

# Desequilibrio de aminoácidos y "maduración química" en la rata

J. C. SANAHUJA Y M. E. RÍO<sup>1</sup>

Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental.  
Facultad de Farmacia y Bioquímica.  
Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

## RESUMEN

Estudios relacionados a los efectos producidos por las proteínas desequilibradas en su composición de aminoácidos han demostrado que su ingestión "ad libitum" por la rata en crecimiento produce cambios en la composición corporal y alteraciones en el proceso de la "maduración química".

La evolución de la relación de incrementos de edad (RIE), definida como el cociente entre los cambios producidos en la edad aparente —calculada a partir de la relación N/H<sub>2</sub>O % contenidos en la carcasa— y los cambios en la edad cronológica, se halla muy distorsionada en los animales que ingieren proteínas desequilibradas desde el destete y a lo largo de un período experimental que cubre hasta la edad adulta.

Mientras que animales controles que consumen una cantidad muy baja de una proteína equilibrada, o aun aquellos que ingieren una dieta libre de proteínas, mantienen un RIE alrededor de 1.0 a lo largo del período experimental, los que ingieren dietas desequilibradas sufren una regresión en los valores de la relación N/H<sub>2</sub>O % y como consecuencia tienen un RIE negativo hasta aproximadamente 45 días de vida. A medida que los animales crecen, el efecto del desequilibrio disminuye y el RIE se hace positivo, estabilizándose después de los 50 días, alcanzando un valor de 0.9 aproximadamente a los 3 meses de vida.

La disminución del RIE se refleja también en la disminución de la excreción de creatinina por kg de peso corporal. La mayor ganancia de peso de los animales desequilibrados con respecto a los controles —que ingieren una baja cantidad de proteína equilibrada— puede ser debida tanto a un mayor contenido de agua tisular como a un incremento en la síntesis de tejido conectivo. Una relación incrementada proteína colágeno/proteína total sería indicadora de una síntesis de proteínas tisulares alterada, con

<sup>1</sup> Miembro de la carrera de Investigador Científico. CNICYT, Argentina.  
Recibido: 23-8-1971

una mayor movilización de los aminoácidos no utilizables, hacia la síntesis de colágeno.

Estos fenómenos parecen guardar una relación más estrecha con la cantidad absoluta de aminoácidos presentes en la dieta no utilizables para la síntesis, que con la relación proteína completa/proteína total de la misma.

Cuando el período de crecimiento activo se supera y los requerimientos de aminoácidos especiales disminuyen, la proporción de proteína completa/proteína total de la dieta se incrementa en la misma proporción en que disminuye el déficit del aminoácido limitante; la disminución de los efectos del desequilibrio observados, a medida que avanza la edad cronológica, guardaría relación con ese fenómeno.

Los procesos adaptativos a la ingestión prolongada de proteínas desequilibradas abarcan otros trastornos metabólicos además de la alteración de la relación N/H<sub>2</sub>O. Cambios en la distribución de los electrolitos tisulares, pérdida de potasio cerebral y cambios en la actividad de algunas enzimas adaptativas aparecen como efectos específicos del desequilibrio, lo cual indicaría que la "maduración bioquímica" también se halla afectada por él mismo.

La homeostasis composicional del organismo, que es preservada aun para cantidades sub-óptimas de proteínas alimenticias, está profundamente alterada por el desequilibrio, que desde este punto de vista aparece como mucho más perjudicial que una dieta libre de proteínas.

Estas alteraciones, sólo detectables por análisis apropiados, señalan que los requerimientos proteicos fijados como óptimos para los niños deberían ser revisados para aquellos casos en que por cualquier causa —entre las cuales las socioeconómicas pueden ser de importancia— aquéllos deben ser cubiertos con proteínas de bajo valor biológico.

## INTRODUCCION

Es un hecho conocido que para rendir un óptimo de aprovechamiento las proteínas alimenticias deben tener una composición de aminoácidos esenciales que guardan entre sí una proporción adecuada, proporción que resulta tan o más importante que las cantidades totales de los aminoácidos (1). El valor biológico de las proteínas no es absoluto y varía de acuerdo con la edad y el estado fisiológico del individuo, pues los requerimientos de aminoácidos individuales dependen en cada caso de la composición media de la proteína de recambio y de las necesidades impuestas por el crecimiento. Esos factores son los que determinan las proporciones óptimas en que deben encontrarse los aminoácidos en las proteínas alimenticias para asegurar su máximo aprovechamiento (2, 3).

