



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
I Z T A C A L A**

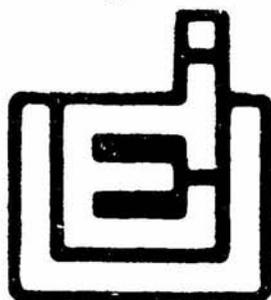
**EFEITOS DE LA DESNUTRICION SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA CREATINAFOSFOQUINASA (CPK)
DEL MUSCULO ESQUELETICO DE RATA.**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

P r e s e n t a

JAVIER ALONSO TRUJILLO



Los Reyes Iztacala

1989



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.

A la memoria de mis padres Hortensia y José

A mis hermanos Estela, Luis, Carmen y Angel

A mis profesores que desde la Preparatoria cultivaron en mí la semilla de la superación, especialmente a:

LIC. MARIO VASCONCELOS

DR. CARLOS PARRAO RODRIGUEZ

DR. SALVADOR LOPEZ ANTUNIANO

DR. JOSE SUAREZ

Al Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán,
especialmente a José Luis Silencio, Enrique Gómez y al
Dr. Hector Bourges.

A la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala,
principalmente a la Maestra Bertha Segura y al Dr. Ismael
Jiménez.

Finalmente, dedico este trabajo con mucho cariño a Elia,
Abraham y

ABREVIARURAS .

| | |
|------------------|--|
| A | ACTINA |
| ADP | ADENOSINDIFOSFATO |
| AMP | ADENOSINMONOFOSFATO |
| ATP | ADENOSINTRIFOSFATO |
| BS | SITIO DE UNION |
| C | CREATINA |
| Ca ⁺⁺ | CALCIO |
| CHCM | CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA |
| CK-BB | CREATINACINASA CEREBRAL |
| CK-MB | CREATINACINASA DE MIOCARDIO |
| CK-Mi | CREATINACINASA MITOCONDRIAL |
| CK-MM | CREATINACINASA DE MUSCULO ESQUELETICO |
| CP | CREATINAFOSFATO |
| CPK | CREATINAFOSFOQUINASA |
| D | DALTON |
| E.C. | COMISION DE ENZIMAS |
| EDTA | ETILENDIAMINO TETRA ACETICO |
| E.E. | ERROR ESTANDAR |
| G-6-P | GLUCOSA-6-FOSFATO |
| G-6-P-DH | GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA |
| H | HIDROGENO |

| | |
|-------|--|
| Hb | HEMOGLOBINA |
| HK | HEXOSAQUINASA |
| Hto | HEMATOCRITO |
| KCl | CLORURO DE POTASIO |
| LDH | LACTOSA DESHIDROGENASA |
| NAC | N-ACETIL-CISTEINA |
| NADP | DIHIDRONICOTINAMIDA ADENINDINUCLEOTIDO |
| NADPH | FOSFATO DE DIHIDRONICOTINAMIDA ADENINDINUCLEOTIDO |
| NS | NO SIGNIFICATIVO ESTADISTICAMENTE |
| TM | TROPOMIOSINA |
| TN | TROPONINA |
| TNc | SUBUNIDAD c DE TROPONINA |
| TNi | SUBUNIDAD i DE TROPONINA |
| TNt | SUBUNIDAD t DE TROPONINA |
| U.I. | UNIDADES INTERNACIONALES |

I N D I C E

| | Página |
|--|--------|
| Resúmen. | 1 |
| I.- Introducción. | 2 |
| 1.- Desnutrición. | |
| 1.1.- Definición. | 2 |
| 1.2.- Causas de la desnutrición. | 2 |
| 1.3.- Etapas de la desnutrición. | 3 |
| 1.4.- Consecuencias de la desnutrición. | 7 |
| 1.5.- Desnutrición en México. | 8 |
| 2.- Músculo esquelético. | |
| 2.1.- Características generales. | 10 |
| 2.2.- Proteínas de las sarcómeras y su participación en la contracción. | 10 |
| 2.3.- Importancia de la CPK. | 13 |
| II.- Antecedentes. | 18 |
| Objetivos. | 20 |
| III.- Material y Métodos. | 22 |
| IV.- Resultados y Discusión. | 30 |
| V.- Conclusiones. | 50 |
| VI.- Bibliografía. | 51 |

R E S U M E N .

El metabolismo protéico del músculo esquelético, así como su capacidad funcional, son sensibles a alteraciones en la alimentación, principalmente cuando esta es deficiente en calorías y proteínas.

Alimentando ratas Wistar con purina y maíz en forma de harina bajo el régimen "ad libitum", se obtuvieron lotes control y problema respectivamente con el propósito de determinar el efecto que provoca la desnutrición sobre la actividad enzimática de la Creatinafosfoquinasa (CPK) del músculo gastrocnémio.

Se valoraron algunos parámetros del estado nutricional (peso corporal y muscular, biometría hemática, química sanguínea y muscular) y se observó el efecto del maíz sobre el crecimiento de ~~los~~ animales.

Se observó un incremento estadísticamente significativo en la actividad enzimática de CPK en condiciones de desnutrición.

Se sugiere que el maíz como único alimento ingerido, provoca desnutrición; durante este proceso, el organismo tiende a mantener su homeostasis, conservando dentro del rango normal algunos parámetros metabólicos.

I.-Introducción.

1.- Desnutrición.

1.1.- Definición.

La desnutrición es un estado de deficiencia en la integridad estructural y/o del desarrollo, producida por una discrepancia entre el suministro de nutrimentos indispensables y la demanda específica de los mismos por parte de los tejidos. (Eslava,1984;Turner,1970) En función de lo anterior, se denomina individuo desnutrido a aquel que no ingiere cantidades suficientes y/o en proporciones adecuadas de nutrimentos. (Lowenberg,1970)

1.2.-Causas de la Desnutrición.

La desnutrición se presenta en todo el mundo, pero alcanza mayores proporciones en aquellos lugares donde prevalecen la pobreza, la ignorancia y la superstición. La desnutrición es causada por el balance negativo de uno o mas nutrimentos, lo cual se traduce en una gran variedad de cuadros clínicos, que dependen del órgano o tejido que se vea afectado en mayor proporción por la desnutrición en función del tipo de deficiencia nutricional sufrida y de las necesidades del individuo.

Bourges (1971), propone que los factores que determinan la desnutrición son los siguientes:

A.- Factores Relativos al Agente. Se refieren a la ausencia

cia o deficiencia absoluta o relativa de nutrimentos; tal ausencia o deficiencia es determinada por la calidad nutritiva de los alimentos.

B.- Factores Relativos al Huesped. Tienen su origen en el individuo mismo y son determinados por la edad, el sexo, la actividad y los estados patológicos de dicho individuo.

C.- Factores Relativos al Ambiente. Se relacionan con el medio ambiente que rodea al individuo y pueden dividirse en:

a) Disponibilidad de los alimentos. Esta depende de los factores geográficos, social, económico, capacidad de almacenamiento, conservación, transporte e industrialización de los alimentos, así como de la importación y exportación de los mismos.

b) Consumo de alimentos. Fuertemente influenciado por el factor económico y por los hábitos alimenticios del individuo.

1.3.- Etapas de la Desnutrición.

Durante la desnutrición, considerada como un proceso continuo y progresivo, pueden observarse las siguientes etapas:

A.- Etapa de Buena Nutrición. En esta etapa no hay desnutrición, ya que existe un equilibrio entre la ingestión

de alimento, las necesidades y las reservas nutritivas del organismo.

B.- Etapa de Disminución de Nutrimientos. La disminución en la cantidad y/o calidad del alimento ingerido produce un decremento de las reservas nutritivas y de la resistencia al stress, así como algunos cambios bioquímicos.

C.- Etapa de Mala Nutrición. Si el suministro de alimento sigue siendo deficiente, el metabolismo se vuelve anormal, lo cual origina alteraciones en principio funcionales y posteriormente anatómicas, que representan la lucha del organismo para adaptarse a condiciones nutricionales cada vez más precarias. (Bourges, 1981)

A partir de lo anterior se ve la necesidad de diagnosticar a tiempo la lesión clínica de origen nutricional. (Pearson, 1962; Pearson, 1966)

En la figura 1 se presentan las principales técnicas empleadas para valorar el estado nutricional del individuo;

a) En primer lugar se menciona la historia dietética, ya que mediante ésta pueden detectarse alteraciones nutricionales de tipo carencial dietético o condicionado. La primera se refiere a aquella situación en la que no

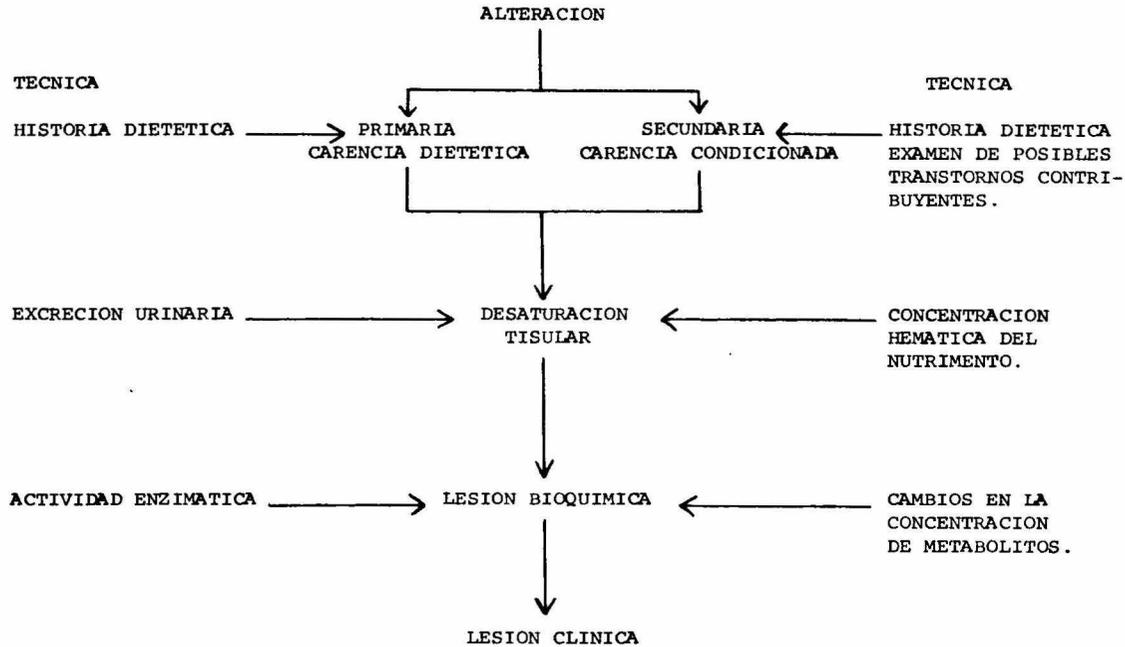


FIGURA 1.- Principales técnica utilizadas para valorar el estado nutricional de un individuo; en la parte central se señala la secuencia de alteraciones causadas por la desnutrición.

se ingieren las proporciones adecuadas de algun nutri--
mento por ignorancia y la segunda se refiere a la caren-
cia por alteraciones anatómicas y/o funcionales del in-
dividuo que condicionan el tipo de alimento que éste
puede ingerir.

b) Cuando se trata de valorar la desaturación tisular,
se emplean las técnicas de excreción urinaria y la de
concentración hemática del nutrimento.

La primera nos permite valorar la velocidad de excre--
ción de compuestos derivados del metabolismo en el su-
jeto desnutrido.

