de la siguiente manera: se colocan 0.5 mL en un matraz aforado de 10 mL y se lleva al aforo con agua destilada para obtener la concentración de 5 µg/mL, para el caso de la concentración 20 µg/mL se colocan 2 mL en el matraz aforado de 10 mL. Se realiza lo mismo con 4, 6 y 8 mL para las concentraciones de 40, 60, 80 µg/mL respectivamente.

En tubos de ensayo se colocan 2.5 mL de cada solución; para el blanco de reactivos se colocan 2.5 mL de agua; se añade a cada tubo 1.8 mL de reactivo mezcla y se agita en vortex. Inmediatamente se adiciona 1.2 mL de reactivo C y se agita nuevamente en el vortex. Por último se adiciona 1.2 mL de reactivo C y se agita vigorosamente. Los tubos se protegen de la luz y se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se determina la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm, ajustando el espectrofotómetro contra el blanco de reactivos.

Para obtener la curva patrón de albúmina sérica bovina se traza la gráfica de absorbancia contra concentración, expresando el valor como μg de proteína/mL. (Ver anexos)

2.5 Procedimiento

Para la determinación de proteína en plasma, se diluyó 0.1 mL de muestra en 50 mL de agua destilada. Posteriormente se diluyeron 5 mL de esta solución en 10 mL de agua destilada para tener al final una dilución de 1:1000

En el caso del tejido muscular, se realizaron homogeneizados con 0.1 g de muestra en 50 mL de agua destilada. Se centrifugó la muestra y se tomaron 3 mL de la solución para llevarlos a un aforo de 10 mL, teniendo al final una concentración de 6×10^{-4} g/mL.

En tubos de ensaye se colocan 2.5 mL de homogeneizado de la muestra de plasma o músculo y se agrega 1.8 mL del reactivo mezcla. Posteriormente se agita en el vórtex. Inmediatamente se adiciona 1.2 mL del reactivo C, y agitar nuevamente en el vórtex. Por último se agrega 1.2 mL del reactivo C y mezclar vigorosamente.

Los tubos preparados se dejan a temperatura ambiente durante 45 minutos, protegidos de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se leen la absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm, ajustando a cero con el blanco de reactivos.

2.6 Cálculos

La concentración de proteína de la muestra se lee a partir de la curva patrón, expresando los resultados en μg de proteína / mililitro ($\mu\text{g Pr- / mL}$), este resultado se multiplica por el factor de dilución de la alícuota de las soluciones de plasma o músculo, quedando expresado en miligramos de proteína / mililitro plasma (mg Pr- / mL) y en miligramos de proteína / g músculo (mg Pr- / g).

3. Extracción de aminoácidos libres ²⁹

Para extraer los aminoácidos libres de muestras de plasma y músculo de ratas nutridas y desnutridas se utilizó el ácido pícrico. Con anterioridad se comparó en el laboratorio donde se realizó esta investigación la metodología con otros ácidos (ácido tricloroacético, ácido perclórico) y se observó que con el ácido pícrico se obtiene una mayor concentración al extraer los α -aminoácidos libres totales. Además esta metodología se ha aplicado en otras investigaciones ^{20, 29} en muestras fisiológicas.

3.1 Fundamento

Las pequeñas estabilidades de la conformación de las proteínas nativas las convierten en muy susceptibles a la desnaturalización, es decir la precipitación irreversible, al alterarse el equilibrio de las débiles fuerzas no enlazantes que mantienen la conformación nativa. La estructura de la proteína nativa se despliega de manera cooperativa: Cualquier desplegamiento parcial de la estructura desestabiliza la estructura restante que debe colapsarse simultáneamente hasta adoptar el arrollamiento al azar. Las variaciones de pH alteran los estados de ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos, lo que cambia la distribución de carga de la proteína y los requerimientos para el enlace de hidrógeno. ⁹

3.2 Material

- Columna. Se hizo una adaptación utilizando una jeringa de plástico de 3 mL a la que se le colocó en el fondo una capa de lana de vidrio de 1 mm. Se colocan 0.5 g de resina que previamente fue suspendida en agua acidulada dejando un espacio de líquido sobre la resina.
- Centrífuga Dynac
- Tubos para centrífuga
- Pipetas graduadas de 1 y 10 mL
- Matraces volumétricos de 10 mL

3.3 Reactivos

- Ácido clorhídrico 0.02 N
- Ácido pícrico al 1% (2,4,6-trinitrofenol)
- Resina de intercambio iónico Dowex Ag 2-x8 malla 200-400

3.4 Extracción de aminoácidos libres del músculo.

1. Se descongela la muestra de tejido muscular y se homogeneiza con 10 mL de HCl 0.02 N
2. Se lleva 1 mL de muestra a un tubo de centrifuga y se adicionan 2 mL de ácido pícrico al 1% y se agita.
3. Se centrifuga por 30 minutos
4. El sobrenadante se pasa por la columna de resina de intercambio iónico ya preparada como se indicó antes.
5. Se lava 4 veces el tubo de centrifuga con pequeños volúmenes y 10 veces la columna con 0.5 mL de HCl 0.02 N
6. Se recibe el líquido incoloro en un matraz aforado de 10 mL y se afora con HCl 0.02 N
7. El extracto se congela en un vial seco, limpio y etiquetado.

