

Crecimiento celular del músculo esquelético como índice de los requerimientos de proteína en la rata adulta*

E. Muñoz-Martínez**, M. T. Unzaga y B. Jiménez-Gancedo

Sección Departamental de Fisiología Animal
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense
28040 Madrid

(Recibido el 10 de agosto de 1988)

E. MUÑOZ-MARTINEZ, M. T. UNZAGA and B. JIMENEZ-GANCEDO. *Skeletal Muscle Growth as Indicator of Dietary Protein Requirements in Adult Rats*. Rev. esp. Fisiol., 45 (2), 137-144, 1989.

Skeletal muscle growth, muscle nucleic acids and muscle protein synthesis capacity, were measured to evaluate the protein requirement of adult rats. Wistar rats were fed on diets containing 4 %, 10 % or 20 % casein + D,L-methionine. All diets were provided for 21 days beginning at 90 days of age. Body weight, food efficiency and net weight change increased as the casein content of the diet increased. Muscle DNA, RNA and RNA/protein were lost, but protein and protein/DNA increased on the 4 % and 20 % protein diet. This fact involves an aplasia phenomenon although the hypertrophic growth is maintained. Alterations of the insulin and GH plasma levels were observed. These findings indicate that for adult rats the 4 % and 20 % protein diets are not adequate for the period of adult maintenance.

Key words: Skeletal muscle, Growth, Protein, Adult rat.

El crecimiento del músculo esquelético es sensible a cambios en el nivel de la proteína dietaria por lo que puede ser un importante indicador de los requerimientos proteicos en animales en desarrollo.

El máximo crecimiento se realiza en ratas al destete que ingieren dietas superiores al 20 % de proteína (7,17), aunque se ha señalado que el máximo crecimiento expresado como incremento en peso, pro-

teína, DNA, RNA/DNA y síntesis proteica muscular, se produce con dietas cuyo contenido es del 15 % de caseína (41). Niveles superiores, hasta del 30 % de proteína, no producen aumentos adicionales en estos parámetros. También ALLISON *et al.* (1), usando el músculo esquelético como un indicador de las necesidades dietarias, encuentran que las razones proteína/DNA y RNA/DNA se incrementan al máximo con un 15 % de proteína y descienden con mayores ingestas proteicas.

La edad del animal puede ser un factor

* Trabajo subvencionado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica n.º 3875.

** A quien debe dirigirse la correspondencia.

importante que explique estas discrepancias en el nivel dietario óptimo; sin embargo, existe poca información al respecto, en especial cuando se trata de animales adultos cuyos niveles dietarios de mantenimiento no son conocidos.

La síntesis proteica muscular (45) también se ha utilizado para evaluar la cantidad y la calidad de la proteína en la dieta. En este sentido, SMITH *et al.* (41) señalan que, la síntesis proteica máxima en ratas en crecimiento define la cantidad mínima necesaria de proteína ingerida, para llegar al máximo crecimiento muscular.

Modificaciones en la proteína de la dieta afectan al balance entre la velocidad de síntesis y el catabolismo proteicos (13, 36). Por ello, la carencia proteica en la rata (26) y los períodos cortos de ayuno en el hombre (37) aumentan la velocidad de síntesis proteica muscular sin incrementar la degradación. Por el contrario, en ratas sometidas a dietas que contienen entre un 30 y un 60 % de caseína, MILLWARD y WATERLOW (27) señalan una actividad de RNA igual o menor que las sometidas al 3,5 % de proteína.

Estos cambios metabólicos parecen, a su vez, estar controlados por factores hormonales inducidos por la dieta (45), entre los que destacan las modificaciones en las tasas de insulina, GH y T_3 , las cuales afectan al peso corporal (16).

Por todo ello, en este trabajo se evalúan el crecimiento y la capacidad de síntesis proteica muscular como indicadores de los requerimientos de proteína dietaria en ratas adultas sometidas a tres niveles proteicos en la dieta.

Material y Métodos

Diseño experimental. — Se utilizan 30 ratas Wistar con un peso inicial de 160 ± 10 g repartidas en tres grupos: a) control, alimentadas con una dieta al 10 % de proteína (caseína + D,L-metionina); b) deficiente en proteínas, que recibe

una dieta al 4 % de proteína; y c) hiperproteico, que recibe una dieta al 20 % de proteína. La composición de las dietas se realiza de acuerdo con datos anteriores (33, 43), utilizando caseína láctica de un 98 % de riqueza.

