



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LA DESNUTRICION SOBRE LA ACTIVIDAD DE  
LAS ATPasas DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

VIDAL HERNANDEZ SANDRA REFUGIO



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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. MARIA LUISA GARCIA PADILLA
Secretario	Prof. LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN
1er suplente	Prof. LETICIA GIL VIEYRA
2do. Suplente	Prof. ELPIDIO GARCIA RAMIREZ.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México.

Ciudad Universitaria, circuito interior, c.p. 04510, México D.F.

Asesor del Tema



M. en C. Angela Sotelo López

Supervisor Técnico



M. en C. Rosa Maria Argote Espinosa

Sustentante



Vidal Hernández Sandra Refugio

## AGRADECIMIENTOS

A la vida por permitirme estar aquí y dar las gracias.

A mi madre, por mostrarme como se debe ser valiente y constante durante el sendero de la vida, con su amor como madre y amiga.  
Gracias mami, Te amo.

A mi hermano Juan José, por llenarme siempre de sorpresas agradables.  
Gracias chinito, Te amo.

A mi hermana Mónica, por ser la mejor amiga, compañera y complice en mi vida. Gracias moe, Te amo.

A mis tíos y primos, en especial a los Lucio y, a los Hernández, por respetarme, apoyarme y quererme. Los amo.

A todas aquellas personas que luchan por que la educación sea pública, por que gracias a ellas he podido realizar este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de ser una persona crítica y libre de pensamiento.

A la Doctora Angela Sotelo, por otorgarme la confianza de realizar un trabajo de investigación, por compartirme sus conocimientos y por todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A la maestra Rosa Maria Argote, por ser mi guía y compañera en este proyecto. Gracias por darme la oportunidad de convivir con un ser humano tan admirable como tú.

A los profesores Bernardo Lucas y Leticia Gil, por sus sugerencias y apoyo.

A la Sra Vicky, por su invaluable ayuda, consejos, compañía y cariño.  
Gracias por su apoyo.

A todos mis compañeros del Lab. 111, pero sobre todo aquellos que me permitieron conocerlos como amigos.  
Gracias por su ayuda y los gratos momentos.

A mis amigos Mary, Roberto y Ricardo, por que el tiempo ha sido nuestro mejor aliado, bajo cualquier circunstancia. Los quiero.

A mis amigos del CEQ, por regalarme parte de su enseñanza y compartir conmigo uno de los momentos mas importantes hasta ahora en mi vida, muchas gracias. Los quiero.

Gracias a todos por su apoyo con este trabajo, pero sobretodo gracias a cada uno de ustedes por ayudarme a presentarlo.

## DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a la lucha por la mejora de la educación en México, como un símbolo contra la ignorancia y las injusticias, pero sobretodo al compromiso tan grande que se adquiere al ser profesionista.

Que no se corten las ideas y los sueños por la exclusividad de las letras en todas sus formas.

*"Todas las cosas en el mundo están interconectadas de forma tan misteriosa y adecuada que la onda ligera y aparentemente insignificante del aleteo de una mariposa en un lugar preciso de este planeta, puede desencadenar un tifón a miles de millas de distancia."*

Valclav Havel

## INDICE

TEMA	pag.
<i>Introducción</i>	1
<i>Objetivos</i>	
General	3
Particulares	3
<i>Antecedentes</i>	
Desnutrición	4
Adenosin Trifosfatasa (ATPasa)	5
ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	9
Ca <sup>2+</sup> -ATPasa	13
Relación acción enzimática en el estado nutricional	14
<i>Validación</i>	
Definición	15
Linealidad, exactitud	16
Precisión, repetibilidad/reproducibilidad	18
Sensibilidad, especificidad/selectividad	19
Estabilidad	20

TEMA	pag.
<i>Metodologías</i>	22
Validación del método	25
Preparación de muestras	34
Determinación de proteína	35
Determinación de ATPasas	40
Cálculo para determinar la actividad de las ATPasas.	46
<i>Resultados y Discusión</i>	47
Validación	47
Obtención de la actividad específica de las ATPasas	66
Determinación de la actividad específica de las ATPasas Total, $Mg^{2+}$ , $Na^+/K^+$ y $Ca^{2+}$ en intestinos de ratas alimentadas, con distintas dietas.	69
Dieta de caseína	69
Dieta de Harina de maíz y Harina de pepita de calabaza (HMCD)	71
Dieta de grenetina	73
<i>Conclusiones</i>	75
<i>Bibliografía</i>	76

# Introducción

## INTRODUCCIÓN

La desnutrición ocurre principalmente en la infancia y constituye un problema serio de salud tanto en México como en otros países, y aunque se piensa que un país rico económicamente no puede sufrir de problemas como el de la desnutrición, eso no resulta así.

¿ Pero en sí, qué genera la desnutrición ?

La desnutrición puede ser generada por una mala distribución de alimentos, lo que propicia una escasa disposición de ellos, falta de adquisición de alimentos debido a su costo, y/o la ignorancia en cuanto a los patrones de alimentación, que involucran una ingesta proteínica de buena calidad con un alto nivel energético, así como un consumo necesario de micronutrientes.

El sufrir desnutrición va a ser un desencadenante de una serie de consecuencias que a la larga pueden resultar de irreversibles a mortales. Un individuo que sufre de desnutrición puede presentar desaceleración en cuanto a su desarrollo muscular y óseo, presentar retraso mental, ser blanco fácil de enfermedades infecciosas, debido a una deficiencia en cuanto a la rápida respuesta inmunológica, así como también presentar alteraciones funcionales de tipo fisiológico en algunos órganos.

Se ha encontrado que el intestino delgado sufre alteraciones fisiológicas y morfológicas en su mucosa en un estado de desnutrición,<sup>1</sup> y siendo el intestino uno de los órganos más importantes en cuanto a la absorción de nutrimentos, no dejan de ser relevantes las evaluaciones concernientes a este tema. En el siguiente estudio se evaluó el efecto de la desnutrición sobre la actividad enzimática de ATPasas: Total,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+/K^+$  y  $Ca^{2+}$ , por ser enzimas que están involucradas en la regulación celular, cuya alteración pudiera verse reflejada en la absorción de nutrientes y consecuentemente en el estado nutricional de un individuo.

# Objetivos

## 1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad de la ATPasa Total, la ATPasa-Mg<sup>2+</sup>, la ATPasa-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y la ATPasa-Ca<sup>2+</sup> en el intestino delgado de ratas nutridas y desnutridas.

## 2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Validar la técnica para determinar la actividad específica de las ATPasas mediante la detección de fósforo inorgánico
- Evaluar la actividad de las ATPasas mediante un ensayo biológico y su posible relación con el estado dietético.

Antecedentes

## ANTECEDENTES

### DESNUTRICIÓN

#### Generalidades

La desnutrición es el resultado de una falla en una serie de procesos, por medio de los cuales un organismo ingiere y asimila los nutrientes necesarios para sus funciones corporales. Las personas más afectadas por la desnutrición son los niños menores de 5 años y los ancianos, trayendo consigo enfermedades de tipo irreversible e inclusive mortales. En la desnutrición frecuentemente se presenta el ciclo desnutrición-infección-desnutrición, por presencia e interacción de varios factores, entre los que destacan: la ablactación prematura o tardía, el uso inadecuado de sucedáneos de la leche humana como la falta de higiene en su preparación, lo que provoca enfermedades gastrointestinales, que por sí mismas desencadenan la disminución de la absorción de nutrientes, aumento de las pérdidas urinarias de nitrógeno y electrolitos y aumento en el gasto energético basal. Esto último tiene como consecuencia que las reservas corporales de grasa, carbohidratos (glucógeno) y proteína se usen para satisfacer las necesidades energéticas, produciéndose así una disminución del crecimiento.

El desequilibrio nutricional es una causa significativa y frecuente de inmunodeficiencia, ya que al presentarse una reducción general de síntesis proteínica (cerca del 40%) se disminuye la respuesta inmune.<sup>2, 3, 4.</sup>

Existen factores desencadenantes de un estado nutricional deficiente y que no necesariamente son de tipo nutricional, como la situación demográfica en la que el individuo se desarrolla, ya que la adquisición de productos será diferente en una zona rural y en una zona urbana. Otro factor desencadenante, es el manejo de la distribución, información y accesibilidad a los alimentos; esto puede ser generado por programas de interés social deficientes, y por otro lado tenemos el factor socioeconómico que involucra los hábitos culturales, el gasto destinado a la alimentación, antecedentes dietéticos y los hábitos alimentarios; todos ellos los establece la familia.<sup>5</sup>

El mejor tratamiento para la desnutrición es el evitar que ésta se presente y para eso se necesita la cooperación, tanto de los gobiernos en general, como de la sociedad y de las instituciones creadas para este fin. En México se han desarrollado estrategias, programas y políticas orientadas a mejorar la nutrición de los grupos más vulnerables.<sup>6,7</sup>

## **ADENOSIN TRIFOSFATASAS (ATPasas)**

### Generalidades

Las ATPasas son proteínas embebidas en una membrana fisiológica que funcionan como bombas iónicas, ya que se encargan del transporte de iones que por lo regular son cationes y que son bombeados en contra de un gradiente de concentración, estos cationes a

su vez pueden ser transportadores de otros sustratos como azúcares, aminoácidos, u otros iones como el calcio y algunos fármacos.

La transportación de estos sustratos va a generar un desfavorecimiento termodinámico, requiriendo de energía para llevar a cabo dicha transportación, esta energía la toma de la energía liberada a partir de la hidrólisis de Adenosin trifosfato (ATP) produciendo Adenosin difosfato (ADP) y fósforo inorgánico (Pi).<sup>8,9.</sup>

Investigaciones anteriores indican la existencia de 3 tipos de ATPasas<sup>10</sup>: La tipo P, V y F.

Las ATPasas de tipo P consisten en un polipéptido simple transmembrana que se fosforila durante el proceso de transporte para llevar a cabo la transportación de iones  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  y la membrana en la que se localizan es de tipo plasmática.

Las ATPasas de tipo V son siempre transportadoras de iones  $H^+$  y están asociadas a organelos unidos a membranas diferentes de las mitocondrias, como los cloroplastos y el retículo endoplasmático, también se encuentran en vacuolas ácidas de hongos y plantas, y no forman intermediarios fosforilados.

Las ATPasas de tipo F no forman intermediarios fosforilados y constan de un complejo unido a membrana  $F_0$  y un segmento extrínseco  $F_1$  que sintetiza ATP a partir de ADP y Pi y estas son de tipo vegetal.<sup>11,12.</sup>

Las ATPasas que se estudiarán, serán las de tipo P ya que el estudio está basado sobre células cuya membrana es de tipo plasmática.

El sistema de transporte de iones  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  tiene gran importancia para el metabolismo celular, ya que la transportación de iones permite que la células mantengan su isotonicidad debido a que se preserva una concentración adecuada de iones, así como también se mantiene un pH citosólico importante para el funcionamiento interno de la célula.

Debido a que son enzimas involucradas en la transportación de nutrientes localizadas en células plasmáticas, podemos encontrarlas en órganos como el intestino y los riñones.

El intestino se conoce como uno de los órganos de mayor importancia en cuanto a la absorción de nutrientes, ya que cuenta con un borde celular en forma de cepillo formado por microvellosidades que son altamente irrigados por medio de capilares sanguíneos sobre un soporte de mucosa intestinal.

La manera en como se lleva a cabo la transportación de nutrientes consiste primeramente en la presencia de solutos en el espacio luminal del intestino, para que ese soluto pueda ser transportado, va a requerir la presencia de algún ión transportador como el ión sodio, así como también de sus proteínas transportadoras acopladas a éste, un ejemplo muy comentado con respecto a este funcionamiento es la transportación de glucosa por medio del ión sodio al interior de la célula epitelial extracelular, transporte conocido como simpórtico( dos moléculas distintas transportadas en un mismo sentido). Una vez dentro, la glucosa es liberada al espacio extracelular a favor de su gradiente de concentración de

manera unipórtica (una sola molécula transportada en un solo sentido) quedando libre en el torrente sanguíneo, mediante la ayuda de una proteína transportadora de glucosa.

El gradiente del ión sodio que impulsa el transporte simpórtico de glucosa, se mantiene debido a la acción enzimática de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , localizada en el dominio basolateral de la membrana plasmática, por lo tanto a menos de que la enzima falle, siempre se tendrá una baja concentración intracelular del ión sodio. (Fig.1).<sup>13</sup>

### Esquema gráfico de la transportación de nutrientes.

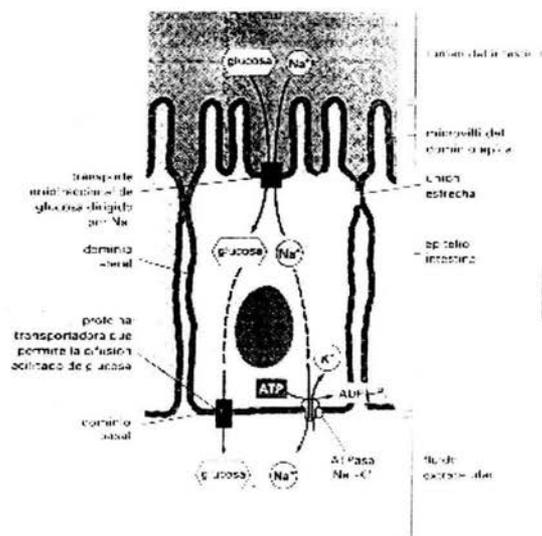


Fig.1 Transporte transcelular de glucosa a través del epitelio intestinal

Así es como la energía metabólica en forma de ATP, está indirectamente relacionada en la transportación de glucosa, debido a que es utilizada para mantener el gradiente de ión

sodio. Por lo tanto una falla en la síntesis de ATP, se refleja en la transportación de glucosa u otros solutos.<sup>14</sup>

A continuación se hará una descripción bioquímica de estas enzimas, para un mayor entendimiento en cuanto a su funcionalidad.

### **ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$**

La ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  es una proteína de membrana plasmática, cuya masa molecular es alrededor de 298 KDa. Esta enzima lleva a cabo la hidrólisis de una molécula de ATP, generando así la expulsión de 3 iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) hacia el espacio extracelular e introduciendo 2 iones potasio ( $\text{K}^+$ ) en el citoplasma. Esto le da la característica de un transporte llamado antiporte (dos moléculas distintas transportadas en sentidos opuestos), y genera un equilibrio homeostático en la célula, que se refleja en la regulación del volumen de agua, manteniendo un potencial eléctrico de membrana en nervio y músculo, así como la concentración de  $\text{Na}^+$  necesaria para llevar a cabo su papel como transportador de soluto.<sup>11,15,16</sup>

La ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  está formada por 3 tipos de subunidades: la  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , todas proteínas integrantes de membrana plasmática.