La segunda técnica nos permite conocer el nivel sangui-
neo del nutrimento. Ambos resultados deben ser relaciona-
dos entre sí.

c) Cuando queremos realizar un estudio nutricional mas
fino, podemos medir la actividad de algunas enzimas o la
concentración de algunos metabolitos en un tejido en par-
ticular, para de esta manera, determinar si existe o no
alguna lesión bioquímica que generalmente conducen a la
lesión clínica de origen nutricional.

Estos estudios son poco comunes en clínica en contraste
con los señalados en los incisos a y b, que en muchos
centros hospitalarios, constituyen la rutina de trabajo
del nutriólogo.

1.4.- Consecuencias de la Desnutrición.

Durante la vida de los mamíferos existen ciertos perio
dos, tales como el de la vida postnatal temprana, la ado-
lescencia y el embarazo, durante los cuales la ingestión
de alimento de calidad y en cantidad suficiente, es de
suma importancia, en función de que durante estos periodos
la actividad metabólica del organismo es muy elevada debido
a que sus sistemas celulares se encuentran en fase de pro-
liferación y/o diferenciación. Y si durante uno o mas de
estos periodos el individuo no recibe el aporte de alimento
necesario, se originará en él un subdesarrollo físico, in-
telectual, social y emocional (López Castro,1977) lo cual
generará una serie de alteraciones que pueden agruparse co
mo sigue:

A) Cambios sanguíneos.-Caracterizado por la disminución en:

- a) la concentración de Hb y proteínas totales.
- b) la actividad de algunas enzimas del eritrocito.
- c) la capacidad acarreadora del oxígeno.
- d) el hierro sérico.
- e) el Hto., además de un incremento en la actividad de
la Met-hemoglobina-reductasa.(Mason,1963; Hagler,1981)

B) Alteraciones musculares.- Russell y colaboradores (1984)
señalan que durante la desnutrición se produce una disminu-

ción en el peso del músculo, la velocidad de relajación y la concentración de creatinafosfato, así como un aumento en la concentración de calcio intracelular y un aspecto irregular de la banda Z en las fibras de contracción rápida, además de que la fatiga muscular ocurre a bajas frecuencias de estimulación.

C) Alteraciones a nivel poblacional.- Al realizar estudios sobre poblaciones de individuos desnutridos, Zubirán y colaboradores(1974) encuentran un elevado índice de mortalidad infantil, retraso en el desarrollo físico, mental, sociocultural y económico de los individuos, así como una menor resistencia a las infecciones por parte de esta población.

1.5.- Desnutrición en México.

A través de una serie de encuestas, realizadas en la República Mexicana, sobre los hábitos alimenticios de la población rural y urbana, Zubirán y cols.(1962,1963,1974) y Bourges (1971) han establecido lo siguiente:

- a) La alimentación de la mayoría de la población mexicana es deficiente en calorías, proteínas y gran parte de las vitaminas.
- b) En las áreas rurales, el 60% de las calorías se obtienen del maíz, cuyo consumo es dominante entre la población de dichas áreas.

c) La población del medio urbano consume una mayor variedad de alimentos, sin embargo, el maíz sigue siendo básico en su alimentación.

d) Tanto en la población rural como en la urbana, la calidad de la proteína ingerida es muy baja, debido a que los alimentos que constituyen la dieta básica de ambas poblaciones contienen cantidades muy escasas de los aminoácidos triptófano y metionina, los cuales son esenciales para el buen funcionamiento del organismo. (Mason, 1963)

e) Un alto porcentaje de mexicanos presenta desnutrición crónica, cuya presencia se manifiesta únicamente por defectos en el crecimiento y desarrollo y por una disminución en la resistencia a las infecciones, sin existir otras manifestaciones clínicas que permitan identificar el estado de deficiencia nutricional crónica. (Youmans, 1964)

2.- Músculo Esquelético.

2.1.- Características generales.

Gran parte del volumen de las células del músculo esquelético, lo ocupan sus elementos contráctiles, las miofibrillas; cada miofibrilla a su vez contiene múltiples miofilamentos.

Las miofibrillas están inmersas en el sarcoplasma, que es el fluido intracelular del músculo, y que contiene glucógeno, enzimas, productos fermentados, ATP, ADP, AMP, fosfatos, creatinafosfato y electrolitos inorgánicos además de varios aminoácidos y péptidos. (Lenhinger, 1982)

2.2.- Proteínas de las sarcómeros y su participación en la contracción.

Las células del músculo esquelético están constituidas por dos tipos de proteínas:

a) Proteínas solubles en el agua del sarcoplasma, las cuales constituyen del 20 al 25% de las proteínas totales del músculo.

b) Proteínas filamentosas insolubles en el agua; actina y miosina, que constituyen el aparato contráctil del músculo esquelético.

c) Otros componentes protéicos, como son tropomiosina, troponina, la proteína C, la proteína de la línea M, así como la alfa y beta actina. Algunos de estos elementos se

encuentran relacionados con la actividad contráctil. Resulta de gran interés la actividad enzimática de la miosina, que actúa como una ATPasa con las siguientes características:

- 1) Es estimulada por el calcio
- 2) Es inhibida por el magnesio
- 3) Es altamente sensible a la concentración de KCl
- 4) Exhibe dos pH óptimos: a 6.0 y a 9.5 respectivamente.

En la figura 2 se representa esquemáticamente la organización estructural de la actina y la miosina, mostrándose la localización del sitio de unión de ambas proteínas durante el deslizamiento.

Durante la relajación, el sarcoplasma posee una elevada concentración de $MgATP^{-2}$, mientras que la concentración de Ca^{++} está por debajo del umbral requerido para el inicio de la contracción. En esta situación, cada cabeza de miosina contiene dos moléculas de ATP ó ADP y fosfato fuertemente unidos, de tal manera que la cabeza de miosina es incapaz de reaccionar con la actina de los filamentos delgados cuyo sitio activo se encuentra cubierto por la tropomiosina (Fig. 2, a). Nótese que unidos a la tropomiosina se encuentran los tres componentes de la troponina (TN); TNT, TNC, y TNI, estando el componente TNI en relación directa con el

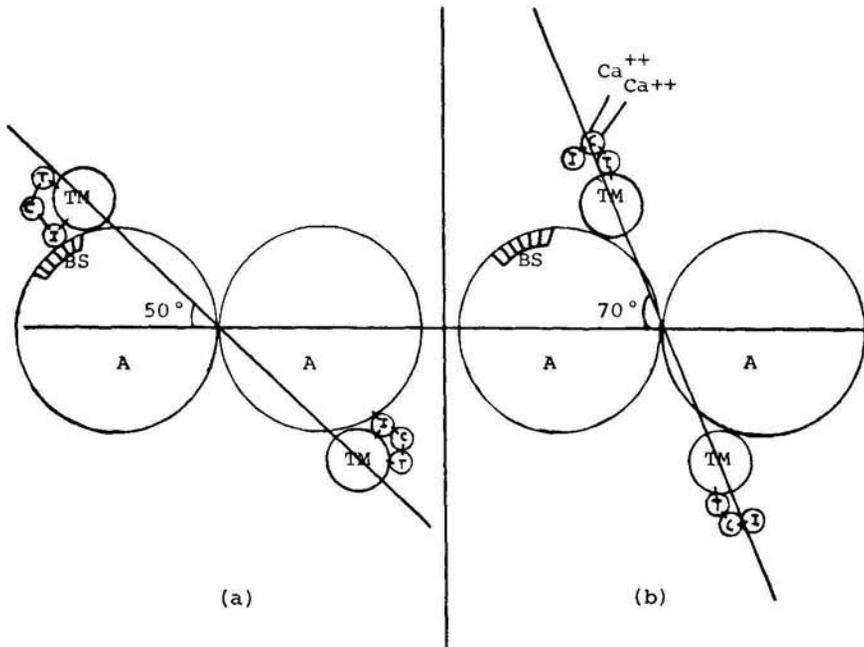


Figura 2.- Esquema del movimiento de la Tropomiosina (TM) durante la contracción muscular. La Troponina, compuesta por tres subunidades, T,I,C, esta asociada a la TM cubriendo el sitio de unión entre la Actina y la Miosina durante el reposo. Al unirse los iones Ca^{++} a la subunidad C, ocurre un cambio conformacional en la TM provocando la exposición del sitio de unión (BS) y con esto la formación de puentes cruzados.

sitio activo de la actina (Lenhinger, 1982).

Cuando se recibe la señal nerviosa, se libera Ca^{++} al sarcoplasma y debido a que el componente C de la troponina presenta una alta afinidad a este ión, se unen inmediatamente provocando un cambio en la conformación de la molécula de troponina (Fig. 2 b), dejando al descubierto el sitio activo de la actina al cual se une la cabeza de miosina que contiene ADP y fosfato unidos; la cabeza de miosina experimenta entonces un cambio de conformación que produce el deslizamiento de los filamentos (Hoyle, 1983)

2.3.- Importancia de la CPK.

Durante todo este proceso se requiere de energía, la cual es obtenida a partir del ATP presente en el sarcoplasma. Sin embargo, este compuesto proporciona sólo 1/5 de la energía necesaria durante la contracción muscular; el resto (4/5) de la energía se obtiene a partir de la creatinafosfato (compuesto que constituye el almacén energético de respaldo); este compuesto es catalizado por la creatinafosfoquinasa (CPK) según la reacción de Lohmann para dar origen al ATP necesario para mantener la contracción muscular. Esta reacción es reversible ya que el ATP formado durante la glucólisis o fosforilación oxidativa, reacciona con la creatina dando lugar a grandes cantidades de crea

tinofosfato. (Lenhinger, 1982; Cervantes, 1982)

El hecho de que exista un reservorio de energía, explica porque la concentración de ATP no disminuye durante periodos breves de contracción muscular, pero sí durante el ejercicio prolongado, en el que la concentración de este compuesto y de creatinafosfato se reducen significativamente.

Isoenzimas de CPK.

Las variedades moleculares de CPK se localizan en el citoplasma, mitocondria (cara externa de la membrana interna) y algunos autores, entre ellos Tietz (1985) las han localizado en la línea M de la sarcómera.

Las isoenzimas son denominadas de la siguiente manera:

CK-BB (CK-1).- Proviene del cerebro y presenta vestigios de actividad en el suero normal.

CK-MB (CK-2).- Se encuentra en el miocardio y es responsable de menos del 6% de la actividad total del suero normal.

CK-MM (CK-3).- Se le localiza en el músculo esquelético y es responsable del 94-96 % de la actividad enzimática presente en el suero normal.

Se han reportado isoenzimas no usuales que aparecen como interbandas entre CK-MB y CK-MM, que se cree son complejos de estas con inmunoglobulinas.

Se ha observado también CK mitocondrial que migra en sentido catódico a CK-MM y que podría ser una cuarta isoenzima (CK-Mi), ésta es un dímero, sin embargo a veces se comporta como oligómero y entonces es denominado Macro CK-tipo 2. (Tietz,1985)

Eppenberger y cols.(1964) analizaron mediante zimogramas^{*} la CPK citosólica del músculo de rata adulta, establecieron que es la más catódica y la describieron como un dímero de dos polipéptidos iguales con un peso molecular de 81,000 D (dalton). La más anódica fue la forma cerebral y la miocárdica se presentó en la parte intermedia.(Licea Ventura,1981)

Actividad enzimática de la CPK.

Generalmente la CPK es cuantificada en suero ya que representa el daño que sufren ciertas células, musculares en su mayoría, las cuales vierten su contenido citoplasmático al torrente circulatorio y de este modo, una medición en suero refleja el daño muscular.

