ACTA MEDICA, Vol. XXI, Núms. 83-84
julio-diciembre, 1985, pp. 63-71

NUCLEOTIDOS CICLICOS Y ESFUERZO FISICODEPORTIVO

Javier Padilla P. *+
D. Pacheco L. *
Ma. C. Eguía Lis G. *+
F. de la Vega L. *+
J. Licea M. *
L. García G. *+
J. Sánchez R. *

INTRODUCCION

El esfuerzo fisicodeportivo involucra un conjunto de respuestas fisiológicas y bioquímicas que interaccionan con factores que influyen sobre la capacidad para realizarlo.[1] Durante el ejercicio la respuesta biológica conduce a la obtención de energía química (ATP) para convertirla después en energía mecánica. Esto implica disponer de las reservas de energía (ATP, fosfato de cratina, glucógeno y lípidos) y su participación depende de la intensidad y duración del ejercicio.[2 a 17] El metabolismo energético se acompaña de respuesta hormonal donde muchas hormonas actúan a través de 3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) como la adrenocorticotrópica, antidiurética, glucagon, estimulante del tiroides y adrenalina entre otras.[18 a 30] El sistema adenilciclasa [31] y las hormonas que actúan a través de éste, involucran cambios en las concentraciones de AMPc de los líquidos corporales.[32 a 33] Mientras el papel de segundo mensajero del AMPc parece claro, el del sistema de guanilciclasa [31] que produce el 3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) es menos específico, ya que el GMPc parece tener función compleja en la regulación biológica, en que posiblemente la estimulación de la guanilciclasa requiere de moduladores o interacción lipoproteínica capaz de generar cambios celulares del estado estable del GMPc.[31 a 34]

Sin embargo, existen procesos celulares mediados por nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) en los que mientras el AMPc aumenta, el GMPc no cambia o aumenta sin que lo haga el primero. Algunos investigadores han encontrado que el GMPc se asocia con actividad colinérgica y el AMPc al ejercicio y al estress,[35 a 40] pero no existe consenso en el sentido de cómo dichos nucleótidos modifican sus concentraciones y la relación que pudieran tener con el entrenamiento. Por esta razón nos propusimos investigar si los nucléotidos cíclicos tienen relación con el entrenamiento y con el esfuerzo fisicodeportivo. Por lo anterior, es de esperarse que los entrenados tengan mayor concentración de AMPc que de GMPc en estado de reposo relativo respecto de los no entrenados. También cabría esperar que las concentracio-

#Comité Olímpico Mexicano, Subsecretaría del Deporte, Confederación Deportiva Mexicana y Promoción Deportiva del Departamento del Distrito Federal.

*Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto: PCSABNA-020388).

+Becario de la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Academicas (COFAA) del Instituto Politécnico Nacional.

nes de AMPc, no las de GMPc aumenten significativamente después del ejercicio.

MATERIAL Y METODO

Se trabajó con una muestra total de 86 personas del sexo masculino: 23 no entrenados (NOE), 31 jugadores de futbol americano de liga mayor (JFA), 16 maratonistas (M) y 16 atletas de la especialidad de caminata (C), cuyas características y actividad relacionada se muestran en la tabla 1. A todos se les hizo historia medicodeportiva para descartar enfermedad (excepto a los maratonistas, quienes por razones reglamentarias presentaron certificado médico) y se pidió en todos los casos que cuando menos dejaran pasar dos horas después de haber ingerido alimentos; no tomar café, té, chocolate, ni medicamentos con el fin de evitar que interfieran con las determinaciones programadas. Los nucleótidos cíclicos fueron determinados en plasma sanguíneo desproteinizado y/o en orina mediante el método de Steiner y cols.[43] Las curvas de calibración se corrieron por duplicado.

RESULTADO

Al aplicar a los grupos la prueba *t* de Student independiente[44] no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) para la edad, pero sí para el consumo máximo de oxígeno ($\dot{V}O_2$) relativo al peso corporal (ml/kg/min). Al correlacionar este último con los nucleótidos cíclicos, sólo se encontró una correlación pobre con el AMPc urinario previo a una actividad, pero llama la atención que los de mayor $\dot{V}O_2$ tienen cifras

TABLA 1.