3.5 Extracción de aminoácidos libres del plasma.

1. Se descongela la muestra de plasma.
2. Se lleva la muestra de volumen conocido a un tubo de centrifuga y se adicionan 2 mL de ácido pícrico al 1%
3. Se centrifuga por 30 minutos
4. El sobrenadante se pasa por la columna de resina de intercambio iónico ya preparada como se indicó antes.
5. Se lava 1 vez el tubo de centrifuga y 1 vez la columna con 0.5 mL de HCl 0.02 N
6. Se recibe el líquido incoloro y traslúcido en un matraz aforado de 5 mL y se afora con HCl 0.02 N
7. El extracto se congela en un vial seco, limpio y etiquetado.

4. Cuantificación de α -aminoácidos libres totales^{29, 30}

La cuantificación de α -aminoácidos libres totales se llevó a cabo mediante la prueba colorimétrica de la ninhidrina.

4.1 Fundamento.

Esta prueba se fundamenta en la reacción de la ninhidrina (hidrato de tricetohidrendeno) con los α -aminoácidos a un pH entre 4 y 8 para dar un compuesto de color morado. En la reacción inicial el α -aminoácido forma una base de Schiff (una cetimina) con la ninhidrina, la cual, a continuación, se descarboxila oxidativamente y forma una aldimina. Esta última se hidroliza y forma una amina intermedia que, a su vez, puede reaccionar directa o indirectamente con una segunda molécula de ninhidrina y forma la púrpura de Ruheman, intensamente coloreada. El átomo de nitrógeno de este pigmento procede del α -aminoácido. Las aminas secundarias, como la prolina e hidroxiprolina, reaccionan también con ninhidrina pero forman un compuesto amarillo. Las aminas primarias y los péptidos reaccionan también con la ninhidrina para formar la púrpura de Ruheman, pero en estos casos se pierde un protón en lugar de CO_2 , para formar la aldimina.⁹

4.2 Material

- Espectrofotómetro Sequoia Turner Mod. 340, con celdas de 1 cm
- Tubos de ensaye de 16 x 150
- Pipeta automática Finnpiptette (200-1000 μL)
- Baño de agua hirviendo

4.3 Reactivos

- DL-alanina (DL-ácido aminopropiónico) P.M. 89.1 (Sigma Chem, Co.)
- Ninhidrina (2,2 dihidroxi-1,3 indanediona) P.M. 178.1 (Sigma Chem, Co.)

Reactivo de ninhidrina.

Disolver 2.0 g de ninhidrina en 100 mL de solución amortiguadora de citrato 0.5 M pH 5.5

Solución amortiguadora de citrato 0.5 M pH 5.5

Colocar en un matraz aforado de 100 mL aproximadamente 16 mL de ácido cítrico 1 M y agregar 34 mL de citrato de sodio 1 M. Aforar a 100 mL con agua desionizada. Se ajusta el pH a 5.5

Estándar concentrado de alanina 1 mg/mL

Pesar 50 mg de alanina y aforar a 50 mL con agua desionizada

Solución estándar de alanina 100 µg/mL

Se diluye 1 mL de la solución concentrada de alanina a 10 mL en un matraz aforado

4.4 Preparación de la curva estándar de alanina

A partir de la solución estándar de alanina 100 µg/mL se realizan diluciones para tener soluciones de alanina de 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 µg/mL de la siguiente manera: se toman 2 mL de la solución estándar (100 µg/mL) , se colocan en un matraz aforado de 10 mL y se afora con agua destilada para obtener una concentración de 20 µg/mL; en otro matraz aforado de 10 mL se toman 2.5 mL de la solución estándar y se lleva al aforo con agua destilada para obtener la concentración de 25 µg/mL. Se realiza lo mismo con 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 mL para obtener las concentraciones de 30, 35, 40, 45 y 50 µg/mL respectivamente.

Se colocan 2 mL de cada una de las soluciones en tubos de ensaye y 2 mL de agua para el blanco de reactivos; se agrega 1 mL del reactivo de ninhidrina y 1 mL de HCl 0.02 N, mezclar vigorosamente. Tapar los tubos con canicas y colocarlos en un baño de agua a ebullición por 15 minutos. Enfriar y leer las absorbancias en el espectrofotómetro a 570 nm dentro de un espacio de tiempo no mayor a una hora.

En las concentraciones antes mencionadas se encontró un comportamiento lineal. (Ver anexos)

4.5 Procedimiento

En tubos de ensaye colocar 2 mL del extracto de aminoácidos de las muestras de músculo y de plasma. Agregar a cada tubo 1 mL de ninhidrina y 1 mL de HCl 0.02 N y agitar en vórtex. Los tubos se tapan con canicas y se colocan en un baño de agua a ebullición (94-95°C) por 15 minutos. A continuación se enfrían en agua corriente.

Leer las absorbancias en el espectrofotómetro a 570 nm ajustando con el blanco de reactivos, dentro de un espacio de tiempo no mayor a una hora.

