



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11281

11  
2e)

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DEL CONTENIDO DE LIPIDOS EN LA DIETA DE LA RATA DURANTE LA LACTANCIA SOBRE LA CAP TACION Y SINTESIS DE LIPIDOS EN LA GLANDULA MAMARIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

MARTHA ELENA DEL PRADO MANRIQUEZ

MEXICO, D. F.

265867

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

P

/

P

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar, en la rata, el efecto de una dieta con 20% de lípidos sobre la composición, producción láctea, el crecimiento de la cría y la síntesis y captación de los lípidos por la glándula mamaria (GM).

**METODO.** Se utilizaron ratas Sprague-Dawley alimentadas durante el embarazo y la lactancia con dietas isoenergéticas con 2.5 g (grupo BL) o 20 g (grupo AL) de lípidos por 100 g de dieta. Se determinó la composición y producción láctea, la composición corporal de la madre y de las crías, la síntesis y captación de lípidos por la GM y la actividad de la lipoproteína lipasa en este tejido.

**RESULTADOS.** La concentración de lípidos en la leche, el volumen de leche y el peso corporal de las crías fueron mayores en la leche del grupo AL en comparación con el BL. El contenido de lípidos fue mayor en la carcasa de las crías AL, sin que se modificara el porcentaje de proteína. La síntesis de lípidos fue menor en la GM del grupo AL, mientras que la actividad de la lipoproteína lipasa y los  $^{14}\text{C}$ -lípidos acumulados en la GM y transferidos a las crías fueron mayores en comparación con el grupo BL.

**CONCLUSIÓN.** Es posible modificar la composición y producción de los lípidos en la leche, aumentando el consumo de lípidos por la rata madre durante todo su ciclo reproductivo. La mayor producción de lípidos en la leche se relacionó con un mayor crecimiento de las crías y con una mayor captación de los lípidos de la dieta por la glándula mamaria.



Vo.Bo. Asesor

Dr Homero Hernández-Montes

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI con la asesoría del Dr Homero Hernández Montes.

Trabajo financiado por CONACyT

Agradezco a:

Dr. Carlos Posadas Romero

Dr. Walid Kuri Harcuch

Dra. Carmen Aceves Velasco

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Dr. Armando Tovar Palacio

Dr. Saul Villa Treviño

sus comentarios que enriquecieron de manera muy importante esta tesis.

Agradezco:

Al Dr. Homero Hernández Montes  
todos estos años de compartir conmigo  
sus conocimientos y su amistad.

Profundamente al Dr Salvador Villalpando Hernández  
por darme la oportunidad de desarrollar mis ideas,  
aun cuando no todas fueran buenas.

A todos los miembros de la Unidad de  
Investigación en Nutrición

Dedico esta tesis a:

José Alfredo Torres Solano por apoyarme en mi  
desarrollo profesional y por todo tu amor.

José Ariel Torres Del Prado  
Por tu alegría

Mis padres  
Celia Manríquez Arroyo y  
Pedro Del Prado González  
por su apoyo y cariño incondicional

<b>ÍNDICE</b>	<b>página</b>
<b>RESUMENES</b>	1-3
<b>ANTECEDENTES</b>	
1. Los lípidos en la leche	4
2. La composición láctea y su relación con la dieta materna	5
3. La lipogénesis en la glándula mamaria	7
III a. Regulación de la síntesis de los ácidos grasos	8
4. La captación de los lípidos circulantes y la actividad de la lipoproteína lipasa.	9
5. La regulación de la actividad de la lipoproteína lipasa	11
6. La composición corporal materna	12
7. La composición de los ácidos grasos en el tejido adiposo	13
8. El crecimiento de las crías	14
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>OBJETIVOS</b>	17
<b>MÉTODOS</b>	
1. Animales	19
2. Registro del consumo de alimento	21
3. Registro del peso de la rata madre y de las crías	21
4. Obtención de la muestra de leche	21
5. Análisis de la composición de la leche	22
6. Determinación de la producción láctea	22
7. Análisis de la composición de los ácidos grasos	22
8. Determinación de la composición corporal	23
9. Determinación de la lipogénesis en la glándula mamaria	24
10. Determinación de la actividad de la lipoproteína lipasa	25

11. Determinación de la captación de lípidos por la glándula mamaria.	26
12. Análisis estadístico	28

## **RESULTADOS**

1. La ingesta materna	29
2. Cambios circadianos en la ingesta de alimento	31
3. El peso corporal de las crías	33
4. El peso corporal materno	35
5. La composición de la leche	37
6. La producción de leche	38
7. Composición de ácidos grasos en la dieta y en la leche	40
8. La composición corporal materna	46
9. La composición de las crías	47
10. La composición de ácidos grasos en los lípidos del carcass de la rata madre y de las crías.	48
11. La lipogénesis en la glándula mamaria	51
12. Actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria	53
13. Utilización materna y transferencia a las crías de trioleína administrada oralmente a la rata madre.	54
14. La producción de CO <sub>2</sub> y la acumulación de lípidos en el hígado y en el tejido muscular de la rata madre.	56

<b>DISCUSIÓN</b>	57-71
------------------	-------

<b>CONCLUSIONES</b>	72
---------------------	----

<b>REFERENCIAS</b>	73-82
--------------------	-------

**RESUMEN:**

La composición de los lípidos de la leche en todas las especies estudiadas cambia importantemente con la dieta de la madre lactante. Existe controversia de si el aumento en el consumo de lípidos durante el ciclo reproductivo puede ocasionar cambios en el contenido de lípidos en la leche o en el crecimiento de las crías.

Esta investigación se diseñó para evaluar, en la rata, el efecto del consumo de una dieta con elevado contenido de lípidos durante todo el ciclo reproductivo o solo durante la lactancia, sobre la composición y producción láctea así como su repercusión en el crecimiento de la cría. Además, se cuantificaron los cambios en la síntesis y en la captación de los ácidos grasos en la glándula mamaria relacionados con las modificaciones dietarias.

**METODOLOGIA.** Se utilizaron ratas hembra Sprague-Dawley alimentadas hasta la semana 12 de edad con una dieta con 2.5% de lípidos. A las 14 semanas de edad, los animales se aparearon con machos de la misma cepa. Las hembras preñadas recibieron a libre demanda durante el embarazo y la lactancia dietas isoenergéticas con 2.5 g (grupo BL) o 20 g (grupo AL) de lípidos por 100 g de dieta. Otros dos grupos de ratas recibieron la dieta AL solo durante el embarazo (grupo AL/BL) o solo durante la lactancia (BL/AL). El consumo de alimento de la rata madre y su peso corporal se determinó diariamente durante el embarazo y la lactancia y el peso corporal de la cría se determinó durante la lactancia. Entre el día 12 y 14 de lactancia se obtuvo una muestra de leche y se determinó su concentración de lípidos totales, lactosa, proteína y la composición de los ácidos grasos. El volumen de leche producida, la síntesis de lípidos, la captación de una dosis bucal de  $^{14}\text{C}$ - lípidos y la actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria de los animales de los diferentes grupos se cuantificó en ese mismo periodo. La composición corporal de la rata madre y de las crías se determinó a través de la cuantificación del contenido de lípidos totales y de nitrógeno en la carcasa de los animales.

**RESULTADOS.** La dieta con elevado contenido de lípidos no modificó la

cantidad de alimento ingerido por la rata madre durante el embarazo; sin embargo durante la lactancia, las ratas que recibieron la dieta AL tuvieron una ingestión de alimento mayor que las del grupo BL. Los animales alimentados con la dieta AL durante todo el ciclo reproductivo tuvieron una mayor concentración de lípidos en su leche en comparación con el grupo BL. El volumen de leche producida y el peso corporal de las crías fueron mayores en las ratas que recibieron la dieta AL durante alguna parte de su ciclo reproductivo, en comparación con el grupo control. El contenido de lípidos fue mayor en la carcasa de las crías de las ratas que recibieron la dieta AL, sin que se modificara el porcentaje de proteína.

La síntesis de lípidos fue menor y la actividad de la lipoproteína lipasa fue mayor en la glándula mamaria de los animales del grupo AL, en comparación con los del grupo BL. La absorción de los  $^{14}\text{C}$ -lípidos fue mayor en el grupo AL que en grupo BL. Los  $^{14}\text{C}$ -lípidos acumulados en glándula mamaria y la cantidad transferida a las crías (cuajo de la leche+ carcasa de las crías) fue mayor en el grupo que recibió la dieta AL en comparación con el grupo BL.

**CONCLUSIÓN.** Es posible modificar la composición y producción de los lípidos en la leche, aumentando el consumo de lípidos por la rata madre durante todo su ciclo reproductivo. La mayor producción de lípidos en la leche de los animales que recibieron la dieta con elevado contenido de lípidos se relacionó con un mayor crecimiento de las crías y con una mayor captación de los lípidos de la dieta por la glándula mamaria.

**ABSTRACT:**

The purpose of the present study was to investigate in the rat, the effect of a high-fat diet on: milk composition and volume, litter growth and the synthesis and uptake of fatty acids by the mammary gland.

**METHOD:** Sprague-Dawley rats were fed during pregnancy and/or lactation with one of two isoenergetic diets containing 2.5% (low lipid diet; LL) or 20%(high lipid diet, HL) of corn oil. Milk production and composition, maternal and pup body composition, and mammary gland fatty acid synthesis and uptake were determined. Lipoprotein lipase activity was measured in acetone-ether dried preparations of mammary gland.

**RESULTS:** Milk lipid concentration, 24h milk production, and pups body weight were higher in the HL group. Mammary gland lipogenesis was higher in the LL rats, while LPL activity and mammary gland lipid uptake, and the amount of oral lipid transferred to the pups were higher in the HL rats.

**CONCLUSION:** Milk composition and production can be modified if the maternal lipid intake increases during the whole reproductive cycle. The higher production of milk lipid relates with a higher mammary gland lipid uptake and with a higher growth of the litter.

**ANTECEDENTES:**

La lactancia es un proceso notable durante el cual el organismo materno produce una secreción que no le proporciona un beneficio propio, pero que puede mantener totalmente el desarrollo y el crecimiento de la cría. Todos los mamíferos producen leche con diferentes composiciones, cada una específica para las necesidades de crecimiento y desarrollo de su recién nacido.

Los beneficios de la lactancia al seno materno son substanciales. La leche materna además de ser la única fuente de macro y micronutrientes para el recién nacido, le proporciona factores de resistencia, inductores y moduladores del sistema inmune y agentes antiinflamatorios.

**1. Los lípidos en la leche:**

Los lípidos de la leche son la principal fuente de energía para el recién nacido, además de proporcionar entre el 40 y el 50% de la energía total de la leche, son esenciales para el desarrollo normal del recién nacido, ya que le proporcionan los ácidos grasos necesarios para el desarrollo del cerebro y son vehículo de vitaminas liposolubles (1,2).

Estudios en humanos y roedores han mostrado que los lípidos son el componente más variable de la leche, mostrando cambios en su contenido y composición en relación con la duración de la gestación, la etapa de lactancia, la composición de la dieta, la tetada y la hora del día (3-12).

La leche de la rata contiene en promedio 10.3% de lípidos, de los cuales el 98% son triacilgliceroles (10). Los lípidos en la leche están presentes en forma de gotas de grasa con un diámetro entre 1 y 7 $\mu$ m, rodeadas de una estructura de bicapa, proveniente de la membrana plasmática apical de la célula epitelial mamaria (13).

Los triacilgliceroles de la leche contienen principalmente ácidos grasos de cadena larga (C16-C18) y, dependiendo de la especie y de la composición de la dieta pueden contener también ácidos grasos de cadena media (C8-C14), y algunas

veces ácidos grasos de cadena corta (C4-C6). Los ácidos grasos de cadena larga pueden ser saturados o insaturados, mientras que los de cadena media y corta son solamente saturados.

Los ácidos grasos de cadena larga provienen principalmente de la dieta, de la movilización de los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo durante el embarazo y de la síntesis en el hígado; mientras que los de cadena media son sintetizados en la glándula mamaria a partir de glucosa principalmente (1,12-15).

## **2. La composición láctea y su relación con la dieta materna:**

En humanos existen muy pocos estudios disponibles en los que se hayan estudiado las alteraciones en el contenido total de lípidos en la leche, generados por cambios en la ingesta materna. La conclusión que emerge de esos trabajos es que el contenido de lípidos en la leche es independiente del estado del consumo materno (9, 16-19).

Estudios realizados en roedores y en cerdos han mostrado que las modificaciones en el contenido de lípidos de la dieta de la madre durante la lactancia están asociadas con el aumento (20-22), la disminución (23) o la ausencia de cambios en el contenido de lípidos en la leche (11,12, 24).

Las discrepancias en los resultados de estos estudios puede explicarse por la diferencia que existe en el diseño experimental entre ellos. En algunos estudios se ha proporcionado la dieta experimental con elevado contenido de lípidos durante periodos muy cortos después del parto (24,20), mientras que otros la han proporcionado durante toda la gestación y la lactancia (21,22).

Otra diferencia entre los estudios es la cantidad de lípidos utilizados para elaborar las dietas experimentales y la manera en que se aumenta el contenido de lípidos en las dietas. El contenido de lípidos ha variado del 10 al 60%, y se ha logrado en algunos casos aumentar el contenido de lípidos controlando la densidad energética de la dieta al disminuir el contenido de los carbohidratos (20,24), mientras que en otros estudios el aumento en el contenido de lípidos se ha realizado adicionando grasa a la dieta, con la consecuente reducción en la

proporción de proteína y otros nutrimentos de la dieta (12,23).

En experimentos realizados con roedores a los que se les ha proporcionado desde el inicio del embarazo una dieta de cafetería (salami, galletas de queso y chocolate, etc.), la cual es rica en lípidos y tiene una elevada densidad energética, se ha mostrado que la concentración de lípidos en la leche de esos animales es mayor si se compara con un grupo de animales que reciben una dieta estándar (21). Esos estudios no permiten establecer si el aumento en el contenido de lípidos de la leche es ocasionado por la mayor ingesta energética, por el aumento específico en la ingesta de lípidos o por una mayor movilización de las reservas corporales maternas durante la lactancia.

La composición de los ácidos grasos en los lípidos de la leche puede modificarse al cambiar el balance energético o el tipo y la cantidad de lípidos en la dieta de la madre lactante (7,8,16,17,20). Si ésta es alimentada con una dieta de bajo contenido de lípidos y un elevado contenido de hidratos de carbono, la proporción de los ácidos grasos de cadena media aumenta en la leche, mientras que se reduce la proporción de los ácidos de cadena larga, estos cambios reflejan el incremento en la síntesis *de novo* de los ácidos grasos por la glándula mamaria y la disminución en el uso de los ácidos grasos tanto de la dieta como de las reservas corporales (16,17, 20).

Si la madre es alimentada con dietas con un elevado contenido de lípidos, la proporción de los ácidos grasos saturados e insaturados que contiene la dieta se ve reflejada en los ácidos grasos de la leche, sin cambios en el contenido total de los lípidos de la leche (16,20,25).

Se acepta que la captación de los lípidos circulantes y la síntesis *de novo* de ácidos grasos en la glándula mamaria, son los dos mecanismos responsables de determinar el contenido total de lípidos en la leche. Este, no se modifica importantemente por las manipulaciones en la dieta materna, a pesar de que el aumento en la ingestión de lípidos por la madre lactante inhibe importantemente la lipogénesis mamaria.

### 3. La lipogénesis en la glándula mamaria:

Los ácidos grasos son sintetizados por las células endoteliales de la glándula mamaria a través de una serie de reacciones catalizadas por la acetil coenzima A carboxilasa y la sintetasa de los ácidos grasos (1).

En muchos animales no rumiantes, la principal fuente de carbono para la síntesis de la acetil-CoA es la glucosa, la que es transformada a piruvato por la glucólisis o por la ruta de las pentosas. El piruvato es convertido a acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa. La acetil-CoA no puede ser transportada a través de las membranas mitocondriales hacia el citoplasma. Para lograrlo, se une al ácido oxaloacético para formar citrato, este es transportado al citoplasma y aquí es transformado a acetil-CoA por la enzima ATP citrato liasa (26) El lactato, la leucina y la alanina pueden ser usados como fuentes de carbono (27,28).

En los rumiantes y en otras especies como el conejo, el acetato es el principal sustrato para la síntesis de los ácidos grasos (1).

La acetil-CoA carboxilasa cataliza la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA siendo esta reacción el paso limitrofe en la síntesis de los ácidos grasos. El sistema multi enzimático de la sintetasa de los ácidos grasos cataliza una secuencia de reacciones que juntas añaden dos carbonos, provenientes de la malonil-CoA, a la cadena del ácido graso. La fase de elongación en la síntesis de los ácidos grasos se inicia con la unión del acetil-CoA y del malonil-CoA con el dominio análogo a la proteína acarreadora de grupos acilo (ACP), para formar acetil-ACP y malonil-ACP. Estas dos últimas se condensan para formar acetoacetil-ACP. Las siguientes tres reacciones en la síntesis de los ácidos grasos reducen el grupo cetónico del carbono tres a un grupo metileno, conduciendo a la formación de butiril-ACP lo cual completa el primer ciclo de elongación. La cadena permanece covalentemente unida al complejo enzimático y queda disponible para la adición sucesiva de más unidades de dos carbonos provenientes de la malonil-ACP. Cada ciclo de reacción requiere de dos moléculas de NADPH (26).

Existen tres diferentes rutas en la glándula mamaria para generar el NADPH: la

ruta del ácido 6-fosfogluónico, el ciclo de transhidrogenación del malato y la deshidrogenasa del isocitrato. En la glándula mamaria de los roedores, las dos primeras rutas parecen ser las más importantes, la ruta del ácido 6-fosfogluónico proporciona cerca de la mitad de los equivalentes reductores necesarios para la síntesis de los ácidos grasos (27).

En el hígado y en el tejido adiposo, cuando la cadena del ácido graso recién sintetizado, alcanza un tamaño de 16 carbonos o más, la síntesis es terminada por la tioesterasa I. Esta parte integral del sistema de la sintetasa de los ácidos grasos termina la síntesis del ácido graso retirando la molécula final del ácido graso de su sitio de unión con la enzima. En el citoplasma de las células epiteliales de la glándula mamaria de las ratas, ratones y conejos existe una acil-tioester hidrolasa (tioesterasa II) para los ácidos grasos de cadena media (29). Esta enzima termina la síntesis de los ácidos grasos cuando estos alcanzan una longitud de 8 a 14 carbonos.

### **3.1. La regulación de la síntesis de los ácidos grasos:**

La síntesis de los ácidos grasos es un proceso que requiere de mucha energía, por lo que está sujeto a regulación. La regulación involucra mecanismos de corto y largo plazo.

a) Regulación a corto plazo: Involucra la modulación de la actividad de las enzimas a través de efectores alostéricos o a ciclos de fosforilación-defosforilación. La piruvato deshidrogenasa y la acetil-CoA carboxilasa, enzimas clave en el proceso de síntesis de los ácidos grasos, son enzimas cuya actividad puede ser regulada por ciclos de fosforilación-defosforilación. La fosforilación de la piruvato deshidrogenasa conduce a la inactivación de la enzima, mientras que su defosforilación la activa. Cuatro factores están involucrados en la regulación de la piruvato deshidrogenasa cinasa: la concentración de piruvato y los cocientes de ATP/ADP, acetil CoA/ CoA y NADH/ NAD<sup>+</sup>. Elevados valores de estos cocientes activan a la cinasa y por lo tanto, inhiben a la piruvato deshidrogenasa (30).

La acetil-CoA carboxilasa existe como un monómero que presenta muy baja actividad, y como un polímero con una elevada actividad. El citrato aumenta marcadamente la actividad de la enzima causando su polimerización, mientras que los acil CoA de cadena larga favorecen la disociación hacia la forma menos activa. La acetil-CoA carboxilasa es además regulada por ciclos de fosforilación-defosforilación. La fosforilación de la enzima causa su inactivación (31).

