

Laboratorio de Fisiología General (C.S.I.C.)
Facultad de Medicina
Universidad de Valencia
(Director : Prof. Dr. J. García-Blanco)

Metabolismo proteico de la rata en crecimiento.* II. — Seroproteínas y complemento sérico en relación con la edad y nivel de proteínas en la dieta

por
A. Pestaña **

(Recibido para publicar el 16 de diciembre de 1966)

El papel del complemento en la resistencia natural y adquirida está bien establecida (15, 17), así como la interrelación nutrición-infección (24). Sin embargo, son muy pocos los trabajos acerca de sus variaciones en relación con la dieta (29). WERTMAN (38) y PRUZANSKY (20) han señalado disminución del complemento en carencias vitamínicas. WEIMER y col. (34) han estudiado las modificaciones del complemento en el ayuno, hipoalimentación y carencia proteica en ratas adultas. KENNEY (8) también en ratas adultas, ha estudiado la influencia de una dieta hipoproteica a lo largo de varias semanas. En ambos trabajos se pone de manifiesto una alteración de los niveles de complemento por la carencia proteica. Sin embargo, falta información acerca de las variaciones del complemento en la rata joven en relación tanto con la edad como con la ingesta proteica.

Pese a que la rata es de empleo universal en experiencias de nutrición, la mayor parte de los estudios acerca de

la influencia de la dieta sobre las seroproteínas, se ha realizado en perros (37). En estos últimos años se han publicado estudios de las seroproteínas de la rata adulta en diferentes situaciones nutricionales (4, 5, 10, 11, 16, 19, 27). WEIMER y col. (29-33, 35-37) han estudiado exhaustivamente las modificaciones de las seroproteínas de la rata adulta tanto en la depleción por el ayuno, hipoalimentación o carencia proteica, como en la repleción con diferentes niveles de proteínas. Pero falta información acerca de la evolución del proteinograma de la rata en crecimiento y su relación con la ingesta proteica.

En el presente trabajo se exponen los datos relativos a niveles de complemento sérico, hematócrito, seroproteínas totales y fracciones electroforéticas de ratas blancas alimentadas con tres niveles

* Es parte de la Tesis Doctoral leída en febrero de 1967.

** Con una beca de Iniciación a la Investigación.

de proteínas durante períodos variables de tiempo a partir del destete.

Material y métodos

El plan experimental y las dietas han sido descritos en un trabajo anterior (18). La experiencia comprende cuatro grupos fundamentales: *D* (destete, control inicial), *A* (dieta 20 % caseína), *B* (dieta 4 % caseína) y *T* (dieta stock, 9 % proteínas vegetales). Los grupos *A*, *B* y *T* se subdividen en cuatro lotes de edad, 15, 30, 60 y 90 días desde el destete. Al final del período experimental, las ratas se sacrifican mediante punción cardíaca o decapitación, previa anestesia etérea. El valor hematócrito se determina en tubos capilares homogéneos, previamente heparinizados y secados a temperatura ambiente, cerrados a la llama, centrifugados 30 minutos a 3.000 rpm.

Las restantes determinaciones se practican en suero separado por centrifugación (10' a 1500 rpm) tras 105-120 minutos de coagulación a temperatura ambiente. Dado el volumen de suero necesario, en el caso de animales pequeños hemos debido proceder a la mezcla de la sangre de 2 ó 3 animales. Las seroproteínas se han determinado en alícuotas de 0,1 ml con el método del Biuret (21). Para el proteinograma electroforético nos ha resultado extraordinariamente útil el soporte de acetato de celulosa, cuyas principales ventajas son (23): sencillez de manejo, obtención de mayor número de fracciones y clara separación de las mismas. Las determinaciones se han realizado en muestras de 0,004-0,010 ml de suero, con tampón veronal a pH 8,6, 90 minutos de separación a 150 V, tinción con Negro Amidón y análisis densitométrico de la banda transparentada. El porcentaje de proteínas se obtiene por integración de la gráfica y los resultados se expresan en g proteína por 100 ml de suero.