Grupos de personas del sexo masculino que realizaron una prueba de esfuerzo [NOE (6), JFA (3), NOE (17) y JFA (28)] en cicloergómetro electrónico, hasta alcanzar la frecuencia cardiaca máxima por el método de Åstrand.[41,42] Los C(5) hicieron un entrenamiento de 8 km, los CM (16) realizaron entrenamiento durante 6 semanas a 2 460 m sobre el nivel del mar y los CB también pero a ≥ 4 300 m sobre el nivel del mar. Los M(16) corrieron el 1er. Maratón Internacional "Ciudad de México" 1983. El consumo de oxígeno fue medido indirectamente por el método de Astrand; (*n*) es el tamaño de la muestra, $\bar{X} \pm$ ds son el promedio más o menos la desviación estándar, S significa plasma sanguíneo desproteinizado y U se refiere a orina.

Grupo	Edad	Años	$\dot{V}O_2$ (ml/kg/min)		
(*n*)	Rango	$\bar{X} \pm$ ds	Rango	$\bar{X} \pm$ ds	Material estudiado
NOE (6)	20-24	23.00 ± 6.32	19.5652-29.1116	26 ± 1.2	S y U
JFA (3)	20-26	22.33 ± 3.21	32.9268-35.0649	34 ± 3.6	S y U
C (5)	23-26	22.66 ± 5.24	34.9465-47.8787	43 ± 2.5	S y U
NOE (17)	17-34	24.00 ± 5.55	19.5652-37.5	29 ± 3	U
JFA (28)	17-30	21.29 ± 4.93	25.3012-31.7221	34 ± 2.7	U
CM (6)	22-37	27.16 ± 6.04	31.8687-50.4299	44 ± 2.5	U
CB (5)	23-26	26.60 ± 5.24	44.7116-49.9846	53 ± 1.75	U
M (16)					U

más bajas de dicho nucleótido (Fig. 1); ello parece hablar en favor de una mayor eficiencia metabólica en los entrenados, ya que los cambios de AMPc urinario después del esfuerzo, también fueron menos intensos en los de caminata (Fig. 2) que en los demás grupos. Las concentraciones de nucleótidos cíclicos en sangre y orina aumentaron en todos los casos después de haber realizado la actividad correspondiente; los aumentos fueron más notorios en el AMPc que en el GMPc; no obstante, al aplicar la prueba *t* de Student para muestras dependientes de dos colas (tabla 2) los aumentos de concentración de AMPc y GMPc resultaron significativos ($p<0.05$) no en todos los casos. Sin embargo, al comparar la concentración urinaria de AMPc entre NOE, JFA, M y C antes de realizar la actividad correspondiente, se encontró que en el grupo C fue significativamente menor ($p<0.05$) (Fig. 3).

DISCUSION

Aunque los aumentos de AMPc no fueron siempre significativos después de cada actividad, existe tendencia a aumentar, pues el metabolismo energético se intensifica durante el esfuerzo y se presume que las hormonas movilizadoras de combustibles que actúan a través de éste pueden ser una de las causas ya que otros factores involucrados son las modificaciones en la diuresis.

No obstante, en las personas que realizaron la prueba de esfuerzo [NOE (6), JFA (3), NOE (17) y JFA (28)] es poco probable que los cambios en la concentración de nucleótidos cíclicos sean debidos a modificaciones en la diuresis; pues aunque el volumen urinario se obtuvo por micción voluntaria máxima y no mediante sonda, la "depuración" así parece indicarlo (Fig. 4). En cambio, en marchistas y sobre todo en los maratonistas, cabría esperar ajustes en la diuresis, pero llama la atención que el AMPc no aumentó como ocurrió con el GMPc. Respecto a los grupos de caminata que se compararon, se observó que el AMPc antes y después de las seis semanas de entrenamiento fue menor en los que entrenaron a 4 300 metros sobre el nivel del mar, sin que el GMPc resultara elevado, lo que parece indicar que es poco probable que los aumentos de AMPc se deban completamente a ajustes en la diuresis y sí a una mayor eficiencia metabólica que parece no asociarse con el GMPc como se esperaba.

TABLA 2

Concentración (pmol/mlurinaria y en plasma sanguíneo desproteinizado (S), de nucleótidos cíclicos en los grupos de los que se mencionan en la tabla 1. El número entre paréntesis es el tamaño de la muestra.