Después de un período de adaptación de una semana, el experimento se prolonga 21 días, durante los cuales los animales son instalados en células individuales de metabolismo, ubicadas en una habitación termorregulada a 23° C, e iluminada de 8 a 20 horas. El alimento y el agua son suministrados *ad libitum* y se controla diariamente la ingesta y el peso.

Al final del experimento los animales son pesados, y sacrificados por exanguinación. Como materiales biológicos se utilizan el músculo gastrocnemio y el plasma sanguíneo. Se homogeneizan por separado las muestras de músculo, correspondientes a los tres grupos experimentales, en un homogeneizador ultraturrax con solución tampón (ClNa 0,1 M y CO_3HNa 0,05 M) pH 7,4, en una proporción del 20 % (P/V). Posteriormente, se centrifuga a $550 \times g$ durante 10 min a 0-4° C. Para los análisis de proteína soluble y actividades deoxirribonucleasa ácida (DNasa), ribonucleasa ácida (RNasa) y fosfatasa alcalina se utilizan alícuotas de los sobrenadantes.

Otras 30 muestras se emplean para la determinación de DNA y RNA previa extracción con ácido tricloroacético. En el plasma obtenido de las muestras de sangre se determinan las tasas de insulina y somatotropina (GH).

Ensayos analíticos. — Las actividades enzimáticas de DNasa y RNasa ácidas y de fosfatasa alcalina se determinan por los métodos de McDONALD (25), KALNITSKY *et al.* (19) y BESSEY *et al.* (5), respectivamente. Las proteínas se determinan por el método de LOWRY *et al.* (23). La cuantificación del RNA y DNA se realiza mediante la técnica de SCHMIDT y THANNHAUSER (38) con modificación de MUNRO y FLECK (32).

La evaluación del número de núcleos y el tamaño celular, se determinan de acuerdo con las fórmulas de ENESCO y LEBLOND (8) y las tasas de insulina y GH mediante RIA (15, 31).

Los resultados se expresan como valores medios $\pm$ SEM. Las diferencias significativas obtenidas comparando los datos de los distintos grupos entre sí, se determinan mediante el test de la t de Student (40). La probabilidad menor de 0,05 se considera significativa.

Resultados y Discusión

Las modificaciones en el peso corporal son proporcionales al porcentaje de proteína ingerida (tabla I), dando lugar a un aumento paulatino tanto en la ganancia neta como en el incremento peso/día. Al mismo resultado llegan GIOVANETTI y STOTHERS (11) con dietas del 5, 10 y 25 % de proteína. Sin embargo, la cantidad de alimento ingerido expresada en gramos de sustancia seca/rata/día y por 100 g de rata (tabla I), disminuye con la dieta del 20 % de proteína con respecto a las otras, lo que puede estar determinado, por un mecanismo destinado a proteger a

los tejidos de un aporte excesivo de aminoácidos (21). No obstante, el incremento paulatino en la eficiencia de conversión alimentaria (ECA) (tabla I) sugiere que, en los animales malnutridos, la limitación de la proteína ingerida afecta a la eficacia alimentaria, siendo mejor su aprovechamiento en los animales sometidos al 20 % de proteína, a pesar de la menor ingesta.

El descenso en un 25 % del peso muscular (tabla I) en las ratas sometidas a la dieta con el 4 % de proteína, señala la sensibilidad de la función del crecimiento muscular a la malnutrición (44), contribuyendo a la pérdida del peso corporal, dando lugar a una relación peso músculo/peso corporal menor, que con la dieta del 10 % de proteína.

Sin embargo, la disminución del índice miosomático encontrado en las ratas alimentadas con el 20 % de proteína, parece señalar un bajo crecimiento del músculo respecto al peso total del animal, lo que podría producirse por el alto depósito graso, que aparece en ratas sometidas a una dieta del 25 % de proteína (6). En este sentido SHAPIRA *et al.* (39) encuentran un decrecimiento del peso muscular en ratas obesas en relación a controles no obesos.

Tabla I. Ingesta, parámetros ponderales y eficiencia de conversión del alimento (ECA) en ratas adultas sometidas al 4, 10 y 20 % de proteína dietaria.

