



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

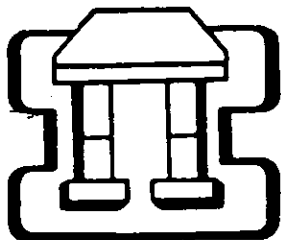
**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
CAMPUS IZTACALA**

**"EFECTO DEL CONTENIDO DE LIPIDOS EN LA  
DIETA DE LA RATA DURANTE LA LACTANCIA  
SOBRE LA CAPTACION DE LIPIDOS EN LA  
GLANDULA MAMARIA"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A :  
CECILIA ARANDA BATALLA**

**DIRECTOR DE TESIS: MARTHA ELENA DEL PRADO MANRIQUEZ.**



**IZTACALA**

**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX. 1998.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

267457



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.

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 de la M en C. Martha E. Del Prado Manríquez.

Trabajo financiado por CONACyT

## **AGRADECIMIENTOS.**

*A mi DIOS por guiarme paso a paso, alumbrando el camino a seguir para alcanzar la meta.*

*A mi alma mater la UNAM, Campus Iztacala (ENEPI) por mi formación como Lic. en Biología.*

*A la M en C. Martha E. Del Prado, por aceptarme en su equipo de investigación, por la dirección de este trabajo y por el infinito apoyo que me ha brindado para seguir adelante.*

*Al Lic. Joaquín Gordillo Díaz por ser un gran compañero de equipo y por compartirme sus conocimientos.*

*Al M en C. Ignacio Peñalosa Castro, a la Biol. Josefina Vázquez Medrano, al Biol. Hugo Perales Vela y a la M en C. Bertha Segura Alegría por la revisión de este trabajo y por los comentarios que aportaron para el enriquecimiento de este.*

*Al Dr. Salvador Villalpando por darme la oportunidad de ser parte de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN).*

*A todas las personas que forman parte de la UIMN.*

**MIL GRACIAS.**

## **DEDICATORIAS.**

*Con amor y respeto a mis padres, José Aranda Aguilar y Cristina Batalla Rodríguez, como muestra de agradecimiento, porque gracias a sus consejos, su confianza, su apoyo y esfuerzo he llegado a realizar mis sueños y objetivos.*

*Con amor a mis hermanos, Guadalupe, Raymundo, Mercedes y Lidia, porque siempre estuvieron pendientes de mis inquietudes y porque han sido mi ejemplo a seguir.*

*A mis cuñados, Arturo, Edith, Tomás y José L., con mucho cariño por ser parte de mi familia y brindarme buenos consejos.*

*A mis sobrinos, Arturo, Monserrat, I. Noemí, Rodrigo de J., L. David, Andrés y Alma Y., porque son los luceros que llenan mi vida de alegría, con ustedes he tenido muy buenos momentos de felicidad, los amo.*

*A todos mis familiares (\*) porque cada uno a su manera me enseñó a luchar para ganar la BATALLA\*.*

*A Silverio RC, mi gran amigo, con quien he contado en todo momento, aún sin darme cuenta, contigo he aprendido el verdadero valor de la amistad (TQM).*

*A mis amigos y compañeros de la Universidad, Dolores SL (Dodo), Edith MR, Elizabeth SG e Ing. Moreno, Fernando M, Felipe C y Alberto M, por todos los momentos que compartimos a lo largo de la carrera.*

## ÍNDICE.

	Páginas
ÍNDICE.	1
RESUMEN.	3
1. ANTECEDENTES.	4
1.1. Estructura de la glándula mamaria.	5
1.2. Desarrollo de la glándula mamaria.	7
1.2.1. Mamogénesis.	7
1.2.2. Lactancia.	8
1.2.3. Involución.	10
1.3. Control hormonal del desarrollo de la glándula mamaria	10
1.4. Síntesis de leche.	14
1.4.1. Lípidos.	16
1.4.1.1. Captación de los lípidos circulantes y la actividad de la LPL.	17
1.4.1.2. Regulación de la actividad de LPL.	18
1.4.1.3. Síntesis de ácidos grasos.	20
1.4.1.4. Regulación de la lipogénesis.	22
1.4.1.5. Influencia de la dieta sobre la composición de los lípidos de la leche.	24
1.4.2. Proteínas.	25
1.4.3. Lactosa.	26
1.5. Cambios en el metabolismo materno durante la lactancia.	27
2. JUSTIFICACIÓN.	29
3. OBJETIVOS.	30
3.1. Objetivo general.	30
3.2. Objetivos particulares.	30
4. HIPÓTESIS.	31
5. METODOLOGÍA.	32
5.1. Animales.	32
5.2. Registro del consumo de alimento.	34
5.3. Registro del peso de la rata madre y de las crías.	34
5.4. Determinación de la transferencia de [1- <sup>14</sup> C]trioleína.	35
5.5. Determinación de la acumulación de los <sup>14</sup> C lípidos en los tejidos	36

5.6. Determinación de la actividad de la lipoproteína lipasa.	37
5.6.1. Extracción de la enzima.	38
5.6.2. Preparación del sustrato.	38
5.6.3. Determinación de la actividad de la lipoproteína lipasa.	39
5.6.4. Determinación de proteínas.	39
5.7. Determinación de los triacilglicerolos en suero.	40
5.8. Análisis estadístico.	41
<b>6. RESULTADOS.</b>	<b>43</b>
6.1. Peso corporal de las ratas madre.	43
6.2. Consumo de alimento de las ratas madre	44
6.3. Peso corporal de las crías.	45
6.4. Subgrupos de estudio y absorción de la 1- <sup>14</sup> C trioleína.	46
6.5. Oxidación de la [1- <sup>14</sup> C]trioleína.	46
6.6. Peso de los tejidos.	49
6.7. Contenido de lípidos en los tejidos	51
6.8. Incorporación de los lípidos marcados a los tejidos.	51
6.9. Actividad específica de la lipoproteína y concentración de triacilglicerolos en plasma.	52
<b>7. DISCUSIÓN.</b>	<b>57</b>
7.1. Metabolismo de los lípidos en la glándula mamaria y su relación con el tipo de dieta.	57
7.2. Crecimiento corporal de las crías.	62
7.3. Ingesta Materna.	65
7.4. Ganancia de peso materno.	66
<b>8. CONCLUSIONES.</b>	<b>67</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>68</b>
<b>10. ANEXO 1.</b>	<b>79</b>

## RESUMEN

Se ha demostrado que las ratas alimentadas con una dieta con elevado contenido de lípidos durante el embarazo y la lactancia producen un mayor volumen de leche, con un mayor contenido de lípidos que las ratas alimentadas con la dieta habitual baja en lípidos. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de proporcionar, desde la gestación y durante la lactancia, una dieta con elevado contenido de lípidos, isoenergética con la dieta habitual de la rata, sobre la captación de lípidos por la glándula mamaria.

Ratas Sprague-Dawley de 12 semanas adaptadas por dos semanas a una dieta purificada (BL), se aparearon con machos de la misma cepa y el primer día de gestación, se asignaron aleatoriamente a uno de dos grupos de dieta. El grupo BL recibió una dieta con 2.5 % de lípidos, mientras que el grupo AL (con dieta alta en lípidos) recibió una dieta con 20 % de lípidos. El consumo de alimento, el peso de las ratas madre y el peso de la camada se registraron cada tercer día. Entre el día 12 y 14 de lactancia las ratas recibieron una carga intragástrica de [1-<sup>14</sup>C]trioleína (0.5g, 0.8μCi), a la mitad de los animales de cada grupo de alimentación se les retiró el alimento durante el experimento. La oxidación de la dosis de <sup>14</sup>C-trioleína, su incorporación a la glándula mamaria, el tejido adiposo, el hígado y la carcasa materna, y su transferencia a las crías, se determinó 5 h después de la dosis. La actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) se determinó en la glándula mamaria.

La absorción de la dosis de trioleína fue significativamente mayor en los animales alimentados con la dieta AL que en los animales BL. La oxidación de <sup>14</sup>C trioleína fue mayor en las ratas del grupo AL a partir de la primera hora después de la dosis, la máxima incorporación de la marca en CO<sub>2</sub> se presentó a la tercera hora en el grupo AL. La producción acumulada de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a las 5h fue significativamente mayor en el grupo de ratas alimentadas con la dieta AL en relación al grupo BL. La incorporación de lípidos marcados en el hígado y en el suero fue significativamente menor en las ratas AL en comparación con las BL (3.218±0.46 vs 4.675±1.83, p<0.01; 0.133±0.02 vs 0.178±0.09, p<0.05). La transferencia de la dosis de trioleína a las crías fue mayor en el grupo AL en comparación con el control (26.37±5.75 vs 19.15±4.93, p<0.05). La dosis de trioleína acumulada en GM y la dosis transferida a las crías fue significativamente mayor en las ratas a las que se les proporcionó alimento durante las 5 h en ambos grupos. La actividad de la LPL fue significativamente mayor en las ratas AL que recibieron alimento durante el experimento en comparación con las ratas AL ayuno y con los dos grupos de ratas BL.

La captación de lípidos por la glándula mamaria y su transferencia a las crías es mayor en los animales alimentados con una dieta con elevado contenido de lípidos, lo cual concuerda con el mayor crecimiento de las crías. La LPL parece no ser el único mecanismo para que la glándula mamaria pueda utilizar los lípidos circulantes.



## 1. ANTECEDENTES

La lactancia es un proceso notable durante el cual el organismo materno sintetiza leche que puede mantener totalmente el desarrollo y crecimiento de la cría.

La importancia de la lactancia radica en que los recién nacidos se nutren con leche materna, hasta que son capaces de ingerir alimentos sólidos, reduciendo así el riesgo a enfermedades infecciosas y alergias (96). La leche posee una elevada densidad energética y un equilibrio de nutrientes que satisface las necesidades de los recién nacidos y les permite un crecimiento adecuado (81,99,101). La leche además, es un importante vehículo para transferir inmunoglobulinas, enzimas, hormonas, agentes anti-inflamatorios y en algunos casos factores no específicos (lisozima, folato, lactoperoxidasa) que interfieren con el desarrollo bacteriano o potencian la actividad inmune de anticuerpos.

El cuerpo materno se prepara para la lactancia a partir del primer día de embarazo, período en el cual la madre acumula reservas energéticas, principalmente grasa en el tejido adiposo, el hígado y la carcasa (40), que son movilizadas durante la lactancia para contribuir a la producción de la leche un elevado valor energético (72,13,98).

### 1.1. Estructura de la glándula mamaria.

La glándula mamaria es un órgano que se origina en el ectodermo embrionario (4), en la mayoría de las especies consta de una teta, un sistema de conductos, lóbulos y lobulillos de tejido secretor.

Los lóbulos están separados por hojas de tejido conjuntivo en el cual corren vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (28). Los lóbulos están formados por lobulillos y estos por acinos o alveolos (5). De cada alveolo sale un conducto que se une a otros conductos cercanos formando conductos tubulares más grandes llamados conductos lactíferos (5), los sistemas de conductos conectan a los alvéolos con el pezón (88). Un poco antes de que los conductos lactíferos penetren al pezón, estos presentan dilataciones que se conocen con el nombre de senos lactíferos, cada conducto lactífero desemboca en su propio poro en el exterior del pezón (Fig. 1) (28,88).

La inervación de los lóbulos es muy rica y proviene de los nervios intercostales, siendo el más importante el cuarto nervio intercostal que provee de inervación aferente y eferente al pezón. La irrigación está dada en mayor parte por la arteria mamaria lateral, rama de la subclavica y en menor proporción por la mamaria interna, rama epigástrica. El plexo linfático es abundante de vasos linfáticos que drenan a la glándula mamaria (28). La rata tiene seis pares de glándulas mamarias: tres pares torácicos, dos inguinales y un abdominal. Las glándulas torácicas son irrigadas por ramas de arterias y venas de la torácica interna, la epigástrica y la craneal, además de vasos

cervicales superficiales a los que llegan ramas de los vasos torácicos, a los cuales se les unen ramas cutáneas laterales de los intercostales. Las glándulas abdominales e inguinales reciben sangre de la arteria epigástrica superficial, de las arterias pudenda externa superficial y profunda, y en ocasiones de la rama ilíaca de la arteria ilio-lumbar y de las ramas cutáneas laterales de las arterias frénico-abdominales. La inervación es por fibras procedentes de distintos nervios: cutáneos laterales del tercer lumbar al tercer torácico, espermático externo y ramas cutáneas ventrales de los intercostales (81).

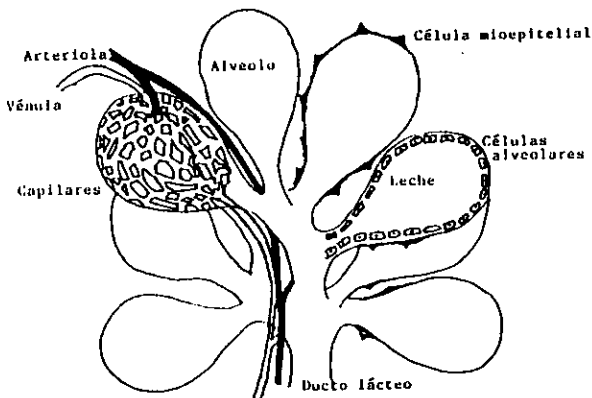


Fig.1. Estructura de un agregado de alveolos en la glándula mamaria (En: Stanbenfeldt GH., 1992).

La unidad secretora fundamental en la glándula mamaria son los alveolos, que son pequeñas evaginaciones vasculares que se forman desde el ducto alveolar

(28,88). Los alveolos están compuestos por tres tipos de células: las primeras células se localizan en la luz del alveolo y se llaman superficiales ó laminares, a estas les sigue una capa de células más claras denominadas principales ó basales, rodeadas de células mioepiteliales (5), también conocidas como células "en canasta". Las células mioepiteliales tienen capacidad contráctil, su contracción permite el vaciamiento del contenido alveolar a la luz de los conductos lactíferos durante el reflejo de eyección de la leche (28). Los conductos lactíferos están también envueltos por células mioepiteliales, tanto en sentido transversal como longitudinal (81).

## **1.2. Desarrollo de la glándula mamaria.**

El desarrollo y función de la glándula mamaria comprende diferentes etapas: mamogénesis, lactancia (lactogénesis y eyección láctea) y regresión ó involución.

### **1.2.1. Mamogénesis.**

Se caracteriza por el desarrollo de la glándula mamaria, que se inicia en la etapa fetal y se encuentra bajo control genético y endocrino (88).

En un período posterior a la fertilización se puede observar a las células ectodérmicas mamarias apiladas en una línea extendida desde la base de la axila a la región inguinal (25), conocida como línea mamaria o zona mamaria, dando origen a yemas mamarias (81). Estas yemas mamarias se modifican

pasando de tener forma aplanada a una forma esférica (81), y penetran en el mesénquima produciendo un primordio primario definitivo, que se ramifica configurando los primordios que serán más tarde los lóbulos (97). En los humanos la invasión de las yemas mamarias en el mesénquima se realiza en un sólo sitio, formándose de 15 a 25 lóbulos, de los cuales de 10 a 15 son funcionales y el resto aparecen como vestigios (28).

Entre el nacimiento y la pubertad, el subsecuente crecimiento de la glándula mamaria depende de la duración del ciclo reproductivo de la especie. Cuando el ciclo es relativamente corto, como en el caso de la rata, el desarrollo de la glándula es limitado a la máxima extensión del sistema ductal (16). Tras la pubertad, el desarrollo de la mama se encuentra bajo influjo de hormonas del ovario, estrógenos y progesterona, junto con la somatotrofina, la insulina y la prolactina (81,101). En este período aumenta el crecimiento de las yemas, el número de ramificaciones laterales y de los extremos terminales en los brotes (secundarios y terciarios) transformarse en alveolos.

