

Efecto del crecimiento sobre el contenido proteico del tejido muscular de rata *

J. Bello, M.* N. Cenarruzabeitia y J. Larralde

Departamento de Investigaciones Fisiológicas
Sección de Nutrición Animal. C.S.I.C.
Universidad de Navarra
Pamplona (España)

(Recibido el 6 de abril de 1974)

J. BELLO, M.* N. CENARRUZABEITIA and J. LARRALDE. *The Effect of Growth on the Protein Components of Muscle in Rat*. Rev. esp. Fisiol., 30, 199-206. 1974.

A study of the nitrogenous fractions of the rat's muscle tissue has been conducted applying Helander's method and following the rat's development throughout its growing period after weaning. The results have shown that the muscular nitrogenous fractions change with the animal's growth and that these changes are more significant than those related to the age of the animal. Sarcoplasmic protein grows from birth up to 37 days of age, when it reaches its maximum value: 30 % of the muscular protein. Myofibrillar protein instead grows progressively within the growing period although its growth size is in function of the animal weight: between 60-100 g it goes from 39 % to 54 % of the muscular protein, whereas between 100-140 g the growth is only from 54 % to 62 %. The muscular non-protein nitrogenous fraction changes as the myofibrillar proteins, establishing a statistically significant correlation between the nitrogen contents in the non-protein and the myofibrillar protein of the muscle tissue.

El desarrollo del tejido muscular es un proceso biológico de gran importancia para la producción de proteínas animales y en muchas ocasiones se ha considerado el crecimiento del músculo esquelético como un índice de la eficacia alimenticia.

Las proteínas musculares acusan de modo particular la influencia de cualquier «stress» nutricional (2, 3, 10, 15, 16) y varios trabajos han puesto de manifiesto

la estrecha relación entre dieta y composición muscular (6, 7, 13).

Sin embargo, se dispone de escasa información acerca de las variaciones que experimentan los componentes nitrogenados del tejido muscular de mamífero, en función de la edad y el peso del animal.

Puesto que la rata blanca es un animal utilizado en numerosos trabajos que valoran algunos componentes proteicos del músculo en condiciones muy diversas, se considera de interés llevar a cabo el estudio de las variaciones en las fracciones ni-

* Trabajo realizado con cargo al Fondo de Ayuda a la Investigación del M.E.C.

trogenadas del tejido muscular, vinculadas de modo específico a la edad y peso animal, en función del desarrollo de la rata a lo largo del período de crecimiento posdestete.

Material y métodos

Animales. Se han utilizado ratas machos de raza Wistar, especialmente escogidas entre las de nuestro criadero. Los animales no sacrificados en el día del destete fueron introducidos — una vez concluido el período de lactancia — en jaulas metabólicas individuales con libre acceso al agua de bebida. Estos animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar que contenía una mezcla de proteínas animales y vegetales, a la vez que recibían un suplemento de leche de vaca y vegetales frescos para asegurar un crecimiento adecuado. Su composición química, según los métodos analíticos de la A.O.A.C. (1), dieron los siguientes resultados: humedad, 12 %; proteína total, 20,2 % (harinas de pescado y de soja y salvado de trigo); proteína digestible, 19,4 %; extracto etéreo, 4,9 %; cenizas, 4,5 %; celulosa, 4,1 %; materias extractivas libres de nitrógeno, 34,9 %, calcio, 0,64 %; fósforo, 0,47 %. El índice nutritivo de esta dieta estándar correspondía a $CDV = 94,7$; $VB = 80,8$ %.

Para estudiar la correlación entre edad y peso animal con las proteínas musculares (experiencia 1), se ha partido de un lote de 28 ratas, procedentes de distintas camadas, destetadas a los 30 días de edad y que presentaban pesos variables entre 55 y 90 g, según las condiciones de lactancia de cada camada. Los animales fueron sacrificados en grupos de cuatro, a los días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12, a partir de su destete.