La determinación del complemento se ha realizado en unidades 50 % hemolíticas con la técnica espectrofotométrica de MAYER (15), utilizando hemolisina comercial y suero de rata al 1/25 ó 1/50. Los resultados se obtienen por el procedimiento gráfico, siendo la pendiente media de 0,27 y habiendo desechado las determinaciones que han dado pendientes superiores a 0,35. Todos los análisis colorimétricos se han realizado indistintamente en Espectrofotómetro Beckman DU o Unicam.

Resultados y discusión

Los valores hematócrito (ver tabla I) muy bajos al destete se elevan rápidamente en el curso del primer mes, lo cual puede relacionarse con la rápida disminución del porcentaje de agua en el cadáver que tiene lugar también en el primer mes tras el destete (18). No se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes lotes de edad, exceptuando *B*₁, significativamente mayor que *A*₁; diferencia que puede atribuirse a la anómala situación nutricional de este lote.

Las seroproteínas totales se presentan en la tabla II. No hay diferencias significativas entre los diferentes lotes *A* y *T*, siendo todos ellos significativamente mayores que los correspondientes al destete. Por el contrario, los valores encontrados para los animales con dieta hipoproteica, no difieren de los del destete y son significativamente menores que los correspondientes al grupo *A*. Este comportamiento de las seroproteínas en la malnutrición proteica es un hecho bien establecido desde los trabajos de KERR y col. (9) y ha servido para la formulación del concepto de estado dinámico de las proteínas corporales (14). Es de destacar la hipoproteinemia basal constante que presentan los animales del grupo *B* durante los dos pri-

TABLA I

Valores de hematocrito y complemento sérico de ratas en crecimiento, sometidas a distintas dietas.

Lote	Animales n.º	Hematocrito %		Complemento	
		Ensayos n.º	Valor	Ensayos n.º	Valor (C'H ₂)
D	21	14	32,7 ± 1,1 *	6	8,16 ± 1,91 *
T ₁	9	6	39,4 ± 1,6	6	22,9 ± 1,59
T ₂	18	10	41,2 ± 0,7	5	28,09 ± 2,80
T ₃	8	6	41,7 ± 1,7	6	25,68 ± 2,56
T ₄	8	6	44,7 ± 0,46	6	25,60 ± 2,7
B ₁	12	9	41,1 ± 0,9 *	6	18,79 ± 2,63
B ₂	13	11	42,1 ± 2,7	6	12,16 ± 1,31 *
B ₃	7	7	46,8 ± 1,7	5	23,78 ± 3,54
B ₄	6	6	44,2 ± 1,5	5	31,51 ± 2,31
A ₁ **	10	6	34,4 ± 1,17	6	25,07 ± 4,21
A ₂	8	8	39,8 ± 1,6	6	30,38 ± 3,19
A ₃	11	9	43,8 ± 0,7	6	37,95 ± 5,04
A ₄	7	7	47, ± 1,4	6	30,18 ± 2,89

* Diferencia con A significativa a $P \leq 0,01$ (t «test»).

** Estado nutricional afectado por factores extraños a la experiencia (contaminación por hongos de la dieta y consecuente intensa diarrea).

meros meses de experiencia; ello pese a que su metabolismo proteico se caracteriza por retención de nitrógeno (18). Esto es consistente con los hallazgos de ALLISON (1, 3) que muestran la posibilidad de que un organismo esté en balance de nitrógeno positivo y pierda nitrógeno por algún otro tejido.

En la tabla II se han detallado los valores encontrados para las diferentes fracciones electroforéticas. La separación de una nueva fracción con el soporte de acetato de celulosa nos planteó un problema de nomenclatura que hemos resuelto con la consideración de tres fracciones α -globulinas. Nuestra fracción α -3, seguramente coincide con la β -1 obtenida por TASKER y col. (25) en Agar-Gel. En la figura 1 se ha representado gráficamente la evolución de cada fracción con relación a la edad, y en la figura 2 se presentan proteogramas representativos de cada lote experimental. Cabe destacar, en primer lugar, la evolución similar del proteo-

grama en los grupos A y T, los cuales usaremos indistintamente como representativos de la evolución normal.