Cuando el contenido de un aminoácido esencial se halla por debajo de su porcentaje óptimo, el valor biológico de esa proteína disminuye; teóricamente, pues bastaría incrementar

la cantidad de proteína ingerida para cubrir los requerimientos del aminoácido deficitario. Sin embargo, puede comprobarse en la rata en crecimiento que cuando el aminoácido limitante se halla en un déficit considerable y se aumenta la cantidad de proteína de la dieta hasta cubrir su requerimiento aparecen una serie de trastornos metabólicos de características bien definidas que en sus manifestaciones generales pueden asimilarse al cuadro producido por la ingestión de dietas experimentalmente desequilibradas en sus aminoácidos (4). Munaver y Harper (5) describieron el fenómeno producido como un "incremento aparente" en el requerimiento del aminoácido limitante; Donoso y Tagle (6) demostraron que el comportamiento de dietas de caseína y gluten de trigo a idéntico nivel de 7 NDp Cal % difería en algunos aspectos nutricionalmente importantes sólo explicables en función de la desproporción de aminoácidos aportado por la dieta de gluten. De hecho, las proteínas de Valor Biológico inferior a 50 presentan una distorsión de las relaciones entre los aminoácidos esenciales con respecto al limitante, similares a las producidas por el agregado de mezclas sintéticas carentes de un aminoácido esencial (7).

Éstos trastornos metabólicos se manifiestan aun sin necesidad de incrementar la cantidad de proteína hasta el nivel en que los requerimientos del aminoácido limitante de la misma se cubran totalmente; basta a veces un aporte del 50% y en algunos casos de sólo el 25% del requerimiento para que aparezcan algunos de tales trastornos (4).

Lo dicho puede ejemplificarse claramente si se toma como referencia el requerimiento de lisina para la rata en crecimiento. Rama Rao y col. (8) establecieron que ésta necesita 0.9 g de lisina por 100 g de dieta; si se reduce el aporte total de lisina a 0.4% en la dieta, y ese aporte se hace bajo la forma de una proteína de elevado valor biológico, equilibrada en su composición de aminoácidos, tal el caso de la proteína total del huevo, el comportamiento fisiológico de los animales que ingieren esa dieta diferirá en muchos aspectos nutricionalmente importantes del de otros que reciban la misma cantidad de ese aminoácido, como limitante de una proteína de bajo valor biológico.

En el primer caso la dieta contiene un bajo porcentaje de proteínas, pero ésta es completamente utilizable para la sín-

tesis; en el segundo caso la cantidad de "proteína completa", limitada por lisina, sigue siendo la misma (9), pero la cantidad total de proteína es mayor: como consecuencia, el animal ingiere un excedente de aminoácidos no utilizables para procesos anabólicos. De hecho, este excedente se comporta biológicamente de modo similar a las mezclas de aminoácidos sintéticos carentes de un aminoácido esencial descriptas por Harper (7).

Nosotros hemos ensayado este tipo de dietas en ratas en crecimiento: la composición de las mismas, así como el procedimiento experimental, se han detallado en otros trabajos ya publicados (10).

La primera anomalía que se manifiesta en relación con la ingestión de esas dietas por animales en estado de depleción proteica es una alteración característica en el ritmo de consumo; en la Fig. 1 pueden observarse las típicas curvas de consumo obtenidas con dietas cuyo nivel de lisina es el mismo, pero que difieren en su contenido total de aminoácidos.

Las curvas de consumo de las ratas que ingieren la proteína equilibrada son continuas, mientras que las obtenidas con las dietas desequilibradas presentan una "meseta de anorexia" que les confiere un aspecto característico.

Si estas dietas desequilibradas son ingeridas por animales recién destetados, por períodos prolongados, el comportamiento biológico de éstos se aleja del normal en algunos aspectos muy significativos, especialmente en aquellos relacionados a los procesos de maduración tisular (11).