	ANTES			DESPUES					ANTES			DESPUES		
GRUPO	$\bar{X}$	ds	esm	X	ds	esm	t	t	X	ds	esm	$\bar{X}$	ds	esm
			S [AMPc]								S [GMPc]			
NOE (6)	38	18	8	43	21	9	NS	NS	1.60	.45	.2	3.6	2	1
JFA (3)	29	3	2	46	191	10	NS	NS	4.20	1.7	1.2	6.8	2	1.6
C (5)	57	14	6	34	14	6	NS	NS	1.36	.22	.1	1.23	.4	.2
			U [AMPc]								U [GMPc]			
NOE (6)	3170	1671	747	6606	1646	736	S	NS	1063	777	347	1451	424	189
JFA (3)	2556	1441	1019	5116	3218	2276	S	NS	996	159	112	983	62	44
C (5)	2288	196	98	6084	888	4444	S	NS	738	199	95	1124	274	362
NOE (17)	5030	2516	629	5639	2713	678	NS	S	515	355	88	1102	669	167
JFA (28)	4576	1840	354	5731	2674	514	NS	S	730	336	64	918	504	97
CM (6)	2531	837	374	374	1625	726	S	NS	848	202	101	1035	692	309
CB (5)	2318	834	417	417	1302	651	S	NS	708	186	90	538	217	108
M (16)	4437	2979	769	769	5612	1119	S	NS	674	391	93	666	125	93

$\bar{X}$ = media muestral; ds = desviación estándar; esm = error estándar de la media; NS y S = diferencias no significativa y significativa para la prueba; *t*-Student, muestras dependientes, de dos colas.

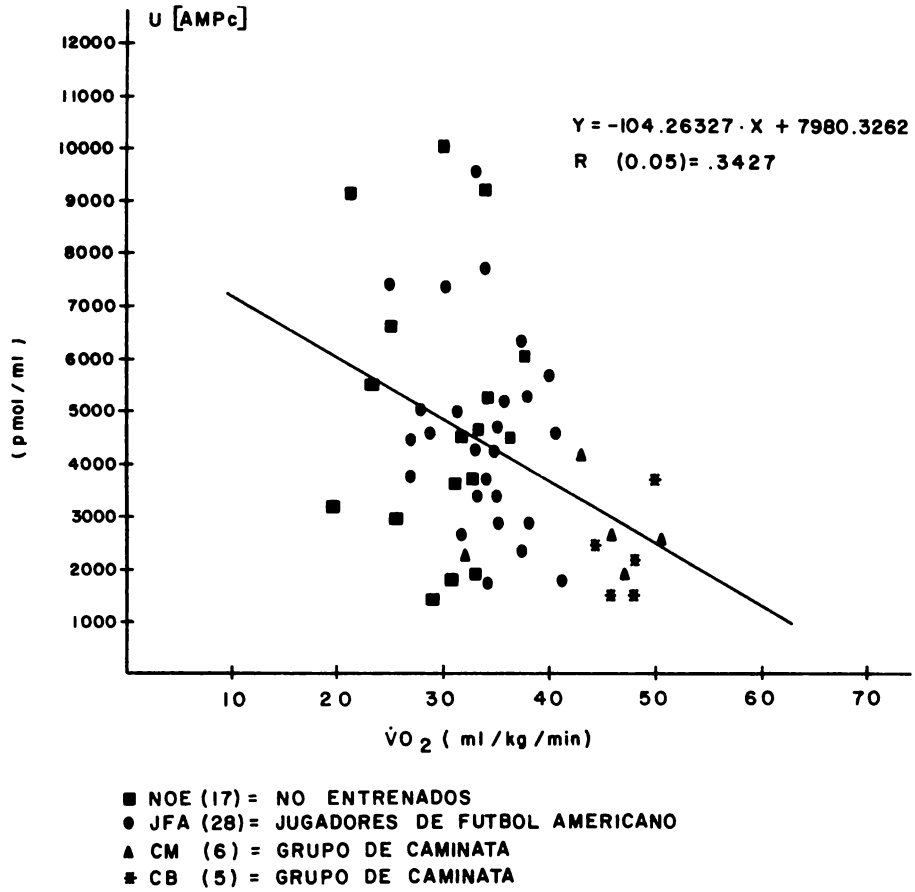


Fig. 1. Correlación y regresión lineal entre consumo de oxígeno y concentración urinaria (U) de AMPc antes de realizar actividad. Nótese que los grupos de caminata de mayor $\dot{V}O_2$ tienen cifras más bajas de dicho nucleótido cíclico.