La albúmina se eleva en un 50 % durante el primer mes tras el destete, quedando prácticamente estabilizada. Sin embargo, en el grupo carencial, la albúmina se mantiene en niveles bajos inferiores a los del destete, lo cual traduce una acentuada depleción de los depósitos proteicos (2, 3). La evolución de la albúmina sérica en relación con la edad y dieta, es similar a la de las seroproteínas totales, lo cual concuerda con la opinión más generalizada de que las variaciones observadas en el nivel de seroproteínas totales en relación con la dieta, pueden atribuirse a cambios en los niveles de seroalbúminas (12).

Las α -globulinas no parecen afectarse por la ingesta proteica, toda vez que los valores encontrados para el grupo B no difieren significativamente de los correspondientes a los grupos A y T. Estos resultados son consistentes con la con-

TABLE II
 Proteinogramas correspondientes a ratas en crecimiento sometidas a diferentes dietas
 con niveles de proteínas distintos.

Lote	Seroproteínas		A/G**	Deter. n.º	Albuminas (gr/%)	PROTEINOGRAMA				
	Deter. n.º	(gr/%) Valor				Alfa-1-G	Alfa-2-G	Alfa-3-G	Beta-G	Gamma-G
D	9	4,70 ± 0,15*	0,54	7	1,83 ± 0,13*	0,33 ± 0,03*	0,62 ± 0,05	0,18 ± 0,01*	0,98 ± 0,03*	0,56 ± 0,06
T ₁	7	5,64 ± 0,15	0,82	6	2,75 ± 0,09*	0,34 ± 0,01	0,70 ± 0,05	0,29 ± 0,01*	1,19 ± 0,05	0,60 ± 0,04
T ₂	18	5,65 ± 0,15	0,71	8	2,54 ± 0,11	0,54 ± 0,03	0,72 ± 0,02	0,39 ± 0,01	1,10 ± 0,04	0,80 ± 0,05
T ₃	8	6,08 ± 0,11	0,73	6	2,56 ± 0,05	0,47 ± 0,04	0,59 ± 0,02	0,44 ± 0,01	1,16 ± 0,06	0,82 ± 0,04
T ₄	8	6,41 ± 0,13	0,74	7	2,67 ± 0,09	0,36 ± 0,04*	0,60 ± 0,04	0,52 ± 0,01	1,05 ± 0,05	1,17 ± 0,07
B ₁	10	4,69 ± 0,13	0,50	8	1,56 ± 0,11*	0,53 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,42 ± 0,03	1,04 ± 0,05	0,51 ± 0,04
B ₂	9	4,77 ± 0,18*	0,59	7	1,79 ± 0,08*	0,54 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,46 ± 0,04	0,93 ± 0,04*	0,57 ± 0,05
B ₃	7	4,47 ± 0,07*	0,55	7	1,58 ± 0,09*	0,44 ± 0,04	0,58 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,86 ± 0,02*	0,59 ± 0,03*
B ₄	6	5,28 ± 0,09*	0,61	5	1,97 ± 0,12	0,55 ± 0,03	0,58 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,85 ± 0,03*	0,73 ± 0,01
A ₁	7	5,07 ± 0,20	0,68	7	2,10 ± 0,12	0,49 ± 0,07	0,57 ± 0,05	0,37 ± 0,02	1,07 ± 0,04	0,56 ± 0,05
A ₂	8	5,96 ± 0,16	0,71	8	2,49 ± 0,12	0,56 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,41 ± 0,01	1,19 ± 0,07	0,69 ± 0,05
A ₃	9	6,36 ± 0,07	0,81	7	2,84 ± 0,10	0,46 ± 0,04	0,63 ± 0,03	0,49 ± 0,02	1,08 ± 0,02	0,84 ± 0,06
A ₄	7	6,28 ± 0,21	0,68	7	2,35 ± 0,09	0,62 ± 0,02	0,67 ± 0,05	0,50 ± 0,04	1,20 ± 0,05	0,92 ± 0,08

* Diferencias significativas con A a nivel $P \leq 0,01$ (t «test»).