El método para la determinación de la actividad enzimática de CPK más utilizado, es el método de Szasz (NAC-EDTA) a 25, 30 ó 37 °C, aunque también existen otros que se fundamentan en cambios de absorbancia detectables a longitud de

* Zimograma.-Análisis químico que se realiza de una sustancia para conocer el conjunto de precursores inactivos (zimógenos) que la componen.

onda cercana a los 340 nanómetros. (Tietz,1985; Tanzer,1959; Szasz,1979)

A través de numerosas investigaciones y experimentos clínicos, se han descrito una serie de eventos fisiológicos en los que se observan incrementos significativos de la actividad enzimática de la CPK sérica, por ejemplo;

--- En infarto al miocardio

--- En traumatismo muscular

--- En distrofia muscular

Por lo anterior, podemos reconocer que la actividad de la CPK esta íntimamente relacionada con la fisiología del músculo, y cada vez que este tejido sufre alguna alteración anatómica o funcional, la actividad enzimática se ve incrementada. (Krupp y Chalton,1985; Hughes,1974; Okinaka,et al, 1961; Pearson,1963; Okano,1987; Graves,1987.)

La alteración, puede ser observada en las primeras etapas del padecimiento, incluso en casos de distrofia preclínica, es decir, cuando el sujeto aún realiza sus actividades normalmente. (Andrew,1979)

Sin embargo, los estudios enzimáticos tambien pueden realizarse directamente en un tejido u órgano particular, mediante mecanismos que permitan vertir todo el contenido citoplasmático en soluciones que, adicionadas de amortiguadores adecuados, mantengan la estabilidad química del com-

puesto en cuestión, ya que es necesario proteger a las enzimas de la gran cantidad de ácido liberado desde las vacuolas o en la ruptura celular.

II.- Antecedentes.

Las alteraciones que sufre el metabolismo enzimático, en diferentes órganos, durante la desnutrición, ha sido tema de estudio para numerosos investigadores en las últimas 4 décadas. Así, Waterlow (1950), realizando sus observaciones en un grupo de niños desnutridos de Africa, observó una disminución en la actividad de la colin-esterasa hepática, en tanto que Niemeyer (1961) detecta una disminución en la actividad de la fosforilasa hepática y propone que ésta, puede ser una manifestación de la reducción en la síntesis protéica o bien consecuencia de la disminución de las proteínas hepáticas.

Por otra parte Stephen (1968), observó un incremento en la actividad de las enzimas sintetetasas en el hígado de ratas desnutridas, además de una disminución en las enzimas involucradas en el ciclo de la urea y sugiere que esto se debe a que durante la ingestión de una dieta con bajo contenido protéico, el organismo trata de optimizar la síntesis de proteínas mediante la utilización de la mayor parte de los aminoácidos que llegan al hígado, por lo cual aumenta la actividad de las sintetetasas; en tanto que trata de no eliminar compuestos protéicos en forma de urea, por lo cual se presenta una disminución en la actividad de las enzimas involucradas en el ciclo de la urea.

Waterlow (1969), supone que las modificaciones sufridas en la actividad enzimática de los diferentes órganos, constituyen una de las vías principales de la regulación metabólica, lo cual permite mantener la homeostasis del organismo durante la desnutrición y menciona la existencia de un proceso de adaptación a la desnutrición. Posteriormente, Olson (1975), reporta el decremento en la actividad enzimática de la Arginasa, Arginosuccinasa y Arginosuccinato-sintetasa, lo cual ocurre al mismo tiempo que se registra una disminución en la concentración de Nitrógeno urinario y con base en esto propone que los cambios observados en la actividad enzimática, durante la adaptación a la desnutrición, son inducidos por la disponibilidad del sustrato.

Por otro lado, López Castro (1977), observa que durante la realimentación de ratas desnutridas con dietas hipoprotéicas, el hígado presenta un tamaño superior al de las ratas controles (hepatomegalia) y sugiere que esto es debido a la acumulación de glucógeno, lo cual a su vez es causada por una disminución en la actividad de las enzimas alfa-glucano-fosforilasa y glucosa-6-fosfatasa, así como por el aumento en la actividad de la fosfoglucomutasa.

Hagler (1981), demuestra que la administración de una dieta deficiente en hierro, produce un decremento en la hemoglobina, la mioglobina del músculo esquelético y la con-

centración de citocromo C; todo esto, reduce la capacidad oxidativa del músculo. Así mismo muestra la presencia de una adaptación específica a la deficiencia de hierro.

Finalmente, Russell (1984) observa que la desnutrición hipocalórica crónica provoca una reducción de la actividad de las enzimas glicolíticas y oxidativas del músculo esquelético además de alteraciones en los soportes energéticos intracelulares y el flujo de Ca^{++} . Sugiere que estos cambios pueden explicar la disfunción mecánica observada en el músculo esquelético, durante la desnutrición.

En función de lo anterior, en el presente trabajo nos hemos planteado el siguiente Objetivo General:

*** Determinar la actividad de la enzima Creatinafosfoquinasa (CPK) en ratas desnutridas, poniendo especial énfasis en su relación con la actividad muscular. ***

Objetivos Particulares:

- 1.- Obtener curvas de crecimiento de ratas control y desnutridas.
- 2.- Adaptar el método de la determinación de CPK sérica (Lakeside) en homogenizado muscular.
- 3.- Evaluar el estado nutricional de la rata Wistar macho alimentada con Purina (testigo) y con harina de maíz (problema) de acuerdo con la medición de los siguien-

tes parámetros:

- a) Somatometría
- b) Biometría hemática
- c) Química sanguínea y muscular.

4.- Determinar la actividad enzimática de CPK muscular en ambos lotes y comparar los resultados.

III.- Material y Métodos.

Se utilizaron ratas machos de la variedad Wistar, que nacieron y se mantuvieron bajo condiciones constantes en el Bioterio General de la E.N.E.P. Iztacala.

El día del nacimiento (día cero postnatal), todas las camadas se ajustaron a 8 crías y fueron amamantadas por la madre hasta el día 21 postnatal. Durante el periodo comprendido entre los días 21 y 40 postnatales, las crías fueron alimentadas con Nutricubos Purina para rata.

A partir del día 40 postnatal se formaron dos lotes:

Lote A.- La alimentación con Nutricubos Purina se continuó hasta el día 100 postnatal. Los Nutricubos Purina contienen alrededor del 28 % de proteína, además de una gran variedad de vitaminas y minerales. (Purina S.A. de C.V.), por lo cual estos animales constituyen el grupo control.

Lote B.- Se alimentaron con una dieta de maíz en forma de harina (MINSA), desde el día 40 hasta el día 100 postnatal. Cabe señalar que el maíz amarillo, como el utilizado en la dieta experimental, contiene una baja concentración de proteínas (8.9 %); además de que la proteína predominante es la zeína, la cual posee una baja calidad nutritiva debido a la carencia de aminoácidos indispensables como son Triptófano y Lisina. (Hernández, M. et al, 1977; Llanos, 1984;

Wohl, et al, 1968)

Tanto los animales control como los problema tuvieron libre acceso al agua y al alimento.

El peso corporal de los animales control y experimental fué registrado periódicamente desde el dia cero hasta el 100 postnatal.

A los 100 días de edad, los animales de ambos lotes fueron sacrificados por decapitación (figura 3), con el objeto de coleccionar una cantidad de sangre suficiente para efectuar análisis posteriores. (Altman y Melby,1976;Laird, 1972; Mitruka y Rawnsley,1977; Vondruska y Greco,1973).

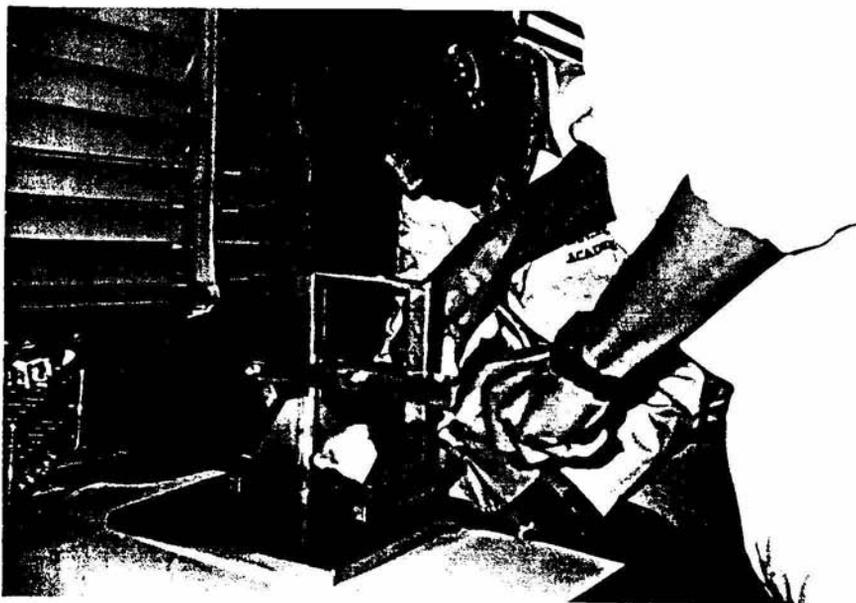


Figura 3.- Sacrificio de los organismos por decapitación.

En seguida se efectuó la disección y aislamiento de los músculos gastrocnémio derecho e izquierdo, cuyos pesos húmedos fueron registrados en una balanza Dial-o-Gram, Ohaus. (Figura 4)

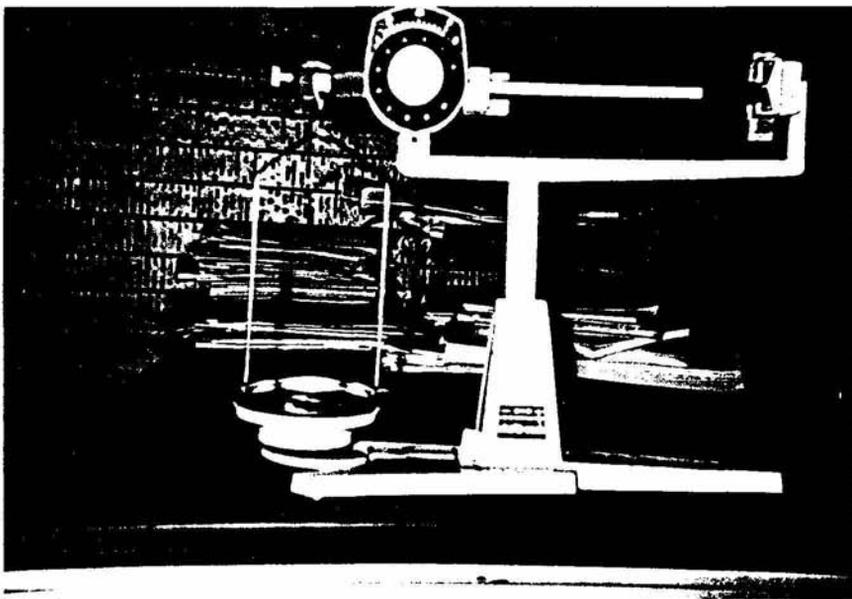


Figura 4.- Balanza empleada para la determinación del peso muscular.