### **1.2.2. Lactancia.**

La lactancia es la fase final del ciclo reproductivo de los mamíferos (16), durante este período se da la síntesis y la liberación de leche por las células epiteliales del alveolo, para sustentar a la progenie durante el período neonatal (101). La lactancia se caracteriza por un aumento en la demanda de sustratos

por la glándula mamaria para sintetizar los constituyentes de la leche (lactosa, lípidos y proteínas).

La primera fase de la lactancia es el proceso denominado lactogénesis, el cual se define como el inicio de la secreción de leche, proceso en el cual se da la síntesis de los constituyentes de la leche dentro de las células alveolares y su paso al lumen alveolar (16).

En las primeras horas posteriores al parto, las células alveolares llegan a desarrollar una citología semejante a las células exócrinas, en la base de la célula se puede observar una gran cantidad de ribosomas libres, que son remplazados por membranas del retículo endoplásmico rugoso, las cuales son evidentes 48 horas después. En este tiempo el epitelio alveolar adquiere una forma cuboidal e incrementa su actividad secretora, la cual puede iniciarse con la repentina disminución o cese de la liberación de progesterona (16) y con la evacuación de los productos que forman el calostro (81).

El alveolo se distiende en presencia de la leche, el epitelio se hace flácido y se distorsiona, la contracción de las células mioepiteliales ayudan a la propulsión de la leche (eyección láctea) desde el lumen alveolar hasta los ductos y senos (28), donde la leche se encuentra bajo presión y disponible para la succión (16). El ritmo de secreción de la leche es alto cuando la presión en los conductos y alveolos alcanza un nivel muy bajo, a medida que la presión aumenta el ritmo de producción disminuye (90).

El mantenimiento de la secreción láctea depende del estímulo mecánico de la succión recibido en las terminaciones nerviosas del pezón, el cual produce impulsos nerviosos que llegan a la médula espinal, siguen la vía espinotalámica hasta el mesencéfalo donde es posible que se bifurquen siguiendo dos rutas separadas hasta las áreas del hipotálamo, determinando así la liberación de prolactina, oxitocina y de la hormona de crecimiento (5,81,93).

### **1.2.3. Involución.**

Cuando el estímulo de succión es detenido totalmente, la presión retrograda de la leche dentro de los alveolos inhibe gradualmente la secreción de leche, dando lugar a la fase de regresión de células alveolares y de los conductos pequeños. Esta fase coincide con la presencia de una gran cantidad de lisosomas y de su actividad autofágica. Dentro de pocos días el resto de la leche contenida en el lumen alveolar y en los ductos es reabsorbida (28,88).

### **1.3. Control hormonal del desarrollo de la glándula mamaria.**

Los cambios hormonales que intervienen en el desarrollo y funcionamiento de la glándula mamaria, presentes antes del parto y durante la lactancia (Fig. 2), son similares entre las especies.

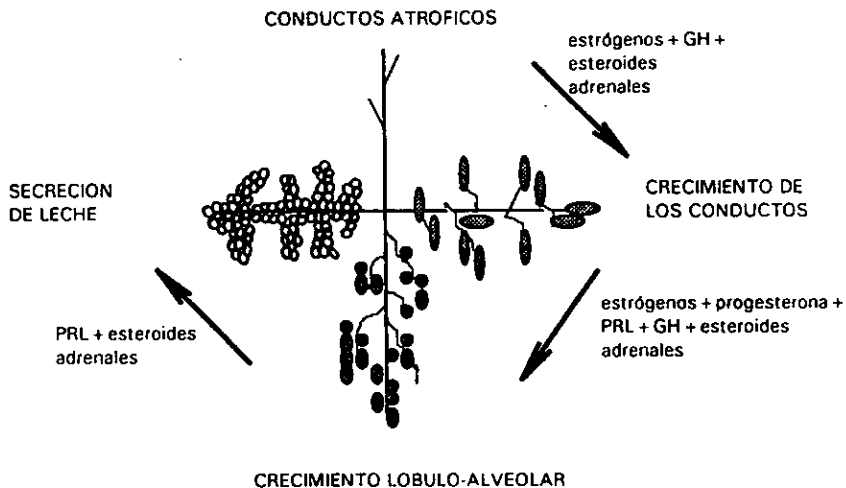


Fig.2. Hormonas relacionadas con el desarrollo de la glándula mamaria y con la secreción de leche (En: Stanbenfeldt GH., 1992).

Los estrógenos junto con la hormona de crecimiento y los esteroides adrenales son los responsables de la proliferación del sistema de conductos (5); el crecimiento de los alveolos en las terminales de los conductos necesitan además, de estas hormonas, progesterona y prolactina (16,88,90). En el ratón también se encuentra implicado el factor de crecimiento epidérmico en el desarrollo de la glándula mamaria (65).

La prolactina (PRL) se produce en células específicas de la porción anterior de la hipófisis llamadas lactótrofos, su producción se debe al efecto supresor de la acción tónica del factor de la inhibición de la prolactina (P.I.F.) y a un



factor o factores, uno de estos es la hormona tirotrópica, la cual probablemente facilita su producción (5). La prolactina actúa sobre receptores específicos de membrana en las células del epitelio glandular, promoviendo la síntesis intracelular de la leche y su transporte del interior de la célula a la luz alveolar (5,16). Por otro lado, la prolactina junto con los glucocorticoides están involucrados en la transcripción de el ARN mensajero (mARN) necesario para la síntesis de la caseína (16). Cuando existe ausencia de prolactina la producción de leche disminuye hasta un 50 %, pero cuando la hormona de crecimiento (GH) es neutralizada, al mismo tiempo, la secreción de leche es detenida completamente (7).

La hormona de crecimiento (GH) es liberada por la hipófisis durante la succión. Se ha demostrado que la actividad de la GH tiene un efecto mamogénico, porque estimula de manera significativa el desarrollo de estructuras alveolares (21), además participa en el transporte de iones y favorece la captación de metabolitos por la glándula mamaria (7,16). La GH es importante en el mantenimiento de la producción y de la secreción de lípidos por la glándula mamaria (23,84). La neutralización de la GH reduce potencialmente la lipogénesis y la captación de ácidos grasos por la glándula mamaria, mientras que tiene un efecto contrario en el tejido adiposo (7).

La oxitocina se produce en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, es almacenada en la hipófisis y es liberada a la circulación cuando la hipófisis recibe el estímulo producido por la succión. La cantidad de

oxitocina secretada por día es determinada por la duración de la succión (80). La oxitocina se combina con receptores específicos sobre las células mioepiteliales que rodean al alveolo (60,61) y produce la contracción de estas células, expulsando la leche de los alveolos hacia el sistema de conductos a través del cual fluye a las cisternas de la mama y del pezón (16,81).

La insulina, secretada por las células beta en el páncreas, juega un importante papel en la mamogénesis, debido a que interviene en la proliferación de conductos, durante el embarazo participa en la diferenciación de las células principales y de las mioepiteliales (5). En la lactancia, la insulina es esencial en el mantenimiento o la sobrevivencia de las células alveolares (16). Estimula el transporte de glucosa a través de las membranas en la glándula mamaria, proporcionando el sustrato disponible para la síntesis de lípidos (35). También se ha propuesto que la insulina es importante en la regulación de la captación de lípidos y de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en la glándula mamaria, lo cual se demostró al analizar la deficiencia de insulina y la deficiencia de insulina y prolactina en ratas lactantes (17,18,68); la deficiencia de insulina, provoca una disminución en la captación de trioleína marcada administrada intragástricamente y en la actividad de LPL en tejido mamario, estos cambios son más drásticos cuando la deficiencia es de insulina y prolactina.

#### 1.4. Síntesis de leche.

La síntesis de leche en la glándula mamaria cambia marcadamente durante el período de lactancia, incrementa dramáticamente en la primera parte de la lactancia y disminuye gradualmente después del período de máxima producción láctea (63), esta etapa se presenta en las ratas entre el día 10 y 14 de lactancia .

Durante la lactancia la glándula mamaria capta de la circulación: glucosa, aminoácidos y ácidos grasos no esterificados, para la síntesis de los componentes de la leche (101).

Se han definido cinco vías específicas (Fig. 3), que actúan paralelamente, para la síntesis y secreción de la leche en la glándula mamaria. Estas vías transforman a precursores derivados de la sangre y a precursores internos en constituyentes de la leche.

- **Mecanismo I (Exocitosis):** Las micelas de caseína, las proteínas, el calcio, el fosfato y el citrato son empaquetados en vesículas secretoras (51). Estas vesículas se mueven hacia el ápice de la célula, se fusionan con la membrana celular y liberan su contenido hacia la luz alveolar por exocitosis (60,59).
- **Mecanismo II (Síntesis y secreción de lípidos):** Los triacilgliceroles sintetizados en el citosol y en el retículo endoplásmico liso, coalescen en vacuolas y se dirigen al ápice de la célula, ahí son envueltos por una

porción de la membrana apical y son separados de la célula como glóbulos de grasa (8,38,59,60).

- **Mecanismo III (Secreción de iones y agua):** El sodio, el potasio y el agua atraviesan la membrana libremente. El agua lo hace de acuerdo a un gradiente osmótico impuesto por la lactosa. Los electrolitos se mueven bajo su gradiente electroquímico (59,60).
- **Mecanismo IV (Secreción de inmunoglobulinas):** La inmunoglobulina A (IgA) y otras proteínas se unen a un receptor específico en la membrana basolateral de la célula. El receptor y la inmunoglobulina son internados en vesículas endocíticas para ser transportadas hacia la membrana apical y ser excretadas al lumen alveolar (31,59,60).
- **Mecanismo V (Vía paracelular):** se designa como mecanismo paracelular porque involucra el paso entre las paredes laterales de las células epiteliales. A través de esta ruta se transportan células, proteínas plasmáticas y sodio. Durante el embarazo las uniones paracelulares herméticas se encuentran separadas y se cierran progresivamente hacia el final del embarazo y el principio de la lactancia (47,59,60).

La síntesis de leche está determinada por la capacidad y el número de células secretoras, el número de células está ligado a factores genéticos, mientras que la capacidad de cada una está influenciada por factores externos, tales como la alimentación y las condiciones climáticas (90).

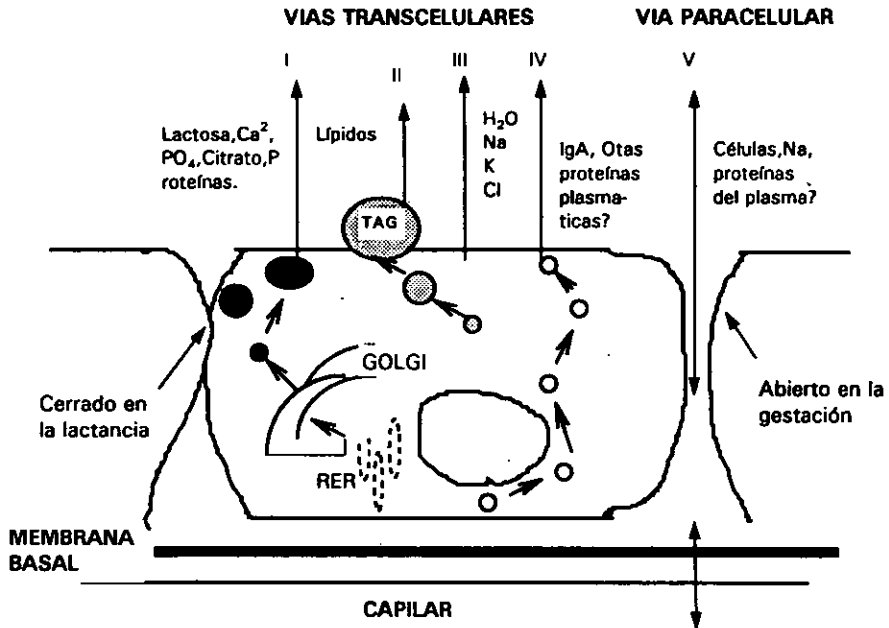


Fig. 3. Vías de síntesis y secreción de leche por la célula epitelial mamaria (En Neville MC, Allen JC. and Watters C. 1983).

#### 1.4.1. Lípidos.

Los lípidos son la principal fuente de energía para el recién nacido (15,40) y son esenciales para su crecimiento debido a que proporcionan los ácidos grasos necesarios para el desarrollo del cerebro, forman parte integral de las membranas celulares y son el vehículo para transportar vitaminas y hormonas liposolubles (36,98).

Los lípidos son el componente más variable en la leche, su concentración y composición varía entre individuos, dependiendo de factores como la

alimentación, la duración de la gestación, la etapa de lactancia y la hora del día (3,32,35,36,60,70).

Los lípidos de la leche se encuentran contenidos en los glóbulos de grasa formados por membranas tridimensionales compuestas por fosfolípidos, colesterol y proteínas (98,44). Entre el 97 y el 99 % de los lípidos contenidos en estos glóbulos son triacilgliceroles (15,32,36,44,70), los cuales proporcionan entre el 40 al 50 % de la energía total de la leche (34,61).

Los ácidos grasos de los triacilgliceroles de la leche provienen de la circulación o de la síntesis en la glándula mamaria (30,44,58,67,101).

Los ácidos grasos de cadena corta (con menos de 8 carbonos), especialmente butírico y hexanoico, son tomados directamente de la circulación o sintetizados a partir de  $\beta$ -hidroxibutirato (61). Los ácidos grasos de cadena media (C8-14) son sintetizados en la glándula mamaria, a partir de glucosa, acetato, lactato y algunos aminoácidos (27,32,70,100). Los ácidos grasos de cadena larga ( $\geq$  C16), saturados e insaturados, provienen de la dieta o de la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo. La composición de los ácidos grasos en la leche varía con la especie y el tipo de dieta (30,32,61).

#### **1.4.1.1. Captación de los lípidos circulantes y la actividad de la LPL.**

Durante la lactancia, los ácidos grasos de cadena larga, provenientes de la dieta y de la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo (32), son transportados hacia la glándula mamaria en los quilomicrones y en las

lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (81,102). La lipoproteína lipasa (LPL) presente en el endotelio capilar mamario, convierte a los triacilgliceroles de las lipoproteínas circulantes en ácidos grasos libres, diacilgliceroles y en 2-monoacilgliceroles (34), que son transportados hacia el interior del lactocito y convertidos nuevamente en triacilgliceroles (32,33,83).

La lipoproteína lipasa es la enzima que se ha descrito como clave para permitir la captación de lípidos por los tejidos. Es una proteína, de 55-kDa, sintetizada por células del parénquima en varios tejidos y es transportada a su sitio de acción en el endotelio vascular donde cataliza la hidrólisis de los triacilgliceroles de los quilomicrones y de las VLDL para que los productos de la hidrólisis puedan ser captados por los tejidos (16,34,49,61,92). La elevada actividad de la LPL durante la lactancia en la glándula mamaria (61,67) y su baja actividad en el tejido adiposo, permiten dirigir a los lípidos circulantes preferentemente hacia la glándula mamaria para la formación de leche (37,49,105).

#### **1.4.1.2. Regulación de la actividad de LPL.**

La actividad de LPL en los tejidos puede cambiar rápidamente bajo diferentes condiciones fisiológicas (37), tal es el caso de los cambios que se presentan en el tejido adiposo y en la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia. La actividad de la LPL en el tejido adiposo es elevada en la gestación, sin embargo, al final de este período la actividad de la enzima

disminuye significativamente en el tejido adiposo al mismo tiempo en que la actividad de la LPL en glándula mamaria aumenta (37,49,69,83).