---

*Subunidad  $\alpha$* 

La masa molecular de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , mayoritariamente se debe a la subunidad  $\alpha$  cuya importancia es trascendental, ya que en ella se encuentran principalmente dos sitios de fijación, uno para  $\text{Na}^+$  en la cara interna de la membrana y otro para  $\text{K}^+$  en su cara externa, presenta una alta afinidad para ATP en el lado citoplasmático, generándose así la fosforilación, lo que da lugar al transporte de iones.

Se ha encontrado que el sitio de unión de la subunidad  $\alpha$  para el ión  $\text{K}^+$ , puede ser ocupado por glúcidos cardiotónicos como: la ouabaína, la digoxina, la digitonina y el vanadato de sodio, los cuales actúan como inhibidores de la enzima, con un intervalo inhibidor de concentración de  $10^{-2}\text{M}$  a  $10^{-5}\text{M}$ .

En la medicina, los glúcidos cardiotónicos son utilizados para incrementar la contracción muscular cardíaca en un posible infarto al corazón, ya que reducen la actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  generando un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , teniendo un intercambio iónico  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ , una mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula inducirá la contracción muscular cardíaca.<sup>11,15,17.</sup>

*Subunidad  $\beta$  y  $\gamma$* 

La función de la subunidad  $\beta$  es la de corregir los pliegues de inserción en la membrana de la subunidad  $\alpha$  asegurándose la funcionalidad de ésta. Con relación a la subunidad  $\gamma$ , se ha encontrado que su función es como el de una bomba moduladora, al menos en el riñón.<sup>11</sup>

Los lípidos de la membrana asociados a las cadenas polipeptídicas tienen importancia en el funcionamiento de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ya que ésta se inactiva, cuando se le aíslan y se le extraen totalmente los lípidos que la acompañan.<sup>18</sup>

### **Acción catalítica de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .**

La ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  cataliza la hidrólisis de ATP en una reacción que requiere la presencia de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . El ciclo de reacción de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ha sido descrito desde hace 30 años, por Alberts y colaboradores, el mecanismo de reacción involucra los intermediarios enzimáticos en la fosforilación y la desfosforilación, donde ambos sufren una transición conformacional. Es en esta transición donde se acopla el ión sodio o potasio. Poco se sabe sobre el papel que juega el ión magnesio dentro de lo que es la actividad de la ATPasa, sin embargo se ha encontrado que su presencia en la enzima es fundamental para su funcionamiento.<sup>11, 19.</sup>

A continuación se prevé el mecanismo de manera sintetizada y el esquema general de funcionamiento de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ <sup>20</sup> (Fig. 2):

#### **Mecanismo sencillo:**



$_i$  = intracelular, citoplasma.

$_e$  = extracelular, fuera de la célula.

Pi = Fósforo inorgánico.

### Esquema cinético para el transporte activo de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ por la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

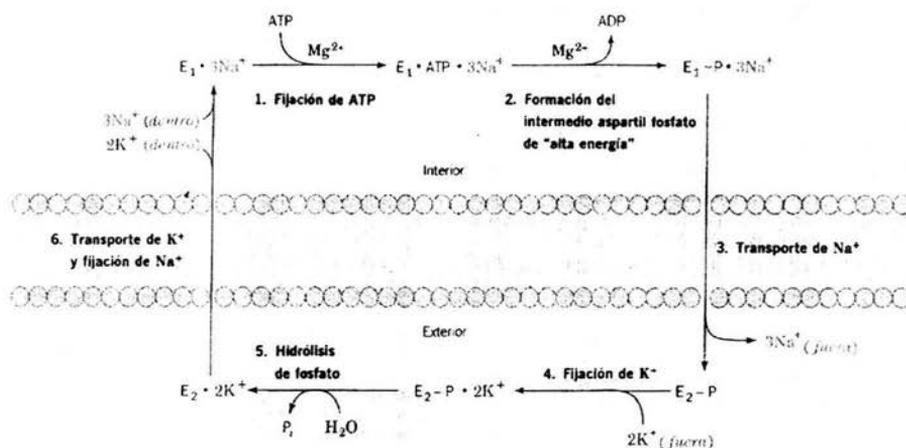


Figura 2. Esquema de la actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

En la conformación conocida como  $\text{E}_1$ , la subunidad  $\alpha$  de la enzima se une con alta afinidad al ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  y a 3 iones  $\text{Na}^+$ , que acceden fácilmente desde la faz citoplasmática, produciendo un complejo ternario  $\text{E}_1 \cdot \text{ATP} \cdot 3\text{Na}^+$ . Se produce la hidrólisis del ATP y el tercer resto fosforilo  $\gamma$ , es transferido al carboxilo de un resto de aspartato en la subunidad  $\alpha$ .<sup>21,22</sup> Los 3 iones  $\text{Na}^+$  quedan atrapados por la enzima fosforilada; se libera ADP y se produce un cambio conformacional conocido como conformación  $\text{E}_2\text{-P}$ , dando como resultado que el ión sodio y los sitios de unión queden expuestos al exterior de la célula, disminuyendo la afinidad para el catión. Los iones  $\text{Na}^+$  son liberados hacia el espacio intersticial. Dos iones potasio se fijan a  $\text{E}_2\text{-P}$ , accesible desde la superficie externa de la enzima fosforilada. La unión del ión potasio promueve la hidrólisis y liberación del fosfato ligado a la enzima. Los iones potasio son atrapados por la enzima desfosforilada. La unión de ATP, ahora se da en

---

sitios de baja afinidad, promoviendo un nuevo cambio conformacional para volver a  $E_1$ . La enzima disminuye su afinidad para el ión potasio, que queda expuesto hacia el interior de la célula y es liberado en el citosol.<sup>11</sup> (Figura 2).

Cuando se aumentan las concentraciones de  $Na^+$ ,  $K^+$ , ADP y  $P_i$ , la ATPasa- $Na^+/K^+$  actúa como una ATPasa sintetasa, formando ATP a partir de ADP y  $P_i$ , utilizando la energía del gradiente de potencial electroquímico para la regeneración de ATP, energía que es generada por el transporte de electrones de membrana.

Cuando se lleva a cabo la inhibición originada por la presencia de glicósidos, aumenta la concentración interna de  $Na^+$ , disminuyendo el potencial electroquímico causando un transporte activo de tipo secundario, el cual en forma distinta al primario, funciona bajo la diferencia de potencial electroquímico creado por la transferencia de iones a partir de la hidrólisis de ATP.

### **Ca<sup>2+</sup>- ATPasa**

La concentración de calcio en el citoplasma de las células se mantiene en niveles bajísimos (hasta 10 000 veces menores que los existentes en el líquido extracelular) debido a la existencia del sistema que expulsa  $Ca^{2+}$  citosólico. Todas las células poseen bombas de

$\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática y en membranas del retículo endoplásmico(RE), la mejor conocida es la de retículo sarcoplásmico (RS), equivalente a RE en células musculares.

Su estructura y funcionamiento es semejante a la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  excepto que es un "uniporter" en vez de un "antiporter". Posee una única subunidad  $\alpha$  con diez segmentos transmembrana, en cuya faz citoplásmica se encuentran sitios específicos de alta afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP; requiere  $\text{Mg}^{2+}$  y cataliza la hidrólisis de ATPasa, a ADP y Pi, transfiriendo dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  por cada molécula de ATP hidrolizada.

La ATPasa- $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática, cumple la función de regular los niveles de iones de calcio en el citosol. El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, promueve su unión sobre una proteína llamada calmodulina. El complejo de la calmodulina interactúa con un sitio en dominio citosólico de la enzima y produce su activación alostérica. La bomba de calcio también puede ser activada por modificación covalente, por la proteína cinasa dependiente del AMP cíclico. <sup>11, 17, 23.</sup>

### **Relación acción enzimática en el estado nutricional.**

De manera simplificada podemos describir la relación que existe entre la actividad de las ATPasas y el estado nutricional de un individuo, ya que como se ha descrito, la buena funcionalidad tanto del intestino como de las macromoléculas involucradas en su funcionamiento, es de vital importancia para la transportación de nutrientes, los cuales ya

metabolizados son indispensables para el buen funcionamiento del organismo, lo que se ve reflejado en el estado nutricional del individuo.

A continuación se detallará de manera simple los parámetros analíticos en los que se basó la validación del método para llevar a cabo la determinación enzimática.

## **VALIDACIÓN**

### Definición

Un método analítico se define como la secuencia de actividades que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) en una muestra. La validación es contar con evidencia documental de que un proceso se comporta de manera consistente y que satisface los requisitos necesarios para su aplicación analítica, permitiendo la obtención de resultados confiables y cercanos al valor real.

La evidencia documentada de la validez de un método, se expresa por medio de la evaluación de distintos parámetros; linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, límites de detección y cuantificación, especificidad, tolerancia, robustez y

estabilidad, en función de las características del análisis. Cada parámetro debe cumplir con ciertos criterios de aceptación para considerar que la metodología es válida.

Los métodos que aparecen en la literatura oficial reconocida (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, métodos oficiales de análisis de la AOAC, etc.), se consideran válidos y sólo deben cumplirse con una etapa de adecuación, verificando que los resultados obtenidos cumplan con los criterios de aceptación.<sup>24-28</sup>

### Linealidad

La linealidad es la proporcionalidad que existe entre la concentración de un analito y los resultados obtenidos directamente o por medio de transformaciones matemáticas definidas, dentro de un determinado intervalo. Se utiliza el modelo de la ecuación de la línea recta ( $Y = mx + b$ ) para su evaluación. También se evalúa el intervalo dentro del cual se cumple dicha proporcionalidad.

La linealidad del sistema es la proporcionalidad del análisis de estándares de referencia en el sistema de cuantificación. Permite obtener curvas de calibración que relacionan la respuesta que genera el analito (Y) en una metodología dada, con la concentración de soluciones estándar del analito (X). Las curvas de calibración se preparan con al menos 5 niveles de concentración del estándar, cada nivel, al menos, por triplicado.

La ecuación que describe la tendencia se obtiene por el método de mínimos cuadrados, donde se obtienen coeficiente de determinación ( $r^2$ ), pendiente ( $m$ ) y ordenada al origen ( $b$ ); además se estima el intervalo de confianza de la pendiente.

La linealidad del método es el comportamiento entre la concentración del compuesto de interés en la muestra y la respuesta obtenida, descrito mediante la ecuación de la línea recta. En este punto se debe considerar la metodología involucrada en la preparación de la muestra (extracción, tiempo de incubación, etc.). Permite asegurar que los resultados que se obtengan serán directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo dinámico de trabajo. Se utilizan al menos tres niveles de concentración.

Existen dos formas de evaluar la linealidad del método:

- \* Cuando se conoce la totalidad de los componentes de la matriz donde se encuentra el analito, se prepara un placebo y se adiciona en tres niveles de concentración el analito a cuantificar y el análisis se hace por triplicado.
- \* Cuando no se conocen los componentes de la matriz, se utiliza la muestra misma como matriz: sin adicionar el analito a cuantificar y analizando tres niveles más de concentración del mismo, cada uno por triplicado. En cada nivel, se mantiene constante la cantidad de muestra utilizada, con la finalidad de restar este resultado de las muestras adicionadas. Cuando no es posible adicionar de manera directa el analito a la muestra, la

adición se hace en alguna de las primeras etapas del método, para lograr asegurar que las etapas posteriores no den lugar a resultados incorrectos.

Los niveles de adición se realizan considerando que los resultados obtenidos estarán dentro del intervalo de linealidad del sistema. Se utiliza como referencia la misma sustancia adicionada. La metodología de la cuantificación debe ser realizada por el mismo analista y bajo las mismas condiciones.

En ambos casos, se reporta la cantidad recuperada (Y) en función de la cantidad adicionada (X). Utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados, se calcula la pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Se estiman también, los intervalos de confianza para la pendiente y para la ordenada al origen, además del coeficiente de variación de la regresión.

#### EXACTITUD

Se define como la concordancia entre un valor obtenido, empleando el método propuesto, y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro del análisis de muestras o placebos adicionados (cantidad cuantificada / cantidad adicionada X 100 ). El intervalo de confianza del promedio de recobro debe incluir el 100% o el promedio aritmético, de al menos 6 determinaciones.

Cuando se hace la evaluación de la linealidad del método, puede determinarse simultáneamente la exactitud del método, pues en la evaluación de cada nivel de concentración adicionado, se determina la cantidad de muestra recuperada.

La exactitud no fue evaluada ya que por tratarse de un sistema enzimático, no se asegura la determinación real de actividad de la enzima.

## PRECISIÓN

Es el grado de concordancia entre ensayos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra o referencia homogéneas. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (C.V):  $\text{desviación estándar muestra} / \text{media aritmética} \times 100$ .

La precisión del sistema se determina a partir del análisis de una solución a un solo nivel de concentración, por sextuplicado. La precisión del método (o precisión intermedia) se obtiene del análisis por triplicado de una muestra homogénea o sustancia de referencia en dos días diferentes y por dos analistas diferentes.

## REPETIBILIDAD / REPRODUCIBILIDAD

La repetibilidad es la precisión expresada como la concordancia entre las determinaciones independientes, aplicando el método desarrollado, realizadas bajo las mismas condiciones (muestra, analista, tiempo, aparato, condiciones, etc.).

La reproducibilidad también se refiere como precisión, pero expresada en términos de determinaciones independientes, realizadas en condiciones diferentes (analista, laboratorio, equipo, etc.), analizando una misma muestra. La desviación estándar relativa es la forma de evaluar la reproducibilidad y / o repetibilidad.

#### SENSIBILIDAD

Cuanto mayor es la sensibilidad de un método, será más probable medir cambios más pequeños en la respuesta del sistema de detección. Los parámetros que la definen son: el límite de detección, que es la mínima cantidad del analito que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar y el límite de cuantificación, que es la mínima concentración del analito que se puede determinar con exactitud y precisión razonables.

Tanto el límite de detección, como el de cuantificación, pueden ser estimados a partir de la relación señal / ruido o de los parámetros de la curva de calibración.

#### ESPECIFICIDAD / SELECTIVIDAD

La especificidad es la capacidad de un método analítico para obtener respuesta debido únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, es decir, evaluar inequívocamente al analito en presencia de compuestos endógenos.

La selectividad es la posibilidad del método de separar el analito de otros productos.

La prueba más simple para la evaluación de especificidad es el análisis de un blanco de la matriz biológica.