Proteína dietaria (%):	4	10	20
Ingesta (g.s.s./rata/día)	14,24 $\pm$ 0,38 ^a	13,89 $\pm$ 0,33 ^a	12,53 $\pm$ 0,56 ^b
(g.s.s./100 g rata/día)	8,019 $\pm$ 0,31 ^a	7,75 $\pm$ 0,60 ^a	6,61 $\pm$ 0,30 ^b
Peso corporal inicial (g)	155,36 $\pm$ 4,30 ^a	162,15 $\pm$ 4,78 ^a	164,1 $\pm$ 1,73 ^a
Peso corporal final (g)	177,56 $\pm$ 5,38 ^a	196,18 $\pm$ 4,76 ^b	214,6 $\pm$ 3,16 ^c
Incremento peso (g/rata/día)	1,16 $\pm$ 0,25 ^a	1,80 $\pm$ 0,36 ^b	2,75 $\pm$ 0,34 ^c
Ganancia neta (g) (1)	22,16 $\pm$ 3,67 ^a	33,95 $\pm$ 3,80 ^b	50,41 $\pm$ 2,40 ^c
Peso músculo (g)	1,05 $\pm$ 0,04 ^a	1,51 $\pm$ 0,13 ^b	1,24 $\pm$ 0,03 ^b
Índice miosomático (peso músculo $\times$ 10 ³ /peso animal)	5,91 $\pm$ 0,07 ^a	7,69 $\pm$ 0,09 ^b	5,78 $\pm$ 0,07 ^a
ECA (Δ peso rata día g/g.s.s. ingesta rata día)	0,08 $\pm$ 0,01 ^a	0,13 $\pm$ 0,01 ^b	0,22 $\pm$ 0,02 ^c

(1) Peso final menos peso inicial. Letras iguales indican diferencias no significativas ($p \geq 0,05$); letras desiguales indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Tabla II. Crecimiento celular del músculo gastrocnemio de ratas adultas sometidas al 4, 10 y 20 % de proteína dietaria.

Proteína dietaria (%):	4	10	20
DNA (mg/órgano)	0,54 ± 0,04 ^a	1,67 ± 0,27 ^b	0,60 ± 0,03 ^a
Proteína soluble (mg/órgano)	72,38 ± 4,53 ^a	56,67 ± 1,04 ^b	109,57 ± 9,81 ^c
Proteína soluble (mg/g órgano)	68,93 ± 2,72 ^b	37,65 ± 1,67 ^a	88,14 ± 3,78 ^c
Proteína/DNA	138,86 ± 11,58 ^a	33,93 ± 1,53 ^b	233,23 ± 28,65 ^c
Número de núcleos (DNA × 1.000)/6,2	87,0 ± 6 ^a ,00	269 ± 23 ^b	96,77 ± 7,00 ^c
Tamaño celular (peso × 1.000/n.º núcleos)	12,05 ± 0,19 ^a	5,61 ± 0,09 ^b	12,84 ± 0,2 ^a
DNasa ácida (U/órgano)	27,18 ± 2,64 ^a	22,71 ± 2,90 ^b	30,76 ± 1,60 ^c
DNasa ácida (U/mg proteína)	0,38 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,029 ^a	0,30 ± 0,04 ^b
Fosfatasa alcalina (µmol p · nitrofenol/mg proteína)	2,01 ± 0,2 ^b	5,99 ± 0,4 ^a	3,54 ± 0,02 ^c
Fosfatasa alcalina (mmol p · nitrofenol/órgano)	0,145 ± 0,016 ^a	0,34 ± 0,02 ^b	0,38 ± 0,02 ^b
RNA (mg/órgano)	9,03 ± 0,71 ^a	22,88 ± 1,18 ^b	8,57 ± 0,23 ^a
RNA/DNA	16,72 ± 0,40 ^a	13,70 ± 0,74 ^b	14,28 ± 0,82 ^b
RNA/proteína	0,23 ± 0,007 ^a	0,37 ± 0,008 ^b	0,07 ± 0,006 ^c

Letras iguales indican diferencias no significativas ($p \geq 0,05$); letras desiguales indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Ambos porcentajes proteicos dietarios (4 y 20 %) conducen, además, a la pérdida del número de células, DNA del músculo y a la aparición de un fenómeno de aplasia (tabla II), lo que sugiere que el número de unidades de DNA determina el tamaño total muscular con ambas dietas. En este sentido, MILLWARD y WATERLOW (27) y SHAPIRA *et al.* (39), también encuentran menores tasas de DNA total en ratas malnutridas marginalmente y en ratas Zucker obesas, respectivamente, a consecuencia de la disminución en la síntesis de este ácido nucleico (12).