Las concentraciones urinarias de nucléotidos cíclicos de reposo en no entrenados respecto de los que tienen una especialidad deportiva, muestran que los de caminata con $\dot{V}O_2$ = 48.5 ± 4.13 (ml/kg/min), tienen menor concentración urinaria de AMPc ($p < 0.05$) que los jugadores de futbol americano con $\dot{V}O_2$ = 34 ± 3.6 (ml/kg/min) y que los entrenados con $\dot{V}O_2$ = 26 ± 1.2 (ml/kg/min). En virtud de que en los de mayor consumo de O_2 relativo al peso corporal existe predominio de la actividad colinérgica o parasimpaticotónica durante el estado de reposo (frecuencia cardiaca y tensión arterial desplazadas hacia sus límites inferiores, entre otras) y sus respuestas fisiológica y metabólica al ejercicio no se disparan tan fácilmente durante la realización de éste como ocurre en los que no lo están. Por otro lado, la concentración urinaria de GMPc antes de la actividad de cada grupo no fue diferente desde el punto de vista estadístico entre los grupos, pues parece no existir relación entre los niveles de dicho nucleótido con el grado de entrenamiento como se supuso.

CONCLUSION

Los niveles de AMPc previos a una actividad física en el plasma sanguíneo desproteinizado y la orina de no entrenados, resultaron más elevados que en los que sí lo están, y parece que esto se acentúa conforme más entre-

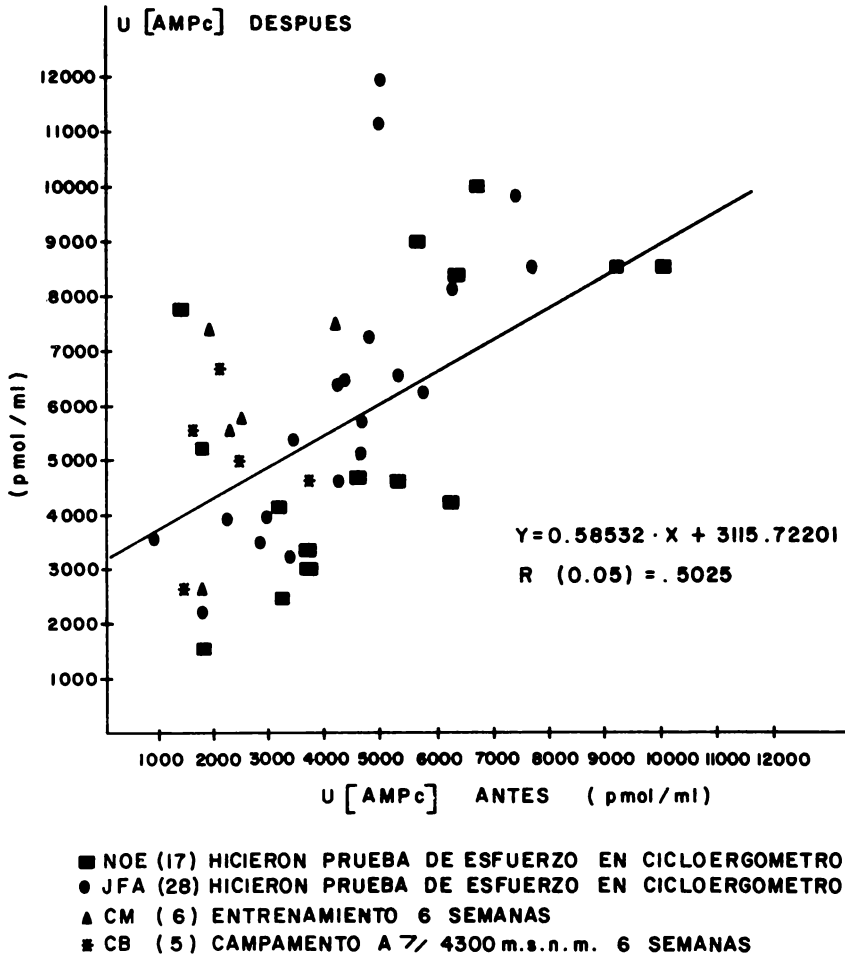
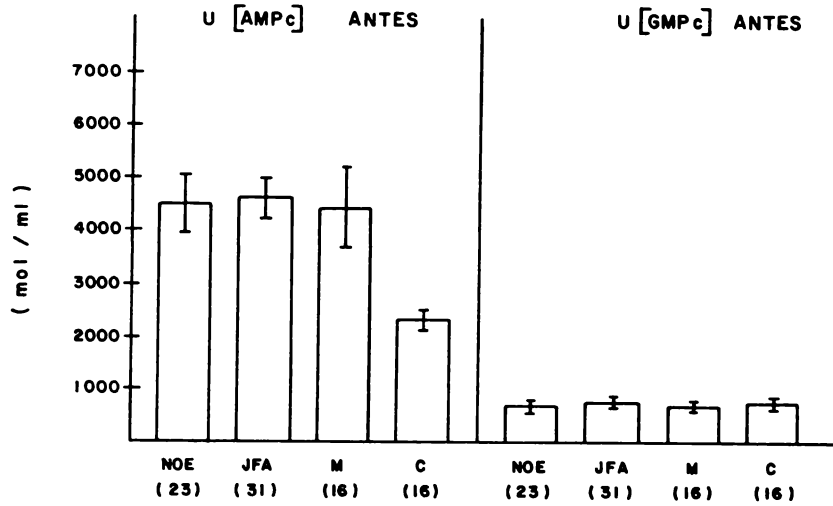