La evaluación de selectividad, en los métodos enzimáticos requiere de evaluaciones específicas para cada enzima.

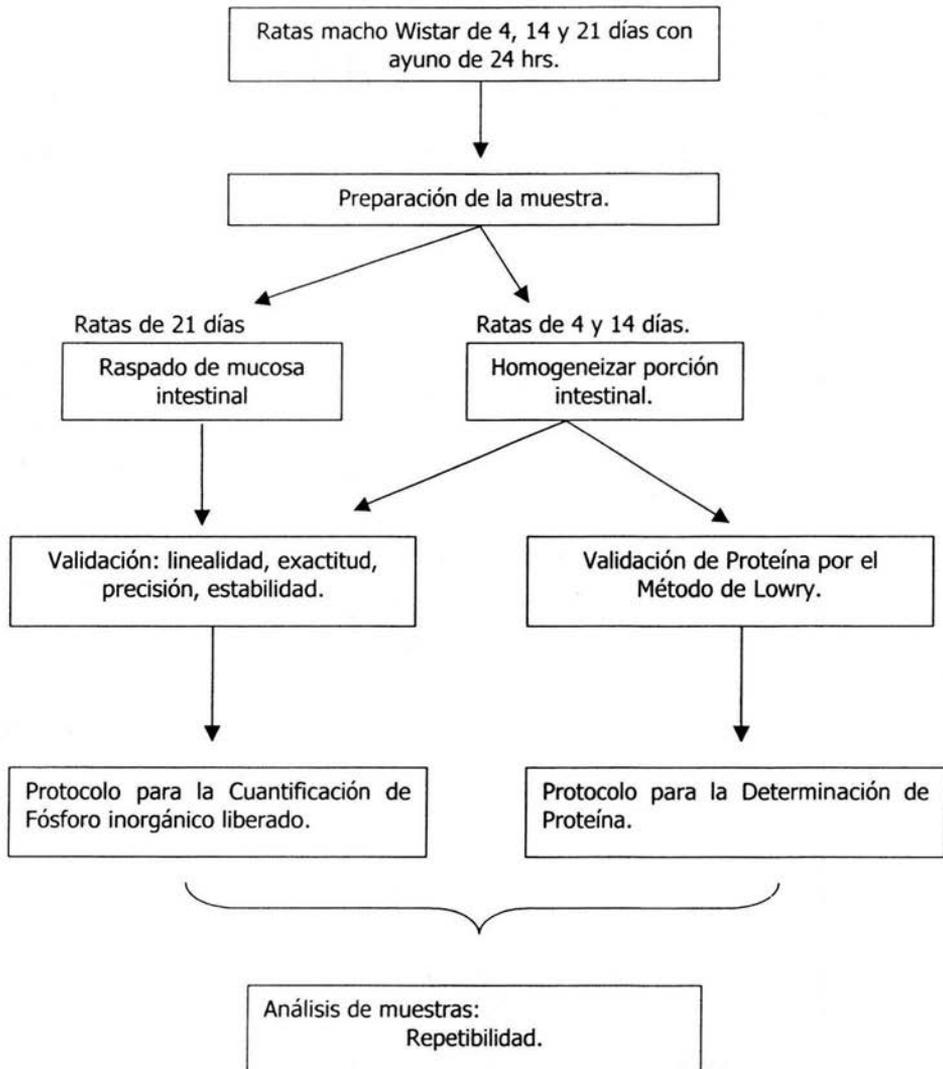
#### ESTABILIDAD

Es la propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de mantenerle bajo condiciones específicas.<sup>24-26</sup>

# Metodologías

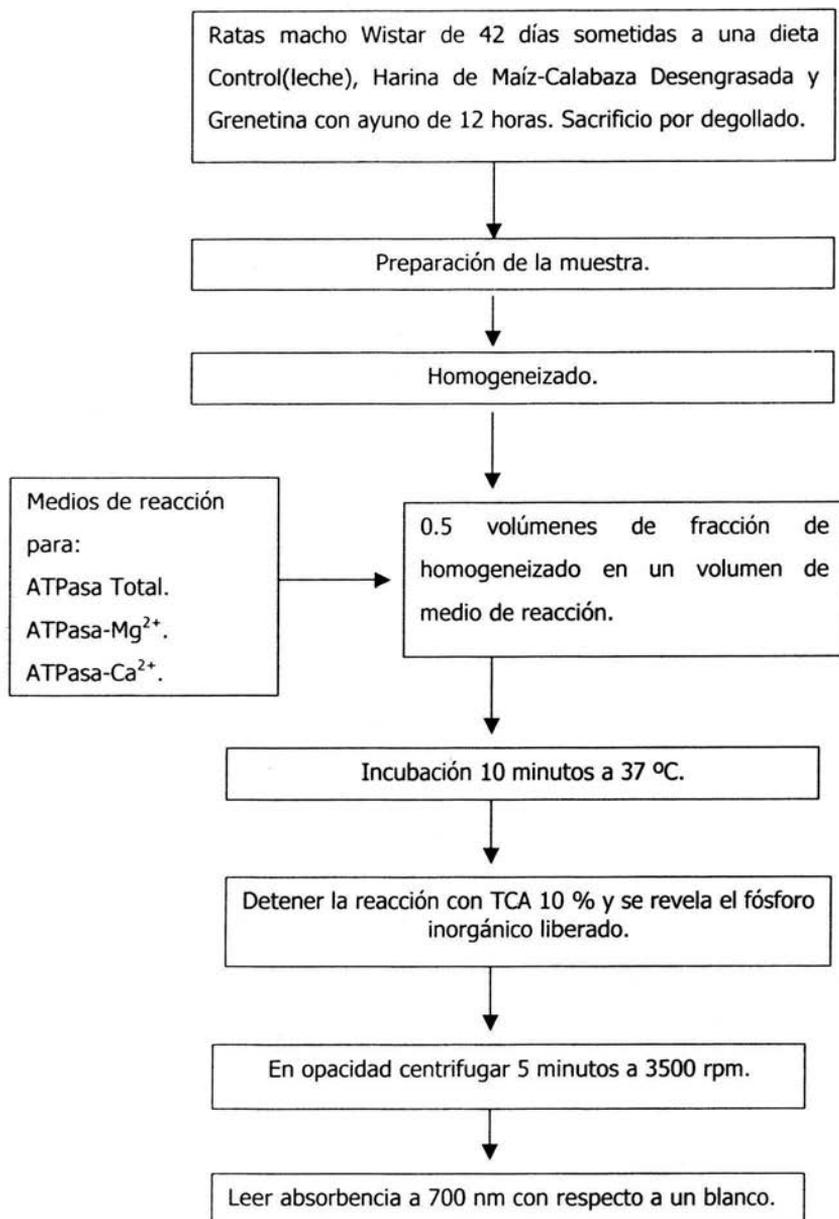
## METODOLOGÍAS

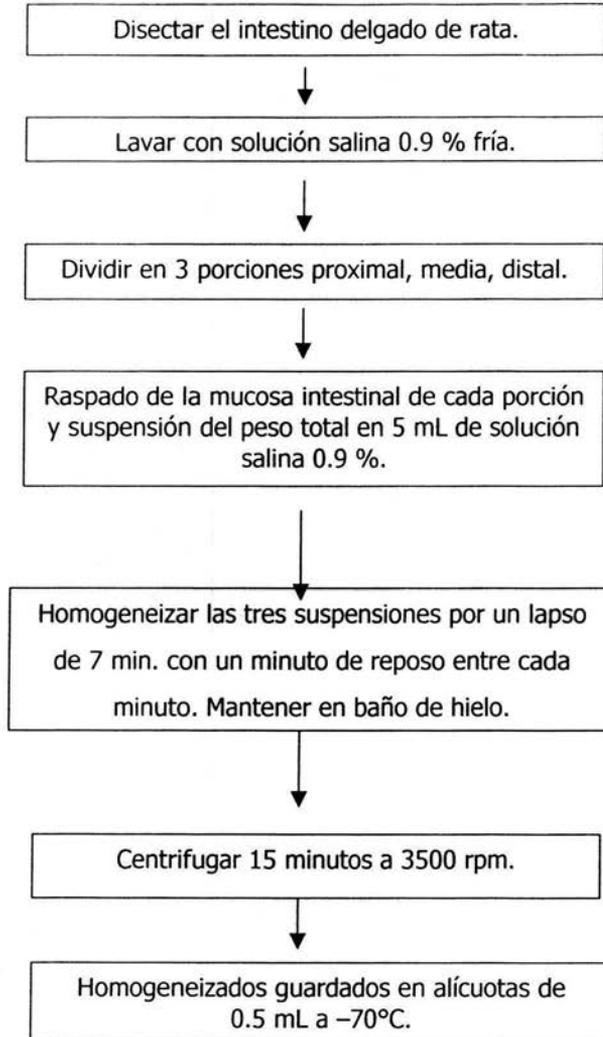
### Validación del Método



## Cuantificación de fósforo inorgánico liberado por la acción de ATPasas

### Análisis de Muestras.



**Preparación de muestras**

---

**VALIDACIÓN****1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO INORGÁNICO.**

En la validación del sistema para determinar fósforo inorgánico, se utilizó una solución estándar de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) equivalente a 0.0016 M de fósforo inorgánico (50 microgramos de fósforo inorgánico ( $\mu\text{gPi}$ ) / mililitro (mL) ). La determinación fue por el método espectrofotométrico mediante la detección de fósforo inorgánico a 700 nm, después de transformarlo en un compuesto colorido.

En la validación del método se requirió de un homogeneizado de cada una de las diferentes porciones del intestino delgado de 2 ratas Wistar de edad joven adulta, 10 ratas de 4 días de edad y 15 ratas de 14 días de edad. Sus condiciones alimenticias y ambientales fueron las que se establecen para ser considerado un reactivo biológico aséptico en un bioterio.

La curva de calibración para determinar la cantidad de fósforo inorgánico liberado está planteada de tal manera que en ella puedan interpolarse los datos para obtener los valores de concentración de fósforo inorgánico de cualquier ATPasa que se esté evaluando. Así que la validación del sistema considera, la cantidad de fósforo inorgánico liberado mediante la acción enzimática de todas y cada una de las ATPasas.

### 1.1.Linealidad

Para la validación del sistema se requirió de una curva estándar de calibración de tipo  $Y = mx + b$ , con 8 niveles de concentración, analizado cada uno por triplicado. Para la obtención de cada una de las concentraciones se partió de una sola concentración de solución estándar ( 50  $\mu\text{gPi} / \text{mL}$ ). Estableciendo así los siguientes niveles de concentración 0, 1.5, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 37 y 50  $\mu\text{gPi} / \text{mL}$ . Se observó que en este intervalo de concentraciones se mantiene una tendencia lineal en la curva, de ahí que se haya establecido de esta forma.

La curva de calibración es de tipo  $Y = mx + b$ , con el método de mínimos cuadrados por lo que se pudo obtener el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), ordenada al origen y pendiente.

El criterio de aceptación empleado para la curva fue el de un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98.

Se adecuaron las muestras intestinales de acuerdo con la metodología establecida para la determinación de ATPasas, para cada una de las diferentes edades. Cada porción intestinal se determinó por triplicado. Se calculó promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y análisis de varianza en todas.

Como criterio de aceptación se estableció un coeficiente de variación menor del 10%.

## 1.2. Sensibilidad

Para evaluar la sensibilidad del sistema se requirió de la curva de calibración con al menos 8 niveles de concentración por triplicado cada uno. Se determinaron los límites de cuantificación y los límites de detección. El criterio de aceptación fue el de un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98.

La sensibilidad del método se llevó a cabo mediante la determinación de los límites de cuantificación y de detección. Se consideró la edad de las ratas y la porción intestinal. El análisis se realizó por triplicado en cada una de las diferentes edades de las ratas, así como cada una de las diferentes porciones intestinales.

Se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Como criterio de aceptación se consideró un coeficiente de variación menor al 10%.

## 1.3. Precisión (Evaluada como Repetibilidad y Reproducibilidad)

La reproducibilidad del sistema fue mediante la comparación de 3 curvas de calibración a 2 diferentes días. La repetibilidad se evaluó, como el promedio de un sextuplicado de cada una de las concentraciones de la curva estándar, cuyo resultado debió de cumplir con el criterio de aceptación.

La repetibilidad del método, se llevó a cabo mediante la determinación de la cantidad de fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de las diferentes ATPasas, en cada una de las porciones del intestino delgado de una misma muestra evaluada por triplicado, en un mismo día.

La reproducibilidad del método, se llevó a cabo mediante la determinación de la cantidad de fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de las diferentes ATPasas, en cada una de las porciones del intestino delgado de una misma muestra evaluada por triplicado, en 2 diferentes días.

Se obtuvo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación porcentual de cada uno de los analitos. El criterio de aceptación fue un coeficiente de variación porcentual menor del 10%.

#### 1.4. Estabilidad

Para evaluar la estabilidad del sistema, se estableció un tiempo límite de 2 horas para la lectura de la absorbencia a 700 nm, debido a la inestabilidad del derivado de fósforo, una vez desarrollado el color con los reactivos específicos.

La estabilidad de la muestra se realizó de dos formas:

La primera consistió en determinar si existe una variación significativa en cuanto a la cantidad de fósforo inorgánico liberado en cada una de las porciones intestinales para un mismo extracto, de una misma muestra, sometido a una primera y una segunda descongelación, en diferentes días de análisis.

La segunda consistió en determinar si el homogeneizado es estable, conservado en calidad de extracto, evaluando los diferentes extractos de una misma muestra, en distintos días de análisis.

El análisis se realizó por triplicado, obteniendo promedio, desviación estándar y coeficiente de variación porcentual menor al 10% y análisis de varianza.

## 2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

En la validación del sistema se utilizó la metodología para la determinación de proteína por el Método de Lowry y requirió de una solución estándar de albúmina sérica bovina (1 mg / mL). La determinación fue por el método espectrofotométrico a 750 nm.

En la validación del método se requirió del mismo homogeneizado utilizado en la validación para la determinación de fósforo inorgánico.

## 2.1. Linealidad

Para la validación del sistema se requirió de una curva estándar de calibración de tipo  $Y = mx + b$ , con 8 niveles de concentración, cada uno por triplicado. Para la obtención de cada una de las concentraciones se partió de una sola concentración de solución estándar (100  $\mu\text{g}$  proteína /mL), teniendo esta concentración como límite para conservar una tendencia lineal. Dando así los siguientes niveles de concentración 0, 5,10, 20,40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}$  proteína /mL.