De forma paralela, parece existir una menor degradación del DNA en los animales sometidos al 20 % de proteína según indica la disminución en la actividad específica de la DNasa ácida (tabla II), que puede contrarrestar la caída del DNA. Asimismo, este decrecimiento en la actividad DNasa podría relacionarse con la posible existencia de una menor capacidad de división celular del músculo, puesto que esta enzima se libera durante el proceso mitótico.

El incremento simultáneo de la proteína soluble (mg/órgano) y de la razón proteí-

na/DNA (tabla II) con ambas dietas, frente a la del 10 %, indica que el tamaño celular aumenta a pesar de la diferencia en el porcentaje proteico, quizá debido al estadio de crecimiento hipertrófico en el que se encuentra el animal en estudio (8). También, la elevación de otros constituyentes celulares podría contribuir a dicha hipertrofia, como se deduce del aumento en la razón peso/número de núcleos (tabla II).

Este acúmulo de proteína intracelular podría ser debido a una posible disminución en el catabolismo proteico muscular, como parece indicar el descenso de la actividad específica del enzima fosfatasa alcalina (tabla II), lo que haría disminuir su acción lítica sobre las fosfoproteínas. En este sentido, GOLDBERG *et al.* (14) señalan la participación de los enzimas lisosómicos en la degradación de la proteína muscular. De esta manera, el proceso degradativo podría regular el tamaño celular y participar en el crecimiento del músculo (3).

Sin embargo, debido al aumento de la relación citoplasma/núcleo, la concentración total de RNA disminuye, de-

Tabla III. Tasas plasmáticas de insulina y GH en ratas adultas sometidas al 4, 10 y 20 % de proteína.

Proteína dietaria (%):	4	10	20
Insulina (mUI/ml)	2,82 ± 0,31 ^a	16,58 ± 1,04 ^b	34,5 ± 2,86 ^c
GH (μUI/ml)	2,72 ± 0,01 ^a	0,93 ± 0,09 ^b	2,00 ± 0,22 ^c

Letras iguales indican diferencias no significativas ($p \geq 0,05$); letras desiguales indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

terminando a su vez la caída de la capacidad de síntesis proteica muscular (RNA/proteína) (tabla II). A este mismo resultado llegan MILLWARD *et al.* (29) en ratas CFY. Otros autores (17, 28) encuentran una baja tasa de RNA muscular en ratas deficientes en proteínas y en las sometidas a dietas del 30 y del 60 % de proteína.

Los factores que parecen limitar el crecimiento muscular en ratas adultas alimentadas con un 4 y un 20 % de proteína, parecen ser, por lo tanto, la disminución en la capacidad de síntesis proteica y la cantidad de DNA del órgano. Sin embargo, estos efectos parecen estar influidos por modificaciones hormonales de insulina y GH plasmáticas, que contribuyen a la reducción de la masa muscular. Así, la hipoinsulinemia (tabla III) de los animales malnutridos, parece impedir, de acuerdo con VON DER DECKEN y OMSTED (45), el efecto estimulador de la hormona sobre la síntesis de DNA, RNA y proteína.

La hiperinsulinemia desarrollada en el grupo sometido al 20 % de proteína en la dieta, pone de manifiesto el efecto insulínico del exceso de aminoácidos (9). Este resultado se acompaña de un mecanismo de resistencia a la insulina (34), similar al indicado por HENLEY y VAITUKAITIS (16) en individuos obesos y cuya causa puede depender bien de un menor número de receptores tisulares para la hormona (42), o bien de su menor capacidad de activación de la tirosina-quinasa y de la autofosforilación (10, 20). A este respecto se han demostrado (35) alteraciones a nivel receptor y postreceptor en la respuesta periférica a la insulina en individuos obesos, así como el descenso en la afinidad de los receptores para insulina

con la ingesta alta en calorías y con tasas elevadas de GH (16).