Existen varios ejemplos de la regulación a corto plazo de la lipogénesis en la glándula mamaria. La síntesis de lípidos en la glándula mamaria disminuye rápida y dramáticamente al someter a un periodo de ayuno a la madre lactante (32, 33). También la administración de triacilglicerolos de cadena media o larga, así como el consumo de dietas con un elevado contenido de lípidos durante la lactancia, disminuye la síntesis de lípidos en la glándula mamaria hasta en un 90% (33-35).

b) Regulación a largo plazo: La regulación a largo plazo involucra la modulación de la cantidad de enzima presente en la célula a través de regular la velocidad de síntesis y degradación de la enzima. En las cercanías del parto, por ejemplo, la piruvato deshidrogenasa, la ATP-citrato liasa, la acetil CoA carboxilasa y la sintetasa de los ácidos grasos aumentan varias veces su concentración en el tejido mamario (36).

#### **4. La captación de los lípidos circulantes y la actividad de la lipoproteína lipasa:**

Los ácidos grasos de cadena larga de la leche provienen principalmente de la dieta y de la síntesis de ácidos grasos en el hígado y glándula mamaria y en menor grado de los depósitos de grasa del tejido adiposo.

Los ácidos grasos son transportados del intestino y del hígado en el torrente sanguíneo como triacilglicerolos asociados a los quilomicrones y a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), respectivamente.

La mayoría de los ácidos grasos movilizados de los depósitos de grasa para ser utilizados en la producción de leche son primero incorporados por el hígado en

triacilgliceroles de las VLDL y después transportados como tales a la glándula mamaria (37).

La captación de los ácidos grasos de los triacilgliceroles, contenidos en los quilomicrones y las VLDL, requiere de la presencia de la lipoproteína lipasa (LPL) en la superficie luminal de los capilares (38). La actividad de la LPL aumenta en la glándula mamaria y disminuye en el tejido adiposo a partir del final de la gestación y durante la lactancia, dando como resultado que los triacilgliceroles del plasma que contienen a los ácidos grasos provenientes de los depósitos de lípidos del tejido adiposo sean utilizados preferentemente por la glándula mamaria para la producción de leche (39).

En varias especies animales se presenta hipertrigliceridemia durante el último trimestre del embarazo y desaparece en las cercanías del parto (40). La relación entre esta hipertrigliceridemia y la actividad de la lipoproteína lipasa se ha estudiado en la rata (41). La actividad de la LPL en el corazón, el músculo del diafragma y el pulmón de rata no se modifican por el embarazo, pero la actividad de la LPL del tejido adiposo comienza a disminuir varios días antes del parto (39,41). El desarrollo de la hipertrigliceridemia ocurre antes de que disminuya la actividad de la LPL en el tejido adiposo y puede atribuirse al aumento en la ingesta de alimento de la madre gestante. El aumento en la actividad de la LPL en la glándula mamaria de la rata, en las cercanías del parto, coincide con la desaparición de la hiperlipemia, por lo que se asume que el aumento en la captación de lípidos por la glándula mamaria es responsable de la disminución en la concentración de triacilgliceroles en el plasma materno (22).

La actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria aumenta hasta 6 veces durante la lactancia en cobayos, ratas, cabras y vacas (38). La elevada actividad de la LPL en la leche humana sugiere que la glándula mamaria humana tiene también una elevada actividad de la enzima durante la lactancia (42).

La actividad de LPL en la glándula mamaria de la rata aumenta muy lentamente durante los primeros 20 días del embarazo, se duplica en el siguiente día, disminuye abruptamente durante el parto, y finalmente aumenta en los primeros

dos días después del parto para mantenerse elevada durante la lactancia (39). Una vez que la demanda disminuye, la actividad de la LPL en la glándula mamaria también disminuye hasta alcanzar los valores de los animales nulíparos. La actividad de la LPL en el tejido adiposo disminuye durante la lactancia y se mantiene baja mientras las crías succionen. Al suspenderse la lactancia, la actividad aumenta en 48 h hasta alcanzar los niveles presentes en animales nulíparos (39).

### **5. La regulación de la actividad de la lipoproteína lipasa:**

La succión es esencial para mantener los niveles de LPL elevados en la glándula mamaria de los animales lactantes. Al suspenderse la succión por 4 h en las ratas, se acumula leche en la glándula mamaria, lo que origina una pequeña disminución en la actividad de LPL en este tejido. La suspensión de la lactancia por 9 h disminuye en un 70% la actividad de la LPL en la glándula mamaria y duplica la actividad en el tejido adiposo (39).

En experimentos en donde se han ligado los conductos que drenan la glándula mamaria inguinal-abdominal en la rata, se observa una reducción de 50% en la actividad de la LP, aún cuando se permita a las crías succionar (43).

Los cambios en la actividad de la LPL en la glándula mamaria y en el tejido adiposo que ocurren al establecerse o suspenderse la lactancia sugieren que una o más de las hormonas responsables de la secreción láctea pudiera regular también la actividad de la LPL durante la lactancia. Estudios realizados en ratas lactantes hipofisectomizadas han permitido mostrar el efecto de la prolactina, la hormona del crecimiento y el ACTH (44). La hipofisectomía disminuyó la actividad de la LPL en la glándula mamaria y aumentó la actividad en el tejido adiposo. La inyección de prolactina, 2 h después de la operación, aumenta la actividad de la LPL en la glándula mamaria hasta los niveles encontrados en los animales normales y bloquea completamente la actividad de la LPL en el tejido adiposo. Estos efectos no se alteraron por la administración de hormona del crecimiento o tiroxina.

La inyección de dexametasona aumentó la actividad de la LPL en la glándula mamaria, pero solamente en un 50% de los valores mostrados por los animales tratados con la prolactina. La administración de las cuatro hormonas juntas produjo el mayor aumento en la actividad de LPL en la glándula mamaria y en la secreción de leche. Esta última se presentó solamente en las ratas que recibieron la prolactina sola o junto con otras hormonas, y estuvo siempre asociada al aumento en la actividad de la LPL en la glándula mamaria.

La administración de bromocriptina, que inhibe la liberación de prolactina por la hipófisis, disminuyó la actividad de la LPL en la glándula mamaria y la aumentó en el tejido adiposo de las ratas lactantes. La administración de prolactina evitó los efectos de la bromocriptina. Estos resultados muestran el importante papel de la prolactina en la regulación de la LPL.

Estudios recientes han analizado los efectos de la deficiencia de insulina y de la deficiencia de insulina y prolactina sobre la captación de lípidos en la glándula mamaria y sobre la actividad de la lipoproteína lipasa (43,45,46). Estos trabajos han mostrado que la deficiencia de insulina disminuye en más de un 80% la captación de  $^{14}\text{C}$ -trioleína, administrada por vía intragástrica, y la actividad de la LPL en el tejido mamario. La actividad de la enzima disminuye aún más con la deficiencia simultánea de las dos hormonas.

#### **6. La composición corporal materna:**

El embarazo y la lactancia son estados fisiológicos en los que se presentan cambios importantes en el peso y en el contenido de grasa corporal de la madre. Durante el embarazo, el peso del concepto, el aumento en el volumen sanguíneo y el desarrollo de la glándula mamaria contribuyen con una parte de la ganancia de peso (40,47), otro de los componentes de esta ganancia es la acumulación de alrededor de 10 g de triacilglicérols en el cuerpo de la rata madre (48). Este depósito de energía ocurre como preparación para la lactancia, ya que la movilización de estas reservas y la hiperfagia cubren normalmente las demandas de energía que impone la producción de leche (49).

Las ratas son capaces de catabolizar alrededor de dos terceras partes de su grasa corporal total mientras amamantan una camada de 8 crías por 16 días. Como resultado de esta movilización, los animales pueden terminar el periodo de lactancia con una menor cantidad de grasa corporal que al principio del ciclo reproductivo (48,49).

El principal determinante en la ganancia de peso de la madre durante la gestación es la dieta disponible durante esta etapa (50). En modelos animales es posible inducir obesidad, ofreciendo a los animales dietas con alta palatabilidad o con un elevado contenido de lípidos (50-53).

La pérdida de lípidos corporales durante la lactancia está directamente relacionada con la cantidad de lípidos acumulados durante la gestación. Las ratas alimentadas con dietas con elevado contenido energético, acumulan más lípidos en las reservas adiposas durante el embarazo y movilizan más grasa durante la lactancia que los animales alimentados con dietas con bajo contenido energético (51). Parece, por lo tanto, que los cambios en el peso corporal de la rata, durante la lactancia, se dan en relación con la cantidad total de grasa corporal acumulada durante la gestación, indicando que durante la lactancia las ratas están en un estado catabólico en el cual la cantidad de grasa corporal movilizada depende de la cantidad disponible.

Otros factores que también pueden influir sobre los cambios en el peso corporal son las demandas impuestas por la lactancia y los cambios en el uso de energía. Por ejemplo, se ha mostrado que si los animales alimentados con la dieta estándar de laboratorio amamantan hasta 4 crías, el peso de los depósitos grasos en el postparto permanece muy cercano a los valores del embarazo, mientras que las ratas que amamantan a camadas de entre 8 y 14 crías, pierden en el postparto dos terceras partes de la grasa acumulada (23).

#### **7. La composición de los ácidos grasos en el tejido adiposo:**

Los acilglicerol del tejido adiposo de los organismos vivos contienen ácidos saturados e insaturados, de todos los ácidos grasos monoinsaturados, el ácido

oleico es el más abundante, en algunos casos puede representar hasta el 30% del total. Otros ácidos grasos como el linoleico, el palmitoleico y el palmítico son casi tan abundantes como el ácido oleico (54).

La composición de ácidos grasos del tejido adiposo está determinada por factores dietarios, ambientales y filogenéticos.

La ingestión de dietas ricas en carbohidratos produce un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados en el tejido adiposo (54). El tejido adiposo del tigre y el puma proporciona un buen ejemplo del efecto de la dieta sobre la composición del tejido adiposo, ya que estos animales al alimentarse normalmente de ovejas o venados, animales que contienen elevados niveles de ácido esteárico en su tejido adiposo, también presentan en su tejido graso niveles elevados de ácido esteárico. Sin embargo, cuando son alimentados con la dieta de los zoológicos, comúnmente carne de caballo, la composición de los ácidos grasos del tejido adiposo del tigre y del puma se altera, pues el contenido de ácido esteárico se reduce drásticamente y otros ácidos grasos insaturados presentes en la grasa del caballo, aumentan (55).

La ingestión de dietas ricas en triacilgliceroles con ácidos grasos de cadena media reduce la acumulación de lípidos en el tejido adiposo en comparación con las dietas con mayor contenido de ácidos grasos de cadena larga (56,57). Los ácidos grasos de cadena media liberados de los triacilgliceroles de la dieta no son reesterificados en las células intestinales y son transportados directamente, vía la circulación portal, al hígado para su oxidación parcial a cuerpos cetónicos o su oxidación completa hasta  $\text{CO}_2$ . Como consecuencia, los ácidos grasos de cadena media provenientes de la dieta, son rápidamente utilizados para obtener energía y poco incorporados en los triacilgliceroles del tejido adiposo, si se compara con los triacilgliceroles que contienen ácidos grasos de cadena larga (58).

#### **8. El crecimiento de las crías:**

Los estudios en donde se ha tratado de relacionar el contenido de lípidos en la dieta, durante el embarazo y la lactancia y el crecimiento de las crías, muestran

resultados contradictorios, ya que, en experimentos realizados en roedores se ha mostrado efecto positivo (20), negativo (35,59) o nulo (24) entre la mayor ingesta de lípidos y el crecimiento de la cría.

Experimentos con ratas lactantes alimentadas con dieta de cafetería (alimentos con elevado contenido energético), desde el inicio de la lactancia muestran que la velocidad de crecimiento de la camada es mayor que la del grupo control que fue alimentado con la dieta estándar de laboratorio con bajo contenido de lípidos (50). Estudios con cerdos han mostrado que la adición de lípidos a la dieta del animal durante la lactancia, sin controlar la ingesta energética, produce un mayor crecimiento de las crías que está relacionado con la producción de una leche con mayor contenido de sólidos y lípidos (23).

Los estudios en los que se han observado efectos negativos o ningún efecto entre el contenido de lípidos en la dieta materna y el crecimiento de las crías coinciden en haber proporcionado la dieta experimental solo durante un corto periodo durante la lactancia (4-7 días), mientras que los que se mencionaron anteriormente proporcionan la dieta desde el embarazo y durante toda la lactancia. Es probable que el tiempo durante el cual se proporciona la dieta con elevado contenido de lípidos sea importante para determinar la producción y la composición de la leche y como consecuencia, modificar el crecimiento de las crías.

**JUSTIFICACIÓN:**

Los estudios disponibles en la literatura, en los que se ha evaluado el efecto de modificar el consumo de lípidos por la rata madre y el desarrollo de la lactancia muestran resultados contradictorios. La discrepancia entre los estudios puede estar relacionada con el tiempo en el que se proporcionó la dieta y si se controló o no el consumo total de energía por la madre lactante.

Se desconocen los efectos de incrementar el consumo de lípidos, sin modificar la ingesta energética por la rata madre, durante todo el ciclo reproductivo o solo durante una etapa de este (embarazo o lactancia) sobre la composición y producción láctea y sus efectos sobre el crecimiento de las crías.

Las adaptaciones en la utilización de los lípidos de origen dietario por la glándula mamaria como respuesta al aumento en la ingestión de lípidos no se han estudiado.

**OBJETIVO GENERAL:**

Determinar los efectos de proporcionar a la rata, desde la gestación y/o durante la lactancia, una dieta con un elevado contenido de lípidos pero isoenergética con la dieta habitual de la rata, sobre el metabolismo de lípidos de la glándula mamaria lactante, la producción y composición láctea y la repercusión sobre el crecimiento y composición corporal de las crías.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Cuantificar la concentración de lípidos, proteínas, lactosa y el patrón de ácidos grasos en la leche de ratas alimentadas durante la gestación y/o la lactancia con dietas purificadas, isoenergéticas con diferente contenido de lípidos.
2. Comparar el efecto de diferentes niveles de lípidos en la dieta de la rata madre durante la gestación y/o la lactancia sobre el peso de la cría al nacimiento, su crecimiento en las dos primeras semanas de vida y su composición corporal.
3. Cuantificar la captación y la síntesis de lípidos en la glándula mamaria de animales lactantes alimentados con dietas isoenergéticas con diferente contenido de lípidos.
4. Comparar la actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria de animales lactantes alimentados con dietas con diferente contenido de lípidos.

**MÉTODOS:****1. Animales:**

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley alimentadas a libre demanda con un alimento comercial (Laboratory rodent diet, PMI Feeds Inc, St Louis MO, USA.) hasta la edad de 12 semanas. A las 12 semanas de edad, los animales cuyo peso corporal se encontró entre 220 y 260 g se adaptaron durante dos semanas a una dieta purificada con un contenido de 2.5 % de lípidos, que corresponde al contenido de lípidos en la dieta habitual de la rata (dieta BL). La composición porcentual de macronutrientes de la dieta BL se muestra en la **Tabla 1** (60).

**Tabla 1**  
Composición de las dietas experimentales

Ingrediente	Dieta Baja en lípidos (BL) <sup>3</sup>	Dieta Alta en lípidos (AL)
	g/ kg dieta	
Caseína	284	284
Glucosa	308	110
Fécula de Maíz	308	110
Aceite de Maíz	25	200
DL-Metionina	3	3
Vitaminas <sup>1</sup>	10	10
Minerales <sup>2</sup>	26	26
Celulosa	36	257
Energía Kcal/ g	3.8	3.8

<sup>1</sup> Contenido por kg: PABA, 11.01 g; Ácido ascórbico, 101.66 g; Biotina, 0.044g; B12, 2.97 g; Pantotenato de calcio, 6.61 g; Citrato de colina dihidrogenada, 349.69 g; ácido fólico, 0.20 g; inositol, 11.01 g; menadiona, 4.95 g; Niacina, 9.91 g; HCl B6, 2.20 g; B2, 2.20 g; HCl B1, 2.20 g; Palmitato de retinil, 3.96 g; ergocalciferol, 0.44 g; Acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol, 24.23 g; Fécula de maíz, 466.67 g.

<sup>2</sup> Contenido por kg: Molibdato de amonio, 0.025 g; Carbonato de calcio, 292.9 g; Fosfato de calcio, 4.3 g; Sulfato cúprico, 1.56 g; Citrato férrico, 6.23 g; Sulfato de magnesio, 99.8 g; Sulfato de manganeso, 1.21 g; Yoduro de potasio, 0.005 g; Fosfato de potasio, 343.1 g; Cloruro de sodio, 250.6 g; Selenito de sodio, 0.015 g; Cloruro de Zinc, 0.2 g.

<sup>3</sup> La dieta es isoenergética con el alimento comercial para roedores

La dieta AL se diseñó para aumentar el consumo de lípidos en un grupo de animales sin que se modificara el consumo total de energía, por lo que al aumentar el contenido de lípidos en la dieta AL, se disminuyó el contenido de carbohidratos. Finalmente se obtuvieron dos dietas con la misma densidad energética y con diferente contenido de lípidos.

A las 14 semanas de edad, los animales cuyo peso corporal se encontró entre 220 y 260 g se aparearon con machos de la misma cepa. El primer día de la gestación, diagnosticado por la presencia de espermatozoides en la citología vaginal, la rata se transfirió a una jaula individual y se asignó al azar a uno de cuatro grupos (Tabla 2).

**Tabla 2. Tipo de dieta y periodo durante el cual se proporcionó la dieta a los animales de cada grupo de experimentación.**

Grupo experimental	% de lípidos en la dieta proporcionada	
	gestación	Lactancia
BL	2.5	2.5
AL	20	20
BL/AL	2.5	20
AL/BL	20	2.5

Al grupo BL se le proporcionó la dieta purificada con 2.5% de lípidos durante el embarazo y la lactancia, mientras que el grupo AL recibió durante el mismo periodo una dieta con 20% de lípidos, isoenergética con la dieta del grupo BL (Tabla 1).

Los grupos BL/AL y AL/BL recibieron la dieta con 20% de lípidos solo durante una parte del ciclo reproductivo, el primer grupo la recibió durante la lactancia, mientras que el segundo solo la recibió durante el embarazo.

Para diferenciar los efectos de la mayor ingesta energética con los de la mayor ingesta de lípidos, se incluyó en el estudio un grupo de ratas que recibieron la dieta AL pero con un consumo de alimento igualado diariamente con el del grupo BL, a este grupo se le denominó grupo AL-Res.

**2. Registro del consumo de alimento:**

Desde el primer día del embarazo y hasta el día 14 de la lactancia, se registró diariamente el consumo de alimento de la rata madre. Cada animal recibió diariamente 200 g del alimento correspondiente a su grupo de alimentación y el día siguiente, a la misma hora, se colectó el alimento residual. El alimento consumido se calculó a partir de la diferencia entre el alimento colocado y el residual.

**3. Registro del peso de la rata madre y de las crías:**

A partir del primer día del embarazo, se registró diariamente el peso corporal de la rata madre utilizando una báscula electrónica OHAUS con sensibilidad de 1g. El peso de los animales se registró a la misma hora en la que se les proporcionó el alimento.

El día del parto, que fue considerado como el primer día de lactancia, se registró el peso y número de crías de cada rata y se ajustó el tamaño de la camada a ocho crías por rata. A partir del primer día de la lactancia se registró diariamente el peso corporal de la camada utilizando una báscula electrónica OHAUS con sensibilidad de 0.1g.

**4. Obtención de la muestra de leche:**

La leche se colectó entre los días 12 y 14 de lactancia en las ratas de todos los grupos de alimentación. Para los grupos BL y AL la leche se colectó cada cuatro horas en seis subgrupos diferentes (seis animales en cada uno) para cada grupo de alimentación, iniciando con el primer subgrupo a las 7:00 AM de un día y concluyendo con el sexto subgrupo a la misma hora del día siguiente. Las ratas de cada subgrupo fueron ordeñadas una sola vez en todo el periodo de estudio para eliminar los posibles cambios en la composición de la leche ocasionados por la ordeña seriada (10).

Para los animales de los grupos AL/BL, BL/AL y AL-Res se obtuvo una muestra de leche a las 13:00h en 6 animales por grupo.