4.6 Cálculos

A partir de la curva patrón se determina la concentración de aminoácidos libres de la solución de la muestra, resultado que se expresa en μg de aminoácidos libres / mL ($\mu\text{g aa/mL}$); esta cantidad se multiplica por el factor de dilución, tomando en cuenta el tratamiento al que fue sometida, expresando en miligramos de aminoácidos libres / mililitro (mg aa / mL). Finalmente este resultado se relaciona con la cantidad de proteína de la muestra, quedando expresado en miligramos de aminoácidos libres / gramos de proteína (mg aa / g Pr-).

A continuación se ejemplifica la fórmula para los cálculos.

$$\frac{(x \mu\text{g aa/mL}) (\text{Factor de dilución}) (1 \text{ mg}/1000 \mu\text{g})}{\text{g de proteína en la muestra}} = X \text{ mg aa / g Pr-}$$

5. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como promedio \pm la desviación estándar de la media. Los resultados de ambos grupos se compararon con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, las diferencias presentes a un nivel de significancia del 5% se consideraron como significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Cuantificación de proteína en plasma y músculo.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de proteína de la muestra de músculo por el método de Lowry.

Tabla 2. Cuantificación de proteína de las muestras de músculo.

Grupo	mg proteína/g
Grupo control *	79.419 \pm 15.508
Grupo desnutrido **	73.881 \pm 12.264

* Promedio de nueve ratas, cada una por triplicado \pm DE; CV < 20%

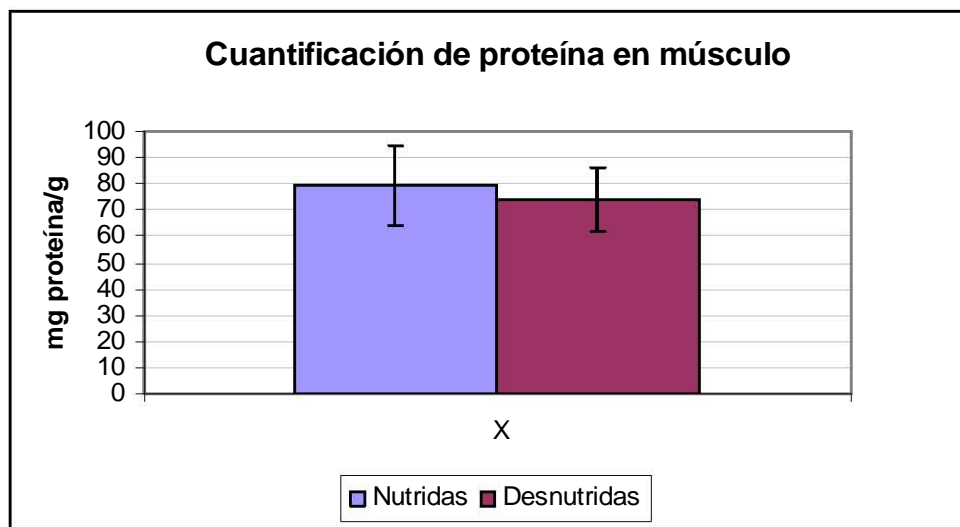
** Promedio de siete muestras proveniente de 10 ratas, cada una por triplicado \pm DE; CV < 20%

En el presente estudio se observa que la cantidad de proteína en el músculo de animales desnutridos es ligeramente menor al de animales nutridos, aunque esta diferencia no es significativa de acuerdo al análisis estadístico de varianza con una probabilidad del 5%. Los resultados reportados en la tabla 2 están de acuerdo con los obtenidos en el estudio efectuado por Almeida et al.³⁶ en el cual se comparó el perfil de proteínas miofibrilares en ratas bien alimentadas con respecto a desnutridas; los perfiles de proteínas miofibrilares fueron similares en ambos grupos experimentales y no se registró diferencia en la cantidad de cada una de las proteínas miofibrilares estudiadas: miosina de cadena pesada, proteína C, α -actinina, tropomiosina, troponina T. En el estudio efectuado por Ameredes et al.³¹ en el que se determinaron concentraciones de proteínas totales de músculo gastrocnemio superficial y profundo en ratas nutridas y con desnutrición crónica (24.5 meses) se observó que dichas concentraciones disminuyeron aunque no de manera significativa en tanto que en los músculos sóleo y extensor no se observaron alteraciones demostrables. En dicho estudio se encontró que la desnutrición crónica parece conducir a algunos músculos a expresar ciertas isoformas predominantes de la miosina de cadena pesada que utilizan un proceso más eficiente de oxidación para proveer energía lo cual permite una utilización eficiente de los substratos de

energía limitados. En el estudio de Poso et al.²² se encontró que en renos con desnutrición moderada las áreas de las fibras musculares se mantuvieron con respecto al grupo control.

Por el contrario, los resultados obtenidos por Almeida et al.³² en cabras desnutridas indican que hubo degradación proteínica de miofibrillas, tanto de la proteína C como de α -actinina, sugiriendo rompimiento muscular a nivel de la estructura donde se localizan estas proteínas.

Figura 1. Contenido de proteína de las muestras de músculo.



Parece ser que la diferencia en resultados depende del nivel de desnutrición, además de los cambios fisiológicos entre especies.