El incremento en la tasa de GH encontrado en los animales malnutridos (4 %), señalado también por otros autores (2, 4, 30), ha sido asociado a un fenómeno de insensibilidad tisular a la hormona, a través de una posible disminución del número de receptores para GH por célula, de acuerdo con otros datos en ratas con malnutrición proteico-calórica (24).

Por su parte, sólo la posible existencia de un estado de resistencia a la GH o la aparición de un artefacto matemático, podría explicar los elevados niveles de GH en el lote sometido al 20 % de proteína, ya que, tasas iguales o menores de la hormona se encuentran tanto en individuos obesos (22) como después de un período de rehabilitación de la proteína dietaria (2). No obstante, en el estado adulto, los altos niveles de somatomedina C, son independientes del crecimiento muscular del animal (18).

Por consiguiente, los datos obtenidos sugieren que, considerando como índices de los requerimientos proteicos las modificaciones en el crecimiento y en la capacidad de síntesis proteica muscular, los niveles proteicos dietarios del 4 y del 20 % comparados con una dieta del 10 %, no parecen ser los más adecuados para la conservación de la masa corporal magra en la rata adulta.

Resumen

Se evalúan el crecimiento del músculo esquelético y la capacidad de síntesis proteica, como índices de los requerimientos óptimos de proteína en la rata

adulto. A este fin, se someten tres grupos de ratas Wistar de 90 días de edad, a tres niveles proteicos dietarios: 4, 10 y 20 % de proteína (caseína + DL-metionina), durante 21 días. El peso corporal, la eficacia de conversión del alimento y la ganancia ponderal neta, se incrementan proporcionalmente al contenido proteico de la dieta. Con las dietas del 4 y del 20 % de proteína aparece una disminución en DNA, RNA y RNA/proteína, mientras que la tasa proteica y la razón proteína/DNA del músculo se elevan, lo que origina un fenómeno de aplasia, aunque persiste el crecimiento hipertrófico. Estas modificaciones parecen estar mediadas por las alteraciones en los niveles plasmáticos de insulina y GH. Se deduce de todo ello que la ingestión de dietas con niveles del 4 y del 20 % de proteína no parecen adecuadas para el período de mantenimiento de la rata adulta.

Palabras clave: Músculo, Crecimiento, Proteína, Rata adulta.