Para conocer la influencia de la duración de la lactancia (experiencia 2), se hicieron tres grupos, de seis ratas cada uno, dos de los cuales fueron destetados a los 30 días de edad y sacrificados uno a los

30 y otro a los 36 días de edad; un tercer grupo fue destetado y sacrificado a los 36 días.

Para la obtención de valores estándar de las distintas fracciones nitrogenadas del tejido (experiencia 3), se emplearon cinco grupos de seis ratas cada uno, destetadas a los 30 días de nacer y escogidas con un peso próximo a los 60 g con el fin de que sus estados fisiológicos fueran equivalentes y asegurar una velocidad de crecimiento homogénea. Un grupo fue sacrificado en el mismo día del destete y sus valores sirvieron de referencia para los restantes grupos, sacrificados a los 7, 14, 21 y 28 días del período de crecimiento posdestete.

Preparación del tejido muscular. Sacrificados los animales mediante golpe en la nuca y desangrados por inmediata decapitación, se separaron con rapidez dos porciones de tejido muscular, correspondientes a la parte dorsal, cuidadosamente liberado de tejido conectivo y depósitos grasos. Una porción sirvió para determinar el contenido nitrogenado del tejido muscular y la otra para la valoración de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares extraíbles del músculo, de acuerdo con el método de HELANDER (8).

Fraccionamiento nitrogenado del tejido muscular. Una porción de tejido muscular se homogeniza con tampón fosfato-K de pH 7,4 y fuerza iónica 0,05 con un aparato Ultra Turrax, tipo TP 18/2 y baño de agua con hielo para mantener la temperatura próxima a los 0° C. Después de dos horas de reposo se centrifugó a $3.000 \times g$ en frío, durante 20 minutos y se decantó el sobrenadante. Esta operación se repitió dos veces, obteniéndose así un primer extracto de proteínas.

El residuo sólido se vuelve a homogenizar con tampón de fuerza iónica 1,3 a base de fosfato-K 0,1 M y IK 1,1 M, con idéntica sistemática que en el paso anterior, separándose un segundo extracto proteico.

Las proteínas sarcoplásmicas se extraen del tejido muscular con soluciones salinas diluidas de baja fuerza iónica, mientras que las miofibrilares solamente se extraen con soluciones salinas de fuerza iónica elevada. El nitrógeno no proteico muscular se obtuvo por precipitación de una parte alícuota del primer extracto de proteínas, con igual volumen de ácido tricloroacético al 20 %.

Los valores de nitrógeno fueron determinados por el método de KJELDAHL (1), y las proteínas extraídas fueron valoradas por el método de LOWRY (12).

Resultados

En primer lugar, de acuerdo con la metodología de la experiencia 1, se ha estudiado la correspondencia que existe entre el contenido proteico del tejido muscular y la edad o el peso de animales cuyos niveles de crecimiento habían sido muy diversos (0,50-5,62 g por día). Dentro del intervalo estudiado (30-42 días de edad y 50-110 g de peso), fueron determinados en cada animal los contenidos proteicos sarcoplásmico (Nps) y miofibrilar (Npm) y

expresados en miligramos de proteína por cada gramo de tejido muscular fresco (tabla I). Asimismo, se indican las ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación encontrados para la fracción sarcoplásmica y la miofibrilar en relación con la edad (E) del animal, en días, o el peso vivo (P) del mismo, en gramos.

A continuación, se estudió la influencia de la duración de la lactancia sobre el incremento proteico del tejido muscular, en las condiciones indicadas para la experiencia 2. En la tabla II se incluyen los valores medios y error estándar correspondientes a los miligramos de nitrógeno muscular total por gramo de tejido muscular fresco, así como los porcentajes de nitrógeno proteico sarcoplásmico y miofibrilar extraíbles, referidos al contenido nitrogenado total.