Se ha reportado que en la desnutrición la degradación proteínica permanece constante aunque existe una reducción general en la síntesis proteínica debido a las deficiencias de proteína y/o energía que sirven como combustible metabólico. Cabe recordar que las proteínas tienen funciones celulares y estructurales vitales, por tanto la adaptación a través del tiempo al estado de desnutrición permite limitar tanto como es posible que el organismo las utilice como combustible reduciendo al mínimo su consumo¹², aunque se observa que el peso y consecuentemente el contenido proteínico de los órganos disminuye¹⁸. Sin embargo, es importante hacer notar que en el presente estudio no había escasez de combustible energético en la dieta del grupo desnutrido, pues el aporte de energía y de proteína era igual que el grupo

control con el fin de observar solamente el efecto de la proteína de mala calidad (la dieta estaba preparada con gelatina que es deficiente en triptofano).

Al realizar la cuantificación de proteína en las muestras de plasma se obtuvieron los resultados de la tabla 3.

Tabla 3. Cuantificación de proteína de las muestras de plasma

Grupo	mg proteína/mL
Grupo control *	46.971 \pm 6.458 ^a
Grupo desnutrido **	34.702 \pm 2.258 ^b

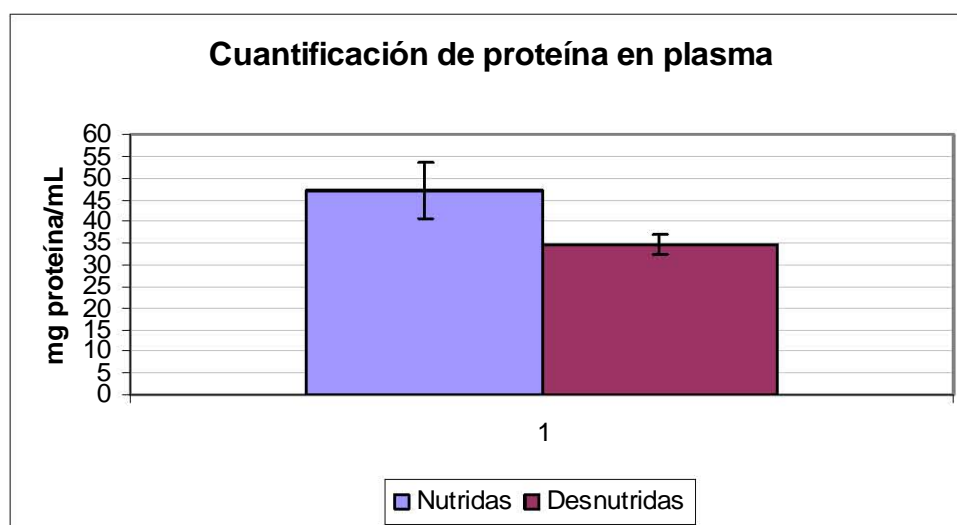
* Promedio de nueve ratas, cada una por triplicado \pm DE; CV < 20%

** Promedio de cinco muestras proveniente de 10 ratas, cada una por triplicado \pm DE; CV < 20%

Letras diferentes indican diferencias significativas, p < 5%

En el estado de desnutrición se presenta disminución de la concentración de proteínas plasmáticas ¹⁰. La determinación de las proteínas séricas se ha utilizado con frecuencia para evaluar afectación o recuperación del estado de nutrición ²⁴. En el estudio realizado por Vásquez, Gerardi y Salazar ³³ que evaluó el perfil bioquímico de niños en edad escolar, se encontró disminución significativa de la globulina sérica beta en el grupo de niños desnutridos, las globulinas alfa-1, alfa-2 y gama así como la albúmina se encontraron dentro del rango de referencia aunque se observa una tendencia a los valores cercanos al límite inferior en los niños desnutridos. El estudio antes mencionado está de acuerdo con los datos de la tabla 3 a los cuales se les realizó un análisis de varianza encontrando diferencia significativa a un nivel de significancia del 5%. En dichos resultados la cantidad de proteína en el grupo desnutrido es menor con respecto al grupo control en un 26%. En la figura 2 se ilustra el gráfico que se refiere a estos resultados.

Figura 2. Contenido de proteína en las muestras de plasma



En el estudio realizado por Millward y Lo ³⁴ evaluando el efecto del ayuno en la síntesis de proteína en ratas se observó que el ayuno de 3 días provocó una caída del 37% en la velocidad de síntesis proteínica, sin embargo un día de realimentación restauró el valor control.

De acuerdo a las condiciones de este estudio parece existir una disminución en la síntesis de proteínas plasmáticas, mientras que las proteínas musculares se conservan.

2. Extracción de aminoácidos libres en plasma y músculo.

Los resultados de la cuantificación de α -aminoácidos libres totales en músculo se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Contenido de α -aminoácidos libres totales en músculo

Grupo	mg aa / g Pr
Grupo control *	47.024 \pm 5.542 ^a
Grupo desnutrido **	41.988 \pm 6.553 ^b