Se ha propuesto la participación de algunas hormonas, como la prolactina (PRL) y la insulina en la regulación de la actividad de la LPL (17,18,68,83,84).

Existe amplia evidencia de que la prolactina participa en la regulación de la actividad de LPL en la glándula mamaria. La concentración de esta hormona aumenta en respuesta al estímulo de succión. En ratas lactantes hipofisectomizadas, la actividad de la LPL en la glándula mamaria disminuye en las primeras 6 h después de la operación, mientras que la actividad de la enzima en el tejido adiposo aumenta. Al inyectar a estas ratas prolactina, la actividad de la enzima en la glándula mamaria aumenta hasta alcanzar sus valores normales y disminuye en el tejido adiposo (105). En ratas tratadas con bromocriptina (inhibidor de la secreción de prolactina), la actividad de la LPL en glándula mamaria disminuye (7), restableciéndose la actividad de la enzima al administrar prolactina.

La separación de las crías de la rata madre ocasiona la disminución en los niveles de PRL y de la actividad de la LPL en la glándula mamaria. Algunas evidencias experimentales han sugerido que la prolactina no es la única hormona que controla la actividad de la LPL en glándula mamaria. El sellado de las tetas de ratas lactantes, que permite la succión pero no la salida de leche disminuye hasta en un 50 % la actividad de la LPL en la glándula mamaria sin cambios en la concentración de la PRL circulante. El ayuno por



24 h en ratas lactantes disminuye la síntesis de la leche y la actividad de la LPL en la glándula mamaria sin que se presenten modificaciones en la concentración en sangre de la PRL (68).

La insulina es otra de las hormonas que pueden estar involucradas en la regulación de la actividad de la LPL en la glándula mamaria. La actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria es estimulada por la insulina cuando la secreción de PRL es inhibida por bromocriptina (17). La deficiencia de insulina inducida por estreptozotocina disminuye la actividad de la LPL en la glándula mamaria. La deficiencia paralela de PRL e insulina causa un cambio más dramático en la actividad de la enzima. El remplazo de insulina a ratas deficientes de insulina o de insulina y prolactina restablece la actividad de la LPL en la glándula mamaria (18).

#### **1.4.1.3. Síntesis de ácidos grasos.**

Los ácidos grasos de cadena media presentes en la leche provienen de la síntesis de novo en la glándula mamaria utilizando a la glucosa como el principal sustrato lipogénico (Fig. 4).

La glucosa dentro de la glándula mamaria:

1) Es convertida en acetyl-coenzima A (CoA) proporcionando las unidades de carbono para la síntesis de los ácidos grasos.

2) Es convertida a ribulosa-5-fosfato por la ruta del ácido 6-P-glucónico, contribuyendo a la formación de NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos (75).

3) Es transferida a gliceraldehido-3-fosfato en la glucólisis, el cual puede ser convertido a glicerol-3-fosfato y utilizado para la síntesis de triacilgliceroles (60).

En el citosol de células mamarias, la glucosa es fosforilada y convertida a piruvato por la glucólisis. Dentro de la mitocondria el piruvato es oxidado por la enzima piruvato deshidrogenasa a acetil-CoA. La acetil-CoA se une con oxalacetato en el primer paso del ciclo de Krebs para formar citrato, el cual es transportado al citosol y convertido a acetil-CoA por la enzima ATP citrato liasa. La conversión de acetil-CoA a malonil-CoA es el paso limitante en la biosíntesis de ácidos grasos y es catalizado por la enzima acetil-CoA carboxilasa en presencia de ATP. Después de la formación de malonil-CoA, la sintetasa de ácidos grasos cataliza una secuencia de siete reacciones, cada reacción adiciona dos carbonos derivados del malonil-CoA para la enlogación de la cadena. Cada ciclo requiere dos moléculas de NADPH (50,60,61,103).

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 de su sitio de unión con la enzima. En el citosol de las células epiteliales

mamarias en animales no rumiantes, la síntesis de ácidos grasos es detenida por la tioesterasa II, después de que la cadena de ácido graso alcanza una longitud de 8 a 14 carbonos (35,61,85).

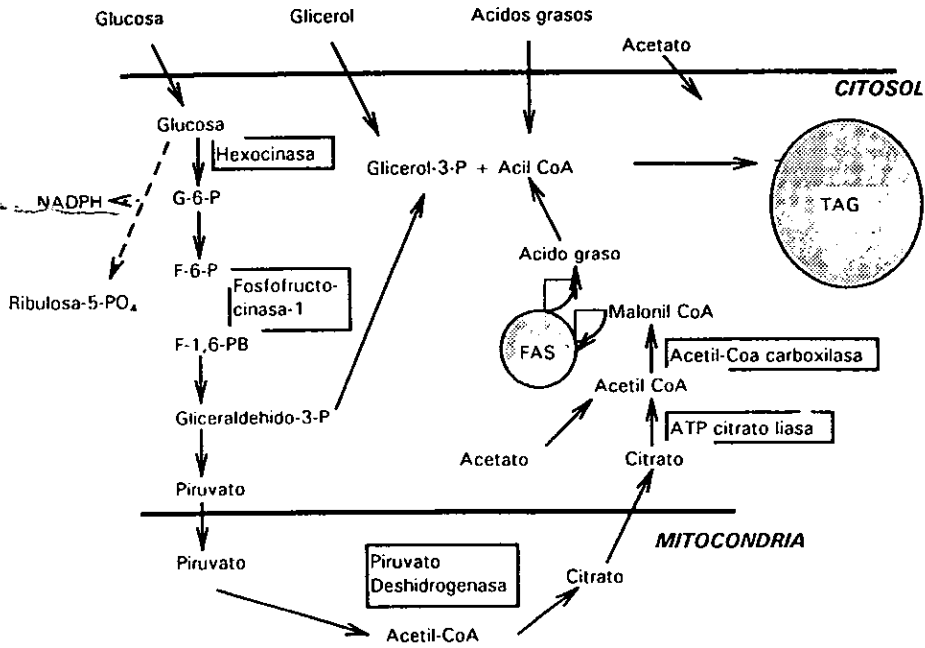


Fig.4. Síntesis de lípidos en la glándula mamaria (En Neville MC. and Picciano MF. 1997).

#### 1.4.1.4. Regulación de la lipogénesis.

La regulación a corto plazo de la lipogénesis en la glándula mamaria es compleja y varía en respuesta al estado hormonal y nutricional del animal, de

manera fisiológica (2). Entre los múltiples mecanismos de control podría incluirse la regulación de la transcripción del ADN para formar ARN mensajero y la subsecuente traducción a enzimas específicas de la síntesis de lípidos (53).

La acetil-CoA carboxilasa y la piruvato deshidrogenasa (PDH) son enzimas clave y sitios de regulación de la lipogénesis (7). 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 polimerización de la enzima causando un aumento en su actividad. Por otra parte los acil CoA de cadena larga (principalmente palmitoilCoA), productos de la síntesis de ácidos grasos, favorecen la disociación de la enzima hacia su forma menos activa.

La acetil-CoA carboxilasa es además regulada por ciclos de fosforilación-defosforilación. La fosforilación de la enzima causa su inactivación (38,46,93).

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 rápidamente al someter a un período de ayuno a la rata madre lactante que coincide con un aumento en la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (56,61,79). También la administración de triacilgliceroles, así como el consumo de dietas con un elevado contenido de lípidos, disminuye la lipogénesis mamaria y aumenta la fosforilación de la enzima (2,79,87). En

cultivos de células secretoras de ratas alimentadas con una dieta alta en lípidos, la insulina puede aumentar la actividad de la acetil-CoA carboxilasa a través de aumentar la defosforilación de la enzima (57).

La piruvato deshidrogenasa también es controlada a través de su estado de fosforilación, se encuentra en forma activa (defosforilada) e inactiva (fosforilada) (100,103). En la regulación de la piruvato deshidrogenasa cinasa están involucrados cuatro factores: la concentración de piruvato y las relaciones ATP/ADP, acetil-CoA/CoA y NADH/NAD<sup>+</sup>. Elevados valores de estas relaciones activan la cinasa e inhiben a la piruvato deshidrogenasa (71). En acinis de ratas alimentadas con dieta de cafetería (alimentos con elevado contenido energético) se presenta una depresión en la actividad de la piruvato deshidrogenasa (1).

#### **1.4.1.5. Influencia de la dieta sobre la composición de los lípidos de la leche.**

La dieta controla la síntesis de los ácidos grasos y de los triglicéridos de la leche, modulando la síntesis o la actividad de las enzimas que intervienen en su síntesis, aumentando la disponibilidad de cofactores (ác. pantoténico, biotina) o influenciando la concentración de hormonas que inducen la síntesis de algunas de las enzimas lipogénicas (34).

Existen variaciones en la proporción de los ácidos grasos de la leche, ocasionadas por cambios en el contenido y composición de los lípidos de la dieta. Estudios en humanos y animales han mostrado que al proporcionar una

dieta con alto contenido de carbohidratos y un bajo contenido de lípidos, la proporción de ácidos grasos de cadena media en la leche aumenta (35,101). Cuando se proporciona a la madre, una dieta con elevado contenido de lípidos o se le administra una carga intragástrica de lípidos, que resulta en la constante liberación de quilomicrones a la circulación (66,91), se tiene como resultado una disminución en la lipogénesis en la glándula mamaria que repercute en la disminución en la proporción de los ácidos grasos de cadena media en la leche y en el aumento en la proporción de ácidos grasos de cadena larga provenientes de la dieta (1,2,13,30,32,35,54,57,87,100,101).

#### **1.4.2. Proteínas.**

Las proteínas de la leche son sintetizadas en la glándula mamaria a partir de los aminoácidos tomados de la circulación (16), los cuales provienen principalmente de la dieta y de la movilización de proteínas corporales (95). La glándula mamaria puede sintetizar también aminoácidos no esenciales a partir de glucosa y de acetato (81).

La  $\alpha$ -lactoalbúmina, es una proteína con función catalítica y nutricional, puede contribuir hasta con el 30 % de las proteínas de la leche (95). Esta proteína se encuentra presente en la leche de todas las especies que secretan lactosa, debido a que actúa como cofactor en el proceso de síntesis de lactosa.

La lactoferrina es una proteína que une hierro y que actúa como bactericida y como agente bacteriostático (60).

La  $\alpha$  y  $\beta$ -caseína, son proteínas lineales que contienen una gran proporción de residuos de prolina. Una de los extremos terminales de cada una de estas moléculas tiene una gran cantidad de grupos carboxilo y fosfato cargados negativamente, lo que permite que interactuen con calcio para formar micelas (60).

La secuencia de la síntesis de proteínas en la célula epitelial mamaria incluye la replicación de ADN, la transcripción del ADN para formar el mRNA y la traducción del mRNA para la formación final de la proteína. El producto inicial derivado de la traducción del mRNA de la caseína y la lactalbúmina contiene una secuencia extra de 16 a 18 aminoácidos en el extremo N-terminal que se ha denominado péptido serial. Esta proteína es procesada en el retículo endoplásmico en donde se remueve el péptido serial y se añaden residuos de oligosacáridos ricos en manosa. Una vez que la proteína es modificada es transferida al sistema de Golgi, en donde toma lugar la fosforilación de las proteínas y la formación de micelas de caseína. Las proteínas envueltas en vesículas secretoras migran a la membrana apical de la célula y son secretadas por exocitosis (81).

#### **1.4.3. Lactosa.**

La lactosa es el principal carbohidrato en la leche humana, es un disacárido de glucosa y galactosa, sintetizado sólo en los mamíferos (62,90,100).

Una parte de la glucosa que entra a la glándula mamaria se dirige al Aparato de Golgi donde es combinada con UDP-galactosa para formar lactosa, reacción catalizada por el complejo de la lactosa sintetasa (62). El complejo de la lactosa sintetasa consiste en dos componentes, la enzima galactosil transferasa y la parte reguladora que es la  $\alpha$ -lactoalbúmina. La galactosil transferasa cataliza la transferencia de los grupos galactosil de la UDP-galactosa a los carbohidratos de las glicoproteínas. La unión de la  $\alpha$ -lactoalbúmina a la galactosil transferasa aumenta la afinidad de la enzima por la glucosa, permitiendo que la síntesis de lactosa ocurra (16,60).

#### 1.5. Cambios en el metabolismo materno durante la lactancia.

Durante la lactancia el cuerpo materno sufre una serie de cambios en el metabolismo de varios tejidos con el fin de proporcionar los substratos necesarios por la glándula mamaria para la síntesis de leche, entre estos cambios se encuentran:

1. La hipertrofia del hígado, que está acompañada por cambios en la actividad de las enzimas que intervienen en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (100,101). El hígado convierte una gran proporción de ácidos grasos de cadena larga provenientes de la dieta en lípidos esterificados y disminuye la proporción que es convertida en cuerpos cetónicos, con el fin de proporcionar lípidos a la glándula mamaria en el inmediato estado post-absortivo (101,104).



2. La hipertrofia del intestino delgado que acompañada por la hiperplasia de la mucosa intestinal, aumenta la capacidad absorbente del intestino (100,101).
3. El aumento en la movilización de los lípidos acumulados durante la gestación y la disminución en la síntesis y captación de lípidos en el tejido adiposo, tienen como resultado que menos glucosa y triacilgliceroles sean captados por el tejido adiposo y más ácidos grasos no esterificados y glicerol sean liberados a la circulación para ser captados por la glándula mamaria (52).
4. El aumento en el consumo de alimento es en función del requerimiento de energía asociado con la síntesis de leche. En general los animales con una elevada producción de leche tienden a comer más alimento (22), en el caso de las ratas, estas llegan a triplicar su consumo calórico durante la lactancia (55).

## 2. JUSTIFICACIÓN.

Estudios previos han mostrado que el consumo de una dieta con elevado contenido de lípidos durante la lactancia, repercute en una mayor concentración de lípidos en la leche y en un mayor crecimiento de las crías en la rata (20,41). El análisis de la composición de ácidos grasos en la leche y la medición de la lipogénesis en la glándula mamaria, muestra que la síntesis de lípidos en este tejido es menor en los animales alimentados con la dieta con elevado contenido de lípidos. Se desconoce el efecto de el consumo de esta dieta sobre la captación de los lípidos de origen dietario y la actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria.

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL:**

Determinar los efectos de proporcionar a la rata, desde la gestación y durante la lactancia, una dieta isoenergética pero con elevado contenido de lípidos sobre la captación de lípidos por la glándula mamaria.

#### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Comparar la actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria de las ratas alimentadas durante el embarazo y la lactancia con dietas con niveles contrastantes de lípidos.
2. Evaluar la captación de una dosis de  $^{14}\text{C}$ -trioleína por la glándula mamaria y su transferencia a las crías de ratas alimentadas durante el embarazo y la lactancia con dietas con niveles contrastantes de lípidos.

#### 4. HIPÓTESIS:

La actividad de la lipoproteína lipasa, la captación de la  $^{14}\text{C}$ -trioleína en la glándula mamaria y su transferencia a las crías será mayor en las ratas alimentadas con la dieta alta en lípidos.

## 5. MATERIAL Y MÉTODO.

### 5.1. Animales:

Se utilizaron 50 ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley con doce semanas de edad, obtenidas del bioterio del Centro Médico Nacional siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Las ratas fueron alimentadas a libre demanda con alimento comercial (Laboratory rodent diet, PMI Feeds Inc, St Louis MO, USA.) y mantenidas a temperatura de 22°C con ciclos de luz-oscuridad de 12 h. A las 12 semanas de edad, las ratas con un peso corporal entre 220 y 280 gramos se adaptaron durante un período de dos semanas a una dieta purificada (dieta BL), cuya composición porcentual de nutrimentos fue similar a la dieta comercial que se les proporcionaba anteriormente (25 % de proteína, 61.5 % de hidratos de carbono y 2.5 % de lípidos). A las 14 semanas de edad las ratas con un peso entre 220 y 280 gramos se aparearon con machos de la misma cepa por el método de tríos (9).