La curva de calibración es de tipo  $Y = mx + b$ , con el método de mínimos cuadrados se obtiene el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), ordenada al origen, pendiente.

El criterio de aceptación empleado fue el de un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98.

Se adecuaron las muestras intestinales de acuerdo a la metodología establecida para la Determinación de Proteína, para cada una de las diferentes edades y cada una de las diferentes porciones intestinales. Cada porción intestinal se determinó por triplicado. Se calculó promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y análisis de varianza.

Como criterio de aceptación se estableció un coeficiente de variación menor del 10%.

## 2.2. Sensibilidad

Para evaluar la sensibilidad del sistema se requirió de la curva de calibración con al menos 8 niveles de concentración por triplicado cada uno. Se determinaron los límites de cuantificación y los límites de detección. El criterio de aceptación fue el de un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98.

La sensibilidad del método se llevó a cabo mediante la determinación de los límites de cuantificación y de detección. Se consideró la edad de las ratas y la porción intestinal. Se realizó por triplicado de cada una de las diferentes edades de las ratas, así como cada una de las diferentes porciones intestinales.

Se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Como criterio de aceptación se consideró un coeficiente de variación menor al 10%.

## 2.3. Precisión (Evaluada como Reproducibilidad)

La reproducibilidad del método se llevó a cabo mediante la determinación de la cantidad de fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de ATPasa Total, ATPasa-Mg<sup>2+</sup>, ATPasa-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, <sup>+</sup>ATPasa-Ca<sup>2+</sup>, en cada una de las porciones del intestino delgado de una misma muestra, a diferentes días por triplicado.

Se obtiene el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación porcentual con un criterio de aceptación menor del 10%.

#### 2.4. Precisión (Evaluada como Repetibilidad)

La repetibilidad del sistema se realizó determinando cada uno de los puntos de la curva de calibración por sextuplicado. Se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

La repetibilidad del método se determinó por triplicado en una misma muestra con una misma concentración.

Se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. El criterio de aceptación es de un coeficiente de variación menor al 10%.

### **ANÁLISIS DE MUESTRAS**

Para evaluar el efecto de la desnutrición sobre la actividad de las ATPasas se utilizaron 3 grupos de 6 ratas Wistar de 42 días de nacidas, alimentadas por 21 días, con 3 diferentes tipos de dietas, cuya diferencia radicó en la calidad proteínica de cada una de ellas. Un primer grupo fue alimentado con una dieta control a base de caseína considerada como una dieta de alta calidad proteínica. Un segundo grupo fue alimentado con una dieta a base de maíz y de harina de pepita de calabaza desengrasada, en una proporción de 50:50 con respecto a la cantidad de proteína de cada componente base, ésta se consideró como

una dieta de buena calidad proteínica. El tercer grupo fue alimentado con una dieta a base de grenetina, considerada como una dieta de baja calidad proteínica.

La composición porcentual de cada una de las dietas con las que se alimentaron a los animales de estudio, se presenta en la Tabla 1, conservando cada dieta el 10% de proteína.

**Tabla1. Composición porcentual en la que fueron diseñadas las dietas alimenticias para ratas.**

Dieta Control		Dieta Harina desengrasada de pepita de calabaza y Harina de maíz (HDM)		Dieta Grenetina	
Componente	%	Componente	%	Componente	%
Caseína(95.2% proteína)	10.5	Harina desengrasada de	8.3	Grenetina(95.2 % proteína)	10.6
Sacarosa	22.0	pepita de calabaza ( <i>Cucurbita</i> <i>argirosperma</i> )		Sacarosa	22.0
Dextrosa	19.0	Harina de maíz nixtamalizada	53.8	Dextrosa	19.0
Dextrina	25.0	Sacarosa	9.0	Dextrina	25.0
Manteca Vegetal	8.0	Dextrosa	7.8	Manteca Vegetal	8.0
Aceite Vegetal	6.0	Dextrina	6.9	Aceite Vegetal	6.0
Mezcla de vitaminas	1.0	Manteca Vegetal	6.6	Mezcla de vitaminas	1.0
Mezcla de minerales	2.0	Aceite Vegetal	5.0	Mezcla de minerales	1.8
Colina (sol. al 50%)	0.4	Mezcla de vitaminas	1.0	Colina (sol. al 50%)	0.4
Celulosa	6.1	Mezcla de minerales	1.2	Celulosa	6.2
		Colina (sol. al 50%)	0.4		
		Celulosa	-		

Esta evaluación biológica fue realizada por alumnos de la clase de Nutrición I de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma 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.<sup>27</sup>

Una vez concluido el ensayo en un tiempo de 21 días en el que fueron alimentados los animales, se procedió a la obtención de las muestras de mucosa intestinal de las ratas de los 3 grupos de dieta.

### **PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Las 6 ratas Wistar de cada una de las dietas, se mantuvieron en ayuno por un lapso de 12 horas, para poder ser sacrificadas por degollado, disectando así el intestino delgado, el cual fue lavado con solución salina fría al 9 %, la que ayuda a remover todo residuo contenido en el intestino delgado, su limpieza reduce la interferencia en los factores que se quieren evaluar. Una vez limpio se divide en tres porciones la proximal, la media y la distal.

Para cada una de las porciones se obtuvo la mucosa intestinal, siguiendo el método de Carmona<sup>29</sup>. Esto se realizó raspando la mucosa de cada porción con un portaobjetos de vidrio. La mucosa de cada porción intestinal fue suspendida en 5 mL de solución salina fría al 9 %, cada suspensión se centrifugó a 3500 rpm por un tiempo de 15 minutos, el sobrenadante se guardó en alícuotas de 0.5 mL a -70 °C, para el posterior análisis de

cantidad de proteína contenida y cantidad de fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de las ATPasas.

A continuación se hará la descripción de las metodologías que se llevaron a cabo para la determinación de proteína y de fósforo inorgánico liberado.

### **DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY.**

La determinación de proteína presente en las muestras de intestino delgado se basó en la técnica de Lowry.<sup>29</sup>

#### **1. FUNDAMENTO.**

El método se fundamenta en el uso de la reacción de Biuret, donde las proteínas reaccionan con los iones cobre en medio alcalino. El reactivo fenol Folín-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico) se reduce por los residuos de tirosina y de triptofano presentes en la proteína. La intensidad del color refleja la formación del complejo cobre-proteína, este complejo puede ser detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

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 debidos al mecanismo de reacción.

---

## 2. REACTIVOS

-Solución estándar de albúmina sérica bovina, Sigma A-3425 (1 mg / mL).

Disolver 10.43 mg de albúmina sérica bovina (Sigma A. 3425), 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 alícuotas de 1 mL a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

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

Disolver 32 g de hidróxido de sodio 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.

### 3. EQUIPO

Balanza analítica Sartorius Mod.022605.

Espectrofotómetro Sequoia Turner Mod. 340, con celdas de 1 cm.

Vortex. Super-Mixer N° 1290.

Matraces volumétricos de 10 y 100 mL.

Probeta graduada de 100 mL.

Pipetas automáticas Finnpipette (200-1000  $\mu$ L y 1-5 mL).

Tubos de ensayo de 16 X 150 mm.

Tubos de microfuga Eppendorff.

### 4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA EN LA MUCOSA INTESTINAL DE RATA.

Para la determinación del contenido de proteína se utilizaron extractos diluidos del homogeneizado de la mucosa del intestino delgado de ratas. Sabiendo con anterioridad que cada una de las porciones posee una cantidad distinta de proteína, se estableció el siguiente patrón de dilución para cada una de las porciones intestinales, en condiciones estandarizadas de alimentación:

Porción proximal 1:400

Porción media: 1:400

Porción distal 1:50

Cabe aclarar que la dilución puede variar de acuerdo con el tipo de alimentación que reciba el animal de estudio, se ha encontrado que el factor de dilución es menor en animales desnutridos. Considerando lo anterior, la determinación se procedió de la siguiente forma:

Colocar en un tubo de ensaye 1.2 mL de la porción del homogeneizado diluido; adicionar 0.9 mL de reactivo mezcla y agitar en vortex, adicionar 0.6 mL de reactivo C y agitar inmediatamente, adicionar 0.6 mL de reactivo C y mezclar vigorosamente. Incubar el tubo a 37 °C por 45 minutos, protegido de la luz. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado.

Leer las absorbencias de las muestras problema en un espectrofotómetro a 750 nm. Ajustar el espectrofotómetro con el blanco de reactivos de la curva patrón. Determinar el contenido de proteína de cada muestra, interpolando su lectura en la curva patrón.

## 5. PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE ALBÚMINA

Para la preparación de la curva patrón de albúmina se prepararon soluciones con concentraciones de 0, 5, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu$ g / mL, a partir de una solución de albúmina sérica bovina (1 mg / mL).

Colocar en tubos de ensaye, 1.2 mL de cada solución estándar; añadir a cada tubo 0.9 mL de reactivo mezcla y agitar en vortex, inmediatamente adicionar 0.6 mL de reactivo C y agitar, para adicionar nuevamente 0.6 mL de reactivo C y mezclar vigorosamente. Incubar

los tubos a temperatura ambiente por 45 minutos, protegidos de la luz. La determinación de cada concentración se hizo por triplicado.

Leer las absorbancias en un espectrofotómetro a 750 nm, ajustando el espectrofotómetro contra el blanco de reactivos .

Para la obtención de la curva se debe trazar la gráfica de absorbancia contra concentración de albúmina sérica bovina (expresando el valor como  $\mu\text{g}$  de proteína / mL).

## 6. CÁLCULOS.

La concentración de proteína de la muestra se lee a partir de la curva patrón y los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de proteína / mL, este resultado se multiplica por el factor de dilución de la alícuota del extracto, quedando expresado en miligramos de proteína (mg Pr-) / mililitro (mL)

Es importante primero llevar a cabo la determinación de proteína antes que la de fósforo inorgánico, ya que la cantidad de proteína contenida se toma como base para estimar la cantidad de fósforo presente y de ahí considerar la dilución a la que se someterá el extracto para determinar el fósforo inorgánico. Este ajuste técnico debe ser considerado cuando no se cuenta con una gran cantidad de muestra.

Las alícuotas utilizadas en un solo ensayo, para la determinación de proteína y de fósforo inorgánico liberado, proceden de una misma fracción de 0.5 mL de extracto homogeneizado, en cada una de las porciones intestinales.

A continuación se describe la metodología que se siguió para la determinación de fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de las ATPasas:

## **DETERMINACION DE ATPasas**

### **1. FUNDAMENTO**

La determinación de la actividad de las ATPasas esta basada en la medición de fósforo inorgánico (Pi) liberado después de la hidrólisis del ATP disódico con la enzima, originando ADP y Pi. La determinación se hizo siguiendo el método de Fiske y col.<sup>30</sup>, con las modificaciones planteadas por Omoruyi<sup>31-35</sup>, que consiste en la reducción del ácido fosfomolibdico formado, al adicionar sulfato ferroso, dando lugar a un compuesto de color azul, cuya intensidad va a depender de la cantidad de fósforo inorgánico presente.

### **2. REACTIVOS:**

Cloruro de sodio (NaCl) 1 M

Cloruro de potasio (KCl) 100 mM

Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 25 mM

Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>) 40 mM

Sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 1 mM

Ouabaína 2mM Sigma O-3125

ATP 25mM Sigma A.1023

Tris-HCl 100mM (pH= 7.4)

Ácido tricloroacético (TCA) al 12.5% en solución acuosa.

Ácido tricloroacético (TCA) al 20% en solución acuosa.

---

---

Molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ) al 1%, con Sulfato Ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) al 4%, en ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 1.15N

Ácido ascórbico al 0.2% en solución acuosa.

Solución estándar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.0016M (equivalente a 0.0016 M de Pi).

### 3. EQUIPO

Balanza analítica. Sartorius Mod. 022605.

Espectrofotómetro Sequoia Turner Mod. 340, con celdas de 1cm.

Vortex. Super-Mixer N° 1290.

Matraces volumétricos de 5, 10 y 100 mL.

Probeta graduada de 100 mL.

Pipetas automáticas Finnpiette (50-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$  y 1-5 mL).

Tubos de ensaye de 16 X 150 mm

Tubos de microfuga Eppendorff.

### 4. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO INORGÁNICO LIBERADO POR LA ACCIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LAS ATPasas: $\text{Na}^+/\text{K}^+$ y $\text{Ca}^{2+}$ .

Para poder determinar la cantidad de fósforo inorgánico liberado por la acción de las ATPasas se requiere:

Primero.- De un medio de reacción específico de la ATPasa ya sea de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  o de  $\text{Ca}^{2+}$ . La determinación de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se efectúa de forma indirecta, ya que es una

---

enzima cuyo aislamiento requiere de un equipo muy especializado y los métodos convencionales que se utilizan para identificar a otras enzimas, no son viables para ésta, de ahí que su determinación se base en la acción de su cofactor que es el ión  $Mg^{2+}$  mediante la presencia y ausencia de un inhibidor directo de la enzima, como lo es la ouabaína.

En la mayoría de las publicaciones la determinación de la actividad específica de la ATPasa- $Na^+/K^+$  se reporta con la presencia o la ausencia del inhibidor.<sup>31-34</sup>. En este trabajo la actividad específica de la ATPasa- $Na^+/K^+$ , se determina como: la actividad específica de la ATPasa Total (ausencia del inhibidor), y la actividad específica de la ATPasa- $Mg^{2+}$  (presencia del inhibidor). El valor de la actividad específica de la ATPasa- $Na^+/K^+$  se obtiene mediante la diferencia entre el valor de la actividad específica de la ATPasa Total y el valor de la actividad específica de la ATPasa- $Mg^{2+}$ .

Segundo.- Se utilizó el resto del extracto del homogeneizado intestinal empleado para determinar proteína. Este extracto requirió de una dilución previa a su análisis, tomando como base el contenido de proteína en mucosa, esta medida se realizó procurando que se ajustara en la zona media de la curva patrón de fósforo inorgánico, ya que la cantidad de muestra con la que se contaba no era muy grande.

En la tabla 2 se presentan los medios de reacción utilizados para la determinación de fósforo inorgánico, para cada una de las enzimas y cuyo valor es necesario para la determinación de actividad específica.

Nótese que cada uno de los medios llega a un volumen final de 5mL independientemente de la variación de los reactivos, conservando el volumen de reacción para cada una de las enzimas.