* Promedio de nueve ratas, cada una por triplicado \pm DE; CV < 20%

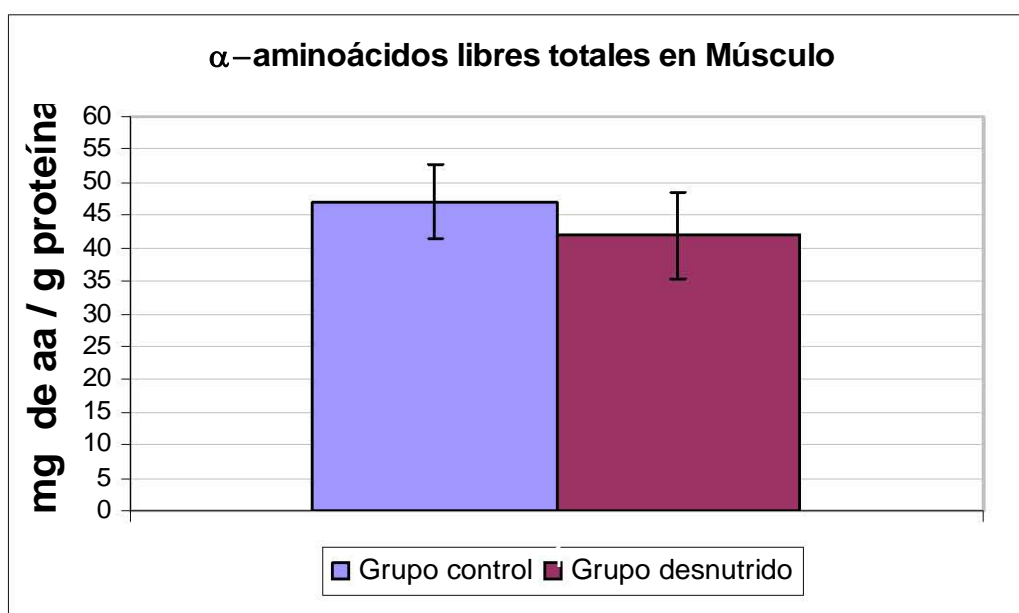
** Promedio de siete muestras proveniente de 10 ratas, cada una por triplicado \pm DE; CV < 20%

Letras diferentes indican diferencias significativas, p < 5%

Se puede apreciar que la cantidad de aminoácidos libres totales determinados en el músculo de ratas desnutridas es menor con respecto al grupo control, esta diferencia es significativa de acuerdo al análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia del 5%. El músculo contiene el pool más grande de aminoácidos libres del organismo por su gran extensión de tejido celular; es interesante observar los cambios que se producen durante el estado de desnutrición en este tejido, ya que entre otras actividades, el organismo le da importancia a su mantenimiento en la adaptación al estado carencial. Los cambios en los aminoácidos libres del músculo nos dan idea de su papel en la síntesis y degradación proteínica y su interrelación con el resto de los tejidos. Las concentraciones de α -aminoácidos libres totales presentadas en la tabla 4 están de acuerdo con el estudio realizado por Lunn et al ³⁵ en el que se observó que en un grupo de animales alimentados con una dieta baja en proteínas, la concentración de aminoácidos libres totales era menor al grupo control y solo presentaba una ligera diferencia con respecto a dicho grupo. En esa investigación se encontró que en el músculo la concentración de aminoácidos esenciales en animales desnutridos disminuye, mientras que los aminoácidos no esenciales aumentan. En la figura 3 se puede apreciar el gráfico que muestra de manera visual la tendencia mencionada.

En el músculo los aminoácidos de cadena ramificada se oxidan y sirven como fuente de nitrógeno para la transaminación de piruvato a alanina. ⁹

Figura 3. Cuantificación de α -aminoácidos libres totales en músculo.



Los resultados de la cuantificación de α -aminoácidos libres totales en plasma se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Contenido de α -aminoácidos libres totales en plasma

Grupo	mg aa / g Pr
Grupo control *	6.711 \pm 1.354 ^a
Grupo desnutrido **	13.135 \pm 4.031 ^b

* Promedio de nueve ratas, cada una por triplicado \pm DE; CV < 30%

** Promedio de cinco muestras proveniente de 10 ratas, cada una por triplicado \pm DE; CV < 30%

Letras diferentes indican diferencia significativa, $p < 5\%$

Se puede observar que la cantidad de α -aminoácidos libres totales en el plasma de animales desnutridos es mayor que en el grupo control. De acuerdo con el análisis de varianza ANOVA existe diferencia significativa a un nivel del 5%.

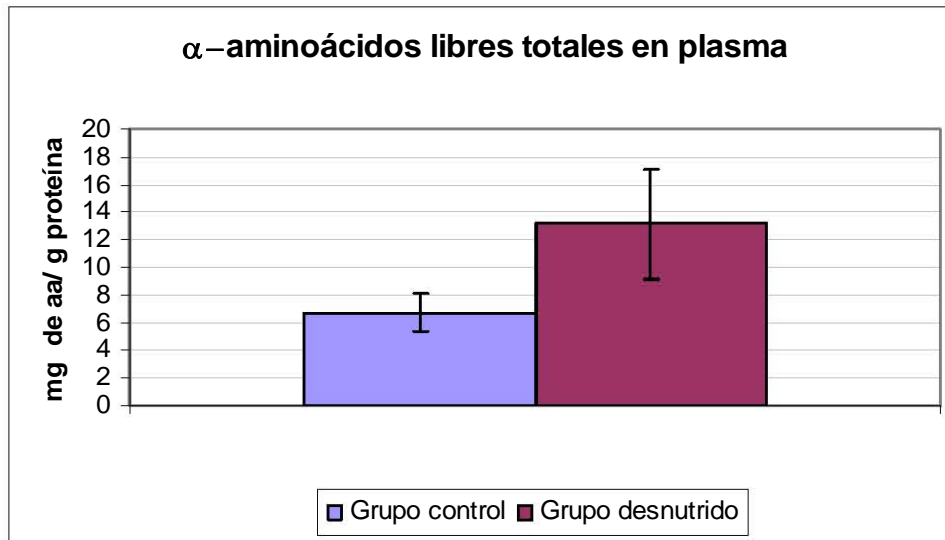
Los resultados presentados en la tabla 5 parecen estar de acuerdo con el trabajo de Almeida et al. ³⁶ en el que determinaron los perfiles de aminoácidos del suero en ratas nutridas y desnutridas; se observó que de los aminoácidos esenciales para la rata, el estado de desnutrición afectó sólo a isoleucina, tirosina, fenilalanina y metionina los cuales se encuentran en mayor concentración; también se observó que ningún aminoácido estudiado disminuyó su concentración como consecuencia de la desnutrición. En la figura 4 se puede apreciar de manera visual la tendencia de una mayor concentración de aminoácidos libres totales en el plasma de animales desnutridos.