Se determinó el primer día de gestación por la presencia de espermatozoides en la citología vaginal (**Anexo 1**), ese día las ratas fueron transferidas a jaulas individuales y asignadas aleatoriamente a dos grupos para recibir una de dos tipos de dieta (**Tabla 1**). El día de parto se consideró como el primer día de lactancia.

El grupo de ratas alimentadas con la dieta baja en lípidos (BL), grupo control, se les proporcionó durante todo el período de gestación y la lactancia, la misma dieta purificada (2.5 % de lípidos) que recibieron durante el período de adaptación, esta dieta es isoenergética a la dieta habitual de la rata.

El grupo de ratas alimentadas con la dieta alta en lípidos (AL), recibió desde el inicio de la gestación y durante la lactancia una dieta con 20 % de lípidos (dieta AL), la cual fue isoproteica e isoenergética con la dieta BL.

Tabla 1. Composición de las dietas.

Componentes de la dieta	Dieta BL (g/Kg)	Dieta AL (g/Kg)
Caseína <sup>1</sup>	284.0	284.0
Glucosa	308.0	110.0
Almidón	308.0	110.0
Celulosa	38.7	259.7
Metionina	3.0	3.0
Minerales <sup>2</sup>	26.1	26.1
Vitaminas <sup>3</sup>	10.0	10.0
Lípidos	22.2	197.2

1.-Caseinato de calcio (Biotecnología y Nutrición, S.A. de C. V.) cada 100g contienen: proteínas 86 a 90g que equivalen a 13.5-14.1g de nitrógeno, minerales 3.8 a 6 g, grasa 0.0 a 2.0g y humedad 0 a 6.2g.

2.-Mineral Mix, Rogers-Harper (Harlan, Tecklad) contenido por Kg.: molibdato de amonio 0.025g, carbonato de calcio 292.9g, fosfato de calcio 4.3g, sulfato cúprico 1.56g, citrato férrico 6.23g, sulfato de magnesio 99.8g, sulfato de manganeso 1.21g, yoduro de potasio 0.005g, fosfato de potasio 343.1 g, cloruro de sodio 250.6g, selenito de sodio 0.015g, cloruro de cinc 0.2g.

3.-Vitamin Mix, Tecklad (Harlan, Tecklad) contenido por Kg.: ácido p-aminobenzoico 11.01g, ácido ascórbico 101.66g, biotina 0.044g, cyanocobalamina 2.97g, pantotenato de calcio 6.61g, citrato de colina 349.69g, ácido fólico 0.20g, inositol 11.01g, menadiona 4.95g, niacina 9.91g, piridoxina HCl 2.20g, riboflavina 2.20g, tiamina HCl 2.20g, palmitato de retinol anhidro 3.96g, ergocalciferol anhidro 24.23g, almidón de maíz 466.67g.

### **5.2. Registro del consumo de alimento:**

A partir del primer día de gestación y durante la lactancia, se registró cada tercer día el consumo de alimento de la rata madre. Se le proporcionó a cada rata 200 g del alimento correspondiente de acuerdo a su grupo de dieta y al tercer día a la misma hora se colectó el alimento residual. El consumo de alimento se calculó a partir de la diferencia entre el alimento proporcionado y el alimento residual.

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

A partir del primer día de gestación, se registró el peso corporal de la rata madre utilizando una báscula electrónica marca "OHAUS" con sensibilidad de 0.1 g.

El peso se registró a la misma hora en que se les colocó el alimento.

El día del parto, considerado como el primer día de lactancia, se registró el peso y número de crías de cada rata; se ajustó el tamaño de la camada a ocho crías por rata. A partir del primer día de lactancia, se registró cada tercer día el peso corporal de la camada utilizando una báscula electrónica marca "OHAUS" con sensibilidad de 0.1 g. El registro se llevo a cabo a la misma hora en la que se les proporcionó el alimento.

#### 5.4. Determinación de la transferencia de [1-<sup>14</sup>C]trioleína:

Entre el día 12 y 14 de lactancia (período de máxima producción láctea) las ratas madre recibieron por vía bucal

[1-<sup>14</sup>C]trioleína (0.5 g, 0.8  $\mu$ Ci) entre las 8:00 y 9:00 am. Las ratas junto con su camada se introdujeron dentro de un desecador, en un sistema (Fig. 5) diseñado para capturar el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> proveniente de la oxidación de la [1-<sup>14</sup>C]trioleína. El <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fue atrapado con una solución de KOH saturada, la solución de KOH se cambio cada hora durante 5 horas. Después de este período las ratas madre fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/Kg de peso corporal), se tomó una muestra de sangre de la arteria aorta abdominal. Un fragmento de glándula mamaria (aproximadamente 1 g) se disecó y se congeló inmediatamente en unas compresas de acero inoxidable enfriadas con nitrógeno líquido. El tracto gastrointestinal, la glándula mamaria, el tejido adiposo parametrial y el hígado fueron disecados y se registró el peso de cada uno de los tejidos. Las crías fueron sacrificadas con éter etílico, se disecó el estómago de cada cría y el contenido estomacal (cuajo de leche) fue pesado. El carcass de las crías y el de la rata madre fueron homogeneizados por separado en 1 volumen de H<sub>2</sub>O, el carcass se obtuvo al quitar a las ratas la cabeza, cola, piel y vísceras. El tracto gastrointestinal de la madre se homogeneizó en HClO<sub>4</sub> al 3 % .

La sangre se centrifugó durante cinco minutos, 20  $\mu$ l de suero se colocaron en viales que contenían 10 ml de líquido de centelleo y se determinó la



radiactividad de la muestra en un contador líquido de centelleo (Beckman, Fullerton, CA).

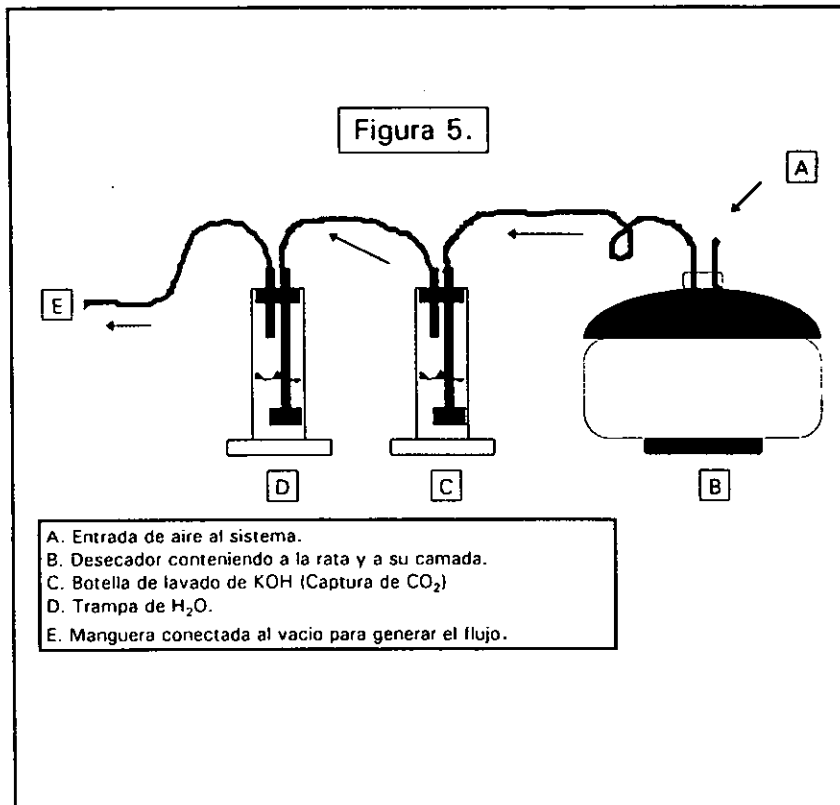
La dosis absorbida se calculó a partir de la diferencia entre la dosis de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] trioleína administrada y los lípidos radiactivos presentes en el tracto gastrointestinal de la madre.

#### 5.5. Determinación de la acumulación de los $^{14}\text{C}$ lípidos en los tejidos:

La acumulación de los lípidos marcados en los tejidos se determinó midiendo la radiactividad en los lípidos extraídos de los tejidos.

Se pesaron muestras por duplicado de cada uno de los tejidos (aproximadamente 0.5 g) y de los homogeneizados de el tracto gastrointestinal y de los carcass (aproximadamente 5 g). Los lípidos se saponificaron con la adición de 1.5 ml de KOH al 60 %. Los tubos se incubaron 10 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  y se les adicionó 1.5 ml de etanol absoluto, agitando la mezcla en vortéx e incubando nuevamente a  $70^{\circ}\text{C}$  por dos horas. Después de la incubación, las muestras se neutralizaron con 1.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6M y se extrajeron los lípidos tres veces con éter de petróleo (89).

La fase etérea se lavó con agua y se evaporó durante 24 horas en viales previamente pesados. Se adicionaron 10 ml de líquido de centelleo a cada vial y se determinó la radiactividad en los lípidos extraídos en un contador líquido de centelleo.



### 5.6. Determinación de la actividad de la lipoproteína lipasa :

El fragmento de glándula mamaria congelada se pulverizó sin descongelar en un mortero de porcelana enfriado con nitrógeno líquido. Una vez pulverizado, se registró su peso y se le adicionó acetona enfriada a -20°C, se agitó y centrifugó durante cinco minutos a 2500 r.p.m. La acetona se decantó y se repitió el mismo procedimiento tres veces. El polvo obtenido se lavó con 10 ml de éter etílico y el polvo se dejó secar en un desecador a vacío durante dos

horas. Se registró el peso del polvo y una muestra se utilizó para extraer la enzima.

#### **5.6.1. Extracción de la enzima**

La enzima se extrajo del polvo acetónico utilizando un amortiguador (Tris-HCl 0.05M con 1M de etilen glicol, pH 8.0). La mezcla se mantuvo en hielo con agitación constante durante una hora. Después de centrifugar, el sobrenadante se utilizó como fuente de la enzima.

#### **5.6.2. Preparación del sustrato**

Se mezclaron 300 mg de trioleína no marcada con 99 % de pureza, 0.25 mCi de trioleína tritiada, 18 mg de lecitina y 6.28 g de glicerol. La mezcla se emulsificó en hielo durante cinco minutos en un homogenizador de tipo Polytron a velocidad máxima. Esta solución es estable durante seis semanas a temperatura ambiente.

El día del ensayo, se preparó el sustrato mezclando un volumen de la solución de trioleína concentrada, cuatro volúmenes de amortiguador Tris-HCl 0.2 M, pH 8.0 con 3 % de albúmina de suero libre de ácidos grasos y un volumen de suero de rata. El suero se obtuvo de ratas en ayuno de 24 horas y se calentó 10 minutos a 60°C para eliminar su actividad lipolítica.

### **5.6.3. Determinación de la actividad de la lipoproteína lipasa:**

La actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) se determinó por el método descrito por Nilson-Ehle (64) utilizando una emulsión de trioleína tritiada como sustrato y determinando los ácidos grasos liberados por la acción enzimática.

La determinación de la actividad enzimática se efectuó por duplicado. Se mezclaron 100  $\mu$ l de la solución del sustrato con 100  $\mu$ l de el extracto enzimático y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Al finalizar el período de incubación se adicionaron 3.3 ml de una mezcla de metanol-cloroformo-heptano 1.45:1.25:1 (v/v/v) y un mililitro de amortiguador de carbonato de potasio-borato 0.1M, pH 10.5. La mezcla se agitó 15 segundos y se centrifugó durante 15 minutos a 2500 r.p.m.. Se determinó la radiactividad en un mililitro de la fase acuosa con un contador líquido de centelleo.

### **5.6.4. Determinación de proteínas**

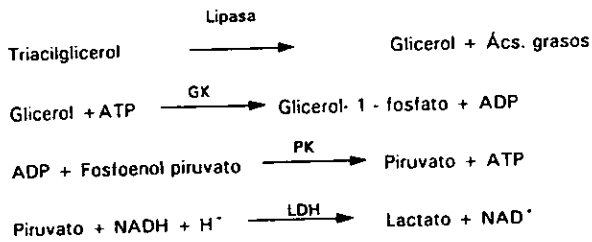
Se determinó la concentración de proteínas en 20  $\mu$ l de el extracto enzimático por el método de Lowry modificado por Hartree (39,48).

La curva patrón fue preparada adicionando 0, 200, 400, 600 y 800  $\mu$ l de solución estándar de albúmina sérica bovina (100  $\mu$ g/ml) a diferentes volúmenes de agua hasta obtener un volumen final de 1 ml, obteniéndose una curva estándar con 0, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ g de albúmina por ml. A todos los tubos se les agregaron 900  $\mu$ l de solución A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y Tartrato de Na-K en NaOH al 1 N), se agitaron e incubaron durante 10 minutos a 50°C. Al

termino de la incubación se dejaron reposar 5 minutos a 5°C, después de lo cual se les adicionaron 100 µl de solución B (Tartrato de Na-K y Sulfato cúprico·5H<sub>2</sub>O en NaOH al 1N). Después de un reposo de 10 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 3 ml de solución C (1vol. Folín Ciocalteau de Sigma Diagnostics por 15 vol. de H<sub>2</sub>O), se agitaron vigorosamente y se incubaron a 50°C durante 10 minutos. La absorbancia se midió a 740 nm.

#### **5.7. Determinación de los triacilgliceroles en suero.**

La determinación de triacilgliceroles en suero se llevó a cabo con un método colorimétrico enzimático ("Triglyceride-UV", Sigma Diagnostics). En este método los triacilgliceroles son hidrolizados por la lipasa a glicerol y ácidos grasos. El glicerol es fosforilado con adenosin trifosfato (ATP) para producir glicerol-1-fosfato y adenosin difosfato (ADP), en una reacción catalizada por la glicerol cinasa (GK). El ATP es regenerado en una reacción catalizada por la piruvato cinasa (PK) en donde participan el ADP y el fosfoenol piruvato. El piruvato formado en esta reacción es reducido a lactato con oxidación simultánea de cantidades equimolares de NADH en presencia de la lactato deshidrogenasa (LDH). La disminución en la concentración de NADH se traduce en la disminución en la absorbancia a 340 nm y es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos (12) .



En los tubos de ensaye de las muestras, de el control y del blanco se colocó 1 ml de reactivo y se incubaron a 37°C por un período de 10 minutos. Al tubo denominado como control se le adicionó 20 µl de estándar (Precinorm U, Boehringer; rango de concentración 90-120 mg/dl) y a los tubos restantes se les adicionó 20 µl de suero. Los tubos se mezclaron, se incubaron durante 10 minutos a 37°C y al término de este período se determino la densidad óptica a 340 nm. El calculo de la concentración de triacilgliceroles se basa en la absortividad molar del NADH ( $6.22 \times 10^3$ ).

