

**CONTENIDO EN AMINOACIDOS LIBRES DEL MUSCULO
VASTUS LATERALIS DE CORDERO DE RAZA «CHURRA»
(4-6 SEMANAS); CAMBIOS EXPERIMENTADOS EN LOS
ANIMALES AFECTOS DE MIODISTROFIA NUTRICIONAL
ENZOOTICA**

*Por C. Martínez Díez y
J. Burgos González.*

INTRODUCCION

Conocidas las posibles implicaciones de los lisosomas en la degradación de los músculos distróficos (DESAI y col. 1964; DESAI, 1966; TAPPEL, 1966; BUCHANAN-SMITH y col. 1969; WHANGER y col. 1969; etc.), las modificaciones observadas en la riqueza muscular y plasmática de algunos enzimas activamente implicados en el metabolismo protéico (KUTTLER y MARBLE, 1958; BLINCOE y DYE, 1960; BOYD, 1964, 1968; WHANGER y col. 1969; BUCHANAN-SMITH y col. 1969; TOLLERSRUD, 1971; etc.) y las variaciones experimentadas por el metabolismo protéico de los músculos de los animales con deficiencias nutricionales capaces de producir distrofia (NICHOLDS y col. 1967; PEDERSEN y col. 1969; WHANGER, 1973), diversos investigadores han estudiado la composición del músculo distrófico en aminoácidos libres, tanto en conejos afectos de avitaminosis E (TALLAN, 1955; SMITH y NELSON, 1957) como en pollos afectos de miodistrofia hereditaria (PETERSON y col. 1968). En los corderos afectos de miodistrofia nutricional sólo se han estudiado las modificaciones experimentadas por la fracción aminoácidos libres del plasma sanguíneo (WHANGER y col. 1968, 1972).

En el presente trabajo se han determinado los niveles alcanzados por los aminoácidos libres del músculo *vastus lateralis* en corderos sanos y en afectos de la miodistrofia nutricional enzoótica.

Las investigaciones descritas en este trabajo forman parte de las recogidas en la Tesis doctoral de doña Camino Martínez Díez.

MATERIAL Y METODOS

La procedencia de los animales y la preparación de las muestras es idéntica a la descrita en trabajos previos (ZUMALACÁRREGUI y BURGOS, 1975; MARTÍNEZ y BURGOS, 1976 a, b, c).

Para la extracción de los aminoácidos musculares se siguió el método descrito por BLOCK (1956).

La identificación y cuantificación de los distintos aminoácidos se efectuó por cromatografía de intercambio iónico utilizando la modificación al método de MOORE y col. (1958) descrita por SALA y BURGOS (1972). Las cantidades de los diversos aminoácidos presentes en las cromatografías se calcularon midiendo el área de la banda obtenida y multiplicándola por el factor correspondiente para cada aminoácido, hallado a partir de un cromatograma patrón obtenido con una muestra que contenía 0,70 micromoles de cada uno de los aminoácidos encontrados en este estudio.

Los patrones de aminoácidos utilizados fueron suministrados por BDH y los reactivos empleados para el análisis por MERCK.

Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis estadístico.

RESULTADOS

El comportamiento de las columnas cromatográficas resultó satisfactorio en la resolución de una mezcla de: ácido aspártico, treonina, serina, glutámico, glicocola, alanina, cistina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tisorina, fenilalanina, lisina, histidina, arginina, taurina y amoniaco. En este sentido, conviene señalar que la utilización de un tampón de pH = 3,19 como recomiendan STEIN y MOORE (1954) resultó consistentemente en una imbricación de la cistina y la alanina, por lo que en los experimentos efectuados con los extractos musculares se sustituyó el citado tampón por otro de pH = 3,22. No fue posible, sin embargo, separar en los extractos musculares la treonina de la serina, ni la lisina de la histidina (véase la figura 1, 2, 3 y 4), problema con el que se han encontrado otros autores (MILLER y col. 1965; FIELD y col. 1971).