Finalmente, se ha llevado a cabo el estudio de la variación de las fracciones nitrogenadas del músculo en función del desarrollo y el crecimiento de la rata, de acuerdo con el esquema de la experiencia 3, empleando unas condiciones estándar perfectamente controladas de alimentación y crianza. Con un nivel de creci-

Tabla I. *Contenido en nitrógeno proteico sarcoplásmico (Nps) y nitrógeno proteico miofibrilar (Npm) del tejido muscular de ratas, destetadas a los 30 días de edad, alimentadas ad libitum con dieta estándar.*

Valores medios $\pm$ error estándar de grupos de cuatro animales.

Edad al sacrificio (E), días	Peso al sacrificio (P), g	Nivel de crecimiento $\Delta p/d$	mg/g tejido muscular fresco	
			Nps	Npm
30	73,41 $\pm$ 9,30	—	7,53 $\pm$ 0,17	12,81 $\pm$ 0,17
32	58,13 $\pm$ 0,73	0,51 $\pm$ 0,03	6,39 $\pm$ 0,02	11,01 $\pm$ 0,06
34	81,98 $\pm$ 0,47	2,98 $\pm$ 0,04	7,40 $\pm$ 0,05	12,86 $\pm$ 0,05
36	77,58 $\pm$ 9,09	2,94 $\pm$ 1,03	7,58 $\pm$ 0,34	13,11 $\pm$ 0,54
38	86,95 $\pm$ 4,37	2,19 $\pm$ 0,45	8,44 $\pm$ 0,05	13,33 $\pm$ 0,19
40	103,98 $\pm$ 0,48	3,00 $\pm$ 0,24	8,51 $\pm$ 0,17	15,60 $\pm$ 1,20
42	105,98 $\pm$ 0,75	2,70 $\pm$ 0,36	9,00 $\pm$ 0,02	14,84 $\pm$ 0,10

Ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación

$$\text{Nps} = 0,008 (E) + 4,9 (r^* = 0,106)$$

$$\text{Npm} = 0,183 (E) + 6,7 (r = 0,542)$$

$$\text{Nps} = 0,041 (P) + 3,8 (r = 0,158)$$

$$\text{Npm} = 0,064 (P) + 7,5 (r = 0,835)$$

* Valor de r para 27 grados de libertad, 0,581 ($P < 0,001$).

Tabla II. *Influencia de la duración de la lactancia sobre las fracciones proteicas del tejido muscular de rata en crecimiento.*

Valores medios $\pm$ error estándar de grupos de seis animales.

Edad (días)		Peso al sacrificio, g	N total mg/g tejido fresco	Nitrógeno proteico extraíble (% de N total)	
destete	sacrificio			sarcoplásmico	miofibrilar
30	30	58,9 $\pm$ 0,68	20,4 $\pm$ 0,15	21,3 $\pm$ 0,11	37,5 $\pm$ 0,16
30	36	87,9 $\pm$ 1,47	31,8 $\pm$ 0,26 (a)	27,2 $\pm$ 0,10 (b)	45,7 $\pm$ 0,29
36	36	80,3 $\pm$ 1,38	31,9 $\pm$ 0,14 (a)	27,0 $\pm$ 0,12 (b)	40,4 $\pm$ 0,43

* Los valores acompañados de la misma letra (a, b) no presentan diferencias estadísticamente significativas, ($P < 0,001$).

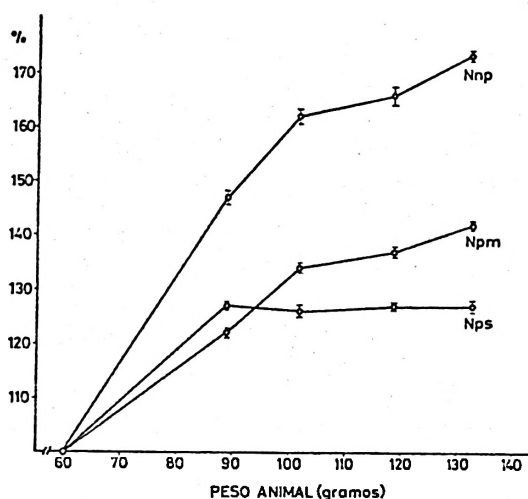


Fig. 1. *Variación de la solubilidad de los nitrógenos proteico sarcoplásmico (Nps), proteico miofibrilar (Npm) y no proteico (Nnp) del tejido muscular de rata con el peso del animal.*

