

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Bases experimentales para desarrollo de un método rápido de evaluación del comportamiento biológico de mezclas proteicas

ROSARIO FARINA¹, MARIA E. RIO² y JUAN C. SANAHUJA

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

RESUMEN

Observaciones experimentales relacionadas a los hábitos de consumo de las ratas en depleción proteica, demostraron que las características de las curvas obtenidas al representar la ingesta en función del tiempo, eran dependientes del grado de equilibrio de los aminoácidos de la proteína de la dieta. En contraposición a las curvas obtenidas con una proteína de Valor Biológico óptimo, los déficits de aminoácidos se manifestaron por la aparición de mesetas de anorexia, de duración variable, lo que les confirió, a las curvas obtenidas con proteínas de diverso valor biológico, un aspecto característico.

Estas modificaciones en el ritmo de consumo se hallan relacionadas a cambios en el cuadro de aminoácidos plasmáticos, en especial a las alteraciones de las relaciones entre el o los aminoácidos limitantes y el nitrógeno aifa-aminico total.

En este trabajo hemos estudiado los efectos de diferentes variables: Valor Biológico, concentración de la proteína, diferentes tipos de suplementación y de agentes con acción sobre el metabolismo proteico en general, o de algún aminoácido en particular, sobre las características de las curvas de consumo obtenidas en condiciones de medio ambiente constante y adecuado.

Se delinean además las posibilidades de desarrollar, sobre la base de estos hechos experimentales, un método rápido de evaluación de la calidad biológica de proteínas, mezclas y concentrados proteicos, así como de detectar los efectos de la presencia de otros constituyentes de la dieta o las modificaciones producidas por procesos tecnológicos.

1. Este trabajo es parte de la Tesis para obtener el grado de Dra. en Bioquímica.

2. Miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET, Argentina.

Recibido: 12-6-73.

INTRODUCCION

Observaciones experimentales relacionadas a los hábitos de consumo de ratas en estado de depleción proteica, demostraron que la curva que se obtiene cuando se representa la cantidad de dieta ingerida, en función del tiempo de consumo en horas, guarda una estrecha relación con el equilibrio de los aminoácidos de la proteína ingerida (1). Proteínas artificialmente desequilibradas por el agregado de mezclas de aminoácidos sintéticos, mezclas de proteínas con un aminoácido limitante común o proteínas naturalmente desequilibradas producen, al ser ingeridas, una curva de consumo anormal cuando se la determina en forma seriada por un período experimental de 24 horas (2). Las curvas se diferencian de las normales fundamentalmente por presentar un período de anorexia de duración variable después del cual la ingestión se reinicia con un ritmo que puede ser o no similar al de los animales que ingieren una proteína equilibrada tomada como referencia (1-2).

El brusco incremento del consumo después del período de anorexia confiere a las curvas un aspecto característico y diferencial que permite considerarlas como un método rápido de evaluación del grado de equilibrio de los aminoácidos de la dieta. (Fig. 1, 2 y 3).

MATERIAL Y METODOS

Ratas de la cepa Wistar de ambos sexos, con un peso de 60.0 ± 1 g., fueron llevadas a un estado de depleción proteica mediante la ingestión de una dieta libre de proteínas durante 10 días y se las mantuvo luego en ayunas durante 4 horas. Los animales que en esas condiciones perdieron aproximadamente 25% del peso inicial se dividieron en lotes de 6 ratas cada uno, y se les ofrecieron las dietas en estudio "ad libitum" por un período experimental de 24 horas. El período de la ingesta se tomó entre las 12:00 horas de un día y las 12:00 del día siguiente. Al final del período experimental los animales se pesaron y dejaron en ayuno por un período adicional de 4 horas, al final del cual se determinó nuevamente el peso, a fin de establecer la pérdida de peso experimentada en el ayuno.

Durante todo el período experimental los animales dispusieron de agua "ad libitum".

Condiciones ambientales: Los animales fueron alojados individualmente en jaulas suspendidas con piso de malla; la temperatura del vivero se mantuvo en $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y la humedad en el 70-80% mediante el uso alternado de 2 acondicionadores de aire. La iluminación se reguló automáticamente en períodos de 12 horas alternadas de luz y oscuridad.