Las ratas madre se separaron de sus crías 4 h antes de ser ordeñadas, después de este tiempo fueron inyectadas intraperitonealmente con 4 UI de oxitocina y 5 minutos después fueron anestesiadas por la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (35 mg/ kg de peso corporal). La leche se obtuvo mediante la ordeña manual de las regiones mamarias inguinal y pectoral de cada animal. La leche obtenida de todas las tetas se mezcló y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

#### **5. Análisis de la composición de la leche:**

La concentración de proteínas, lípidos totales, lactosa y la composición de los ácidos grasos se determinó en todas las muestras de leche.

El contenido de proteínas se cuantificó por el método de Lowry (61), la concentración de lípidos por gravimetría después de la extracción de los lípidos con cloroformo: metanol (2:1 v/v) (62). El contenido de lactosa se determinó cuantificando la concentración de glucosa por el método de glucosa oxidasa, después de la hidrólisis enzimática de la lactosa (63).

#### **6. Determinación de la producción láctea:**

El volumen de leche producido por las ratas de los cinco grupos experimentales se determinó cuantificando la transferencia de agua tritiada de la madre lactante a las crías (64). La producción de leche se analizó en ocho animales de cada grupo de alimentación entre los días 12 y 14 de lactancia.

Los valores de producción de leche en 24 h, junto con los datos de composición láctea (sección 5), fueron utilizados para calcular la producción en 24 h de lípidos, proteínas y lactosa.

#### **7. Análisis de la composición de los ácidos grasos:**

El tipo de ácido graso presente en los triacilglicérols de la leche y en la grasa de la carcasa de los animales (6 animales por grupo de alimentación) se determinó por cromatografía de gases. Los lípidos de las muestras fueron extraídos con cloroformo: metanol (2:1 v/v) y fueron transesterificados con metanol para ser

identificados como ésteres metílicos (65).

Los ácidos grasos fueron separados en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 utilizando una columna capilar de 100 m de longitud y con CP-Sil 88% como fase estacionaria. Las condiciones de separación fueron las siguientes: temperatura del inyector 270°C, temperatura del detector de ionización de flama 300°C, la temperatura inicial de la columna fue de 105°C durante 22 minutos con un incremento posterior de 15°C cada minuto hasta alcanzar 230°C y mantenerla así durante 15 min.

Se añadió a cada muestra ácido margárico (ácido heptadecanoico) como estándar interno. Los ácidos grasos de las muestras se identificaron por su comparación con los tiempos de retención de estándares de referencia (Poly Science, Illinois USA).

#### **8. Determinación de la composición corporal:**

La composición corporal de la rata madre y de las crías se determinó en seis animales para cada grupo de alimentación en el primer día y al día 14 de lactancia.

Después del sacrificio de la rata madre y de las crías en una cámara de CO<sub>2</sub> los animales fueron eviscerados y se les eliminó la piel y la cabeza. Los tejidos restantes (principalmente masa muscular, ósea y tejido adiposo) fueron nombrados como la carcasa.

La carcasa de la rata madre y de las crías se pesó y se licuó por separado con agua (1:1 p/v). El homogeneizado fue vertido en una charola de aluminio previamente tarada y se colocó dentro de un horno a 100°C hasta obtener un peso constante. El material seco se pulverizó finamente con ayuda de un mortero y el polvo se conservó en frascos de vidrio con tapón de rosca a 4°C, hasta su uso. La diferencia entre el peso húmedo de la carcasa y el peso del polvo se consideró como el contenido de agua.

El contenido de lípidos y nitrógeno se determinó en el polvo obtenido de la carcasa de los animales. El contenido de nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl utilizando un destilador y titulador semiautomático (Tecator modelo 1035) (66). El

contenido de lípidos totales se determinó por gravimetría después de la extracción de los lípidos con éter etílico en caliente y a reflujo durante cuatro horas (Labconco)(66).

### **9. Determinación de la síntesis de lípidos en la glándula mamaria:**

La síntesis de lípidos se cuantificó *in vivo* a través de la incorporación de agua tritiada en los lípidos de la glándula mamaria en 6 animales de cada grupo de alimentación (67).

La cinética de la incorporación de la marca del agua tritiada en los lípidos de la glándula mamaria fue establecida midiendo en diferentes grupos de animales (3 animales por grupo) la incorporación de la marca en los lípidos del tejido durante 15, 30 y 60 minutos después de la administración del agua tritiada. Para determinar la lipogénesis en la glándula mamaria en los animales de los cuatro grupos de alimentación se eligió un tiempo dentro del intervalo lineal de la incorporación de la marca en los lípidos tisulares.

Ocho ratas de cada grupo de alimentación recibieron por inyección intraperitoneal 2 mCi de agua tritiada. Después de 60 minutos, los animales se anestesiaron con la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/ kg de peso corporal) y se tomó una muestra de sangre arterial para determinar la radiactividad específica del agua tritiada en el plasma. Los animales se sacrificaron y la glándula mamaria de las regiones pectoral e inguinal fue disecada y pesada. Los lípidos del tejido fueron extraídos con el procedimiento descrito por Stansbie (68). Brevemente, se pesaron por duplicado aproximadamente 0.5 g de glándula mamaria y se les agregaron 2.5 mL de KOH 6M y 2.5mL de etanol, los tubos se mantuvieron a 70°C durante 2h. Los lípidos saponificados se extrajeron 4 veces con éter de petróleo. El solvente se evaporó a temperatura ambiente bajo la campana de extracción y el contenido de lípidos totales de las muestras se determinó por gravimetría para finalmente determinar la radiactividad de la muestra en un contador de centelleo líquido (Beckman LS6000).

## **10. La actividad de la lipoproteína lipasa:**

### **10.1. Preparación del polvo acetónico:**

Después de la obtención de la muestra de sangre en los animales utilizados en la sección anterior (8 animales por grupo) y antes de su sacrificio, se disecó un fragmento de la glándula mamaria de aproximadamente 1 gramo. El tejido se congeló de inmediato en nitrógeno líquido y se mantuvo congelado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Los tejidos se pulverizaron en un mortero de porcelana, enfriado con nitrógeno líquido sin descongelar el tejido. El tejido pulverizado se pesó, se colocó en tubos de ensayo y se le adicionó acetona enfriada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El polvo se mezcló con la acetona y la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 1800g. Al término de la centrifugación se eliminó la acetona y el procedimiento se repitió 3 veces. El polvo obtenido se lavó con 10 mL de éter etílico, se centrifugó en las mismas condiciones y se decantó cuidadosamente el éter para no resuspender el polvo. El sedimento se secó al vacío y el polvo obtenido se pesó y utilizó para extraer de él a la enzima.

### **10.2 Extracción de la enzima:**

La enzima se extrajo del polvo acetónico utilizando una solución de Tris-HCl 0.05M pH 8 con 1M de etilen glicol. Para eso se adicionó 1mL de la solución por cada 10 mg de polvo acetónico y se mantuvo con agitación constante durante 1 h en hielo. Transcurrido ese tiempo, la mezcla fue centrifugada a 3,000 X g durante 20 minutos y el sobrenadante fue utilizado como fuente de la enzima.

### **10.3. Preparación del sustrato:**

Se pesaron 300 mg de trioleína no marcada con 99% de pureza (Sigma), 0.25 mCi de trioleína tritiada disuelta en tolueno (Dupont) y 18 mg de lecitina (Sigma). El tolueno se evaporó bajo corriente de nitrógeno y se adicionaron 5 mL (6.28 g) de glicerol (Sigma). La mezcla se emulsificó con la ayuda de un homogeneizador Polytron (Brinkmann PT3000) durante 5 minutos a velocidad máxima, manteniéndola en hielo.

La solución de trabajo se preparó diariamente mezclando un volumen de la

solución de trioleína concentrada, 4 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 0.2M, pH 8.0 que contiene 3% de albúmina de suero de bovino libre de ácidos grasos y 1 volumen de suero de rata. Este último se obtuvo de ratas en ayuno de 24 h y se calentó a 60°C durante 10 minutos para eliminar su actividad lipolítica.

#### **10.4. Determinación de la actividad de la lipoproteína lipasa**

La actividad de la LPL se determinó por el método descrito por Nilson-Ehle (69). Se mezclaron 100  $\mu$ L de la solución de sustrato de trabajo con 100  $\mu$ L del extracto enzimático y se incubaron durante 60 minutos a una temperatura de 37 °C. Al término de la incubación se añadieron 3.3 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-heptano 1.41:1.25:1 (v/v/v) y 1 mL de amortiguador de carbonato de potasio 0.05 M, pH 10.5 conteniendo 0.05 M de borato. La mezcla se agitó durante 15 segundos y se centrifugó por 15 minutos a 1800 X g.

Un mL de la fase acuosa se colocó en viales de vidrio a los que se añadió 10 mL de líquido de centelleo y se determinó la radiactividad utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman LS 5000). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Previamente a la determinación de la enzima en la glándula mamaria de las ratas de los diferentes grupos de dieta, se establecieron en nuestro laboratorio las condiciones de concentración de sustrato, pH, concentración de enzima y tiempo necesarias para el estudio óptimo de la actividad enzimática.

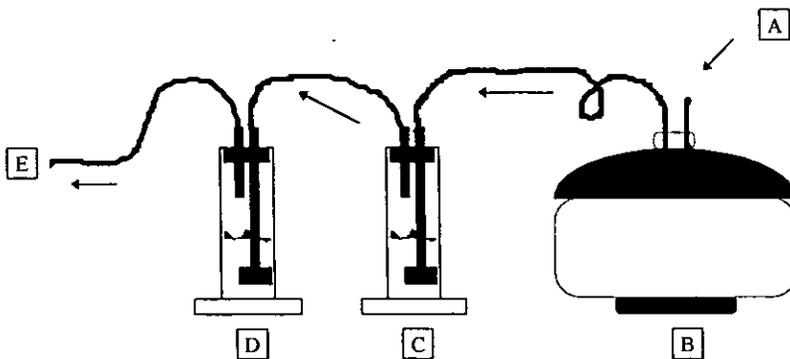
#### **11. Captación de lípidos por la glándula mamaria:**

La captación de lípidos de origen dietético por la glándula mamaria fue evaluada a través de la incorporación de los ácidos grasos de la trioleína radiactiva, administrada por vía bucal en los lípidos de la glándula mamaria y en la leche (70,71). Junto a esa incorporación se valoró la oxidación de los lípidos determinando la producción de  $^{14}\text{CO}_2$ .

Las ratas (6 animales por grupo de dieta) recibieron intragástricamente [1- $^{14}\text{C}$ ]trioleína (0.5g, 0.8 $\mu$ Ci), no se utilizó anestésico para la intubación. Inmediatamente después, las ratas y sus crías fueron colocadas en un desecador

de vidrio conectado a una botella que contenía 30 mL de una solución saturada de KOH para absorber el  $\text{CO}_2$ . La **Figura 1** muestra esquemáticamente el equipo utilizado para la colección de  $\text{CO}_2$ . Se introdujo aire al desecador a una velocidad de 1L / minuto (**Figura 1 A**).

El contenido de la botella (C) se cambió cada hora. Después de 5 h de la administración de la dosis de trioleína, la rata madre se anestesió con la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (60mg/ kg de peso corporal). Después de la toma de muestra de sangre arterial, la rata se sacrificó y se disecó completamente el tracto gastrointestinal, el hígado, el tejido adiposo parametrial y la glándula mamaria de la rata madre. Las crías fueron sacrificadas con éter etílico, se disecó el estómago y el contenido estomacal (cuajo de leche) fue separado y pesado. La carcasa de la rata madre y de las crías se homogeneizó en agua (1:1 p/v). El tracto gastrointestinal materno se homogeneizó con 150 mL de ácido perclórico al 3%.



**Fig. 1.** Sistema diseñado para capturar el  $^{14}\text{CO}_2$  proveniente de la oxidación de la  $^{14}\text{C}$ -trioleína. **A** = entrada de aire al sistema. **B** = desecador donde se coloca a la rata madre con sus crías. **C** = recipiente con solución saturada de KOH. **D** = recipiente con agua. **E** = conexión al vacío.

Muestras por duplicado de fragmentos (aproximadamente 0.5 g) de la glándula mamaria, del hígado y del tejido adiposo materno, del contenido estomacal de las crías y alícuotas (aproximadamente 5g) de los homogeneizados del tracto gastrointestinal y de las carcasas, fueron utilizadas para la extracción de lípidos por el método de Stansbie (68).

Los lípidos extraídos se disolvieron en 10 mL de líquido de centelleo y la radiactividad se cuantificó para determinar los lípidos marcados acumulados por los tejidos.

La absorción de la dosis oral de trioleína se calculó como la diferencia entre la radiactividad en la dosis administrada y la radiactividad en los lípidos presentes en el tracto gastrointestinal materno después de 5 h de la administración de la dosis. La captación de los lípidos por los tejidos se expresó como porcentaje de la dosis absorbida.

El CO<sub>2</sub> capturado en la solución de hidróxido de potasio fue destilado con ácido sulfúrico 2 M y vuelto a capturar en 5 mL de una solución de etanol amina- etilen glicol (1:1). Terminada la destilación se añadió líquido de centelleo a esta solución y se determinó la radiactividad en el contador de centelleo.

## **12. Análisis estadístico:**

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. Las series longitudinales de datos (peso corporal de la rata madre, ingesta de alimento, crecimiento de las crías) se analizaron con una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Tukey. La composición y la producción láctea, la lipogénesis y la captación de lípidos en los cuatro grupos de alimentación fueron comparadas utilizando una prueba de ANOVA (72).

**RESULTADOS:**

**1. La ingesta materna:**

La ingesta de alimento de las ratas de los cuatro grupos experimentales se muestra en la **figura 2**. La ingesta se incrementó progresivamente durante el embarazo en todos los grupos. No se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento durante el embarazo entre los grupos experimentales.

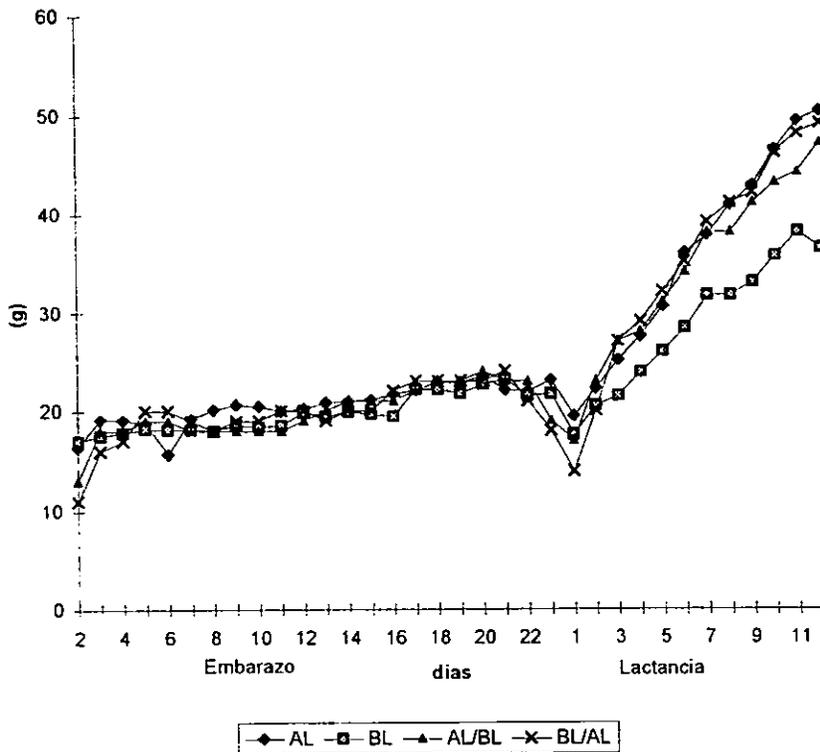
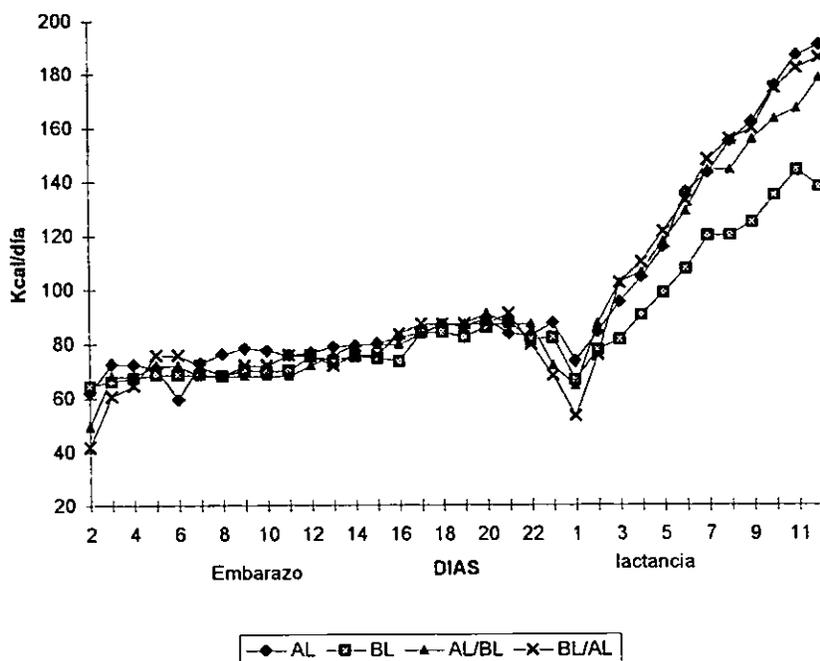


Figura 2. Consumo de alimento de la rata madre durante el embarazo y la lactancia, con una dieta que contiene 20% (AL) o 2.5% (BL) de lípidos. AL n= 38, BL n=39, AL/BL n= 22, BL/AL n= 23. Los valores se presentan como promedio.

La ingesta de alimento de los animales durante la lactancia se incrementó notablemente en todos los grupos, en los primeros cinco días de la lactancia el consumo de alimento no fue significativamente diferente entre los grupos. A partir del sexto día de lactancia, la ingesta de los grupos de ratas que recibieron la dieta alta en lípidos durante alguna etapa de su ciclo reproductivo (grupo AL, BL/AL y AL/BL) fue significativamente mayor en comparación con los animales que recibieron solamente la dieta con un contenido normal de lípidos (grupo BL). La ingesta energética de las ratas durante el embarazo y la lactancia se muestra en la **figura 3**.

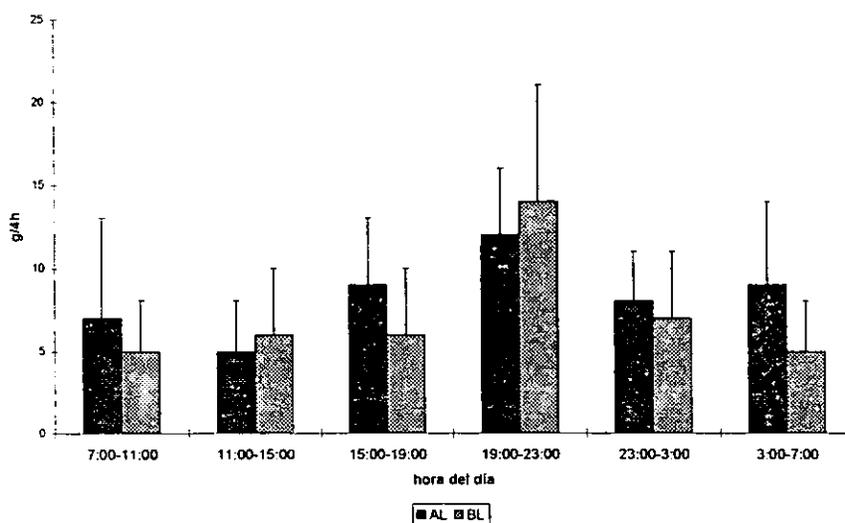


**Figura 3.** Consumo energético de la rata madre durante el embarazo y la lactancia, con una dieta que contiene 20% (AL) o 2.5% (BL) de lípidos. AL n = 38, BL n = 39, AL/BL n = 22, BL/AL n = 23. Los valores se presentan como promedio.