Bibliografía

- Allison, J. B., Wannemacher, R. W. Jr., Banks, W. L. y Wunner, W. H.: *J. Nutr.*, 84, 383-389, 1964.
- Atinmo, T., Baldijao, C., Pond, W. G. y Barnes, R. H.: *J. Nutr.*, 106, 947-951, 1976.
- Bates, P. C. y Millward, P. J.: *Br. J. Nutr.*, 46, 7-14, 1981.
- Beas, F., Contreras, I., Maccioni, A. y Arenas, S.: *Brit. J. Nutr.*, 26, 169-175, 1971.
- Bessey, O. A., Lowry, O. M. y Brock, M. J. V.: *J. Biol. Chem.*, 164, 321-329, 1946.
- Donald, P., Pitts, G. C. y Pohl, S. L.: *Science*, 211, 185-186, 1981.
- Edozien, J. C., Switzer, B. R.: *J. Nutr.*, 108, 282-293, 1978.
- Enesco, M. y Leblond, C. P.: *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 10, 530-535, 1962.
- Floyd, J. C., Fajans, S. S., Conn, J. W., Knopf, R. F. y Roll, J.: *J. Clin. Invest.*, 45, 1487-1502, 1966.
- Gabbay, R. A. y Lardy, H. A.: *J. Biol. Chem.*, 259, 60521-6058, 1984.
- Giovanetti, P. M. y Stothers, S. L.: *Growth*, 39, 1-16, 1975.
- Goldberg, A. L. y Goldsping, D. F.: *Am. J. Physiol.*, 228, 310-317, 1975.
- Goldberg, A. L. y St. John, Ac.: *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 747-803, 1976.
- Goldberg, A. L., Tischler, H., De Martino, G. y Griffin, G.: *Fed. Proc.*, 39, 31-36, 1980.
- Greenwood, F. C., Hunter, W. M. y Glover, J. S.: *Biochem. J.*, 89, 114-123, 1963.
- Henley, K. H. y Vaitukaitis, J. L.: *Clin. Obst. Gynecol.*, 28, 615-631, 1985.
- Howart, R. E.: *J. Nutr.*, 102, 37-43, 1972.
- Isley, W. L., Underwood, L. E. y Clemmons, D. R.: *J. Clin. Invest.*, 71, 175-182, 1983.
- Kalnitsky, G., Hummel, J. P., Resmick, H., Carter, J. P., Barnett, L. B. y Dierks, C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 81, 542-566, 1959.
- Larner, J.: *Am. J. Med.*, 74, 38-40, 1983.
- Leung, K. y Munk, A.: *Ann. Rev. Physiol.*, 37, 245-272, 1977.
- Londono, J. H., Gallagher, T. F. y Bray, A.: *Metabolism*, 18, 986-988, 1969.
- Lowry, D. A., Rosebrough, N. J., Fair, A. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- Maes, M. y Ketelslesgers, J. M.: *Endocrinology*, 112 (Suppl.), 282 (abs.), 1983.
- McDonald, M. R.: En «Methods in Enzymology» (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.). Academic Press, Nueva York, 1955, vol. II, pp. 437-447.
- Millward, D. J., Garlick, A. J., Stewart, R. J., Nnanyelugo, D. O. y Waterlow, J. C.: *Biochem. J.*, 150, 235-243, 1975.
- Millward, D. J. y Waterlow, J. C.: *Fed. Proc.*, 37, 2283-2290, 1978.
- Millward, D. J., Garlick, P. J., Nnanyelugo, D. O. y Waterlow, J. C.: *Biochem. J.*, 156, 185-188, 1976.
- Millward, D. J., Bates, P. C., Benoist, B., Brown, J. G., Cox, M., Halliday, D., Odebra, B. y Rennie, M. J.: En «IV Int. Symp. Protein Metabolism and Nutrition» (Prion, R., Arnal, N. y Bonin, P., eds.). INRA (Les colloques de l'INRA n.º 16). París, 1983, pp. 69-96.
- Milner, R. D. G.: *Pediatrics*, 4, 213-217, 1970.
- Morgan, C. R. y Lazarov, G.: *Diabetes*, 12, 115-126, 1963.
- Munro, H. N. y Fleck, A.: *Analyst*, 91, 78-88, 1966.
- Muñoz-Martínez, E., Marcos, A., Varela, P., Unzaga, M. T. y Varela, G.: *Arch. Lat. Am.*, 36, 714-724, 1986.
- Muñoz-Martínez, E., Unzaga, M. T., Jiménez Gancedo, B. y Rey de Viñas, J. L.: *XXIII Congreso Nal. Soc. Esp. C. Fisiol.*, Tenerife, 1988, 95 (abs.).
- Prager, R., Wallace, P. y Olefsky, J.: *J. Clin. Invest.*, 78, 472-481, 1986.
- Rannels, D. E., McKee, E. E. y Morgan, M. E.: En «Biochemical actions of hormones»

- (Litwack, G., ed.). Academic Press, Nueva York, 1977, vol. IV, pp. 135-195.
37. Rennie, M. J., Edwards, R. H. T., Halliday, D., Matthews, D. E., Wolman, S. L. y Millward, D. J.: *J. Clin. Sci.*, 63, 519-523, 1982.
38. Schmidt, G. y Thannhauser, S. J.: *J. Biol. Chem.*, 161, 83-89, 1945.
39. Shapira, J. F., Kircher, J. y Martin, R. J.: *J. Nutr.*, 110, 1313-1318, 1980.
40. Sokal, R. R. y Rohlf, F. J.: En «Biometría: Los principios y la práctica de la estadística en la investigación biológica.» H. Blume, Madrid, 1978, pp. 145-194.
41. Smith, C. K., Durschlag, R. P. y Layman, D. K.: *J. Nutr.*, 112, 255-262, 1982.
42. Susuki, K. y Kono, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2542, 1980.
43. Varela, P., Muñoz-Martínez, E., Marcos, A., Unzaga, M. T. y Varela, G.: *Rev. esp. Fisiol.*, 42, 111-116, 1986.
44. Waterlow, J. C., Garlick, P. J. y Millward, D. J.: En «Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body». North Holland. Oxford, 1978, pp. 502-570.
45. Von der Decken, A. y Omstedt, P. T.: *J. Nutr.*, 102, 1555-1565, 1972.