Las mezclas de estos aminoácidos se calcularon utilizando un coeficiente de extinción molar promedio entre los de los dos aminoácidos componentes, lo que sólo rendiría resultados fidedignos en el caso de que las mezclas estuvieran constituidas por cantidades equimoleculares de ambos. El problema apenas tiene importancia en el caso de la treonina y serina pues en nuestras condiciones experimentales el coeficiente de extinción de la serina representa el 89 % del de la treonina. En el caso de la lisina y la histidina, los errores pueden tener mucha mayor entidad dado que el coeficiente de extinción de la lisina representa el 64 % del de la histidina.

Se detectaron en todas las muestras analizadas los siguientes componentes: ácido aspártico, treonina + serina, ácido glutámico, prolina, glicocola,

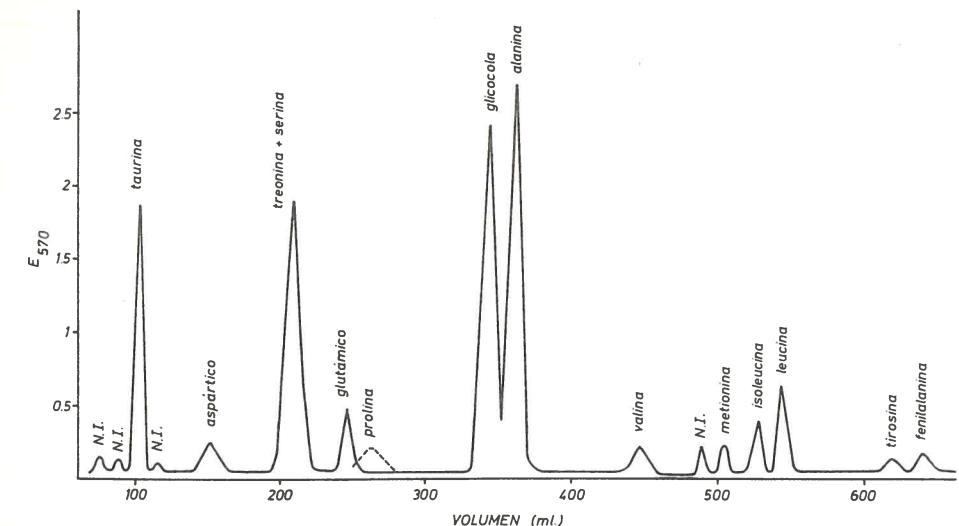


Fig. 1.-Cromatograma de los aminoácidos neutros y ácidos del músculo *vastus lateralis* de un cordero sano.

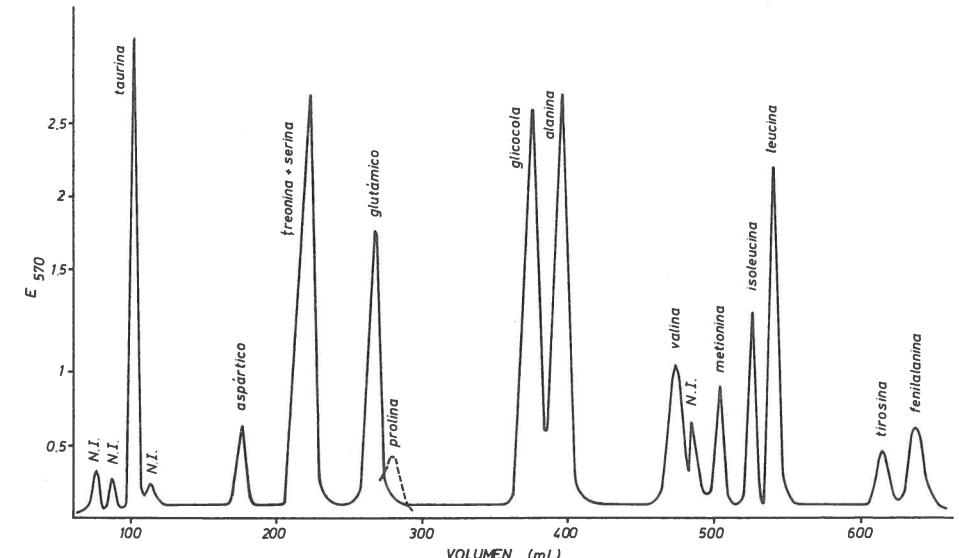


Fig. 2.-Cromatograma de los aminoácidos neutros y ácidos del músculo *vastus lateralis* de un cordero distrofico.