Fig. 2. Correlación y regresión lineal de AMPc urinario (U) antes y después de realizar una prueba de esfuerzo en cicloergómetro electrónico [NOE (17) y JFA (28)], de 6 semanas de entrenamiento de caminata a 2 460 m.s.n.m. [CM (6)] y a una altura de $\geq$ 4 300 m.s.n.m. [CB (5)].

nado es el individuo, ya que probablemente se asocia con actividad adrenérgica. Se esperaba lo contrario para el GMPc pero no ocurrió. En todos los casos se encontró que el AMPc aumentó al término de las actividades en cuestión, pero como el GMPc también aumentó en los grupos que hicieron la prueba de esfuerzo y en los otros no, se deduce que pudo deberse al aumento de la producción de nucleótidos cíclicos más que a modificaciones de la diuresis. Para aclarar estos puntos será necesario hacer estudios de depuración de nucleótidos cíclicos y su correlación con hormonas que actúan a través de AMPc o actividad colinérgica-GMPc. El nivel de AMPc previo a una actividad parece correlacionarse negativamente con el $\dot{V}O_2$ relativo al peso corporal, ya que las concentraciones fueron menores en los más entrenados (grupo caminata) cuyo $\dot{V}O_2$ resultó mayor.

RESUMEN

Debido al papel de segundo mensajero de los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc, sobre el AMPc, se investigó si tienen relación con el esfuerzo físico o con el entrenamiento. Se estudiaron sujetos no entrenados (NOE), jugadores de futbol americano (JFA), marchistas (C, CM y CB) y maratonistas (M) cuyo $\dot{V}O_2$ máximo se determinó indirectamente usando el nomograma de Åstrand y las determinaciones de



NOE = No entrenados
JFA = Jugadores de futbol americano
M = Maratonistas
C = Caminata
E = Entrenados
( ) = Tamaño de la muestra

		JFA	M	C	E(63)		M	C		C
U[AMPc]	NOE	dns	dns	ds	dns	JFA	dns	dns	M	ds
U[GMPc]		dns	dns	dns	dns		dns	dns		dns

dns = Diferencia no significativa ($p > 0.05$)
ds = Diferencia significativa ($p < 0.05$)

Fig. 3.. Concentración de nucleótidos cíclicos excretados en orina (U[AMPc] y U [GMPc]) de atletas. Los valores de p fueron calculados mediante la prueba t - Student, muestras independientes de dos colas.