## PROTEINAS DESEQUILIBRADAS Y MADURACION TISULAR

Es sabido que el crecimiento va acompañado de un proceso de maduración de los tejidos; el contenido porcentual de proteínas del animal recién nacido es inferior al del adulto y ese proceso de "incremento nitrogenado", sinónimo de "maduración tisular", puede seguirse en la rata a través de la modificación de la relación  $N/H_2O$  de la carcasa, valor que guarda una relación matemática con la edad cronológica (12).

Existe, pues, para cada edad cronológica del animal una "edad de maduración" que en el caso ideal se corresponden exactamente. Aun cantidades relativamente pequeñas de pro-

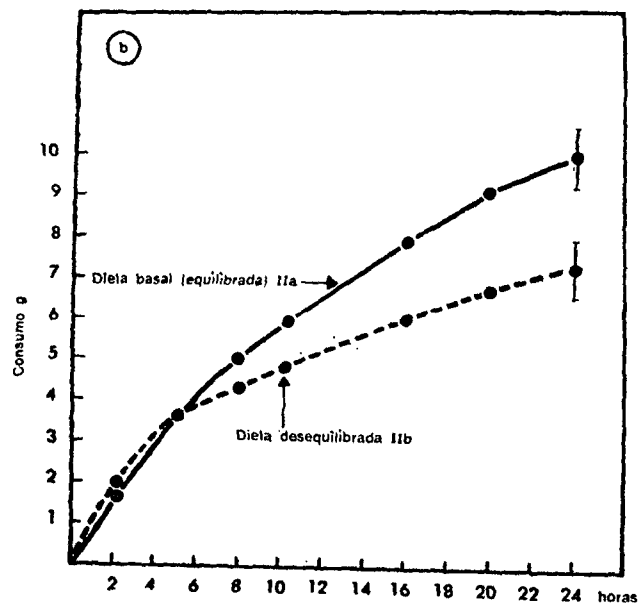
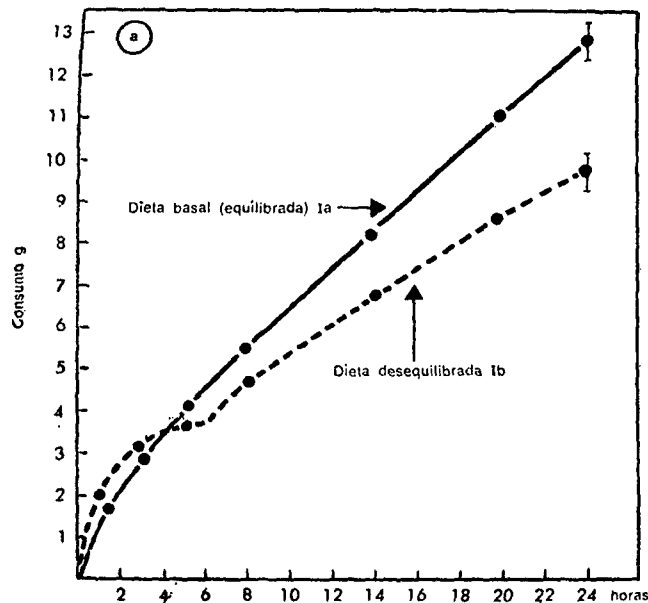


Figura 1

Curvas de consumo em 24 horas, de ratas previamente colocadas em depleção proteínica.

(a) Dieta basal (equilibrada) Ia: Huevo en polvo desengrasado, suplementado con lisina 6.2%. Dieta desequilibrada Ib: Huevo en polvo desengrasado 6.2% + gluten de trigo 16%. Proteína completa en ambas 4.40%.

(b) Dieta basal (equilibrada) IIa: Huevo en polvo desengrasado 5.8%. Dieta desequilibrada IIb: Huevo en polvo desengrasado 3% + gluten de trigo 9.0%. Proteína completa en ambas 2.20%.