Curvas de consumo: Las curvas de consumo se determinaron mediante el siguiente procedimiento: un doble recipiente conteniendo la dieta experimental en exceso, se taró en una balanza Mettler, tipo granataria, con una aproximación de 0.1 g. Bajo las jaulas de piso de malla, en las que se hallaban alojadas las ratas, se colocó una bandeja a fin de determinar las posibles pérdidas de dieta producidas durante el período experimental; esto resulta especialmente importante en las dietas de baja calidad, pero no puede descartarse el factor individual que hace que algunos animales vuelquen cantidades considerables aún con dietas de elevada calidad. Periódicamente los potes fueron retirados y pesados, incorporándose al pote la dieta que pudiera hallarse en la bandeja, previo a la pesada del mismo; la dieta consumida se estableció por diferencia.

Las curvas obtenidas en cada lote, si bien presentan valores cuantitativamente diferentes, debido a las variaciones individuales, en todos los casos muestran las mismas inflexiones. Por ello para cada dieta hemos representado una sola curva cuyos valores están dados por la media de los valores observados para cada lote, siendo sus inflexiones las comunes para todos ellos.

Dietas: Las dietas utilizadas variaron con el tipo de proteína en ensayo: Las proteínas aisladas o los concentrados proteicos se incorporaron en cantidades adecuadas a una dieta base, diluyendo con dextrina, de modo que la composición de dichas dietas, es similar a la dieta libre de proteínas utilizada para llevar a los animales al estado de depleción proteica (Cuadro 1) con la única diferencia en el contenido de proteína. Las harinas de Leguminosas, Maíz, etc., se ensayaron directamente o bien se diluyó con dieta base, según el tipo de datos que se pretendía obtener.

CUADRO N° 1
COMPOSICION DE LAS DIETAS

	Dieta base (g%)	Dieta libre de proteínas (g%)	Dietas experiencia
Minerales ¹	10.0	5.0	
Vitaminas hidrosolubles ¹	0.5	0.25	
Clorhidrato de Colina	0.3	0.15	
Aceite ²	10.0	5.0	
Dextrina ³	79.2	89.6	
Dieta base	—	—	50 g
Proteína en estudio	—	—	(4)
Dextrina	—	—	(5)

1. Según Harper, A. E. (3).
2. Conteniendo la mezcla de vitaminas liposolubles (3).
3. Almidón húmedo autoclavado a 121°C 3 horas.
4. x: Cantidad de muestra necesaria para contener la cantidad deseada de proteína.
5. Cantidad para llevar a 100 g de dieta.

CUADRO N° 2
CARACTERISTICAS DE VALOR BIOLÓGICO (V.B.) Y CHEMICAL
SCORE (C.S.) DE LAS PROTEÍNAS USADAS EN EL ESTUDIO

Proteína en la dieta	V.B. ¹	C.S.	
		1º limitante	2º limitante ²
Huevo en polvo desengrasado 4.4% ³	100.0	—	—
Harina de Carne	94.0	94.8 (S)	—
Harina de pescado A	76.8	84.4 (S)	—
Harina de pescado B	77.1	79.2 (S)	—
Caseína	69.3	61.1 (S)	—
Pan + Caseína (23.8%)	70.0	47.5 (S)	84.0 (Ly)
Harina de maíz opaco-2 (8.8%)	76.2	—	—
Harina de girasol	69.5	53.9 (Ly)	—
Harina de porotos (23%)	62.0	43.1 (S)	64.1 (Try)
Harina de lentejas (26.4%)	39.0	23.7 (S)	45.0 (Try)
Harina de maíz común (8.0%)	45.7	—	—
Gluten de trigo	31.0	20.5 (Ly)	65.0 (S)
Soja	—	27.0 (S)	—
Zeína	—	0.0 (Ly)	6.7 (Try)
Harina de sangre	—	17.0 (I. leu)	41.6 (S)

1. NPU/D determinado experimentalmente.
2. En las curvas con 2 períodos de anorexia se calcula el déficit del 2º amino ácido limitante.
3. Concentración de proteína (N x 6.25). Cuando no se señala es 10%.

RESULTADOS

En las Fig. 1, 2 y 3 pueden verse agrupadas las curvas de consumo obtenidas para las diferentes proteínas ensayadas. En cada caso se comparan con la curva obtenida para una dieta de proteína total de huevo al 4.4% tomada como referencia de comportamiento óptimo (1).