Por el contrario, en el estudio realizado por Frenk et al. ²⁰ referente a los patrones plasmáticos de aminoácidos libres en la desnutrición de tercer grado se observó que durante la desnutrición proteico-calórica en niños existe depresión de la tasa de aminoácidos libres totales y de los niveles de aminoácidos específicos, particularmente valina, leucina, isoleucina y tirosina. Sin embargo algunos aminoácidos presentan concentraciones elevadas como glicina e histidina.

De manera general parece ser que en el Kwashiorkor hay una declinación en los valores plasmáticos de todos los aminoácidos esenciales, cualquiera que sea el aminoácido limitado en el alimento proteínico. Sin embargo la mayor parte de los aminoácidos no esenciales no está

reducida, y algunos pueden encontrarse anormalmente altos ¹². Esto se debe a que los aminoácidos no esenciales no pueden utilizarse para la síntesis de proteína debido a la deficiencia relativa del aminoácido limitante.

Figura 4. Cuantificación de α -aminoácidos libres totales en plasma



La cuantificación de los aminoácidos libres totales de las muestras fisiológicas estudiadas nos proporciona una idea general de los cambios que ocurren en el pool de aminoácidos, aunque no nos indica los cambios en las concentraciones individuales de aminoácidos que componen el pool.

La concentración de aminoácidos depende en parte del equilibrio entre la disponibilidad de proteínas y su utilización para el crecimiento, mantenimiento y catabolismo, aunque también se ve afectada por multitud de factores. Los aminoácidos libres del plasma, los intracelulares y los que se encuentran incorporados a proteínas celulares como las del músculo esquelético, se encuentran interrelacionados activamente. Posiblemente se esté reflejando el proceso de adaptación al estado carencial.

La disponibilidad de aminoácidos es un factor limitante para la síntesis proteínica, así como la concentración de cada uno de los diferentes aminoácidos en relación a los demás, es decir se deben encontrar en la proporción correcta que favorezca la síntesis proteínica.

Una dieta de mala calidad proteínica como la que se administró al grupo desnutrido, provoca cambios en la velocidad de oxidación de aminoácidos ya que se está modificando la actividad enzimática, la disponibilidad de sustrato, además de que existe alteración en las velocidades de catabolismo y existe disminución de síntesis proteínica. Estos ajustes fisiológicos son importantes en la conservación de nitrógeno así como de aminoácidos esenciales cuando se restringe la ingesta de alimento.

Cabe recordar que el pool de aminoácidos es un evento dinámico; el aumento en la concentración de aminoácidos libres totales en plasma determinados en el presente estudio puede reflejar: a) las diferencias en el balance entre el catabolismo proteínico y la degradación de los aminoácidos liberados para proporcionar energía, y b) baja capacidad para utilizar los aminoácidos para formación de proteína.

En los resultados que se presentan en las tablas 2 a 5 se puede apreciar que existe una desviación estándar considerablemente alta; en otros estudios de cuantificación de aminoácidos libres y proteínas (entre otros compuestos fisiológicos) se presenta la misma situación ^{18, 20, 37}; esto se debe a las diferencias fisiológicas que existen entre organismos vivos de la misma especie. Sin embargo, se recomienda efectuar un estudio con mayor número de muestras para efectuar un mejor análisis estadístico de los datos ³⁸.

CONCLUSIONES

- De acuerdo a las condiciones del presente estudio el grupo de animales desnutridos presenta diferencias significativas de los compuestos estudiados en el plasma: disminución de proteínas, aumento de α -aminoácidos libres totales y en el tejido muscular: disminución de α -aminoácidos libres totales.
- En el tejido muscular no hay diferencia significativa en la cantidad de proteína por gramo de tejido, sin embargo se observó disminución en el peso total porque se debe mantener la homeostasis y una forma de ahorro de proteína en el animal es deteniendo el crecimiento.
- El pool de aminoácidos libres del plasma y del tejido muscular son dinámicos, las concentraciones del grupo desnutrido determinadas en este estudio de dichos compuestos están respondiendo a la dieta de mala calidad proteínica y están reflejando las alteraciones en velocidades de catabolismo y síntesis de proteína, así como de degradación de aminoácidos.
- Los cambios que presentaron las ratas del grupo desnutrido con respecto al grupo control reflejan la adaptación que tiene el organismo al estado carencial.