TABLA 1

VALORES DE LA RELACION N/H<sub>2</sub>O EN LA RATA, DURANTE LA INGESTION DE DIETAS EQUILIBRADAS Y DESEQUILIBRADAS DURANTE UN PERIODO EXPERIMENTAL DE 90 DIAS A PARTIR DEL DESTETE

	Número de ratas	Edad Cronológica				
		Días				
		<u>24</u>	<u>40</u>	<u>45</u>	<u>50</u>	<u>90</u>
Relación N/H <sub>2</sub> O% <sup>1</sup> Valores normales <sup>1</sup>	-	3.40	4.03	4.26	4.50	4.68
Valores de la Relación N/H <sub>2</sub> O% <sup>2</sup> con la dieta basal (equilibrada) Ia <sup>3</sup>	6	-	3.90 ± 0.20	4.30 ± 0.08	4.50 ± 0.09	4.50 ± 0.19
Valores de la Relación N/H <sub>2</sub> O% <sup>2</sup> con la dieta desequilibrada Ib <sup>3</sup>	6		2.80 ± 0.20 <sup>4</sup>	3.10 ± 0.20 <sup>4</sup>	3.49 ± 0.16 <sup>4</sup>	3.95 ± 0.08

1. Calculados de acuerdo a:  $N/H_2O = 2.15 - 0.047 \times (12)$ .
2. Adaptado de M. E. Río (4).
3. Composición de las dietas - Ver Figura 1.
4. Diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ) con el grupo alimentado con la dieta basal (equilibrada) correspondiente.

teínas equilibradas —4.4% de proteínas de huevo— mantienen esa correspondencia de valores mientras que cantidades elevadas de proteínas desequilibradas que aportan la misma cantidad de “proteína completa” que las equilibradas a expensas de un incremento en el contenido total de proteína, causan profundas modificaciones de la relación N/H<sub>2</sub>O de modo tal que los valores de la “edad de maduración” calculada a partir de ésta y de la edad cronológica difieren considerablemente (Tabla 1), configurando aquélla una “edad aparente” inferior a esta última. El valor porcentual de la relación entre ambas lo denominamos “índice de maduración”.

Los animales que consumen 4.4% de proteínas equilibradas en la dieta mantienen una relación lineal entre ambas de tal modo que a cada incremento de la edad cronológica corresponde un incremento equivalente de la edad de maduración; la pendiente que resulta de representar al incremento de ésta en función de aquella “relación de incrementos de edad” (RIE) tiene un valor de 1.0 (dieta Ia) (Fig. 2).

Si se ingieren en cambio proteínas desequilibradas que tienen un considerable excedente de aminoácidos no utilizables para la síntesis proteica, la representación de la relación de los incrementos tiene pendiente negativa como consecuencia del valor disminuido de la relación N/H<sub>2</sub>O (dieta Ib).

El nivel de proteína de la dieta puede ser aun de sólo 2.2% de proteína completa (dieta IIa) y la pendiente que representa los incrementos de ambas edades sigue teniendo signo positivo, aunque aparece retardada con respecto al valor ideal; en cambio, la dieta desequilibrada que contiene el mismo nivel de “proteína completa” (dieta IIb) origina un RIE también negativo.

Sin embargo, como puede observarse en la Figura 2, esta regresión es menor que la de la dieta desequilibrada que contiene el doble de “proteína completa” (dieta IIb), pese a que en ambos casos la relación proteína completa/proteína total es aproximadamente la misma.

Es decir que las proteínas desequilibradas producen un retardo en la maduración tisular al disminuir la relación N/H<sub>2</sub>O, retardo que guarda relación con el excedente absoluto de aminoácidos no utilizables (11).

En la Fig. 3 se representa gráficamente la evolución del incremento durante un período experimental de 66 días. El