**TABLA 2. MEDIOS DE REACCION PARA LA ATPasa Total , ATPasa-Mg<sup>2+</sup> Y ATPasa-Ca<sup>2+</sup>.**

REACTIVO	ATPasa Total	ATPasa-Mg <sup>2+</sup>	ATPasa-Ca <sup>2+</sup>
NaCl 1 M	0.50mL	0.50mL	-
KCl 100 mM	0.50mL	0.50mL	-
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.50mL	0.50mL	-
CaCl <sub>2</sub> 40 mM	-	-	0.50mL
Ouabaína 2 mM	-	0.50mL	0.50mL
EDTA 1 mM	0.50mL	0.50mL	0.50mL
ATP 25 mM	0.50mL	0.50mL	0.50mL
Tris-HCl 100 mM (pH =7.4)	2.50mL	2.00mL	3.00mL
Volumen final	5.00mL	5.00mL	5.00mL

Tabla 2. Medio de reacción para ATPasas.

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

Colocar en un tubo de ensaye 1 mL del medio de reacción de la enzima por evaluar, la reacción de hidrólisis se inicia al adicionar 0.5 mL del extracto (**muestra**), e incubar la mezcla a 37 °C por un tiempo de 10 min. La reacción se detiene al precipitar proteínas con 1.5 mL de ácido tricloroacético al 12.5 %, y mantener en baño de hielo por alrededor de 5 minutos, (si hay presencia de turbiedad en el tubo, se debe de centrifugar a 5000 rpm por 5

---

minutos y separar el sobrenadante, de no presentar turbiedad se continua con la medición). Adicionar 2.0 ml de molibdato de amonio al 1.0 % con  $\text{FeSO}_4$  al 4 % en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.15 N, agitar y agregar 2.0 mL de ácido ascórbico al 0.2 %, volver a agitar y desarrollar color a temperatura ambiente durante 10 minutos. Leer la absorbencia a 700 nm, ajustando con el blanco de la muestra e interpolando los valores en la curva estándar.

#### 4.1 ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA ENZIMA: $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$ .

La actividad específica de la  $\text{ATPasa-Na}^+/\text{K}^+$  se obtiene mediante la diferencia del valor de la actividad específica de la  $\text{ATPasa}$  Total menos el valor de la actividad específica de la  $\text{ATPasa-Mg}^{2+}$ , de una misma muestra.

### 5. PREPARACIÓN DEL BLANCO DE LAS MUESTRAS

Colocar en un tubo de ensaye 1 mL de la solución de sales como medio de reacción (tabla 2), adicionar 1.5mL de ácido tricloroacético (frío) al 20 % y como simulación de la hidrólisis enzimática adicionar 0.5 mL de agua, en lugar de la muestra, incubar a 37 °C en un tiempo de 10 min. Mantener la reacción en un baño de hielo por alrededor de 5 minutos. Adicionar 2.0 mL de molibdato de amonio al 1.0 % con  $\text{FeSO}_4$  al 4 %, en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.15 N, agitar y agregar 2.0 mL de ácido ascórbico al 0.2 %, volver agitar y desarrollar color a temperatura ambiente durante 10 minutos. Leer la absorbencia a 700 nm.

## 6. CURVA ESTANDAR DE FÓSFORO INORGÁNICO

Realizar por triplicado la curva estándar con una solución estándar de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50  $\mu\text{g}$  fósforo inorgánico /mL equivalente a 0.0016 M de fósforo inorgánico.

En la Tabla 3 se muestran los 8 niveles de concentración y los volúmenes utilizados de la solución estándar de fósforo inorgánico, agua desionizada y ácido tricloroacético al 20% necesarios para alcanzar la concentración de cada nivel.

**TABLA 3. PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO INORGÁNICO.**

Tubo	Concentración $\mu\text{g Pi / mL}$	Solución estándar de fósforo inorgánico. (50 $\mu\text{gPi / mL}$ ) <sup>a</sup> (mL)	Agua Desionizada (mL)	TCA 20 % (mL)	Volumen final (mL)
1 (blanco)	0.000	0.000	2.000	1.000	3.000
2	1.500	0.050	1.950	"	"
3	3.125	0.150	1.850	"	"
4	6.200	0.250	1.750	"	"
5	12.500	0.500	1.500	"	"
6	25.000	1.000	1.000	"	"
7	37.000	1.500	0.500	"	"
8	50.000	2.000	-	"	"

a. Solución estándar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.0016M.

Adicionar a cada tubo 2.0 mL de la solución: molibdato de amonio 1 %, con  $\text{FeSO}_4$

---

4 %, en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.15 N, agitar y adicionar 2.0 mL de la solución de ácido ascórbico 0.2 %, agitar y desarrollar color a temperatura ambiente por 10 minutos. Leer a 700 nm, ajustando con el blanco.

### **CÁLCULO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE ATPasas.**

La concentración de fósforo inorgánico en la muestra se obtuvo a partir de la curva estándar en microgramos de fósforo inorgánico / mL, por lo que se hace la conversión a micromoles de fósforo inorgánico. Se debe de considerar en el cálculo el factor dilución de la alícuota del extracto.

Para poder calcular la actividad específica, se necesita conocer el contenido de proteína en la fracción del homogeneizado, de acuerdo con la porción intestinal que se esté manejando, por lo que se debe de considerar, tanto el factor de dilución del extracto como la fracción 0.5 mL del homogeneizado de la muestra. El valor se expresa en miligramos de proteína / mL. El tiempo es de acuerdo con la duración de la reacción enzima-sustrato.

Así, finalmente se hace la relación matemática de fósforo y proteína teniendo:

$$\text{Actividad Específica (AE)} = \frac{\text{micromoles } (\mu\text{moles}) \text{ de fósforo inorgánico (Pi)}}{\text{miligramos (mg) de proteína(Pr-) / minutos (min)}}$$

# Resultados y Discusión

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VALIDACION

#### 1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO INORGÁNICO LIBERADO POR LA ACCIÓN ENZIMÁTICA DE ATPasas.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO INORGÁNICO LIBERADO POR ATPasa TOTAL (ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y ATPasa- $\text{Mg}^{2+}$ ).

##### 1.1 Linealidad del sistema

El sistema presenta una linealidad de entre 1.5 – 50  $\mu\text{gPi}$ . pasando por cero. La respuesta es directamente proporcional a la concentración de fósforo inorgánico que se maneje. En todas las curvas realizadas por triplicado se obtuvo un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor de 0.98 como se observa en la Figura 3.

### Curva para evaluar la linealidad del sistema.

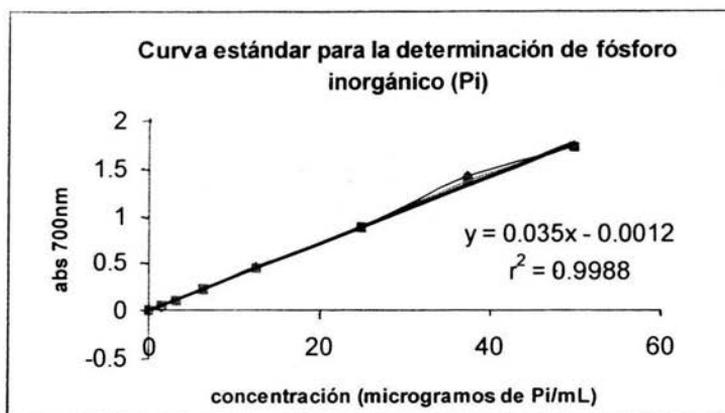


Figura 3. Curva estándar para la determinación de fósforo inorgánico, mediante el uso de una solución estándar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con concentraciones de 0, 1.5, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 37 y 50  $\mu\text{g Pi/ml}$ . Condiciones de incubación: 10 min a temperatura ambiente.

Considerando como satisfactorios los criterios de aceptación de la linealidad del sistema, se procedió a evaluar la cantidad de fósforo inorgánico contenido en las diferentes porciones de la mucosa del intestino delgado de ratas jóvenes adultas y del intestino delgado de ratas de 14 y 4 días de edad.

En la Tabla 4 se muestra la cantidad de fósforo inorgánico liberado mediante la acción enzimática de la ATPasa Total, ATPasa- $\text{Mg}^{2+}$  y ATPasa- $\text{Ca}^{2+}$ , en la mucosa intestinal de ratas jóvenes adultas, en la diferentes porciones de intestino delgado. Cada una determinada por triplicado.

**Tabla 4. Fósforo inorgánico liberado por la acción de ATPasas, presente en cada una de las tres porciones del intestino delgado de ratas adultas jóvenes.**

porción	$\mu\text{g Pi ATPasa Total} / \text{mL}$ en mucosa de rata. promedio	$\mu\text{g Pi ATPasa-Mg}^{2+} / \text{mL}$ en mucosa de rata promedio	$\mu\text{g Pi ATPasa-Ca}^{2+} / \text{mL}$ en mucosa de rata promedio
Proximal	$205.8 \pm 8.6^a$	$81.8 \pm 6.02^d$	$108 \pm 5.6^g$
CV (%)	6.1	7.3	5.2
Media	$66.0 \pm 2.4^b$	$25.7 \pm 1.80^e$	$29 \pm 1.7^h$
CV (%)	3.7	7.0	5.6
Distal	$43.3 \pm 2.5^c$	$9.7 \pm 0.59^f$	$17.3 \pm 0.3^i$
CV (%)	5.8	6.1	2.0

Letras distintas denotan diferencia significativa, entre cada porción y entre cada ATPasa

Como puede observarse, cada una de las porciones para las tres ATPasas cumple con el criterio de aceptación para esta prueba (CV menor al 10 %), por lo que puede establecerse un análisis de los valores encontrados.

Se observa una diferencia significativa entre cada una de las porciones para cada una de las enzimas, indicándonos que el comportamiento enzimático en cada porción no es el mismo y va a estar relacionado con la funcionalidad de cada porción.

Se observa que la mayor cantidad de fósforo inorgánico se tiene en la porción proximal del intestino delgado, y la menor cantidad de fósforo, en la porción distal, teniendo una cantidad intermedia en la porción media del intestino delgado. Lo cual indica que en la porción proximal existe una mayor presencia de ATPasas.

El que exista más cantidad de fósforo inorgánico en la porción proximal del intestino delgado, no es más que el indicio de una mayor función reguladora de cationes, de modo que es la región en donde se lleva a cabo la absorción de la mayoría de los metabolitos.

En la tabla 5 podemos observar la cantidad de fósforo inorgánico en cada una de las porciones del intestino delgado en ratas de 4 y 14 días de edad.

La respuesta obtenida para la evaluación del homogeneizado de intestino delgado de ratas de 4 y 14 días, cumple con el criterio de aceptación (CV menor al 10 %) para cada edad y cada porción.

La determinación de actividad enzimática no se realiza directamente en mucosa intestinal, debido a su falta de viabilidad, ya que la fracción intestinal a esta edad aún no ha alcanzado un estado de madurez que permita la obtención de mucosa, por lo que la determinación de cantidad de fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de ATPasa se realiza en cada porción del intestino como tal. Debido a que la porción intestinal de cada fracción obtenida fue mínima, se procedió a hacer un pool (concentrado) de cada porción del intestino delgado de todas las ratas de una misma edad, y aun así se obtuvo muy poca cantidad de muestra, siendo solo posible evaluar la acción enzimática de la ATPasa Total. De antemano debe de considerarse que los datos sobre la cantidad de fósforo inorgánico encontrado en estas muestras, no son del todo confiables, ya que pueden existir interferencias causadas por el tejido epitelial del que está constituido el intestino, dando falsos positivos, sin embargo siguen siendo datos registrables para estudios que se deseen

realizar en un futuro. De igual forma estos datos nos ayudan a validar el método en la actividad de ATPasas Totales.

**Tabla 5. Fósforo inorgánico liberado por la acción de las ATPasas totales en un pool intestinal de ratas de 4 y 14 días de edad.**

porción	$\mu\text{gPi} / \text{ml}$ en un pool de intestino de 10 ratas de 4 días $\pm$ DE promedio	$\mu\text{gPi} / \text{ml}$ en un pool de intestino de 15 ratas de 14 días $\pm$ DE promedio
Proximal	$342.5 \pm 19.9^g$	$438.4 \pm 1.18^d$
CV (%)	5.8	0.27
Media	$377.8 \pm 21^h$	$624 \pm 7.7^e$
CV (%)	5.5	1.24
Distal	$530.5 \pm 9.2^i$	$681.6 \pm 16.6^f$
CV (%)	1.7	2.44

Letras diferentes indican diferencia significativa, entre cada porción y entre cada edad. La determinación se realizó por triplicado. DE (desviación estándar).

Para las ratas de 4 y 14 días de edad se encontró que existe una diferencia en cuanto a la cantidad de fósforo inorgánico en cada una de las porciones intestinales. La porción distal del intestino delgado, contiene la mayor cantidad de fósforo inorgánico, después la porción media y finalmente la menor cantidad se encuentra en la porción proximal.

Se ha encontrado<sup>16</sup> que en ratas de 4 y 14 días se tiene una mayor cantidad de fósforo inorgánico en la porción distal, a diferencia de las ratas adultas, donde la mayor cantidad de fósforo es en la porción proximal. Simplemente se refleja las etapas de maduración del intestino en ratas. En etapas tempranas de desarrollo en el intestino de ratas, se observa una mayor actividad enzimática en la región distal y a medida que el animal va creciendo, se va incrementando la actividad enzimática, siendo la región proximal la que lleva a cabo una mayor actividad. Para cuando el animal ha alcanzado una etapa de maduración, la funcionalidad del intestino en sus distintas regiones, permite que sea apto para el proceso de absorción de los nutrimentos de manera específica , logrando ajustarse a las necesidades metabólicas del animal.

## 1.2 Sensibilidad

### 1.2.1 Límites de detección del sistema:

La concentración a la cual se detectó la mínima cantidad de fósforo fue a 0.3  $\mu\text{gPi}$  / mL (Tabla 6 ), conservando la curva su tendencia lineal. La curva de calibración cumplió con los criterios de aceptación.

**Tabla 6. Curva estándar de fósforo inorgánico para límite de detección.**

$\mu\text{Pi} / \text{mL}$	Abs 1	Abs 2	Abs 3
0.000	0.000	0.000	0.000
0.300	0.001	0.001	0.003
0.600	0.014	0.011	0.013
0.900	0.017	0.015	0.015
1.500	0.033	0.026	0.030
3.125	0.084	0.091	0.093
6.250	0.155	0.138	0.149
12.500	0.270	0.299	0.276
25.000	0.533	0.567	0.548
37.000	0.911	0.830	0.903
50.000	1.078	1.201	1.122

$r^2 = 0.9806$   
 $m = 0.0225$   
 $\text{Ord} = 0.0128$

### 1.2.2 Límite de cuantificación del sistema:

En la tabla 7 se citan los 8 niveles de concentración establecidos para la determinación de fósforo inorgánico, encontrando que el límite de cuantificación para el sistema es de  $1.5 \mu\text{g Pi} / \text{mL}$ .