La ingesta energética en todos los grupos presenta los mismos cambios que la ingesta total de alimento debido a que las dietas experimentales se prepararon para mantener la misma densidad energética por gramo de alimento.

## 2. Cambios circadianos en la ingesta de alimento:

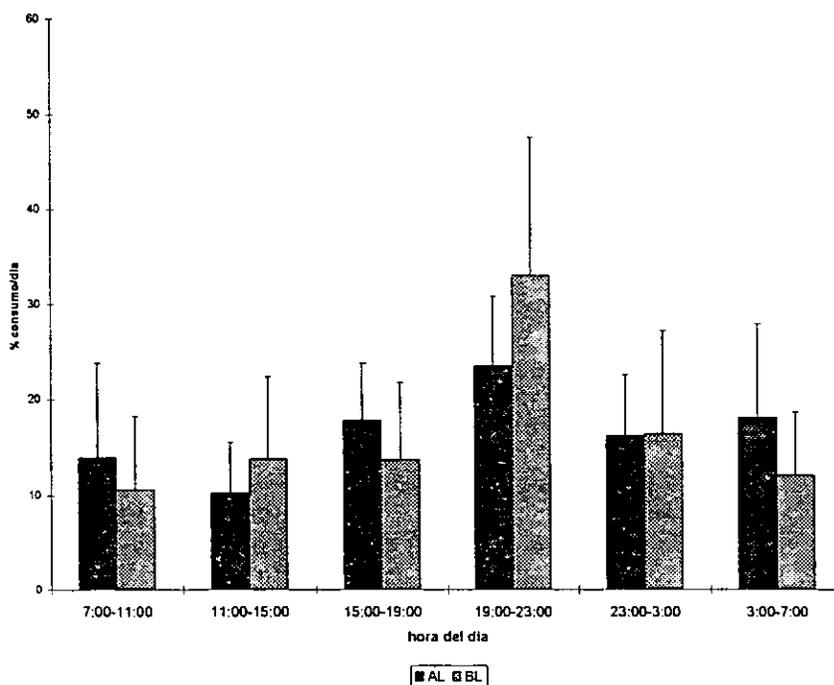
Para conocer si los animales que reciben los diferentes tipos de dieta presentan un diferente patrón de consumo de alimento con relación a la hora del día, se midió en 6 animales del grupo AL y en 6 animales del grupo BL su ingesta de alimento cada cuatro horas durante 24h. En la **figura 4** se muestra el consumo de alimento cada 4h en los animales de los dos grupos de dieta en el día de máxima producción láctea (día 12 de lactancia).



**Figura 4.** Consumo de alimento cada 4h en el día 12 de lactancia en los animales que recibieron la dieta con 20% (AL) o con 2.5% de lípidos (BL). n= 6. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar.

Los animales del grupo AL tuvieron en promedio un consumo de alimento mayor que el grupo BL en 4 de los 6 periodos del día estudiados aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguno de estos periodos.

En la **figura 5** se muestra el consumo de los animales del grupo AL y BL expresado como porcentaje del alimento total consumido durante el día.



**Figura 5.** Consumo de alimento en el día 12 de lactancia en los animales que recibieron una dieta con 20% (AL) o 2.5% (BL) de lípidos. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar (n=6).

Los resultados muestran que no hay diferencias en el patrón circadiano de ingesta del alimento entre el grupo BL y AL. Ambos grupos de animales tuvieron el periodo de mayor ingesta de alimento entre las 19:00 y las 23:00h del día, en este periodo los animales ingirieron del 25 al 30% del total del alimento consumido durante el día. En el periodo de obscuridad (19:00-7:00h), los dos grupos consumieron alrededor del 60% del alimento total ingerido en el día.

El consumo total de alimento, en el día en el que se midió el consumo cada 4 h, no fue diferente al que mostraron los animales un día antes o un día después de la valoración.

### 3. El peso corporal de las crías:

El mayor contenido de lípidos en la dieta de la madre durante la gestación no ocasionó cambios en el peso de las crías al nacimiento o en el número de crías por camada (tabla 3).

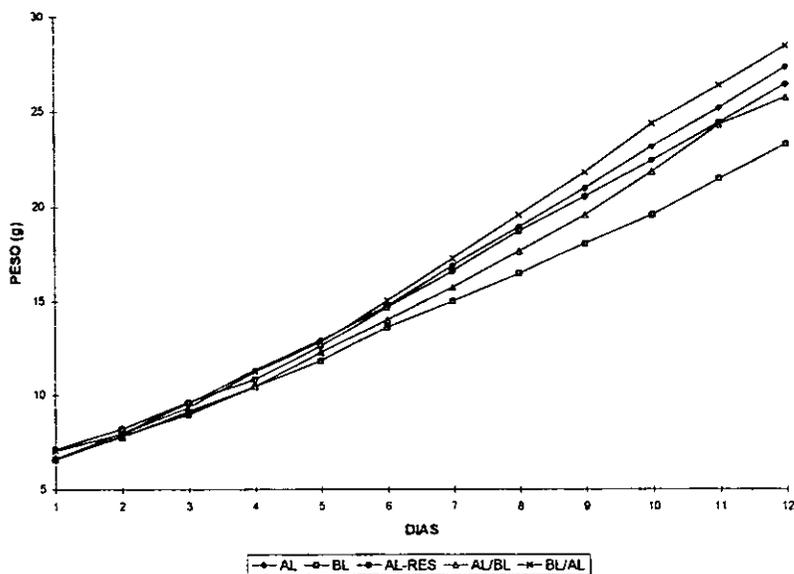
**Tabla 3. Efectos del contenido de lípidos en la dieta de la rata madre sobre el número y peso de las crías al nacimiento.**

Grupo	n	Numero de crías al nacimiento	Peso al nacimiento (g)	
			por camada	por cría
AL	24	10.7 ± 2.3	76.4 ± 9.2	7.1 ± 0.7
BL	19	10.9 ± 2.7	77.9 ± 20.2	7.5 ± 1.3

Los resultados se muestran como promedio ± la desviación estándar.

A partir del octavo día de lactancia, las crías de las ratas que consumieron la dieta con la mayor concentración de lípidos durante alguna de las etapas del ciclo

reproductivo (AL, AL/BL, BL/AL o AL-res) tuvieron un peso corporal significativamente mayor al de las crías del grupo BL (figura 6, tabla 4).



**Figura 6.** Peso corporal de las crías de ratas alimentadas durante el embarazo y la lactancia, con una dieta que contiene 20% (AL) o 2.5% (BL) de lípidos. AL n= 38, BL n=39, AL/BL n= 22, BL/AL n= 23, AL-Res=9. Los valores se presentan como promedio.

Al día 12 de lactancia, el peso corporal de las crías del grupo BL/AL fue 20% mayor que el de las crías del grupo BL. No se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre aquellos grupos que recibieron al menos en una etapa de su ciclo reproductivo el alimento con alta concentración de lípidos aunque el peso corporal promedio de las crías fue mayor cuando sus madres recibieron la dieta AL durante la lactancia.

Las crías de las ratas que recibieron la dieta con alta concentración de lípidos pero cuya ingesta energética fue igualada a la del grupo BL (AL-Res), no mostraron diferencias significativas en su peso corporal en comparación con las ratas que tuvieron además de un mayor consumo de lípidos, un mayor consumo energético (grupo AL).

**Tabla 4. Peso corporal de las crías de ratas alimentadas durante el embarazo y la lactancia una dieta con 2.5% (BL) o 20%(AL) de lípidos.**

Grupo	n	DIA DE LACTANCIA		
		1	6	12
Peso (g)				
AL	38	6.6 ± 0.8	14.7 ± 1.9	27.3 ± 3.4**
BL	39	6.5 ± 1.3	13.6 ± 2.0	23.2 ± 3.7
AL-res	9	7.1 ± 1.1	14.7 ± 0.9	26.4 ± 1.6**
AL/BL	22	6.6 ± 0.6	14.0 ± 1.5	25.7 ± 1.9**
BL/AL	23	7.0 ± 0.3	15.0 ± 1.0	28.4 ± 2.0**

Los valores se muestran como promedio ± la desviación estándar. Los promedios que son significativamente diferentes contra el grupo BL se muestran como \*\*p<0.01.

#### 4. El peso corporal materno:

El peso corporal de la rata madre durante el embarazo y la lactancia en los 5 grupos de animales se muestra en la **figura 7**. El peso corporal de la rata madre aumentó progresivamente durante el embarazo en todos los grupos. No se observaron diferencias significativas en el peso corporal de la madre durante el embarazo o la lactancia entre los grupos con la diferente alimentación, a pesar de que durante la lactancia, la ingesta energética de las ratas alimentadas con la dieta AL fue mayor. Las ratas del grupo AL con ingesta igualada al grupo BL (grupo AL-Res) presentaron una constante disminución en el peso corporal a partir del octavo día de lactancia.

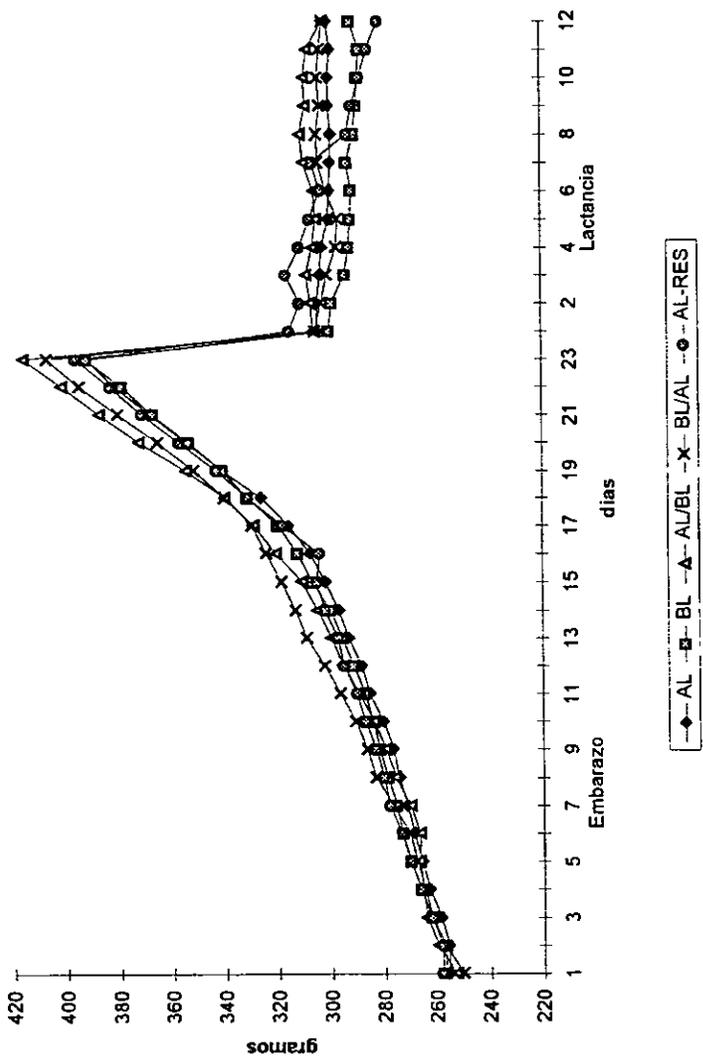


Figura 7. Peso corporal de la ratas madre durante el embarazo y la lactancia, con una dieta que contiene 20% (AL) o 2.5% (BL) de lípidos. AL n = 38, BL n = 39, AL/BL n = 22, BL/AL n = 23, AL-Res n = 9. Los valores se presentan como promedio.

### 5. La composición de la leche:

Los cambios circadianos en la concentración de los principales macronutrientes de la leche se estudió en 36 ratas del grupo AL y en 36 animales del grupo BL. La concentración de lípidos, lactosa y proteína en la leche de los animales de ambos grupos en relación con la hora del día, se muestra en la **tabla 5**.

**Tabla 5. Efecto de la hora del día sobre la composición de la leche en ratas lactantes alimentadas con una dieta baja (2.5% BL) o alta (20% AL) en lípidos.**

Hora	AL			BL		
	Lípidos	Proteína g/L	Lactosa	Lípidos	Proteína g/L	Lactosa
7:00	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.1 ± 0.01	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.2 ± 0.01
11:00	1.5 ± 0.5	1.0 ± 0.3	0.2 ± 0.01	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.01
15:00	1.4 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.01
19:00	1.4 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.2 ± 0.01	1.4 ± 0.5	0.8 ± 0.1	0.1 ± 0.01
23:00	1.6 ± 0.01	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0.01	1.4 ± 0.4	0.9 ± 0.2	0.1 ± 0.1
3:00	1.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.2 ± 0.01	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.1 ± 0.01

Los resultados se muestran como promedio ± la desviación estándar de los valores obtenidos con seis animales por subgrupo.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de ninguno de los macronutrientes de la leche con relación a la hora del día.

En la **tabla 6** se muestra la composición de la leche obtenida a la 13:00 h en todos los grupos de dieta. El contenido de lípidos en la leche de los animales solo fue significativamente mayor en el grupo AL en comparación con el grupo BL. No

se observaron diferencias en el contenido de proteínas y lactosa entre los grupos de dieta.

**Tabla 6. Concentración de los principales macronutrientes en la leche de ratas alimentadas en el embarazo y/o la lactancia con dietas con 2.5% o 20% de lípidos.**

Grupo	n	Lípidos	Proteína	Lactosa
		g/L		
AL	12	1.44 ± 0.16*	0.89 ± 0.25	0.16 ± 0.05
BL	12	1.18 ± 0.18	0.85 ± 0.14	0.14 ± 0.05
AL/BL	6	1.08 ± 0.09	0.97 ± 0.27	0.19 ± 0.03
BL/AL	6	1.25 ± 0.25	0.90 ± 0.10	0.22 ± 0.06
AL-res	6	1.37 ± 0.14	1.03 ± 0.24	0.20 ± 0.05

Los valores se muestran como promedio ± la desviación estándar. Las diferencias que son estadísticamente diferentes contra el grupo BL se muestran como: \* p<0.05

## 6. La producción de leche:

El volumen de leche y la producción por 24 h de lípidos, proteínas y lactosa en leche se muestran en la **tabla 7**. La producción de los macronutrientes de la leche se calculó utilizando los datos de composición láctea y los valores de producción láctea obtenidos para cada animal.

Las ratas que consumieron a libre demanda la dieta AL durante el embarazo y la lactancia o solamente durante una etapa del ciclo reproductivo produjeron un mayor volumen de leche en comparación con el grupo BL.

La producción diaria de lípidos en la leche fue significativamente mayor en el grupo AL y BL/AL en comparación con el grupo BL. La producción diaria de lactosa y proteína en la leche fue significativamente mayor en los grupos de animales que recibieron la dieta alta en lípidos en cualquier momento de su ciclo reproductivo, en comparación con el grupo BL. No se presentaron diferencias significativas en la producción de lactosa y proteína entre los grupos AL y AL-res.

**Tabla 7. Volumen de leche y producción de lípidos, lactosa y proteínas en la leche de los animales alimentados con una dieta que contiene 2.5% (BL) o 20% de lípidos (AL).**

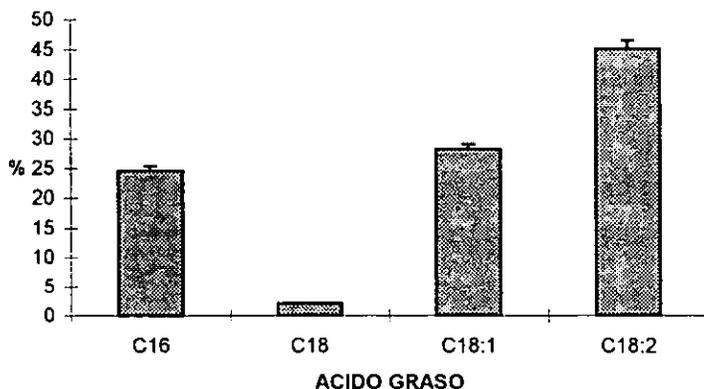
Grupo	n	Volumen mL/día	Producción por día			
			Lípidos	Proteína	Lactosa	Energía
			g/día			
			Kcal/día			
AL	12	44.6 ± 5.9*	6.5 ± 0.9 ***	3.9 ± 0.5**	0.7 ± 0.1**	76.7 ± 10.1***
BL	12	37.5 ± 6.7	4.5 ± 0.8	3.2 ± 0.6	0.5 ± 0.1	55.4 ± 9.9
AL/BL	6	50.2 ± 7.3**	5.4 ± 0.8	4.9 ± 0.7***	0.9 ± 0.1***	72.1 ± 10.5**
BL/AL	6	54.9 ± 3.2***	6.9 ± 0.4***	5.0 ± 0.3***	1.2 ± 0.1***	86.6 ± 5.1***
AL-res	6	37.2 ± 6.1	5.1 ± 0.8	4.0 ± 0.7*	0.7 ± 0.1**	64.8 ± 10.1

Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar (n=6). Los resultados que son estadísticamente diferentes al grupo BL se muestran como: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001

La producción diaria de energía en la leche fue significativamente mayor en los grupos de ratas que recibieron a libre demanda la dieta AL en cualquier momento de su ciclo reproductivo, en comparación con el grupo BL.

### 7. Composición de ácidos grasos en la dieta y en la leche:

La composición de los ácidos grasos del aceite de maíz utilizado para la preparación de las dietas se muestra en la **figura 8**.



**Figura 8.** Composición de los ácidos grasos en el aceite de maíz. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  la desviación estándar,  $n=6$ .

En el aceite de maíz, tres cuartas partes de los ácidos grasos tienen 18 carbonos. El ácido hexadecanoico contribuye con una cuarta parte de los ácidos grasos presentes en el aceite de maíz.

La composición de ácidos grasos de la leche obtenida cada 6h en los animales de los grupos AL y BL se muestra en la **tabla 8**. En las **figuras 8 a la 12** se muestran gráficamente estos resultados.

No se observaron variaciones circadianas en el tipo de ácido graso presente en la leche en el grupo de ratas BL. En el grupo AL el porcentaje de los ácidos grasos de 8, 10 y 12 carbonos aumentó entre las tres y las once de la mañana, disminuyó notablemente para las tres de la tarde y de esta hora hasta las once de la noche se incrementó nuevamente. Los ácidos grasos de más de 16 carbonos no mostraron cambios con relación a la hora del día en el grupo AL.

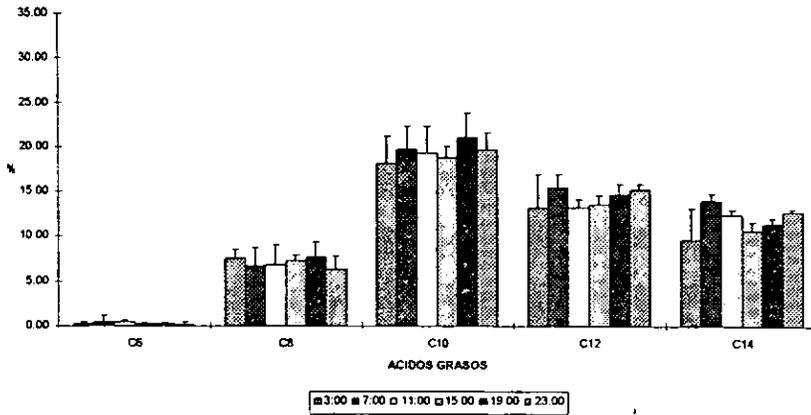
Tabla 7. Efecto de la hora del día sobre la composición de los ácidos grasos contenidos en la leche de las ratas alimentadas con dietas que contienen 2.5% (BL) o 20% (AL) de lípidos.