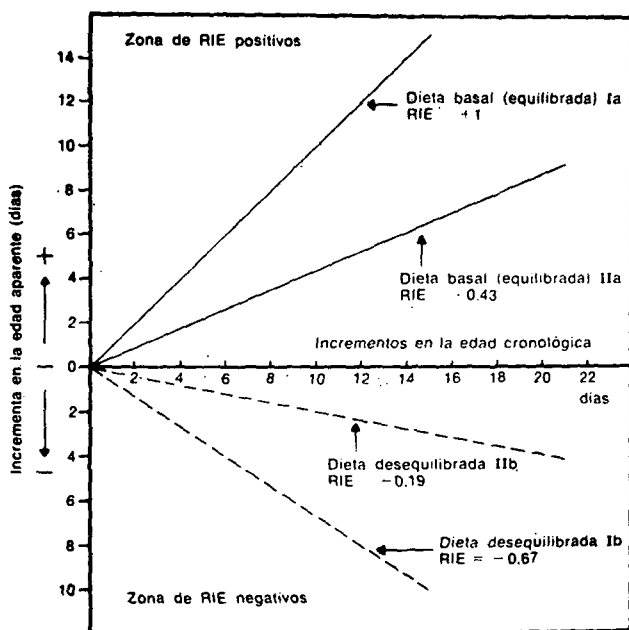


Figura 2

Variaciones de los valores del RIE (relación de incrementos de edad) en ratas alimentadas con dietas equilibradas y desequilibradas, desde el destete (día 0 en la figura).

Dietas 1a y 1b: 14 días de experiencia.

Dietas 1Ia y 1Ib: 21 días de experiencia.

Composición de las dietas - Ver figura 1.

"Proteína completa"/Proteína total

dieta 1b = 19.6%

dieta 1Ib = 18.3%

gráfico en total abarca un período de 90 días en la vida del animal, desde el nacimiento a la edad adulta.

Cuando la relación de los incrementos de ambas edades es 1.0 significa que existe una correspondencia perfecta entre ambas; un valor de 0 correspondería teóricamente a aquellos animales cuya edad de maduración permaneciera estacionaria en el transcurso de la experiencia. Todos los valores que se hallan por debajo de 0 representan "retrocesos" en el grado de maduración, con respecto al valor inicial; por el contrario, los valores que se hallan por encima de la línea de base corresponden a incrementos positivos de la edad de maduración. Las barras representan los valores analíticos para un día dado, y la línea puntuada es un intento de graficar la evolución del proceso a lo largo del período experimental.

Es obvio que durante el período de lactancia los animales mantienen una relación N/H<sub>2</sub>O óptima, siendo en consecuencia el RIE igual a 1; los animales que al destete recibieron la dieta equilibrada, con 4.4% de proteína de huevo, mantienen valores para el coeficiente que oscilan alrededor de 1 a pesar del bajo contenido de proteínas de la dieta. Por el contrario, los animales que ingieren la proteína desequilibrada acusan una brusca disminución de su relación N/H<sub>2</sub>O, es decir, se manifiesta un aparente "rejuvenecimiento" de sus tejidos. La ingestión continuada de las dietas por períodos prolongados más allá de los 15 días origina un fenómeno de adaptación, ya que, a medida que se avanza en la edad cronológica (45 días), el fenómeno de "regresión" disminuye (40 días) y es reemplazado a los 50 días por un "retardo" con respecto a los valores iniciales. El valor del RIE tiende a la estabilización a partir de ese momento y hasta los 90 días, edad en que los animales pueden considerarse adultos. Esta estabilización se produce por debajo del valor ideal en forma tal que permite predecir que éste nunca será alcanzado.

La reducción de la masa muscular relativa de los animales como consecuencia de la ingestión de dietas desequilibradas se exterioriza, además de la disminución de la relación N/H<sub>2</sub>O,

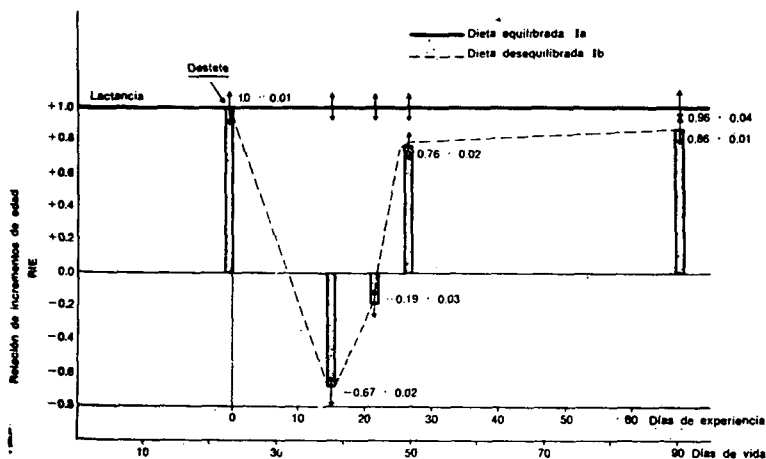


Figura 3

Modificaciones del valor de la relación de incrementos de edad (RIE) (cambios en edad aparente/cambios en edad cronológica) en ratas alimentadas con una dieta desequilibrada (1b) y una equilibrada (basal) (1a) desde el destete. Composición de las dietas - Ver figura 1.