**Tabla 7. Curva estándar de fósforo inorgánico para el límite de cuantificación.**

$\mu\text{Pi} / \text{mL}$	Abs 1	Abs 2	Abs 3	CV(%)
0.000	0.000	0.000	0.000	0.00
1.500	0.056	0.052	0.054	3.70
3.125	0.110	0.113	0.111	1.37
6.250	0.240	0.237	0.245	1.68
12.500	0.483	0.490	0.501	1.85
25.000	0.973	0.982	0.978	0.46
37.000	1.448	1.448	1.436	0.48
50.000	1.930	1.930	1.917	0.39

$r^2 = 0.9993$   
 $m = 0.039$   
 $\text{Ord} = -9.3 \text{ E-}3$

Este parámetro cumplió con los criterios de aceptación con un coeficiente de variación (CV) menor del 10 % dentro de cada concentración para las tres curvas, con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98.

### 1.3 Repetibilidad / Reproducibilidad

#### 1.3.1 Repetibilidad del sistema.

En la Tabla 8 se presenta la repetibilidad del sistema que cumple con los criterios de aceptación: un coeficiente de variación (CV) menor al 10 % y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98.

**Tabla 8. Repetibilidad del sistema.**

$\mu\text{gPi} / \text{mL}$	Abs 1 03/06/02	Abs 2 03/06/02	Abs 3 03/06/02	Promedio $\mu\text{gPi} / \text{mL}$	CV (%)
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00
1.500	0.038	0.033	0.032	$0.034 \pm .003$	9.36
3.125	0.106	0.09	0.102	$0.099 \pm 0.008$	8.38
6.250	0.218	0.222	0.233	$0.224 \pm 0.007$	3.46
12.500	0.488	0.494	0.496	$0.492 \pm 0.004$	0.84
25.000	0.95	0.971	0.97	$0.963 \pm 0.012$	1.23
37.000	1.375	1.382	1.389	$1.382 \pm 0.007$	0.50
50.000	1.797	1.828	1.791	$1.805 \pm 0.019$	1.09
$r^2 =$	0.9987	0.9985	0.997	$0.9986 \pm 0.0009$	0.09
$m =$	0.0366	0.0372	0.0367	$0.0369 \pm 0.0003$	0.87
$\text{ord} =$	0.0024	-0.0026	0.0062	-	-

### 1.3.2. Reproducibilidad del sistema.

En la Tabla 9 se presenta la reproducibilidad del sistema que cumple con los criterios establecidos, en cada una de las concentraciones: un coeficiente de variación (CV) menor al 10 %, y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98.

**Tabla 9. Reproducibilidad del sistema.**

$\mu\text{gPi} / \text{mL}$	Abs 18/07/02	Abs 23/07/02	Promedio $\mu\text{gPi} / \text{mL}$	CV (%)
0.000	0.000	0.000	0.000	0.00
1.500	0.044	0.046	$0.045 \pm 0.001$	3.14
3.125	0.103	0.099	$0.101 \pm 0.002$	2.80
6.250	0.218	0.218	$0.218 \pm 0.000$	0.00
12.500	0.456	0.451	$0.4535 \pm 0.003$	0.77
25.000	0.88	0.871	$0.8755 \pm 0.006$	0.72
37.000	1.389	1.382	$1.3855 \pm 0.005$	0.35
50.000	1.843	1.713	$1.778 \pm 0.092$	5.17
$r^2 =$	0.999	0.998	$0.998 \pm 0.0007$	0.01
$m =$	-0.0110	0.0006	$0.036 \pm 0.014$	3.93
ord. =	0.037	0.035	-	-

### 1.3.3. Repetibilidad del método.

La repetibilidad del método, se evaluó realizando la determinación por triplicado, en cada una de las porciones de mucosa intestinal de ratas jóvenes adultas. Cumple con los criterios de aceptación: un coeficiente de variación (CV) menor al 10 % (Tabla 4).

La prueba de repetibilidad para la determinación de fósforo inorgánico en ratas de 4 y 14 días de nacidas, cumple con el criterio establecido, es decir, un coeficiente de variación (CV) menor al 10% para cada una de las diferentes porciones, en cada una de las diferentes edades (Tabla 5).

1.3.4. Reproducibilidad del método.

Los resultados de la determinación de fósforo inorgánico en la muestra de mucosa intestinal de ratas jóvenes adulta, presentan un coeficiente de variación menor al 10 %, en las porciones proximal y distal; pero en la porción media, el valor del coeficiente de variación es mayor. Esto puede deberse al proceso de homogeneización, por lo que a veces es necesario homogenizar más de una ocasión, aunque no es del todo recomendable ya que un manejo excesivo de la muestra puede incrementar la variabilidad. El coeficiente de variación de 2 diferentes días cumple con los criterios de aceptación para la reproducibilidad.

Esto puede apreciarse en la Tabla 10, donde se presenta los valores de las cantidades de fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de la ATPasa Total, de la ATPasa-Mg<sup>2+</sup> y de la ATPasa-Ca<sup>2+</sup>, recordando que no se define el estado de la ATPasa-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, hasta tener datos de actividad.

**Tabla 10. Reproducibilidad del Método, para determinación de fósforo inorgánico por la ATPasa Total, ATPasa-Mg<sup>2+</sup> y ATPasa-Ca<sup>2+</sup> en ratas adultas jóvenes.**

	ATPasa Total Variación de dos días µgPi / mL promedio	ATPasa-Mg <sup>2+</sup> Variación de dos días µgPi / mL promedio	ATPasa-Ca <sup>2+</sup> Variación de dos días µgPi / mL promedio .
Proximal	180.2 ± 11.9 <sup>a</sup>	98.2 ± 6.3 <sup>d</sup>	113 ± 5.9 <sup>g</sup>
CV (%)	6.6	6.4	5.2
Media	64.2 ± 6.4 <sup>b</sup>	24.2 ± 1.4 <sup>e</sup>	30.2 ± 2.4 <sup>h</sup>
CV (%)	9.9	5.8	7.9
Distal	25.5 ± 1.7 <sup>c</sup>	10.5 ± 0.7 <sup>f</sup>	15.5 ± 0.4 <sup>i</sup>
CV (%)	6.6	6.6	2.6

Letras diferentes indican diferencia significativa en cada porción intestinal y en cada una de las enzimas.

---

Es de hacer notar, que la cantidad de fósforo inorgánico es mayor en la porción proximal, seguida de la porción media y una menor cantidad en la porción distal, lo que indica un comportamiento consistente con lo anteriormente observado.

La evaluación de la reproducibilidad del método para la determinación de fósforo inorgánico en ratas de 4 y 14 días de nacidas no se realizó, ya que no se contaba con cantidad de muestra suficiente para poder evaluar este parámetro.

#### 1.4. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Se evaluó la estabilidad de la muestra con el extracto homogeneizado, de la mucosa intestinal de ratas adultas y el extracto intestinal homogeneizado, de ratas de 4 y 14 días de edad, mediante la determinación de la cantidad de fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de la ATPasa Total.

Se sometió el extracto 1, a una primera y a una segunda descongelación, así como también a una primera y a una segunda homogeneización, con el fin de evaluar la estabilidad del extracto en diferentes días de análisis. Se usan un extracto 2 y un extracto 3 con una sola descongelación y una sola homogeneización, para evaluar la estabilidad de diferentes extractos en diferentes días de análisis.

La estabilidad del extracto homogeneizado de la mucosa intestinal de ratas adultas se presenta en la Tabla 11. En los datos para el extracto 1 se observa una diferencia

significativa entre un día y otro, lo que significa que no se puede congelar y descongelar un solo extracto, para llevar a cabo las determinaciones requeridas en distintos días.

En los datos obtenidos usando diferentes extractos para determinaciones en distintos días se tiene, que no hay una diferencia significativa entre cada uno de ellos para cada una de las porciones, lo que significa que para realizar el análisis de la muestra, se requiere de un nuevo extracto cada vez que se lleva a cabo el análisis del mismo.

**Tabla 11. Estabilidad de la muestra de mucosa intestinal de ratas adultas.**

Mismo Día	extracto		Diferentes Extracto 2	extractos Extracto 3
	Extracto 1	Extracto 1		
	23/07/02	24/07/02	25/07/02	26/07/02
	$\mu\text{gPi} / \text{mL}$ promedio	$\mu\text{gPi} / \text{mL}$ promedio	$\mu\text{gPi} / \text{mL}$ promedio	$\mu\text{gPi} / \text{mL}$ promedio
Proximal	$208.7^a \pm 7.38$	$181.8^b \pm 11.1$	$188.7^a \pm 0.38$	$171.8^a \pm 10.8$
CV(%)	3.5	6.1	2.0	6.3
Media	$78.7^c \pm 2.31$	$58.7^d \pm 0.9$	$58.7^b \pm 0.81$	$55.7^b \pm 2.9$
CV(%)	2.9	1.5	1.37	5.3
Distal	$44.3^e \pm 0.4$	$26.9^f \pm 2.1$	$24.3^c \pm 0.04$	$26.7^c \pm 1.5$
CV(%)	0.9	7.8	1.64	5.7

Letras diferentes indican diferencia significativa.

Para muestras intestinales de ratas de 4 y 14 días se encontró que no cumplieron con los criterios de aceptación cuando se realiza una primera y una segunda descongelación del

mismo extracto. Esto quiere decir que un mismo extracto no puede ser utilizado por segunda ocasión, una vez descongelado, para efectuar la determinación, de hecho una segunda descongelación requiere de una segunda homogeneización del extracto y esto trae como consecuencia un mayor manejo de la muestra, por lo tanto un mayor daño celular, incrementando la variación en el análisis.

En la Tabla 12 se presenta el promedio de las dos determinaciones efectuadas en el extracto descongelado dos veces, la desviación estándar y el coeficiente de variación donde se observa que el uso de un mismo extracto no cumple con los criterios de aceptación.

**Tabla 12. Estabilidad de un mismo extracto de muestras intestinales en ratas de 4 y 14 días de edad.**

<b>Rata 14 días</b>	$\mu\text{g Pi}$	$\mu\text{g Pi}$	<b>CV(%)</b>
	06/09/02 promedio	10/09/02 promedio	
Proximal	443.0 $\pm$ 21.8	556.4 $\pm$ 1.18	15.9
Media	524.4 $\pm$ 13.6	624.0 $\pm$ 7.7	12.3
Distal	568.3 $\pm$ 20.6	681.6 $\pm$ 16.6	12.8
<b>Rata 4 días</b>			
Proximal	304.1 $\pm$ 9.4	362.4 $\pm$ 11.9	12.4
Media	324.3 $\pm$ 18.5	416.0 $\pm$ 8.6	17.5
Distal	329.73 $\pm$ 15.3	539.7 $\pm$ 27.5	34.1

Se evaluó la estabilidad de la muestra utilizando diferentes extractos para determinar la cantidad de fósforo inorgánico liberado mediante la acción enzimática de la ATPasa Total, observándose que la muestra es estable, cuando se usan diferentes extractos para determinar la cantidad de fósforo inorgánico, cumpliendo con los criterios de aceptación.

En las determinaciones para evaluar la estabilidad de la muestra se observó un comportamiento igual, tanto en ratas adultas en donde se utilizó la mucosa intestinal y en ratas de 4 y 14 días en donde se utilizó el intestino.

La estabilidad de la muestra se estudió únicamente evaluando la acción enzimática de la ATPasa Total, ya que la cantidad de muestra no fue suficiente para la determinación de las demás enzimas.

## **1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.**

Los parámetros evaluados para el sistema fueron:

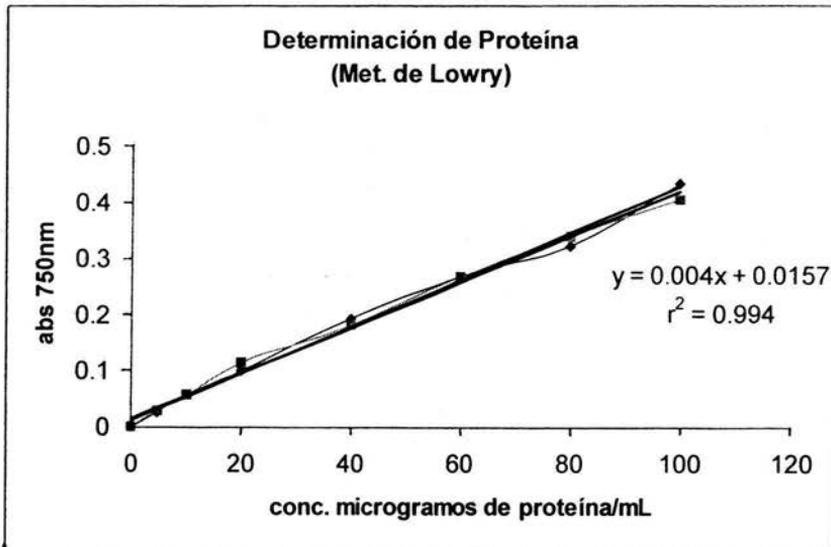
2.1. Linealidad, Sensibilidad: límite de cuantificación y límite de detección y Precisión: Repetibilidad.

En la evaluación de la linealidad los niveles de concentración para la curva de calibración son: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu$ g proteína / mL, utilizando una solución estándar de albúmina sérica bovina Sigma A-3425. La curva presenta una tendencia lineal, cumpliendo con el criterio de aceptación: un coeficiente de variación menor al 10 % en una determinación por triplicado para cada una de las concentraciones. (Figura 4).

El límite de detección fue de: 5µg proteína / mL (Figura 4).

El límite de cuantificación fue de: 5µg proteína / mL (Figura 4).

**Figura 4. Curva de linealidad para la Determinación de Proteína.**



La proteína de homogeneizados de mucosa intestinal de rata se determina utilizando como estándar una solución de albúmina sérica bovina a 8 niveles de concentración: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100µg / mL. Condiciones de incubación: temperatura ambiente protegido de la luz, durante 45 minutos.

En la tabla 13 se muestra la repetibilidad del sistema cuya curva de calibración se realizó por sextuplicado, obteniéndose coeficientes de variación para cada concentración de la curva, menores al 10 % y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) menor a 0.98, con lo que se cumplió con los criterios de aceptación establecidos.