AMPc y GMPc en plasma sanguíneo desproteinizado (S) y/u orina (U) se hicieron mediante radioinmunoanálisis antes y después de cada actividad. La concentración de AMPc en S o en U de NOE antes de realizar actividad física fue mayor que en los entrenados. En todos los casos se encontró que el AMPc aumentó respecto del estado de reposo, pero el GMPc aumentó en unos grupos y en otros no; las diferencias de concentración de nucleótidos cíclicos no siempre fueron significativas, excepto para el AMPc en el grupo de caminata ($p < 0.05$); probablemente dichos cambios pueden estar relacionados con el metabolismo energético y con el $\dot{V}O_2$ (ml/kg/min) mas que con modificaciones en la diuresis.

SUMMARY

Due to the role of second messenger of the cyclic nucleotides (cAMP and cGMP), specially the cAMP, it was investigated if there is any relation with physical effort or with training. Untrained (UT), football players (FP), walkers (W, WM and WB) and marathonists were studied. The $\dot{V}O_2$ (ml/kg/min) was determined indirectly by the Åstrand method and cAMP and cGMP determinations in blood (S) and/or urine (U) were made by radioimmune assay before and after each activity, the effort test was done in an electronic bicycle ergometer (Åstrand method). UT and FP-exercise test in a bicycle W-walked 8 km; WM-walk training

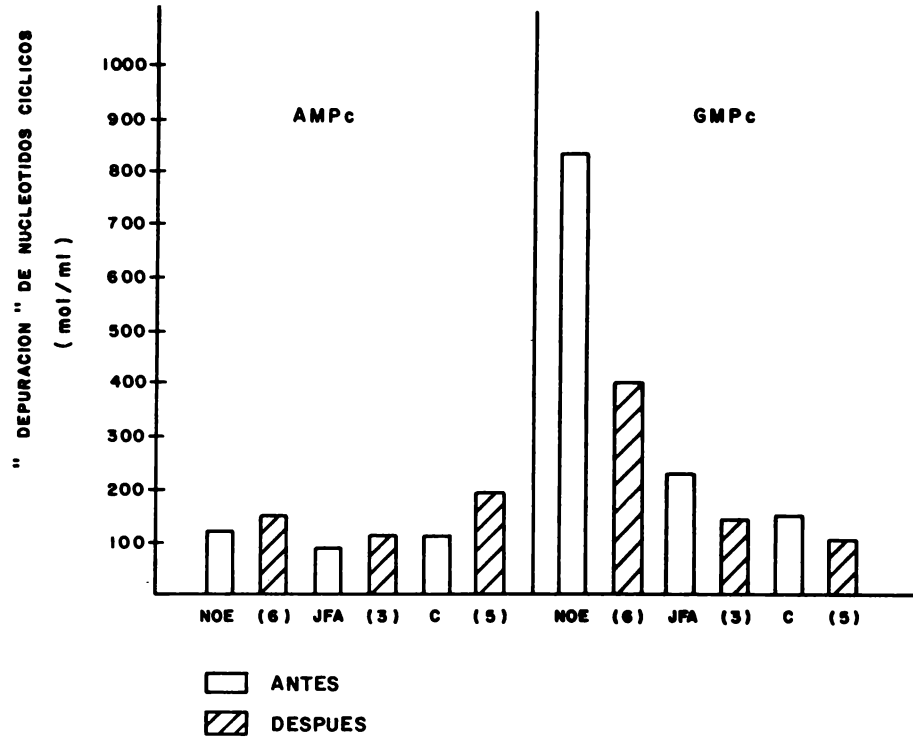


Fig. 4. La gráfica de barras demuestra que la depuración de AMPc fue mayor después, respecto de antes, y vice versa en el caso del GMPc.

$$\text{"Depuración"} = \frac{U\,[NC]\,VU}{S\,[NC]}$$

VU significa micción voluntaria máxima y NC significa nucleótido cíclico en orina (U) o en plasma sanguíneo desproteinado. (S).

program of 6 weeks at 2 400 m altitud; WB walk training program of 6 weeks at 4 300 m altitud and marathonists in the 1st. International Marathon "Mexico City", 1983. The concentration of cAMP in S and U of UT, before, is greather than in the trained. It was found that in some groups the cGMP increases and not in others but differences in concentration of cyclic nucleotides were not significative except for the cAMP in the walkers group ($p<0.05$); since some changes may be related with the energetic metabolism, and probably with the VO_2 (ml/kg/min) rather than due to modification in diuresis.