a través de una menor excreción de creatinina en 24 horas, cuando se la expresa por kg de peso corporal. Los animales controles mantienen a lo largo de los primeros 15 días de experiencia una eliminación media de creatinina de 37.0 mg/kg de peso corporal. Los desequilibrados, en cambio, eliminan en ese período 19.0 mg/kg de peso (4). Este hecho es especialmente significativo si se considera que el aumento de peso es mayor en los animales desequilibrados, los que, sin embargo, no fueron capaces de utilizar la proteína ingerida para una correcta maduración de sus tejidos. El aumento de peso está en este caso asociado a un incremento del agua corporal, así como a una síntesis incrementada de tejido conectivo, ya que tanto las relaciones N/H<sub>2</sub>O como proteína total/proteína de colágeno aparecen en ellos disminuidos significativamente (13). Un hecho similar había sido señalado por Venkatachalam (14) para individuos que ingerían cantidades importantes de proteínas vegetales en su dieta.

Un lote control de animales que a partir del destete consumió dieta libre de proteínas se comportó de modo similar al que consumiera proteínas de huevo; su RIE a través de 40 días de vida, pese a la pérdida de peso, mantuvo el valor de 1 con muy pequeña dispersión de los datos individuales (15). Este hecho demostraría que los animales que mantienen un aporte calórico adecuado consumen su propia proteína corporal, que desde el punto de vista nutricional es óptima para cubrir las demandas de la maduración tisular.

#### INTERPRETACION DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LA INGESTION DE PROTEINAS DESEQUILBRADAS SOBRE EL PROCESO DE "MADURACION TISULAR"

El principio de una "Homeostasis corporal" independiente del medio nutricional enunciado por Weil y Wallace (16) establece que el organismo mantiene una constancia manifiesta en su composición aun en presencia de cantidades sub-óptimas de nutrientes. Este principio, que se cumple aun con la ingestión de cantidades muy bajas de proteínas alimenticias de alto valor biológico y aun para dietas libres de proteínas, carece de validez como se ha visto en el caso de la ingestión de proteínas desequilibradas en sus aminoácidos.

Nuestras experiencias en ratas a lo largo de 90 días de vida

demuestran que la ingestión de proteínas desequilibradas provoca alteraciones en los procesos de maduración tisular con la consiguiente modificación de la composición corporal.

La ingestión de dietas desequilibradas parece provocar en la primera etapa la inversión del proceso normal de maduración, resultando desde este punto de vista más perjudicial que una dieta libre de proteínas, la que es capaz de mantener la evolución del proceso normal a expensas de las propias proteínas corporales del animal. Los animales alimentados con dieta libre de proteínas aparecen fisiológicamente maduros a expensas de una pérdida de peso y evolucionan normalmente mientras que sus músculos son capaces de seguir suministrando aminoácidos al "pool"; los que consumen dietas desequilibradas crecen sin madurar, quizás como resultado de una aparente canalización de los aminoácidos de la dieta hacia la síntesis de proteína del colágeno (13). A medida que los animales envejen (2, 3), por lo cual la proporción relativa de "Proteína completa" de la dieta se va incrementando con respecto al contenido de aminoácidos excedentes: aumenta así el valor biológico de la proteína desequilibrada al mismo tiempo que se atenúa el grado de desequilibrio con la disminución del requerimiento para el aminoácido limitante, lo cual produce la involución del cuadro inicial a una forma crónica que representa las características de un "síndrome de adaptación".