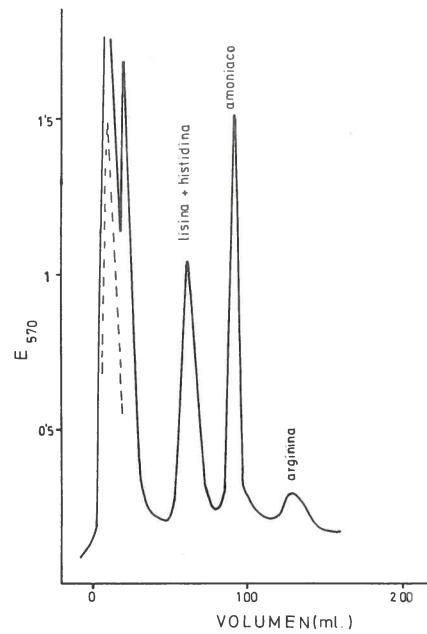


Fig. 3.-Cromatograma de los aminoácidos básicos del músculo *vastus lateralis* de un cordero sano.

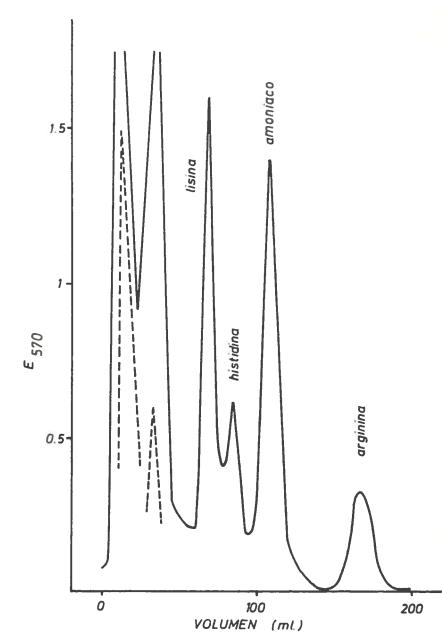


Fig. 4.-Cromatograma de los aminoácidos básicos del músculo *vastus lateralis* de un cordero distrófico.

alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenil-alanina, lisina + histidina, arginina, taurina, y amoniaco, más cuatro componentes no identificados, dos de elución anterior a la taurina, otro que se eluye entre éste y al ácido aspártico y finalmente otro que se eluye entre la valina y la metionina.

Las tasas de los distintos componentes identificados figuran en la Tabla 1. Las cifras de los corderos sanos son sensiblemente inferiores a las señaladas para músculos de óvidos adultos por BANU y col. (1971) y a las que citan BERGEN y col. (1973) para el *gastrocnemius* de corderos de 2 meses de edad y 25-34 Kgs de peso, y a las citadas, para bóvidos de 13-20 meses de edad, por FIELD y YET-OY CHANG (1969) y, para broilers y gallinas, por MILLER y col. (1965); son, en cambio, similares a las que PARRISH y col. (1969) hallan en el *longissimus dorsi* de terneros.

La comparación entre los animales sanos y enfermos revela que el contenido en aminoácidos libres es, en términos globales, aproximadamente doble en los músculos distróficos que en los sanos, hallándose, en términos estadísticos, significativamente incrementados los aminoácidos leucina, ácido glutámico, treonina + serina, isoleucina, ácido aspártico, valina, metionina, tirosina y fenil-alanina; también aparecen incrementados, aunque sin significación estadística, la prolina, alanina, glicocola, arginina y taurina y ligeramente disminuidos lisina + histidina y amoniaco, aunque tampoco este descenso ofrece significación estadística.