#### 5. 8. Análisis estadístico:

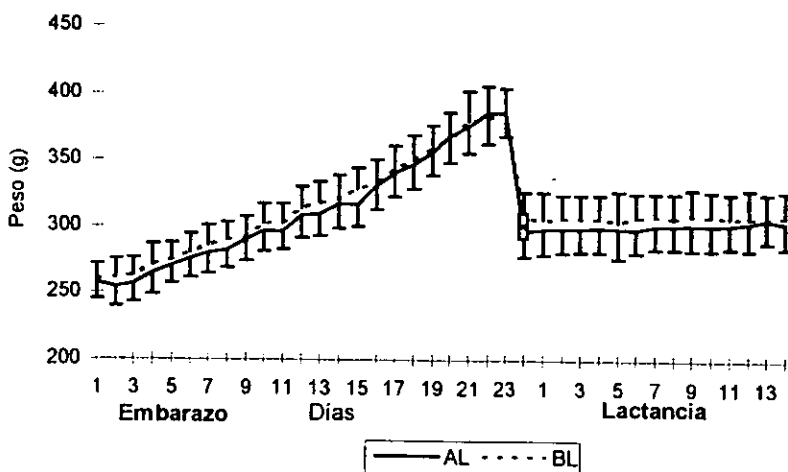
Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. El análisis de crecimiento de las crías y ganancia de peso se llevó a cabo mediante un análisis de regresión para el cálculo de los pesos teóricos en los días que no se llevo a cabo la medición. Las series longitudinales de datos (consumo de alimento, peso corporal de la rata madre y crecimiento de las crías) fueron comparadas con ANOVA bifactorial para mediciones repetidas.

La actividad de LPL y la acumulación de la [1-<sup>14</sup>C]trioleína en los tejidos fueron comparados con ANOVA bifactorial para Mediciones independientes realizando todas las comparaciones *post hoc* por el método de Tukey (HSD) con un nivel  $\alpha = 0.05$ . (86).

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Peso corporal de las ratas madre:

En la gráfica 1 se muestra el peso corporal de las ratas de los grupos AL y BL (grupo control) durante el embarazo y la lactancia.



Gráfica 1. Peso corporal de las ratas madre durante el embarazo y la lactancia. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar con  $n = 13$ .

El peso corporal de los animales de los dos grupos aumentó progresivamente durante el embarazo. El día del parto el peso corporal de los animales en ambos grupos disminuyó bruscamente y se mantuvo constante durante la etapa de lactancia. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de dieta en ninguna de las etapas estudiadas.

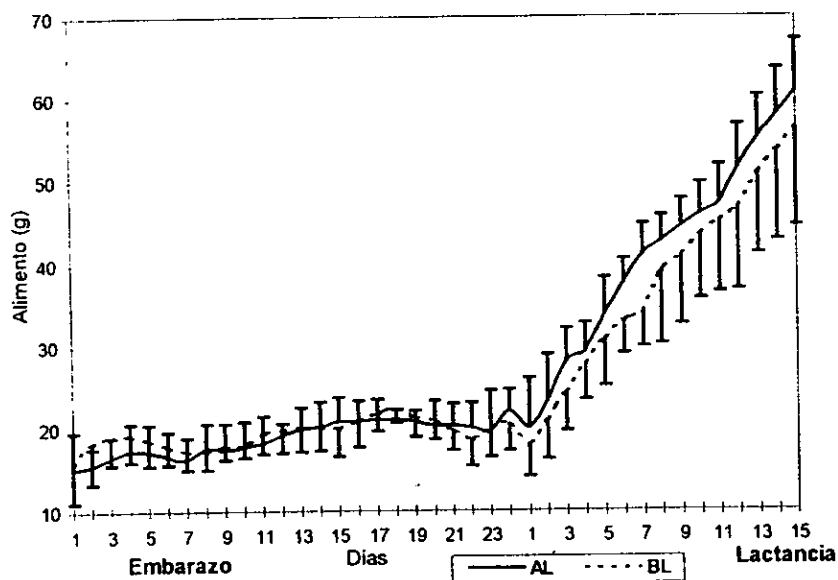


## 6.2. Consumo de alimento de las ratas madre:

El consumo de alimento expresado en gramos por día de las ratas de los dos grupos de dieta se muestra en la gráfica 2.

El consumo de alimento aumentó ligeramente en ambos grupos de animales durante la gestación. A partir del primer día de lactancia, el consumo de alimento aumentó importantemente en los animales de ambos grupos.

Al final del período de estudio el consumo de los dos grupos de ratas fue tres veces mayor que el mostrado al inicio del embarazo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las etapas estudiadas.



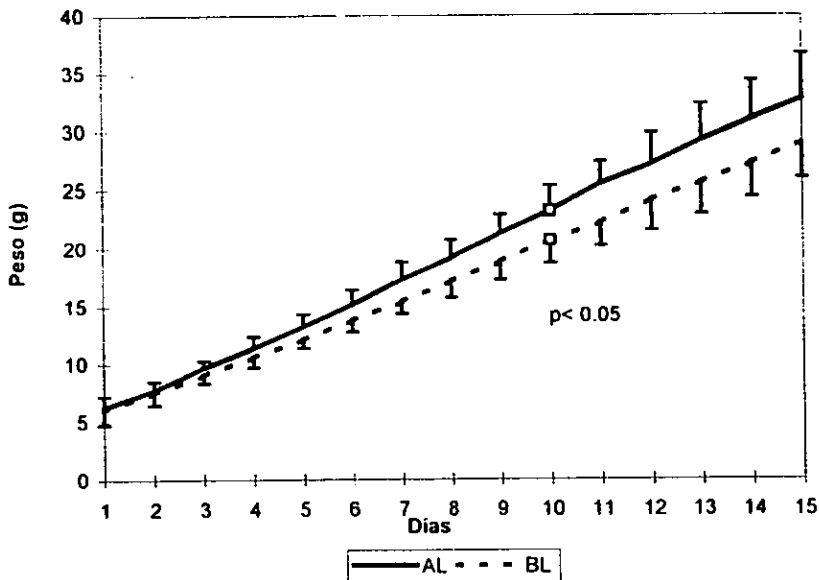
Gráfica 2. Consumo de alimento de las ratas madre.  
Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar con  $n=11$ .

### 6.3. Peso corporal de las crías:

En la gráfica 3 se muestra el peso corporal de las crías de los dos grupos de dieta, desde el primer día de nacimiento hasta el día 15 de lactancia.

El primer día de lactancia el peso corporal de las crías del grupo AL ( $6.23 \pm 0.99$ ) fue similar al del grupo BL ( $6.01 \pm 1.3$ ).

A partir del día diez de lactancia el peso de las crías de las ratas alimentadas con la dieta alta en lípidos ( $23.25 \pm 2.13$ ) fue significativamente mayor en comparación con el grupo BL ( $20.73 \pm 2.03$ ,  $p < 0.05$ ), esta diferencia se mantuvo hasta el final del período de estudio.



Gráfica 3. Peso corporal de las Crías.

Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar con  $n = 12$ . Las diferencias entre los grupos que son estadísticamente significativas se muestran si  $p < 0.05$

#### **6.4. Subgrupos de estudio y absorción de la 1-<sup>14</sup>C trioleína:**

Para cada grupo de dieta en los que se llevó a cabo la medición de la transferencia de la trioleína marcada, se establecieron dos grupos de estudio que se diferenciaban en la administración o no de alimento durante el período de medición. La mitad de los animales de cada grupo de alimentación recibieron alimento durante las 5 horas posteriores a la administración de la dosis (subgrupo alimentado), mientras que la otra mitad de los animales no recibieron alimento durante ese período (subgrupo en ayuno).

En la **tabla 2** se muestra la absorción de la dosis de trioleína para los dos grupos de dieta y en las dos condiciones de alimentación.

Los animales alimentados con la dieta AL mostraron una absorción de la dosis significativamente mayor que los animales BL. No se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos de alimentación en ninguno de los tipos de dieta.

Los resultados de la incorporación de la marca a los tejidos en todos los resultados que se muestran posteriormente se expresan como porcentaje de la dosis de trioleína absorbida para tomar en cuenta las diferencias de absorción encontradas entre los grupos de alimentación.

#### **6.5. Oxidación de la [1-<sup>14</sup>C] trioleína:**

La **gráfica 4** muestra la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> por hora, durante las 5 horas que duró el estudio.

**Tabla 2.** Porcentaje de absorción de la [1-<sup>14</sup>C]trioleína en las ratas alimentadas con una dieta con 20% de lípidos (AL) o con una dieta con 2.5% de lípidos (BL).

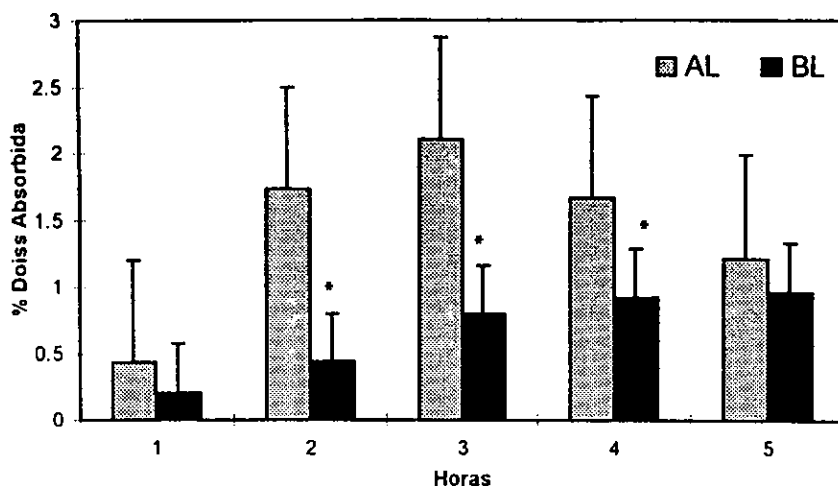
Grupo	AL	BL
Condición		
Alimentada	91.06 * (3.22)	78.99 * (9.9)
Ayuno 5h	87.06 (9.73)	76.6 (11.31)
Total grupo	89.06 <sup>a</sup> (7.3)	77.8 (10.3)

Promedio (Desviación estándar). Las diferencias que por ANOVA bifactorial para mediciones independientes fueron encontradas se muestra como:

<sup>a</sup> p < 0.01 Entre dietas.

\*P < 0.01 Análisis de medias realizadas con Tukey. n = 7 ratas por subgrupo.

No se encontraron diferencias entre subgrupo de alimentación, por lo que solo se presentan los resultados agrupados por tipo de dieta. La oxidación de la <sup>14</sup>C trioleína es mayor en las ratas alimentadas con la dieta AL a partir de la primera hora después de recibir la dosis de [1-<sup>14</sup>C]trioleína en comparación con el grupo BL. El máximo valor se alcanza a la tercera hora en el grupo AL, mientras que en el grupo de ratas alimentadas con la dieta baja en lípidos no se logra percibir el valor máximo de oxidación durante las 5 horas de observación. Dos horas después de recibir la dosis de [1-<sup>14</sup>C]trioleína se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales que se mantienen hasta la cuarta hora postdosis.

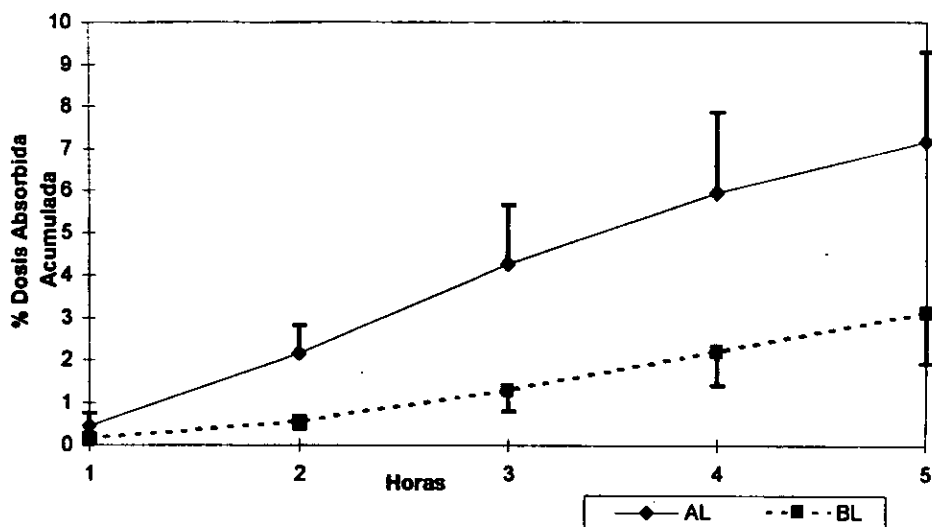


Gráfica 4. Producción de  $^{14}\text{CO}_2$ .

Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar con  $n = 14$  en el grupo AL y  $n = 16$  en el grupo BL. Las diferencias entre los grupos que son estadísticamente significativas se muestran si  $p < 0.01$

La producción acumulada de  $^{14}\text{CO}_2$  durante las 5 horas después de la dosis se muestra en la gráfica 5, los valores se expresan como porcentaje de dosis absorbida. En la primera hora posterior a la dosis no se encontraron diferencias en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  entre los grupos.

A partir de la segunda hora, la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) en el grupo de las ratas alimentadas con la dieta AL en relación a las del grupo BL ( $7.13 \pm 2.16$  vs  $3.33 \pm 1.49$ ).



Gráfica 5. Producción acumulada de  $^{14}\text{CO}_2$ .  
 Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar con  $n = 14$  en el grupo AL y  $n = 16$  en el grupo BL. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se muestran si  $p < 0.001$ .

### 6.6. Peso de los tejidos:

La tabla 3 muestra los pesos de los tejidos de las ratas de los dos grupos de alimentación. Los resultados son los promedios de siete ratas por subgrupo experimental.

El peso de los cuajos fue mayor en las ratas que recibieron alimento durante el experimento ( $5.61 \pm 1.02$  alimentadas vs  $4.58 \pm 1.45$  ayuno,  $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias en relación al tipo de dieta.

Tabla 3. Peso de los tejidos.

Grupo	n	Hígado	Tejido Adiposo Parametrial	Carcass Madre	Glándula Mamaria	Cuajo <sup>a</sup>	Carcass Crías	
								g
AL	Alimentada	7	11.44 (0.74)	1.84 (0.40)	136.83 (9.72)	16.15 (2.76)	5.49 (0.93)	246.35 (25.9)
	Ayuno	7	10.70 (0.94)	1.80 (0.47)	154.68 (11.70)	13.50 (2.13)	4.34 (1.56)	229.83 (35.79)
BL	Alimentada	7	11.49 (1.83)	1.79 (0.59)	143.74 (5.81)	14.50 (1.23)	5.73 (1.16)	222.48 (10.23)
	Ayuno	7	11.24 (0.97)	1.94 (0.66)	151.86 (15.42)	14.88 (2.30)	4.82 (1.41)	221.17 (41.45)

Promedio (D.E) Las diferencias que por ANOVA bifactorial para mediciones independientes fueron encontradas se muestra como:  
<sup>a</sup>p < 0.05 entre condición de alimentación.

### **6.7. Contenido de lípidos en los tejidos:**

En la **tabla 4** se muestra la concentración de lípidos en los tejidos de las ratas con cinco ratas por subgrupo. El contenido total de lípidos fue significativamente menor en el hígado de las ratas alimentadas con la dieta AL respecto a las del grupo BL ( $0.612 \pm 0.19$  vs  $0.979 \pm 0.27$  alimentadas y  $0.659 \pm 0.24$  vs  $0.881 \pm 0.27$  en ayuno,  $p < 0.05$ ). El contenido de lípidos fue significativamente mayor en el carcass de las crías de el grupo con la dieta alta en lípidos ( $17.934 \pm 2.39$  vs  $10.170 \pm 1.25$  alimentadas y  $16.636 \pm 2.55$  vs  $8.754 \pm 1.47$  en ayuno,  $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias cuando se analizó por condición de alimentación. En el tejido adiposo, en el carcass de la rata madre y en la glándula mamaria no se encontraron diferencias en el contenido de lípidos al analizarse el resultado por el tipo de dieta o por la condición de alimentación.