Sin embargo, no resulta tan simple explicar los efectos del desequilibrio en base a la proporción de "proteína completa" con respecto a la total de la dieta; dietas con la misma, o muy aproximada, relación "proteína completa"/proteína total producen distintos grados de regresión (Figura 2), hecho que hace recaer la atención especialmente en el contenido total de aminoácidos excedentes. La sobrecarga de aminoácidos no utilizables para síntesis proteínica, en valor absoluto, sería el factor determinante de las alteraciones producidas independientemente del porcentaje de "Proteína completa" de la dieta. A mayor sobrecarga, mayores alteraciones aun con mayor contenido de proteína utilizable parecería ser la ley general, al menos por encima de excedentes que sobrepasan un cierto valor crítico cuya magnitud sería de importancia determinar (4).

Una serie de trastornos metabólicos relacionados a la evolución del proceso normal de maduración señalan los puntos

claves al nivel de los cuales los efectos del aporte exagerado de aminoácidos se manifiestan con mayor intensidad: alteraciones en la distribución del agua y los electrolitos tisulares (17), disminución del contenido de potasio cerebral (18) y alteraciones de la actividad de algunos sistemas enzimáticos evolutivos —fenilalanina hidroxilasa, fosfatasa alcalina— (19) demostrarían que aun después de largos períodos experimentales que llegan hasta la edad adulta, los efectos de la ingestión de proteínas desequilibradas se sigue manifestando más allá de los ya bien conocidos sobre la “maduración química” cuya magnitud e importancia no se hallan aún establecidas.

La importancia de estos hechos en relación a los cuadros de malnutrición humana, especialmente en la infancia, merece una atención particular; los disturbios metabólicos, en la mayor parte de los casos sólo detectables a través de análisis cuidadosos y especializados, producidos por la ingestión de proteínas que aportan aminoácidos no utilizables, deberían tenerse en cuenta para una reconsideración de los valores establecidos como requerimientos proteicos óptimos, especialmente cuando las condiciones socio-económicas determinan que sean cubiertos fundamentalmente a expensas de proteínas de bajo valor biológico.

#### SUMMARY

##### Amino acid imbalance and “Chemical maturity” in rats

Nutritional studies concerning the effect of amino acid imbalance on body composition have shown that the normal process of “Chemical maturity” was altered when rats were fed natural imbalanced diets “ad libitum”.

The values for the “age increments ratio” (AIR), defined as the ratio between the changes on the “apparent age” —calculated from the carcass content of nitrogen per cent of water— and the changes in the “chronological age”, were markedly modified in imbalanced animals throughout a long term experiment.

Rats fed control diets at a low level of “complete protein”, or protein-free diets, have a close correlation between chronological and apparent age, being their AIR about 1.0 throughout the experimental period. On the contrary rats fed imbalanced diets from weaning suffers a regression in the apparent age, as a consequence of a decrease in the  $N/H_2O\%$  ratio values, thus becoming their AIR negative in value.

As animals grow the effect of imbalanced diets diminished and the AIR turns to a positive value. From the 50 days of life the  $N/H_2O$  ratio tends to be stabilized at values lower than normal, reaching the AIR a figure of

0.9 at about 3 months of life.

The decrease in the AIR is also reflected by a low creatinine excretion, when expressed by kg of body weight. However imbalanced animals gain more weight than those fed small quantities of high biological value proteins as a consequence of a high water content of tissues. This fact also correlates with a higher ratio of collagen protein to total body protein, indicating that rats fed amino acid imbalanced diets have an impairment in their tissue protein synthesis and would vehiculize the excess of amino acids to collagen protein synthesis.

When the "active growth" period is exceeded and the requirements of the limiting amino acid decreased, the relative proportion of "complete protein" to "total protein" in the diet is increased; this fact results in a slightness of the imbalance effects, which however can not be only explained on the basis of that ratio.

The adaptative process through long feeding of natural imbalanced diets involves some biochemical disturbances other than changes in the N/H<sub>2</sub>O ratio: tissue electrolites distribution, brain potassium loss and changes in adaptative enzymes are some specific effects of amino acid imbalance which indicate that "biochemical maturity" is also affected.

The compositional homeostasis of body, which is preserved even for sub-optimal quantities of dietary protein, is profoundly altered by an imbalance. From this point of view, an imbalanced protein is worse than a protein free diet.