GRUPO AL		%C6	%C8	%C10	%C12	%C14	%C16	%C18	%C18:1	%C18:2
Hora del día										
7:00	1.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	6.5 ± 1.8 <sup>ab</sup>	10.4 ± 2.4 <sup>a</sup>	4.6 ± 1.3	2.6 ± 0.8	9.3 ± 0.5	2.8 ± 0.2	22.7 ± 3.0		39.4 ± 2.8 <sup>abc</sup>
11:00	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	7.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	11.0 ± 2.7 <sup>ab</sup>	4.5 ± 0.8	2.6 ± 0.5	9.9 ± 0.5	3.0 ± 0.3	22.5 ± 2.3		38.1 ± 3.8 <sup>abc</sup>
15:00	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	5.0 ± 1.1 <sup>c</sup>	2.4 ± 0.9	1.7 ± 0.8	10.7 ± 1.3	5.9 ± 4.6	27.5 ± 3.3		42.7 ± 2.2 <sup>a</sup>
19:00	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	4.1 ± 1.6 <sup>ab</sup>	6.1 ± 2.4 <sup>abc</sup>	2.7 ± 1.1	1.7 ± 0.6	11.4 ± 1.2	3.7 ± 0.5	28.0 ± 2.2		41.9 ± 3.9 <sup>abc</sup>
23:00	0.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	6.3 ± 1.3 <sup>ab</sup>	9.3 ± 1.8 <sup>abc</sup>	4.0 ± 0.6	2.2 ± 0.3	10.9 ± 2.9	3.2 ± 0.1	28.1 ± 8.0		35.7 ± 6.0 <sup>b</sup>
3:00	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.8 <sup>ab</sup>	7.9 ± 1.2 <sup>bc</sup>	4.1 ± 0.5	2.8 ± 0.4	10.4 ± 0.9	3.1 ± 0.3	23.3 ± 2.2		43.2 ± 3.9 <sup>ca</sup>

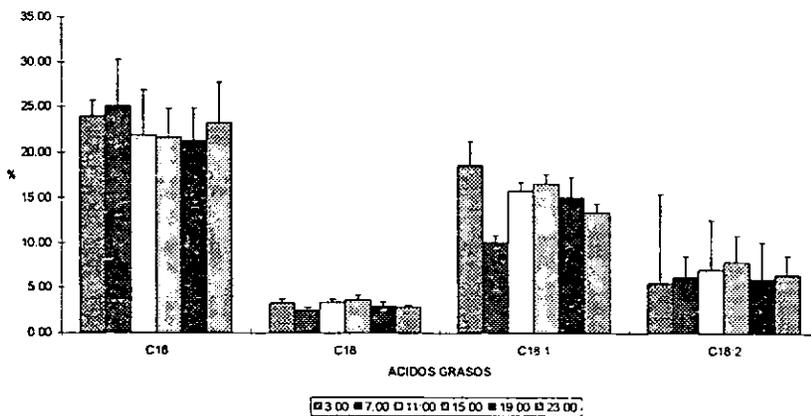
**GRUPO BL**

GRUPO BL		%C6	%C8	%C10	%C12	%C14	%C16	%C18	%C18:1	%C18:2
Hora del día										
7:00	0.4 ± 0.01	6.1 ± 1.3	19.7 ± 2.6	15.5 ± 1.0	13.8 ± 1.2	25.1 ± 4.6	2.5 ± 0.3	10.1 ± 2.1		6.2 ± 0.7
11:00	0.4 ± 0.2	6.8 ± 0.6	19.2 ± 1.4	13.2 ± 2.6	12.3 ± 1.4	21.9 ± 4.5	3.4 ± 0.3	15.8 ± 5.0		7.1 ± 0.9
15:00	0.2 ± 0.3	7.2 ± 0.6	18.7 ± 1.6	13.5 ± 0.6	10.6 ± 0.8	21.7 ± 2.9	3.7 ± 0.5	16.6 ± 2.8		7.9 ± 0.9
19:00	0.2 ± 0.2	7.6 ± 1.9	21.1 ± 2.3	14.6 ± 1.3	11.3 ± 1.7	21.3 ± 3.3	3.0 ± 0.4	15.1 ± 3.8		6.0 ± 2.0
23:00	0.2 ± 0.2	6.3 ± 1.7	19.6 ± 2.9	15.1 ± 0.9	12.7 ± 1.4	23.2 ± 4.1	2.9 ± 0.2	13.5 ± 2.0		6.5 ± 0.8
3:00	0.2 ± 0.2	7.6 ± 0.8	18.1 ± 2.7	13.1 ± 3.4	9.6 ± 3.1	24.0 ± 1.5	3.3 ± 0.4	18.6 ± 8.9		5.6 ± 2.3

Los resultados se muestran como promedio ± la desviación estándar, n=36. Los valores que no comparten superíndices son diferentes p<0.01



**Figura 9.** Efecto de la hora del día en la composición de los ácidos grasos de 8 a 14 átomos de carbono contenidos en la leche de ratas alimentadas con una dieta con 2.5% (BL) de lípidos, n=36.



**Figura 10.** Efecto de la hora del día en la composición de los ácidos grasos de 16 a 18 átomos de carbono contenidos en la leche de ratas alimentadas con una dieta con 2.5% (BL) de lípidos, n=36.

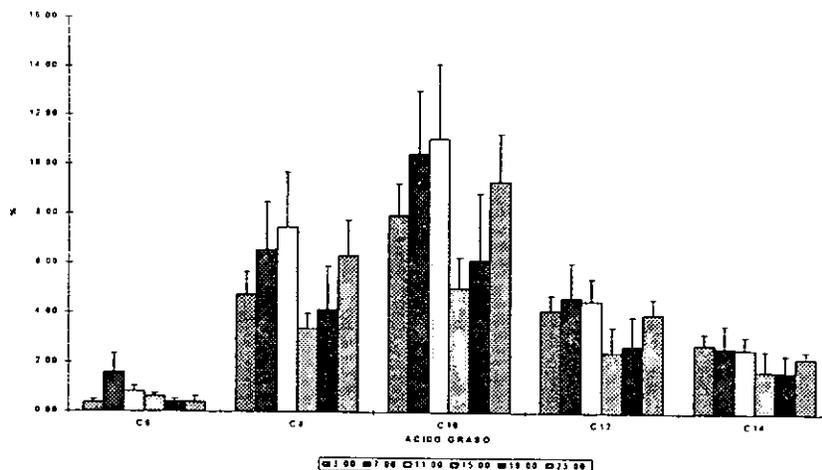


Figura 11. Efecto de la hora del día en la composición de los ácidos grasos de 8 a 14 átomos de carbono contenidos en la leche de ratas alimentadas con una dieta con 20% (AL) de lípidos, n=36.

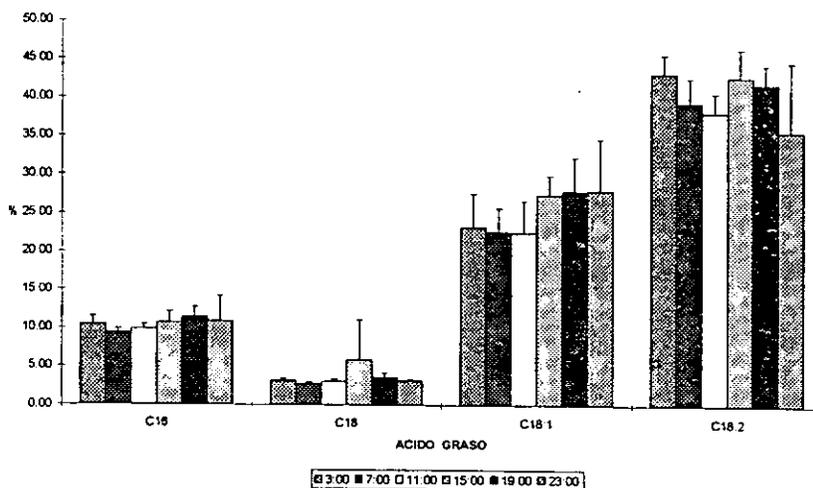
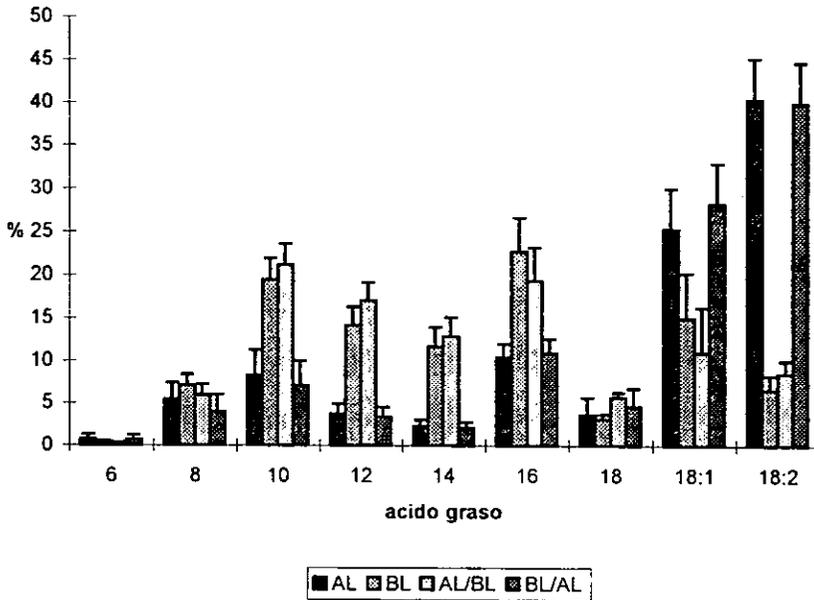


Figura 12. Efecto de la hora del día en la composición de los ácidos grasos de 16 a 18 átomos de carbono contenidos en la leche de ratas alimentadas con una dieta con 20% (AL) de lípidos, n=36.

La **figura 13** muestra los valores promedio de cada ácido graso para los cuatro grupos de animales.



**Figura 13.** Composición de ácidos grasos en los lípidos de la leche obtenida de ratas que recibieron dietas con niveles contrastantes de lípidos durante el embarazo y la lactancia. Los valores se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar AL n = 36, BL n = 36, AL/BL n = 6, BL/AL n = 6.

La composición de ácidos grasos en los lípidos de la leche fue diferente entre los grupos de alimentación dependiendo del tipo de dieta que la rata madre recibió durante la etapa de lactancia. No se encontraron diferencias entre los grupos BL y AL/BL o entre los grupos AL y BL/AL.

La leche de aquellos animales que recibieron la dieta con elevado contenido de lípidos durante la lactancia (grupos AL y BL/AL) muestra un predominio de los ácidos oleico y linoléico que son los mismos que predominan en el aceite de maíz que se utilizó como fuente de lípidos en la preparación de las dietas, mientras que

la leche de los animales que recibieron la dieta con bajo contenido de lípidos durante la lactancia (grupo BL y AL/BL) mostró un predominio de los ácidos grasos con menos de 18 carbonos (C8-C16).

El porcentaje de ácidos grasos de 6 a 16 carbonos se sumó y se utilizó como un indicador de la síntesis de ácidos grasos por la glándula mamaria, mientras que la suma de los ácidos grasos de 18 carbonos se utilizó como un indicador de la captación de lípidos por la glándula mamaria (tabla 9).

**Tabla 9. Porcentaje y secreción de ácidos grasos de cadena media y larga en la leche de animales lactantes con dietas contrastantes en su contenido de lípidos.**

Grupo	%	%	Secreción de ácidos grasos g/día	
			C6-C16	C18
AL	30.8 ± 6.4***	69.2 ± 6.4***	2.0 ± 0.4***	4.5 ± 0.4***
BL	75.4 ± 5.3	24.6 ± 5.2	3.5 ± 0.2	1.1 ± 0.24
AL/BL	76.3 ± 4.5	23.7 ± 4.5	4.1 ± 0.2**	1.3 ± 0.2
BL/AL	27.4 ± 3.7***	72.6 ± 3.7***	1.9 ± 0.2***	5.0 ± 0.2***

Los valores son promedio ± desviación estándar. Las diferencias significativas con el grupo BL se muestran como: \*\* p<0.05, \*\*\*p<0.001

La leche de los animales que consumieron la dieta AL durante la lactancia (AL y BL/AL) presentó una mayor proporción de ácidos grasos de cadena larga (C18, C18:1, C18:2) que los grupos que recibieron la dieta BL durante el mismo periodo (BL y AL/BL). En contraste, estos últimos grupos presentaron una mayor proporción de ácidos grasos de cadena media (C6-C14) en comparación con los grupos de animales que recibieron la dieta AL durante la lactancia.

De acuerdo con el análisis de la composición de los ácidos grasos en la leche, en los animales que consumieron la dieta AL durante el periodo de lactancia, alrededor del 70% de los ácidos grasos presentes en la leche provienen de la captación de los ácidos grasos de la circulación y un 30% de la síntesis *de novo* en la glándula mamaria, mientras que para los grupos de ratas que consumieron la dieta BL durante la lactancia, esta relación se invierte y más del 70% de los ácidos grasos en la leche provienen de la síntesis por la glándula mamaria y el resto proviene de la captación de los ácidos grasos de la circulación.

#### **8. La composición corporal materna:**

La composición corporal de los animales de los diferentes grupos experimentales determinada el día del parto y al día 14 de la lactancia se muestra en la **tabla 10**.

Se observa que las ratas que recibieron la dieta AL durante el embarazo, tienen en el día 1 de lactancia un porcentaje de lípidos significativamente mayor en comparación con las ratas que recibieron la dieta BL durante el embarazo.

El porcentaje de lípidos en la carcasa de las ratas en el día 14 de la lactancia no mostró diferencias significativas entre los grupos. El contenido de grasa corporal de los grupos BL, AL y AL/BL disminuyó significativamente del día 1 al día 14 de la lactancia. El grupo BL/AL no mostró diferencias significativas en el contenido de grasa la carcasa de la madre entre el día 1 y el 14 de lactancia.

**Tabla 10. Efecto del contenido de lípidos en la dieta de la rata madre sobre su composición corporal al inicio y al día 14 de lactancia.**

Grupo	n	Día 1		Día 14	
		% Lípidos	% Proteína	% Lípidos	% Proteína
AL	6	5.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	19.2 ± 0.9	3.6 ± 0.9**	18.9 ± 2.3
BL	6	4.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	19.8 ± 1.2	3.2 ± 0.8**	19.9 ± 0.6
AL/BL	6	5.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	19.2 ± 0.9	4.1 ± 0.9*	20.4 ± 0.7
BL/AL	6	4.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	19.8 ± 1.2	4.4 ± 0.9	19.5 ± 1.3

Los valores se muestran como promedios ± desviación estándar. Las diferencias significativas entre el día 1 y 14 de lactancia se muestran como \*p<0.05, \*\*p <0.01. Los valores entre grupos de alimentación que no comparten superíndices son diferentes p< 0.05

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas en la carcasa de los animales del día 1 o del día 14 de lactancia.

### 9. La composición corporal de las crías:

En la **tabla 11** se muestra la composición de la carcasa de las crías de los diferentes grupos.

Se observa que la concentración de lípidos y de proteínas en la carcasa de las crías al nacimiento no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos, mientras que en el día 14 de lactancia las crías cuyas madres recibieron la dieta con elevado contenido de lípidos al menos durante una parte de su ciclo reproductivo, tuvieron una concentración de lípidos en su carcasa significativamente mayor con relación a las crías del grupo BL.

**Tabla 11. Efecto del contenido de lípidos en la dieta de la rata madre durante el embarazo o la lactancia sobre la composición corporal de las crías.**

Grupo	n	Día 1		Día 14	
		% lípidos	% proteína	% lípidos	% proteína
AL	6	1.0 ± 0.2	9.3 ± 0.4	8.5 ± 0.4***	13.1 ± 0.8
BL	6	1.0 ± 0.3	9.8 ± 0.3	5.4 ± 0.9	13.1 ± 0.5
AL/BL	6	1.0 ± 0.2	9.3 ± 0.4	7.0 ± 1.1***	13.9 ± 1.1
BL/AL	6	1.0 ± 0.3	9.8 ± 0.3	8.7 ± 1.4***	13.6 ± 0.3

Los valores se muestran como promedios ± desviación estándar. Las diferencias significativas con el grupo BL se muestran como : \*\*\*p<0.001

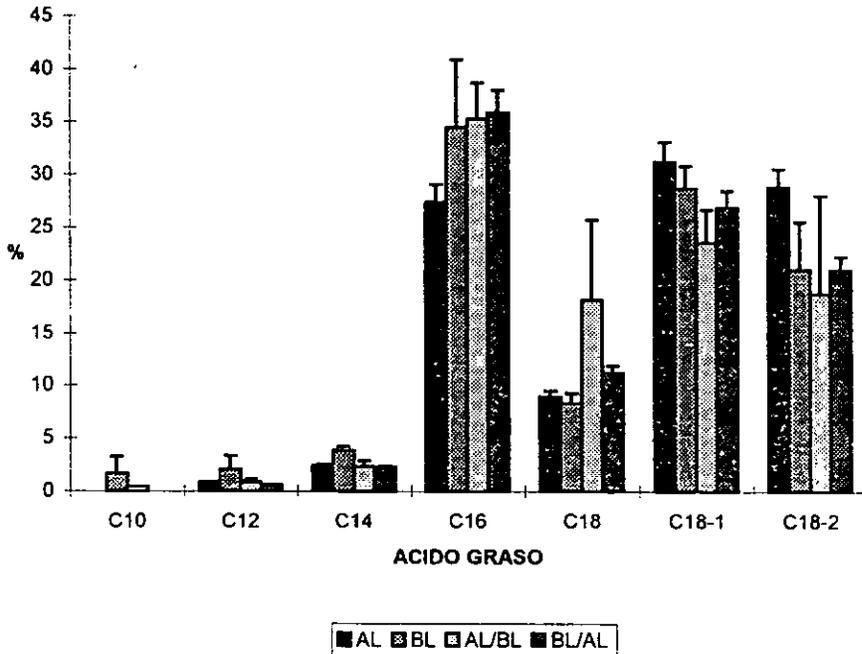
La comparación de la composición corporal de las crías los días 1 y 14 de la lactancia muestra un aumento significativo de la concentración de proteínas en todos los grupos, pero no existen diferencias significativas en la concentración de proteína de la carcasa de las crías de la misma edad.

#### **10. La composición de ácidos grasos en los lípidos corporales en la rata madre y de las crías:**

La composición de ácidos grasos en la carcasa de la rata madre se muestra en la **figura 14**.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en la composición de ácidos grasos en los lípidos de la carcasa de la rata madre. En

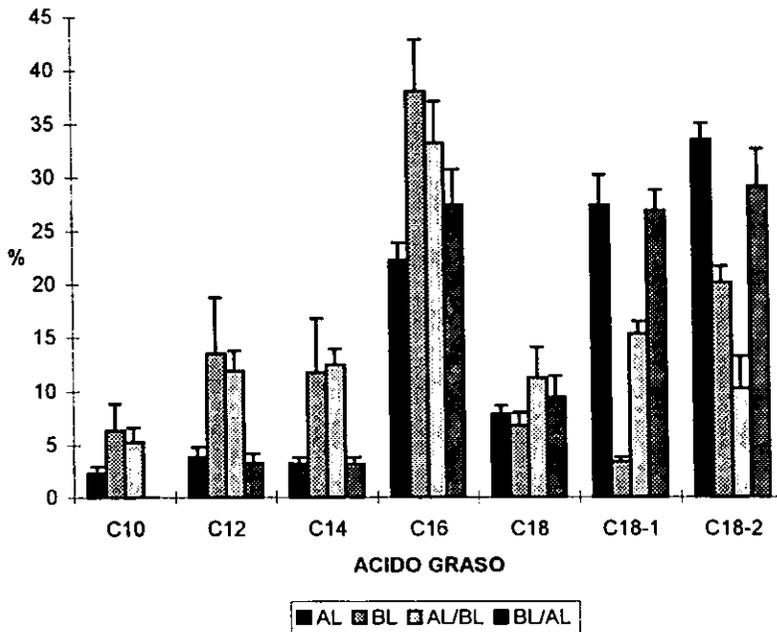
todos los grupos predominaron el ácido palmítico, el esteárico, el oleico y el linoléico.



**Figura 14.** Composición de ácidos grasos en los lípidos de la carcasa de la rata madre. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  la desviación estándar, n=6.

En la **figura 15** se muestra la composición de ácidos grasos en los lípidos del carcass de las crías de todos los grupos de alimentación.