### **6.8. Incorporación de los lípidos marcados a los tejidos:**

En la **tabla 5** se muestra la incorporación de los lípidos marcados en el hígado, tejido adiposo, carcass de la madre y en el suero. La incorporación de los lípidos marcados en el hígado fue significativamente menor en las ratas AL en comparación con las BL ( $3.218 \pm 0.46$  vs  $4.675 \pm 1.83$ ,  $p < 0.01$ ), mientras que la incorporación en el suero fue significativamente menor en el grupo AL en comparación con el BL ( $133 \pm 0.02$  vs  $0.178 \pm 0.09$ ,  $p < 0.05$ ). No se



encontraron diferencias en la incorporación de la marca a el tejido adiposo y a el carcass de la rata madre entre los grupos de alimentación.

En la **tabla 6** se muestra la incorporación de los lípidos marcados en la glándula mamaria, en el cuajo de leche, en el carcass de las crías. La incorporación de los lípidos marcados fue significativamente mayor en el cuajo y en el carcass de las crías en las ratas del grupo AL en comparación con las BL ( $19.08 \pm 6.64$ ,  $8.50 \pm 2.93$  vs  $13.67 \pm 4.06$ ,  $5.49 \pm 2.03$ ,  $p < 0.05$ ). La transferencia de la dosis de trioleína a las crías (Cj + Cc) fue mayor en el grupo AL en comparación con el grupo control ( $26.37 \pm 5.75$  vs  $19.15 \pm 4.93$ ,  $p < 0.05$ ).

La dosis de trioleína acumulada por la glándula mamaria (GM + Cc + Cj) y la dosis transferida a las crías (Cc + Cj) fue significativamente mayor en las ratas a las que se les proporcionó alimento durante el experimento con respecto a las que se mantuvieron en ayuno en los dos grupos de dieta.

#### **6.9. Actividad específica de la lipoproteína lipasa y concentración de triacilglicerolos en plasma:**

En la **tabla 7** se muestra la concentración de triglicéridos plasmáticos y la actividad de la LPL en la glándula mamaria en los animales de los diferentes grupos de alimentación.

**Tabla 4.** Contenido de lípidos en los tejidos de ratas lactantes alimentadas con una dieta con 20% de lípidos (AL) o con una dieta con 2.5% de lípidos durante el embarazo y la lactancia.

Grupo	n	Hígado <sup>a</sup>	Tejido Adiposo	Carcass	Glándula	Cuajo	Carcass	
		Parametrial	g lípidos/ tejido total	madre	mamaria	crías <sup>b</sup>		
AL	Alimentada	5	0.612 (0.19)	1.363 (0.40)	3.376 (0.29)	1.800 (0.69)	1.317 (0.33)	17.934 <sup>w</sup> (2.39)
		Ayuno	5	0.659 (0.24)	1.540 (0.38)	3.131 (0.52)	1.683 (0.59)	1.383 (0.61)
BL	Alimentada	5	0.979 (0.27)	1.786 (0.51)	3.726 (1.09)	1.853 (1.01)	1.513 (0.19)	10.170 <sup>r</sup> (1.25)
		Ayuno	5	0.881 (1.27)	1.507 (0.44)	3.342 (1.13)	1.639 (0.59)	1.507 (0.32)

Promedio (Desviación estándar). Las diferencias que por ANOVA bifactorial para mediciones independientes fueron encontradas se muestra como: p<0.05 Entre dietas. Análisis de medias realizadas con Tukey HSD. P<0.05 letras iguales no hay diferencia.

**Tabla 5.** Incorporación de <sup>14</sup>C-lípidos en los tejidos y en el suero de ratas lactantes alimentadas con una dieta con 20% de lípidos (AL) o con una dieta con 2.5% de lípidos durante el embarazo y la lactancia.

Grupo	n	Hígado <sup>a</sup>		Tejido Adiposo		Carcass Madre		Suero
		Parametrial		Parametrial		Parametrial		
		% de dosis absorbida por tejido total		% de dosis absorbida por tejido total		% de dosis absorbida/mL		
AL	7	3.218 <sup>w</sup>	0.147	4.206	0.133			
		(0.46)	(0.11)	(1.83)	(0.02)			
Ayuno	7	3.673 <sup>w,x</sup>	0.119	4.422	0.105			
		(1.38)	(0.10)	(1.33)	(0.03)			
BL	7	4.675 <sup>w,x</sup>	0.175	5.574	0.178			
		(1.83)	(0.06)	(1.69)	(0.09)			
Ayuno	7	5.688 <sup>x</sup>	0.128	4.269	0.147			
		(2.20)	(0.05)	(1.58)	(0.03)			

Promedio (Desviación estándar). Las diferencias que por ANOVA bifactorial para mediciones independientes fueron encontradas se muestra como: <sup>w</sup>p<0.01, <sup>x</sup>p<0.05 entre dietas. Análisis de medias realizada con Tukey HSD. P<0.05 Letras iguales no hay diferencia.

**Tabla 6.** Incorporación de los  $^{14}\text{C}$ -lípidos en los tejidos de ratas lactantes alimentadas con una dieta con 20% de lípidos (AL) o con una dieta con 2.5% de lípidos durante el embarazo y la lactancia.

Grupo	n	Mamaria				% de dosis absorbida por tejido total
		Glándula	Cujojo <sup>a,b</sup>	Carcass crías <sup>a,b</sup>	GM + Cj + Cc <sup>a,b</sup>	
AL	7	22.95	19.08 <sup>w</sup>	8.50 <sup>w</sup>	49.32 <sup>w</sup>	26.37 <sup>w</sup>
		(6.6)	(6.64)	(2.93)	(9.03)	(5.75)
Ayuno	7	24.61	12.41 <sup>w,x</sup>	5.78 <sup>w,x</sup>	42.81 <sup>w,x</sup>	18.19 <sup>w,x</sup>
		(9.6)	(6.94)	(3.62)	(8.58)	(9.19)
BL	7	32.51	13.67 <sup>w,x</sup>	5.49 <sup>w,x</sup>	51.66 <sup>w</sup>	19.15 <sup>w,x</sup>
		(7.46)	(4.06)	(2.03)	(8.91)	(4.93)
Ayuno	7	24.57	8.32 <sup>x</sup>	3.64 <sup>x</sup>	36.34 <sup>x</sup>	10.77 <sup>x</sup>
		(5.87)	(5.00)	(1.16)	(8.37)	(6.01)

Promedio (Desviación estándar). Las diferencias que por ANOVA bifactorial para mediciones independientes fueron encontradas se muestran como: <sup>a</sup>p < 0.05 entre dietas. <sup>b</sup>p < 0.05 entre condición de alimentación. Análisis de medias realizada con Tukey HSD, p < 0.05. Letras iguales no hay diferencia.

La concentración de triacilgliceroles fue significativamente mayor en el plasma de las ratas del grupo AL ( $209.96 \pm 74.14$  vs  $90.54 \pm 33.34$ ,  $p < 0.01$ ) en comparación con los animales del grupo BL.

La actividad de la LPL fue significativamente mayor en las ratas AL que recibieron alimento durante el experimento en comparación con las ratas AL en ayuno y con los dos grupos de ratas BL. No se encontraron diferencias en la actividad de la LPL en la glándula mamaria con relación a la concentración de lípidos en la dieta de los animales.

**Tabla 7.** Triacilgliceroles plasmáticos y actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria en las ratas lactantes alimentadas con una dieta con 20% (AL) o con 2.5% de lípidos (BL).

Grupo		n	TAG <sup>a,c</sup> (mg/dL)	EA LPL <sup>b,c</sup> (nmol/min/mg plvvo)	EA LPL <sup>bb,c</sup> (nmol/min/mg proteína)
AL	Alimentada	6	209.96 <sup>w</sup> (74.14)	5.81 <sup>x</sup> (1.60)	1288 <sup>x</sup> (397)
	Ayuno	7	122.54 <sup>x</sup> (47.56)	1.75 <sup>w</sup> (1.21)	418 <sup>w</sup> (280)
BL	Alimentada	7	90.54 <sup>x</sup> (33.34)	3.28 <sup>x,w</sup> (1.85)	828 <sup>x,w</sup> (415)
	Ayuno	5	108.89 <sup>x</sup> (59.72)	2.98 <sup>x,w</sup> (1.87)	907 <sup>x,w</sup> (737)

Promedio (Desviación estándar). Las diferencias que por ANOVA bifactorial para mediciones independientes fueron encontradas se muestra como:

<sup>a</sup> $p < 0.01$  entre dietas

<sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>bb</sup> $p < 0.05$  entre condición de alimentación

<sup>c</sup> $p < 0.05$  Dieta x Condición.

Análisis de medias realizada con Tukey HSD. Letras iguales no hay diferencia.

## **7. DISCUSIÓN:**

Esta investigación fue diseñada para evaluar los efectos del consumo de una dieta con elevado contenido de lípidos sobre la captación de los lípidos y la actividad de la LPL en la glándula mamaria de la rata.

Los resultados muestran varios hallazgos importantes. Las ratas alimentadas con la dieta con elevado contenido de lípidos desde el embarazo, presentaron durante la lactancia un manejo más eficiente de la carga oral de trioleína que los animales alimentados con la dieta BL. Esta mayor eficiencia se observa desde la mayor absorción de la dosis (ver tabla 2) de lípidos hasta en la mayor transferencia de estos lípidos a las crías (ver tabla 6). La mayor transferencia de los lípidos de la dieta a la glándula mamaria de los animales alimentados con la dieta AL se relacionó con el mejor crecimiento de las crías (ver gráfica 3).

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

En la rata alimentada con una dieta normal de laboratorio (elevado contenido de carbohidratos y con un bajo contenido de lípidos), la glándula mamaria sintetiza a partir de glucosa alrededor de el 50 % de los lípidos de la leche (99). La otra mitad de los lípidos de la leche proviene de la captación y

reesterificación por el tejido mamario de los ácidos grasos presentes en la circulación.

La ingesta de dietas con elevado contenido de lípidos durante la lactancia disminuye la lipogénesis en la glándula mamaria de las ratas (2,87), esto coincide con el análisis de la composición de los ácidos grasos en la leche de animales estudiados en nuestro laboratorio, el cual muestra que el consumo de la dieta con alto contenido de lípidos durante la lactancia disminuyó importantemente la proporción de los ácidos grasos de cadena media que son sintetizados en la glándula mamaria, mientras que la proporción en los lípidos de la leche de los ácidos grasos provenientes de la dieta aumentó (42). Estos resultados sugieren que el consumo de una dieta con alto contenido de lípidos no solo disminuye la lipogénesis, sino que al mismo tiempo aumenta la captación de los lípidos circulantes por la glándula mamaria.

La lipoproteína lipasa se ha descrito como la enzima clave para la captación de los ácidos grasos de los triacilgliceroles de la sangre por la glándula mamaria (82). La actividad de la enzima en la glándula mamaria y en el tejido adiposo presenta cambios importantes dependiendo de la etapa fisiológica y de la disposición de alimento por el animal lactante (37,68,73), sin embargo no existe en la literatura evidencia de que la actividad de la LPL cambie en la glándula mamaria dependiendo de la composición de la dieta de la madre lactante. En un estudio en humanos se mostró un aumento en la actividad de la lipoproteína lipasa en el plasma postheparinizado en hombres que recibieron

una dieta alta en lípidos durante 6 semanas (14).

Los resultados de nuestro estudio muestran que la glándula mamaria de los animales alimentados con la dieta AL y a los que se les proporcionó alimento durante el experimento fue la que mostró la mayor actividad de la lipoproteína lipasa, misma que disminuye notablemente si a los animales se les retira el alimento durante el experimento (ver tabla 7). La lipoproteína lipasa de la glándula mamaria de animales del grupo AL, alimentados durante el experimento, mostró mayor actividad lo cual coincide con la mayor transferencia de la trioleína marcada hacia la leche y las crías. Sin embargo, los cambios en la actividad de la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria no siempre se correlacionaron cuantitativamente con los cambios en la captación de lípidos por la glándula mamaria y la transferencia de la marca hacia las crías. Por ejemplo, mientras que la actividad de la lipoproteína lipasa disminuye en un 60 % en la glándula del grupo AL cuando los animales se someten a un ayuno de 5 horas, en las mismas condiciones la transferencia de la trioleína marcada hacia la leche y las crías solo disminuye en un 30 %. Esta poca correlación entre los diferentes resultados puede indicar que en la glándula mamaria lactante existe un mecanismo diferente a la lipoproteína lipasa que le permite al tejido captar los ácidos grasos de la circulación. Estudios en animales han mostrado que la alimentación con una dieta con alto contenido de lípidos aumenta la concentración de ácidos grasos no esterificados en plasma (19) y que la captación de estos ácidos grasos por la



glándula mamaria está linealmente relacionada con su concentración en circulación (63).

La lipoproteína lipasa tiene su sitio de acción en la superficie luminal del endotelio vascular, aunque su sitio de síntesis es el adipocito y no la célula epitelial mamaria (45). Otra explicación para la poca correlación entre la actividad de la enzima y la transferencia de los lípidos hacia la leche y las crías es que la enzima puede estar presente en una mayor proporción en su sitio activo (unida al endotelio) sin que se presenten cambios en la cantidad total de la enzima. En nuestro estudio se midió la actividad total de la enzima en el tejido y no se realizó ningún intento para diferenciar la actividad de la enzima presente en la superficie endotelial o dentro de la célula.

La medición de la incorporación de una dosis bucal de trioleína marcada nos permitió estudiar las adaptaciones en el metabolismo de los lípidos que presentaron las ratas como respuesta a la ingesta de una dieta con elevado contenido de lípidos durante todo su ciclo reproductivo.

Las ratas que recibieron una mayor cantidad de lípidos en su dieta a lo largo del estudio manejaron los lípidos de la carga intragástrica de una forma mucho más eficiente que las ratas del grupo BL. La mayor absorción de la dosis de trioleína sugiere que la maquinaria enzimática del tracto gastrointestinal para la digestión y la absorción de lípidos en el grupo AL se encontraba mejor preparada para manejar la carga intragástrica de lípidos que en el grupo BL.

No existe en la literatura evidencia de que la mayor ingestión de grasa aumente la absorción de lípidos a nivel intestinal.

Cuando analizamos la incorporación de la marca expresada como porcentaje de dosis por tejido total observamos que las ratas del grupo AL tuvieron una mayor incorporación de la marca en el cuajo y en el carcass de las crías (ver tabla 6). De la misma manera, las ratas que recibieron alimento durante el experimento, independientemente del tipo de dieta recibida, tuvieron una mayor incorporación de la marca en estos compartimientos. Estos hallazgos nos sugieren que la transferencia de los lípidos de la dieta a la leche depende de la disposición de alimento y del contenido de lípidos del mismo.

La mayor producción de  $^{14}\text{CO}_2$  encontrada en las ratas AL (ver gráfica 4 y 5) es otro dato que junto con la absorción de la dosis permite sugerir un mejor manejo de la carga intragástrica de lípidos en este grupo. La máxima incorporación de la marca en el aire espirado se presentó en el grupo AL a las 3 horas de haber iniciado el estudio mientras que en el grupo BL 5 horas después no se había presentado aún este máximo. La producción acumulada de  $^{14}\text{CO}_2$  a las 5 horas fue más del doble en el grupo AL en comparación al grupo BL.