These alterations, only noticeable when appropriate chemical analysis are applied, emphasize the need to adjust protein requirements of children when the socio-economic conditions impose covering them with proteins of low biological value.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) Allison, J. B.—The nutritive value of dietary proteins, in: *Mammalian protein metabolism*, Vol. II, Ed. H. N. Munro and J. B. Allison. Academic Press, N. Y. London, pág. 76, 1964.
- (2) Henry, K. M. & S. K. Kon.—Effect of level of protein intake and of age of rat on the biological value of proteins. *Brit. J. Nutrition*, 11: 305-313, 1957.
- (3) Arroyave, G.—Consideraciones sobre requerimientos de proteínas y de aminoácidos. Conferencia sobre recursos proteínicos en la América Latina, INCAP, Guatemala. 24-27 de febrero, 1970.
- (4) Río, M. E.—Estudio experimental de los efectos producidos por la ingestión de dietas desequilibradas en aminoácidos: su interpretación bioquímica. Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica. Universidad de Buencs Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica, 1969.
- (5) Munaver, S. M. & A. E. Harper.—Amino acid balance and imbalance. II. Dietary level of protein and lysine requirements. *J. Nutrition*, 69: 58-64, 1959.
- (6) Tagle, M. E. & G. Donoso.—Long term effects of feeding rats on casein and gluten diets at the same protein value. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 17: 295-310, 1967.

- (7) Harper, A. E.—Amino acid toxicities and imbalances, in: Allison, J. B., op. cit. 1, p. 100, 1964.
- (8) Rama Rao, P. B., H. W. Norton & B. C. Johnson.—The amino acid composition and nutritive value of proteins: V. Amino Acid requirements as a pattern for protein evaluation. *J. Nutrition*, 82: 88-92, 1964.
- (9) Allison, J. B., op. cit. 1, p. 63, 1964.
- (10) Sanahuja, J. C. & M. E. Río.—Effect of imbalanced diets containing natural proteins on appetite and body composition in the rat. *J. Nutrition*, 95: 295-302, 1968.
- (11) Río, M. E., S. J. Closa & J. C. Sanahuja.—Changes in body composition in rats fed natural imbalanced diets. *J. Nutrition*, 100: 69-77, 1970.
- (12) Miller, D. S. & A. E. Bender.—The determination of the net protein utilization of proteins by a shortened method. *Brit. J. Nutr.*, 9: 382-388, 1955.
- (13) Closa, S. J., M. E. Río & J. C. Sanahuja.—Efecto de los desequilibrios entre los aminoácidos de la dieta sobre la composición corporal de la rata en crecimiento. II. Relación proteína colágeno/proteína total, después de la ingestión de dietas naturalmente desequilibradas (Experiencias no publicadas), 1969.
- (14) Venkatchalam, P. S.—Diet and bodily constitution. Ciba Foundation, Study Group N<sup>o</sup> 17. Ed. J. A. Churchill Ltd., London, pág. 114, 1964.
- (15) Farina, R. & J. C. Sanahuja.—Estudio comparativo de la composición corporal de la rata luego de la determinación de la eficacia proteica (PER) o de la utilización proteica neta (NPU) de proteínas alimenticias. I Simposio sobre Proteínas alimenticias, Buenos Aires, 18-21 de mayo, 1970.
- (16) Weil, W. B. Jr. & W. M. Wallace.—The effect of variable food intake on growth and body composition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 110: 380-394, 1963.
- (17) Closa, S. J., M. E. Río & J. C. Sanahuja.—Variaciones en el contenido de sodio y potasio muscular de la rata en crecimiento en relación a la ingestión de proteínas desequilibradas: Estudios de distribución. II. Reunión Científica de S.L.A.N., Viña del Mar, Chile. 2-6 de diciembre, 1970.
- (18) Río, M. E., M. L. de Portela & J. C. Sanahuja.—Las modificaciones en el contenido de potasio y sodio del organismo en relación a la ingestión de proteínas desequilibradas por la rata en crecimiento. II Reunión Científica de S.L.A.N., Viña del Mar, Chile, 2-6 de diciembre, 1970.
- (19) Closa, S. J., M. E. Río & J. C. Sanahuja.—Composición corporal de ratas adultas alimentadas desde el destete con proteínas desequilibradas en sus aminoácidos. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 21: 69-86, 1970.