Se toma como referencia (100) los valores correspondientes al final del período de lactancia (30 días de edad y 60 g de peso medio).

miento homogéneo ($2,59 \pm 0,1$ g/día), en los cuatro grupos de animales se han determinado los gramos de proteínas sarcoplásmica, miofibrilar y total, así como de nitrógeno no proteico, contenidos en cada 100 g de músculo fresco de rata, para las cuatro primeras semanas del desarrollo posdestete, durante las cuales la rata llega a superar el doble de su peso inicial (tabla III).

Aunque para el conjunto total de animales que integran esta experiencia también se da correlación estadísticamente significativa, observada ya en la experiencia I, entre el contenido en proteína miofibrilar (Pm) y el peso del animal (p), con un coeficiente $r:0,991$, sin embargo, hay que resaltar el cambio que experimenta la pendiente de la recta que define la relación entre Pm y p, a partir de los 100 g de peso vivo. Para los animales comprendidos entre los 60 y 100 g de peso medio el coeficiente angular encontrado para la regresión entre proteína miofibrilar y peso es de 0,071, en tanto que para las ratas de peso medio comprendido entre 100 y 130 g es de 0,044.

Estos cambios en el período de crecimiento posdestete se observan con claridad cuando se representa (fig. 1) la variación de la solubilidad de las distintas fracciones nitrogenadas del músculo, tomando como referencia los valores obtenidos para los animales cuando se da por concluido su período de lactancia.

En la gráfica anterior se pone de manifiesto un cierto paralelismo entre las variaciones de los nitrógenos no proteico y miofibrilar del músculo, corroborado por el estudio estadístico de la correlación entre ambos: la ecuación de regresión

$$Npm = 4,22 \times (Nnp) + 3,67$$

con un coeficiente de $r:0,956$, indica una correlación altamente significativa, puesto

Tabla III. *Variación del contenido nitrogenado del tejido muscular (g/100 g de tejido fresco) con el desarrollo y el crecimiento de la rata.*
Valores medios $\pm$ error estándar de grupos de seis animales.

Edad (días)	Peso, g	Nitrógeno no proteico	Proteína total	Proteína sarcoplásmica	Proteína miofibrilar
30	58,8 $\pm$ 1,11	0,16 $\pm$ 0,01	17,3 $\pm$ 0,08	3,9 $\pm$ 0,02	6,9 $\pm$ 0,03
37	88,7 $\pm$ 1,43	0,24 $\pm$ 0,02	18,1 $\pm$ 0,10 (b)	5,3 $\pm$ 0,04 (d)	9,0 $\pm$ 0,08
44	102,2 $\pm$ 0,50	0,28 $\pm$ 0,01 (a)	18,2 $\pm$ 0,19 (b,c)	5,4 $\pm$ 0,05 (d)	10,0 $\pm$ 0,09 (e)
51	118,9 $\pm$ 0,31	0,28 $\pm$ 0,01 (a)	18,8 $\pm$ 0,14 (c)	5,5 $\pm$ 0,04 (d)	10,5 $\pm$ 0,13 (e)
58	133,1 $\pm$ 2,11	0,30 $\pm$ 0,01	19,2 $\pm$ 0,19 (c)	5,6 $\pm$ 0,02 (d)	14,4 $\pm$ 0,09

* Los valores acompañados de la misma letra (a, b, c, d, e) no presentan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$).

que el valor tabulado para los treinta pares de valores experimentales corresponde a 0,571 ($P < 0,001$).

Discusión

La solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares ha sido un parámetro bioquímico usado en ocasiones para caracterizar los cambios proteicos que tienen lugar en el tejido muscular durante el desarrollo de los mamíferos (5). Se ha afirmado que las respuestas bioquímicas y fisiológicas encontradas en estos animales son distintas, cuantitativa y cualitativamente, según la etapa de su desarrollo (4).