Como puede observarse existe una estrecha relación entre los valores de valor biológico y Chemical Score³ y la aparición de anormalidades en las curvas (Cuadro 2). En proteínas con dos aminoácidos limitantes en proporciones cercanas, es característica la presencia de 2 mesetas de anorexia, caso típico de las harinas de leguminosas y de las dietas a base de Zeína.

Efectos de la Concentración de Proteína:

El incremento de la concentración de proteína tiene un efecto de agudización de las características anormales de las curvas, produciéndose un desplazamiento de las mesetas de anorexia, las que aparecen más precozmente cuanto mayor es la concentración de proteínas de la dieta. Sin embargo el consumo total de dieta puede ir incrementándose paralelamente a la concentración de proteína hasta alcanzar un cierto valor crítico en el que tanto la forma de la curva como el consumo total de dieta en 24 horas resultan dramáticamente anormales. El hecho puede ejemplificarse a través del comportamiento de los animales que ingirieron dietas con concentraciones crecientes de gluten de trigo (10, 20, 30 y 40%) (Fig. 4).

Un hecho similar se observa al diluir harinas de leguminosas (Habas y Arvejas) a concentraciones de aproximadamente el 50% de las naturales; las curvas correspondientes a las leguminosas sin diluir presentan 2 puntos de inflexión, correspondientes a los aminoácidos limitantes, Azufrados y Triptofano. Las muestras diluídas presentaron una sola inflexión, correspondiente al 1er. limitante, desplazada en el sentido del retardo para las Habas y la normalización casi total de la curva en el caso de las arvejas (Fig. 5).

3. Determinados experimentalmente en nuestro laboratorio.

CURVAS DE CONSUMO OBTENIDAS CON DIFERENTES PROTEINAS

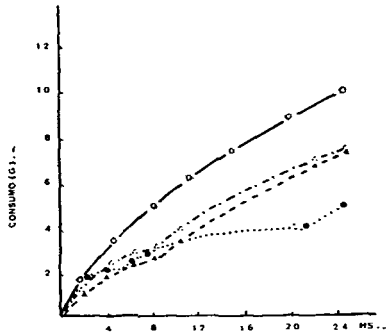


Figura 1

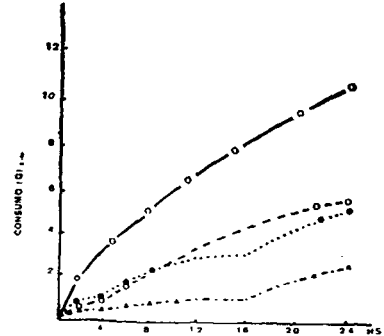


Figura 2

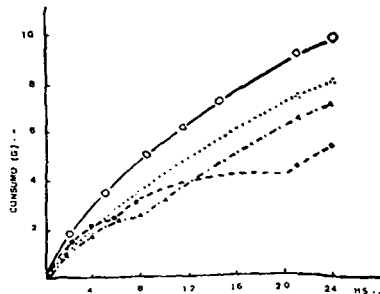


Figura 3

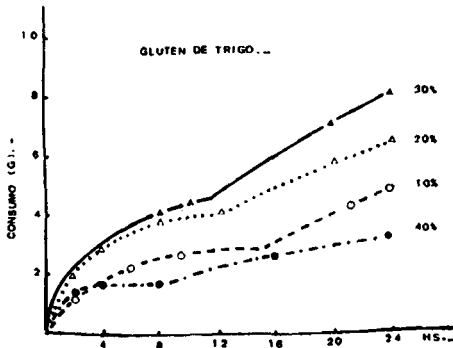


Figura 4

Agudización de las características anormales de la curva de consumo, en función de la concentración de la proteína ensayada.

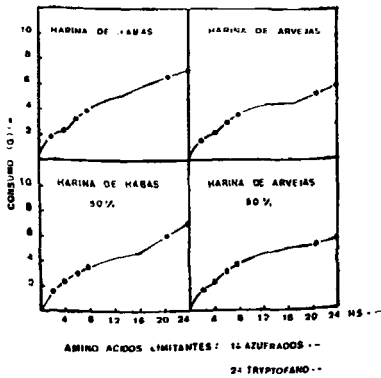


Figura 5

Efecto de la dilución sobre las curvas de consumo de las harinas de Habas y Arvejas.