La  $^{14}\text{C}$ -trioleína de la dosis se diluyó con los lípidos del plasma en una mayor proporción en el grupo AL que en grupo BL debido a que, en el primer grupo, la concentración de triacilgliceroles plasmáticos fue significativamente mayor. Esto introduce problemas en la interpretación de los resultados puesto que

para el grupo AL la acumulación de la marca en los tejidos podría estarse subestimando y contribuir a la falta de diferencia entre los grupos en la incorporación del isótopo a la glándula mamaria

## **7.2. Crecimiento 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 esta etapa ya que conduce a la disminución en el crecimiento y a un aumento en la mortalidad del recién nacido (55,76,77). Algunos otros autores han mostrado el efecto contrario (30,74,77). 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 (77). Grigor y Warren observaron que al alimentar a la rata lactante durante cuatro días con una dieta sintética que contenía aceite de coco (200g/kg de dieta, 490g de ácido láurico/kg de aceite) no se modificaba la ganancia de peso de las crías al compararlas con ratas alimentadas con la dieta comercial. La administración de una dieta sintética similar pero que contenía aceite de

cacahuete (mezcla de ácido oleico y linoleico) aumentó significativamente el crecimiento de las crías (30).

La controversia entre los resultados de los diferentes grupos de investigación puede radicar en la manera en la que se modifica el contenido de lípidos en la dieta de la rata. Algunos investigadores han agregado la grasa ya sea de origen vegetal o de origen animal a la dieta no purificada que la rata normalmente come y esto tiene como consecuencia la 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 (29,87). Otra diferencia importante radica en el tiempo en el que se ha proporcionado la dieta experimental; este ha fluctuado entre sólo algunos días durante la lactancia hasta todo el embarazo y la lactancia.

Nuestros resultados muestran que la administración de una dieta con elevado contenido de lípidos durante el embarazo y la lactancia en la rata repercute positivamente sobre el crecimiento de las crías (ver gráfica 3).

Las diferencias en el crecimiento de las crías entre el grupo AL y BL está relacionada con cambios en la cantidad y en 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.

Rolls et al. encontró una correlación directa entre la ingesta diaria de energía de la rata madre lactante y la velocidad de crecimiento de las crías (78). Las

ratas alimentadas con la dieta con elevado contenido de lípidos estudiadas por nosotros presentaron una mayor ingesta de energía durante el período de lactancia en comparación con el grupo control y esto por sí solo podría influir sobre la producción de leche y sobre el crecimiento de las crías. Sin embargo, en un estudio previo, las crías de las ratas que recibieron la misma dieta con elevado contenido de lípidos pero cuyo consumo de alimento se igualó al del grupo control, presentaron la misma velocidad de crecimiento que las crías del grupo AL y mayor que la del grupo control (20). Por lo tanto, el mayor crecimiento de las crías de los grupos de animales que recibieron la dieta con mayor contenido de lípidos puede atribuirse a un efecto directo de la mayor ingesta de lípidos de la rata madre lactante sobre la producción y composición de la leche.

Se ha mostrado que la ingesta de dietas con elevado contenido de lípidos modifica la composición de los ácidos grasos en la leche de la rata, aumentando la proporción de los ácidos grasos de cadena larga a expensas de la disminución en el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (10). El destino metabólico de los ácidos grasos de cadena media es diferente al de los ácidos grasos de cadena larga (6). 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 parcialmente a cuerpos cetónicos o son oxidados completamente a  $\text{CO}_2$ . Como consecuencia, los ácidos grasos de

cadena media son más rápidamente utilizados para la obtención de energía que los ácidos grasos de cadena larga, pero son incorporados en los triacilgliceroles del tejido adiposo en forma menos efectiva.

Estas diferencias en el metabolismo de ácidos grasos de cadena 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 la alimentación de ratas adultas con dietas con ácidos grasos de cadena media, ha tenido como resultado una menor acumulación de lípidos en el tejido adiposo (11,26).

### **7.3. Ingesta materna:**

A pesar de los esfuerzos que se realizaron para analizar específicamente los efectos sobre el desarrollo de la lactancia del mayor consumo de lípidos por la madre lactante y disecarlos de los efectos del mayor consumo de energía, los animales que recibieron la dieta AL mostraron ligeramente un mayor consumo de alimento durante la lactancia en comparación con los grupos que recibieron la dieta BL (ver gráfica 2). Durante el período pre-embarazo y durante el embarazo, no se encontraron diferencias en el consumo de alimento entre los diferentes grupos de animales, lo que puede indicar que la hiperfagia que presentó el grupo AL durante la lactancia no está relacionada con una mayor preferencia por la dieta con elevado contenido de lípidos.

El costo energético de la lactancia incluye el contenido de nutrimentos y energía en la leche así como el costo energético de la síntesis de lactosa,

caseína y lípidos. La mayor ingesta del grupo AL durante la lactancia puede estar relacionada con las mayores demandas de este grupo de ratas impuestas por la mayor velocidad de crecimiento de sus crías.

#### **7.4. Ganancia de peso materno:**

El aumento de peso corporal durante la gestación se debe, en la fase temprana a la proliferación de tejido mamario y posteriormente al aumento en el peso del feto, de las membranas, de los fluidos y los depósitos de tejido adiposo (55,69). En la lactancia, el peso corporal materno presenta pequeños cambios a pesar de el aumento en el consumo de alimento (13,22,37,55,83). El peso corporal de las ratas de nuestros dos grupos de estudio, permaneció constante durante la lactancia sin existir diferencias entre los grupos ocasionadas por el tipo de alimentación (ver gráfica 1). Estos resultados coinciden con los de Burnol et al. quien no encontró diferencias en el peso corporal en el período de lactancia, al utilizar dos dietas con diferente contenido de lípidos (13).

## **8. CONCLUSIONES:**

1. Los animales del grupo AL presentan una mayor eficiencia en el manejo de la carga intragástrica de trioleína, valorada a través del mayor porcentaje de absorción, así como por la mayor oxidación de la dosis.
2. Las ratas alimentadas con la dieta AL presentan 37.7 % mayor transferencia de los lípidos de la dieta a la leche con respecto a ratas alimentadas con la dieta BL, lo cual puede estar relacionado con el mayor crecimiento de sus crías.
3. No se encontró correlación entre la transferencia de  $^{14}\text{C}$ -lípidos hacia la glándula mamaria, cuajo de la leche o carcasa de las crías, con la actividad de la LPL.
4. Es posible que exista en la glándula mamaria otro mecanismo para la captación de los lípidos circulantes diferente a la lipoproteína lipasa.



## 9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Agius L., Rolls BJ., Rowe EA., Williamson DH. Impaired Lipogenesis In Mammary Glands Of Lactating Rats Fed On A Cafeteria Diet. *Biochem. J.* 1980; 186: 1005-1008.
2. Agius L. and Williamson DH. Rapid Inhibition Of Lipogenesis *In Vivo* In Lactating Rat Mammary Gland By Medium- Or Long- Chain Triacylglycerols And Partial Reversal By Insulin. *Biochem. J.* 1980; 192: 361-364.
3. Allen JC., Keller RP., Archer P. and Neville MC. Studies In Human Lactation: Milk Composition And Daily Secretion Rates Of Macronutrients In The First Year Of Lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 54: 69-80.
4. Arey LB. 1965. *Developmental Anatomy*, 7th ed., Saunders, Philadelphia. pp: 449-453.
5. Arrieta R. y Cravioto J. 1985. Lactancia Materna: Análisis Crítico. Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF), Instituto Nacional de ciencias y Tecnología de la Salud del Niño DIF, Centro Colaborador de la O. M. S. en Crecimiento y Desarrollo. México. pp: 9-25.
6. Bach AC. and Babayab BK. Medium Chain Triglycerides: And Update. *Am. J. Clin. Nutr.* 1982; 36: 950-962.
7. Barber MC., Clegg RA., Finley E., Vernon RG. and Flint DJ. The Role Growth Hormone, Prolactin And Insuline-Like Growth Factor In The Regulation Of Rat Mammary Gland And Adipose Tissue Metabolism During Lactation. *J. Endocrinology.* 1992; 135: 195-202.
8. Bauman DE., Davis CL. 1974. Biosynthesis Of Milk Fat. En Larson BL., Smith VR. Editor Lactation. New York: Academic Press. pp: 31-75.
9. Bennett JP. and Vickery BH. 1970. Sexual Cycles. Reproduction And Breending Techniques For Laboratory Animals. Hafes ESE. Lea & Febiger. Philadelphia. pp: 299-315.
10. Brandorff NP. The Effect Of Dietary Fat On The Fatty Acid Composition Of Lipids Secreted In Rats Milk. *Lipids* 1980; 15: 276-278.

11. **Bray GA., Lee M. and 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.
12. **Bucol G., David H.** Quantitative Determination Of Serum Triglycerides By The Use Of Enzymes. *Clin. Chem.* 1973; 19:476.
13. **Burnol AF., Leturque A., De Saintaurin MA., Penicaud L. and Girard J.** Glucose Turnover Rate In The Lactating Rat: Effect Of Feeding A High Fat Diet. *J. Nutr.* 1987; 117: 1275-1279.
14. **Campos H., Dreon DM., Kraus RM.** Associations Of Hepatic And Lipoprotein Lipase Activities With Changes In Dietary Composition And Low Density Lipoprotein Subclasses. *J. Lipid. Res.* 1995; 36: 462-472.
15. **Christie WW.** 1987. The Analysis Of Lipids With Special Reference To Milk Fat Recent Advances In Chemistry And Technology Of Fats. Hamilton RJ. and Bathi A. Elsevier Applied Science. London and New York. pp: 57-78.
16. **Cowie AT., Forsyth YA. and Hart IC.** 1980. Hormonal Control Of Lactation. Springer-Verlag Berlin Heiderberg, Germania.
17. **Da Costa THM. and Williamson DH.** Effects Of Exogenous Insulin Or Vanadate On Disosal Of Dietary Triacylglycerols Between Mammary Gland And Adipose Tissue In Lactating Rat: Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Biochem. J.* 1993; 290: 557-561.
18. **Da Costa THM. and 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.
19. **De Gasquet, Pequignot-Planche GE. and Malewiak MY.** 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.

20. **Del Prado M., Delgado G. and Villalpando S.** Maternal Lipid Intake During Pregnancy And Lactation Alters Milk Composition And Production And Litter Growth In Rats. *J. Nutr.* 1997; 127: 458-462.
21. **Feldman M., Ruan W., Cunningham BC., Wells JA. and Kleinberg DL.** Evidence that Growth Hormone Receptor Mediates Differentiation And Development Of The Mammary Gland. *Endocrinology.* 1993; 133: 1602-1608.
22. **Fleming AS.** Control Of Food Intake In The Lactating Rat: Role Of Suckling And Hormones. *Physiology and Behavior.* 1976; 17: 841-848.
23. **Flint DJ. and Gardner M.** Evidence That Growth Hormone Stimulates Milk Synthesis By Direct Action On The Mammary Gland And That Prolactin Exerts Effects On Milk Secretion By Maintenance Of Mammary Deoxyribonucleic Acid Content And Tight Junction Status. *Endocrinology.* 1994; 135: 1119-1124.
24. **Fox RR. and Laird CW.** 1970. Sexual Cycles. Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory animals. Hafes ESE. Lea & Febiger. Philadelphia. pp: 107-122.
25. **Gasper RF.** 1975. Atlas Of Human Embryos. Harper, Hgeerstown, Maryland.
26. **Geliebter A., Torbay N., Braco EF. and Hashim Say.** Overfeeding With Medium-chain Triglyceride Diet Results In Diminished Deposition Of Fat. *Am. J. Clin. Nutr.* 1983; 37: 1-4.
27. **Gibson JP.** Altering Milk Composition Trough Genetic Selection. *J. Dairy: Sci.* 1989; 72: 2815-2825.
28. **Gould S,F.** 1983. Anatomy of the Breast. Lactation: Physiology, Nutrition and Breast-Feeding. Neville MC. and Neifert MR. Plenum Press. New York. pp: 23 - 47.
29. **Green MH., Gohner EL. and Green JB.** Influence of Dietary Fat And Cholesterol On Milk Lipids And On Cholesterol Metabolism In The Rat. *J. Nutr.* 1981; 111: 276-286.

30. Grigor MR. and Warren SM. Dietary Regulation Of Mammary Lipogenesis In Lactating Rats. *Biochem J.* 1980; 188: 61-65.
31. Gross SJ., Buckley RH., Wakil SS., McAllister DC., David RJ., Faix RG. Elevated Ig A Concentration In Milk Produced By Mothers Delivered Of Preterm Infants. *J. Pediatr.* 1980; 99: 389-93.
32. Grummer RR. Effect Of Feed On The Composition Of Milk Fat. *J. Dairy. Sci.* 1991; 74: 3244-3257.
33. Grummer R., Maurer SA., Stieve DE. and Dentine MR. Assessment Of Lipoprotein Activators Of Skim Milk Lipoprotein Lipase And The Relationship Between Lipoprotein Lipase Activity And Milk Fat Synthesis. *J. Dairy. Sci.* 1989; 72: 1451-1458.
34. Gurr MY. Lipid Metabolism In Man. *Proceeding of the Nutrition Society.* 1988; 47: 277-285.
35. Hachey DL., Silber GH., Wong WW. and Garza C. Human Lactation II: Endogenous Fatty Acid Synthesis By The Mammary Gland. *Pediatric. Res.* 1989; 25: 63-68.
36. Hamosh M., Bitman J., Wood L., Hamosh P. and Mehta NR. Lipids In Milk And The Firts Steps In Their Digestion. *Pediatrics.* 1984; 758(suppl): 146-150.
37. Hamosh MT., Clary R., Chernick SS. and Scow RO. Lipoprotein Lipase Activity Of Adipose And Mammary Tissue And Plasma Triglyceride In Pregnant And Lactanting Rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1970; 210: 473-482.
38. Hardier DH. The Regulation Of Fatty Acid Synthesis By Reversible Phosphorylation Of Acetyl-CoA Carboxylase. *Molecular Aspects of Cellullar Regulation.* 1980: 33-62.
39. Hartree EF. 1971. Determination Of Protein: A Modification Of Lowry Method That Gives A Linear Photometric Response. *Anal Biochem.* 48: 422-427.

40. **Herrera E.** 1986. *Bioquímica Perinatal*. Ed. Fundación Ramón Areces. pp: 9-28.
41. **Hoar WS.** and **Hickman CP.** 1978. *Manual De Laboratorio Para Fisiología General Y Comparada*. Omega, S.A. Casanova, 220-Barcelona-36. pp: 244-248.
42. **Ibarra AB.** 1997. *Efectos De Una Dieta Con Alto Contenido de Lípidos Durante el Embarazo O La Lactancia Sobre La Producción Y Composición De La Leche En La Rata*. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana.
43. **Inglis JK.** 1988. *Introduction To Laboratory Animal Science And Technology*. Pergamon Press. Oxford. pp: 155-234.
44. **Jensen RG., Ferris AM.** and **Lammi-Keefe C.** The Composition Of Milk Fat. *J. Dairy. Sci.* 1991; 74: 3228-3243.
45. **Jensen DA., Gavigan S., Sawicki V., Witsell DL., Eckel RH.** and **Neville MC.** Regulation Of Lipoprotein Lipase Activity And mRNA In The Mammary Gland Of The Lactating Mouse. *Biochem J.* 1994; 298: 321-327.
46. **Lehninger AL., Nelson DL.** and **Cox MM.** 1993. *Lipid Biosynthesis. Principles of Biochemistry*. 2nd Edition. Worth Publishers, Inc. United States of America. pp: 642-687.
47. **Linzell JY., Peaker M.** Changes In Collostrum Composition And In The Permeability Of The Mammary Epithelium At About The Time Of Parturition In The Goat. *J. Physiol.* 1974; 243: 129-151.
48. **Lowry Ho, Rosenbrough NJ., Farr Al., Randal JR.** Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
49. **Martin-Hidalgo A., Holm C., Belfrage P., Schotz MC.** and **Herrera E.** Lipoprotein Lipase And Hormone-sensitive Lipase Activity And mRNA In Rat Adipose Tissue During Pregnancy. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: E930-E935.
50. **Mayes PA.** 1981. *Metabolism Of Lipids: I. Fatty Acids/17*. Harper's Review Of Biochemistry. Martin DW., Mayes PA. and Rodwell VW., 18th edition Lange Medical Publications. Los Altos, California. pp: 199-221.