En 1948, HERMANN y NICHOLAS (9) estudiaron la variación de las proteínas del tejido muscular de la rata en función de la edad, pero lo inadecuado de la metodología aplicada para la separación de las fracciones proteicas requiere una revisión de los resultados encontrados.

Los trabajos que estudian las variaciones del tejido muscular de los mamíferos (5, 8, 11) suelen relacionar los datos encontrados con la edad; sin embargo, los resultados obtenidos en nuestras experiencias ponen de relieve la preponderancia del estado fisiológico vinculado al peso del animal. Ratas con niveles de crecimiento distintos — lo que equivale a distinto peso con la misma edad — no presentan correlación entre su contenido en

proteína miofibrilar — factor primordial de la estructura muscular — y la edad. En cambio, sí existe una correlación estadísticamente significativa entre proteína miofibrilar y el peso del animal.

Para algunos autores, el papel de la dieta es esencial para el desarrollo de la rata lactante (4), y, según TASKAR y TULPUL (15), los constituyentes proteicos del músculo ofrecen respuestas muy diferentes en función de las condiciones nutritivas a las que haya sido sometido el organismo vivo. En nuestras experiencias, se ha podido comprobar que la duración de la lactancia en la rata origina algunas variaciones en las respuestas de las distintas fracciones nitrogenadas del músculo, aunque los resultados parecen indicar que estas variaciones tienen mayor vinculación con el crecimiento de los animales. La comparación estadística de los valores medios encontrados señala que animales de la misma edad tienen igual solubilidad de proteínas sarcoplásmicas, en tanto que la cantidad extraíble de proteínas miofibrilares está en función del peso alcanzado por el animal en esa edad, cualquiera que sea la duración de la lactancia.

Cuando el nivel de crecimiento para cada animal es homogéneo se observa que, en las sucesivas semanas del desarrollo posdestete, el tejido muscular de la rata en crecimiento experimenta variaciones que son específicas de cada fracción nitrogenada. Así, el contenido nitrogena-

do total del músculo aumenta en la primera semana posdestete para permanecer después prácticamente constante, sin variaciones estadísticamente significativas. La cantidad de proteína total del músculo sigue un cambio paralelo al del nitrógeno total, estando de acuerdo estos resultados con lo indicado hace unos años por RERAT *et al.* (14) para la rata.

Las proteínas sarcoplásmicas solubles aumentan hasta que el animal alcanza los 36 días de edad, para permanecer en este valor sin variaciones estadísticamente significativas. Cambios semejantes han sido señalados para el cerdo (5), pero no para el caso de terneros en los que las proteínas sarcoplásmicas aumentan en una primera etapa, para disminuir posteriormente (11).

En el presente estudio, se ha encontrado un paralelismo en los cambios experimentados por el nitrógeno proteico miofibrilar y el no proteico. Ambos aumentan con el desarrollo y el crecimiento, con un período constante durante la tercera semana; entre ellos existe una correlación estadísticamente significativa, dentro del período de crecimiento estudiado. Estos datos presentan diferencias con los encontrados para otros animales: en el cerdo, la fracción no proteica alcanza pronto un nivel constante y la miofibrilar aumenta con la edad (5), en tanto que para la ternera se han señalado cambios de las proteínas miofibrilares opuestos a los de las sarcoplásmicas (11) e independientes del nitrógeno no proteico.

Al establecer las variaciones estándar vinculadas de modo específico al desarrollo o al crecimiento de la rata hay que resaltar que las proteínas sarcoplásmicas varían en relación con la edad, alcanzando un valor máximo y constante a partir de los 36 días de nacer, en tanto que las variaciones observadas para las miofibrilares y el nitrógeno no proteico son una función del peso del animal. Además, se ha de señalar que a partir de los 100 g de peso vivo, la pendiente de la ecuación

que relaciona contenido proteico miofibrilar con peso vivo experimenta una reducción del 38 %.