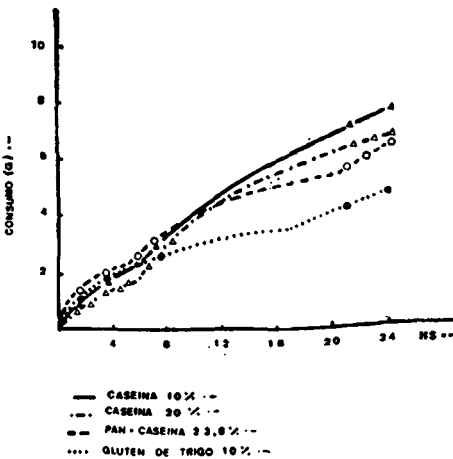


Figura 6

Curvas de consumo de Caseína a dos niveles diferentes de concentración. Efecto que produce el agregado de dicha proteína sobre la harina de Trigo.

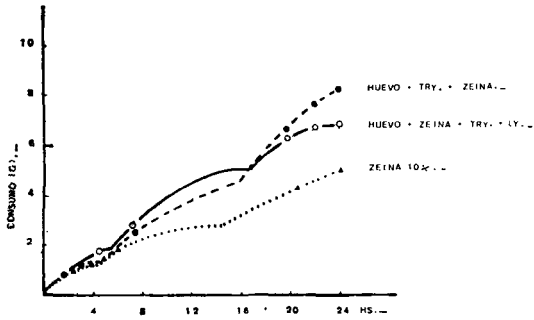


Figura 7

Modificaciones que produce el agregado de proteína de Huevo y aminoácidos sintéticos, sobre la curva de consumo de Zeina.

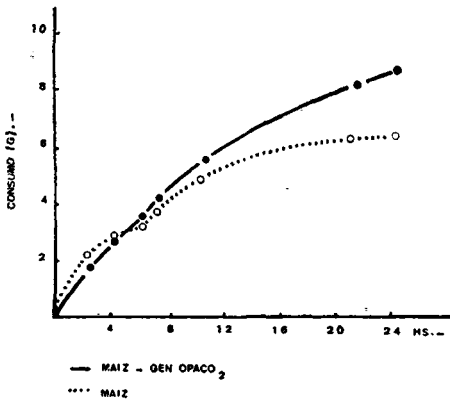


Figura 8

Modificación genética del contenido en Lisina y Triptofano del Maíz y su efecto sobre la curva de consumo.

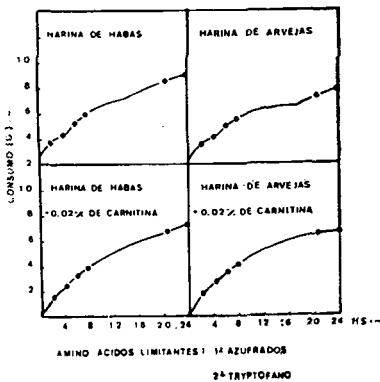


Figura 9

Normalización de las curvas de consumo de Habas y Arvejas por el agregado de Carnitina a la dieta.

Dietas a base de Caseína con concentraciones del 10 y 20% de proteína mostraron un comportamiento similar, obteniéndose una curva más cercana a la normal con la menor concentración (Fig. 6).

Efectos de la suplementación:

Los efectos de la suplementación de harina de Trigo con Caseinato para obtener un pan enriquecido pueden apreciarse en la Fig. 6. El comportamiento de la mezcla es similar al de la Caseína al 20% aunque en la zona final se introduce una segunda inflexión, probablemente debido al déficit residual de lisina.

En la Fig. 7 pueden apreciarse diferentes curvas obtenidas suplementando Zeína con proteína de huevo y con aminoácidos sintéticos; en ningún caso se obtuvo una curva normal observándose como único efecto de la suplementación desplazamientos de los puntos de inflexión, hecho que puede asociarse a la insolubilidad de la Zeína y su diferencia de comportamiento, en cuanto a los fenómenos de absorción, con la proteína del huevo y con los aminoácidos sintéticos.