BIBLIOGRAFIA

1. **Astrand, P.O. y K. Rodahl,** 1977. *Textbook of work physiology.* McGraw-Hill Book Company: 451.
2. **Hultman, E. y H. Sjoholm,** 1982. "Substrate Availability", *International Series of Sport Science.* Vol. 13, 63.
3. **Gollnick, P.D.,** 1977. "Free fatty acid turnover and the availability of Substrates as a limiting factor in prolonged exercise", *Ann. New York Acad. Sci.* **301:** 64-71.
4. **Hultman, E.,** 1971. "Muscle glycogen store and prolonged exercise", *In* E.J. Shephard (Ed.), *Frontiers of Fitness,* Springfield Ill.: C.G. Thomas Publisher, 30.

5. **Hultman, E. y L.H. Nilson,** 1971. "Liver glycogen in man, effect of different diets of muscle exercise", *In* B. Pernow y B. Saltin (Eds.) *Adv. Exp. Med. Biol.:* **11:**143-151.
6. **Saltin, B. y J. Karlsson,** 1971. "Muscle glycogen utilization during work of different intensities", *In* B. Pernow y B. Saltin (Eds.) *Adv. Exp. Biol.:* **11:** 289-300.
7. **Gollnick, P.D., R.B. Asrmstrong, B. Saltin, C.W. Saubert IV, W.L. Sembrowich y R.E. Shepheprd",** 1973. "Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle", *J. Appl. Physiol.:* **34:**107-111.
8. **Gollnick P.D., R.B. Armstrong, W.L. Sembrowich, R.E. Shepheprd y B. Saltin,** 1973. "Glycogen depletion pattern in human skeletal muscle fibers after heavy exercise", *J. Appl. Physiol.* **34,** 615-168.
9. **Gollnick, P.O. y B. Saltin,** 1982. "Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training", *Clin Physiol,* **2:** 1-12.
10. **Hermansen L., E. Hultman y B. Saltin,** 1967. "Muscle glycogen during prolonged severe exercise", *Acta Physiol. Scand.* **71,** 1929-1939.
11. **Karlsson, J., L. -O. Nordesjo y B. Saltin,** 1973. "Muscle lactate, ATP, and CP levels during exercise after physical training in man", *J. Appl. Physiol.* **33,** 199-203.
12. ———, 1974. "Muscle clycogen utilization during exercise after physical training", *Acta Physiol. Scand.* **90,** 210-217.
13. **Davies, K.J.A., L. Packer y G.A. Brooks,** 1981. "Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training", *Arch. Biochem. Biophys.,* **209,** 538-553.
14. **Costill, D.L., W.J. Fink, L.H. Getchell, J.L. Ivy y F.W. Witzmann,** 1979. "Lipid metabolism in skeletal muscle of endurance-training males and famales" *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* **47,** 787-791.
15. **Bergstrom, J., L. Hermansen, E. Hultman y B. Saltin,** 1967. "Diet, muscle glycogen, and physical performance", *Acta Physiol, Scand.* **71,** 172-179.
16. **Newsholme, E.A.,** 1983. "Control of metabolism and the integration of fuel supply for the marathon runner", *International series on Sport Sciences,* Vol. 13, *Biochemistry of Exercise.* Human Kinetics Publishers: 144-150.
17. **Newsholme, E.A. y C. Start,** 1973. *Regulation in Metabolism,* London, Sydney and Toronto: Wiley and Sons.
18. **Viru, A.,** 1983. "Exercise metabolism and endocrine function", *International series on Sport Sciences.* Vol. 13, *Biochemistry of exercise.* Human Kinetics Publishers: 76-86.
19. **Davies, C.T.M. y J.D. Few,** 1973. "Effect of exercise on adrenocortical function", *J. Appl. Physiol.* **35,** 888-891.
20. **Galvo, H.,** 1981. "Endocrinology and metabolism in exercise". *Int. J. Sport. Med.* **2,** 203-211.
21. **Galvo, H., J.J. Holst y N.J. Christensen,** 1975. "Glucagon and plasma catecholamine responses to graded and prolonged exercise in man", *J. Appl. Physiol.* **38,** 70-76.