** Cociente Albúmina/Globulina.

SEROPROTEINAS FRACCIONES ELECTROFORETICAS

● = D / ○ = T / ▲ = B / △ = A

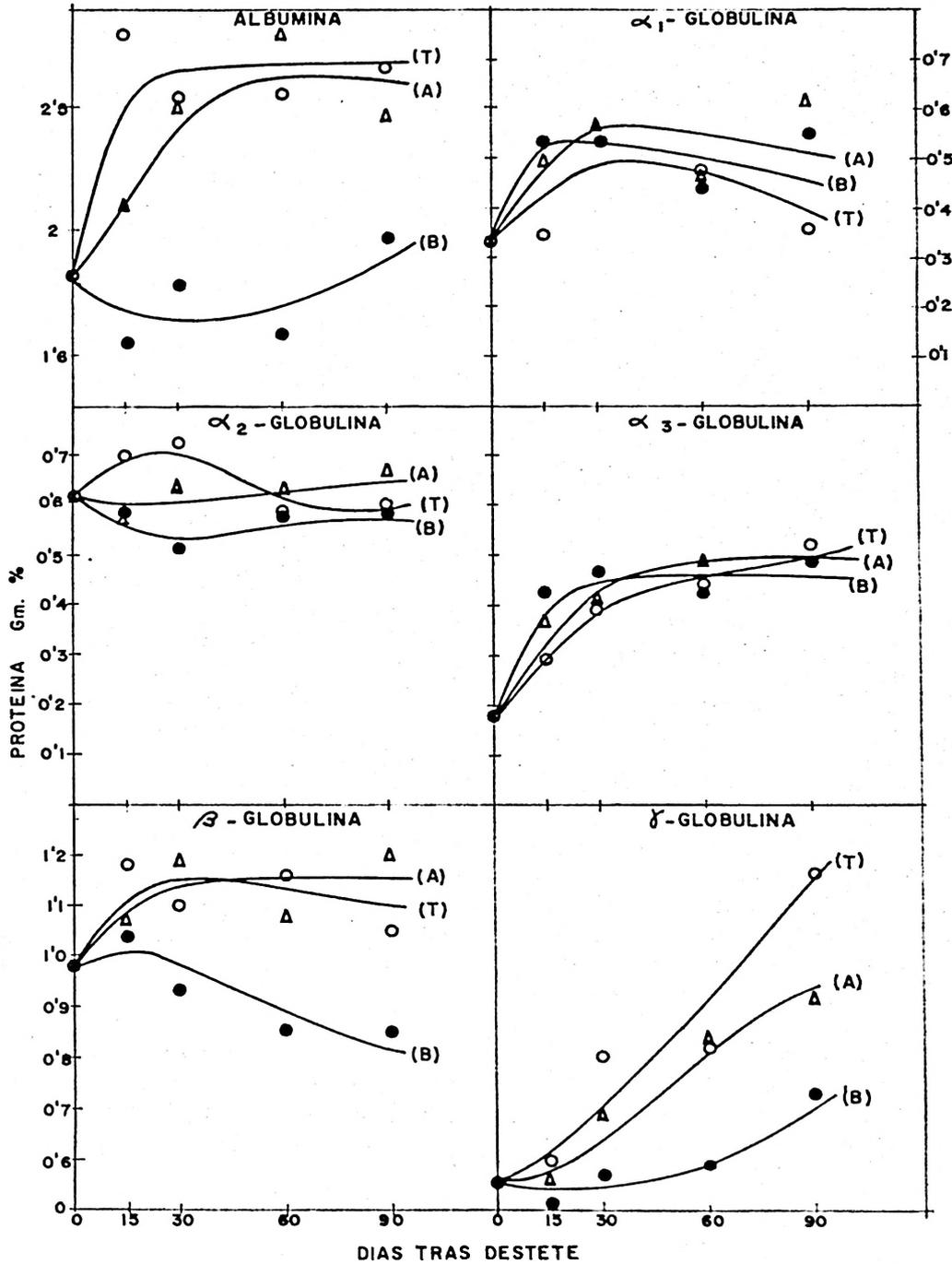


FIG. 1. Evolución de las fracciones electroforéticas del suero de la rata en relación con la edad y nivel de proteínas de la dieta (D, destete; A, dieta con 20 % de caseína; B, dieta con 4 % de caseína; T, dieta stock con 9 % de proteína vegetal).