Es importante tener en cuenta esta dependencia de las variaciones proteicas musculares con el crecimiento, especialmente cuando se trata de comparar animales que, para la misma edad, presentan variaciones muy acusadas en el peso vivo. Se ha establecido que animales con crecimiento inhibido por ser alimentados con una dieta hipoproteica presentan cambios cualitativos en las proteínas sarcoplásmicas del músculo (15). Como una baja calidad de la proteína de una dieta también se traduce en un reducido incremento de peso, no es de extrañar que las variaciones relacionadas con la alimentación dependan más del peso vivo animal que de su edad.

Agradecimiento

A D. L. M.^a Jáuregui y a D. J. Iriarte, Ayudantes Técnicos de Laboratorio, expresamos nuestro agradecimiento por la colaboración prestada en la realización práctica de este trabajo.

Resumen

Se ha llevado a cabo el estudio de las fracciones nitrogenadas del tejido muscular de rata, aplicando la sistemática establecida por HELLANDER y siguiendo el desarrollo de la rata a lo largo del período de crecimiento posdestete. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que las fracciones nitrogenadas del músculo experimentan cambios vinculados al crecimiento del animal, más significativos cuando se relacionan con el peso que con la edad del mismo. Las proteínas sarcoplásmicas aumentan desde el nacimiento hasta los 37 días de edad, donde alcanzan su valor máximo de 30 % de la proteína muscular. En cambio, las proteínas miofibrilares aumentan de modo progresivo dentro del período de crecimiento, aunque la magnitud de su incremento está en función del peso del animal: entre 60-100 g estas proteínas pasan de ser el 39 al 54 %, mientras que para el intervalo 100-140 g de peso vivo solamente aumenta de 54 hasta 62 % de la proteína total

del tejido. La fracción nitrogenada no proteica del músculo cambia de modo paralelo a las proteínas miofibrilares, encontrándose una correlación estadísticamente significativa entre los contenidos en nitrógeno no proteico y miofibrilar del tejido muscular.

References

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS: En «Official Methods of Analysis» (10.^a edic.). Edit. A.O.A.C., Washington, 1965.
2. BELLO, J., CENARRUZABEITIA, M.^a N. y LARRALDE, J.: *Rev. Nutr. Animal*, **10**, 225, 1972.
3. BELLO, J., CENARRUZABEITIA, M.^a N. y LARRALDE, J.: *Rev. Nutr. Animal*, **10**, 237, 1972.
4. CZAJKA-NARINS, D. M., MILLER, S. A. y BROWNING, A. M.: *J. Nutr.*, **103**, 1608, 1973.
5. DICKERSON, J. W. y WIDDOWSON, E. M.: *Biochem. J.*, **74**, 247, 1960.
6. GILBREATH, R. L. y TROUT, J. R.: *J. Nutr.*, **103**, 1637, 1973.
7. HAHN, P. y KOLDOVSKY, O.: En «Utilization of Nutrients during postnatal development». Pergamon Press Ltd., Oxford, 1966.
8. HELANDER, E.: *Acta Physiol. Scand.*, **41**, Sup. 141, 1957.
9. HERRMANN, H. y NICHOLAS, J. S.: *J. Exp. Zool.*, **107**, 165, 1948.
10. HOWARTH, R. E. y BALDWIN, R. J.: *J. Nutr.*, **101**, 477, 1971.
11. LINK, B. A., CASENS, R. G., KAUFFMAN, R. G. y BRAY, R. W.: *J. Anim. Sci.*, **30**, 10, 1971.
12. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RADALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
13. MCCANCE, R. A. y WIDDOWSON, E. M.: *Quart. J. Exp. Physiol.*, **41**, 1, 1956.
14. RERAT, A., FEVRIER, C. y HENRY, Y.: *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **4**, 35, 1964.
15. TASKAR, K. y TULPUL, P. G.: *Biochem. J.*, **92**, 391, 1964.
16. YAMAGUCHI, M. y KANDATSU, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1372, 1967.