ANEXOS

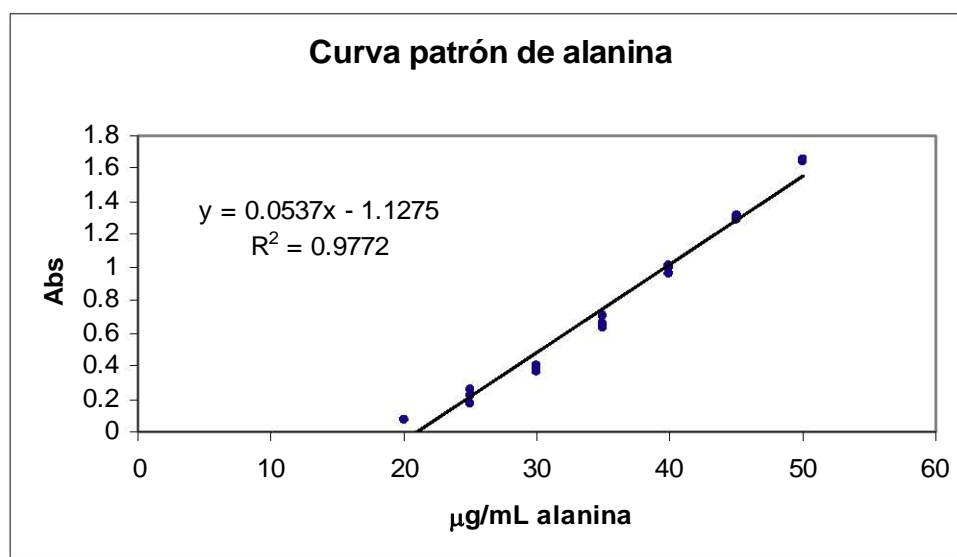
ANEXO 1.

Composición porcentual de las dietas con que se alimentaron las ratas.

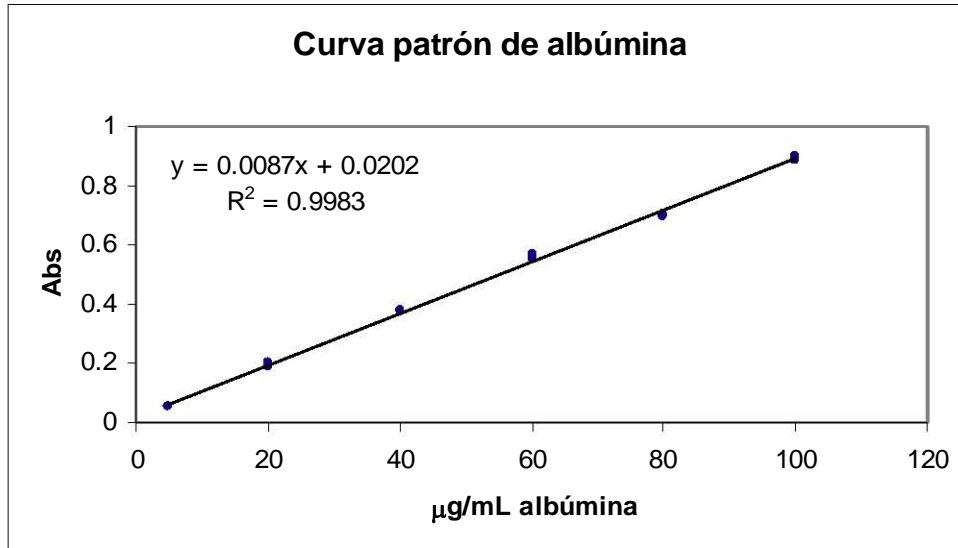
Dieta control		Dieta Grenetina	
Componente	%	Componente	%
Caseína (95.2% proteína)	10.5	Grenetina (95.2% proteína)	10.6
Sacarosa	22.0	Sacarosa	22.0
Dextrosa	19.0	Dextrosa	19.0
Dextrina	25.0	Dextrina	25.0
Manteca Vegetal	8.0	Manteca Vegetal	8.0
Aceite Vegetal	6.0	Aceite Vegetal	6.0
Mezcla de vitaminas	1.0	Mezcla de vitaminas	1.0
Mezcla de minerales	2.0	Mezcla de minerales	1.8
Colina (sol. al 50%)	0.4	Colina (sol. al 50%)	0.4
Celulosa	6.1	Celulosa	6.2

ANEXO 2.