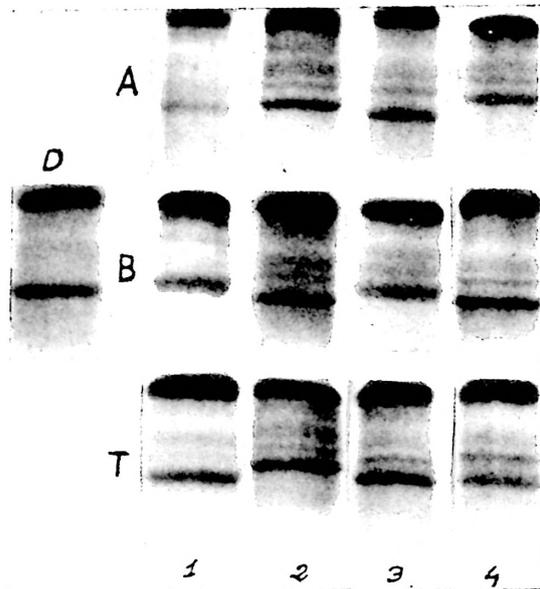


FIG. 2. Proteinograma representativo de cada lote experimental (símbolos como en la fig. 1).

sideración de las globulinas α como proteínas específicas de importancia biológica que el organismo tiende a conservar (1, 39). El comportamiento de las α -globulinas en relación con la edad es dispar: La fracción α -1 se eleva inicialmente, para estabilizarse a partir del primer mes tras el destete; la fracción α -2 es muy estable y no difiere de los valores iniciales (*D*) en ninguna de las edades estudiadas; la fracción α -3 es posiblemente la seroproteína más afectada por la edad: aumenta progresivamente hasta valores 300 % superiores a los del destete en el tercer mes de experiencia.

Las β -globulinas en los animales normales se elevan inicialmente estabilizándose a partir del primer mes. Por el contrario, en los animales con dieta hipoproteica se evidencia una progresiva disminución con valores significativamente menores en los lotes B_2 - B_3 - B_4 .

Este comportamiento de las β -globulinas en dieta hipoproteica, similar al encontrado por WANNEMACHER y colabo-

radores (27) en el perro, pero que no hemos encontrado en otras publicaciones sugiere una relación de esta fracción con las reservas proteicas según la definición de ALLISON y col. (2). La γ -globulina manifiesta un aumento progresivo con la edad, muy acusado en el grupo *T* que, a los tres meses, presenta valores un 100 % superiores a los del destete. La evolución de esta fracción puede interpretarse, de acuerdo con GUSTAFSON (6, 7) como consecuencia del progresivo contacto con los microorganismos del medio; y los valores más elevados del grupo *T* pueden depender de diferencias en las condiciones de alojamiento. En los animales del grupo *B*, la γ -globulina se mantiene a niveles similares a los del destete en los dos primeros meses de experiencia, no participando en la evolución general descrita. Aunque sólo el lote B_3 presenta valores significativamente menores, puede concluirse que esta fracción es afectada por la ingesta proteica en la rata en crecimiento. En la rata adulta, hay pruebas de su estabilidad (32, 33, 37).

En la tabla I se detalla la actividad del complemento sérico encontrada en los diferentes lotes. Ante todo, cabe destacar los valores bajos al destete y su rápido incremento en un 150-300 % durante los siguientes 15 días. Al mes del destete, los animales de los grupos *A* y *T* presentan valores similares a los encontrados en los lotes de 90 días y comparables a los encontrados por LEVY (13) para la rata adulta. La dieta hipoproteica no parece comprometer la evolución ascendente del complemento en los animales jóvenes, los valores encontrados en los lotes B_1 - B_2 - B_3 no difieren de los correspondientes al grupo *A*. Los valores significativamente bajos encontrados en el lote B_2 pueden interpretarse como un agotamiento del material para síntesis consecuente a las demandas anabólicas máximas (18) en un orga-

nismo con reservas proteicas exaustas. No obstante, la interpretación de las variaciones en los niveles del complemento no pueden simplificarse dada la multitud de factores que le pueden afectar (34).