TABLA 1
Contenido en aminoácidos libres y compuestos similares del músculo *vastus lateralis* de 3 corderos sanos y 8 mioidistróficos, expresado en términos de mg/100 grs. de músculo

Compuestos	Sanos	Distróficos	Signif.
A. aspártico	0,33 ± 0,13	0,65 ± 0,27	P<0,05
Treonina	3,44 ± 1,12	8,42 ± 3,62	P<0,01
+ Serina			
A. glutámico	0,69 ± 0,35	5,52 ± 3,46	P<0,01
Prolína	1,69 ± 1,14	2,03 ± 1,95	P>0,05
Glicocola	4,47 ± 1,83	6,29 ± 1,74	P>0,05
Alanina	3,37 ± 1,70	4,48 ± 1,58	P>0,05
Valina	0,57 ± 0,23	2,25 ± 1,94	P<0,05
Metionina	0,40 ± 0,22	2,03 ± 2,06	P<0,05
Isoleucina	0,50 ± 0,20	2,64 ± 1,84	P<0,01
Leucina	0,46 ± 0,29	2,66 ± 1,26	P<0,001
Tirosina	0,40 ± 0,17	1,25 ± 0,89	P<0,05
Fenilalanina	0,31 ± 0,21	1,61 ± 1,37	P<0,05
Lisina	2,33 ± 1,15	2,14 ± 1,21	P>0,05
+ Histidina			
Arginina	0,36 ± 0,23	0,63 ± 0,51	P>0,05
Aminoácidos totales	19,36 ± 6,75	42,60 ± 19,56	P<0,05
Taurina	3,03 ± 0,52	3,76 ± 1,38	P>0,05
Amoniaco	0,79 ± 0,29	0,48 ± 0,22	P>0,05

DISCUSION

SMITH y NELSON (1957) observaron en los músculos de los conejos severamente afectados de mioidistrofia nutricional por carencia de vitamina E un incremento generalizado de los aminoácidos libres, con excepción de la glicocola que quedaba reducida a un 58 % de su tasa normal; la taurina se veía reducida en la misma cuantía que el aminoácido glicocola; la tasa global del resto de los compuestos aminoacídicos se hallaba multiplicada por un factor ligeramente superior a 2.

Observaciones similares fueron realizadas por TALLAN (1955), también en conejos distróficos, por recibir dietas inductoras de avitaminosis E. En los músculos de los animales distróficos por TALLAN analizados, la glicocola quedaba reducida a un 28 % (de la tasa normal) en las distrofias incipientes y a un 54 % en los animales severamente afectados; la mayor parte del resto de los compuestos aminoacídicos se hallaba considerablemente aumentada, siendo más notable el incremento en ácido glutámico (multiplicado por un factor de 4), alanina (multiplicada por 2), leucina (x 3), treonina (x 2), cistina y otros componentes no determinados en nuestros experimentos, como la urea, la fosfoetanolamina y la glicerofosfoetanolamina.

El descenso en la tasa de glicocola que parece ser en las distrofias producidas por avitaminosis E uno de los fenómenos más generalizados fue

señalado también por DINNING (1955) que sugiere la posibilidad de que se deba a constituir una fuente de formilo para la formilación de las purinas de los ácidos nucleicos, cuyo turnover se halla considerablemente incrementado durante la avitaminosis E.

El nivel medio del incremento en la tasa muscular de aminoácidos libres observado en el presente trabajo en los músculos de los animales distróficos, es del mismo orden que el detectado por los autores citados; el incremento de la tasa de aminoácidos individuales es sumamente variable, siendo los más espectaculares los del ácido glutámico, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, valina y tirosina, casi todos ellos esenciales; no se observan, en cambio, variación alguna estadísticamente significativa en el contenido en glicocola, prolina, alanina, arginina y taurina. El esquema de la contribución de cada aminoácido individual a la tasa global es bastante constante en todos los animales distróficos.