El porcentaje de los ácidos grasos con 10, 12, 14 y 16 carbonos fue mayor en los lípidos del carcass de las crías cuyas madres recibieron la dieta BL durante la lactancia en comparación con el de las crías de los grupos AL y BL/AL, en donde el porcentaje de ácidos grasos de 18 carbonos fue mayor.



**Figura 15.** Composición de ácidos grasos en los lípidos de la carcasa de las crías a los 14 días de edad.

Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar.

La **tabla 12** muestra los resultados cuando los ácidos grasos se agrupan en cadena media y en cadena larga.

El porcentaje de ácidos grasos de cadena media en las ratas que recibieron la dieta AL durante la lactancia fue significativamente menor y el de los ácidos grasos de cadena larga mayor, en comparación con los valores mostrados por los grupos alimentados con la dieta BL durante la lactancia.

**Tabla 12. Efecto del contenido de lípidos en la dieta de la rata madre sobre la composición de ácidos grasos en la carcasa de las crías a los 14 días de edad.**

Grupo	Porcentaje	
	C6-C16	C18-C18:2
AL	31.4 ± 3.0***	68.4 ± 3.1***
BL	69.4 ± 4.3	30.2 ± 6.7
AL/BL	62.7 ± 3.6	36.6 ± 3.9
BL/AL	33.6 ± 4.7***	65.2 ± 5.2***

Los valores son promedio ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas contra el grupo BL se muestran como: \*\*\*p<0.001, n=6.

### 11. La lipogénesis en la glándula mamaria:

La **figura 16** muestra la secuencia de incorporación del agua tritiada en los lípidos de la glándula mamaria en el día 12 de lactancia en las ratas de los grupos AL y BL.

La incorporación de la marca en la glándula mamaria del grupo BL aumenta rápidamente en los primeros 30 minutos (90 nmoles/g tejido) y se estabiliza después de este tiempo, mientras que en el grupo AL la incorporación de la marca en los lípidos es lenta y su máximo valor (35 nmoles/g tejido) no alcanza los valores máximos del grupo BL. Se eligió hacer las determinaciones de la lipogénesis en la glándula mamaria en todos los grupos experimentales a los 60 minutos para permitir a las ratas del grupo AL tener una incorporación de agua tritiada en los lípidos de la glándula mamaria que nos permita su cuantificación.

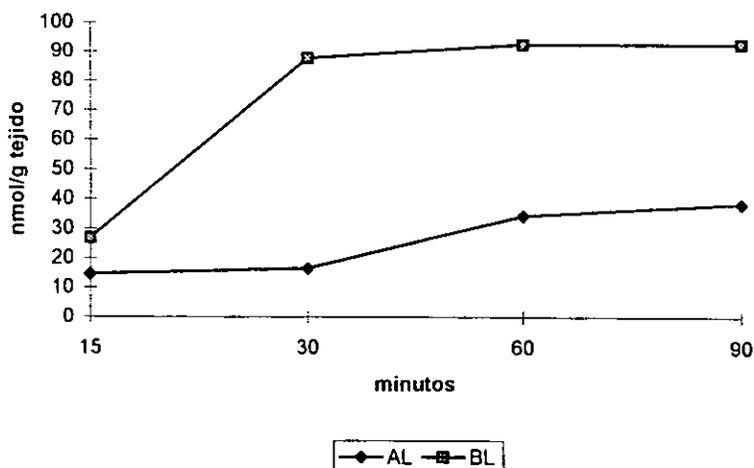


Fig. 16 Incorporación de agua tritiada a los lípidos de la glándula mamaria de las ratas alimentadas con una dieta con 20% (AL) o 2.5% de lípidos (BL), n=3 por punto.

En la tabla 13 se muestra la lipogénesis en la glándula mamaria de los animales de los grupos AL y BL.

Tabla 13. Efecto del contenido de lípidos en la dieta de la rata lactante sobre el contenido y la síntesis de lípidos en la glándula mamaria.

Grupo	Peso tejido (g)	% lípidos	Lipogénesis	
			$\mu\text{mol } ^3\text{H}_2\text{O}/\text{h/g}$	$\mu\text{mol } ^3\text{H}_2\text{O}/\text{tejido total}$
AL	15.50 $\pm$ 1.90	16.19 $\pm$ 5.01	22.9 $\pm$ 15.0 **	348.05 $\pm$ 221.01 **
BL	15.23 $\pm$ 2.36	19.03 $\pm$ 8.76	88.3 $\pm$ 33.3	1242.7 $\pm$ 385.10

Los valores son promedios  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias estadísticas contra el grupo BL se muestran como: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , n=6.

Los animales que recibieron la dieta BL tuvieron una lipogénesis significativamente mayor en comparación con el grupo AL. No se encontraron diferencias significativas en el tamaño del tejido o en su contenido de lípidos.

## 12. Actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria:

El efecto de la concentración del sustrato, concentración de proteína, pH y tiempo sobre la actividad de la lipoproteína lipasa se evaluó en experimentos separados y los resultados se muestran en la figura 17.

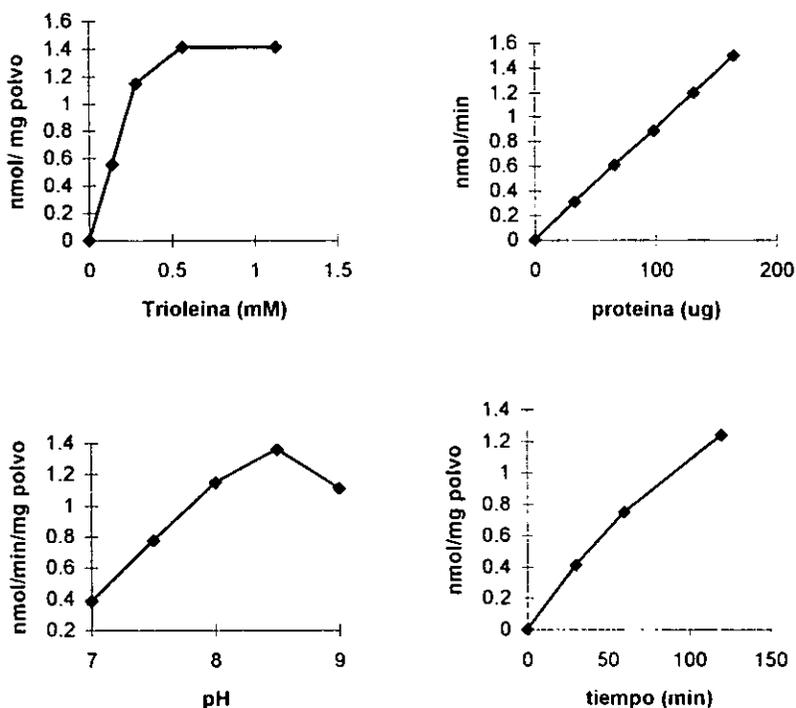


Fig. 17 Actividad de la lipoproteína lipasa. Efecto de la concentración de sustrato, la concentración de enzima, pH y tiempo.

De acuerdo con esos resultados, las condiciones elegidas par la determinación de la enzima fueron pH 8.5 Tris-HCl 0.07M, 1.13 mM de trioleina, 30-200 µg de proteína y un tiempo de incubación de 30 minutos.

En la **tabla 14** se muestra la actividad de la Lipoproteína lipasa determinada en la glándula mamaria de los animales de los grupos AL y BL.

**Tabla 14. Efecto de la ingesta de una dieta con alto o bajo contenido de lípidos durante la gestación y la lactancia de la rata sobre la actividad de lipoproteína lipasa en la glándula mamaria.**

Actividad de la lipoproteína lipasa				
Grupo	n	nmol ác. oleico/min/ mg proteína	nmol ác. oleico/min/ mg polvo acetónico	µmol ác. oleico/min/ tejido total
AL	9	19.6 ± 7.5	2.87 ± 0.41 **	7.03 ± .91 **
BL	10	16.9 ± 4.3	2.19 ± 0.43	5.67 ± 1.24

Los valores son promedios ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas contra el grupo BL se muestran como: \*\*p< 0.01

No se encontraron diferencias entre los grupos en la actividad específica de la enzima; sin embargo, la actividad expresada por mg de polvo acetónico o por tejido total fue significativamente mayor en el grupo AL.

### **13. Utilización materna y transferencia a las crías de 1-<sup>14</sup>C trioleina administrada oralmente a la rata madre:**

La absorción de la dosis oral de trioleina marcada fue significativamente mayor en las ratas con la dieta AL en comparación con las ratas del grupo BL (**tabla 15**).

Para corregir las diferencias en la absorción entre los grupos experimentales, todos los resultados se expresaron como porcentaje de la dosis absorbida.

La incorporación de la [ $1-^{14}\text{C}$ ] trioleína en la glándula mamaria de la rata madre y su transferencia a las crías se muestra en la **tabla 15**.

**Tabla 15. Efecto del contenido de lípidos en la dieta de la rata lactante sobre la absorción y acumulación en la glándula mamaria de la [ $1-^{14}\text{C}$ ] trioleína.**

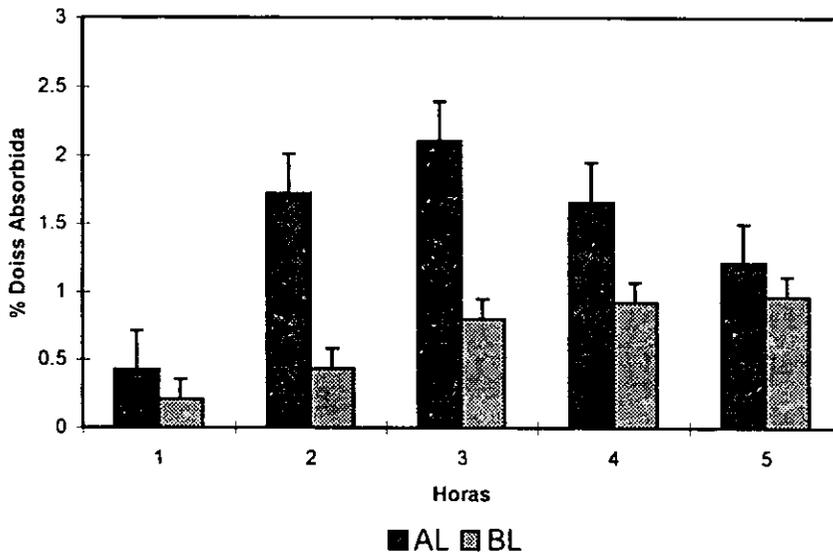
Grupo	Absorción de la dosis de [ $^{14}\text{C}$ ]trioleína (%)	Acumulación total de [ $^{14}\text{C}$ ]-lípidos (% dosis absorbida / tejido total)			
		Glándula mamaria	Cuajo de leche	Carcasa de las crías	Cuajo de leche + carcass de crías
AL	89.1 ± 7.3*	23.8 ± 7.9	15.7 ± 7.4	7.1 ± 3.5*	22.9 ± 9.1*
BL	77.8 ± 10.3	28.5 ± 7.6	11.0 ± 5.2	4.6 ± 1.8	15.6 ± 6.2

Los resultados son promedios ± la desviación estándar, n=6. Las diferencias significativas entre grupos de dieta se muestran como: \* p<0.05

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la acumulación de los lípidos radiactivos en la glándula mamaria o en el cuajo de leche obtenido del estómago de las crías. La acumulación de la [ $1-^{14}\text{C}$ ]trioleína en el carcass de las crías fue significativamente mayor en el grupo AL. La suma de la marca radiactiva transferida a las crías fue significativamente mayor en el grupo de ratas que recibieron la dieta AL.

#### 14. La producción de $^{14}\text{CO}_2$ y la acumulación de $^{14}\text{C}$ lípidos en el hígado y en el tejido muscular de la rata madre.

La producción de  $^{14}\text{CO}_2$  durante las 5 h posteriores a la administración de la [1- $^{14}\text{C}$ ] trioleína en las ratas que recibieron la dieta AL o BL durante la lactancia se muestra en la **figura 18**.



**Figura 18** Producción de  $^{14}\text{CO}_2$  en las ratas alimentadas con dietas con 20% (AL) o con 2.5% (BL) de lípidos. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran como \*  $p < 0.01$ ,  $n = 6$

En las ratas pertenecientes al grupo AL, la oxidación de la [1- $^{14}\text{C}$ ]trioleína es mayor desde la primera hora y se obtiene un máximo entre la segunda y la cuarta hora después de administrar la dosis. A la segunda hora existe una diferencia muy importante entre los grupos, las ratas del grupo AL alcanzaron

un  $1.72\% \pm 0.5$  contra únicamente  $0.44\% \pm 0.17$  en el grupo de ratas BL ( $p < 0.001$ ). En este último grupo la oxidación de la  $[1-^{14}\text{C}]$ trioleína en las ratas aumenta paulatinamente durante las cinco horas y durante este periodo no se pudo determinar el tiempo en donde se presenta el máximo de oxidación de la dosis.

En la **tabla 16** se muestran los valores acumulados de producción de  $^{14}\text{CO}_2$  durante las 5 horas del estudio en los dos grupos de animales.

**Tabla 16. Efecto del contenido de lípidos en la dieta de la rata lactante sobre la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  y la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -trioleína en el hígado, el carcass y el tejido adiposo parametrial de la rata lactante.**

Grupo	Producción de $\text{CO}_2$ (% dosis absorbida)	Acumulación de $^{14}\text{C}$ -lípidos (% dosis absorbida / tejido)		
		Hígado	Carcasa	Tejido adiposo parametrial
AL	$7.13 \pm 2.16^{**}$	$3.45 \pm 1.0^*$	$4.31 \pm 1.5$	$0.13 \pm 0.15$
BL	$3.33 \pm 1.49$	$5.18 \pm 2.0$	$4.92 \pm 1.7$	$0.15 \pm 0.06$

Los resultados se presentan como promedios  $\pm$  la desviación estándar,  $n=6$ . Los valores que son estadísticamente diferentes se muestran como \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

No se encontraron diferencias entre los grupos en la acumulación de los lípidos marcados en la carcasa o en el tejido adiposo de las ratas madre; sin embargo la acumulación de la  $[1-^{14}\text{C}]$ trioleína en el hígado fue significativamente menor en las ratas alimentadas con la dieta AL.

**DISCUSIÓN:**

Esta investigación se propuso evaluar los efectos de aumentar el consumo de lípidos de la rata durante el embarazo y la lactancia sobre la composición y producción láctea y su repercusión en el crecimiento de la cría. Aunque en la literatura existen algunos estudios que analizan el efecto de la dieta sobre la composición láctea o sobre el crecimiento de las crías, existen pocos trabajos en los que se integren estas observaciones. Además, es importante mencionar que los resultados entre las diferentes investigaciones no siempre apuntan hacia la misma dirección. La diferencia en los resultados obtenidos, puede radicar en la forma de modificar el contenido de lípidos en la dieta de la rata. Algunos investigadores han agregado la grasa, ya sea de origen vegetal o animal a la dieta no purificada que la rata normalmente come y esto tiene como consecuencia una reducción en la proporción de la proteína y de otros nutrimentos en la dieta que puede repercutir negativamente en la producción de leche y en el crecimiento de las crías (12, 35). Con esta aproximación además, no es posible diferenciar los efectos del aumento en el consumo específico de lípidos sobre los del aumento en la ingesta de energía. Otra diferencia importante, radica en el tiempo durante el cual se ha proporcionado la dieta experimental y ese ha fluctuado entre sólo algunos días durante la lactancia hasta todo el embarazo y la lactancia.

El diseño de nuestro estudio permite evaluar los efectos de aumentar el consumo de lípidos, controlando la ingestión total de energía, durante un periodo corto (solo embarazo o lactancia) o durante un periodo prolongado (todo el ciclo reproductivo), sobre el desarrollo de la lactancia.

Las dietas utilizadas en nuestro estudio, fueron diseñadas para proporcionar la misma densidad energética por gramo de alimento, pero empleando una cantidad baja (2.5%) o bien una cantidad mayor (20%) de lípidos. En la literatura, se ha recomendado para la rata en el periodo de reproducción o durante la lactancia, una dieta con 5 a 7% de lípidos (60). El contenido de 2.5% de lípidos en la dieta BL, que parece bajo de acuerdo a estas recomendaciones, se eligió basándose en la composición química de la dieta que las ratas consumían normalmente en el

bioterio, por lo tanto las ratas del grupo BL se mantuvieron consumiendo los niveles de lípidos a los que estaban acostumbradas.

El peso corporal de las crías al nacimiento y su crecimiento durante la lactancia son buenos indicadores del estado de nutrición materno. Cuando comparamos el crecimiento de las crías del grupo BL con el de las crías de ratas alimentadas con el alimento comercial o con datos reportados en la literatura utilizando otro alimento no purificado, no se encontraron diferencias ni en el peso al nacimiento, ni en el crecimiento de la cría en el periodo posnatal.

La concentración de 20% de lípidos utilizada para la dieta del grupo AL es 5 veces mayor a las recomendaciones para roedores en su ciclo reproductivo, algunos investigadores han utilizado hasta el 50 o el 60% de lípidos en la dieta. Nosotros elegimos el nivel de 20% por ser el valor más ampliamente utilizado en la literatura, lo que nos permitió tener un mayor marco de comparación.

#### **Composición de la leche:**

Los estudios que han evaluado la relación entre una mayor ingesta de lípidos por la madre lactante y la composición de la leche se han realizado aumentando el consumo de lípidos de la rata lactante controlando la densidad energética de la dieta (11,12,20,24) o aumentando el contenido de lípidos en la dieta sin control del consumo total de energía (21,23,73). Las ratas que reciben alimentos con elevada densidad energética (dieta de cafetería) durante el embarazo y la lactancia produjeron leche con una menor concentración de proteína pero con una concentración de lípidos y una densidad energética mayor que los animales alimentados con la dieta normal de laboratorio (21). Este diseño no permite diferenciar los efectos ocasionados por la mayor ingesta de lípidos de los efectos provocados por el mayor consumo total de energía. Además, la disminución en la concentración de proteínas en la leche de los animales alimentados con la "dieta de cafetería" es un reflejo de la disminución en su consumo de proteínas, el cual es desplazado por el aumento en la ingestión de lípidos. Junto con la disminución en el consumo de proteína por estas ratas, es probable que el consumo de

muchos micronutrientos esté también disminuido y esto puede influir en los cambios observados en la composición de la leche.

Otros estudios realizados durante la lactancia en la rata, en donde se ha mantenido constante la densidad energética y se ha aumentado el contenido de lípidos de la dieta, han mostrado aumentos discretos, pero no significativos en la concentración de lípidos en la leche (20, 21, 24). Este resultado coincide con los nuestros, ya que no encontramos diferencias en la composición de la leche cuando a los animales solo se les proporcionó la dieta AL durante la lactancia.

En nuestro estudio, únicamente la leche de los animales que consumieron la dieta con un alto contenido de lípidos durante el embarazo y la lactancia, tuvo una concentración de lípidos significativamente mayor en relación con el grupo BL. Cuando se igualó el consumo energético del grupo AL con el del grupo BL, la diferencia en la concentración de los lípidos en la leche disminuyó, lo que sugiere que el aumento en la concentración de los lípidos en la leche mostrada por el grupo AL, es función de la mayor ingesta de lípidos junto con una mayor ingesta total de energía.

Como ya se mencionó, cuando se proporcionó la dieta AL solo durante el periodo de la lactancia, no se observaron diferencias en la concentración de los lípidos de la leche. Esto sugiere, la participación de la acumulación de las reservas lipídicas durante la gestación y de la movilización de estas sobre la composición de la leche, es decir, solo los animales que tuvieron la posibilidad de acumular más reservas lipídicas durante el embarazo (grupo AL) y de movilizarlas en mayor proporción durante la lactancia (grupo AL) tuvieron un incremento en la concentración de los lípidos en la leche. El aumento en estos dos factores (dieta y movilización) aumentó la disponibilidad de ácidos grasos en la circulación y por lo tanto la glándula mamaria aumentó su captación y su exportación en la leche.