El caso opuesto se ejemplifica con dos variedades de Maíz, un maíz común y la Variedad Opaco II en la que genéticamente se ha modificado la proporción de Lisina y Triptofano de la proteína. La curva de consumo obtenida con el maíz Opaco II presenta solo ligeras anormalidades con respecto a la curva típicamente desequilibrada obtenida con el maíz común. (Fig. 8).

De modo similar, cuando se hace el ensayo de las leguminosas citadas anteriormente, con el agregado de 0.02% de Carnitina, sustancia que tiene un efecto de ahorro de grupos metilos (4) se observa la normalización de las curvas de consumo (Fig. 9).

DISCUSION

La producción de la meseta de anorexia, y por ende de los puntos de inflexión de las curvas de consumo, se halla relacionada a la distorsión del cuadro de aminoácidos plasmáticos, especialmente a la disminución de la relación del aminoácido limitante, respecto al nitrógeno alfa amínico total (5).

Dado que el cuadro de aminoácidos plasmáticos es función directa de la composición aminoacídica de la proteína de la dieta y de los requerimientos de dichos aminoácidos (6) la aparición de una o más mesetas de anorexia indica el grado de equilibrio de los aminoácidos en la proteína ingerida para la especie en estudio, y por lo tanto su calidad. Este principio ha sido aplicado como método de evaluación de la calidad proteica (6).

La modificación por cualquier medio del cuadro de aminoácidos plasmáticos debería producir la normalización o agudización de dichas anomalías en la curva de consumo. Esta puede realizarse de diferentes maneras entre las cuales mencionamos agregado de aminoácidos a la dieta, administración de drogas (7), acción de los agentes modificadores del metabolismo proteico: Hormonas (Insulina, Cortisol, etc.) (2) (8) y Fluor en altas concentraciones (9).

La respuesta que se observa cuando se inyecta Insulina o Cortisol a los animales en experiencia, es un hecho que demuestra que es el cuadro de aminoácidos plasmáticos el que determina la aparición de las mesetas de anorexia en las curvas de consumo. La administración de dichas hormonas provoca modificaciones en las curvas las que están de acuerdo con las modificaciones producidas en la relación entre el aminoácido limitante y los aminoácidos totales del plasma (2, 8).

El fluor en altas concentraciones en la dieta produce cambios en la composición de aminoácidos plasmáticos y por consiguiente en las curvas de consumo, las que se hacen discontinuas (9). Este fenómeno es el resultado de la acción del fluor sobre determinados sistemas enzimáticos (Fenil alanina hidroxilasa, Serina dehidrasa, etc.) con lo que se deteriora el metabolismo de los aminoácidos involucrados, que desde el punto de vista nutricional, se comportan entonces como deficitarios. Algo similar se observa en las dietas con alto contenido en Selenio; las curvas de consumo de los animales demuestran que la presencia de selenio a partir de 4,5 ppm., hace inefectiva la suplementación con lisina⁴, hecho que concuerda con las observaciones de Jaffé y col. (10).

4. Farina, R., experiencias no publicadas.

El caso del Maíz Opaco II y del efecto de la adición de Carnitina a dietas deficientes en Metionina (7), son ejemplos de modificaciones similares a las que produciría una suplementación altamente eficiente.

CONCLUSIONES

Dada la enorme influencia que los factores propios de la dieta, medio ambiente, etc., juegan en la evolución de las curvas de consumo, es necesario estandarizar perfectamente la metodología de trabajo a fin de obtener el máximo de información en condiciones comparables.

a) Es evidente que el excedente de aminoácidos no utilizables para la síntesis proteica juega un papel preponderante en la aparición de las anomalías de las curvas de consumo; por consiguiente una proteína en distintas concentraciones puede producir curvas diferentes (Ej: Gluten, Caseína, Leguminosas). La obtención de curvas estándares a distintos niveles de proteína puede ser necesaria para evaluar el comportamiento biológico de proteínas naturalmente contenidas en los alimentos.

b) La determinación seriada a varias concentraciones puede ser el método de elección para establecer cual es el "límite de conveniencia" para la utilización de un concentrado proteico.

c) La obtención de una curva "práctica", en contraposición a la curva óptima obtenida para la proteína de huevo, puede marcar el límite de aceptabilidad en cuanto a la calidad de las proteínas de ensayo.