El incremento en la tasa de aminoácidos libres del músculo distrófico concuerda con el incremento en la proteólisis señalado por WEINSTOCK y col. (1955), pero es preciso tener en cuenta que la concentración de cada aminoácido en los «pool» tisulares representa el balance neto del aporte exógeno, el turnover de las proteínas, la biosíntesis y el catabolismo. WHANGER y col. (1968, 1972) intentando aclarar la posible contribución de las alteraciones sufridas por algunos de estos factores estudiaron las tasas de los distintos aminoácidos en el plasma de corderos con miostrofia nutricional, inducida suministrando a las madres dietas carentes en selenio, y los compararon con los de otros animales sometidos a condiciones idénticas pero a los que se protegía de la distrofia mediante inyecciones de selenio. En el primero de los trabajos citados observaron que el contenido del plasma en serina, ácido glutámico y glicocola quedaba reducido en los animales distróficos a 1/2 de su valor normal y que se duplicaba el de valina, cistina, metionina, leucina e isoleucina. En el segundo observaron que tras la alimentación con dietas idénticas, la tasa total de aminoácidos libres era, salvo en los animales muy jóvenes (1-2 días de edad), más alta en los animales distróficos y que no se daban diferencias significativas en ayunas. Del cociente concentración de aminoácidos del plasma en ayunas/concentración tras la ingestión de alimentos (muy disminuido en los animales distróficos, especialmente en los de más edad) dedujeron que era probable que el turnover de los aminoácidos en la sangre fuera más rápido en los animales normales que en los distróficos, lo que evidentemente significaría un descenso, en los distróficos, de la síntesis proteica. Por otra parte WHANGER (1973) ha observado también que el glutamato se incorpora más lentamente a las proteínas en el músculo de los animales distróficos y que su catabolismo es también más lento.

Es significativo que en nuestras observaciones sea precisamente el ácido glutámico aquel cuya tasa se eleva más en los músculos distróficos y parece

difícil escapar a la conclusión, de que a la elevación de la tasa de aminoácidos libres del músculo contribuyen en cuantía no aclarada un enlentecimiento de la biosíntesis proteica y del catabolismo aminoacídico y un incremento de la degradación protéica.

RESUMEN

Se ha estudiado la composición en aminoácidos libres del músculo *vastus lateralis* de corderos de raza «Churra» (4-6 semanas de edad) sanos y afectos de la miostrofia nutricional enzootica.

Se observa en los músculos de los animales distróficos la duplicación de la tasa global de aminoácidos libres, contribuyendo fundamentalmente a este incremento los siguientes aminoácidos: leucina, ácido glutámico, treonina + serina, isoleucina, ácido aspártico, valina, metionina, tirosina y fenilalanina.

RÉSUMÉ

On a fait l'étude du muscle *vastus lateralis* dans les agneaux de race «churra» (âgés de 4-6 semaines) en ce qui concerne la composition d'acides aminés libres, remarquant les différences observées quand les animaux souffrant la miostrophie enzootique d'origine nutritionnelle ont été comparés avec ceux qui se portaient sains.

Les animaux souffrant la miostrophie montraient dans les muscles une concentration des acides aminés libres qui était double en rapport de celle trouvés dans les sains. Cette élévation on peut attribuer avant tout aux acides aminés qui sont rapportés: leucine, acide glutamique, treonine + serine, isoleucine, acide aspartique, valine, methionine, tyrosine et phenilalanine.

SUMMARY

The level of total free aminoacids in the *vastus lateralis* of 4-6 weeks old «Churra» lambs suffering from nutritional muscular dystrophy doubles that found in control healthy animals. The aminoacids whose level significantly raises in dystrophic animals over that found in controls were: leucine, glutamic acid, threonine + serine, isoleucine, aspartic acid, valine, methionine, tyrosine and phenilalanine.

BIBLIOGRAFIA

- BANU, C., ENACHE, A. y MUSCA, L. (1971).—Die Fleischwirtschaft, **9**, 1.343.
BERGEN, W. G., HENNEMAN, H. A. y MAGEE, W. T. (1973).—J. Nutr., **103**, 575.
BLINCOE, C. y DYE, W. B. (1958).—J. Anim. Sci., **17**, 224.
BLOCK, R. J. (1956).—En «Amino Acid Handbook». Ed. C. C. Thomas. Pub. Springfield. Ill. USA.
BOYD, J. W. (1964).—Res. Vet. Sci., **5**, 419.
BOYD, J. W. (1968).—Brit. J. Nutr., **22**, 411.
BUCHANAN-SMITH, J. G., NELSON, E. C. y TILLMAN, A. D. (1969).—J. Nutr., **99**, 387.
DESAI, I. D. (1966).—Nature, **209**, 1.349.