### **Composición de los ácidos grasos de la leche:**

La composición de los ácidos grasos de la leche está fuertemente influenciada por el tipo de ácido graso y por su cantidad en los lípidos de la dieta de la madre

lactante (7,8,16,18,20). Los datos obtenidos en nuestro estudio muestran que el tipo de ácidos grasos que recibió la rata madre en su dieta durante la lactancia, es el principal determinante de la composición de ácidos grasos de la leche, y que el tipo de dieta proporcionada durante la gestación no modifica el tipo de ácido graso presente en la leche. Cuando los ácidos grasos no son proporcionados en la dieta, la glándula mamaria sintetiza ácidos grasos de cadena media ya que contiene una maquinaria enzimática para sintetizarlos difiere de la de otros tejidos, ya que posee una hidrolasa de acilglicéridos de cadena media (tioesterasa II), que termina la síntesis de los ácidos grasos después de que estos alcanzan de 8 a 14 carbonos de longitud (29).

Los animales que consumieron la dieta AL durante la lactancia (grupo AL y BL/AL) secretaron una leche que mostró predominio de los ácidos grasos contenidos en el aceite de maíz utilizado para la preparación de la dieta (98% de los ácidos grasos constituidos por el ácido palmítico, el oléico y el linoléico), mientras que en los animales que recibieron la dieta con bajo contenido de lípidos durante la lactancia (grupo BL y AL/BL) la leche mostró una mayor proporción (76%) de ácidos grasos de cadena media.

#### **Producción de leche:**

En los estudios realizados con ratas, la influencia del contenido de lípidos en la dieta de la madre sobre la producción de leche se obtuvo a partir de los datos del crecimiento de las crías, el cual está fuertemente correlacionado con la producción láctea (74). En nuestro estudio, la producción de leche no se infirió del crecimiento de las camadas, sino que fue determinada a través de la transferencia de agua tritiada de la madre a las crías.

Los estudios publicados muestran que la producción de leche de las ratas obesas alimentadas con una "dieta de cafetería" durante la lactancia, es 25% menor en comparación con la producción de las ratas alimentadas con la dieta habitual baja en grasa (75). En contraste, cuando las ratas no obesas son alimentadas con una dieta purificada alta en lípidos y con niveles adecuados de proteína, o con una

dieta suplementada con huevos y aceite, producen un mayor volumen de leche que los animales alimentados con la dieta habitual (20,73). Nuestros resultados concuerdan con los de estos últimos y muestran que las ratas alimentadas con una dieta con 20% de lípidos durante una parte o durante todo el ciclo reproductivo, pero utilizando niveles adecuados de proteína (24%) aumentan su producción de leche en un 33% en comparación con el grupo control.

El volumen de leche producido por la madre lactante está en función de la demanda de leche de la cría, que a su vez depende del tamaño y la velocidad de crecimiento de esa. Se ha propuesto que el mecanismo a través del cual la cría determina la producción de leche es aumentando la secreción de prolactina como respuesta a un mayor estímulo de succión (76,77). En nuestro estudio, las crías de los animales que recibieron al menos durante una etapa de su ciclo reproductivo la dieta AL mostraron un peso corporal mayor desde el séptimo día de lactancia, en comparación con las crías BL, lo que pudo determinar la mayor producción de leche por la rata madre.

#### **Crecimiento y composición corporal de las crías:**

La relación que existe entre el crecimiento de las crías y el contenido de lípidos en la dieta de la madre lactante ha sido estudiado por otros investigadores y se han encontrado resultados que señalan hacia direcciones opuestas. Algunos autores han mostrado que la ingesta de dietas con elevado contenido de lípidos durante la lactancia repercute negativamente en el desarrollo de la cría, ya que conduce a la disminución en el crecimiento y a un aumento en la mortalidad del recién nacido (59,78-80). Otros autores han mostrado el efecto contrario, experimentos con ratas lactantes alimentadas con "dieta de cafetería" (alimentos con elevado contenido energético como galletas de chocolate y salami) desde el inicio de la lactancia muestran que la velocidad de crecimiento de la camada es mayor que la del grupo control que fue alimentado con la dieta estándar de laboratorio con 2% de lípidos (50). Grigor y Warren no observaron modificaciones en la ganancia de peso de las crías de ratas lactantes que fueron alimentadas

durante cuatro días con una dieta purificada que contenía 20% de aceite de coco (4.9% de ácido láurico), mientras que la administración de otra dieta purificada de composición similar pero que contenía aceite de cacahuete (mezcla de 46% de ácido oleico y 36% de ácido linoléico) aumentó significativamente el crecimiento de las crías (20).

En nuestro estudio, las crías de las ratas que recibieron la dieta con un elevado contenido de lípidos al menos durante una parte de su ciclo reproductivo (grupos AL, AL/BL y BL/AL) tuvieron un mayor crecimiento y un mayor porcentaje de lípidos corporales en comparación a las crías del grupo control. Esta diferencia en el crecimiento de las crías está directamente relacionada con los cambios en el volumen y en la composición de la leche que recibieron, ya que no se detectaron diferencias en el peso de las crías al nacimiento y la leche fue la única fuente de nutrimentos para las crías durante la etapa de estudio.

El consumo de la dieta con mayor contenido de lípidos únicamente durante la gestación no ocasionó cambios en el peso o en la composición corporal de las crías al nacimiento, ya que el feto utiliza la glucosa y no los lípidos como la fuente principal de energía para su desarrollo (81). Resultados de otros investigadores coinciden con los nuestros ya que demuestran que el contenido de lípidos en la dieta de la madre no tiene ningún efecto en la deposición de lípidos en el feto de la rata a pesar de que se presente un aumento importante en la disposición de triacilgliceroles circulantes por el consumo de la dieta alta en lípidos (82).

La mayor ingesta de lípidos por la rata madre durante la lactancia mostró una mayor influencia sobre el crecimiento de las crías que la movilización de las reservas adiposas maternas. Las crías del grupo que consumió la dieta alta en lípidos durante la lactancia (BL/AL) mostraron pesos mayores que las crías de las madres que recibieron la dieta con mayor contenido de lípidos durante el embarazo (AL/BL).

El mayor crecimiento observado en las crías AL es consistente con el mayor volumen y la mayor concentración de lípidos de la leche de sus madres, sin

embargo, se desconoce el o los factores que inician el crecimiento acelerado de las crías AL.

El peso corporal y la composición de la carcasa de las crías AL y BL fue similar al nacimiento y su peso corporal permaneció en valores comparables hasta el día 6 posparto. Es posible que la composición de la leche del grupo AL haya presentado una mayor densidad energética desde etapas muy tempranas de la lactancia y que esto influenciara el mayor crecimiento de las crías.

La mayor producción de leche y el mayor contenido de lípidos en la leche del grupo de animales que recibieron la dieta con elevado contenido de lípidos durante el embarazo y la lactancia, puede explicar el mayor crecimiento de las crías AL, sin embargo, las ratas madre del grupo AL-Res no presentaron diferencias en la producción diaria de lípidos en la leche en comparación con el grupo control, y aún así, las crías AL-Res mostraron un peso corporal similar al de las crías del grupo AL.

Las diferencias en el crecimiento entre las crías del grupo AL-Res y las del grupo BL, puede explicarse con base en la diferente composición de los ácidos grasos de la leche. Se ha mostrado que la ingesta de dietas con elevado contenido de lípidos modifica el tipo de ácidos grasos de la leche de la rata, aumentando la proporción de los ácidos grasos de cadena larga (provenientes de dieta) a expensas de la disminución en el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (provenientes de la síntesis *de novo*) (83).

El catabolismo de los ácidos grasos de cadena media es diferente al de los ácidos grasos de cadena larga (58). Los ácidos grasos de cadena media liberados de los triacilgliceroles presentes en la dieta no son reesterificados en las células del intestino y son transportados directamente vía el sistema porta al hígado en donde son oxidados a cuerpos cetónicos o hasta CO<sub>2</sub>. Por lo tanto, los ácidos grasos de cadena media son principalmente utilizados para la obtención de energía y son incorporados en forma menos efectiva en los triacilgliceroles del tejido adiposo. Lo opuesto ocurre con los ácidos grasos de cadena larga.

Estas diferencias en el metabolismo de los ácidos grasos de cadenas media y larga pueden ser importantes en el control de la cantidad de lípidos que son depositados en el tejido adiposo de las crías ya que, como se señaló anteriormente, la alimentación de las ratas adultas con dietas ricas en ácidos grasos de cadena media, resulta en una menor acumulación de lípidos en el tejido adiposo (56,57).

Los resultados de la composición corporal obtenidas en nuestro estudio coinciden con lo anterior, y muestran que las crías de las ratas que recibieron la dieta AL durante cualquiera de las dos etapas del ciclo reproductivo y cuyas madres produjeron una leche con una mayor proporción de ácidos grasos de cadena larga, tuvieron un mayor contenido de lípidos en su carcasa el día 14 de lactancia en comparación con las crías de las ratas que nunca recibieron esa dieta y en cuya leche predominaban los ácidos grasos de cadena media.

La composición de los ácidos grasos en la leche de la rata madre tuvo además, repercusiones importantes en la composición de los ácidos grasos de la carcasa de las crías. Las ratas AL/BL que produjeron una leche con una alta proporción de ácidos grasos de cadena media tuvieron crías que en su carcasa presentaron un mayor porcentaje de ácidos grasos de cadena media. Se desconoce la importancia que pueda tener para el desarrollo posterior de las crías que en su composición corporal predominen los ácidos grasos de cadena media sobre los ácidos grasos de cadena larga. Parece entonces interesante estudiar el desarrollo de las crías de las ratas alimentadas con dietas con un elevado contenido de lípidos para conocer la repercusión a largo plazo de la ingesta de esta dieta.

El mayor peso corporal que muestran las crías de las ratas que recibieron al menos durante una parte de su ciclo reproductivo (AL, AL/BL o BL/AL) la dieta con 20% de lípidos no es sinónimo de un mejor crecimiento, ya que en la ganancia de peso predominó la acumulación de grasa con una cantidad constante de proteína. Guo y Jeng mostraron que las crías de ratas alimentadas con 40% de lípidos tenían niveles más altos de glucosa y de triacilgliceroles en sangre que las

crías del grupo control, lo que puede representar factores de riesgo para que en la vida adulta desarrollen obesidad, diabetes o arteriosclerosis (84).

El aumento en el almacenamiento de grasa corporal puede ser el resultado de un aumento en el número de células, de un aumento en el tamaño de las células existentes o una combinación de estos dos factores (53,85). Martin y Herbein mostraron que las crías recién nacidas de ratas alimentadas durante la gestación con una dieta con 60% de lípidos, tenían el mismo número de células en el tejido adiposo que las crías de ratas alimentadas con una dieta control con 5% de lípidos. Tres semanas después del nacimiento, las crías del grupo con 60% de lípidos tenían una mayor cantidad de grasa corporal y un mayor número de células que las crías de las ratas control (86). En nuestro estudio no determinamos si el aumento de contenido de lípidos en la carcasa de las ratas AL estaba relacionado con un mayor número o con un mayor tamaño de los adipocitos.

#### **Metabolismo de lípidos en la glándula mamaria y su relación con el tipo de dieta:**

La glándula mamaria de la rata alimentada con una dieta normal de laboratorio (60% de carbohidratos y 4% de lípidos), sintetiza a partir de glucosa alrededor del 50% de los lípidos de la leche (87). La otra mitad proviene de la captación y reesterificación, por el tejido mamario, de los ácidos grasos presentes en la sangre. Con el consumo de dietas con elevado contenido de lípidos durante la lactancia, la glándula mamaria disminuye la lipogénesis (34,35).

El análisis de la composición de los ácidos grasos en la leche de nuestros animales mostró que el consumo durante la lactancia de la dieta con mayor contenido de lípidos disminuyó en un 50% la proporción de los ácidos grasos de cadena media que son sintetizados en la glándula mamaria, mientras que aumentó la proporción de los ácidos grasos provenientes de la dieta. Estos resultados sugieren que el consumo de la dieta con AL ocasiona que la glándula

mamaria capte una mayor cantidad de los lípidos circulantes y se disminuya la lipogénesis.

Se ha reconocido que la acetil-CoA carboxilasa es la enzima que limita la velocidad de síntesis de los ácidos grasos, su actividad puede estar disminuida en los animales alimentados con la dieta alta en lípidos ya que los derivados de CoA de los ácidos grasos de cadena larga inhiben su actividad. Además, el aumento en la oxidación de los ácidos grasos ocasionada por un aumento en los niveles de ácidos grasos por el consumo de la dieta alta en lípidos puede aumentar la relación acetil-CoA/CoA y la del NADH/NAD, inhibiendo a la piruvato deshidrogenasa y bloqueando la conversión de piruvato a acetil-CoA.

La lipoproteína lipasa se ha descrito como la enzima clave para la captación por los tejidos extrahepáticos de los ácidos grasos contenidos en los triacilgliceroles de la sangre, y en nuestro estudio fue utilizada como un indicador de la captación de triacilgliceroles por la glándula mamaria (38).

La determinación de la actividad de la lipoproteína lipasa y de la síntesis de lípidos en la glándula mamaria de nuestras ratas confirma lo sugerido por el análisis de la composición de ácidos grasos en la leche, ya que, en la glándula mamaria de los animales alimentados con la dieta rica en lípidos había más triacilgliceroles en circulación y el incremento observado en la actividad de la lipoproteína lipasa facilitó su transporte hacia el interior del lactocito lo que ocasionó una reducción en la síntesis de ácidos grasos.

La actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria y en el tejido adiposo se modifica dependiendo de la disposición de alimento por el animal y de la etapa fisiológica (39,43,88). Existe poca información que muestre que la concentración de lípidos en la dieta con la que es alimentada la madre lactante modifique la actividad de la LPL en la glándula mamaria. En un estudio en hombres, se mostró que la alimentación durante 6 semanas con una dieta rica en lípidos produjo un aumento en la actividad de la lipoproteína lipasa en el plasma (89).

Nuestros resultados mostraron que en el grupo de ratas alimentadas con la dieta AL existió una mayor concentración de ácidos grasos de cadena larga en la leche y una mayor captación de la trioleína radiactiva de la dosis oral por la glándula mamaria y una mayor transferencia de la marca a las crías aunque la actividad específica de la lipoproteína lipasa no fue diferente entre los grupos. Esta aparente diferencia entre los indicadores de captación de lípidos estudiados puede explicarse de la siguiente manera:

- 1) La alimentación con la dieta con mayor contenido de lípidos aumentó la concentración de ácidos grasos no esterificados en el plasma (89) lo que ocasionó un aumento en la proporción de los ácidos grasos captados por la glándula mamaria de estos animales (90).
- 2) La dieta no indujo un aumento adicional en la actividad de la lipoproteína lipasa ya que el aumento producido al iniciarse la lactancia (38,39) y el aumento en el flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria durante esta etapa (87) permitieron que este tejido captara los ácidos grasos de los triacilgliceroles circulantes, aún cuando su concentración se incrementó por el aumento en el consumo de lípidos.
- 3) Que exista una distribución de la lipoproteína lipasa intra y extracelularmente diferente entre el grupo AL y BL. La enzima presente en la superficie luminal del endotelio vascular que permite la captación de los acilgliceroles circulantes está aumentada en la glándula mamaria del grupo AL, mientras que la forma intracelular (forma no activa) predomina en el grupo BL (91,92). Esta redistribución no modifica la concentración total de enzima.

En nuestro estudio se midió la actividad total de la enzima en el tejido y no se realizó ningún intento de diferenciar la actividad de la enzima presente en la superficie endotelial o en intracelularmente.

#### **Consumo y composición corporal materna:**

Para distinguir el efecto del mayor consumo de lípidos por la madre lactante sobre el desarrollo de la lactancia del de o de los efectos producidos por el mayor

consumo de energía, se alimentaron durante el ciclo reproductivo dos grupos de animales con dos dietas isoenergéticas con niveles contrastantes de lípidos. Esperábamos que el consumo de alimento (en gramos) no fuera diferente entre los dos grupos de dietas, sin embargo, observamos que los animales que recibieron la dieta AL consumieron más alimento durante la lactancia en comparación con los que recibieron la dieta BL. La hiperfagia de las ratas AL puede tener varias explicaciones:

1. La rata tenía preferencia por los alimentos ricos en grasa. Al analizar el consumo de los animales de los dos grupos de dieta durante el periodo pre-embarazo y durante el embarazo, no se encontraron diferencias en el consumo de alimento que sugirieran una mayor preferencia por la dieta AL.
2. La mayor velocidad de crecimiento de las crías y el mayor volumen de leche producido por las ratas AL imponen mayores demandas energéticas en este grupo de ratas que son cubiertas por un mayor consumo de alimento.

Durante el embarazo, la madre deposita grasa corporal (48), la cual es movilizada durante la lactancia para apoyar la producción de leche, aún a pesar del aumento importante en la ingesta de alimento (87). La magnitud de la grasa corporal movilizada durante la lactancia está en relación con la cantidad de lípidos acumulados al finalizar el embarazo (50). En nuestro estudio las ratas que recibieron la dieta AL durante el embarazo iniciaron la lactancia con un 30% más de grasa corporal que las ratas BL y al término de la lactancia el grupo AL mostró una pérdida de lípidos corporales 80% mayor en comparación con las ratas que recibieron la dieta BL durante el embarazo.

#### **Comparación de los hallazgos en los animales con los de los humanos:**

Se debe ser muy cauteloso cuando se usan los hallazgos experimentales de una especie para hacer predicciones con relación al control de la fisiología o del metabolismo en otras.

La rata ha sido utilizada ampliamente como modelo experimental para el estudio de la fisiología y las adaptaciones metabólicas del organismo materno durante la lactancia. En comparación con el humano, la rata produce una leche con un mayor contenido de lípidos y proteínas y un menor contenido de lactosa, además, produce de 115 a 140 ml de leche por kilogramo de peso corporal, mientras que el humano produce entre 12 y 23 ml/kg de peso (15). Esto significa que las demandas nutricionales de la lactancia son mucho mayores en la rata que en el humano y por lo tanto es de esperarse que las modificaciones en la dieta muestren efectos mas pronunciados en la composición y la producción de la leche en la rata.

En estudios con roedores se ha demostrado ampliamente que parte de los lípidos requeridos por la glándula mamaria para la síntesis de la leche son proporcionados por la movilización de las reservas acumuladas durante el embarazo en el tejido adiposo. Por otra parte, se ha establecido que el consumo de una dieta con elevado contenido de lípidos está relacionado en muchas especies con el aumento de peso y de grasa corporal (93).

En nuestro estudio, las ratas que recibieron la dieta rica en lípidos almacenaron más grasa corporal durante el embarazo, misma que movilizaron durante la lactancia, quedando al final del ciclo reproductivo con una composición corporal similar a la de la rata no embarazada no lactante. En los humanos parece que esta situación no se repite, ya que en la mayoría de los estudios, la velocidad de pérdida de peso y los cambios en la composición corporal materna no son diferentes entre mujeres no lactantes y lactantes (94,95).

La evidencia epidemiológica en humanos sugiere que existe una relación directa entre la cantidad de grasa consumida en la dieta y el grado de obesidad (96). A diferencia de las ratas madre alimentadas con la dieta rica en lípidos, que terminaron su ciclo reproductivo sin modificaciones en su composición corporal, las crías alimentadas por estas ratas resultaron obesas al final del periodo de lactancia ya que tuvieron 60% mas grasa corporal que las crías del grupo control. El aumento en la cantidad de lípidos circulantes ocasionado por el mayor

contenido de lípidos en la leche que recibieron las crías AL, pudo aumentar el depósito de lípidos en los adipocitos presentes al nacimiento, ocasionando el aumento en el tamaño de las células. Si estas crías continuaran recibiendo una dieta con un elevado contenido de lípidos, el número de adipocitos podría aumentar y contribuir al almacenamiento de una cantidad adicional de lípidos que finalmente conduce al desarrollo de la obesidad. Como lo mostraron Faust y Hirsch quienes observaron que la sobrealimentación de la rata desde su nacimiento repercute en un mayor peso corporal, en una mayor masa grasa y en el aumento tanto en el número como en el tamaño de los adipocitos en la rata adulta. Estos autores concluyen y que el número de las células adiposas no está determinado al nacimiento (97).