Una vez que el músculo fué aislado y pesado, se colocó en una solución Buffer de fosfatos (pH= 7.3) y se mantuvo en congelación hasta el momento de efectuar la cuan-

tificación de la actividad enzimática de la CPK, la concentración de proteínas y de creatina musculares. Con el objeto de medir dichos parámetros, el músculo fué homogenizado mediante un rotor modelo VM de Lourdes Instruments Corp. (Figura 5)

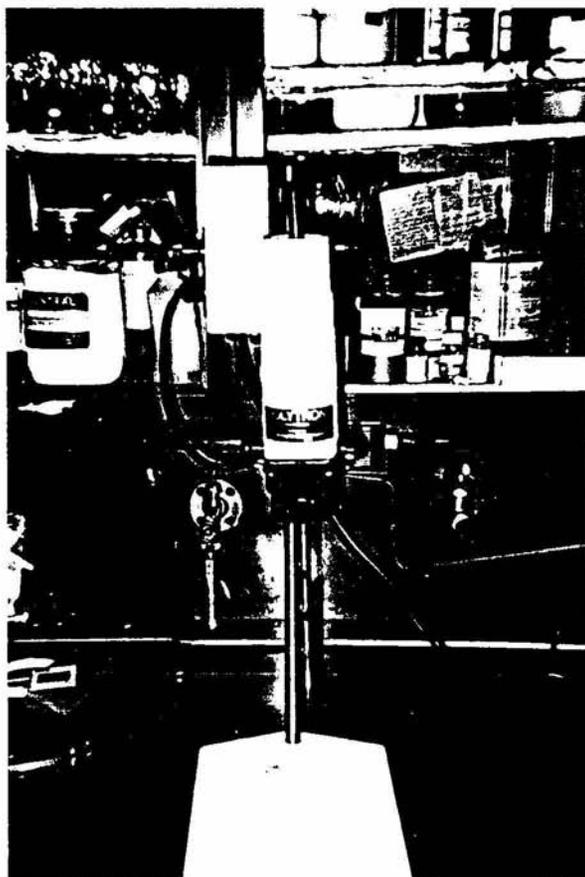


Figura 5.- Polytron. Instrumento utilizado en la homogenización del tejido muscular.

El homogenizado obtenido se centrifugó inmediatamente a 18,000 R.P.M. durante 40 minutos, utilizando para ello una centrifuga refrigerante modelo J-21 B de Beckman. (Figura 6)

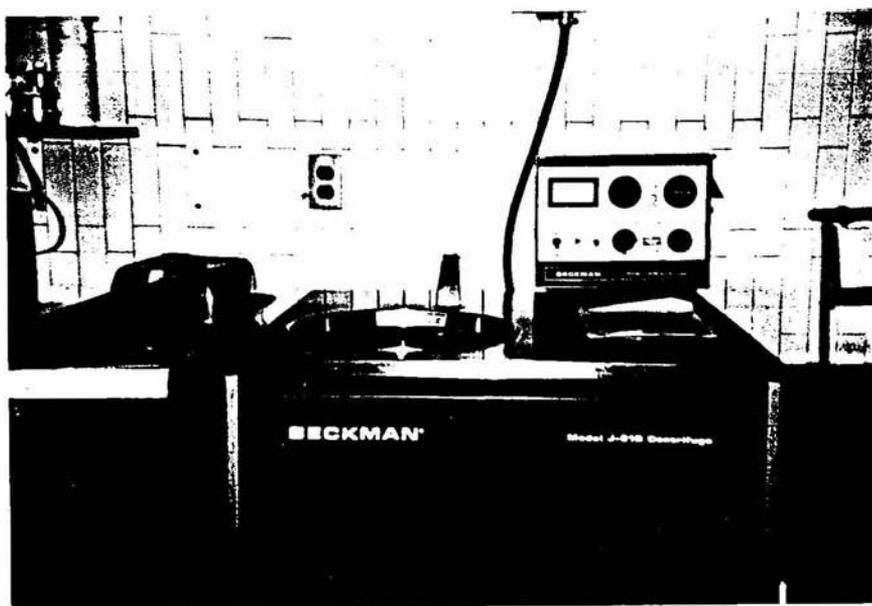
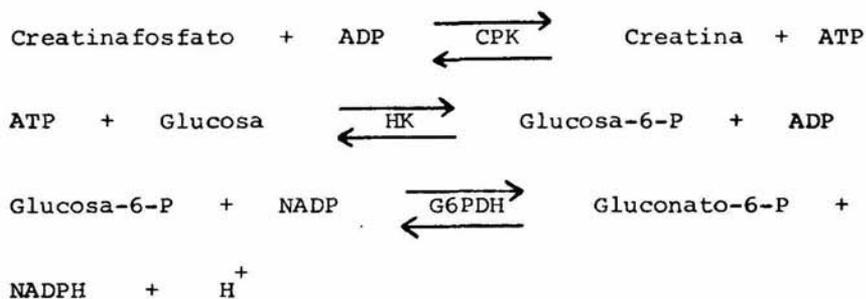


Figura 6.- Centrifuga refrigerante utilizada con el propósito de obtener un sobrenadante rico en enzima CPK.

Se separó el sobrenadante y se cuantificó:

1.- La actividad enzimática de CPK, mediante el empleo del

Kit Monotest-b CK-NAC activado, prueba UV de Lakeside, el cual utiliza como sustrato a la creatinafosfato, de acuerdo a las siguientes reacciones:



De manera que mediante un espectrofotómetro DU-70 de Beckman a una longitud de onda de 340 nm (Figura 7), se midió la aparición de NADPH + H⁺ en la mezcla reactiva, para de esta manera cuantificar la actividad enzimática de la CPK.

Cabe señalar, que para medir la actividad de la CPK, fué necesario realizar una dilución 1:100 del sobrenadante ya que éste presentó una actividad enzimática tan elevada que no fué posible leerla directamente en el espectrofotómetro. (Oliver, 1955; Recommendation of the German Soc., 1977)

2.- Proteínas musculares, para lo cual se empleó el método de Lowry (Whitaker, 1972; Lowry, et al, 1951; Hartree, 1972; y Gonzalez Moreno y Peñaloza Castro, 1981)

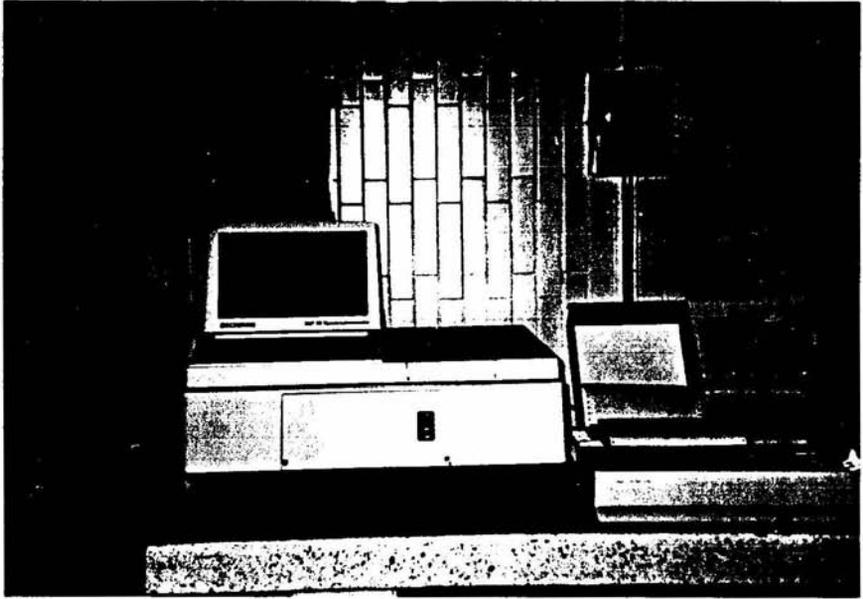


Figura 7.- Espectrofotómetro Beckman DU-70 utilizado en la determinación de la actividad enzimática de la CPK.

3.- Creatina muscular, utilizando el método de Jaffé, según la técnica de Tierney y Peters. (Lynch, et al, 1969; Tierney y Peters, 1943)

Por otra parte, utilizando la sangre colectada después de la decapitación, se midieron los parámetros que a continuación se mencionan:

- 1.- Biometría hemática.
 - 1.1.- Determinación de hemoglobina. (Lynch, 1969)
 - 1.2.- Medición del Microhematocríto. (Lynch, 1969)
 - 1.3.- Cuenta leucocitaria. (Lynch, 1969)
- 2.- Determinación de la glucosa, mediante el método de la orto-toluidina. (Lynch, 1969)
- 3.- Cuantificación de proteínas totales, utilizando el método de Biuret. (Lynch, 1969; Whitaker, 1972; Gornall, et al, 1949)
- 4.- Determinación de la albúmina, usando el método del verde de bromocresol. (Lynch, 1969)

La medición de estos parámetros se efectuó con el objeto de establecer claramente el grado de desnutrición logrado mediante la dieta de maíz.

IV.- Resultados y Discusión.

1.- Alteraciones en los pesos corporal total y del músculo gastrocnémio de ratas normales y desnutridas.

Con el objeto de conocer los efectos de la dieta de maíz sobre los organismos problema, se elaboró una curva de crecimiento (Figura 8), en la cual se observan cambios en el peso corporal que experimentaron tanto el lote alimentado con nutricubos purina (control), como el lote alimentado con maíz; nótese que los organismos de este último lote, prácticamente dejaron de crecer desde el momento en que se inició la alimentación con maíz.

En la figura 9 se han representado los pesos corporal y muscular promedio de las ratas control y desnutridas a los 100 días de edad. El lote de animales alimentados con la dieta experimental tuvo una reducción del 33% ($t: 7,9; \alpha = 0.05$), y 39% ($t: 14,18; \alpha = 0.05$) en los pesos corporal y muscular respectivamente. Esta pérdida de peso junto con la reducción en la talla de los organismos, puede asociarse con el hecho de que el maíz carece de aminoácidos indispensables como la Lisina y el Trptófano, así como la vitamina A (retinol), sustancia que desempeña un importante papel durante el crecimiento del organismo y que se pierde en el proceso de nixtamalización. (Hernández, et al,

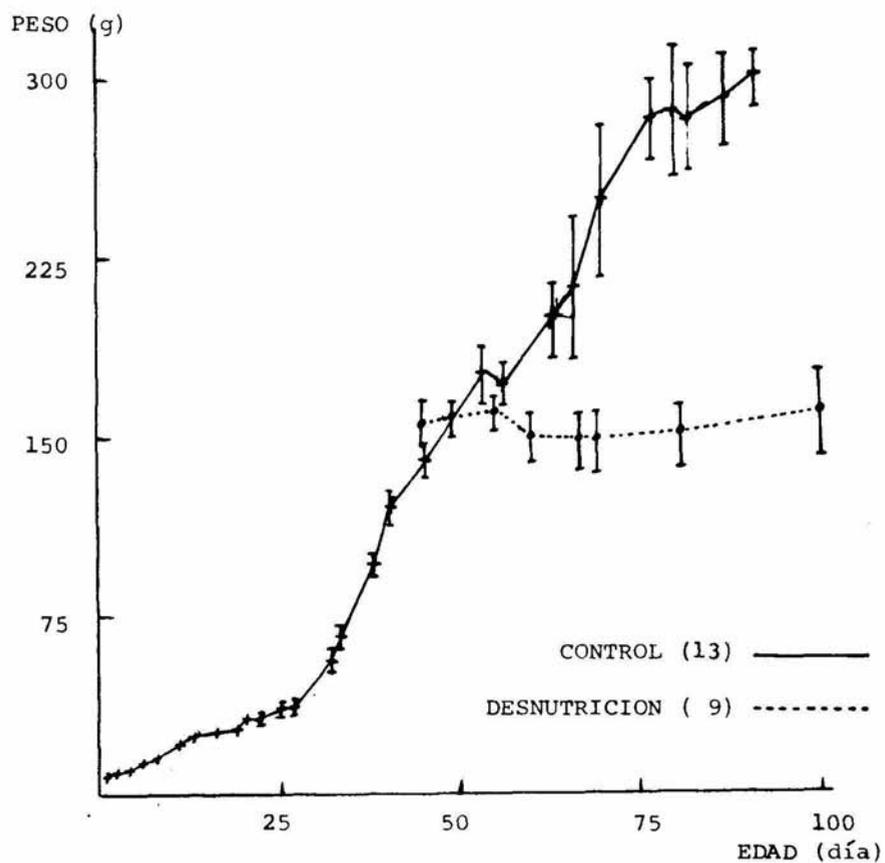


Figura 8.- Curva de crecimiento de los animales control y experimental (alimentados con harina de maíz) Entre paréntesis se indica el tamaño de la muestra.