Dos fracciones del sistema complemento (C_3 y C_4) se han identificado con proteínas plasmáticas de movilidad electroforética de β -globulina (26). En este sentido, RICE (22) ha encontrado buena correlación entre actividad del complemento y niveles de β -globulina. Nosotros no hemos podido encontrar relación alguna similar en nuestros resultados, lo que concuerda con los hallazgos de WEIMER (34).

Resumen

Se ha estudiado la actividad del complemento, hematócrito, seroproteínas totales y fracciones electroforéticas en ratas blancas alimentadas con tres niveles de proteínas (4-20 % caseína, y 9 % proteína vegetal) durante 15, 30, 60 y 90 días a partir del destete.

Los valores hematócrito, muy bajos al destete, se elevan rápidamente en el primer mes con independencia del tipo de dieta. Las seroproteínas totales muestran un comportamiento similar, si bien, en los animales con dieta 4 % caseína, muestran valores bajos, inferiores a los del destete, durante los dos primeros meses de experiencia.

La albumina sérica se afecta marcadamente en los animales con dieta hipoproteica, en los que se mantiene a niveles inferiores a los del destete durante los dos primeros meses de experiencia. Resultados que evidencian una marcada depleción de los depósitos proteicos. También las globulinas β y γ se afectan por el nivel de proteínas en la dieta. Las α -globulinas muestran evolución dispar en relación con la edad, pero no se afectan por el tipo de dieta, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre ninguno de los grupos de edad experimentales.

El complemento sérico, que muestra valores muy bajos al destete, se eleva en un 150-300 % en los primeros 15 días de experiencias. A la edad de un mes los animales con dieta 20 % caseína y 9 % proteína vege-

tal, presentan valores similares a los adultos. Por el contrario, los animales con dieta a 4 % de caseína tienen valores bajos en el primer mes de experiencia; los niveles de complemento a los 15, 60 y 90 días tras el destete son similares en los tres grupos.

No se ha encontrado relación entre ninguna fracción electroforética y nivel de complemento.

Summary

Protein metabolism in growing rats. II. Serum complement levels and electrophoretic patterns related to age and dietary protein level

A study of serum complement levels, hematocrit values, total serum proteins and electrophoretic patterns on cellulose acetate has been made in young albino rats fed on diets of three different levels (4 and 20 % casein and 9 % vegetable protein) during periods of 15, 20, 60 and 90 days from weaning.

Hematocrit values increased with age independently of dietary protein. Total serum protein increased rapidly during the first month in those groups fed on diets of 20 % casein and 9 % vegetable protein. Animals on 4 % casein diet had significantly lower values than the other diet and similar to those sacrificed at weaning during the first two months. Similar behavior was found in serum albumin, which suggests depletion of protein reserves in the 4 % casein groups.

Beta and gamma globulins were also lower in protein deficient rats, while alpha-globulins showed no differences in relation to dietary proteins. In the three diet groups, alpha-3-globulins increased progressively with age, to reach values of 300 % greater at 90 days from weaning; alpha-2-globulin did not vary with age and alpha-1-globulins showed a slight increase in the first 30 days only.

Serum complement level was very low at weaning and increased by about 150-300 % during the first 15 days. At the

end of the first month, animals on 20 % casein and 9 % vegetable protein diets had levels similar to those of adults, while those on 4 % casein diet showed significantly lower levels, similar to the weaning group. At 60 and 90 days after weaning, serum complement levels was similar in the three diet groups. No correlation was found between serum complement level and concentration of serum protein fractions.