Knittle y colaboradores han mostrado que los niños obesos no difieren, al nacimiento, ni en el número, ni en el tamaño de las células en su tejido adiposo con los niños no obesos. Sin embargo después de los dos años de edad, tanto el número como el tamaño de los adipocitos es mayor en los niños con diagnóstico de obesidad (98). Se ha mostrado también que la sobre alimentación y el establecimiento de la obesidad en la edad temprana están relacionados con la presencia de obesidad y de arteriosclerosis en la vida adulta (99,100). Actualmente, algunos organismos de salud en los Estados Unidos sugieren la reducción en el consumo de energía y de lípidos por la población americana. Aunque estas recomendaciones excluyen a las mujeres embarazadas, a las mujeres lactantes y a los niños menores de dos años (101).

En humanos no se ha encontrado ninguna asociación entre la alimentación con leche humana y el desarrollo de la obesidad en el adulto. En general, los estudios indican que los niños alimentados al seno materno tienen menos grasa corporal que los alimentados con fórmula (102).

En resumen nuestros resultados muestran varios hallazgos importantes.

1. Es posible aumentar la concentración de lípidos y el volumen de leche producido por las ratas solamente si se aumenta el consumo de lípidos

durante todo el ciclo reproductivo, puesto que la alimentación con la dieta con elevado contenido de lípidos solo durante una etapa del ciclo reproductivo no modificó la composición de la leche aunque sí aumentó el volumen de leche.

2. Los cambios en la producción de leche ocasionados por la manipulación de la dieta de la rata madre repercutieron en el crecimiento de las crías, ya que las crías de las ratas que recibieron al menos en una etapa de su ciclo reproductivo la dieta con elevado contenido de lípidos tuvieron un peso corporal mayor que aquellas cuyas madres nunca recibieron la dieta AL.
3. La mayor concentración de lípidos en la leche del grupo AL se alcanzó gracias a un aumento en la captación de los lípidos circulantes. En esas condiciones la síntesis de lípidos en la glándula mamaria disminuyó de manera importante.

**CONCLUSIONES:**

1. Las ratas alimentadas con una dieta con un elevado contenido de lípidos durante el embarazo y la lactancia produjeron un mayor volumen de leche con una mayor concentración de lípidos que aquellos animales que nunca ingirieron esa dieta.
2. Los animales que ingirieron la dieta alta en lípidos solo durante el embarazo o solo durante la lactancia no mostraron cambios significativos en la composición de su leche, pero el volumen de leche producido fue significativamente mayor que el del grupo control.
3. El crecimiento de las crías fue significativamente mayor en aquellas cuyas madres ingirieron la dieta con elevado contenido de lípidos durante alguna etapa del ciclo reproductivo.
4. Las crías de las ratas que recibieron la dieta AL durante alguna parte de su ciclo reproductivo tuvieron un mayor porcentaje de lípidos y un porcentaje similar de proteínas en relación con las crías del grupo BL. Se desconoce el efecto en su desarrollo en la vida adulta de estos cambios en la composición corporal en el inicio de la vida.
5. La mayor captación de lípidos de origen dietario en los animales alimentados con la dieta AL está acompañada por la disminución en la lipogénesis en la glándula mamaria.

**REFERENCIAS:**

1. Neville MC, Allen JC, Watters SC. Lactation: Physiology, nutrition and breast feeding. Neville MC y Neifert MR ed. Plenum Press, New York, 1980 pp 43-103.
2. Hamosh M, Bitman K, Wood L, Hamosh P, Mehta NR. Lipids in the milk and the first steps in their digestion. *Pediatr.* 1984; 75:146-150.
3. Jensen RG. Changes with time in the lipids of human milk. *Nutr. Rev.* 1984; 42: 12-13.
4. Harzar G, Haug M, Dieterich I, Gentner P. Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day. *Am. J. Clin. Nutr.* 1983; 37: 612-621.
5. Bitman J, Wood L, Hamosh M, Hamosh P, Mehta N. Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. *J. Clin. Nutr.* 1983; 38: 300-312.
6. Anderson H. The effect of prematurity on milk composition and its physiological basis. *Fed. Proc.* 1984; 43: 2438-2442.
7. Vuori E, Kiuru K, Marinen M, Vayrynen P, Kara R, Kuitunen P. Maternal diet and fatty acid pattern of breast milk. *Acta Paediatr. Scand.* 1982; 71:959-963.
8. Mellies M, Ishikawa T, Gartside P, Burton K, Mc Gee J, Allen K, Steiner P, Brady D, Glueck C. Effects of varying maternal dietary fatty acids in lactating woman and their infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1979; 32: 299-303.
9. Tead WWC, Lutz P, Tashjian A. Human milk lipids. A study in four ethnic groups. *Am. J. Clin. Nutr.* 1965; 17: 180-183.
10. Keen VL, Lonnerdal B, Clegg M, Hurly L. Developmental changes in the composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *J. Nutr.* 1981; 111: 226-230.
11. Ross AC, Davila ME, Clearly MP. Fatty acids and retinyl esters of rat milk. Effects of diet and duration of lactation. *J. Nutr.* 1985; 115: 1488-1497.

12. Green MH, Dohner EL, Green JB. Influence of dietary fat and cholesterol on milk lipids and on cholesterol metabolism in the rat. *J. Nutr.* 1981; 111: 276-286.
13. Jensen RG. The lipids of human milk. Jensen RG ed. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 1989.
14. Hachey DL, Silber GH, Wong GH, Garza C. Human lactation II. Endogenous fatty acid synthesis by the mammary gland. *Pediatr. Res.* 1989; 25: 63-68.
15. Williamson DH, Munday MJ, Jones RG. Biochemical basis of dietary influences on the synthesis of the macronutrients of the rat milk. *Fed. Proc.* 1984; 43: 2443-2447.
16. Insul W Jr, Hirsch J, James T, Ahrens EH Jr. The fatty acids of human milk. Alterations produced by manipulation of caloric balance and exchange of dietary fats. *J. Clin. Invest.* 1985; 38: 443-450.
17. Beusekon CM, Martini IA, Rutgers HM, Boersma ER, Muskiet FA. A carbohydrate-rich diet not only leads to incorporation of medium-chain fatty acids in milk triglycerides but also in each milk-phospholipid subclasses. *Am. J. Clin. Nutr.* 1990; 52: 326-334.
18. Harzer G, Dieterich I, Haug M. Effects of the diet on the composition of human milk. *Ann. Nutr. Metab.* 1984; 28:231-249.
19. Prentice AM, Roberts SB, Prentice A, Paul AA, Watkinson M, Watkinson AA, Whitehead RG. Dietary supplementation of lactating Gambian women. I. Effect on breast-milk volume and quality. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 1983; 37C: 53-57.
20. Grigor Mr, Warren SM. Dietary regulation of mammary lipogenesis in lactating rats. *Biochem. J.* 1980; 188: 61-65.
21. Rolls BA, Gurr MI, Van Duijvenvoorde PM, Rolls BJ, Rowe EA. Lactation in lean and obese rats: Effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition. *Physiol. Behav.* 1986; 38: 185-190
22. Pettigrew JE: Supplemental dietary fat for periparturient sows: a review. *J. Anim. Sci.* 1981; 53: 107-116.

23. Noblet J, Etienne M. Effect of energy level in lactating sows on yield and composition of milk and nutrient balance of piglets. *J. Anim. Sci.* 1986; 63: 1888-1896.
24. Farid M, Baldwin RL, Yang T, Osborne E, Grichting G. Effects of age, diet and lactation on lipogenesis in rat adipose, liver and mammary tissues. *J. Nutr.* 1978; 108: 514-524.
25. Beare JL, Gregory ER, Morison SD, Campbell JA. The effect of rapeseed oil on reproduction and on the composition of rat milk fat. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1961; 39: 195-201.
26. Stryer L. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Co. New York, 1988.
27. Robinson AM, Williamson DH. Comparison of glucose metabolism in the lactating mammary gland of the rat in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 1977; 64: 153-159.
28. Katz J, Wals PA, Van de Velde RL. Lipogenesis by acini from mammary gland of lactating rats. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 7348-7357.
29. Smith S. Mechanism of chain length determination in biosynthesis of milk fatty acids. *J. Dairy Sci.* 1980; 63: 337-350.
30. Randle PJ. Phosphorylation-dephosphorylation cycles and regulation of fuel selection in mammals. *Curr. Topics Cellul. Reg.* 1981; 18: 107-130.
31. Hardie DG. Regulation of fatty acid synthesis by reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Molecular Aspects of Cellular Regulation*, 1980, 1: 33-62.
32. Munday MR, Williamson DH. Diurnal variation in food intake and lipogenesis in mammary gland and liver of lactating rats. *Biochem. J.* 1983; 214: 183-187.
33. Romsos DR, Muiruri KL, Lin P, Leville GA. Influence of dietary fat, fasting and acute premature weaning on in vivo rates of fatty acid synthesis in lactating mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1978; 159: 308-312.
34. Agius L, Williamson DH. Rapid inhibition of lipogenesis in vivo in lactating rat mammary gland by medium chain triacylglycerols and partial reversal by insulin. *Biochem. J.* 1980; 192: 361-364.

35. Souza PF, Williamson DH. Effects of feeding medium-chain triacylglycerols on maternal lipid metabolism and pup growth in lactating rats. *Br. J. Nutr.* 1993; 69: 779-787.
36. Dils R, Clark S, Knudsen J. Comparative aspects of milk fat synthesis. In : *Comparative aspects of Lactation* (M Peaker ed) Academic Press, New York 1977.
37. Robinson DS. The function of the plasma triglycerides in fatty acid transport. In: *Comprehensive Biochemistry*. M. Florkin and E.H. Stotz, ed. Academic Press, New York. Vol. 18, 51-116.
38. Scow RO, Chernick SS. Role of lipoprotein lipase during lactation. In: *Lipoprotein lipase*. Borensztajn J (ed). Evener, Chicago. 1987.
39. Hamosh, M, Clary TR., Chernick, SS, Scow R.O. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1970; 210:473-482.
40. Herrera E, Lasunción MA, Martín A, Zorzano A. Carbohydrate-Lipid Interactions in pregnancy. In: *Perinatal Biochemistry*. Herrera E and Knopp RH eds. CRC press USA 1992 p 1-18
41. Otway S, Robinson DS. The significance of changes in tissue clearing-factor lipase activity in relation to the lipaemia of pregnancy. *Biochem. J.* 1968; 106:677-682.
42. Hernell O, Olivecrona T. Lipoprotein lipase activity in human milk. *J. Lipid Res.* 1974; 15: 367-374 .
43. Oller Do Nascimento C, Illic V, Williamson DH. Re-examination of the putative roles of insulin and prolactin in the regulation of lipid deposition and lipogenesis in vivo in mammary gland and white and brown adipose tissue of lactating rats and litter-removed rats. *Biochem. J.* 1989; 258: 273-278.
44. Zinder O, Hamosh M, Fleck TR, Scow RO. Effect of prolactin on lipoprotein lipase activity in mammary gland and adipose tissue of rats. *Am. J. Physiol.* 1974; 226: 744- 748.

45. Da Costa T, Williamson DH. Effects of exogenous insulin or vanadate on disposal of dietary triacylglycerols between mammary gland and adipose tissue in lactating rat: insulin resistance in white adipose tissue. *Biochem. J.* 1993; 290: 557-561.
46. Da Costa T, Williamson DH. Regulation of rat mammary gland uptake of oral [1-14C]triolein by insulin and prolactin. Evidence for bihormonal control of lipoprotein lipase activity. *Biochem. J.* 1994; 300: 257-262.
47. Naismith DJ. The requirement for protein and the utilization of protein and calcium during pregnancy. *Metabolism.* 1966; 15: 582-595.
48. Naismith SJ, Richardson DP and Pritchard AE. The utilization of protein and energy during lactation in the rat, with particular regard to the use of fat accumulated in pregnancy. *Br J Nutr.* 1982; 48: 433-441.
49. Naismith DJ. The role of body fat, accumulated during pregnancy in lactation in the rat. *Proc. Nutr. Soc.* 1971; 30: 93A.
50. Rolls BJ, Van Duijvenvoorde PM, Rowe RA. Effects of diet and obesity on body weight regulation during pregnancy and lactation in the rat. *Physiol. Behav.* 1984; 32:161-168.
51. Rolls BJ, Towe EA, Turner RC. Persistent obesity in rats following a period of consumption of a mixed, high-energy diet. *J. Physiol.* 1981; 298:415-427.
52. Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol. Behav.* 1976; 17: 461-471.
53. Steingrimsdottir L, Greenwood MRC, Brasel JA. Effect of pregnancy, lactation and a high-fat diet on adipose tissue in Osborne-Mendel rats. *J. Nutr.* 1980; 110:600-609.
54. Hilditch TP. The chemical constitution of natural fats. New York: John Wiley and Sons Inc., 1956.
55. Gunstone FD. Component acids of tiger fat and or puma fat. *Biochem. J.* 1955; 59: 454-458.

56. Bray GA, Lee M, Bray T. Weight gain of rats fed medium-chain triglycerides is less than rats fed long-chain triglycerides. *Int. J. Obes.* 1980; 4: 27-32.
57. Geliebter A, Torbay N, Braco EF, Hashim S. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. *Am. J. Clin. Nutr.* 1983; 37: 1-4
58. Bach AC, Babayab BK. Medium chain triglycerides: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 1982; 36: 950-962.
59. Rolls BJ, Rowe EA, Fahrenbach SE, Agius L, Williamson DH. Obesity and high energy diets reduce survival and growth rates of rat pups. *Proc. Nutr. Soc.* 1980; 39: 51A.
60. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76<sup>a</sup> rodent diet. *J. Nutr.* 1993; 123: 1939-1951.
61. Lowry HO, Rosenbrough NJ, Farr AI, Randall JR. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
62. Jensen RG, Neville MC. Human lactation. Milk components and methodologies. Plenum press, New York 1985 pp 97-112.
63. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 1969; 6: 24-28.
64. Godbole VT, Grundleger ML, Pasquine TA, Tehenen SW. Composition of rat milk from day 5 to 20 of lactation and milk intake of lean and preobese Zucker pups. *J. Nutr.* 1981; 111: 480-487.
65. Knapp DR. Handbook of analytical derivatization reactions. John Wiley and Sons, New York. 1979 pp151-159.
66. Zubiran S. Manual de técnicas para el laboratorio. Instituto Nacional de la Nutrición 1984.
67. Agius L., Williamson DH. Rapid inhibition of lipogenesis in vivo in lactating mammary gland by medium or long-chain triacylglycerols and partial reversal by insulin. *Biochem. J.* 1980; 192: 361-364.

68. Stansbie D, Brownsey RW, Crettaz M, Denton RM. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem. J.* 1976; 160:413-416.
69. Nilsson P, Schotz M. A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J. Lip. Res.* 1976; 17: 421-425.
70. Del Prado M, Da Costa TH, Williamson DH. Effects of tri-iodothyronine administration on the disposal of oral [1-<sup>14</sup>C]triolein, lipoprotein lipase activity and lipogenesis in the rat during lactation and on removal of the litter. *Biochem. J.* 1994; 301: 495-501.
71. Oller Do-Nascimento C, Williamson DH. Evidence for conservation of dietary lipid in the rat during lactation and the immediate period after removal of the litter. Decreased oxidation of oral [1-<sup>14</sup>C]triolein. *Biochem. J.* 1986; 239: 233-236.
72. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods.* The Iowa State University Press, 1980.
73. Roberts SB, Coward WA. Dietary supplementation increases milk output in the rat. *Br. J. Nutr.* 1985; 53: 1-9.
74. Sampson DA, Jansen GR. Measurement of milk yield in the lactating rat from pup weight and weight gain. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1983; 8: 225-232.
75. Rolls BA, Barley JB, Gurr MI. The influence of dietary obesity on milk production in the rat. *Proc. Nutr. Soc.* 1983; 42: 83A
76. Warman NL, Rasmussen KM. Effects of malnutrition during reproductive cycle on nutritional status and lactational performance of rat dams. *Nutr. Res.* 1983; 3: 527-545.
77. Dewey KG, Heinig J, Nommsen LA, Lönnerdal B. Maternal versus infant factors related to breast milk intake and residual milk volume. The DARLING study. *Pediatrics* 1991; 87: 829-37.
78. Rolls BJ, Rowe EA. Pregnancy and lactation in the obese rat: effects on maternal and pups weights. *Physiol. Behav.* 1982; 28: 393-400.

79. Moore BJ, Olsen JL, Marks F, Brasel JA. The effects of high fat feeding during one cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation and recovery on body composition and fat pad cellularity in the rat. *J. Nutr.* 1984; 114: 1566-1573.
80. Shaw MA, Rasmussen KM, Myers TR. Consumption of a high fat diet impairs reproductive performance in Sprague-Dawley rats. *J. Nutr* 1997; 127(1):64-69.
81. Ktorza A, Ferré P. Fuel Metabolism in the Fetus. In: *Perinatal Biochemistry*. Herrera E and Knopp R eds. CRC Press, Boca Ratón Florida, 1992. p 149-181.
82. Platka-Bird L, Bennink MR. Relationship of level and type of dietary fat to fetal and maternal rat lipogenesis and lipid deposition. *J. Nutr.* 1978; 108: 1422-1430.
83. Brandorff NP. The effect of dietary fat on the fatty acid composition of lipids secreted in rats milk. *Lipids* 1980; 15: 276-278.
84. Guo F, Jen KC. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol. Behav* 1995; 57: 681-686.
85. Faust IM, Johnson Pr, Stern JS , Hirsch J. Diet induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am. J. Physiol.* 1978; 235: E279-E286.
86. Martin RJ, Herbein JH. Effect of a high fat diet on body composition, cellularity and enzyme levels during early development of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Ned.* 1980; 164: 341-346.
87. Williamson DH. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *Febs. Letters.* 1980; 117: K93-K105.
88. Reichl D. Lipoprotein lipase activity in the adipose tissue of rats adapted to controlled feeding schedules. *Biochem. J.* 1972; 128: 79-87.
89. Campos H, Dreon DM, Krauss RM. Associations of hepatic and lipoprotein lipase activities with changes in dietary composition and low density lipoprotein subclasses. *J. Lipid Res.* 1995; 36:462-72

90. De Gasquet, Pequignot-Planche, GE, Malewiak, MI. Diurnal changes in plasma and liver lipids and lipoprotein lipase activity in heart and adipose tissue in rats fed a high and low fat diet. *J. Nutr.* 1977; 107: 199-212.
91. Nielsen, MO, Hajibsen K. Changes in mammary uptake of free fatty acids, triglyceride, cholesterol and phospholipid in relation to milk synthesis during lactation in goats. *Comp. Biochem. Physiol.* 1994;109A: 857-867.
92. Jensen DA, Gavigan S, Sawicki V, Witsell DL, Eckel RH, Neville MC. Regulation of lipoprotein lipase activity and mRNA in the mammary gland of the lactating mouse. *Biochem. J.* 1994; 298: 321-327.
93. West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am.J.Clin.Nutr.* 1998; 67:505S-512S.
94. Maternal health effects of breastfeeding. In: *Nutrition during lactation.* National Academy Press. Washington,D.C. 1991 pp 197-212.
95. Butte NF, Hopkinson HM. Body composition changes during lactation are highly variable among women. *J. Nutr.* 1998; 128:381S-385S.
96. Golay A, Bobbioni E. The role of dietary fat in obesity. *Int. J. Obes. Metab. Disord.* 1997; 21; S2-S11.
97. Faust, IM, Johnson PR, Hirsch J. Long term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. *J. Nutr.* 1980; 110: 2027-2034.
98. Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J. Clin. Invest.* 1979; 63: 239-246.
99. Lucas A. Programming by early nutrition: and experimental approach. *J. Nutr.* 1998; 128: 401S-406S.
100. Mott GE. Early Feeding and atherosclerosis. In *Long-term consequences of early feeding.* Edited by J Boulton. Nestlé Nutrition Workshop Series. Vol. 36. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA 1996 pp 113-122.
101. Hachey DL. Benefits and risks of modifying maternal fat intake in pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 454S-464S.

102. Infant outcomes. In: Nutrition during lactation. National Academy Press. Washington, D.C. 1991 pp 153-196.