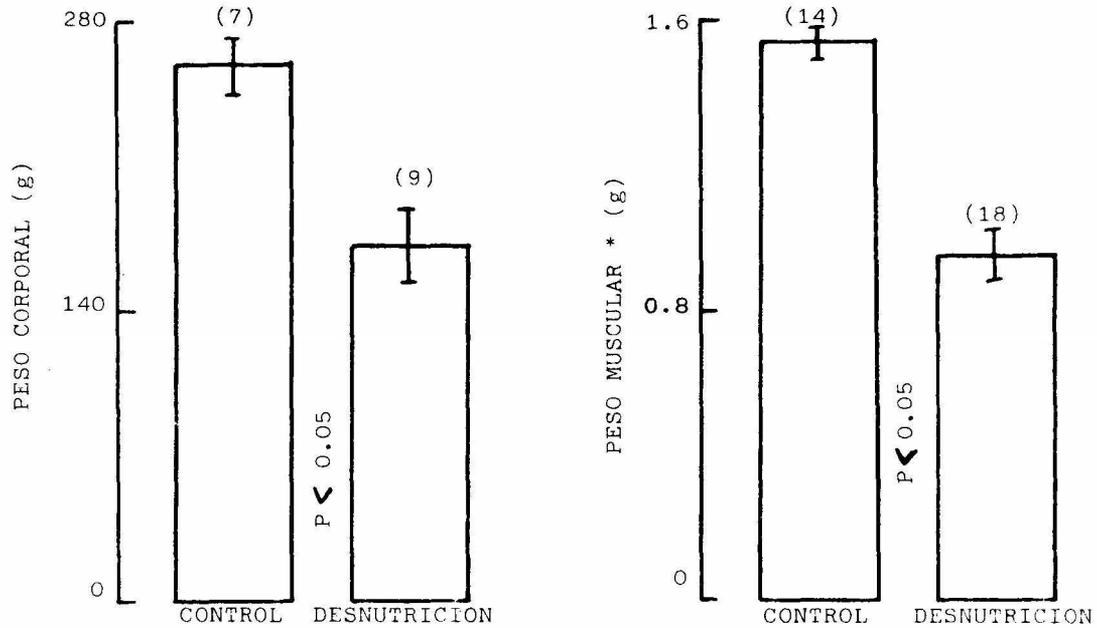


FIG.9.- EFECTO DE LA DIETA HIPOPROTEICA SOBRE EL PESO CORPORAL Y MUSCULAR* DE RATAS DE 100 DIAS DE EDAD (MEDIA + E.E.) ENTRE PARENTESIS SE SEÑALA EL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

* MUSCULO GASTROCNEMIO.

1977; Krause y Hunscher, 1975; Llanos, 1984; Nevin y Vernon, 1976; Hodges, 1979; Icaza y Behar, 1988).

La pérdida de peso tanto corporal como muscular en ausencia de edema (como en el caso de nuestros organismos problema), es un buen indicador del grado de desnutrición logrado con la dieta experimental; sin embargo mediante la medición de otros parámetros tales como la biometría hemática, glucosa, proteínas totales y albúmina se cuenta con una valoración más completa del estado nutricional del organismo.

2.- Biometría Hemática en ratas normales y desnutridas:
Al realizar la biometría hemática se obtuvieron disminuciones, estadísticamente significativas ($t:7,7; \alpha=0.05$), en los valores de hemoglobina y hematocrito del lote experimental. (Figura 10)

Estos resultados nos indican la presencia de un estado de anemia en los organismos sometidos a la dieta de maíz. La presencia de éste estado es confirmada por el hecho de que los organismos experimentales presentan una reducción en la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Figura 11). (López Hernández, 1987; Sanderson, 1981).

La disminución del hematocrito durante la desnutrición puede explicarse de la siguiente manera:

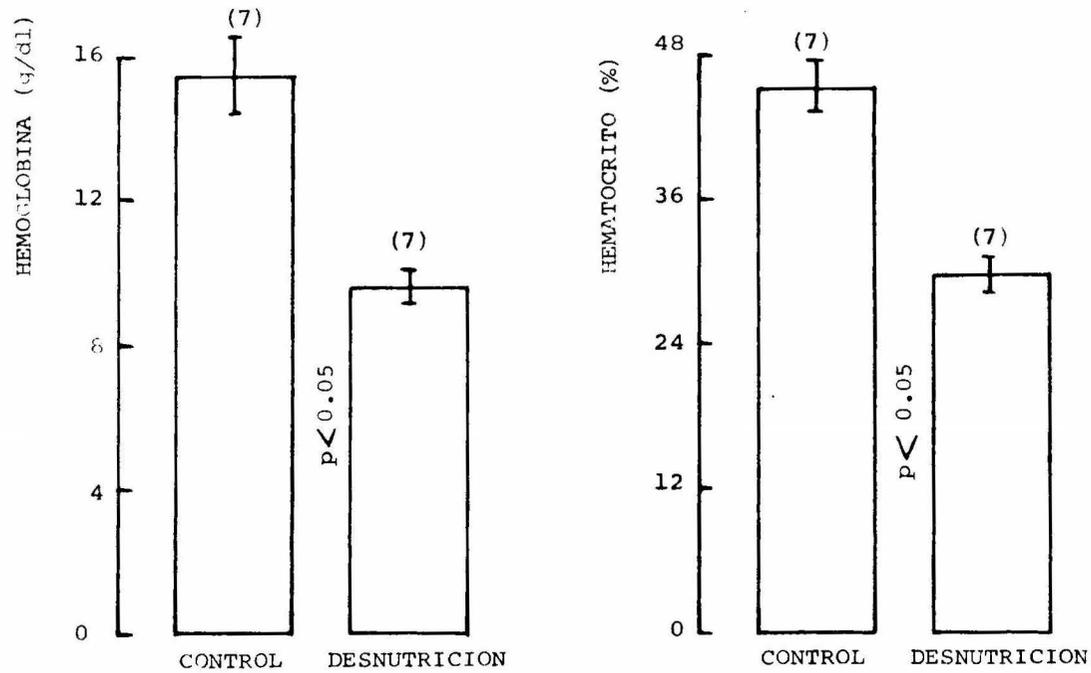


Figura 10 .-Resultados de los parámetros hematológicos. Se observa el efecto provocado por la dieta de maíz. (Media \pm Error estandar.)
Entre paréntesis se indica el tamaño de la muestra.

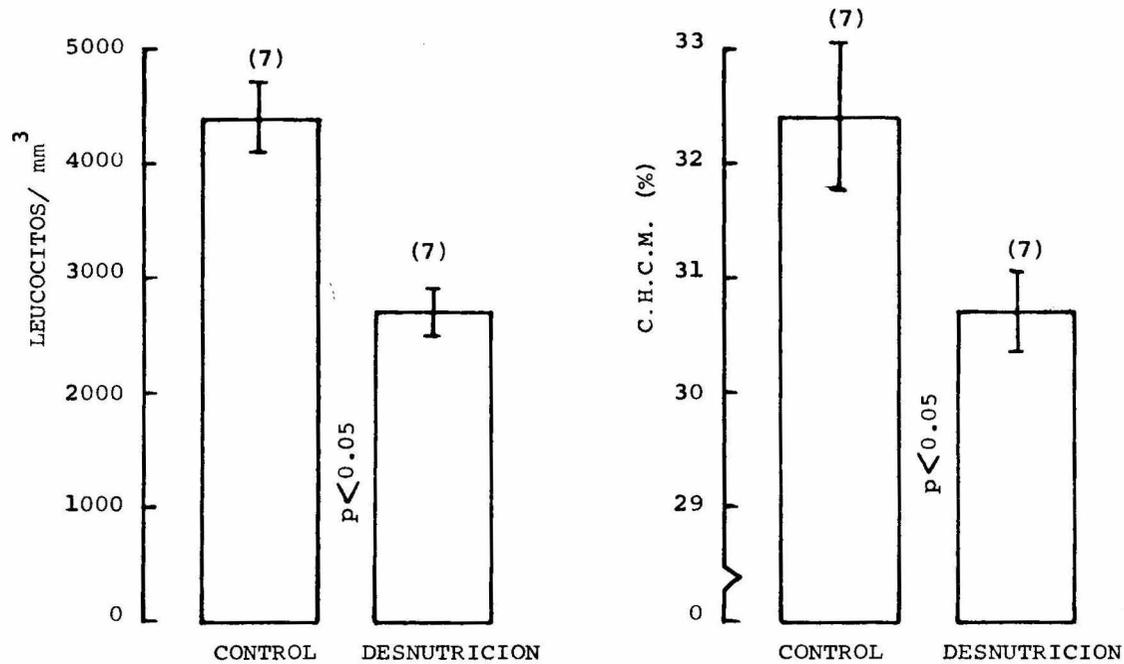


Figura 11.- Resultados de la cuenta leucocitaria y de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media. Observese el estado de leucopenia asi como el valor subnormal de la C.H.C.M. en los organismos desnutridos. (Media \pm Error estandar) Entre paréntesis se indica el tamaño de la muestra.

- a) Por un aumento en la lisis de los eritrocitos, así como por una reducción en la vida media de los mismos. (Mason, 1963; Ganong, 1986).
- b) Por una disminución en el efecto estimulante de la eritropoyetina, la cual produce que los eritrocitos no alcancen su diferenciación total. (Krause y Hunscher, 1975; Ganong, 1986).
- c) Por la carencia de ácido ascórbico en la harina de maíz, lo cual impide la adecuada absorción de hierro. (Hernández et al, 1977; Krause y Hunscher, 1975; Nevin y Vernon, 1976).

Al realizar la cuenta de leucocitos, se observó que las ratas desnutridas presentaron valores inferiores a los obtenidos en los animales control (Figura 11); esto puede asociarse con la existencia de una reducción en el AMP cíclico, ya que como se sabe, éste compuesto regula la mitosis en los leucocitos. (Waterlow.J., 1975) Por otra parte, Waterlow J. (1975) también ha sugerido que durante la desnutrición se reducen la capacidad fagocítica y la síntesis de anticuerpos por parte de los leucocitos.

3.- Contenido de metabolitos séricos en ratas control y desnutridas.