22. **Galvo, H. L. Hummer, I.B. Peterson, N.J. Christensen y W. Bie,** 1977. "Thyroid and testicular hormonal responses to graded and prolonged exercise in man", *Eur. J. Appl. Physiol.* **36,** 101-106.
23. **Gollnick, P.D., y C.D. Ianuzzo,** 1975. "Acute and Chronic Adaptation to exercise in hormone deficient rats", *Med. Sci. Sport.* **7,** 12-29.
24. **Keul, J., B. Kohler, G. Von Glutz, U. Luthi, Berg y H. Howald,** 1981. "Biochemical changes in a 100 km run: carbohydrates, lipids, and hormones in serum", *Eur. J. Appl. Physiol.* **47,** 181-189.
25. **Lehmann, M., J. Keul, G. Huber., y M. Da Prada,** 1981. "Plasma catecholamine in trained and untrained volunteers during graduated exercise", *Int. J. Sports Med.* **2.** 143-147.
26. **Matlina, E.,** 1976. "Main phases of catecholamine metabolism under stress" *In* E. Usdin., R. Kvetnansky and I. J. Kopin (Eds), *Catecholamines and stress* Oxford: Pergamon Press,
27. **Suttton, J.R. y L. Lazarus,** 1976. "Growth hormone in exercise: comparison of physiologic and pharmacologic stimuli", *J. Appl. Physiol.* **41,** 523-527.
28. **Terjung, R.L. y C.M. Tipton,** 1971. "Plasma thyroxinte and tryroid stimulating hormone levels during submaximal exercise in human", *Am. J. Physiol.* **220,** 1840-1845.
29. **Wahren, J. Bjorkman:** "Hormones, exercise and regulation of splanchnic glucose otuput in normal man". *In* J. Poormans y G. Niset (Eds), *Biochemistry of Exercise* IV B. Baltimore: Univ. Park Press, 1981.
30. **Goldberg, N.D. y Haddox, M.K.:** "Cyclic GMP metabolis and involvement in biological regulation", *Ann, Rev. Biochem.* **46,** 823-896.
31. **Padilla, P.J., D. Pacheco L., R. Yañez A., F.C. de la Vega L., M. C. Eguía Lis G., D. Moreira M., A. Hernández M., D. Susuki, L. y Licea M.,** 1984. "Esfuerzo físico y eliminación urinaria de AMPc y GMPc", *Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología,* IPN, Vol. II, **5:** 25-39.
32. **Linklater, H.A., K.P. Strickland, D.A. Nam, J.C. Griffith y J.R. Frevithick,** 1977. "Urinary Cyclic AMP and Cyclic GMP in normal and asthmatic subjects during exercise", *Med. and Sci. in Sports.* **11,** 250-255.
33. **Padilla, J.P.** y cols., 1984. *Op. cit.* 27.
34. **Pacheco, L.D.,** 1981. "Nucleótidos cíclicos en la regulación celular", *Acta Médica,* ESM. IPN. México. D.F., vol. XV., **57:** 7-12.
35. **Posternak, T.H.,** 1976. "Cyclic AMP and cyclic GMP". *Ann, Rev. of Pharm.* **14,** 23-33.
36. **Honna, M. y M. Vi,** 1978. "Plasma cyclic GMP: Response to cholinergic agents", *Eur. J. Pharmacol.* **47,** 1-10.
37. **Klug, G.A., M.B. Knudson, L.J. Cartier y P.D. Gollnick,** 1980. "The role of cAMP acumulation in the maintenance of contractily in the *in situ* rat heart", *Med. and Sci. in Sp. and Exercise.* **12,** 110.
38. **Breckbridge, McI,** 1970. "Cyclic AMP and drug

action", *Ann. Rev. of Pharm.* **10**, 19-34.

39. **Anderson, R.G.** y **L. Djarr**, 1978. "Tension and cyclic GMP changes", *Mol. Pharmalcol.* **13**, 330-341.
40. **Åstrand, I.**, 1960. "Aerobic work capacity in men and women wit special reference to age", *Acta Physiol. Scand.* 49-67.
41. **Åstrand, P.O.**, 1952. *Experimental studies of physical working capacity in relation to sex and age.* Munksgard, Copenhagen,
42. **Steiner, A.L., C.W. Parker** y **D.M. Kipnis**, 1972. *J. Biol. Chem.* **247**, 1106.
43. **Morehouse, C.A.** y **G.A. Stull**, 1975. *Statical Principles and procedures with applications for Physical Education.* 156-180.