**Tabla 13. Repetibilidad del sistema para la determinación de proteína.**

$\mu\text{g}$ proteína /mL	promedio	CV(%)
0	0	0
5	0.026 $\pm$ 0.002	9.40
10	0.031 $\pm$ 0.001	4.90
20	0.108 $\pm$ 0.005	4.70
40	0.214 $\pm$ 0.017	8.30
60	0.308 $\pm$ 0.016	5.40
80	0.388 $\pm$ 0.003	0.80
100	0.488 $\pm$ 0.011	2.40
$r^2 =$	0.9959	
m =	0.0048	
ord =	0.0008	

Cada nivel se realizó por sextuplicado.

## 2.2. Linealidad, Reproducibilidad y Repetibilidad del método.

### 2.2.1. Linealidad.

Considerando como satisfactorio el criterio de aceptación para la linealidad del sistema en la determinación de proteína, se obtienen las cantidades de proteína en cada una de las porciones de la mucosa intestinal en ratas jóvenes adultas, cada una cumpliendo con el criterio de aceptación: un coeficiente de variación es menor al 10%. La determinación se realizó por triplicado. (Tabla 14)

Se encontró que la porción proximal contenía la mayor cantidad de proteína, en la porción media se encontró una menor proporción de proteína, y la cantidad más baja de

proteína fue en la porción distal. La cantidad contenida en cada una difiere significativamente.

**Tabla 14. Linealidad del método para la determinación de proteína en mucosa intestinal de ratas jóvenes adultas.**

Porción	mg proteína / mL promedio
Proximal	12.7 ± 0.4
CV (%)	5.10
Media	5.76 ± 0.2
CV (%)	9.80
Distal	4.4 ± 0.2
CV (%)	3.30

Cantidad de proteína contenida en cada una de las porciones intestinales.

### 2.2.2. Precisión (Evaluada como Reproducibilidad)

En la tabla 15 se muestran los datos de la evaluación para la reproducibilidad del método en ratas de 4 y 14 días de edad, considerando que la evaluación de proteína se realizó en el intestino delgado como tal y no en la mucosa intestinal como se ha venido realizando, además la evaluación se hizo con un pool de intestino de 15 ratas de 14 días y otro de 10 ratas de 4 días. Los resultados de la evaluación de cada pool cumplieron con los criterios de aceptación, ya que el coeficiente de variación fue menor al 10% en todas las

porciones, analizadas cada una por triplicado en 2 diferentes días, se observó el mismo resultado en cuanto a la cantidad de proteína en la mucosa intestinal de ratas jóvenes adultas. Mayor cantidad de proteína en la porción proximal, menor cantidad de proteína en la porción distal y una cantidad intermedia de ambas, en la porción media. Debe considerarse que la cantidad de proteína encontrada en la mucosa intestinal, es considerablemente diferente a la cantidad de proteína encontrada en el epitelio intestinal.

**Tabla 15. Reproducibilidad del método para la determinación de proteína en intestino de ratas de 4 y 14 días de edad.**

Porción	Pool intestinal de 15 ratas de	Pool intestinal de 10 ratas de
	14 días	4 días.
	mg proteína /mL	mg proteína / mL
	promedio en 2 diferentes días	promedio en 2 diferentes días
Proximal	43.81 ± 2.2	32.96 ± 1.7
CV (%)	4.90	5.20
Media	34.99 ± 1.3	20.34 ± 2.0
CV (%)	3.70	9.80
Distal	30.15 ± 0.8	16.84 ± 0.3
CV (%)	2.70	1.80

### 2.2.3. Precisión (Evaluada como Repetibilidad).

Se encontró que el método cuenta con repetibilidad para las muestras de extracto de mucosa intestinal de ratas jóvenes adultas, pues cumplió con los criterios de aceptación: un coeficiente de variación menor al 10% en todas las porciones, analizadas cada una por

triplicado, observándose el mismo comportamiento en cuanto a la cantidad de proteína. (Mayor cantidad en la porción proximal, menor cantidad en la porción distal y una cantidad intermedia en la porción media).(Tabla14)

El método para la determinación de proteína en ratas recién nacidas, cumple con el criterio de aceptación para la repetibilidad. Las determinaciones se efectuaron por triplicado y su coeficiente de variación resultó ser menor del 10%, en cada una de las porciones intestinales y en las diferentes edades de rata.(Tabla 16).

**Tabla 16. Repetibilidad del método para la determinación de proteína en intestino y mucosa intestinal de rata.**

Porción	Mucosa intestinal de ratas jóvenes adultas Proteína mg / 5 mL promedio	Pool de intestino de Ratas 14 días Proteína mg / 5 mL Promedio	Pool de intestino de Ratas de 4 días Proteína mg / 5 mL Promedio
Proximal	0.155	0.548	0.412
Media	0.074	0.437	0.127
Distal	0.055	0.196	0.109

#### **OBTENCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS ATPasas:**

**Total,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+/K^+$ ,  $Ca^{2+}$ .**

La actividad específica de cada ATPasa se obtuvo relacionando la cantidad de fósforo inorgánico en micromoles, con la cantidad de proteína en miligramos a un tiempo de 10 minutos, que fue el tiempo de incubación, quedando las unidades:  $\mu\text{mol}$  de fósforo inorgánico (Pi) / mg de proteína (Pr-) / min.

En la Tabla 17 se presenta la actividad específica de ATPasa Total obtenida de las muestras de intestino de ratas de 4 y de 14 días de edad. Debido a que la cantidad de muestra fue limitada, únicamente pudo evaluarse la ATPasa Total. En la tabla se ejemplifica la manera en la que a partir de los datos, se calculó la actividad específica de cada enzima. La determinación se efectuó por triplicado, en cada caso.

**Tabla 17. Actividad Específica ( AE) de la ATPasa Total en ratas de 4 y 14 días**

	PORCION	$\mu\text{mol Pi}$ promedio	mg Pr- promedio	min	AE ( $\mu\text{mol Pi} / \text{mg Pr-} / \text{min}$ )
<b>Ratas de 4 días</b>					
	Proximal	14.14	0.548	10	2.58
	Media	20.12	0.437	10	4.6
	Distal	21.98	0.196	10	11.2
<b>Ratas de 14 días</b>					
	Proximal	11.05	0.412	10	2.68
	Media	12.2	0.127	10	9.59
	Distal	17.11	0.109	10	15.69

De acuerdo con los valores de actividad específica para la ATPasa Total en ratas de 4 y 14 días, en ambas edades se presenta una mayor actividad en la porción distal, una menor en la media y la más baja en la proximal, contrariamente a lo que se ha encontrado con ratas

jóvenes. Esto se debe a que el tracto digestivo de ratas jóvenes ha madurado conforme a su crecimiento.<sup>37</sup>

Entre cada porción existe una diferencia significativa, así como también entre las edades, ya que se observó una mayor actividad en todas las porciones del intestino de ratas de 14 días, en comparación con las porciones intestinales de ratas de 4 días.

En la tabla 18 se presenta la actividad específica de las ATPasas: Total,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+/K^+$  y  $Ca^{2+}$ , en las diferentes porciones de la mucosa intestinal de ratas jóvenes adultas, observándose una mayor actividad en la porción proximal, una actividad media en la porción media y la actividad más baja en la porción distal, con una diferencia significativa entre cada una de ellas.

**Tabla 18. Actividad específica de las ATPasas: Total,  $Mg^{2+}$ -ATPasa,  $Na^+/K^+$ -ATPasa y  $Ca^{2+}$ -ATPasa en ratas jóvenes.**

PORCION	ATPasa Total AE ( $\mu\text{mol Pi /mg Pr-}$ /min)	$Mg^{2+}$ - ATPasa AE ( $\mu\text{mol Pi /mg Pr-}$ /min)	$Na^+/K^+$ ATPasa AE ( $\mu\text{mol Pi /mg Pr-}$ /min)	$Ca^{2+}$ - ATPasa AE ( $\mu\text{mol Pi /mg Pr-}$ /min)
Proximal	4.280 <sup>a</sup>	1.696 <sup>d</sup>	2.584 <sup>g</sup>	2.24 <sup>j</sup>
Media	2.864 <sup>b</sup>	1.122 <sup>e</sup>	1.742 <sup>h</sup>	1.26 <sup>k</sup>
Distal	0.228 <sup>c</sup>	0.051 <sup>f</sup>	0.177 <sup>i</sup>	0.09 <sup>l</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa entre cada porción y entre cada enzima. La actividad de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa se obtuvo mediante la diferencia de la actividad entre la ATPasa Total y la  $Mg^{2+}$ -ATPasa.

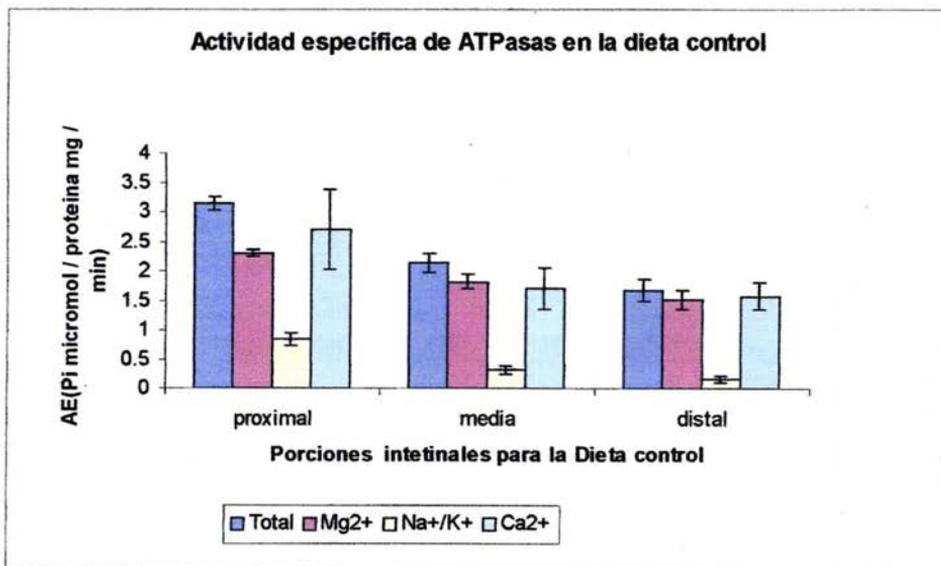
**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE ATPasas: TOTAL,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+/K^+$ , Y  $Ca^{2+}$  EN RATAS ALIMENTADAS CON LAS DISTINTAS DIETAS.**

**DIETA DE CASEÍNA (CONTROL).**

En la dieta control a base de caseína, se observó que la actividad total de las enzimas es mayor en la porción proximal, seguida de una menor actividad en la porción media y la más baja actividad en la porción distal, con diferencias significativas. Comportamiento semejante se observa en cada porción para cada una de las ATPasas. La actividad entre cada una de ellas es diferente significativamente y la enzima que presenta una menor actividad es la ATPasa- $Na^+/K^+$ -. Esto se debe principalmente a la dificultad que existe para efectuar una determinación directa, ya que suele ser una enzima sumamente delicada, por lo que su determinación es indirecta y se obtiene mediante la diferencia entre el valor de la ATPasa Total y el valor de la ATPasa- $Mg^{2+}$ , cosa que no ocurre para la determinación de ATPasa- $Mg^{2+}$  y ATPasa- $Ca^{2+}$ , cuya determinación es directa, por lo que permite una detección más clara de su actividad, de ahí que la actividad entre ambas sea mas evidente, siendo la actividad de ATPasa- $Ca^{2+}$  la mayor.

En la Figura 5 se observa el comportamiento de las diferentes ATPasas. Es necesario considerar que la denominada ATPasa Total, involucra la actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y ATPasa- $\text{Mg}^{2+}$  y que el valor de la actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se obtuvo de la diferencia del valor de la actividad de la ATPasa Total y la ATPasa- $\text{Mg}^{2+}$ .

**Figura 5. Actividad específica de ATPasas en mucosa intestinal de ratas alimentadas con la dieta control de Caseína (n=4).**



Los valores de actividad son el promedio de 4 animales de estudio, debido a que la variación entre ellos era muy alta.

---

---

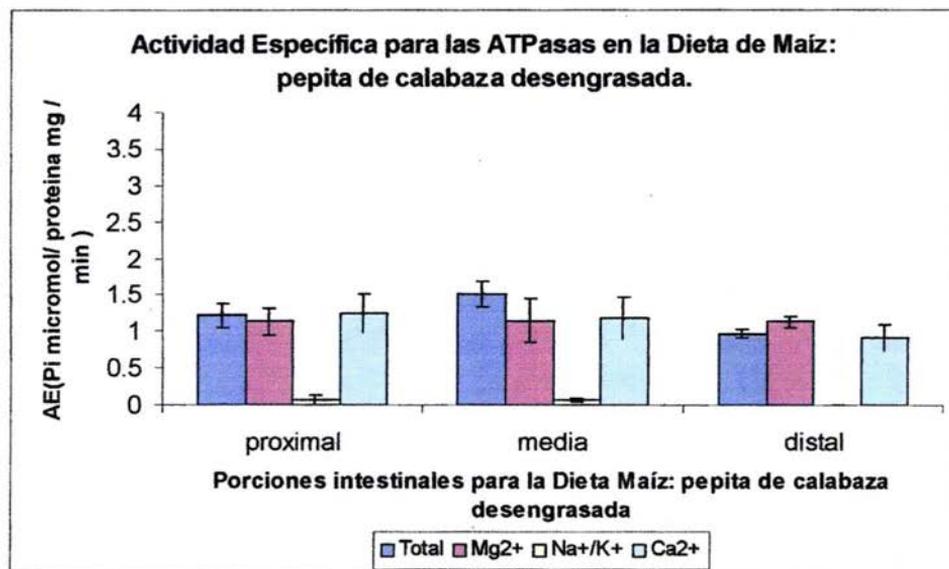
**DIETA HARINA DE MAIZ Y HARINA DE PEPITA DE CALABAZA  
DESENGRASADA (HMCD).**

En la dieta de harina de maíz: pepita de calabaza desengrasada (HMCD), se logra una buena suplementación de los aminoácidos dando lugar a una proteína de buena calidad. En la Figura 6 se tiene que en la porción proximal, las actividades de la ATPasa Total, la ATPasa-Mg<sup>2+</sup> y la ATPasa-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> son diferentes significativamente a la de la dieta control, registrándose la menor actividad por la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. El valor de actividad de la ATPasa Total y la ATPasa-Ca<sup>2+</sup> no difieren significativamente, lo que muestra que la actividad de la ATPasa-Ca<sup>2+</sup> es potencialmente igual a la ATPasa Total, por lo menos en esta porción.

En la porción media las actividades de la ATPasa Total, de la ATPasa-Mg<sup>2+</sup> y de la ATPasa-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, muestran un perfil similar al control, aunque todas se observaron disminuidas.