En la figura 12 se han representado los resultados obtenidos al cuantificar las concentraciones de glucosa, pro-

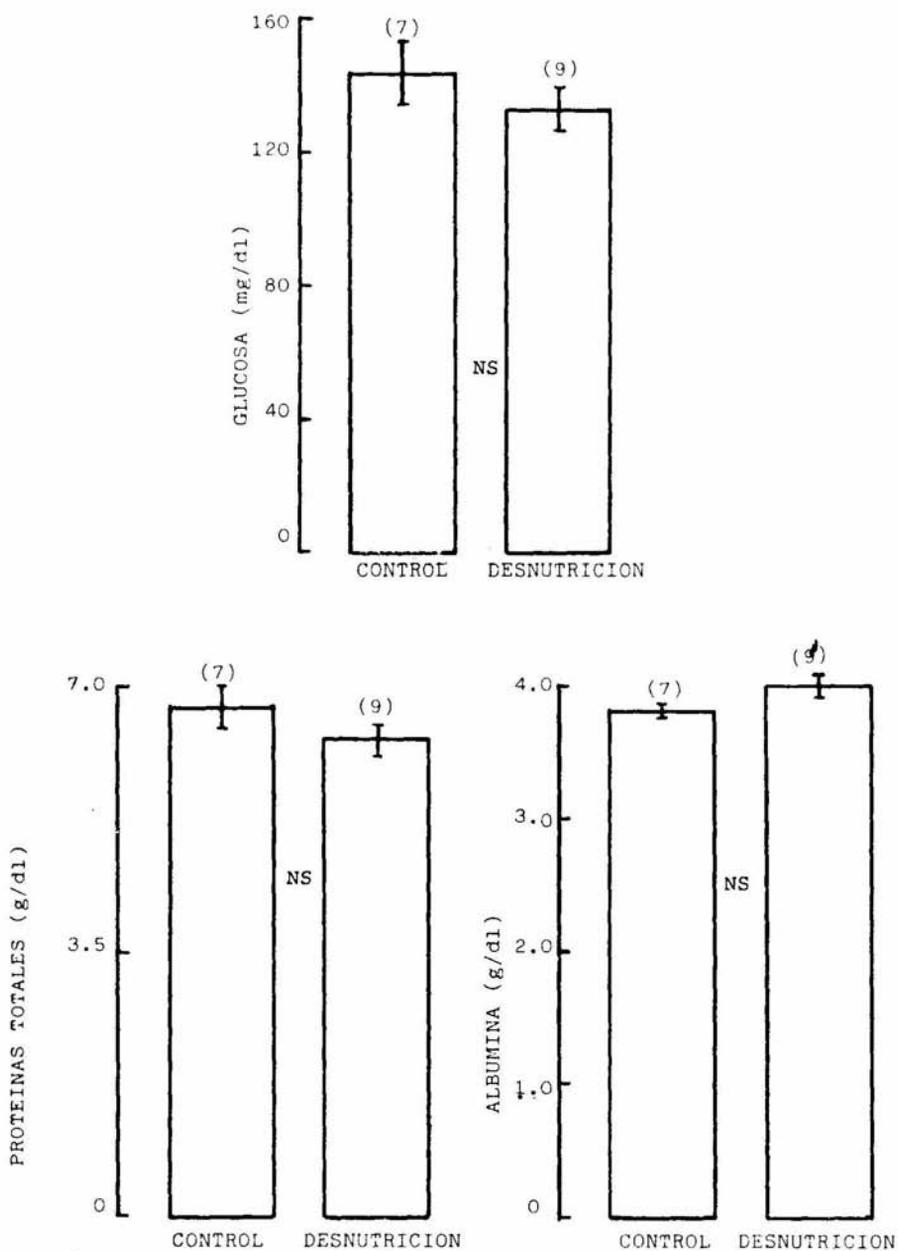


FIG. 12.-CONTENIDO DE METABOLITOS SERICOS EN RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS. (MEDIA + E.E.). ENTRE PARENTESIS SE INDICA EL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

teínas totales y albúmina en sangre. Nótese que en ningún caso se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre los lotes control y experimental.

El hecho de que se mantenga constante la concentración de glucosa nos sugiere la existencia de un proceso de adaptación a la desnutrición durante el cual la glicemia normal a expensas del glucógeno hepático, aminoácidos musculares y grasas corporales (Figura 13). (Lenhinger, 1982; Li y Goldberg, 1976).

Los resultados obtenidos en la concentración de proteínas totales y albúmina, nos permiten suponer, que a pesar de que los animales del lote experimental presentan una notable reducción en peso y una intensa anemia, el grado de desnutrición, causado por la dieta de maíz, no fué tan severo como para modificar ambos parámetros séricos, como ha sido reportado por Coward y Lunn (1981), Hamilton y Rose. (1987), Alexis (1972) y Munro (1969).

Además de que no se puede descartar la participación de los siguientes mecanismos homeostáticos:

a) Vitamínicos.- El ácido nicotínico, vitamina hidrosoluble, presente en la harina de maíz, puede ser capaz de mantener el nivel de proteínas totales, mediante un mecanismo que aún no esta bien definido. (Gras.J. 1967).

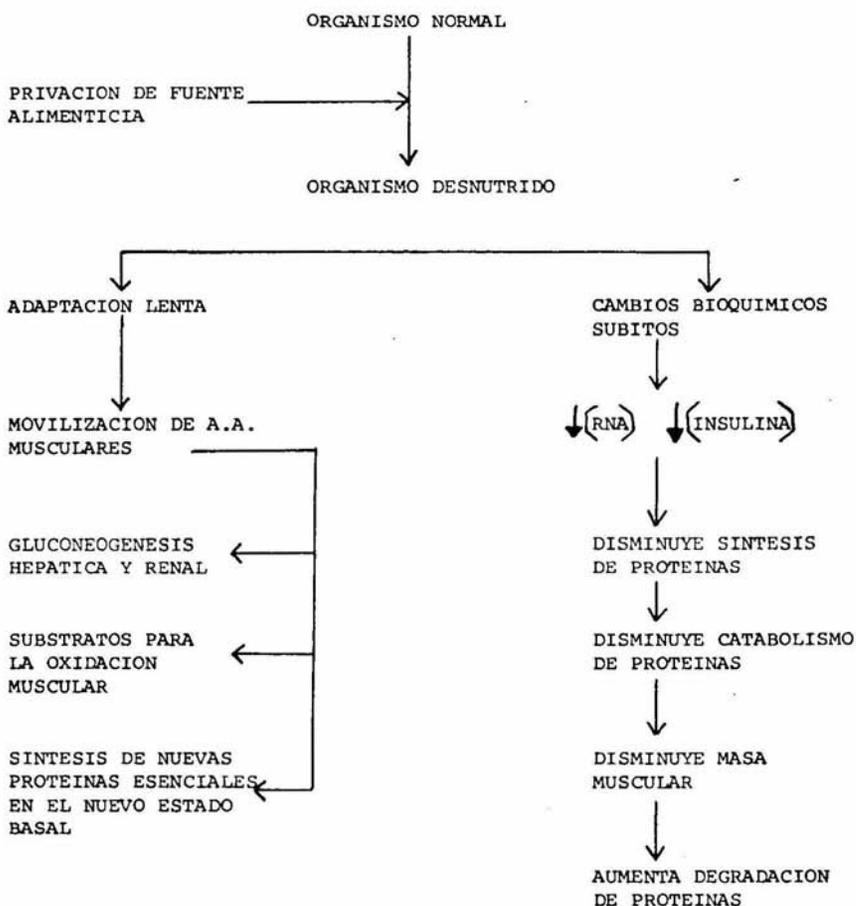


FIGURA 15.- METABOLISMO HIPOTETICO DE RATA SOMETIDA A PRIVACION DE FUENTES EXOGENAS DE ENERGIA. (46)

A.A. AMINOACIDOS

RNA. ACIDO RIBONUCLEICO

↓() DISMINUYE CONCENTRACION

b) Hormonal.- Se ha sugerido (Gras.J.,1967), que una dieta deficiente en iodo puede producir hipotiroidismo y que bajo esta condición, aumenta el nivel de proteínas totales en el suero.

c) Tisular.- La concentración de las proteínas intersticiales y de la linfa se mantiene constante, debido al paso de las proteínas del plasma, a través de las paredes capilares, hacia el espacio intersticial, desde donde pasa a la linfa para de ahí regresar al plasma.(Figura 14)

En el caso de la albuminemia, se ha propuesto Waterlow.J., (1975), que esta se mantiene constante debido a la unión de la albúmina extravascular con la intravascular.

4.- Proteínas musculares en ratas normales y desnutridas.

La concentración de proteínas musculares se reduce significativamente ($t; 14,16; \alpha=0.05$), en los animales desnutridos (Figura 15); esto nos permite sugerir una alteración en el patrón de degradación y síntesis de proteínas (rotación), en la cuál se favorece la incorporación de estas a rutas metabólicas alternas como son la gluconeogénesis hepática y renal (Li y Goldberg, 1976); mientras que en condiciones normales la contribución de las proteínas musculares a estas vías metabólicas es muy baja. (Stein, 1982).

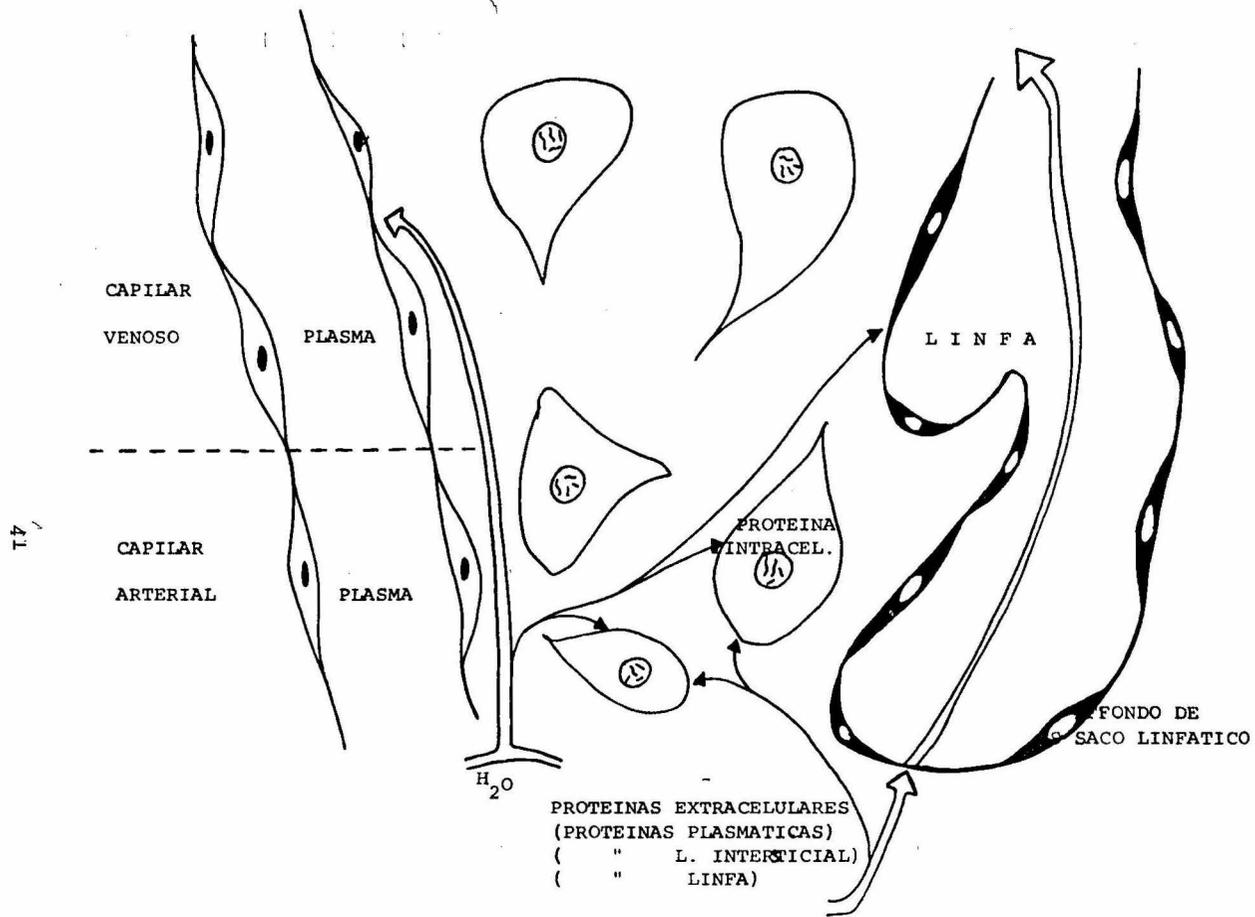


FIG. 14. CICLO DE LAS PROTEINAS EXTRACELULARES DESDE EL PLASMA HASTA EL LIQUIDO INTERSTICIAL Y LINF A PARA DE ESTA VOLVER AL PLASMA. (85)