51. **Maule-Walker FM.** Exocrine And Endocrine Secretions Of The Mammary Gland: Local Control In Ruminant. Symp. Zool. Soc. Lond. 1984; 51: 171-191.
52. **McNamara JP.** Regulation Of Adipose Tissue Metabolism In Support Of Lactation. J. Dairy. Sci. 1991; 74: 706-719.
53. **McNamara JP.** Lipid Metabolism In Adipose Tissue During Lactation: A Model Of A Metabolic Control System. J. Nutr. 1994; 124: 1383S-1391S.
54. **Mercer SW and Willianson DH.** Rapid inhibition By Intragastry Triolein Of The Re-activation Of Glucose Utilization And Lipogenesis In The Mammary Gland During The Starved-refed Transition In Lactating Rats. Biochem J. 1988; 250: 269-276.
55. **Moore BJ., Olsen JL., Marks F. and Brasel JO.** 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.
56. **Munday MR. and Williamson DH.** Diurnal Variation In Food Intake And Lipogenesis In Mammary Gland And Liver Of Lactating Rats. Biochem. J. 1983; 214: 183-187.
57. **Munday MR. and Williamson DH.** Insulin Activation Of Lipogenesis In Isolated Mammary Acini From Lactating Rats Fed On A High-fat Diet. Biochem. J. 1987; 242: 905-911.
58. **Neville MC.** Regulation Of Milk Fat Synthesis. J. Pediatric Gastroenterol. Nutr. 1989; 8(4): 426-428.
59. **Neville MC.** Mammary Gland Biology And Lactation: A short Course. Given At The Meeting Of The International Society For Research In Human Milk And Lactation. Plymouth, New Hampshire. October 15, 1997. pp:1-30.
60. **Neville MC., Allen JC. and Watters C.** 1983. The Mechanism of Milk Secretion. Lactation: Physiology, Nutrition And Breast-Feeding. Neville MC. and Neifert MR. Plenum Press. New York. pp: 49-102.

61. **Neville MC. and Picciano MF.** Regulation Of Milk Lipid Secretion And Composition. *Annu. Rev. Nutr.* 1997; 17: 159-184.
62. **Newsholme EA. and Leech AR.** 1994. The Synthesis Of Glycogen And Other Polysaccharides. *Biochemistry for the Medical Sciences.* John Wiley & Sons. New York. pp: 583-609.
63. **Nielsen MO. and Jakobsen 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.
64. **Nilson P. and Schotz MA.** Stable, Radiative Substrate Emulsion For Assay Of Lipoprotein Lipase. *J. Lipid Research.* 1976; 160: 413-416.
65. **Okamoto S. and Oka T.** Evidence For Physiological Function Of Epidermal Growth Factor: Pregestational Sialoadenectomy Of Mice Decreases Milk Production And Increases Offspring Mortality During Lactation Period. *Proc. Nat Acad. Sci. USA.* 1984; 81: 6059-6063.
66. **Oller Do Nascimento CM. and Williamson DH.** Evidence For Conservation Of Dietary Lipid In The Rat During Lactation And The Immediate Period After Removal Of The Litter. *Biochem. J.* 1986; 239: 233-236.
67. **Oller Do Nascimento CM. and Williamson DH.** Tissue-specific Effects Of Starvation And Refeeding On The Disposal Of Oral [ $1-^{14}\text{C}$ ]triolein In The Rat During Lactation And On Removal Of Litter. *Biochem. J.* 1988; 254: 539-546.
68. **Oller Do Nascimento CM., Illic V. and 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.
69. **Otway S. and 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.

70. Palmquist DL., Beaulieu AD. and Barbano DM. Adsa Foundation Symposium: Milk Fat Synthesis And Modification. Feed And Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. J. Dairy. Sci. 1993; 76: 1753-1771.
71. Randle PJ. Phosphorylation-dephosphorilation Cycles And Regulation Of Fuel Selection In Mammals. Curr. Topics. Celle. Reg. 1981; 18: 107-130.
72. Rasmussen K. M. The Influence Of Maternal Nutrition On Lactation. Annu. Rev. Nutr. 1992; 12: 103-117.
73. Reichl D. Lipoprotein Lipase Activity In The Adipose Tissue Of Ratas Adapted To Controlled Feeding Schedules. Biochem. J. 1972; 1280: 79-87.
74. Roberts SB. and Coward WA. Dietary Supplementation Increases Milk Output In The Rat. Br. J. Nutr. 1985;53: 1-9.
75. Robinson AM. and Williamson DH. Comparison Of Glucose Metabolism In The Lactating Mammary Gland Of The Rat *In Vivo* And *In Vitro*. Biochem. J. 1977; 164: 153-159.
76. Rolls BJ., Rowe EA., Fahrbach SE., Agius L. and Williamson DH. Obesity And High Energy Diets Reduce Survival And Growth Rates Of Rat Pups. Proc. Nutr. Soc. 1980; 39:51A.
77. Rolls BJ. and Rowe EA. Pregnancy And Lactation In The Obese Rat: Effects On Maternal And Pups Weights. Physiol. Behav. 1982; 28: 393-400.
78. Rolls BJ., Van Duijvenvoorde PM. and Rowe RA. Effects Of Diet And Obesity On Body Weight Regulation During Pregnancy and Lactation In The Rat. Physiol. Behav. 1984; 32: 161-168.
79. Romsos DR., Mulrurl KL., Lin P. and Levlie GA. Influence Of Dietary Fat, Fasting And Acute Premature Weaning On *In Vivo* Rates Of Fatty Acid Synthrsis In Lactating Mice. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 1978; 159: 308-312.
80. Russell JA. Milk Yield, Suckling Behaviour And Milk Ejection In The Lactating Rat Nursing Litters Of Diferent Sizes. J. Physiol. 1980; 303: 403-415.



81. **Schmidt GH.** 1974. *Biología De La Lactación*, Acribia, Zaragoza (España).
82. **Scow RO., Chernick SS.** 1987. Role Of Lipoprotein Lipase During Lactation. In: *Lipoprotein Lipase*. Borensztajn J (Ed) Evener, Chicago.
83. **Scow RO., Mendelson CR., Zinder O., Hamosh M. and Blanchette-Mackie J.** 1973. Role Of Lipoprotein Lipase In The Delivery Of Dietary Fatty Acids To Lactating Mammary Tissue. *Dietary Lipids And Postnatal Development*. Galli C., Jacini G. and Pecile A. Raven Press, Publishers. New York. pp: 91-114.
84. **Shand JH., West DW. and Flind DJ.** Effects Of Growth Hormone On Cholesterol Metabolism In The Lactating Rat Mammary Gland. *J. Endocrinology*. 1997; 152: 447-454.
85. **Smith S.** Mechanism Of Chain Length Determination In Biosynthesis Of Milk Fatty Acids. *J. dairy. Sci.* 1980; 63: 337-350.
86. **Snedecor GW., Cochran WG.** 1980. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press.
87. **Souza PF. and 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.
88. **Stanbenfeldt GH.** 1992. *Fisiología Veterinaria*. Cunninham JG. Interamericana Mc Graw Hill. México. pp: 517-535.
89. **Stansbie D., Brownsey RW., Crettaz M. and Denton RM.** Acute Effects *In Vivo* Of Anti-insulin Serum On Rates Of Fatty Acid Synthesis And Activities Of Acetyl Coenzyme A Carboxilase And Pyruvate Dehydrogenase In Liver And Epididymal Adipose Tissue Of Fed Rats. *Biochem. J.* 1976; 160: 413-416.
90. **Svendsen P.** 1976. *Introducción A La Fisiología Animal*. Acribia, Zaragoza (España). pp: 192-200.
91. **Tedstone AE., Ilic V. and Williamson DH.** Evidence That Use Of Triton WR1339 Underestimates The Triacylglycerol Entry Rate Into The Plasma Of

- Lactating Rats Owing To Continued Accumulation Of Lipid In The Mammary Gland. *Biochem J.* 1990. 272: 835-838.
92. **Tso P., Karlstad MD., Bistran BR. and De Michele SJ.** Intestinal Digestion, Absorption, And Transport Of Structured Triglycerides And Cholesterol In Rats. *Am. J. Physiol.* 1995; (*Gastrointest. Liver Physiol.* 31): G568-G577.
93. **Tucker HA.** 1974. General Endocrinological Control Of Lactation. In *Lactation*, vol.1. Eds RL Larson & VR Smith. New York: Academic Press. pp: 277-326.
94. **Vernon RG.** GH Inhibition Of Lipogenesis And Stimulation Of Lipolysis In Sheep Adipose Tissue: Involvement Of Protein Serine Phosphorylation And Dephosphorylation And Phospholipase C. *J. Endocrinology.* 1996; 150: 129-140.
95. **Villalpando S, y De Santiago S.** La Lactancia Y El Metabolismo De Proteínas. *Bol. Med. Hosp Infant. Mex.* 1990; 47(3): 181-185.
96. **Villalpando S, y De Santiago S.** Bases Biológicas De La Lactancia Materna. *Bol. Med. Hosp. Infan. Mex.* 1993; 50(12): 889-897.
97. **Vorher H.** 1974. *The Breast: Morphology, Physiology And Lactation.* Academic Press, New York.
98. **Watkins JB.** Lipid Digestion And Absorption. *Pediatrics.* 1985; 75(suppl): 151-156.
99. **Wells MA.** Fatty Acid Metabolism And Ketone Formation In The Suckling Rat. *Federation. Proc.* 1985; 44: 2365-2368.
100. **Williamson DH.** Integration Of Metabolism In Tissues Of The Lactating Rat. *Febs Letter.* 1980; Volume 117, supplement: K93-K105.
101. **Williamson DH.** Regulation Of Metabolism During Lactation In The Rat. *Reprod. Nutr. Develop.* 1986; 26(2 B): 597-603.
102. **Williamson DH., Munday MR. and Jones RG.** Biochemical Basis of Dietary Influences On The Synthesis Of The Macronutrients Of Rat Milk. *Federation Proc.* 1984; 43: 2443-2447.

103. **Williamson DH. and Lund P.** 1994. Cellular Mechanisms For The Regulation Of Adipose Tissue Lipid Metabolism In Pregnancy And Lactation. Nutrient Regulation During Pregnancy, Lactation, and Infant Growth. Allen L., King J. and Lönnnerdal (Volume 352). Plenum Press, New York. pp: 45-70.
104. **Whitelaw E. and Willianson DH.** Effects Of Lactation On Ketogenesis From Oleato Or Butyrate In Rat Hepatocytes. *Biochem. J.* 1977; 164: 521-28.
105. **Zinder O., Hamosh M., Clary TR. and Scow RO.** Effect Of Prolactin On Lipoprotein Lipase In Mammary Gland And Adipose Tissue Of Rats. *Am. J. Physiol.* 1974; 226(3): 744-748.

## 10. ANEXO 1.

### **Citología vaginal :**

La actividad reproductora en las hembras se relaciona con la liberación de hormonas y es influenciada por el medio ambiente (43). El ciclo estral se define como la periodicidad con la que se presenta el estro en una especie determinada; se divide en cuatro etapas (Fig. 6) que pueden identificarse por cambios característicos en el tipo de células presente en la citología vaginal (24,41).

- **Estro.-** al principio desaparecen los leucocitos, del 80 al 90% de las células epiteliales presentes son grandes, cornificadas y no nucleadas. En esta fase se presenta el calor sexual, donde la hembra acepta copular; se da la ovulación y el óvulo puede ser fertilizado resultando en embarazo (9).
- **Metaestro o Metestro.-** ocurre después de la ovulación, aparecen una gran cantidad de leucocitos neutrófilos junto con vestigios de células epiteliales cornificadas.
- **Diestro.-** especialmente predominan los leucocitos polimorfonucleares y algunas células epiteliales nucleadas, las células epiteliales presentan un tamaño mayor a los leucocitos.
- **Proestro.-** es una fase preparatoria, preliminar al próximo ciclo estral. En esta etapa aumenta el 95% de las células son epiteliales nucleadas, no cornificadas y pueden presentarse leucocitos.

El ciclo estral en la rata tiene una duración de cuatro a cinco días y se repite a lo largo del año y puede ser interrumpido por el embarazo (9). El diestro dura entre 60 y 70 horas, el proestro tiene una duración de 12 a 14 horas, el estro de 9 a 19 horas y el metaestro entre 8 y 10 horas.

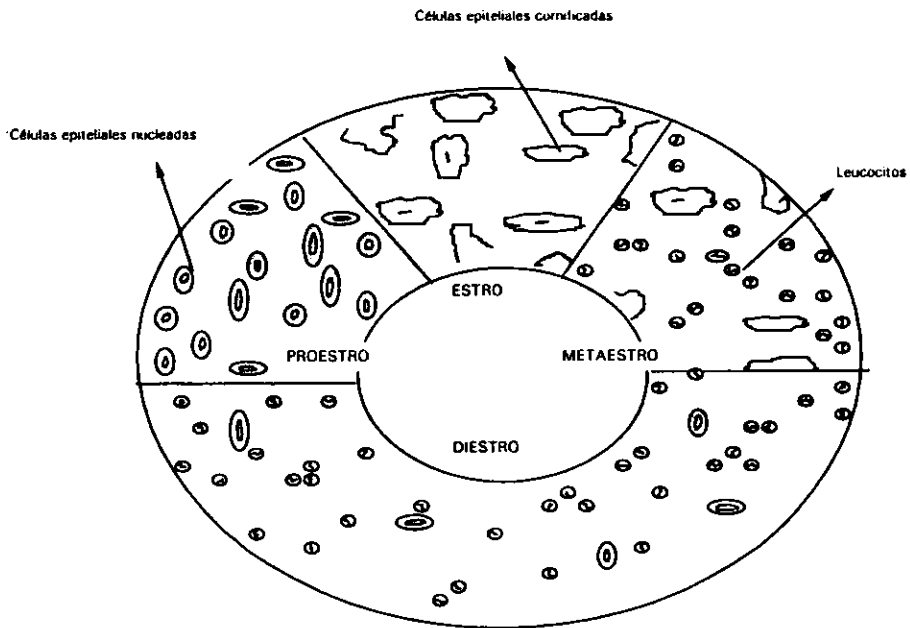


Fig. 6. Citología del Ciclo Estral de la rata  
(En Hoar WS. and Hickman CP., 1978).

### Procedimiento para realizar la citología vaginal:

El frotis consiste en introducir en el orificio vaginal de la rata unas gotas de solución fisiológica (NaCl 0.9 %) con una pipeta. Enseguida, mediante aspiración con la misma pipeta, se recoge el contenido vaginal, que se extiende de manera uniforme sobre un portaobjetos y se observa al microscopio óptico a 10X. Para obtener una observación más nítida es necesario realizar una tinción de la siguiente manera: el contenido del portaobjeto se seca suavemente a la llama, se realiza una fijación en alcohol-éter (1:1) durante tres minutos, se aclara en agua, se realiza una coloración con la solución de Giemsa (XX gotas en 5 ml de agua destilada) durante 15 a 20 minutos, aclarado en agua, secado y finalmente observación (41).

La unión del macho con la hembra debe realizarse entre las fases del proestro y el estro, manteniéndolos unidos unas horas.

A continuación se separa a la hembra y se le hace un frotis vaginal con fin de determinar si ha habido o no copulación. Ello se comprueba porque microscópicamente se visualizan los espermatozoides con la típica cabeza de gancho. Este es el momento adecuado, una vez constatada la preñez, de separar a las ratas.