d) Se hace imprescindible un estudio sistemático de proteínas con distintos aminoácidos limitantes para determinar cuál es el déficit del aminoácido en la proteína, que determina la aparición de la meseta de anorexia y que lo relacione con su intensidad. El déficit de los aminoácidos Azufrados parece ser detectado con mayor eficiencia que el déficit de Lisina (70 y 50% respectivamente) aunque en el pan suplementado con Caseinato la aparición de una segunda inflexión se produjo para un Chemical Score de Lisina de 75.7. Resta la posibilidad de que en este último caso el valor de Lisina total no represente la verdadera disponibilidad del aminoácido en el alimento (11).

e) Por último es de suma importancia la elección de una escala adecuada y constante para todas las representaciones a efectuar ya que la ampliación exagerada de la misma puede inducir a error al magnificar las variaciones individuales de los animales del lote.

Teniendo en cuenta todas las variables enunciadas sería posible establecer, sobre la base de las curvas de consumo de los animales en estado de depleción proteica, un método rápido de evaluación del Valor Biológico de proteínas, mezclas o concentrados proteicos, así como de los efectos de suplementaciones naturales o con aminoácidos sintéticos.

SUMMARY

Experimental basis of rapid method for protein quality evaluation

Experimental observations concerning the food intake habits of protein depleted rats have shown that the consumption curve pattern is dependent on the amino acid balance of dietary protein. As compared to curves rendered by a protein of optimal Biological Value, curves obtained with proteins of different quality denote each specific amino acid deficit by an "Anorexia Period", which then gives the curve a characteristic shape.

This typical food intake pattern is related to changes in the pattern of plasma amino acids, especially to those changes involving the ratio of plasma limiting amino acids to total plasma free amino acids.

In this paper we have studied the effects of: Biological Value, protein concentration, supplementation and other factors which affect protein or amino acid metabolism upon the characteristics of curves obtained in a proper and constant environment.

We have also outlined the possible implication of these observations and their use as a basis for the development of a rapid method for protein quality evaluation to be applied to proteins, protein foods and protein concentrates; as well as for the detection of effects produced by other dietary components or of changes produced by technological processing.

BIBLIOGRAFIA

1. Sanahuja, J. C. & M. E. Río. Effect of Imbalanced Diets Containing Natural Proteins on Appetite and Body Composition in the rat. *J. Nutr.* 95: 295-302, 1968.
2. María E. Río. 1969. Estudio Experimental de los efectos producidos por la ingestión de dietas desequilibradas en amino ácidos. Tesis para optar al grado de Dr. en Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
3. Harper, A. E. Amino acid balance and imbalance. I. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.* 68: 405-418, 1959.

4. Khairallah, E. A. & G. Wolf. Growth promoting and lipotropic effect of Carnitine in rats fed diets limited in protein and Methionine. *J. Nutr.* 87: 469-476, 1965.
5. Río, M. E. & J. C. Sanahuja. 1970. Las fluctuaciones de apetito y su relación con las modificaciones del pool de aminoácidos libres. 5º **Con-greso Argentino de Ciencias Biológicas, Buenos Aires, 13-18 de Julio.**
6. Longenecker, J. B. & N. L. Hausse. Relationship between plasma amino acids and composition of ingested protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 84: 44-46, 1959.
7. Daneri, María A. O. de, 1970 Estudio del mecanismo de acción de drogas anabolizantes. **Comunicación personal.**
8. Sanahuja, J. C. & M. E. Río. Effect of hormones on amino acid imbalance in short term experiments. Effect of insulin and cortisol on threonine limited diets. *Nut. Rep. Int.* 3, 101-109, 1971.
9. Portela, M. L. & J. C. Sanahuja. Influence of dietary fluoride on food consumption and plasma amino acids in the rat. *Nut. Rep. Int.* 2: 193-201, 1970.
10. Jaffé, W. G., M. C. de Mondragón, M. Layrisse & A. Ojeda. Síntomas de toxicidad de selenio en ratas. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 22: 467-490, 1972.
11. Carpenter, K. J. & G. M. Ellinger. Protein quality and "available lysine" in animal products. *Poultry. Sci.* 34: 1451, 1955.