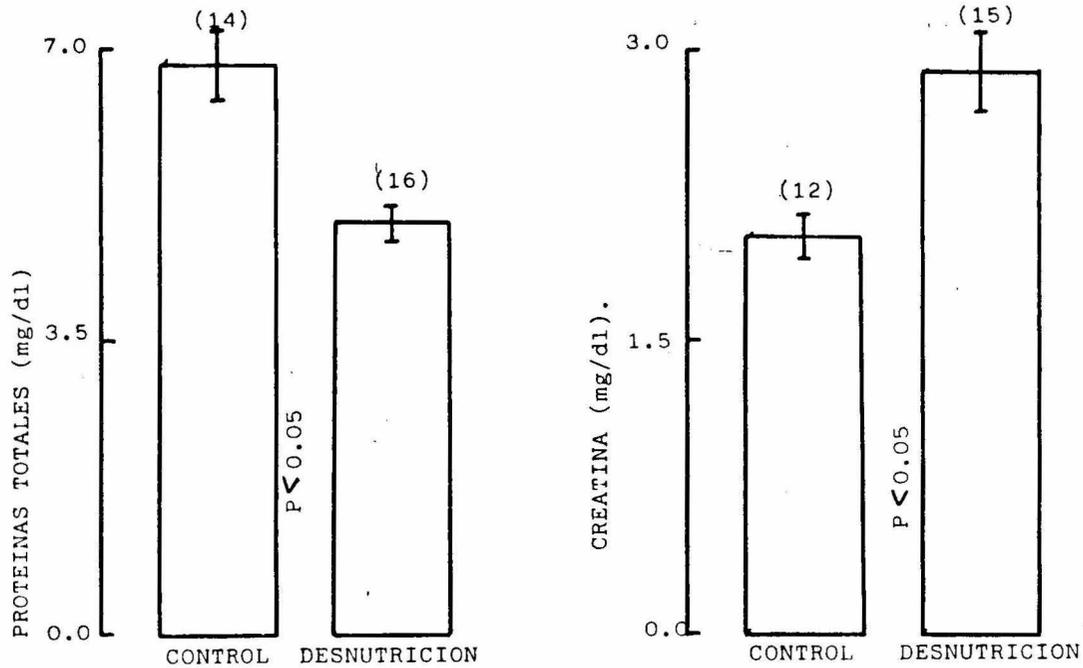


FIG.15.-DIFERENCIAS OBSERVADAS EN LA CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES Y CREATINA DEL MUSCULO GASTROCNEMIO DESPUES DE 60 DIAS DE DIETA A BASE DE MAIZ. (MEDIA \pm E.E.)

ENTRE PARENTESIS SE SEÑALA EL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

5.- Creatina muscular en ratas normales y alimentadas con maíz.

La concentración de creatina muscular, por su parte, se encuentra significativamente aumentada ($t; 12, 15; \alpha=0.05$), en los animales desnutridos. Aquí es de gran importancia recordar que la creatina (ácido-alfa-metil-guanidin-acético), es un compuesto que tiene su origen en la degradación protéica y que se sintetiza a partir de los aminoácidos arginina, glicina y metionina (Lenhinger, 1982). Esta consideración, junto con el gran incremento de la creatina muscular en los animales alimentados con maíz, nos hace suponer que durante la desnutrición se incrementa el catabolismo protéico y que los aminoácidos resultantes son incorporados en aquellas rutas metabólicas involucradas con la homeostásis del organismo, como son la gluconeogénesis hepática y renal.

6.- Actividad enzimática de la CPK en ratas controles y desnutridas.

En cuanto a la actividad enzimática específica de la CPK (UI/mg de proteína muscular), se encontró que durante la desnutrición, esta se incrementa considerablemente. (Figura 16).

Una posible explicación a este resultado, es que a pesar

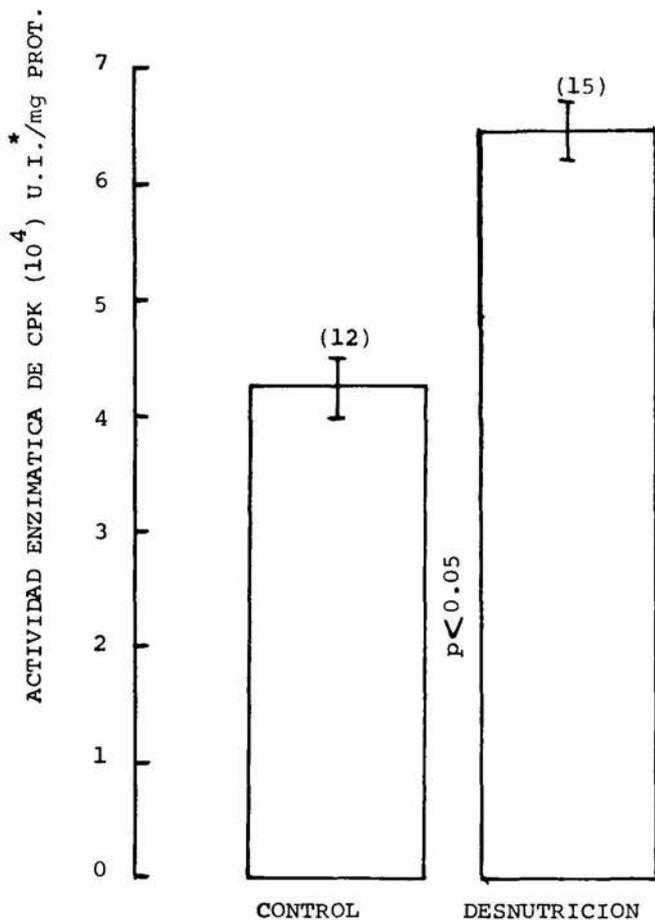


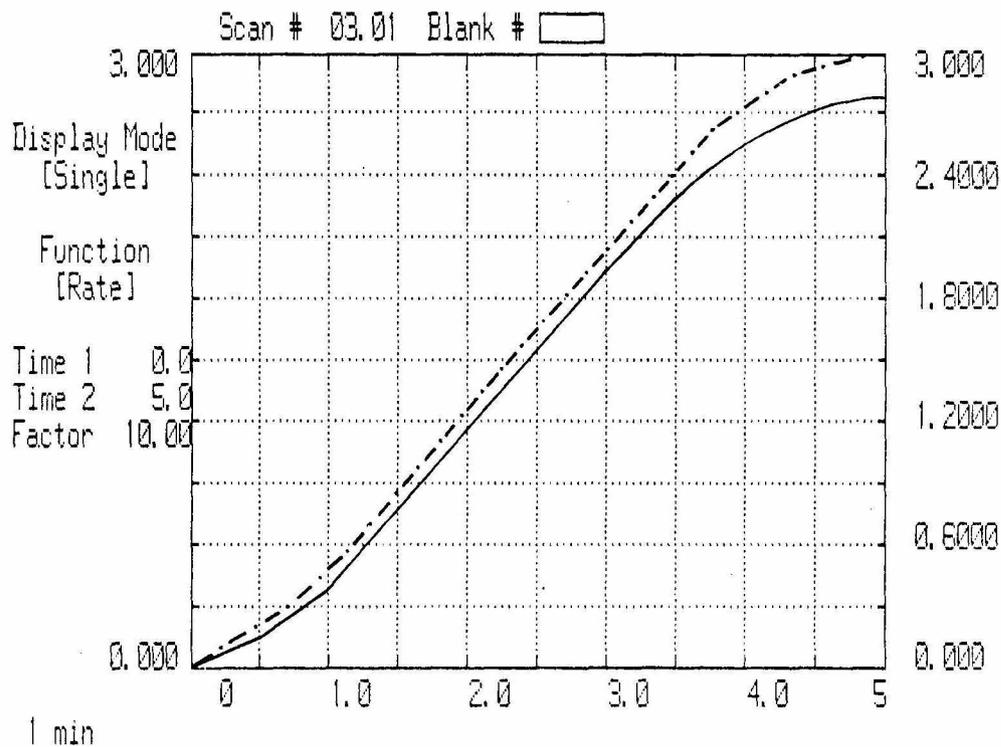
Figura 16.- Actividad enzimática específica de CPK del músculo gastrocnémio de rata. (Media \pm Error estándar) Entre paréntesis se indica el tamaño de la muestra.

* Unidades Internacionales. Definidas por la Comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica como la cantidad de enzima que puede catalizar la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones estándar. (25 °C)

de que la síntesis de esta enzima no se alteró durante la denutrición, debido a la baja concentración de proteínas musculares, la actividad enzimática se ve aumentada, ya que se sintetiza normalmente pero no se utiliza. (Figura 17)

Por otra parte, Good y cols., 1968), han reportado que durante la desnutrición se incrementa la velocidad de rotación de las proteínas reguladoras del metabolismo y es muy posible que durante este proceso se vea favorecida la síntesis de una enzima que como la CPK, juega un importante papel en el proceso de obtención de energía en forma de **ATP**.

FIG.17 REGISTRO TIPICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE CPK



| | | | | | | |
|-------|--------|--------|----------|------|-----------|--------------|
| λ | ABS | SOURCE | 12:13 | CELL | ————— | CONTROL |
| 340.0 | 0.0015 | Vis/LV | 19/10/88 | 1 | - - - - - | DESNUTRICION |

Los resultados obtenidos nos permiten proponer la existencia de un estado de adaptación a la desnutrición, ya que aquellos parámetros relacionados con la homeostasis general del organismo como son las concentraciones séricas de proteínas totales y albúmina se mantienen constantes, mientras se reduce drásticamente la concentración de proteínas musculares. A este respecto, Wipple y cols. (1948) han propuesto que durante la desnutrición se presenta el paso de proteína tisular hacia el plasma, por lo cual es válido suponer que la concentración de proteínas totales y albúmina séricas se mantienen constantes debido a la utilización de proteína tisular; esta hipótesis es apoyada por la observación realizada por Li y Goldberg (1976), en el sentido de que la gran pérdida de peso muscular observada durante la desnutrición se debe fundamentalmente al decremento en la concentración de proteína muscular; por otra parte, esta disminución en el peso muscular, también puede asociarse con el incremento en el catabolismo de las proteínas musculares, observado por Schwartz (1961); lo cual es apoyado por el hecho de que en los animales desnutridos se observó un aumento considerable en la concentración de creatina muscular, que como se ha mencionado en este mismo trabajo, es sintetizada a partir de los aminoácidos resultantes de la degradación

protéica (Williams, et al, 1984).

El incremento en la actividad de la CPK, en el músculo gastrocnémio de las ratas desnutridas, posiblemente también pueda asociarse con el establecimiento de un nuevo estado basal; aunque es muy difícil establecer la importancia funcional que este hecho representa. Para poder dar una explicación al respecto se hace necesario efectuar la cuantificación del resto de los compuestos involucrados con la reacción de Lohmann, así como establecer la correlación entre la actividad bioquímica y el patrón de contracción mecánica del músculo gastrocnémio, posiblemente al hacer esto se encuentre que la reacción de Lohmann ocurre predominantemente en aquel sentido en el que se favorece el incremento en la concentración de creatinafosfato, (Figura 18), lo cual permite que el músculo cuente, en cualquier momento, con la suficiente cantidad de energía para efectuar la contracción.

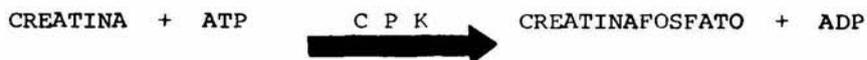


Figura 18.- Posible sentido de la reacción de Lohman durante la desnutrición. Nótese que la creatina y ATP son utilizados para incrementar el almacen energético de reserva.

Esta última proposición también puede explicar los resultados obtenidos por Russell et al, (1984); en el sentido de que la tensión desarrollada, por el músculo gastrocnémio de las ratas desnutridas, es mayor que la desarrollada por los músculos de las ratas controles cuando se utiliza una frecuencia de estimulación de 10 Hz; para apoyar esta hipótesis se hace necesario cuantificar la actividad de la CPK, así como la concentración de creatina y creatinafosfato durante la actividad contráctil del músculo gastrocnémio.

V.- Conclusiones.

Con base en lo anteriormente expuesto se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1.- El maíz como único alimento ingerido, provoca desnutrición con las siguientes manifestaciones:
 - a) Pérdida de peso corporal.
 - b) Pérdida de peso muscular.
 - c) Anemia y leucopenia.

- 2.- Durante la desnutrición, hay tendencia del organismo a mantener la homeostasis como lo confirma la glucemia, proteinemia y albuminemia normal.

- 3.- La síntesis de CPK no se ve alterada durante la desnutrición y de esta manera, participa en el mantenimiento de la homeostasis orgánica.

VI.- Bibliografía.

- Alexis.S.D., Basta.S. and Young.V.R. Dietary protein intake and skeletal muscle protein metabolism in rats. Biochem.J. 128:521,1972.
- Altman.N.H. and Melby.E.E. Handbook of laboratory animal science. Vol.II. C.R.C. Press. Inc.USA.1976.
- Andrews.G.H. Introductory Nutrition. The C.V. Mosby Company. 4 ed. USA. 1979.pp262.
- Bourges.H. Nosología básica integral. Vol.II Médica oteo. México,1971.
- Bourges.H. Nutritional status of the mexican population. Nutrition in the 1980's. Constraints on our Knowlwdgw. Alan R.Liss:Inc. New York,1981.pp 249-269
- Cervantes.R.C. Variables que afectan la determinación de creatinina por el método del picrato alcalino.IPN. Tesis. México,1982.
- Coward.W.A. and Lunn.P.G. The biochemistry and physiology of Kwashiorkor and marasmus. Br.Med.Bull. 37(1):19,1981.
- Eppenberger.H.M., Eppenberger.M., Richterich.R., and Aeby.H. The ontogeny of creatinekinase isoenzymes. Develop.Biol. 10:1,1964.
- Eslava.M.J. Ensayo sobre la situación nutricional en México y su relación en cavidad bucal. UNAM.Tesis.México,1984.

- Ganong.W.F. Fisiología Médica. El manual moderno. México,1986.
- Gonzalez.M.S. y Peñaloza.C.I. Métodos de biomoléculas. ENEP.Iztacala.UNAM.México,1981,pp 20.
- Good.C.A., Kramer.H. y Somogyi. Biol. Chem.100:485,1968.
- Gornall.A.G., Bardawill.Ch.J. and David.M.M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. J. Biol. Chem. 171:751,1949.
- Gras.J. Proteínas plasmáticas. Fisicoquímica, metabolismo, fisiopatología y clinica de las proteínas extracelulares. Editorial Jims. Barcelona,1967.pp254.
- Graves.J.E., Piscilla.M., Clarkson,P.L., John.P.Kirwan and James P. Norton. Serum creatine kinase activity following repeated bouts of isometric exercise with different muscle groups. Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. 56(6):657,1987.
- Hagler.L.et al. Influence of dietary iron deficiency on hemoglobin, myoglobin their respective reductases and skeletal muscle mitochondrial respiration. Am. J. Clin. Nutr. 34:2169,1981.
- Hamilton.H.K. y Rose.M.B. Diagnóstico Clínico. Interamericana. México, 1987. pp 230.

- Hartree.E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analitical Biochem.* 48:422,1972.
- Hernández. M., Chávez. A. y Bourges. H. Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. 7a ed. Instituto Nacional de la Nutrición. México,1977.
- Hodges .R.E. Human Nutrition. A comprehensive treatise. Vol. IV. Nutrition, Metabolic and Clinical Applications.USA. 1979.
- Hoyle. G. Muscles and their neural control. John Wiley & Sons. New York, 1983.
- Hughes.J.T. Pathology of muscle. Vol. IV in the series: Major Problems in Pathology. W.B. Saunder Company.USA,1974.
- Icaza.S.J. y Behar.M. Nutrición. Interamericana. México, 1988. pp 234.
- Krause. M.V. y Hunscher. M.A. Nutrición y Dietética en Clínica. Interamericana. México,1975. pp 112-115.
- Krupp. M.A. y Chalton. M.J. Diagnóstico clínico y tratamiento. El manual moderno. México, 1985. pp 1112.
- Laird.C.W. Representative values for animal and veterenary populations and their clinical significance. Houston, Hycel Inc. 1972.
- Lenhinger. A. Bioquímica. Omega. España, 1982.

- Li J. and Goldberg. A.L. Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. Am. J. Physiol. 231(2):441,1976.
- Licea V.G. Diferencias sexuales neuromusculares a nivel molecular. IPN. Tesis. México, 1981.
- Llanos C.M. El Maíz. Su cultivo y aprovechamiento. Ediciones Mundi-Prensa. España, 1984.
- López Castro B.R. Actividad de las enzimas Glucosa-6-fosfatasa, Fosfoglucomutasa y Fosforilasa en el hígado de ratas desnutridas y en recuperación. UNAM. Tesis. México, 1977.
- López Hernández M.A. Método de estudio general de las anemias. Act. Med. ISSSTE. 1(5):7,1987.
- Lowenberg M., Wilson E., Todhunter E., Freeney M. y Savaje J. Los alimentos y el hombre. Limusa Wiley. México, 1970 pp 191-244.
- Lowry O.H., Rosebrough J.J., Farr L.A. and Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 192:265,1951.
- Lynch M. et al. Métodos de laboratorio. Interamericana. México, 1969.
- Mason V.M.J. Efectos de diferentes estados nutricionales sobre algunas actividades enzimáticas del eritrocito de rata. Universidad Iberoamericana. Tesis. México, 1963.

- Mitruka, B.M. and Rawnsley H.M. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals. Masson Publishing. USA. Inc. 1977.
- Munro H.N. Adaptation of mammalian protein metabolism to amino acid supply. *Proc. Nutr. Soc.* 28:214,1969.
- Nevin S.S. and Vernon R.Y. The requirements of human nutrition. *Sci. Am.* 235:51,1976.
- Niemeyer H., Gonzalez C. and Rozzi R. The influence of diet on liver phosphorilase. *J. Biol. Chem.* 236:610,1961.
- Okano K. et al. *Clin. Chim. Acta.* 169(2/3):159,1987.
- Okinaka S., Kumagai H., Ebashi S., Sugita H., Momoi H., Toyokura Y. and Fujie Y. Serum creatine phosphokinase. Activity in progresive muscular dystrophy and neuromuscular diseades. *Arch. Neur.* 4:520,1961.
- Oliver I.T.A. Spectrophotometric method for the determination of cratine phosphokinase and myokinase. *Biochem.J.* 61:116, 1955.
- Olson R.E. Protein-calorie malnutrition. Academic Press. USA. 1975.
- Pearson C.M. Muscular Dystrophy. *Am.J. Med.*35:632,1963.
- Pearson W.N. Assessment of nutritional status: Biochemical Methods in Nutrition; A comprehensive tratise. Vol. III. G.H. Beaton and E.W. McHenry New York. Academic Press. 1966.

- Pearson W.N. Biochemical appraisal of the vitamin nutritional status in man. J.A.M.A. 180:49,1962.
- Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry Standard Method for the Determination of Creatine Kinase Activity. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15:255,1977.
- Russell D. et al. Metabolic and structural changes in skeletal muscle during hypocaloric dieting. Am J. Clin. Nutr. 39(4):503,1984.
- Russell, D. et al. The effects of fasting and hypocaloric diets on the functional and metabolic characteristics of rats gastrocnemius muscle. Clin. Sci. 67:185,1984.
- Sanderson J.H. and Phillips C.E. An atlas of laboratory animal haematology. Clarendon. Press Oxford, 1981.
- Schwarts N.B. Changing size, composition and contraction strength of gastrocnemius muscle. Am. J. Physiol. 201(1):164,1961.
- Stein T.P. Nutrition and Protein Turnover: A review. J. Parent. and Enteral Nutr. 6(5):444,1982.
- Stephen J.M.L. Adaptative enzyme changes in liver and muscle of rats during protein depletion and refeeding. Br. J. Nutr. 22:153,1968.
- Szasz G., Gruber W., and Bernt E. Creatinekinase in serum. 1.- Determination of optimum reaction conditions. Clin. Chem. 22:650,1976.

- Tanzer M.L. and Gilvarg C. Creatine and creatine kinase measurement. J. Biol. Chem. 234:3201,1959.
- Tierney N.A., y Peters J.P. The mode of excretion of creatine and creatine metabolism in thyroid disease. The Journal of Clinical Investigation. 22(4):595,1943.
- Tietz N.W. Guía clínica de pruebas de laboratorio. Editorial Médica Panamericana. Argentina,1985. pp 63.
- Turner D. Handbook of diet therapy. 5a ed. University of Chicago. Press.Chicago,1970
- Vondruska J.F. and Greco R.A. Certain hematology and blood chemical values in chemical river.C.D. albino rats. Bull. Am.Soc. Vet. Clin. Path.2:3,1973.
- Waterlow J.C. and Stephen J.M.L. Enzymes and assessment of protein nutrition. Proc. Nutr. Soc. 28;234,1969.
- Waterlow J.C. In. Olson R.E. Protein-calorie malnutrition. Academic Press. USA. 1975.
- Waterlow J.C. Liver choline-esterase in malnourished infants. The Lancet. 13:908,1950.
- Whipple G.H. Hemoglobin plasma protein and cell protein. Their production and interchange. Ch. C. Thomas. Springfield 1:11, 1948.
- Whitaker J.R. Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker, Inc. New York, 1972.

- Williams A., Sodeman Jr. y Sodeman T.M. Fisiopatología Clínica. Mecanismos de producción de los síntomas. Interamericana. México, 1984.
- Wohl. M.G., Goodhart R.S. Modern nutrition in health and disease. 4a ed. Lea and Febiger. USA, 1968.
- Youmans J.B. The changing face of nutritional disease in America. J.A.M.A. 189:672, 1964.
- Zorzano A. et al. Effects of starvation and exercise on concentrations of citrate, hexose phosphates and glycogen in skeletal muscle and heart. Biochem J. 232:585, 1985.
- Zubirán S., Chávez A., Bonfil G., Aguirre G., Cravioto J. y De la Vega J. La desnutrición en México. Colección de Testimonios del Fondo. Fondo de cultura económico. México, 1974.
- Zubirán S. y Chávez A. Algunos aspectos sobre la situación nutricional en México. Bol. of San. Pan. 54:101, 1963.
- Zubirán S., Martínez P.D. y Chávez A. Características de la desnutrición en México. Rev. Inv. Clin. Mex. 14:359, 1962.