Bibliografía

1. ALLISON, J. B., y FITZPATRICK, W. H. : *Dietary proteins in health and disease*. Ch. C. Thomas, Springfield, Ill., 1960.
2. ALLISON, J. B., y WANNEMACHER, R. W. : *Am. J. Clin. Nutr.*, **16**, 445, 1965.
3. ALLISON, J. B. : *Physiol Revs.*, **35**, 664, 1955.
4. BARROS, C. : *Ztschr. Versuchstierk.*, **5**, 130, 1964.
5. GJESSING, E. C., y CHANUTIN, A. : *J. Biol. Chem.*, **169**, 657, 1947.
6. GUSTAFSON, B. F. : *J. Exp. Med.*, **108**, 251, 1958.
7. GUSTAFSON, B. F. : *J. Exp. Med.*, **110**, 675, 1959.
8. KENNEY, M. A. : *J. Nutrition*, **85**, 213, 1965.
9. KERR, W. J., HURTWITZ, S. H., y WHIPPLE, G. A. : *Am. J. Physiol.*, **47**, 356, 1918.
10. KHISNA-SUDHA, R. : *J. Nutrition*, **76**, 207, 1962.
11. KHISNA-SUDHA, R. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **100**, 233, 1959.
12. LEVELLE, G. A. : *J. Nutrition*, **74**, 500, 1961.
13. LEVY, A. L. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **99**, 584, 1958.
14. MADDEN, S., y WHIPPLE, G. : *Physiol. Revs.*, **20**, 194, 1940.
15. MAYER, M. M. : *Experimental Immunochimistry*. Kabat, A. E., Ed., Ch C. Thomas, 2.^a ed. Springfield, Illinois, 1964.
16. MULGONKAR, A. G. : *Proc. Soc. Exp. & Biol. Med.*, **94**, 44, 1957.
17. OSLER, A. G. : *Adv. Immunology*, **1**, 132, 1961.
18. PESTAÑA, A. : *R. esp. Fisiol.*, **23**, 00, 1967.
19. PETERSON, R. D. : *Am. J. Physiol.*, **193**, 79, 1958.
20. PRUZANSKY, J., y AXELROD, A. E. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **89**, 323, 1955.
21. REINHOLD : *Standard methods in clinical chemistry*, **I**, 88. Academic Press, Nueva York, 1953.
22. RICE, Ch. E. : *Canad. J. Comparative Med. and Vet. Sci.*, **28**, 38, 1964.
23. RITTS, R. E. : *Am. J. Clin. Path.*, **41**, 321, 1964.
24. SCRIMSHAW, N. S., TAYLOR, C. E., y GORDON, J. E. : *Am. J. Med. Sci.*, **237**, 367, 1959.
25. TASKER, P. K., PRASAD, D. S. M., DANIEL, V. A., ACHARAYA, V. S. V., JOSEPH, A. A., RAO, S. V., y RAO, M. N. : *J. Nutr. Dietet.*, **1**, 73, 1964.
26. THORBECK, G. J., HOCHWALD, G. M., VAN FURTH, R., MÜLLER, H. J., y JACOBSON, E. B. : *Ciba Found. Symposia on Complement*, 99. Churchill Ltd., Londres, 1965.
27. VIVANCO, F., VILLASANTE, J. G., NIÑO, J., RAMOS, F., y JIMÉNEZ-DÍAZ, C. : *Rev. Clin. Esp.*, **91**, 355, 1963.
28. WANNEMACHER, R. W., RUSSELL, J. T., y ALLISON, J. B. : *J. Nutrition*, **80**, 315, 1963.
29. WEIMER, H. E. : *J. Nutrition*, **81**, 405, 1963.
30. WEIMER, H. E. : *J. Nutrition*, **67**, 137, 1959.
31. WEIMER, H. E. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **95**, 677, 1957.
32. WEIMER, H. E., BELL, R. T., y NISHINARA, H. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **100**, 853, 1959.
33. WEIMER, H. E., y GODFREY, J. F. : *Am. J. Physiol.*, **206**, 331, 1964.
34. WEIMER, H. E., MILLER, J. M., MAYERS, R. L., BAXTER, D. B., ROBERTS, D. M., CARPENTER, J. F., y CARPENTER, Ch. M. : *Cancer Research*, **24**, 847, 1964.
35. WEIMER, H. E., y NISHINARA, H. : *Am. J. Physiol.*, **196**, 642, 1959.
36. WEIMER, H. E. y NISHINARA, H. : *J. Nutrition*, **69**, 151, 1959.
37. WEIMER, H. E., y NISHINARA, H. : *Ann. New York Acad. Sci.*, **94**, 225, 1961.
38. WERTMAN, K., SMITH, L. W., y O'LEARY, W. M. : *J. Immunology*, **72**, 196, 1954.
39. ZELDYS, L. T., HELLING, E. L., MCCOORD, A. B., y KULKA, J. P. : *J. Exp. Med.*, **82**, 157, 1945.