- DESAI, I. D., CALVERT, C. C., SCOTT, M. L. y TAPPEL, A. L. (1964).—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **115**, 462.
- DINNING, J. S., SIME, JT. y DAY, P. L. (1955).—*J. Biol. Chem.*, **217**, 205.
- FIELD, R. A. y YET-OY CHANG. (1969).—*J. Food Sci.*, **34**, 329.
- FIELD, R. A., RILEY, M. L. y YET-OY CHANG (1971).—*J. Food Sci.*, **36**, 611.
- KUTTLER, K. L. y MARBLE, D. W. (1958).—*Am. Jour. Vet. Res.*, **19**, 632.
- MARTÍNEZ, C. y BURGOS, J. (1976a).—*Ana. Fac. Vet. León*. (En prensa).
- MARTÍNEZ, C. y BURGOS, J. (1976b).—*Ana. Fac. Vet. León*. (En prensa).
- MARTÍNEZ, C. y BURGOS, J. (1976c).—*Ana. Fac. Vet. León*. (En prensa).
- MILLER, J. H., DAWSON, L. E. y BAUER, D. H. (1965).—*J. Food Sci.*, **30**, 406.
- MOORE, S., SPACKMAN, D. H. y STEIN, W. H. (1958).—*Anal. Chem.*, **30**, 1.185.
- NICHOALDS, G. E., DIEHL, J. R. y FITCH, C. D. (1967).—*Am. J. Phys.*, **213**, 759.
- PARRISH, F. C., GOLL, D. E., NEWCOMB, W. J., LUMEN, B. O., CHAUDRY, H. M. y KLINE, E. A. (1969).—*J. Food Sci.*, **34**, 196.
- PEDERSEN, N. D., WHANGER, P. D. y WESWIG, P. H. (1969).—Pacific Slope Biochem. Conf., p. 49 (Abstr.).
- PETERSON, D. W., HAMILTON, W. H. y LILYBLADE, A. L. (1968).—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **127**, 300.
- SALA TREPAT, F. J. y BURGOS, J. (1972).—*Anal. Bromatol.*, XXIV-1, 51.
- SMITH, L. C. y NELSON, S. R. (1957).—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **94**, 644.
- STEIN, W. H. y MOORE, S. (1954).—*J. Biol. Chem.*, **211**, 915.
- TALLAN, H. H. (1955).—*Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, **94**, 644.
- TAPPEL, A. L. (1966). En «The physiology and Biochemistry of Muscle as a Food I». Ed. Briskey, E. J., Cassens, R. G. y Trautman, J. C.. p. 237. University of Wisconsin, Wisconsin.
- TOLLERSRUD, S. (1971).—*Acta Vet. Scand.*, **12**, 365.
- WEINSTOCK, I. M., GOLDRICH, A. D. y MILHORAT, A. T. (1955).—*Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, **88**, 257.
- WHANGER, P. D. (1973).—*Biochem. Med.*, **7**, 316.
- WHANGER, P. D., PEDERSEN, NV. D., MUTH, O. H., WESWIG, P. H. y OLFIELD, J. E. (1968).—*J. Anim. Sci.*, **27**, 1.179 (abstr.).
- WHANGER, P. D., WESWIG, P. H., MUTH, O. H. y OLFIELD, J. E. (1969).—*J. Nutr.*, **99**, 331.
- WHANGER, P. D., PEDERSEN, N. D., ELLIOT, D. H., WESWIG, P. H. y MUTH, O. H. (1972).—*J. Nutr.*, **102**, 435.
- ZUMALACÁRREGUI, J. y BURGOS, J. (1975).—*An. Fac. Vet. León*, **21**, 409.