En la porción distal se observó el mismo comportamiento que en las anteriores fracciones, aunque en esta porción la actividad de la ATPasa-Mg<sup>2+</sup> resultó ser mayor que la de la ATPasa Total. La explicación podría ser el número de animales ( n = 6) que se utilizaron para este estudio y el hecho de que sólo basta tener un dato diferente a los demás, para que varíe el análisis. En este caso lo que se sugiere es el uso de un número más elevado de animales.

**Figura 6. Actividad específica de ATPasas de intestino de ratas alimentadas con la dieta de HMCD (n=4).**



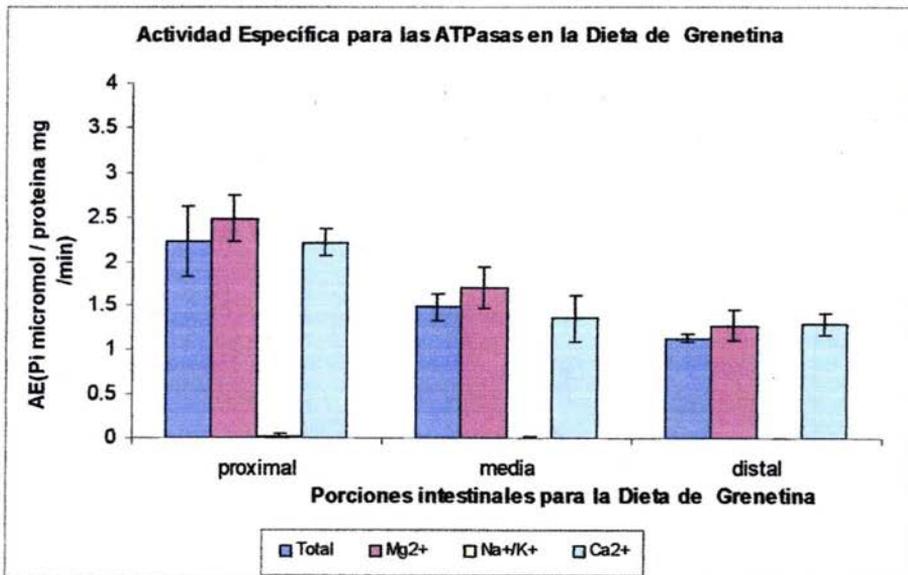
Al comparar la actividad específica de estas ATPasas para la dieta de HMCD con la actividad de las ATPasas de la dieta control, se observó que difieren significativamente, siendo menor la actividad en la dieta de HMCD, con una diferencia de casi un 50%.

### DIETA DE GRENETINA

En la Figura 7, correspondiente a la actividad específica para las ATPasas de la dieta de grenetina, que es la proteína de mas baja calidad, se observa que en la porción proximal las actividades de la ATPasa Total, de la ATPasa-Mg<sup>2+</sup> y de la ATPasa-Ca<sup>2+</sup>, no difieren

significativamente, por lo que se les consideró como iguales, solo la actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  fue menor. En la porción media se observó una disminución en cuanto a la actividad de todas las enzimas, tomando como referencia la actividad enzimática de la porción proximal, pero muestran el mismo comportamiento. En la porción distal se encontró que la actividad de todas las enzimas disminuyó con respecto a la actividad enzimática de la porción media y de la proximal.

**Figura 7. Actividad específica de ATPasas en la mucosa intestinal de ratas alimentadas con un dieta de Grenetina (n=4).**



Al considerar la dieta de HMCD como una dieta de buena calidad proteica, la respuesta de actividad para las ATPasas, debió ser equivalente a la actividad de la ATPasas en la dieta control, sin embargo esto no resultó así, ya que la actividad de las ATPasas de la

---

dieta de HMCD en todas las porciones disminuyó más de la mitad, comparada con la actividad de ATPasas de la dieta control (Figura 5) y aún con la dieta de gnetina (Figura 6).

Estudios anteriores<sup>38</sup> han encontrado que la presencia de fibra en la dieta estimula la actividad enzimática de ATPasas en todo el intestino, la cual es directamente proporcional al incremento de la proliferación celular epitelial. Esto se ha confirmado parcialmente en este estudio, pues el peso de la mucosa intestinal en la dieta HMCD se mantuvo significativamente igual, con respecto al peso de la mucosa en la dieta control, pero no resultó así en cuanto a la actividad enzimática, ya que ésta fue menor comparada con la control.

Se puede decir que la composición fisiológica se conserva, gracias a la composición proteínica, mas no resulta así para la función enzimática. Una especulación a esta alteración enzimática está enfocada hacia la presencia de fitatos, contenidos en la dieta HMCD, específicamente en el maíz que tiene más fibra. Los fitatos tienen la particularidad de ser agentes quelantes de cationes como el Ca, Fe, Zn, Mg y Cu.<sup>39</sup> y dado que las ATPasas son dependientes de cationes como el magnesio, podría entenderse la alteración en la actividad de estas enzimas con dicha dieta.

Se ha encontrado por otro lado que la actividad de las ATPasas también es directamente proporcional a la cantidad de proteína contenida en una dieta<sup>18, 40, 41</sup>. Esto evidencia de alguna manera la influencia dietaria sobre la actividad de las ATPasas en el intestino delgado de rata y que su actividad va a depender no sólo de la calidad proteínica sino también de la cantidad de proteína proporcionada, así como también de otros componentes, en este caso los fitatos, presentes en la dieta.

# Conclusiones

**CONCLUSIONES**

- Se demostró la validez de las metodologías para las determinaciones de fósforo inorgánico y proteína, en términos de precisión (evaluada como repetibilidad y reproducibilidad), linealidad, límites de sensibilidad y cuantificación. Consecuentemente se establece la medición de la actividad de las ATPasas del intestino delgado de rata en las tres secciones del mismo: proximal, media y distal.
- El comportamiento de actividad enzimática específica de cada una de las enzimas fue mayor para la ATPasa Total, seguida en forma decreciente la ATPasa-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> posteriormente la ATPasa-Ca<sup>2+</sup> y por último ATPasa-Mg<sup>2+</sup>.
- La actividad específica de las ATPasas en intestino de ratas alimentadas con una proteína de muy buena calidad (caseína) fue mayor que la obtenida en las dietas de buena calidad proteínica (maíz: pepita de calabaza desengrasada) y de mala calidad (gelatina).
- La actividad específica de las ATPasas se observó más afectada en la dieta a base de harina de maíz y pepita de calabaza desengrasada, que con la de gelatina. La explicación que se da a estos resultados no esperados, es que es probable la presencia de fitatos, provenientes principalmente de la harina de maíz, tuvo un efecto quelante sobre los iones calcio y magnesio disminuyendo de esta manera la actividad de las ATPasas correspondientes.

# Bibliografía

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Ward A. Olsen and Mark L. Lloyd. "Carbohydrate assimilation". Gastroenterology. 5ª edición, Editores Saunders Company, pag. 955-962, 1998.
2. Bender, D., Introducción a la nutrición y el Metabolismo, Editorial Acribia, Zaragoza, 187-195, 1995.
3. Butzner, D., Butler, D., Miniats, P., "Impact of chronic protein-caloric malnutrition on small intestinal repair after acute viral enteritis, a study on Genobiotic Piglets, Pediatric Research, vol. 19, N°4, 476-481, 1985.
4. Ziklstra, R., Donovan, S., Odle, J., Gelberg, H., Petschow, B., Gaskins, H., Protein-energy malnutrition delays small intestinal recovery in neonatal pigs infected with rotavirus, Journal of Nutrition, vol. 127, N°6, 1118-1127, 1997.
5. Vásquez Edgar, "Diagnóstico del estado nutricional en la infancia", Acta Pediátrica de México, vol. 19(S), 1-11, 1998.
6. Gómez Federico, Aguilar Rigoberto, Muñoz Jorge, "La desnutrición infantil en México", Boletín Médico del Hospital Infantil de México, vol. 54, N° 7, 665-677, 1997.
7. Barquera S., River-Dommarco J., Gasca-García A., "Políticas y programas de alimentación y nutrición en México", Salud Pública de México, vol.43, N°5, 464-477, 2001.
8. Blanco A., Química Biológica, 7ª edición, editorial El Ateneo, 181-184, 2000.
9. Díaz Zagoya, Bioquímica, 2ª ed, editorial Interamericana, México, 178-181,1995.

- 
10. Haraux F., Kouchkovsky Y., Energy coupling and ATP syntetase, *Photosynthesis Research*, vol. 57, 231-251, 1998.
  11. Blostein Rhoda, "Structure-function studies of the sodium pump", *Biochem. Cell. Biol.* Vol. 77, 1999.
  12. J. Darnell, H. Lodish, *Biología celular y molecular*, 2a ed. editorial Omega, Barcelona, 1995, 580-593.
  13. Alberts B. Bray D., Lewis J., *Biología celular de la célula*, 3ª de, editorial Omega, 547-559, 1996.
  14. Thomas M. Devlin, *Text Book Biology with clinic correlations*, 9a ed. Editorial Wiley-Liss, 208-211, NY, 1997.
  15. Montgomery, R., Conway, T., Specter, A., *Biochemistry*, 5ª edición editorial Mosby company, 511-518, 1990.
  16. Semenza G., "Intestinal oligosaccharidases and disaccharidases", *Handbook of Physiology Alimentary Canal, Vol 5: Bile; Digestion; Ruminal physiology*. Ed. Waverly Press. American Physiology Society, New York, capitulo 119, 2539-2560, 1968.
  17. Pezza, R., Virrereal, M., Montich, G., "Vanadate inhibits the ATPase activity and DNA binding capability of bacterial MutS. A structural model for the vanadate-Muts interaction at the Walter A motif", *Nucleic Acids Research*, vol. 30, N°21, 4700-4708, 2002.
  18. Pácha J., Pohlová, I., The influence of high salt intake on intestinal Na, K-ATPase in Wistar and Dahl rats, *Acta Physiology Scand*, vol. 148, 69-75, 1993.
  19. Amstrup, P., Jesper, R. Y Leth, P., Importance of conserved  $\alpha$ -Subnit segment <sup>709</sup>GDGVND for Mg<sup>2+</sup> binding, phosphorylation, and energy transduction in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, *J. Biol. Chem.*, vol. 275, 37588-37595, 2000.

- 
20. Voet Donald, Judith Voet, Biochemistry, 2a ed. Editorial John Wiley, 524-532, 1995.
  21. Sweadner, K., Donnet, C., Structure of Na, K- ATPase and SERCA, the  $Ca^{2+}$ - ATPase of the sarcoplasmic reticulum, *Biochem J.*, vol. 149, 6118-6269 2000.
  22. Skou J., The influence of some cations an adenosine triphosphatase on peripheral nerves, *Biochemical Et Biophysica Acta*, vol. 23,394-401, 1957.
  23. Schaloskei, R., Sonnemanni J., Malchowi D., Fatty acids release of  $Ca^{2+}$  from acidosomal stores and activate capacitative  $Ca^{2+}$  entry in *Dictyostelium discoideum*, *Biochem., J.*, vol. 332, 541-548, 1998.
  24. Díaz de Armas, M.,Hernández I., Martínez, M., Validación de técnicas Analíticas en el control de la Calidad, *Rev. Cubana Farm.*, vol 32, 106-112, 1998.
  25. García, A., Soberón, E., Cortés, M., Rodriguez, R., Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos-Farmacéuticos-Biólogos, México, AC, 2002.
  26. Alcántara, A., Cortés, M., Soberón E., Validación de Métodos Analíticos en Memorias del II Simposio Nacional de Validación, Colegio Nacional de Químicos-Farmacéuticos-Biólogos, México, AC, 2002.
  27. Pellet, L., Metohds of protein with rats, A review in proteins in human nutrition, Academic Press, New York, 225-244, 1973
  28. Carmona A., Borgudd L.,Borges, G., Effect of Black bean tannins on in vitro carbohydrate digestion and absortion, *Nutr. Bioch.*, vol., 7, 445-450, 1996.
  29. . Bergmeyer H. U. The lowry Method. *Methods of enzymatic analysis*, 3ª edición, editores Jurgen Bergmeyer and Marianne Grassl., vol. 1, 88-91, 1988.
  30. Fiske, H., Subbarow, Y., The Colorimetric determination of Phosphorus, *J. Biol. Chem.*, vol. 66, Nº 2, 375-400, 1925.

- 
31. Takeo S., Fliegel, L., Beamish R., Effects of adrenochrome on rat heart sarcolemnal ATPase Activities, *Bioch. Pharm.*, vol. 29, 559-564, 1980
  32. Omoruyi, F., Adamson, Ishola, Digestive and hepatic enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats fed supplements of dikanut (*Irvingia gabonensis*) and Cellulose, *Ann. Nutr. Metab*, vol.. 37, 14-23, 1993.
  33. Grindley, P., Omoruyi, F., Carbohydrate digestion and intestinal ATPases in streptozotocin-induced diabetic ratas fed extract of yam(*Dioscorea cayenensis*) or dasheen (*Colocasia esculenta*), *Nutr. Res*, vol. 22, 333-341, 2002.
  34. Bonting, S., Caravaggio, L., Hawkins, N., Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. VI. Its role in cation transport in the lens of cat, calf and rabbit, *Arch. Biochem. Biophy*. Vol. 101, 47-55, 1963.
  35. Tausky, H., Shorr, E., A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus, *J. Biol. Chem.*, vol. 202, 675-685, 1953.
  36. Martínez Acosta S. Efecto de los taninos del frijol negro jamapa in vitro sobre la actividad enzimatica de la maltasa, sacarasa y lactasa del intestino delgado de ratas, Tesis Licenciatura UNAM 31-34, 2002.
  37. Tagle, M., Donoso, G., Protein requirements for the pregnant rat, *Nutrition Dieta II*, 44, 1969.
  38. Oku, T., Reversible cecal and colonic enlargement induced by dietary fiber in rats, *Nutrition Research*, vol. 15, 1355-1366, 1995.
  39. Instituto de Nutrición Bromatológica, Enzimas y la nutrición porcina, [http:// www. revista-anaporc.com/contenido/enzimar2.htm](http://www.revista-anaporc.com/contenido/enzimar2.htm). Buscador : Google, citado 21 julio a las 1:10am.

40. Jakobsson, B., Larsson, S., Aperia, A., Amino acid stimulation of Na, K-ATPase activity in rat proximal tubule after high-protein diet, *Acta Phy., Scd.*, vol. 139, 9-13, 1990.
41. Jakobsson, B Aperia, A., High protein intake acelerates the maturation of Na, K-ATPase in rat renal tubules, *Acta Phy., Scd.*, vol. 139, 1-7, 1990.