1. Curva patrón de alanina y ecuación de regresión para la cuantificación de α -aminoácidos libres totales.



2. Curva patrón de albúmina y ecuación de regresión para la cuantificación de proteína por el método de Lowry.



BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez F, Aguilar R, Muñoz J. La desnutrición infantil en México. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1997; 54: 665-677.
2. Barquera S, River-Dommarco J, Gasca-García A. Políticas y programas de alimentación y nutrición en México. Salud Pública de México. 2001; 43: 464-477.
3. John D. Kirschmann. Nutrition almanac. EUA: Nutrition Search; 1975.
4. Insel P, Turner E, Ross D. Nutrition. EUA: American Dietetic Association; 2002.
5. Bourges H., Casanueva E, Rosado J. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. México: Médica Panamericana; 2005.
6. Brownsell V, Griffith C, Jones C. La ciencia aplicada al estudio de los alimentos. México: Diana; 1993.
7. Vishwanath M. Sardesai. Introduction to clinical nutrition. 2ª ed. EUA: M. Dekker; 2003.
8. Morrison R, Boyd R. Química orgánica. EUA: Addison-Wesley Iberoamericana; 1990.
9. Voet D, Voet J. Bioquímica. España: Ediciones Omega; 1992.
10. Bender D. Introduction for nutrition and metabolism. 2ª ed. Londres: Taylor and Francis; 1997.
11. Bondi A. Nutrición animal. España: Acribia; 1989.
12. Feldman E; tr por Merigo J. Principios de nutrición clínica. México: Manual Moderno; 1990.
13. Scriver C, Rosenberg L. Metabolismo de aminoácidos y sus trastornos. España: Científico-Médica; 1979.
14. Mente E, Deguara S, Begoña M, Houlihan D. White muscle free amino acid concentrations following feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture. 2003; 225: 133-147.
15. Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 9ª ed. México: Interamericana Mc Graw-Hill; 1997.
16. Zachmann M, Cleveland W, Sandberg D, Nyhan W. Concentrations of amino acids in plasma and muscle. Amer J. Dis Child. 1966; 112: 283-289

17. Fernández I, Cuadros L, González A. Effect of different matrices on physiological amino acids analysis by liquid chromatography: evaluation and correction of the matrix effect. *J. Chromatography*. 2004; 799: 73-79.
18. Dadmarz M, Burg C, Milakofsky L, Hofford J, Vogel W. Effects of stress on amino acids and related compounds in various tissues of fasted rats. *Life Sciences*. 1998; 63: 1485-1491.
19. Leeson T, Leeson R, Paparo A. *Texto/Atlas de histología*. México: Interamericana Mc Graw-Hill; 1990.
20. Frenk S, Villarreal I, Benítez S, Cuéllar A. Patrones plasmáticos de aminoácidos libres en la desnutrición de tercer grado del lactante y del preescolar. *Revista Médica del IMSS*. 1973; 12: 85-90.
21. Clark A, Umezawa C, Swendseid M. Plasma amino acid curve in rats force-fed a single meal lacking an essential amino acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 1973; 26:1175-1179.
22. Poso A, Heiskari U, Lindstrom M, Nieminen M, Soveri T. Muscle fibre growth in undernourished reindeer calves (*Rangifer tarandus tarandus* L.) during winter. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2001; 129: 495-500.
23. Shils M, Shike M. *Modern nutrition in health and disease*. EUA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
24. Vásquez E. Diagnóstico del estado nutricional en la infancia. *Acta Pediátrica de México*. 1998; 19: 1-11.
25. Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur A, Arroyo P. *Nutriología Médica*. 2ª ed. México: Médica Panamericana; 2001.
26. Pellet P, Young V. *Nutritional evaluation of protein foods*. E.U.A.: The United Nations University; 1980.
27. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
28. Bergmeyer H, Bergmeyer J, Grabl M. *Methods of enzymatic analysis*. 3a ed. Alemania: Verlagsgesellschaft; 1986.
29. Rodríguez A. *Medición de aminoácidos libres en plasma y líquido amniótico de mujeres embarazadas con retardo en el crecimiento normal del feto*. Tesis, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México; 1999.
30. Lee Y, Takahashi T. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin. *Analytical Biochemistry*. 1966; 14: 71-77.

31. Ameredes B, Watchko J, Daood M, Rosas F, Donahoe M, Rogers R. Growth hormone improves body mass recovery with refeeding after chronic undernutrition-induced muscle atrophy in male rats. *The Journal of Nutrition*. 1999; 129: 2264-2270.
32. Almeida A, Schwalbach L, De Waal H, Greyling J, Cardoso L. Serum amino acids and myofibrillar protein profiles in Boer goat bucks following undernutrition. *Small Ruminant Research*. 2004; 55: 141-147.
33. Vásquez S, Gerardi A, Salazar R. Estado nutricional y concentración de proteínas sericas en una población de niños (6-12 años) de Chacopata, Estado Sucre, Venezuela. *Acta Científica Venezolana*. 2004; 55: 56-61.
34. Lo C, Millward D. The effect of fasting and refeeding on whole-body protein synthesis in the rat. *Proc. Nutr. Soc.* 1977; 36: 137 A.
35. Lunn P, Whitehead R, Baker B. The relative effects of a low-protein-high-carbohydrate diet on the free amino acid composition of liver and muscle. *Br. J. Nutr.* 1976; 36: 219-230.
36. Almeida A, Van Harten S, Cardoso L. Serum amino acid and myofibrillar protein profiles of fed and underfed laboratory rats. *Nutrition Research*. 2002; 22: 1453-1459.
37. Alejandro I, Benitez S, Cuéllar A, Guízar-Vázquez J, Frenk S. La concentración plasmática de aminoácidos libres en niños normales. *Gac. Med. Mex.* 1981; 117: 58-61.
38. Armstrong M, Stave U. A study of plasma free amino acid levels.II. Normal Values for children and adults. *Metabolism*. 1973; 22: 561-569: