

9 00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE UNA DIETA MARGINAL SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA (sistema ubiquitina-proteasomas) EN LOS TEJIDOS DE LA RATA LACTANTE, SU COMPOSICION CORPORAL Y LA PRODUCCION DE LA LECHE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE: MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

MARGARITA CERVANTES RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR HOMERO HERNANDEZ MONTES



COORDINACIÓN

MEXICO, D. F.

MARZO 2002.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de febrero de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de la Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno Cervantes Rodríguez Margarita, con número de cuenta 99809896, y número de expediente 3991110, con la tesis titulada: "Efecto de una dieta marginal sobre la actividad proteolítica (sistema ubiquitina-proteasomas) en los tejidos de la rata lactante, su composición corporal y la producción de la leche.", bajo la dirección de la Dr. Homero Hernández Montes

Presidente:	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Secretario:	Dr. Homero Hernández Montes
Vocal:	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Suplente:	Dra. Bertha Soledad De Santiago Martínez
Suplente:	Dra. Elena Zambrano González

Sin otro particular, quedo de usted

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de febrero de 2002


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c c p Expediente del interesado

SE RECONOCE LOS APOYOS RECIBIDOS POR PARTE DE:

El Fondo para el Fomento de la
Investigación (FOFOI) del Instituto
Mexicano del Seguro Social: FP-
0038/1251 y FP-0038/773

Beca CONACYT y Beca IMSS.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL

Dr Homero Hernández Montes
Dr Armando Roberto Tovar Palacio
Dra Soledad De Santiago Martínez

EFFECTO DE UNA DIETA MARGINAL SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA
(SISTEMA UBIQUITINA - PROTEASOMAS) EN LOS TEJIDOS DE LA RATA
LACTANTE, SU COMPOSICIÓN CORPORAL Y LA PRODUCCIÓN DE LA
LECHE.

INDICE

RESUMEN EN ESPAÑOL

RESUMEN EN INGLES

INTRODUCCION

1

ANTECEDENTES

1. Bioquímica y fisiología de la lactancia. 3
 - a). Metabolismo de proteínas. 4
 - b). Metabolismo de lípidos. 5
 - c). Metabolismo de hidratos de carbono. 5
2. Alimentación y lactancia. 6
 - a). Requerimientos de energía y proteína de la rata en la lactancia. 6
 - b). Efecto de la dieta sobre la producción y composición de la leche. 7
 - c). Alimentación marginal en la lactancia. 7
 - d). Relación del estado nutricional de la madre y la producción y composición de la leche. 9
3. Captación de nutrimentos por la glándula mamaria 10
 - a). Aporte de aminoácidos provenientes del músculo. 10
 - b). Sistemas enzimáticos relacionados con proteólisis muscular. 12
 - c). El sistema de proteasomas. Un sistema dependiente de ATP y de un polipéptido llamado ubiquitina. 15

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

18

OBJETIVOS

19

HIPOTESIS

20

MATERIAL Y METODOS

1. Manejo de animales. 21
2. Grupos de estudio. 21
3. Elaboración de las dietas. 22
4. Sacrificio y preparación de la carcaza de los animales. 24
5. Preparación del extracto enzimático. 24
6. Determinación de la actividad enzimática de los proteasomas. 25
7. Estandarización de la actividad de los proteasomas.

7 1. Curva estándar de Cumarina	26
7 2. Efecto de la concentración de enzima.	27
7 3. Efecto del tiempo de incubación	28
7 4. Efecto de la presencia de ATP.	29
8. Determinación del contenido de proteínas.	30
9. Concentración de proteína en el extracto crudo de los tres tejidos.	30
9.1. Concentración de proteína en el extracto crudo del hígado.	30
9.2. Concentración de proteína en el E.C. de la glándula mamaria.	31
9.3. Concentración de proteína en el E.C. del músculo.	32
10. Determinación de la composición de la carcaza de las madres.	33
10.1. Determinación de lípidos.	33
10.2. Determinación de proteínas.	33
11. Determinación de la producción de leche.	34
12. Obtención de las muestras de leche.	35
13. Determinación de la composición de la leche.	
13.1. determinación de proteínas.	36
13.2. determinación de lípidos.	36
13.3. determinación de lactosa.	36
14. Determinación de agua en las crías.	37
15. Recolección de datos.	37
16. Cálculos	38
17. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	39

RESULTADOS

1. Características generales de los animales estudiados.	
1.1. Peso corporal de las ratas durante todo el estudio.	40
1.2. Ingestión de alimento durante todo el estudio.	41
1.3. Consumo de energía y proteínas.	42
2. Composición corporal de las ratas durante la lactancia y el efecto de la alimentación marginal.	
2.1. Contenido de lípidos en la carcaza y su movilización durante la lactancia.	46
2.2. Contenido de proteínas en la carcaza de la rata.	47
3. Peso de los tejidos de las ratas.	
3.1. Peso húmedo del hígado.	49
3.2. Peso húmedo de la glándula mamaria.	50
3.3. Peso húmedo del paquete muscular.	51
4. Actividad específica de los proteasomas en los tejidos de las ratas lactantes y de sus vírgenes (pareadas en edad).	
4.1. Actividad específica en el hígado de las ratas.	52
4.2. Actividad específica en la glándula mamaria de las ratas.	53
4.3. Actividad específica en el músculo de las ratas	54
5. Actividad total de los proteasomas en los tejidos de las ratas lactantes y de sus vírgenes.	
5.1. Actividad total en el hígado	56

5.2. Actividad total en la glándula mamaria.	57
5.3. Actividad total en el músculo.	59
6. Producción de leche y de nutrimentos al día 14 de lactancia.	61
7. Composición química de la leche.	62
8. Crecimiento de las crías del nacimiento hasta el día 21.	63
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76
Anexos	87

EFFECTO DE UNA ALIMENTACION MARGINAL SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA (sistema ubiquitina-proteasomas) EN TEJIDOS DE LA RATA LACTANTE, SU COMPOSICION CORPORAL Y LA PRODUCCION DE LA LECHE. Lic Nut Margarita Cervantes Rodríguez. Línea de Investigación: Metabolismo de proteínas y Lactancia.

Después del nacimiento, el único medio para obtener un crecimiento adecuado es que la madre pueda ofrecer a sus crías un volumen de leche que contenga cantidad suficiente de energía y de nutrientes. La madre puede obtenerlos de la dieta y de la movilización de las reservas corporales acumuladas durante el embarazo. Hay evidencia suficiente de que la rata durante la lactancia, incrementa su ingesta de alimento hasta en un 300% y que las reservas corporales lipídicas son completamente movilizadas durante este periodo, aunque la presencia de una reserva corporal de proteínas y su movilización es parte actual de una controversia, se ha observado que al finalizar la lactancia la rata madre pierde proteína corporal a pesar del incremento en el consumo de alimento. En nuestro laboratorio se ha demostrado que en ratas alimentadas a libre demanda, existe un incremento en la actividad proteolítica de las catepsinas D y L en el hígado, la glándula mamaria y el músculo; Se desconoce como una dieta nutricionalmente marginal pueda afectar las reservas de proteína y lípidos y la actividad de un sistema proteolítico asociado con la pérdida de proteína en varios tipos de atrofia. Objetivo. Conocer la participación del sistema ubiquitina-proteasomas en la proteólisis que ocurre en la lactancia cuando la rata recibe una alimentación marginal crónica y determinar la modificación en la composición corporal y su repercusión en la cantidad y la calidad de la leche producida. Métodos. Se utilizaron dos grupos de ratas blancas Sprague-Dawley: uno de ellos fue alimentado con una dieta que cubrió las recomendaciones para los roedores (NP) y el otro grupo con la dieta marginal (KP). Los dos grupos consumieron su dieta desde dos semanas antes de la cría (adaptación) y hasta el final de la lactancia; los días de experimento fueron al inicio de la lactancia (día 1), el día de máxima producción de leche (14 de lactancia) y al final de esta (día 21). Para medir la actividad de la enzima en el hígado, la glándula mamaria y el paquete muscular se utilizó el método de Fagan y Goldberg; para estudiar la composición corporal de las madres, se utilizó para proteínas el método de Kjeldahl y para lípidos el de Goldfish. El día 14 de lactancia se midió la producción de leche utilizando agua tritada (método de Godbole) y para la composición de la leche: la concentración de proteína por el método de Lowry, para lípidos el de Folch y la lactosa se determinó por un método enzimático

RESULTADOS: Las ratas a las que se les proporcionó la dieta KP mostraron las siguientes diferencias con su grupo testigo (NP). El peso de la carcaza seca el día 14 de lactancia fue menor (33.04 ± 2.10 g KP vs 36.43 ± 3.71 g NP, $p < 0.05$). El contenido de lípidos corporales disminuyó por efecto de la lactancia en los dos grupos, solo que el grupo KP el día 14 de lactancia los tenía en menor cantidad (5.26 ± 0.69 g KP vs 7.18 ± 0.79 g NP; $p < 0.0002$) y hacia el final de la lactancia fue el grupo testigo quien bajó su contenido de lípidos, resultando para este día la misma cantidad en ambos grupos (4.74 ± 0.9 g KP vs 4.58 ± 1.2 g NP). El

contenido de proteína el día 14 de lactancia para las ratas con la dieta KP fue menor aunque no alcanzó la diferencia significativa (21.83 ± 3.04 g NP vs 20.54 ± 3.31 g KP). La actividad específica de los proteasomas (ng de Metil Cumarina (MCA)/mg de proteína/min) aumentó en el hígado del grupo KP al día 14 de la lactancia (24.6 ± 6.8 , NP vs 96.0 ± 21.4 , KP; $P < 0.0001$). La actividad específica presente en la glándula mamaria fue mayor en las ratas con alimentación marginal KP que en el grupo testigo al día 14 de lactancia 30.52 ± 5.8 vs 51.33 ± 8.9 ; NP vs KP; $p < 0.0001$) y de la misma manera al final, 37.55 ± 8.1 vs 51.58 ± 7.7 para NP y KP, respectivamente. La actividad específica de los proteasomas en el músculo no presentó diferencia significativa en los tres días de lactancia entre los dos grupos de alimentación.

Al reportarse la actividad de los proteasomas por órgano o tejido total es decir en μ g de MCA liberada /órgano o tejido total/ min, se encontró que el hígado de las ratas KP en el primer día de lactancia tuvieron una actividad estadísticamente mayor que las ratas testigo y menor al día 14 de la lactancia; La actividad total de la glándula mamaria fue significativamente mayor en las ratas KP al inicio de la lactancia ($p < 0.05$) y se incrementó aun mas el día de máxima producción de leche ($p = 0.0001$). El tejido muscular presentó los valores mas altos de la actividad total, al día 14 de lactancia la actividad total del tejido fue menor en las ratas KP que en las ratas testigo, pero al final de la lactancia los valores fueron mayores para las ratas KP que para las NP. A pesar de los cambios presentados por las ratas con la alimentación marginal, también tuvieron deficiencias en el volumen producido de leche y en su calidad. El volumen producido al día 14 fue de 48.5 ± 5.48 ml para el grupo testigo y para KP fue de 41.1 ± 6.00 ml ($p < 0.01$), la concentración de proteínas y lactosa fue menor en el grupo KP que el grupo control ($p < 0.0001$ y $p < 0.02$, respectivamente) Mientras que la concentración de lípidos fue mayor para las ratas alimentadas marginalmente ($p = 0.0001$). Estos cambios en conjunto provocaron que las ratas con la dieta KP tuvieran crías al nacimiento con un peso similar a las crías del grupo control, pero a partir del quinto día de edad las crías empezaron a detener su ganancia de peso en un 10 % y hacia el día 14 este retraso es del 16% y al día 21 de 27%.

CONCLUSIONES. Además del estrés de la lactancia una alimentación marginal (KP) provocó en el organismo la mayor participación del sistema de los proteasomas en el recambio de proteínas en el hígado, al día 14 de lactancia. La glándula mamaria por su elevada actividad de síntesis-hidrólisis aumentó la hidrólisis de proteínas y se observó un aumento en la actividad específica en la rata con alimentación marginal a partir del día 14. El tejido muscular de los dos grupos presentó mayor actividad total de los proteasomas en el día 14 de lactancia sin que acarree pérdida neta de proteína corporal. Finalmente, a parte de afectar una alimentación inadecuada al organismo materno, hubo una reducción en la producción de leche y en el contenido de algunos nutrimentos importantes especialmente proteína. Y estos cambios llegaron a influir en la ganancia de peso de la cría a partir del día 5 agudizándose mas hasta al final de la lactancia. Es de suponerse que es a partir del quinto día las deficiencias de energía y nutrimentos en la dieta empieza a afectar la producción de leche y por ende a la cría.

EFFECT OF A MARGINAL FOOD INTAKE ON THE PROTEOLYTIC ACTIVITY (ubiquitin-proteasome system) IN THE LACTATING RAT TISSUES, ITS CORPORAL COMPOSITION AND MILK PRODUCTION

Lic.Nut. Margarita Cervantes Rodríguez.

Research field: Proteins metabolism and lactation

After birth, the only way to get and adequate growth is that mother can offer to her offspring a milk volume containing a suitable energy intake and nutriment. The mother may get this nourishment from diet and by mobilizing the body reservoirs accumulated during pregnancy. Evidence exists that during lactation, rat increases its food intakes up to 300% and that the lipidic corporal reservoirs are completely mobilized during this stage. Presence of corporal protein reservoirs is actually controversial, it has been observed that by the end of lactation, the nursing rat may lose corporal proteins even when food intake is increased. Studies in our lab have demonstrated that rats fed in a free way present an increase in the proteolytic activity of D and L cathepsins from the liver, milk glands and muscle. There is not enough information of how a marginal diet can affect proteic and lipidic reservoirs and also how the activity of a proteolytic system is associated with loss of protein in several atrophy types. **Objective:** The aim of this study is to know the participation of the ubiquitin-proteasome system in the proteolysis, that takes place during lactation when nursing rat receive a chronic food intake in marginal conditions. It is necessary to determine the modification of body composition as well as its repercussion in the amount and quality of the produced milk. **Methodology:** Sprague-Dawley white rats were divided in two groups: a) control group fed with a diet recommended for rodents (NP), b) group fed with a marginal diet (KP). All the animals were fed with their correspondent diets two weeks before breeding (adaptation) until the end of lactation. The days of experiment were at the beginning of lactation (day 1), the day of maximum milk production (day 14 of lactation), and at the end of lactation (day 21). To measure the enzyme activity in the liver, milk glands and muscle we used the Fagan and Goldberg method; to study body composition in the rats we used Kjeldahl method for proteins and Goldfish method for lipids. The day 14 of lactation, milk production was measured using tritiated water (Godbole), and for milk composition we used Lowry for proteins, Folch for lipids and an enzymatic method for lactose. **Results:** Rats fed with a marginal diet (KP) showed the following results compared to control group (NP): weight of dry carcass at day 14 of lactation was lower (33.04 ± 2.10 g KP vs 36.43 ± 3.71 g NP; $p < 0.0002$); this means that KP rats mobilized a bigger amount of lipids. In KP rats the protein content by day 14 of lactation was lower but without a significant difference (21.83 ± 3.04 g NP vs 20.54 ± 3.31 g KP). Specific activity of proteasomes (ng of MCA/mg of protein/min) was increased in the liver of KP rats group by day 14 of lactation (24.6 ± 6.8 in NP vs 96.0 ± 21.4 in KP; $p < 0.001$). Specific activity present in milk gland is bigger in rats with marginal diet KP than in control group NP at day 14 of lactation (30.52 ± 5.8 vs 51.33 ± 8.9 ; NP vs KP; $p < 0.001$). The same behavior was observed at day 21 of lactation (37.55 ± 8.1 vs 51.58 ± 7.7 ng of MCA/mg of protein /min for NP and KP, respectively).

Specific activity of proteasomes in muscle did not show significant difference at three days of lactation between the two study groups NP or KP. When specific activity of proteasomes was analyzed for organ or total tissue (μg of MCA released/organ or total tissue/min) it was found that liver of KP rats in the first day of lactation has an activity statistically higher than control rats and lower at day 14 of lactation. Total activity of milk gland is significantly bigger in KP rats at the beginning of lactation ($p < 0.05$) and increases more the day when milk production is maximum ($p < 0.001$). Muscle tissue is the one that presents the highest values of total activity; at day 14 of lactation the total activity of the tissue is lower in KP rats than for NP rats, but by the end of lactation the values are higher for KP rats than for NP rats. Other changes observed in the rats fed with a marginal diet were deficiencies in milk volume and quality. Regarding milk volume, it was observed that by day 14 the volume obtained was 48.5 ± 5.48 ml for control NP rats and 41.1 ± 6.0 ml for KP rats ($p < 0.01$). Proteins and lactose concentration was lower in the KP group than the control group ($p < 0.001$ and $p < 0.024$, respectively). However, lipids concentration was bigger for KP rats fed with a marginal diet ($p < 0.01$). These changes made that rats fed with a KP diet gave birth to litter with a similar weight than those from control rats. It was also observed that after fifth day of birth the litters stop gaining weight in about 10%, by day 14 this development delay is 16% and by day 21 is 27%.

Conclusions: As well as lactation stress, a marginal diet (KP) may cause a higher participation of the proteasome system in the interchange of liver proteins at day 14 of lactation. In the milk glands this system participates in proteins hydrolysis. (it has been suggested that can be abnormal proteins of short life), for its elevated activity of synthesis-hydrolysis showing an increase in the specific activity in the KP rats since day 14. Muscle tissue presents a higher activity of proteasomes at day 14 of lactation, without causing lose of body protein. Finally, more than affecting an adequate food intake for the mother, it has been observed a reduction in milk production and in the content of some important nutriment, particularly protein. These changes affect mainly the development and growth of the litter after day 5, turning out worst by the end of lactation. It has been suggested that after day 5 is when energy intakes and nutriment deficiencies start affecting milk production and causing development delays.

INTRODUCCIÓN

Para el organismo enfrentarse al proceso de la lactancia sugiere una cascada de cambios a nivel tisular, celular y ultra celular que se van presentando desde la gestación en el desarrollo embrionario *in utero*, hasta el buen desarrollo de la lactancia, siendo decisiva para la primera etapa de la vida después del nacimiento donde se presenta la mayor velocidad de crecimiento. Es por ello que se requiere una gran demanda de energía, macronutrientes y micronutrientes para que la madre pueda sintetizar leche en volumen y composición adecuada. Los fenómenos fisiológicos y bioquímicos que se adaptan en este proceso están definidos principalmente para el metabolismo de lípidos; pero, la adaptación en el metabolismo de proteínas no ha sido descrita completamente.

Es el caso de la bien conocida curva bifásica de Naismith Morgan (49) que varios autores han utilizado como referencia y que analizando detenidamente en el diseño experimental no resulta clara la acumulación de proteína reportada en el músculo de la rata durante las dos primeras semanas de embarazo; lo que si está claro es que inician la lactancia sin ninguna reserva de proteína (al menos en el tejido muscular), lo cual coincide con lo reportado en diversas especies. En la siguiente sección se encontrará información más explícita y abundante sobre este tema.

Así como existen datos importantes del aumento en la síntesis de proteína en tejidos muy específicos como la glándula mamaria, también ocurre una hidrólisis importante de proteínas en el organismo lactante para el recambio proteico por lo que las enzimas que intervienen en la hidrólisis de proteínas se encuentran aumentadas, por lo menos las catepsinas y la proteasa miofibrilar que ya han sido estudiadas. Con este trabajo se pretende proponer un nuevo sistema enzimático que interviene en la proteólisis que acontece en la lactancia; El sistema enzimático de los proteasomas dependiente de ATP y ubiquitina es químicamente complejo aunque no tanto fisiológicamente, tiene todo un mundo de antecedentes en la pérdida de proteína tisular que nada tiene que ver con la lactancia, pero que de igual manera se mencionan en los antecedentes de este trabajo.

Fue en los años 50, cuando iniciaron los trabajos de lactancia que van desde la composición de la leche de varias especies, hasta el estudio del efecto de la dieta sobre la producción y composición láctea; hasta ahora no se ha podido aclarar esta relación, y existe una diversidad de resultados que aún están en controversia y serán retomados en la parte correspondiente de los antecedentes.

Finalmente, aunque existen las modificaciones mencionadas anteriormente en la madre, parece encontrarse un mayor efecto de los cambios que se pudiera sufrir en la lactancia (como la dieta) para las crías que para el organismo materno.

Los trabajos recientes del grupo del Dr Hernández-Montes relacionados con la composición corporal de los dos elementos madre y cría, apuntan en esta dirección.

La rata es una de las especies que mas se ha estudiado en esta etapa ya que su tiempo de gestación es relativamente corto, su organismo y su conducta han sido bien estudiados, tienen una producción de leche mayor por Kg de peso comparándola con el humano y la alta concentración de proteínas en la leche aumenta la demanda de este nutrimento.

El presente estudio pone a su consideración, tanto el punto de vista del autor como una serie de resultados novedosos e interesantes para quienes estén interesados por los aspectos bioquímicos de la lactancia, ya sea de apoyo a trabajos anteriores o de referencia para nuevos estudios relacionados a este interesante aspecto de la nutrición y la lactancia.

ANTECEDENTES

1. BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGIA DE LA LACTANCIA.

En la lactancia los requerimientos de energía para la producción de leche son extremadamente altos, aún cuando se observan condiciones de regulación como una marcada supresión de la termogénesis y una importante disminución en las respuestas fisiológicas al estrés por la liberación de la adrenalina y la noradrenalina (1,2). Pero condiciones establecidas previas a la lactancia como el deporte no afecta su desarrollo, ya que con un consumo adicional de energía se compensa el aumento en el gasto total por el ejercicio (3). En la rata, el buen funcionamiento y desarrollo de la lactancia se puede ver afectada en términos negativos cuando es sometida nuevamente a un embarazo (4).

El aumento en los requerimientos de energía es compensado por un aumento en el consumo de alimento, que se da en función de la energía asociada con el proceso de síntesis de leche y no directamente por los cambios hormonales. En general los animales con alta producción de leche en relación a su peso corporal tienden a comer mas (5), es el caso de la rata que aumenta en un 300 % el consumo de alimento y en el caso de las mujeres las recomendaciones son de 500 Kilocalorías por arriba de sus necesidades fuera de este periodo. El aumento en el gasto total de energía en mujeres lactantes tiene relación con el aumento en el uso de la glucosa por la glándula mamaria determinándose ésta por la composición corporal de la mujeres y regulada por el medio hormonal, según el grupo de NF Butte (6). Los nutrimentos que son utilizados por la glándula mamaria para la composición de la leche principalmente se transfieren del plasma, así que todos los fenómenos fisiológicos y bioquímicos que influyen en la composición del plasma también lo hacen en la composición de la leche (7).

a) METABOLISMO DE PROTEÍNAS.

La capacidad para secretar leche depende del número y de la actividad de las células mamarias, el desarrollo de estas células antes y después del parto requiere proteína adicional para este crecimiento mamario. Ya en la lactancia se incrementa considerablemente la demanda de aminoácidos que varía de acuerdo a la cantidad de leche producida y a su contenido de proteínas. Existen diferencias entre dos especies, la rata produce una leche con una alta concentración en proteína 13.52 g/dl (8), en comparación con la leche humana que en la lactancia temprana su contenido es de 1.5 g /dl y declina ligeramente a 0.8-0.9 g /dl en la lactancia estabilizada (9). En la rata, durante la lactancia los indicadores de síntesis de proteína en la glándula mamaria se encuentran elevados como la captación de aminoácidos y la velocidad fraccional de proteínas(10). Por otra parte se ha encontrado que el tejido esplénico también aumenta su captación durante la lactancia temprana (11)

Hay tres fuentes de los constituyentes de la leche, los sintetizados en las células secretoras, los sintetizados en otras células de la glándula mamaria y los que son transferidos directamente del plasma a la leche. En el caso de las proteínas de la leche, la prolactina e insulina intervienen en la síntesis de caseína, de α -lactoalbúmina, y de la β - lactoglobulina en células secretoras (12). Los amino-ácidos menos metabolizables y que se utilizan para síntesis de proteínas son leucina, tirosina y fenilalanina, los demás pueden recorrer esta u otra vía metabólica como la gluconeogénesis, que en este periodo de lactancia se encuentra disminuida, como ahorrador de nitrógeno. Algunas condiciones como la hiperinsulinemia inhibe la proteólisis, pero no estimula considerablemente la síntesis de proteína como sucede in vitro (13). Las hormonas relacionadas con el metabolismo de proteínas son los estrógenos placentarios, la hormona del crecimiento, glucocorticoides, la insulina y la prolactina (14). El recambio de proteína es un proceso cíclico, los aminoácidos derivados de la degradación de proteína intracelular son reutilizados para la síntesis de otras proteínas (15) o en caso necesario para su oxidación.

b). METABOLISMO DE LÍPIDOS.

El tejido adiposo juega un papel integral en la preparación para la estabilidad de la lactancia. El medio hormonal que prevalece en la lactancia temprana condiciona a que se reduzca la capacidad de sintetizar lípidos por el tejido adiposo, aumentando la velocidad de la lipólisis de lo que resulta una pérdida neta importante de lípidos del tejido adiposo (16). Los triacilgliceroles de la leche que son cerca del 98% del contenido total de lípidos son sintetizados en las células alveolares de la glándula mamaria, los ácidos grasos de menos de 16 carbonos provienen de la dieta y los de más de 16 carbono provienen del tejido adiposo. En ratas lactantes alimentadas con dieta de cafetería, la alanina es utilizada por la glándula mamaria para la lipogénesis (17). En la lactogénesis, la disminución en el número de receptores de insulina y el incremento de los receptores de adrenalina en tejido adiposo alteran el metabolismo celular favoreciendo la lipólisis en relación con la lipogénesis (18). También se ha descrito que el cortisol y la corticosterona se relacionan con un aumento en la lipogénesis en glándula mamaria, en la actividad de la lipoproteína lipasa y un aumento en el número de receptores a insulina en periodos de prolongación de lactancia del día 22 al 28 de lactancia (19).

c). METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO.

La glucosa es utilizada primero para la síntesis de lactosa, de glicerol y para la generación de equivalentes reductores en la glándula mamaria disminuyendo su utilización por el tejido adiposo para la síntesis de lípidos; se ha reportado que los receptores de insulina se incrementan en el tejido mamario y disminuyen en el tejido adiposo en el parto, aparentemente en asociación con la disminución de la progesterona, cambiando también la afinidad de los receptores a insulina de ratas lactantes en comparación con animales vírgenes (18).

2. ALIMENTACIÓN Y LACTANCIA

a) REQUERIMIENTOS DE ENERGÍA Y PROTEÍNA DE LA RATA EN LA LACTANCIA.

En 1973, se formó un subcomité "Ad Hoc" del Consejo del Instituto Americano de Nutrición para desarrollar las recomendaciones nutricionales de ratas y ratones, sirviendo así de guía y de unificación en el uso de las dietas estándares; en ese momento surgieron las primeras recomendaciones para las ratas en periodo de lactancia que el comité describe como dieta purificada para ratas y ratones denominada AIN-76TM que contiene 20 % de caseína y 385 Kilocalorías por 100 gramos de alimento (20).

Para 1980, el comité después de una recopilación en el uso de esta dieta, realizan cambios en la cantidad de vitamina K, en la adición de antioxidante y en la fuente de carbohidratos de la dieta; pero no realiza ningún cambio de energía o proteína para este tipo de dieta que ahora es denominada AIN-76^a (21).

El último reporte respecto a la dieta de los roedores tanto de ratas como de ratones tuvo nuevos cambios en la fuente de carbohidratos que se pueden utilizar de acuerdo al investigador y a su diseño de la dieta; para fuente de grasas se propuso 70 g/kg de alimento utilizando el aceite de soya. La nueva dieta no presenta cambios en cuanto a la cantidad o en la fuente de proteína, solo que en las nuevas disposiciones se recomienda suplementar la dieta con L-Cisteína y L-metionina y una adición de un antioxidante llamado Santoquina; las mezclas de vitaminas y minerales sin cambios. En este reporte la dieta recomendada para roedores en etapa de desarrollo, en gestación y en lactancia se denomina AIN-93G que aporta aproximadamente 3800 kilocalorías. Este mismo comité diseñó una dieta de mantenimiento, que excluye los periodos catabólicos del roedor y esta dieta se denominó AIN-93M contiene una menor cantidad de proteína (14%) y aporta 3600 kilocalorías por kilogramo de alimento (22).

b). EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE.

La producción de leche de mujeres lactantes de países desarrollados es similar al volumen producido por mujeres de países subdesarrollados, a pesar de las diferencias en la ingestión de energía y nutrimentos entre estas (7). Lo anterior sugiere que la ingesta de energía materna no está asociada con el volumen de leche producido (23). Es conocido que la suplementación de alimentos en mujeres lactantes con malnutrición prevalente no aporta beneficio alguno para el infante aún cuando sí se tiene un mejoramiento en la composición de la leche (24). La dieta de la madre puede en algunos casos afectar la composición de la leche, como lo prueba el estudio de la Dra Motil (25) con mujeres lactantes sometidas a una dieta marginalmente restringida en proteína, donde no se encontró efecto sobre la cantidad de leche producida ni sobre la cantidad de nitrógeno proteico, sin embargo se observó un efecto de reducción en el nitrógeno no proteico y en la cantidad de aminoácidos libres contenidos en la leche, especialmente leucina, fenilalanina e histidina. En ratas con dieta baja en proteína se afecta negativamente la producción diaria y la concentración de sus proteína (8). Al disminuir la calidad de la proteína de la dieta, también se ha encontrado una reducción de la producción de la leche adicional a la baja concentración de proteína contenida en esta (26). De igual manera sucede con las madres con dietas altas en lípidos que producen una leche con alta concentración de lípidos similares a la dieta recibida (27). La expulsión de la leche producida se debe a la oxitocina liberada en cortos impulsos a través de la sangre hasta las mamas, donde provoca la contracción de las células epiteliales que rodean las paredes externas del alveolo (28).

c) ALIMENTACIÓN MARGINAL EN LA LACTANCIA.

La calidad de la alimentación es determinante en el estado nutricional (composición corporal) y en situaciones de mayor gasto energético por lo que

dicha alimentación debe de cubrirlos para evitar un desgaste del propio organismo. Con anterioridad se ha informado ampliamente de los cambios que ocurren en la lactancia los que provocan un mayor requerimiento de energía. Los efectos que puedan provocar los cambios en la dieta de la madre durante la lactancia se ven reflejados en su propio estado nutricional, en la calidad de la leche y finalmente en el crecimiento de su(s) cría(s). Los dos primeros aspectos serán analizados en el siguiente capítulo; con respecto a los cambios en el crecimiento y desarrollo los resultados son contradictorios debido a que las dietas son administradas por diferentes periodos ya sea desde la gestación y la lactancia o en periodos más cortos de lactancia, lo que ha llevado a diferentes conclusiones.

Se han utilizado diferentes tipos de dietas con deficiencias nutrimentales en varias especies para estudiar su efecto en el desarrollo de la lactancia. Estos estudios indican que la fuente de proteína en la dieta de la rata influye en el desarrollo de la lactancia, ya que a ratas alimentadas con una dieta marginalmente baja en proteína (8%) afecta el peso corporal, el crecimiento de las crías y el perímetro cefálico de estas (29), tanto los pesos de cerebro e hígado y la concentración de proteolípidos en el cerebro también se ve reducido (29-31). Cuando la fuente de proteína de la dieta de la rata es el maíz y el frijol (8% de proteína) se ve disminuido el contenido total de ADN, ARN y de proteína en el hígado (32). La deficiencia de algunos aminoácidos como la lisina y treonina en la proteína del trigo, provocan un cambio en la poza de lisina en la glándula mamaria y una deficiencia de este aminoácido en la leche producida; tanto la pobre calidad y la baja cantidad de proteína (11.6%) en la dieta de la rata gestante, repercute en un bajo peso de la camada al nacimiento y al día 15 de lactancia se acentúa aún más. (33).

Las dietas bajas en proteínas consumidas por las ratas en periodo de lactancia no solo alteran los tres aspectos de la lactancia a la que se ha estado refiriendo, si no también afecta a nivel celular disminuyendo el tamaño de los adipocitos y aumentando el número de receptores de membrana a insulina (34). Las ratas en periodo de lactancia aumentan todos los parámetros de la síntesis de proteína en glándula mamaria y en el hígado, mientras que en el músculo se ve

disminuida la síntesis de proteína (35). Sin embargo, la administración de una dieta baja en proteína o con proteína de origen vegetal, provoca una disminución en la síntesis de proteínas en el hígado y en la glándula mamaria (36,37) y un desarrollo psicomotor deficiente (38).

d). RELACION DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LA MADRE Y LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE.

En mujeres, los estudios para relacionar el estado de nutrición con la composición de la leche producida, en general se realizan comparando los indicadores de estado de nutrición de las mujeres lactantes contra mujeres no lactantes. En estos términos, el cambio longitudinal del peso corporal durante la lactancia presenta una pérdida de 0.6 a 0.8 Kg /mes durante los primeros 4 a 6 meses postparto, y los pliegues supraileaco y subescapular disminuyen durante los primeros 4 a 6 meses de lactancia (23).

En mujeres de los Estados Unidos el estado nutricional evaluado a través de índices antropométricos no está relacionado con el volumen de leche, mientras que en países en desarrollo aun no es muy claro porque los resultados han sido controversiales. Villalpando y cols Encontraron una relación entre la producción de leche y la adiposidad de la madre (39) y de la cantidad de lípidos en la leche con el IMC de la mujer lactante (40).

Las consideraciones del control fisiológico de la lactancia y del papel de la cría en el proceso de la regulación del volumen de leche se extiende a factores maternos como edad, paridad, estrés, uso de sustratos y estado de nutrición. La cantidad de leche transferida a la cría es considerada la cantidad de leche producida aunque debe de reconsiderarse la leche remanente en la mama. Recientemente la utilización de isótopos estables en humanos para realizar esta medición ha tomado mayor auge, y para las ratas es la técnica que en este trabajo se describe.

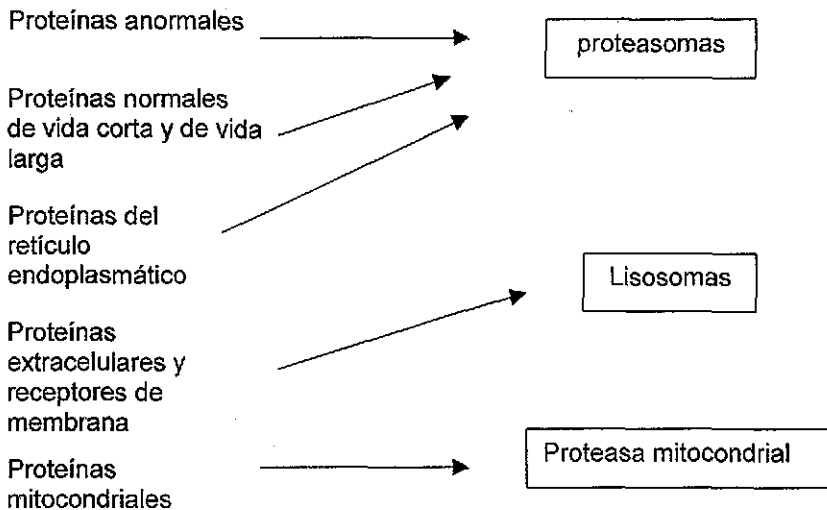
3. CAPTACION DE NUTRIMENTOS POR LA GLANDULA MAMARIA.

a). APORTE DE AMINOÁCIDOS PROVENIENTES DEL MÚSCULO.

El tejido mamario necesita para su proliferación y para la síntesis de la leche, sustratos que son principalmente obtenidos de la circulación, la mayor parte de estos sustratos provienen de la dieta y en menor cantidad de la movilización de otros tejidos. Esta situación está bien descrita para los ácidos grasos (41) pero no para los aminoácidos, ya que persiste la controversia de la pérdida de proteína corporal. De alguna manera son los aminoácidos de la dieta, los principalmente captados por la glándula mamaria (42) y algunas proteínas de origen hepático como la albúmina y las globulinas (43). En esta condición de lactancia todos los indicadores relacionados con la síntesis de proteína en el tejido mamario están elevados como es el caso de la concentración de DNA y RNA, captación de aminoácidos, la velocidad fraccional de síntesis de proteína (10) y la actividad de transaminación y oxidación de los aminoácidos (44). Uno de los primeros trabajos relacionados con proteólisis en la lactancia son el de Naismith y Morgan (45) que sugiere que durante los dos primeros tercios del embarazo en la rata se forma una reserva de proteínas que es utilizada en el último tercio de la gestación por el rápido crecimiento fetal; un trabajo reciente del grupo del Dr Hernández-Montes (46) diseñado específicamente para comprobar lo anterior, no encuentra ninguna formación de reserva de proteína en el paquete muscular en la gestación. Para el periodo de lactancia, diversos estudios muestran que algunos organismos pierden proteína corporal (47,48) y esta pérdida tiene lugar en el músculo por medio de la hidrólisis de sus propias proteínas para la movilización de los aminoácidos (49) coincidiendo con el mayor flujo sanguíneo hacia el tejido mamario (42) y la mayor captación de aminoácidos libres por la glándula mamaria lactante (50). Con el consumo de dietas isocalóricas con baja concentración de proteínas en ratas lactantes no se encontró pérdida de proteína corporal, cuando se analizó su composición corporal (51), pero las ratas con restricción energética-proteica al 50% redujeron el contenido de proteína corporal hasta en un 30 % al final de la

lactancia adicional a la restricción (52). Los aminoácidos que son captados por la glándula mamaria son destinados a sintetizar proteínas de la leche como es el caso de la caseína, siguiendo el mismo mecanismo conocido para la síntesis de proteínas dentro de la célula; aunque también estos aminoácidos son utilizados para la síntesis de proteínas estructurales del mismo tejido mamario y en menor cantidad para su oxidación. Existe poca información de cuales son las reservas proteínicas corporales que se movilizan y se propone que la proteína del músculo esquelético sea la principal fuente de aminoácidos endógenos dado que ese tejido contiene el 25% de la proteína corporal total (51). Aunque en periodos de ayuno de 48 h las ratas pierden del 25 al 40% de la proteína hepática no se detecta una pérdida importante del contenido de proteína muscular (53).

Figura 1. Sustratos de diferentes vías proteolíticas intracelulares.



Fuente: Lecker SH Et al. Am Soc Nutr Sci 129:227S-237S, 1999. (54)

b). SISTEMAS ENZIMATICOS RELACIONADOS CON PROTEOLISIS MUSCULAR.

El intercambio proteico es un proceso cíclico que implica la síntesis de proteínas y la degradación de estas, dichos procesos pueden ser regulados por propiedades innatas de las proteínas, como por factores que interactúan con ellas para su hidrólisis posterior por la maquinaria hidrolítica de la célula. La interpretación de los datos de proteólisis es difícil sobre todo cuando son obtenidos por mediciones *in Vitro* debido a factores asociados con la ausencia de las influencias físicas y humorales presentes *in Vivo*. Pero aun así, se ha logrado el diseño de métodos como el de la medición de la velocidad de degradación proteica *in Vivo* donde se usa la diferencia entre la velocidad de síntesis proteica y la velocidad de degradación de proteínas o la medición de la pérdida radiactiva de las proteínas premarcadas. Recientemente se utiliza la infusión de aminoácidos marcados basándose este método en la dilución isotópica de los aminoácidos inyectados. Para medir la velocidad de degradación de proteínas *in Vitro* se calculan las velocidades de liberación de fenilalanina y tirosina en presencia de cicloheximida o de puomicina. Para ello también se utiliza la liberación de 3-metilhistidina que es el producto de la hidrólisis de la actina y miosina del músculo esquelético y no tiene otra vía de liberación diferente (55, 56). Es posible que las proteínas tengan mecanismos para aumentar su susceptibilidad hacia la degradación como podría ser la desaminación de los aminoácidos o el proceso en el cual los sitios funcionales son removidos de las proteínas y son secuestradas (57). La hidrólisis de proteínas es regulada por diversos factores, principalmente por insulina en células intactas (58) y glucagon además de algunos aminoácidos y sus metabolitos en el hígado (53). En la figura 1 se muestran los mecanismos proteolíticos de la célula y sus proteínas blanco.

Los sistemas de organelos celulares que son responsables de la degradación de las proteínas celulares deben tener actividad endoproteolítica y esporoteolítica, pero también necesitan tener otras actividades enzimáticas para completar la hidrólisis. El lugar para el proceso hidrolítico sin duda son los lisosomas por

la alta concentración de hidrolasas, está claramente establecido que los lisosomas son responsables de la hidrólisis de las proteínas extracelulares que entran a la célula por endocitosis, en general las proteasas lisosomales son de grupo de cistein- y aspartato- proteasas.

PROTEASAS LISOSOMALES.

Las proteasas lisosomales son enzimas relativamente pequeñas que están presentes prácticamente en todas las células de mamíferos excepto en los glóbulos rojos. Las enzimas lisosomales fueron llamadas catepsinas, de las cuales se puede mencionar a las catepsinas B y H que tienen acción de endo- y exopeptidasas. Las catepsinas N,M,S,T pertenecen al grupo de las cistein-proteasas. La catepsina L tiene actividad endopeptidasa y un pH óptimo de 5.5 e hidroliza sustratos sintéticos, como la azocaseína, una proteína químicamente modificada (59). También se conoce la catepsina D que es una aspartoproteasa. Estas dos últimas son las que se encuentran en mayor concentración en los lisosomas. Las catepsinas D y L fueron estudiadas recientemente por el grupo del Dr Hernández-Montes (51) en ratas lactantes, encontrándose aumento de su actividad en el hígado y en la glándula mamaria pero no en el músculo, lo que hace sugerir al autor que este sistema proteolítico no es el más importante en el músculo para la movilización de proteína en este periodo demandante.

PROTEASAS PLASMÁTICAS MEMBRANALES

Las metaloendoproteasas, se encuentran asociadas a las membranas en las células o son secretadas por las células y actúan fuera de la célula como las colagenasas y elastasas. De ellas la mejor caracterizada es la metaloendopeptidasa membranal (meprina) que es una enzima plasmática membranal con una alta actividad en el riñón (57).

PROTEASAS CITOPLASMÁTICAS

Estas proteasas son aisladas del citoplasma de varios tipos de células, son cisteinproteasas y muchas de ellas requieren de un ligando para su activación. La notable característica de muchas proteasas citoplasmática es su tamaño, ya que tienen pesos moleculares en el rango de 80 a 750 KDa a diferencia de las lisosomales, siendo esta diferencia muy importante para su regulación y su selectividad.

Las proteasas dependiente de Calcio conocidas como calpaínas, son cisteinproteasas relacionadas con la familia de la papaína. Las calpaínas se inhiben por agentes específicos que reaccionan con grupos sulfidriilo; su peso molecular aproximado es de 110 KDa y son heterodímeros.

Existen dos formas de calpaínas que difieren por su sensibilidad al Ca^{++} . Las primeras se activan con concentraciones micromolares y son denominan μ -calpaínas y las segundas necesitan concentraciones milimolares del catión llamadas m-calpaínas. Las dos formas de enzimas tienen una subunidad catalítica de 80 KDa y otra subunidad pequeña de 26 KDa de la cual no se conoce su función. Las calpaínas no están involucrados en la hidrólisis de grandes volúmenes de proteínas celulares, sin embargo parecen participar en las etapas iniciales de la degradación de proteínas miofibrilares y de las proteínas del citoesqueleto (57).

Las calpaínas han sido relacionadas con la hidrólisis de las bandas Z de las proteínas miofibrilares en períodos de sepsis (60), y se ha encontrado en ratones con distrofia muscular genética una elevada concentración de Calcio y un aumento en la degradación de proteína (61).

Otro sistema hidrolítico importante ubicado en el citoplasma es el que requiere de ATP para la conjugación covalente del sustrato a hidrolizar con el polipéptido ubiquitina.

c). EL SISTEMAS DE PROTEASOMAS. Un sistema dependiente de ATP y de un polipéptido llamado ubiquitina

La estructura de los proteasomas ha sido estudiado por microscopía electrónica, encontrándose como un compuesto dimérico, con un centro cilíndrico con cuatro discos de estructuras α , β , β , α a la cual le han dado el nombre de 20S proteasoma con un peso molecular aproximado de 750 KDa, en los polos de esta estructura cilíndrica se encuentra un complejo con una estructura en V con una orientación opuesta que corresponde a la parte de 22S proteasoma que tiene un peso molecular de aproximadamente 2000 KDa (62,63). Los productos de los genes PRS3, PUP1, PUP2 y PUP3 que han sido identificados y clonados forman parte de la subunidad 20S proteasoma, mientras que los productos de los genes PRE1, PRE2, PRE3 y PRE4 forman parte de la subunidad del tipo β y para las proteínas de las subunidades del tipo α , los genes PRE5 y PRE6 (64). Los proteasomas tienen actividad de endopeptidasa semejante a la tripsina y quimotripsina dependiendo de las diferentes unidades (65). Se han encontrado hasta la fecha dos activadores de los proteasomas, el PA700 (66) y el PA28; de este último ya se describió su estructura que esta formada por dos polipéptidos homólogos denominados PA28 α y PA28 β que no presentan actividad hidrolítica (67). Este sistema hidrolítico de proteasomas necesita un marcador para poder atacar a la proteína blanco, este marcador es la ubiquitina, una proteína pequeña que se encuentra en todas las células eucariotas y es codificada por cuatro clases de genes: el UBI1, el UBI2, el UBI3 y UBI4; este último codifica para la cadena de poliubiquitina (68). La estructura tridimensional de la ubiquitina presenta el carboxilo terminal de la glicina 76 que sobresale del cuerpo globular el cual se une por enlace covalente con el grupo amino de la cadena lateral de la lisina de la proteína blanco, este proceso conocido como ubiquitinilación involucra cuatro reacciones separadas:

1. La activación de ubiquitina. Una alta concentración de ubiquitina es sintetizada como cadena polimérica, la que para activarse requiere de un procesamiento proteolítico para el rompimiento de enlaces amino en el C-terminal de la ubiquitina, la división debe ocurrir en la glicina 76 de la ubiquitina. Dos tipos de enzimas específicas son necesarias, la ubiquitina carboxil terminal hidrolasa y la proteasa de ubiquitina específica.

2. La conjugación de ubiquitina con una variedad de proteínas celulares. Aunque no se conoce la especificidad de este proceso de ubiquitinilación, se sabe que requiere de una serie de reacciones complejas catalizadas por las primeras enzimas del sistema y así las proteínas blanco pueden ser mono, di- o- poliubiquitinizadas. Para esto se necesita de una primera enzima, la enzima activadora de ubiquitina (E1), que cataliza la formación de un enlace tioéster entre el C-terminal de ubiquitina y una cisteína de una segunda enzima acarreadora de ubiquitina (E2), que es quien se encarga de llevar a la ubiquitina cerca de la proteína blanco; una tercera enzima ligasa (E3) tiene afinidad por la ubiquitina y por el sustrato y se une a E2 transitoriamente para pasarle su ubiquitina desde E2 a la proteína blanco (69-71).

3. Identificación del complejo o conjugado. Se ha propuesto una identificación previa del complejo ubiquitina - proteína blanco, para corregir el mecanismo y asegurar que solamente estas sean hidrolizadas agregando mas moléculas de ubiquitinas y por otro lado, separar a la proteína que se le haya unido el marcador que no va a ser requerida en el proceso de proteólisis.

4. Catabolismo del conjugado (proteína-ubiquitina). La proteólisis comprende la degradación de las proteínas ubiquitinizadas por el proteasoma (72). Este sistema ha sido caracterizado en el espermatozoide humano y de ratón (73) y

se ha propuesto como el responsable de la hidrólisis del receptor a IL-1 asociado con cinasa (74), de las ciclinas en el ciclo celular (75) y de la hidrólisis normal de proteínas del músculo e hígado (76,77); en pérdidas mayores de proteína inducida por tumores en ratas (78), por la administración de glucocorticoides en ratas (79), en condiciones de sepsis (80-82) y en pacientes diabéticos dependientes de insulina (83).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto una identificación previa del complejo ubiquitina - proteína blanco, para corregir el mecanismo y asegurar que solamente estas sean hidrolizadas agregando mas moléculas de ubiquitinas y por otro lado, separar a la proteína que se le haya unido el marcador que no va ha ser requerida en el proceso de proteólisis

Proponemos que la lactancia involucra un estrés fisiológico que junto con una dieta no adecuada (marginal), coloca al organismo en una situación condicionante a la proteólisis muscular y a cambios en la hidrólisis de las proteínas del hígado y de la glándula mamaria, que no han sido hasta la fecha aclarados. Por lo anterior, se desconoce como afecta una alimentación marginal en energía y proteínas, alta en fibra y con el 70% de proteína de baja calidad, consumida de manera crónica a la composición corporal de la rata y al funcionamiento enzimático de los proteasomas dependiente de ubiquitina en tres tejidos importantes en la lactancia.

Se propone al sistema enzimático de proteasomas que depende de ATP y ubiquitina como el responsable de la hidrólisis de proteína en el músculo y de la hidrólisis de proteínas en el tejido mamario e hígado.

Hoy se sabe que en la lactancia, la madre no compromete su salud ni su composición corporal hasta un límite de riesgo, por lo que consideramos que la alimentación marginal pudiera afectar la proteína y los lípidos corporales. Además no se conocen los efectos de esta limitación en la producción de leche y la composición química de la rata, ni su repercusión final en el crecimiento de las crías y consideramos que estos aspectos deben ser aclarados.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Valorar el efecto de la alimentación crónica marginal sobre la movilización de reservas corporales, la actividad proteolítica dependiente de ATP durante la lactancia y las repercusiones en la producción y composición de leche, así como en el crecimiento de las crías.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la composición química de la carcaza (proteínas y lípidos corporales maternos) de las ratas alimentadas con una dieta normal (NP) o una dieta marginal (KP), durante la lactancia.
2. Comparar la actividad proteolítica dependiente de ATP (proteasomas) en el hígado, el músculo y la glándula mamaria de la rata lactante alimentada con una dieta normal o marginal.
3. Estudiar la producción láctea por 24 h y la composición química de la leche producida por las ratas alimentadas con las dos dietas diferentes.
4. Estudiar el efecto de la administración de una dieta marginal (KP) sobre el peso de las crías y compararlas con el de las crías de las ratas que recibieron la dieta NP.

HIPÓTESIS

1. La concentración de proteínas y de lípidos corporales se verá afectada en las ratas lactantes, mostrándose una mayor movilización en las ratas alimentadas con una dieta marginal (KP) cuando se compare con la composición corporal de las ratas alimentadas con la dieta normal (NP).
2. Para cubrir las demandas de la lactancia el organismo materno aumenta la hidrólisis de las proteínas corporales, incrementando la actividad específica y total de los proteasomas en el hígado, músculo y glándula mamaria, acentuándose este incremento en las madres alimentadas con una dieta marginal (KP).
3. La producción diaria de leche por las ratas alimentadas con la dieta KP será menor a la producida por los animales alimentados con la dieta NP, y los cambios en la dieta de la madre afectaran la composición química de la leche
4. La alimentación de la madre con la dieta KP ocasiona que sus crías sean de menor peso al nacer que las del grupo NP y su peso corporal se mantendrá por debajo del grupo testigo durante toda la lactancia.

MATERIALES Y METODOS

1. Manejo de los animales

Se emplearon para este estudio, ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 14 semanas de edad con pesos de 240 ± 20 g. Antes de esta selección, las ratas fueron alimentadas con dieta de laboratorio (Labdiet prolab de Brentwood MO). Los animales seleccionados fueron mantenidos en cajas de Pals-tico en un cuarto del bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI que cuenta con temperatura regulada de 22°C y un ciclo luz : oscuridad de 12 :12 h. El alimento y el agua estuvieron disponibles a libre demanda. Para lograr la adaptación de los animales a las dietas del estudio, las ratas fueron alimentadas en las semanas 14 y 15 con la dieta específica (periodo de adaptación). Durante la semana 16, las ratas fueron colocadas con machos de la misma cepa para su cruce. Después fueron retirados y la evolución de la gestación fue seguida midiendo la ganancia de peso de las hembras. Las ratas no embarazadas fueron incluidas en los grupos control, que corresponden a los grupos vírgenes. Desde el primer día de la adaptación y hasta el día del sacrificio se registraron tres veces por semana, el peso corporal y el alimento consumido y en su caso el peso total de la camada (balanza OHAUS de 0.1 g de sensibilidad, Brisbane C.A). El día del parto, que fue designado como el primer día de la lactancia, se registró el número de crías y el peso total de la camada y se ajustó la camada a ocho crías

2. Grupos de estudio.

Los animales fueron incluidos aleatoriamente en dos grupos de alimentación.

2.1 Grupo de experimentación. 21 Animales lactantes que consumieron una alimentación marginal, **dieta KP**, que se dividieron en subgrupos de

- 7 ratas para 3 días diferentes de sacrificio: El día 1 de lactancia, el día 14 de lactancia, y el subgrupo que fue sacrificados el día 21 de lactancia

Por las características del diseño de la investigación se consideró pertinente formar 3 grupos testigos.

- 2.2 **Grupo testigo 1.** 21 Animales lactantes alimentados con una dieta isocalórica que se denominó **dieta NP**. Sacrificados a los mismos días de lactancia del grupo de experimentación.
- 2.3 **Grupo testigo 2.** 21 ratas no embarazadas, no lactantes que se denominó grupo virgen alimentadas con la dieta KP. Sacrificadas en su edad equivalente del grupo de experimentación.
- 2.4 **Grupo testigo 3.** El grupo **virgen** (ratas no embarazadas, no lactantes) alimentadas con la dieta NP. Sacrificadas en su edad equivalente del grupo testigo 1

La determinación de la producción y la composición de la leche se realizó exclusivamente los días 12-14 de lactancia (máxima producción de leche) de cada grupo de alimentación [**testigo**, alimentado con la dieta NP y de **experimentación** alimentado con la dieta KP; (n=10)];

3 Elaboración de las dietas.

Las dos dietas utilizadas, fueron preparadas en la cocina metabólica de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición. Los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis MO), Arancia corn products (Guadalajara, Mex), Harlan-Tecklad (Madison W) y Universal Flavors (México).

La **dieta control** (NP) corresponde a las últimas recomendaciones de la NRC de 1993, para roedores en periodo de gestación y lactancia (22) y la **dieta de experimentación** señalada como **marginal** (KP) corresponde a las características de la alimentación de una zona rural otomí del Estado de México (San Mateo

Capulhuac), descrita por Villalpando y De Santiago (84) como una alimentación monótona, alta en el consumo de hidratos de carbono y fibra, baja en lípidos y con cantidades marginales de energía y proteína, de la cual el 70% corresponde a proteína de origen vegetal. La dieta KP de nuestro estudio conserva esas características pero fue ajustada a los requerimientos de la rata. La composición química de estas dietas y el porcentaje con el que contribuye cada uno de los nutrimentos al **Valor Calórico Total** (VCT) se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Composición de las dietas utilizadas en el estudio.

Ingredientes	Dieta (NP) Control			Dieta (KP) Experimental		
	g / Kg de dieta	% del VCT	Kcal	g / Kg de dieta	% del VCT	Kcal
Caseína	200	20.77	800	44.55	5.60	178.2
Gluten del trigo	---	---	---	138.14	13.04	414.42
Almidón	325	33.76	1300	295.5	37.19	1182
Sacarosa	325	33.76	1300	295.5	37.19	1182
Aceite de maíz	50	11.69	450	23.5	6.97	221.5
DL-metionina	3			0.67		
Colina	2			2		
Vitaminas ¹	10			10		
Minerales ²	35			35		
Celulosa	50			159.17		
Totales	1000	99.98	3850	1004	99.99	3178

¹ La mezcla mixta de vitaminas (Telklad 40060) contienen: ácido p-amino-benzoico, ácido ascórbico, biotina, pantotenato de calcio, citrato de colina, ácido fólico, inositol, menadiona, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina, palmitato de retinol anhidro, ergocalciferol anhidro y DL- α -acetato de tocoferol anhidro. ² La mezcla mixta de minerales (Rogers-Herper, Tecklad 170760) contiene: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro, azufre, yodo, hierro, magnesio, zinc, cobre y manganeso.

4. Sacrificio y preparación de la carcaza de los animales.

Los animales fueron sacrificados entre las 9:00 y las 10:00 h, por dislocación cervical e inmediatamente fueron disecados el hígado, las glándulas mamarias (pectorales, abdominales e inguinales) y el paquete muscular de la pata trasera izquierda los cuales fueron pesados y colocados inmediatamente en hielo, para preparar con ellos el extracto en donde se determinó la actividad enzimática. A los cadáveres se les eliminaron posteriormente las vísceras, la piel, la cabeza y las patas. El paquete músculo-esquelético restante, denominado "carcaza", fue pesado y conservado en congelación (a -40°C) hasta su uso en la determinación de la composición corporal.

5. Preparación del extracto enzimático.

Después de disecados los 3 tejidos antes mencionados, se les eliminó el tejido conectivo y el graso, así como el hueso en el caso del paquete muscular; los cuales fueron finamente picados con la ayuda de unas tijeras. Se tomaron de 2 a 3 g de la papilla obtenida y fueron primeramente lavados con el amortiguador de Fagan (77), para eliminar pelos, sangre y otros contaminantes. Posteriormente los tejidos fueron homogeneizados en proporción 1:3 (p/v) con el mismo amortiguador que contiene 5 mM de Tris (pH 8), 1 mM de EDTA, 1mM de EGTA, 1 mM de mercaptoeta-nol, 50 µM de quimostatin y 1% de glicerol (todos los reactivos fueron deSigma-Aldrich) utilizando un homogeneizador tipo Polytron marca Tekmar (Cincinnati OH), homogeneizando en tres ocasiones por un tiempo de 1 minuto con interrupciones de 30 segundos entre ellas. Los homogeneizados fueron filtrados a través de organdí, para eliminar los residuos gruesos y posteriormente ajustado su pH a 7.0. Después, las suspensiones fueron centrifugadas a 30 000 x g durante 30 minutos; los sobrenadantes separados y centrifugados a 100 000 x g por 60 minutos (ultracentrífuga Beckman modelo XL-90 y un rotor 80Ti). Al sobrenadante final le fue añadido glicerol frío hasta obtener una concentración final de 20% (1/0.3 v/v). Esta preparación cruda fue utilizada como

fuelle de la enzima y se le llama Extracto Crudo (EC). Todos los pasos fueron realizados a 4°C.

Para conservar la actividad enzimática de los extractos crudos estos fueron dializados toda la noche contra un medio que contenía 20 mM de Tris, 2 mM de ditiotreitól, 10mM de acetato de magnesio, 20 mM de cloruro de potasio y 10 % de glicerol (Sigma Aldrich), para posteriormente congelarlos a -70°C (76).

Para determinar la actividad enzimática en los extractos fue necesario determinar las diluciones adecuadas de cada tipo de tejido y de la situación fisiológica de la rata. Para eso se seleccionaron las siguientes diluciones, presentadas en el cuadro 2:

Cuadro 2. Diluciones utilizadas para la determinación de la actividad enzimática.

Tejido	Estado fisiológico	Dilución
Hígado	Virgen	1:10 o 1:20
	Lactante	1:40
Glándula	Virgen	1:5
	Lactante	1:20 o 1:40
Músculo	Virgen	1:5
	Lactante	1:10 o 1:20

6 Determinación de la actividad proteolítica (proteasomas) dependiente de ubiquitina y ATP.

La actividad proteolítica dependiente de ATP fue medida siguiendo las recomendaciones de Driscoll y Goldberg (85). Para eso se incubaron por 30 min a 38°C y en un volumen final de 1.1 ml los siguientes reactivos: Tris 50 mM, pH 7.8, cloruro de magnesio 10 mM, ditiotreitól 1 mM, adenosina trifosfato (ATP) 2mM y

0.5 mM del sustrato fluorogénico succinil-leucil-leucil-valil-tirosil-4 metil-cumaril-7-amida (sllvt-MCA), (todos los reactivos utilizados son de Sigma-Aldrich). La reacción se inició con la adición de 200 μ l del extracto enzimático. Transcurridos los 30 min, la reacción se detuvo con la adición de 1 ml de etanol absoluto frío. Todas las incubaciones se realizaron por triplicado.

De cada mezcla final fueron tomados 300 μ L y transferidos a los pozos de una placa de plástico de fondo plano para determinar en ellas la fluorescencia liberada empleando un lector de placas (Biotek Instruments, Inc., modelo FL 600) el cual se ajustó a 360 nm como luz de excitación y 440 nm como luz de emisión. Todas las lecturas se interpolaron en una curva patrón de 0 a 40 ng de 4-metil-cumaril-7-amida (MCA) (77).

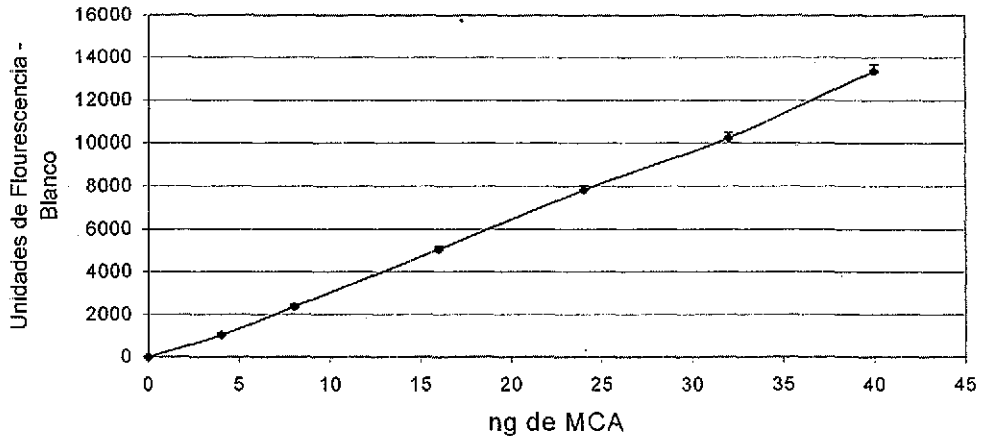
La actividad enzimática se informa como ng de MCA liberada en los 30 min de incubación por cada miligramo de proteína (actividad específica) o bien como los ng de MCA que libera la proteína del órgano en su totalidad (actividad total).

7. Estandarización de la actividad de los proteasomas.

7.1. Curva Estándar de Metil Cumarina.

Se realizaron pruebas de estandarización, primero para probar el equipo, que en este caso se utilizó un lector de placas para fluorescencia. Se realizaron varias pruebas de diferentes concentraciones del MCA encontrándose una sensibilidad de 100 pg, por lo que se utilizó una curva de 0 a 40 ng de MCA. Se muestra en la figura 5 una curva estándar de 0 a 40 ng de MCA. Reportada como Unidades de Fluorescencia (U.F.) – blanco.

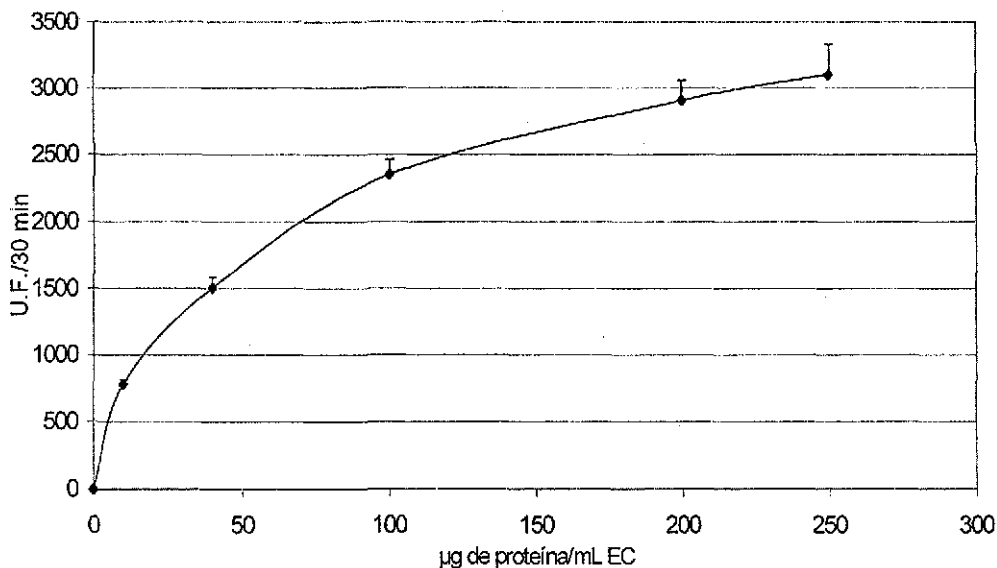
Figura 2. Curva estándar de 0- 40 ng de MCA



7.2. Efecto de la concentración de la enzima.

Se realizaron pruebas de estandarización con diferentes concentraciones de proteína en el extracto crudo, utilizándose para estas pruebas muestras de músculo que contenían desde 10 μg a 250 μg de proteína por ml de extracto crudo (EC). Los ensayos fueron realizados por triplicado y se graficaron en la figura 3. Tomando en cuenta estos resultados se decidió utilizar para los ensayos enzimáticos concentraciones de 50 a 150 μg de proteína/ml de EC, dependiendo de la fuente de esta enzima (Ver cuadro 2, sobre diluciones).

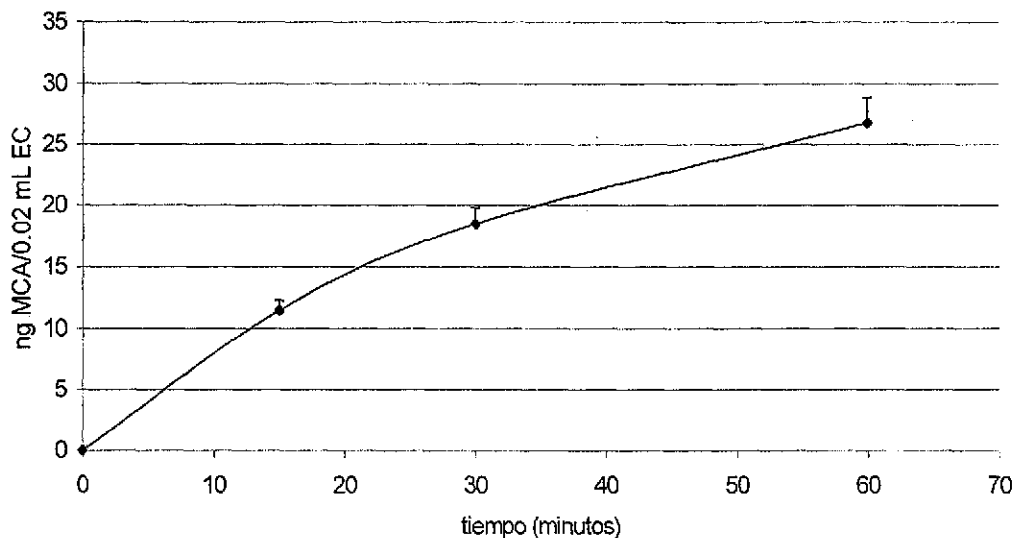
Figura 3. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad de los proteasomas



7.3. Efecto del tiempo de incubación.

Como se muestra en la figura 4, la liberación de MCA es lineal en los primeros 30 minutos, a partir de los 45 minutos de incubación tiende a disminuir por lo que se decidió realizar la incubación de 30 minutos. Por otro lado, para comprobar que nuestro sistema enzimático era dependiente de ATP, se hicieron unas incubaciones en presencia y en ausencia de 2 mM de ATP con 30 minutos de incubación y 0.200 ml de extracto crudo (~ 10 a 30 µg de proteína), presentándose los resultados en el cuadro 3.

Figura 4. Efecto del tiempo sobre la actividad de los proteasomas



7.4. Efecto de la presencia de ATP.

Cuadro 3. ng MCA liberada/0.2 mL EC/30 min

Con 2 mM de ATP	26.5
Sin 2 mM de ATP	11.46

Por todo la anterior las incubaciones se realizaron en las siguientes condiciones: se utilizó $5\mu\text{M}$ de sustrato (S-Ivt-MCA), un pH de 7.0, una concentración de enzima de 50 a $150\mu\text{g}$ de proteína/ ml, una incubación de 30 minutos y en presencia de 2mM de ATP.

8. Determinación del contenido de proteínas.

Para este propósito se utilizó la técnica de Lowry modificada por Hartree (86). Previamente a esta determinación, las muestras de los tejidos fueron diluidas con agua en las siguientes proporciones: 1:400 para el hígado, 1:200 para la glándula mamaria y 1:100 para el músculo. Las muestras de la leche de las ratas fueron diluidas 1:40.

Al volumen seleccionado de cada muestra o de la curva patrón, se le agregó agua suficiente para completar un mililitro. A todos los tubos se les agregó 0.9 ml de una solución de tartrato doble de sodio y potasio (solución A, ver anexo 2) y se incubaron primero 10 min a 50°C y enseguida otros 10 min a 4°C. Al concluir ese tiempo se les adicionaron 0.1 ml de la solución B (sulfato de cobre, B, ver anexo 2) permaneciendo a temperatura ambiente por 10 minutos y al término de los cuales se les adicionaron 3 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:16 v/v con agua, para ser incubados por 10 min a 50° C y al final fueron mantenidos a 4°C por 10 minutos. Después de este tiempo se determinó en cada tubo la absorbancia a 740 nm en un espectrofotómetro (Philips PU8700).

Todas las determinaciones, curva estándar y muestras, fueron realizadas por triplicado. Para elaborar la curva estándar se utilizaron diferentes volúmenes de una solución que contenía 100 µg de albúmina de suero de bovino.

9 Concentración de proteína en el extracto crudo de los tres tejidos.

9.1. Concentración de proteína en el extracto crudo del hígado.

Para los cálculos de la actividad específica de los proteasomas, es necesario determinar la concentración de proteína enzima que existe en cada ml del extracto crudo utilizado para las incubaciones. En el hígado la concentración de proteína, resultó de 15- 21 mg / ml, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los extractos por efecto de la dieta, a excepción del grupo L14KP

que presentó una disminución estadísticamente significativa de proteína comparándolo al grupo testigo virgen.

Cuadro 4. Concentración de proteína en el extracto crudo del hígado.*

	Días de Lactancia		
	1	14	21
LACTANTE			
KP	16.53 ± 2.36	15.64 ± 3.86 ^a	20.19 ± 4.34
NP	17.68 ± 4.33	21.44 ± 7.82	18.61 ± 3.05
VIRGEN			
KP	20.39 ± 3.67	20.74 ± 1.49	15.47 ± 2.14
NP	20.08 ± 5.65	20.27 ± 6.10	19.13 ± 0.07

*mg de proteína por ml de extracto crudo promedio de las determinaciones ± desviación estándar
^a p= 0.03 comparándolo con el grupo virgen KP del mismo día

9.2. Concentración de proteína en el extracto crudo de la glándula mamaria.

La glándula mamaria de las ratas lactantes se encuentran en un metabolismo acelerado de todos los nutrimentos, en los extractos crudos obtenidos de este tejido se encontraron concentraciones de proteína estadísticamente mas altas para el día 1, 14 y 21 del grupo NP, comparado con su respectivo grupo virgen. Para el grupo KP las diferencias significativas fueron para el día 14 y 21, en comparación con sus grupos respectivos vírgenes. No se encontraron diferencias en el contenido de proteína de los extractos crudos de la glándula mamaria por efecto del tipo de alimentación.

Cuadro 5. Concentración de proteína en el extracto crudo de la glándula mamaria.

	Días de Lactancia		
	1	14	21
LACTANTE			
KP	11.57 ± 4.87	12.63 ± 2.90 ^a	17.41 ± 4.6 ^a
NP	9.22 ± 1.13 ^a	12.87 ± 5.36 ^b	12.63 ± 5.09 ^b
VIRGEN			
KP	5.63 ± 2.33	4.53 ± 0.38	6.10 ± 0.85
NP	4.32 ± 0.66	3.84 ± 0.60	4.59 ± 1.04

*mg de proteína por ml de extracto crudo promedio de las determinaciones ± desviación estándar.
^a p= 0.005, ^b p= 0.05. comparándolos con sus grupos testigos vírgenes del mismo día y del mismo tipo de alimentación.

9.3. Concentración de proteína en el extracto crudo del músculo.

El extracto crudo obtenido del paquete muscular presentó concentraciones de 7 a 10 mg de proteína /ml de E.C. cantidades relativamente estables. No se encontró diferencia significativa entre ratas lactantes y las vírgenes en ninguno de los dos tipos de alimentación. Los extractos crudos de las lactantes KP tuvieron mayor concentración de proteína en el día 21 que las testigo

Cuadro 6. Concentración de proteína en el extracto crudo del músculo.

	Días de Lactancia		
	1	14	21
LACTANTE			
KP	8.72 ± 0.41	8.25 ± 1.29	10.73 ± 2.31 ^a
NP	9.49 ± 2.36	10.14 ± 3.02	7.85 ± 1.48 ^a
VIRGEN			
KP	7.53 ± 1.69	8.61 ± 0.74	10.18 ± 0.89
NP	7.85 ± 1.81	6.92 ± 1.98	9.04 ± 1.61

*mg de proteína por ml de extracto crudo promedio de las determinaciones ± desviación estándar.
^a p= 0.02 comparándolos con el grupo lactante con alimentación NP del mismo día

10. Determinación de la composición de la carcaza de las madres.

Las carcazas preparadas y congeladas de la forma en que indicó en la sección 4, fueron descongeladas, molidas con agua en una licuadora y el licuado resultante fue vaciado en una charola de aluminio y colocado en un horno a 100°C hasta lograr su total desecación y obtener un peso constante (carcaza seca). Después de conocer el peso del residuo, este fue molido en un Picatodo (Osterizer) hasta obtener un polvo fino que fue posteriormente conservado en frascos de plástico a 4°C, hasta el momento de su uso.

10.1. Determinación de lípidos.

El contenido de lípidos de las carcazas fue determinado por el método de Soxhlet (87), para lo cual se utilizó 1 gramo del polvo de la carcaza el cual fue depositado en dedales de celulosa (Whatman) que fueron colocados en un extractor de lípidos tipo Goldfish (Labconco). Los lípidos fueron extraídos durante 3 h por reflujo constante con éter dietílico, el disolvente fue posteriormente evaporado y los vasos conteniendo el residuo lipídico fueron colocados en un horno con vacío hasta obtener un peso constante. La diferencia de peso muestra la cantidad de lípidos contenidos en 1 g de carcaza seca. Los datos también pueden ser reportados como los gramos de lípidos contenidos en la carcaza seca total. Las determinaciones fueron hechas por duplicado.

10.2. Determinación de proteínas.

El contenido de proteínas de la carcaza se determinó por el método de Kjeldahl (88). Se pesaron alrededor de 0.02 g del polvo de la carcaza y fueron digeridos a 300° C por 3 horas con 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y 0.50 g de un catalizador de selenio y sulfato de potasio (Kjeltabs, Gerhardt) en una placa de digestión (Digestion system 40, Tecator 1016). El sulfato de amonio formado se hizo reaccionar con hidróxido de sodio formándose amoníaco, el cual se cuan-

tificó por titulación con ácido clorhídrico 0.03N, con la ayuda de un titulador automático (Kjeltec auto sampler system, tecator 1035). Con esta técnica se determina la cantidad de Nitrógeno total el cual debe ser multiplicado por el factor 6.25, para calcular el porcentaje de proteína contenida en la muestra. Todas las muestras se determinaron por duplicado

11 Determinación de la producción de leche.

Se utilizó el método descrito por Godbole et al modificado por Warman y Rasmussen (89,90). El ensayo se inició entre el día 12-13 de lactancia. A la rata se le inyectó por vía intraperitoneal 1 mCi (miliCurie) de agua tritiada y de inmediato se le retiró el bebedero de agua. Una hora después se obtuvo una muestra de sangre de la vena de la cola, la sangre obtenida se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos en una centrifuga clínica (IEC); se tomaron 10 µl de plasma y se depositaron en un vial junto con 10 ml de líquido de centelleo INSTA-GEL (Packard), se determinó la actividad específica del isótopo (en dpm, desintegraciones por minuto) con ayuda de un contador de centelleo (Beckam, modelo LS 6000 LL), conociendo esta radiactividad se le proporcionó inmediatamente a la rata el biberón con agua adicionada de una cantidad suficiente de tritio que permitiera en las horas siguientes mantener el mismo nivel de radiactividad en el plasma de la rata.

24 horas después de la toma de la primer muestra de sangre se tomó una segunda muestra de sangre de la rata madre y una primera de las crías (de 4 crías en promedio, para obtener una muestra representativa de sangre y en cantidad suficiente) que tratada de la misma forma que la sangre de la primera total de la madre, sirvió para calcular los mCi/dl que hay en el plasma de las dos fuentes, se utilizó la siguiente formula:

$$\text{mCi/dl} = \frac{\text{dpm}/10 \mu\text{l}}{2.22 \times 10^9} \times 10^4$$

La producción de leche se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$Fm = \ln \left[\left(\frac{S_{Ac}}{S_{Am}} \times \frac{T_w}{L_w} \right) + 1 \right] \frac{V}{T_w}$$

Donde:

S_{Ac} = Actividad específica en la sangre de las crías (en mCi/dl)

S_{Am} = Actividad específica en la sangre de la madre (en mCi/dl)

L_w = Contenido de agua en la leche (g/ml).

T_w = Agua total a partir de leche = L_w + M_w

M_w = Agua metabólica

F_m = Ingesta diaria de leche de la cría

V = Agua corporal total de la cría. (g)

F_m se multiplicó por el número de crías de cada rata y con ello se determinó la producción diaria de leche por esa rata.

12 Obtención de las muestras de leche.

Las muestras se obtuvieron de las ratas utilizadas en la sección anterior. Para realizar la ordeña única de las ratas; las crías fueron separadas 4 h antes, se les inyectó a las ratas 4 U (unidades) de oxitocina por vía intraperitoneal, cinco minutos después se les inyectó pentobarbital monosódico (35 mg/kg de peso corporal), hasta asegurarnos que la rata estuvo completamente anestesiada y con ayuda de pipetas pasteur y una bombilla de succión, se ordeñaron las 12 tetas de la rata aplicando un masaje manual con movimientos de extracción de adentro hacia fuera; la leche obtenida se depositó en tubos de plástico de 2 ml de capacidad y se guardaron en congelación a -20° C hasta su análisis.

13. Determinación de la composición de la leche.

13.1. Determinación de proteínas.

Las leches se descongelaron a 38° C, se utilizó el método de Lowry modificado por Hartree (86) descrita anteriormente (pag 30).

13.2. Determinación de lípidos.

Los lípidos de la leche se determinaron con una técnica descrita por Folch (91), para la cual se utilizaron 200 μ l de leche se colocaron en tubos cónicos de vidrio, se les añadieron 5.4 ml de una mezcla preparada previamente de cloroformo:metanol en relación 2:1 y 1.8 ml de cloruro de sodio al 0.7% se agitaron vigorosamente y se centrifugaron durante 15 minutos a 2500 x g en una centrifuga refrigerada (J-6B, Beckman Instruments, Inc.), después de finalizado este paso se separó cuidadosamente la parte superior, con ayuda de un sistema de vacío y la fase inferior fue transferida a tubos cónicos graduados (15 ml) los cuales fueron previamente puestos a peso constante. Los tubos fueron colocados en una campana de extracción para evaporar la mezcla de solventes y después de 24 h se colocaron durante una hora en una estufa con vacío para que se logrará la evaporación completa de estos. Después de que alcanzaron su peso constante, los gramos de grasa fueron determinados por gravimetría. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

13.3. Determinación de lactosa

Para la determinación de la lactosa se utilizó una primera hidrólisis por la β -galactosidasa (glucosa+galactosa) y posteriormente fue determinada la concentración de glucosa, por el método de la glucosa oxidasa (92). Para la hidrólisis de las muestras, se depositaron por triplicado y en tubos identificados, 50 μ l de leche problema o 50 μ l de un estándar de lactosa de 40 mg/dl, a los que se les agregó

10 μ l de β -galactosidasa (0.3 U) y 40 μ l de agua bidestilada; se incubaron por 4h a 38°C. En tubos se colocaron 10 μ l del hidrolizado de la muestra y 1 ml del reactivo de la glucosa oxidasa (Trinder-stanbio, Sigma Diagnostics, St Louis, MO). La mezcla se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 500 nm (espectrómetro Philips PU 8720 uv/vis). El contenido de agua fue determinado por gravimetría en una muestra de 100 μ l de leche, el mismo día que fue ordeñada la rata para evitar que variara por efecto de la congelación.

14. Determinación del agua corporal de las crías para el calculo de la producción de leche.

La cantidad de agua corporal se determinó por gravimetría. Después de sacrificar a las crías con exposición al éter, les fue disecado el estomago y la vejiga urinaria y con ayuda de unas tijeras se fraccionó el cuerpo, fue registrado su peso húmedo, fue licuado en una licuadora con 100 ml de agua destilada, el licuado fue colocado en una charola de aluminio previamente pesada y se llevo a sequedad en un horno a una temperatura de 100°C por cuatro días o hasta tener un peso constante; Con la diferencia del peso se determinó el contenido de agua, que fue utilizado para los cálculos de producción de leche.

15 Recolección de los datos

Los datos del consumo de alimento y el peso corporal de la rata madre y de las crías fueron recolectados en unas tarjetas de concentración de datos diseñados para su fácil manejo en el bioterio, identificando a cada rata con un numero.

16. Cálculos.

Todos los datos fueron almacenados en la versión de la hoja de cálculo Excel del paquete Office 98 de Microsoft o en la versión de cuatro Pro de Lotus. Todos los resultados fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. La actividad específica es reportada en ng de cumarina liberada/ mg de proteína/ min.

$$\text{Act especif} = \left[\frac{[(\text{ng MCA} \cdot \text{TR}) / \text{CP}] \cdot \text{dil}}{\text{EC}} \right] / \text{mgP}$$

Donde:

ng MCA= ng de cumarina liberada en 300 μ l de la incubación.

TR = Cantidad total de la reacción.

EC = Cantidad de extracto crudo de la enzima utilizado en la incubación.

CP = Cantidad de producto utilizado para la lectura.

Dil = dilución del extracto enzimático crudo.

MgP = concentración de proteína (mg/ 1ml de EC).

Este resultado se obtiene en 30 minutos de incubación, solo se hicieron los cálculos para reportarlos en cada minuto de incubación. La actividad total se define como la capacidad del órgano total de hidrolizar proteínas mediante los proteasomas, para los cálculos se utilizó el programa excel tomando en cuenta la actividad específica y el peso del tejido, se reporta como μ g de MCA liberada /órgano total /min.

17 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Para los resultados de la actividad enzimática específica y total, los resultados de producción y composición de la leche se empleó la prueba de t de student y una postprueba de Tuckey. En ambos casos se consideró el valor de 0.05 como el nivel mínimo de significancia. Para analizar los cambios de peso de tejidos y actividades tanto específica como total a lo largo de la lactancia se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). El consumo de alimento y el peso corporal de la ratas y de las camadas fueron analizadas por una ANOVA para mediciones repetidas. En todos los casos el análisis estadístico se realizó empleando la versión 10.2 del paquete de Minitab, Inc.

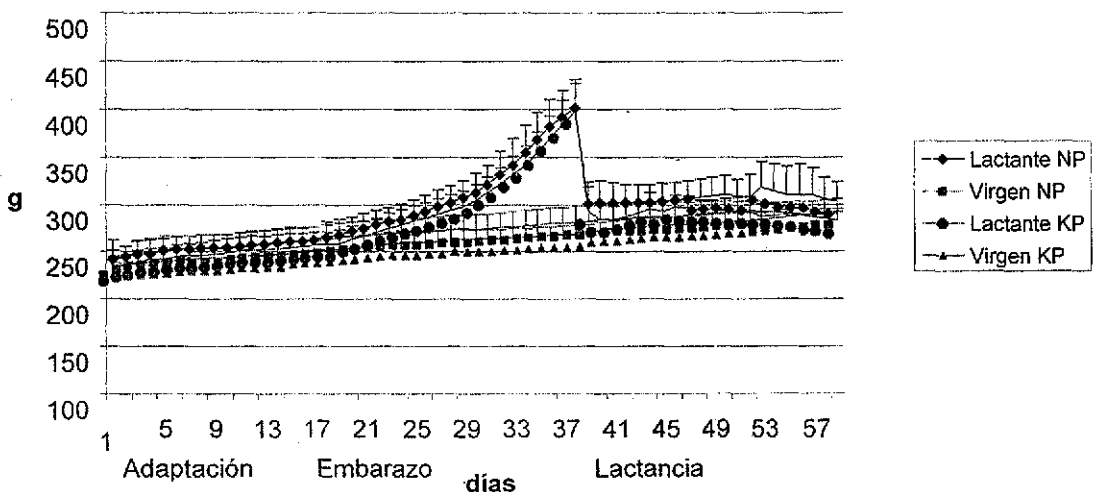
RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES.

1.1. Peso corporal de las ratas durante todo el estudio.

Las ratas fueron seleccionadas a las 14 semanas de edad, iniciando el periodo de adaptación con un peso promedio de 240 g como se muestra en la figura 5, siendo asignadas aleatoriamente a cualquiera de las dietas, ya sea normal (NP) o a la dieta marginal (KP). Durante el periodo de gestación las ratas de los grupos lactantes NP y KP incrementaron su peso de manera similar, siendo mayor el incremento en la tercera semana de la gestación. Para el día del parto (primer día de la lactancia) las ratas de los dos grupos de alimentación disminuyeron en promedio 100 g de su peso corporal, quedando las ratas del grupo lactante NP con un peso ligeramente mayor (20%) al de las ratas KP. Las ratas vírgenes (testigos de ambos grupos) mostraron un aumento continuo en el peso corporal desde el inicio del estudio hasta el día equivalente al día 21 de lactancia, siendo el aumento total cercano al 25% en ambos grupos.

Figura 5 Variaciones del peso corporal



1.2. Ingestión de alimento durante todo el estudio.

Como se observa el Cuadro 7, el tipo de dieta administrada no influyó en la cantidad de alimento consumido acumulado por semana. No se encontraron diferencias en el periodo de adaptación. En las tres semanas de gestación, las ratas gestantes consumieron en promedio, una mayor cantidad de alimento que las vírgenes, sin que la diferencia sea estadísticamente significativa; durante la lactancia las ratas del grupo KP consumieron en promedio, una menor cantidad de alimento en la 2ª y 3ª semana de lactancia. Las ratas lactantes de ambos grupos consumieron una cantidad de alimento estadísticamente mayor al de sus controles vírgenes pareados en edad.

Cuadro 7. Consumo semanal de alimento (g) por las ratas NP y KP.

	Adaptación		Embarazo			Lactancia		
	1ª sem	2ª sem	1ª sem	2ª sem	3ª sem	1ª sem	2ª sem	3ª sem
LACTANTE								
KP	126.22 (16.28)	118.81 (16.94)	126.40 (15.62)	139.55 (21.62)	167.22 (21.74)	217.45 ^a (37.9)	333.39 ^b (36.98)	309.74 ^b (45.00)
NP	112.12 (12.33)	109.59 (21.54)	123.77 (16.56)	127.73 (25.36)	146.93 (25.36)	192.69 ^{a*} (33.58)	345.09 ^{b*} (45.04)	362.88 ^{b*} (37.82)
VIRGEN								
KP	106.64 (10.68)	102.93 (11.51)	105.14 (13.3)	102.97 (13.66)	128.8 (12.5)	114.85 ^a (7.6)	117.8 ^b (14.37)	102.79 ^b (4.12)
NP	115.75 (14.15)	103.46 (17.66)	108.66 (18.16)	101.84 (12.10)	119.07 (15.43)	102.39 ^{a*} (11.45)	107.87 ^{b*} (14.78)	99.95 ^{b*} (15.02)

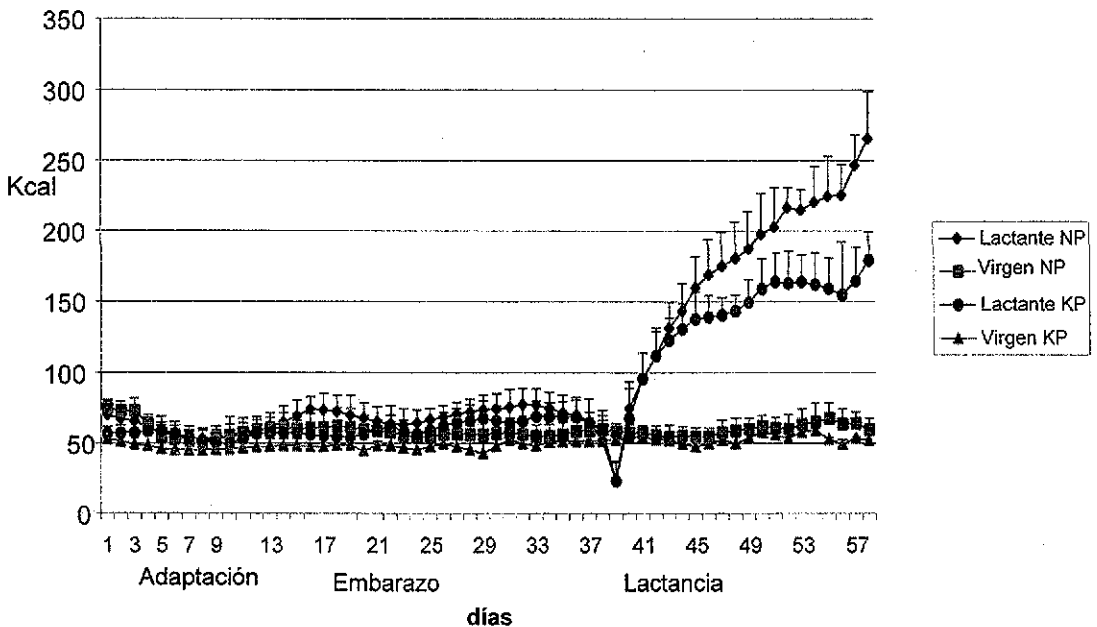
El promedio del consumo semanal es de 7 animales en cada grupo (DE).

Las diferencias se encontraron comparando contra sus grupos testigos Vírgenes del mismo día y de la misma dieta ^{a,a*} $p < 0.001$, ^{b,b*} $p < 0.000$

1.3. Consumo de energía y proteínas de las ratas durante todo el estudio.

Si se recuerda, la composición de la dieta experimental (KP) es 18% baja en energía y proteína en comparación de la dieta control (NP), esto afecta la ingestión teórica de energía como se presenta en la figura 6, donde se comprueba que las ratas KP tanto vírgenes como lactantes consumen menos cantidad de energía que las ratas vírgenes y lactantes NP respectivamente; esta diferencia se acentúa en los grupos lactantes entre los dos grupos de alimentación, porque es en este período donde las ratas con alimentación normal (NP) tienen un aumento mayor en el consumo de energía que las ratas con la alimentación marginal (grupo KP).

Figura 6. Consumo diario de energía de las ratas NP y KP.



Cuando se calcula la cantidad de energía consumida por semana, se observa que desde las dos semanas de adaptación hay una ligera disminución en la cantidad de energía consumida de los grupos KP en comparación con los grupos NP, y que durante el embarazo es hasta del 20 % menor para los grupos

KP. En la segunda semana de lactancia el consumo de energía del grupo KP es un 20% menor al grupo control. En la tercera semana el grupo NP alcanza un consumo semanal de 1397 Kcals, mientras que para el grupo KP es 30% menos. Como se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Consumo de energía (Kilocalorías) por semana

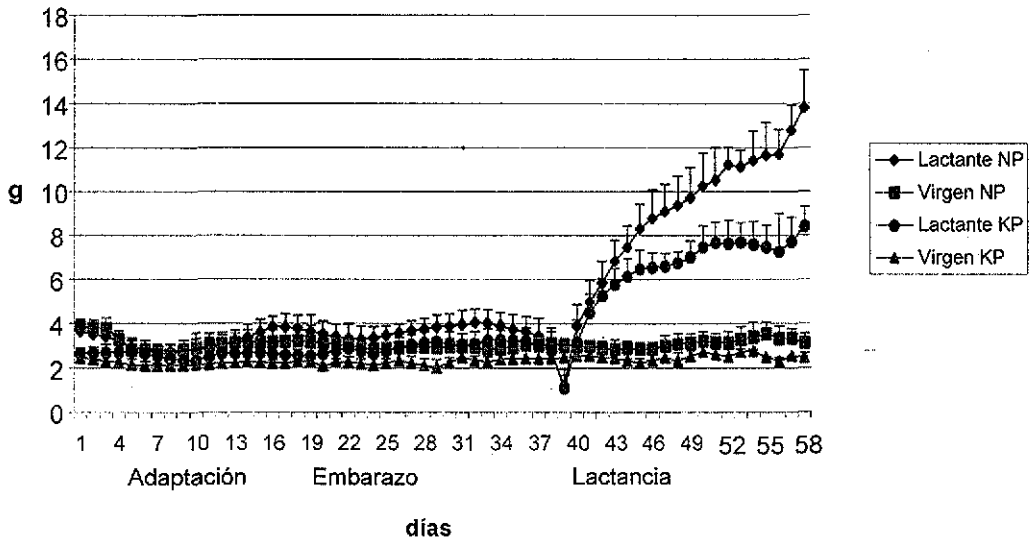
	Adaptación		Embarazo			Lactancia		
	1ª sem	2ª sem	1ª sem	2ª sem	3a sem	1a sem	2a sem	3a sem
LACTANTE								
KP	401.27 (51.73)	377.71 (53.83)	401.84 (49.64)	443.63 (68.71)	531.59 (69.09)	691.26 (120.45)	1059.85 (117.52)	984.64 (143.01)
NP	431.67 (47.47)	421.92 (82.93)	476.51 (63.76)	491.76 (97.64)	565.68 (97.64)	741.86 (129.28)	1328.59 (173.40)	1397.1 (145.61)
VIRGEN								
KP	339.01 (33.94)	327.21 (36.58)	334.23 (42.26)	327.33 (43.41)	409.46 (39.72)	365.12 (24.15)	374.48 (45.67)	326.77 (13.09)
NP	445.65 (54.47)	398.33 (67.99)	418.34 (69.92)	392.10 (46.58)	458.41 (59.40)	394.20 (44.08)	415.32 (56.90)	384.8 (57.83)

El Promedio es del consumo de 7 animales por cada grupo (DE)

En la figura 7 se muestra la cantidad de proteína en gramos consumida por los diferentes grupos de estudio; las ratas del grupo NP desde el periodo de adaptación consumieron alrededor de 3.5 g diarios/animal, las ratas no embarazadas (grupo virgen) mantuvieron su consumo de proteína muy constante similar a las ratas del grupo que cruzaron por la gestación, pero en el momento de mayor demanda (día 14 de lactancia) la rata consume alrededor de tres veces mas (11 gramos al día) y para el día 21 que es el día final de la lactancia consume teóricamente 14 g al día. Por el contrario, las ratas del grupo KP, que en cantidad de alimento consumido igualaron al grupo control (NP), en la cantidad de proteína

siempre fue menor la ingerida por las ratas de los grupos de la alimentación marginal que va del 20 al 30% comparada con el control. Para las ratas vírgenes el consumo diario de proteína fue alrededor de 2.5 g. Para las ratas lactantes KP el día 14, consumieron en promedio 7.6 g, que corresponde al 70 % de proteína consumida por una rata igualmente lactante pero con alimentación normal, Para el día 21 el grupo de lactantes KP ingirieron 8.4 g de proteína que corresponde al 40% menos de la cantidad consumida por el grupo lactante control. Además que aquí se afirma que los animales experimentales realmente están consumiendo la dieta marginal en energía y proteína, se recuerda que además la dieta experimental contiene solo en un 30% de la proteína total de proteína de alto valor biológico como es la caseína, y el 70% corresponde a proteína vegetal extraída del gluten de trigo.

Figura 7 Consumo diario de proteínas de las ratas NP y KP.



2. COMPOSICION CORPORAL DE LAS RATAS DURANTE LA LACTANCIA Y EL EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN MARGINAL.

La carcaza es el tejido músculo esquelético completo del cual se reporta la composición química. En el cuadro 9 se presenta el peso de la carcaza libre de agua. Todas las siguientes determinaciones están referidas a este peso seco total, donde encontramos que se presenta diferencia significativa en las ratas vírgenes al primer día de lactancia por efecto de la dieta siendo menor el peso seco de las ratas KP y en las ratas lactantes se presenta esta diferencia al día 14 siendo menor el peso para las ratas KP. La lactancia tuvo mayor efecto en el peso seco de la carcaza de las ratas, ya que tanto para las NP como para las KP a partir del 14 día de lactancia se presento reducción de peso.

Cuadro 9 Peso seco de las carcazas de las ratas.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	35.10 ± 1.94 ^{a*}	33.04 ± 2.10 ^{a**,b}	31.31 ± 1.57 ^{b**}
NP	37.01 ± 3.51	36.43 ± 3.71 ^{a**,c}	31.88 ± 5.84 ^{b*}
Virgen			
KP	32.82 ± 1.98 ^{a*,a}	40.78 ± 5.99 ^b	42.03 ± 4.87 ^{b**}
NP	36.99 ± 3.68 ^a	41.56 ± 3.59 ^c	39.56 ± 1.71 ^{b*}

Promedio (gramos) ± (DE) de 8 ratas por grupo

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí
^{a, a*, a**} P = < 0.05 ^{b, b*, b**} P < 0.005 ^c P = 0.01. t de student y pos prueba.

2.1 . Contenido de lípidos en la carcaza y su movilización durante la lactancia.

El comportamiento de los lípidos corporales en los grupos vírgenes es similar a otros patrones ya conocidos (51-52), que con el paso del tiempo el contenido de lípidos en la carcaza va siendo mayor estos grupos, es decir hay una mayor aposición de grasa. En los días pareados en edad 14 y 21, las ratas vírgenes con la dieta marginal (KP) tuvieron menor cantidad de lípidos que las alimentadas con la dieta testigo (NP) pero sin alcanzar a ser estadísticamente significativos (valor de p de 0.21 y 0.06).

Los dos grupos de ratas lactantes, tanto NP como KP iniciaron la lactancia con una cantidad similar de lípidos en la carcaza (6.6 y 6.3 g, respectivamente). Del inicio al día 14 de lactancia, el grupo de ratas alimentadas con la dieta marginal tuvo una pérdida de lípidos corporales de 1 g, mientras que las del grupo con alimentación NP no presentó ninguna pérdida; por lo que en comparación hasta este momento (día 14 de la lactancia) la cantidad de lípidos presentes en la carcaza de las ratas es menor para las ratas KP con un valor de significancia de 0.0002.

Para el día 21 de la lactancia , que corresponde al ultimo de este periodo las ratas con alimentación marginal terminan con un contenido de lípidos de 4.7 g, aproximadamente 500 mg menos que el día 14; pero las ratas con alimentación NP presentaron 4.6 g de lípidos. Es decir los dos grupos de ratas lactantes perdieron la misma cantidad de lípidos, pero en diferente momento de la lactancia, mientras las ratas KP manejan al inicio los lípidos disponibles, el grupo control los utilizo en la segunda parte de la lactancia. Aun con la dieta marginal las ratas no perdieron una cantidad adicional de lípidos de su carcaza lo que posiblemente indica un límite en la utilización de los lípidos del músculo. También las ratas lactantes a partir de día 14 tuvieron menor cantidad de lípidos que sus controles vírgenes en los dos grupos de alimentación, lo que hace suponer que la lactancia condiciona a la pérdida de lípidos independiente del tipo de alimentación.

Cuadro 10. Contenido de lípidos totales (g) en la carcaza de las ratas NP y KP.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	6 252 ± 0.723	5 264 ± 0.691 ^{b, a*}	4 740 ± 0.949 ^{b*}
NP	6.647 ± 0.545	7.184 ± 0.795 ^b	4.587 ± 1.262 ^{b**}
Virgen			
KP	6.019 ± 0.761 ^a	7.205 ± 1.71 ^{a*}	7.692 ± 1.595 ^{b*}
NP	7 033 ± 0.468 ^a	8.156 ± 1.116	9.075 ± 1.057 ^{b**}

Promedio (gramos) ± (DE) de 8 ratas por grupo.

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí.
^{a, a*} P < 0.01, ^{b, b*, b**} P < 0.001 t de student y pos prueba.

2.2. Contenido de proteínas en la carcaza de la rata.

Las proteínas contenidas en la carcaza de las ratas del estudio se presentan en el cuadro 11, se encontró que las ratas vírgenes del grupo de alimentación KP no tuvieron diferencia significativa con el grupo virgen NP los días 14 y 21; pero en el primer día se presentó menor cantidad de proteína en su carcaza. El grupo lactante con la dieta experimental (KP) presentó una mayor cantidad de proteína que el NP al inicio de la lactancia (22.76 vs 20.3 g), y mayor que la contenida en la carcaza de la rata virgen del mismo grupo experimental (22.76 vs 17.6 g). Al día 14 de lactancia las ratas KP tienen menor cantidad de proteína que las NP y el grupo KP tiene un contenido de proteína significativamente menor ($p= 0.051$) que su testigo virgen. Esta observación corresponde al día de máxima producción de leche y al día de mayor demanda de las proteínas.

Al final de la lactancia, las ratas de los dos grupos de alimentación (tanto KP como NP) tuvieron la misma proteína contenida en su carcaza sin que se presentaran diferencias significativas.

Se considera una pérdida de proteína al día 14 de lactancia para el grupo experimental KP.

Cuadro 11. Contenido de proteínas totales (g) en la carcaza de las ratas NP y KP.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	22.76 ± 1.22 ^{b,b*}	20.54 ± 3.31 ^{a*}	22.60 ± 2.71
NP	20.34 ± 1.53 ^b	21.83 ± 3.04	21.88 ± 0.87
Virgen			
KP	17.61 ± 3.41 ^{a,b*}	23.89 ± 2.37 ^{a*}	23.78 ± 2.12
NP	21.12 ± 2.96 ^a	23.86 ± 2.93	22.13 ± 1.43

Promedio (gramos) ± (DE) de 8 ratas por grupo

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí.

a, a* P < 0.05, b, b*, b** P < 0.005. t de student y pos prueba

3. PESO DE LOS TEJIDOS DE LAS RATAS.

3.1. Peso húmedo del hígado.

Las ratas vírgenes de los dos grupos de alimentación NP y KP, presentan un peso del hígado de alrededor de 9 g, el cual no varió a lo largo del estudio. Para las ratas lactantes KP se presenta un incremento del peso del hígado a lo largo de la lactancia, empezando al día 1 con un peso de 11.5 g en promedio al día 14 aumentó 2 g y para el día 21 se reporta un peso en promedio de 14.3 g. En el grupo lactante NP, el hígado aumentó su peso del primer día de lactancia al 14, al final de la lactancia volvió a disminuir. En la lactancia, la atrofia del hígado es una adaptación fisiológica que se lleva a cabo para cubrir en su mayoría la demanda necesaria de nutrimentos; se presentó en los dos grupos de alimentación, sin que la alimentación marginal ocasione una atrofia mayor de dicho órgano. El peso de este tejido es mayor para las ratas lactantes del grupo NP y KP en comparación con sus respectivos grupos vírgenes en el día 14.

Cuadro 12. Peso del hígado de las ratas vírgenes y lactantes KP y NP.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	11.5 ± 1.04 ^b	13.6 ± 1.5 ^{a*}	14.3 ± 1.9 ^{a***}
NP	10.3 ± 2.4	14.9 ± 0.9 ^a	12.8 ± 2.6
Virgen			
KP	9.0 ± 1.1 ^b	9.3 ± 0.1 ^{a*}	9.8 ± 0.3 ^{a***}
NP	9.9 ± 0.5	9.3 ± 1.4 ^a	9.6 ± 1.4

Promedio (gramos) ± (DE) de 8 ratas por grupo.

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí.

^{a, a*, a***} P < 0.001, ^b P < 0.005 por t de student y pos prueba.

P < 0.005 por ANOVA de 1 vía, para los grupos lactantes NP y KP.

3.2. Peso húmedo de la glándula mamaria

En las ratas vírgenes el peso de la glándula mamaria corresponde al 2-3% del peso corporal total de las ratas. En el peso de la glándula mamaria en las ratas de este estudio del grupo V1, V14 y V21 no se encontró ningún cambio por efecto del tipo de alimentación recibida; pero sí entre los días de lactancia comparándose por anova de 1 vía. Siendo la glándula mamaria en este periodo el tejido mas importante para la síntesis y secreción de la leche, esto se refleja en su peso ya que las ratas lactantes presentan un peso de este tejido significativamente mayor que las ratas vírgenes (con valores de significancia de 0.01 a 0.0001); esta diferencia se observó entre las ratas de los dos grupos de alimentación. No se encontraron diferencia cuando se trató de la misma condición y diferente dieta.

Cuadro 13. Peso húmedo de la glándula mamaria de las ratas vírgenes y lactantes KP y NP.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	17.0 ± 3.5 ^c	18.5 ± 3.1 ^{c*}	20.3 ± 3.6 ^{b**}
NP	20.5 ± 2.1 ^b	20.4 ± 1.7 ^{b*}	17.8 ± 4.8 ^{a**}
Virgen			
KP	7.3 ± 0.6 ^c	9.2 ± 1.1 ^{c*}	9.6 ± 0.8 ^{b**}
NP	7.17 ± 1.5 ^b	9.41 ± 2.6 ^{b*}	9.82 ± 0.8 ^{a**}

Promedio (gramos) ± (DE) de 8 ratas por grupo.

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí

^{a**} P < 0.01, ^{b, b*} P < 0.001, ^{c, c*} P < 0.005 por t de student y pos prueba

3.3. Peso húmedo del paquete músculo esquelético.

Se tomó como peso del paquete muscular la carcaza completa de la rata, y como se observa en el cuadro 14; Por los valores de p al compararse los grupos de alimentación tanto lactantes y vírgenes no hay diferencia significativa alguna, aplicando la prueba de "t" de student y la prueba de anova de una vía

Cuadro 14. Peso húmedo del paquete muscular de las ratas vírgenes y lactantes KP y NP.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	113.6 ± 13	115.4 ± 3.6	113.9 ± 6.3
NP	113.2 ± 7.6	121.8 ± 5.7	125.1 ± 16.5
Virgen			
KP	112.3 ± 9.9	114.5 ± 7.5	122.2 ± 4.5
NP	121.6 ± 9.5	113.5 ± 12.4	119.3 ± 27.6

Promedio (gramos) ± (DE) de 8 ratas por grupo

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí.

4. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LOS PROTEASOMAS EN TRES TEJIDOS EN RATAS VÍRGENES Y LACTANTES.

4.1. Actividad específica en el hígado de las ratas.

La actividad específica de una enzima es la capacidad que tiene está de actuar en un sustrato y convertirlo en producto, en una unidad de tiempo, por mg de proteína. En este caso es hidrolizar el polipéptido S-Ivt-MCA y liberar el compuesto fluorogénico MCA. Los proteasomas en el hígado (cuadro 15) presentan diferencia en su actividad por efecto de la dieta en ratas lactantes en el día que coincide con la máxima producción de leche (L14), presentándose la mayor actividad en las ratas del grupo KP y también se encuentra diferencia entre este grupo L14 KP y su virgen KP.

Cuadro 15. Actividad específica de los proteasomas en el hígado.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	44.89 ± 11.1	96.0 ± 21.4 ^{a,b*}	59.2 ± 10.7
NP	46.16 ± 7.6	24.6 ± 6.8 ^a	58.18 ± 10.6
Virgen			
KP	42.2 ± 6.6	44.76 ± 24.8 ^{b*}	78.36 ± 9.5 ^b
NP	48.9 ± 5.5	26.54 ± 3.6	51.33 ± 13.8 ^b

Promedio (ng de MCA /mg de prot /min) ± DE de 8 ratas por grupo.
 Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí
^a P<0.000, ^{b,b*} P<0.05 Por t de student y pos prueba

A lo largo de la lactancia tanto en el grupo NP como KP se encuentran diferencias significativas (análisis de varianza de una vía). Se observa que la

actividad específica en el hígado al día 1 y 21 de lactancia son del mismo orden para los dos tipos de alimentación (NP/KP) y es exactamente al día 14 (día de máxima producción de leche) que tienen comportamientos contrastantes, mientras que la actividad para las ratas NP disminuye significativamente, para las ratas KP aumenta cerca del 100%.

En la actividad específica del hígado, para las ratas KP se presenta un aumento gradual y estadísticamente significativo ($P < 0.05$). Las ratas vírgenes presentan una disminución en la actividad del día 14 en el grupo NP y un aumento en la actividad el día 21 en el grupo de experimentación. Entre tipo de alimentación se reportan diferencias significativas en las ratas vírgenes los días 1 y 21.

4.2. Actividad específica en la glándula mamaria de las ratas.

La actividad específica calculada en la glándula mamaria se presenta en el cuadro 16. Con base a los resultados de nuestro estudio podemos mencionar que las ratas vírgenes en comparación con las lactantes, mantienen este tejido mamario casi inactivo, porque se presentó una actividad específica basal en las ratas vírgenes de los dos grupos de alimentación (NP/KP) similar de 7 a 16 ng de MCA liberada /mg de proteína /min, sin que se presentara diferencia significativa a lo largo de este periodo.

En el cuadro 16 se muestran las diferencias entre los grupos lactantes de los dos tipos de alimentación, en los días 14 y 21 de lactancia. La actividad específica de los proteasomas en la glándula mamaria de las ratas lactantes NP tiene un incremento del día 1 al día 14 del 200%, para mantenerse hasta el día 21; en las ratas lactantes KP se presenta el primer día una actividad similar a su grupo testigo (NP) del mismo día y similar a los grupos vírgenes, pero tiene un incremento del 300% para el día 14 y tiene el mismo comportamiento que las NP, ya que de igual manera se mantiene al día 21. Además que la mayor actividad específica determinada se presenta en este tejido y en este día.

Cuadro 16. Actividad específica de los proteasomas en la glándula mamaria.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	17.06 ± 7.7	51.33 ± 8.89 ^a	51.58 ± 7.7 ^{a*}
NP	15.64 ± 1.7	30.52 ± 5.8 ^a	37.55 ± 8.1 ^{a*}
Virgen			
KP	12.44 ± 3.27	14.00 ± 6.87	7.06 ± 2.56
NP	16.60 ± 6.4	14.01 ± 8.71	7.93 ± 1.10

Promedio (ng de MCA /mg de prot /min) ± DE de 8 ratas por grupo.
 Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí
^{a, a*} P<0.001. Por t de student y pos prueba

4.3. Actividad específica de los proteasomas en el músculo.

El músculo como probable reserva de proteínas, en las ratas vírgenes NP y KP, mantienen una actividad específica de 10 a 20 ng de MCA liberada / mg de proteína / min, a lo largo del estudio (V1,V14,V21) que podría deberse al constante recambio de proteínas sin que se encuentren diferencias significativas entre ellas (Anova de 1 vía). Cuando se comparan las vírgenes con las lactantes se encontraron diferencias significativas en NP al día 14 (p=0.002) y en las KP al día 14 V/L (p=0.001). Los días que este tejido presenta mayor actividad es el 14 tanto en las ratas alimentadas con la dieta NP como las KP. Por efecto de la dieta en las ratas vírgenes no se encontraron diferencias significativas.

Las ratas del grupo NP que atraviesan por el periodo de lactancia presentan la máxima actividad específica en el músculo al día 14, siendo estadísticamente significativa en comparación con los otros días en que se realizó esta medición.

Para las ratas con alimentación marginal (KP) se muestra que su máxima actividad específica se lleva a cabo el día 14 de la lactancia, presentándose

diferencia significativa en comparación con los días 1 y 21 de lactancia, analizado con un Anova de 1 vía.

Los grupos testigos, sirven para observar el efecto de algunos cambios no controlados que pueden intervenir o no en las lecturas. Parece ser que el músculo es un tejido donde no se afecta de manera significativa la actividad específica por algún error que no se pudiera controlar.

Cuadro 17. Actividad específica de los proteasomas en el músculo.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	24.67 ± 5.07	32.84 ± 7.7 ^b	25.85 ± 9.52
NP	21.83 ± 8.4	46.66 ± 16.5 ^a	23.03 ± 5.02
Virgen			
KP	17.24 ± 4.19	10.33 ± 3.58 ^b	21.16 ± 2.8
NP	20.16 ± 2.73	15.42 ± 7.65 ^a	15.63 ± 6.9

Promedio (ng de MCA /mg de prot /min) ± DE de 8 ratas por grupo.
 Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí.
^aP < 0.002, ^bP < 0.001. Por t de student y pos prueba.

5. ACTIVIDAD TOTAL DE LOS PROTEASOMAS EN LOS TEJIDOS DE LAS RATAS.

5.1. Actividad total en el hígado.

En el cuadro 18, se presentan los valores de la actividad en el hígado total de los proteasomas; se encontraron diferencias significativas por el tipo de alimentación (NP/KP) en las ratas lactantes al día 1 y 14 siendo mayor la actividad en los hígados de las ratas alimentadas con la dieta marginal. En las ratas vírgenes se encuentra que estas tienen actividades de 16 a 38 μg de MCA liberada por minuto; en el grupo de las vírgenes KP, la actividad se encuentra a lo largo del estudio estable sin que se presente diferencia significativa por un análisis de varianza de una vía ($p=0.81$) y para las vírgenes NP se encontró un valor alto en las vírgenes de 1 día comparándolo con el día 14 y 21 ($p=0.000$).

Cuadro 18. Actividad total de los proteasomas en el hígado de las ratas vírgenes y lactantes KP y NP.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	16.9 \pm 4.16 ^{ab}	31.2 \pm 10.1 ^{***}	29.9 \pm 14.4
NP	9.61 \pm 1.86 ^{a,a*}	44.5 \pm 13.7 ^{***,c}	24.4 \pm 7.25
Virgen			
KP	24.3 \pm 7.11 ^{a*,b}	23.0 \pm 12.4	26.9 \pm 3.25
NP	38.8 \pm 6.61 ^{a*,a*}	16.7 \pm 2.82 ^c	25.5 \pm 4.19

Promedio (μg de MCA /órgano total /min) \pm DE, de 8 ratas por grupo.

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí.

^{a,a*} $P < 0.0001$, ^{***} $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$, ^{a*,c} $P < 0.05$ Por t de student y pos prueba.

Las ratas lactantes solo aumentan su actividad del día 1 de lactancia al día 14 y es aquí donde se encuentra la mayor actividad de los proteasomas (L14) en el hígado. Las diferencias entre vírgenes y lactantes del mismo tipo de alimentación se presentaron en el grupo de NP al día 1 y el día 14; Para el grupo KP solo al día 1 de lactancia entre el grupo lactante y su control virgen ($^b P < 0.001$).

Este órgano que tiene la capacidad de administrar y regular el anabolismo y el catabolismo de proteínas, en la lactancia presenta como respuesta un ajuste en la actividad enzimática dependiente de ATP (proteasomas) disminuyendo la hidrólisis de proteína al inicio de la lactancia (L1),

Pero las ratas con alimentación marginal parece que no pueden bloquear esta disminución ya que no bajan los proteasomas a su actividad como las ratas NP, para el día 14 se ve un aumento considerable y significativo de la hidrólisis de las proteínas relacionándose con la mayor demanda de aminoácidos para la producción de leche y para el día 21 ya se encuentra normalizada la actividad enzimática con valores similares a los encontrados en las ratas que no están sometidas al estrés de la lactancia.

5.2. Actividad total en la glándula mamaria.

La glándula mamaria de las ratas vírgenes tiene una actividad "basal" de 0.8 a 1.6 μg de MCA liberada por minuto, sin existir diferencia significativa entre los días V1, V14 y V21 de ratas alimentadas con la misma dieta (NP o KP), Por un análisis de varianza de una vía ($P > 0.05$). Donde si se encontró una diferencia significativa ($p = 0.049$) en la actividad total de la glándula mamaria fue entre las ratas vírgenes al día 14 del grupo NP vs las ratas alimentadas con la dieta KP de esta misma condición. Como era de esperarse desde el día 1 de lactancia este tejido se vuelve mas activo, para las ratas L1 NP aumenta su actividad total a 3.55 μg de MCA liberada, con respecto a su control virgen y sin que presente diferencia significativa con la actividad total de la glándula mamaria de las ratas del grupo

alimentado con la dieta KP, aun cuando este ultimo aumentó ligeramente mas su actividad total (5.6µg de MCA liberada).

Cuadro 19. Actividad total de los proteasomas en la glándula mamaria de las ratas vírgenes y lactantes KP y NP.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	5.6 ± 1.81 ^c	27.9 ± 7.32 ^{a, c*}	42.7 ± 13.3 ^{b, d}
NP	3.55 ± 2.2	22.3 ± 3.7 ^{a, c**}	8.93 ± 1.7 ^{b, d*}
Virgen			
KP	1.53 ± 0.39 ^c	1.54 ± 0.60 ^{a*, c*}	1.08 ± 0.15 ^d
NP	1.66 ± 0.7	0.81 ± 0.4 ^{a*, c**}	1.02 ± 0.3 ^{d*}

Promedio (µg de MCA /órgano total /min) ± DE, de 8 ratas por grupo
 Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre si.
^{a, a*} P<0.05, ^{b, c*, c**, d} P = 0 0001; ^{c, d*} P= 0.0002. Por t de student y pos prueba

Como se observa en el cuadro 19, el día 14 de lactancia las ratas tanto NP como KP aumentaron su actividad total en la glándula, siendo significativo este aumento. Las ratas KP en relación con NP para este día presentó mayor actividad, teniendo un valor de p de 0.027.

Hacia el final de la lactancia, el grupo NP disminuye la actividad total que presentaba el día de máxima producción de leche (L14), mientras que para el grupo KP aumenta aun mas la actividad total presentada al día 14. Se puede pensar que son los proteasomas que el día 21 de lactancia, realizan un esfuerzo adicional, hidrolizando proteínas de la misma leche, ya que no se relaciona este aumento de actividad con regresión de tejido (peso del tejido).

5.3. Actividad total en el músculo.

El músculo ha sido considerado por muchos autores el reservorio de proteína que pudiera ser utilizado en cualquier condición de estrés que induzca al catabolismo de estas; pero esto no siempre es cierto, sobre todo si se considera el cuadro 20 para discutirlo. Ya que se presenta la actividad total de las ratas alimentadas con la dieta normal a los días que corresponderían en edad a la lactancia del día 1, 14 y 21 (vírgenes) con valores de 34 µg de MCA liberada por minuto, como la actividad basal de la hidrólisis "normal" del recambio de proteínas musculares. Se observa para las ratas alimentadas con la dieta marginal una hidrólisis menos estable pero en el rango presentado para las NP. Sin que existan diferencias significativas por el tipo de dieta.

Cuadro 20. Actividad total de los proteasomas del músculo esquelético en las ratas vírgenes y lactantes KP y NP.

	Días		
	1	14	21
Lactante			
KP	63.7 ± 21.0 ^c	54.8 ± 16.0 ^{a, c}	45.5 ± 13.5 ^{a*}
NP	52.2 ± 12.2 ^a	95.9 ± 21.2 ^{a, b}	28.2 ± 3.70 ^{a*}
Virgen			
KP	30.2 ± 7.21 ^c	26.5 ± 9.52 ^c	48.1 ± 6.37
NP	32.4 ± 8.50 ^a	34.8 ± 6.00 ^b	35.7 ± 9.60

Promedio (µg de MCA /órgano total /min) ± DE, de 8 ratas por grupo

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí.

^a P < 0.005, ^{a*} P < 0.0005, ^b P < 0.0001, ^{a, c, c*} P < 0.001 Por t de student y pos prueba

La actividad total del tejido muscular de las ratas de los dos grupos de alimentación (NP/KP) durante los tres días claves de la lactancia tienen respuesta diferentes, se observa que el primer día de la lactancia tienen un aumento con respecto a sus grupos vírgenes de manera significativa (ver pie de notas del cuadro 20). Sin que se presente esta diferencia por el tipo de alimentación que recibieron.

En el día 14, la actividad es mayor significativamente en el grupo de las ratas NP, y se ve disminuida casi a rangos basales para el día 21, mientras que en los grupos KP, se va observando una disminución significativa entre L1 y L14 y L21 (ANOVA reporta diferencia significativa, $p < 0.05$), pero eso sí siempre la actividad total por arriba de los valores encontrados en sus controles vírgenes, excepto al día 21, donde se encontró para las ratas V21KP un valor alto.

6. PRODUCCIÓN DE LECHE Y DE NUTRIMENTOS AL DÍA 14 DE LACTANCIA.

El período de máxima producción de leche es entre los días 12-14 de lactancia; en esos días se realizó esta medición y se encontró una producción en las ratas alimentadas con la dieta NP de 48.5 mL mientras que para las ratas KP la producción fue 16% menor, esta diferencia es estadísticamente significativa entre los dos grupos. La producción diaria de nutrientes se calculó considerando la cantidad de leche producida y la composición de esta mostrando una idea de la cantidad diaria de proteínas, lípidos e hidratos de carbono que son utilizados para producir leche; encontrándose que las proteínas y la lactosa es significativamente menor para los grupos KP en comparación por la prueba de "t" con el grupo de las ratas alimentadas con la dieta NP, la energía vertida a la leche por día es significativamente mas alta para el grupo NP en casi un 14%. Los lípidos producidos para la leche son ligeramente mayor para el grupo de las ratas KP que para las del grupo NP, sin tener diferencia estadística.

Cuadro 21. Volumen de leche producida y los macronutrientes y energía producidos para la leche.

	Volumen (mL/día)	Proteínas (g/día)	Lípidos (g/día)	Lactosa (g/día)	Energía (Kcal/día)
Lactante					
KP	41.1 ± 6.00 ^a	4.1 ± 0.92 ^b	6.1 ± 1.23	0.86 ± 0.1 ^c	74.9 ± 13.9 ^d
NP	48.5 ± 5.48 ^a	7.7 ± 1.29 ^b	5.7 ± 0.45	1.2 ± 0.24 ^c	87.2 ± 11.4 ^d

Promedio ± DE, de 10 ratas por grupo.

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre si

^aP < 0.01, ^bP < 0.0001, ^cP < 0.001, ^dP < 0.05 Por t de student y pos prueba.

7. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE.

Las ratas alimentadas con la dieta KP (marginal), además de mostrar una producción 16% menor que las ratas NP, mostraron en la composición de su leche cambios como la disminución en la concentración de sus proteínas que se ven afectadas en un 36 %, bajando la concentración de 15.82 g/dL en la leche de las ratas NP vs 10.14 g/dL encontrados en la leche de las ratas que recibieron su dieta marginal (KP). Los lípidos por el contrario tuvieron su concentración mas alta en la leche de las ratas KP en un 21 % en comparación con la concentración encontrada en la leche de las ratas NP, lo anterior hace que la densidad energética de la leche sea estadísticamente significativa mayor para este grupo con alimentación marginal. La cantidad de lactosa encontrada en la leche NP fue ligeramente mayor que en el grupo KP encontrándose diferencias significativas comparándolo con una prueba de "t".

Cuadro 22. Composición química de la leche al día 14 de la lactancia.

	Volumen (mL/día)	Proteínas (g/dL)	Lípidos (g/dL)	Lactosa (g/dL)	Energía (Kcal/dL)
Lactante					
KP	41.1 ± 6.0 ^a	10.1 ± 1.55 ^b	14.8 ± 1.1 ^c	2.1 ± 0.05 ^d	182.5 ± 13.4
NP	48.5 ± 5.48 ^a	15.8 ± 1.84 ^b	11.8 ± 0.5 ^c	2.46 ± 0.4 ^d	179.43 ± 7.1

Promedio ± DE, de 10 ratas por grupo.

Los valores que tienen el mismo superíndice están comparados entre sí.

^a P= 0.01, ^b P= 0.0001, ^c P= 0.0000, ^d P= 0.02

8. CRECIMIENTO DE LAS CRÍAS DEL NACIMIENTO HASTA EL DÍA 21 DE LACTANCIA.

La dieta experimental que ofrecimos a un grupo de ratas (KP), no presentó diferencias en su tasa de natalidad, ni en el éxito de sus embarazos. Se observa en el cuadro 23, que los promedios del número de crías por camada es similar para los dos grupos, sin que se presenten diferencias significativas tampoco en el peso de la camada.

Cuadro 23. Efecto de la dieta sobre el número de crías y el peso de la camada.

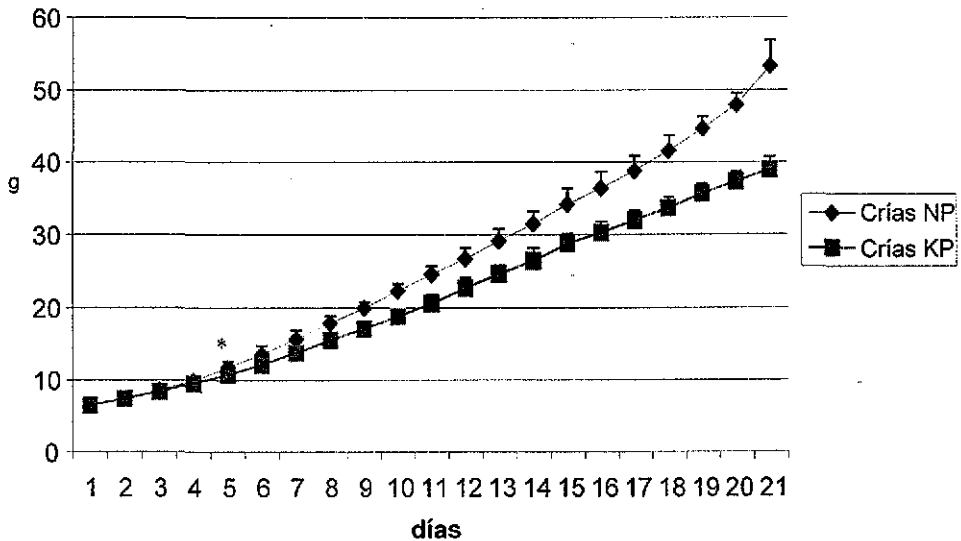
DIETA	Nº DE CRÍAS	PESO DE LA CAMADA AL NACIMIENTO. (g)
NP	10.33 ± 2.5	71.5 ± 16.5
KP	11.19 ± 2.2	78.0 ± 12.4

Promedio ± DE, de las crías de 10 ratas por grupo.
Peso de la camada está reportada en gramos.

Las crías nacen con un peso de 6.48 g en promedio las de las ratas alimentadas con la dieta NP y de 6.52 g para las crías de las ratas KP, es al día 5 de edad donde se hace una diferencia significativa de 0.0006, es aquí donde las crías NP aumentan un 10% más del peso que alcanzaron en este día las crías de las ratas KP. Basándose en la prueba de t es que se hace la diferencia significativa a partir de este día. Se observa en la figura 20 que la curva de crecimiento del peso se va separando a partir del día 5, donde se ve detenida para las crías KP, que en el día 14 la deficiencia en peso es del 16% en comparación

con el peso que llevan ese mismo día las crías de las ratas alimentadas con la dieta marginal (KP). Para el día 21 de lactancia, el promedio del peso de las crías KP es de 38.96 g que se encuentra un 27% por debajo del peso registrado para las crías del grupo NP que es de 53.32 g. Por lo que se puede resumir que el consumo de la dieta marginal (KP) por las ratas afecta a la producción y composición de la leche negativamente a partir del día 5 de lactancia, pero es hasta el día 14 donde se comprueba por su análisis, sin embargo este efecto se mantiene durante el resto del periodo de lactancia, donde se observa que para el final de la lactancia (L21) el efecto se acentúa y se convierte en un peso casi 30% menor.

Gráfico 8. Peso corporal de las crías hasta el día 21 día de la lactancia.



DISCUSIÓN

El estudio de la lactancia es tan amplio y aun con algunos aspectos por aclarar, que este estudio es tan solo una pequeña aportación a la investigación de este tema. La presente investigación estuvo diseñada para evaluar el efecto de una alimentación marginal adicional al efecto de la lactancia en el metabolismo de proteína; específicamente sobre la proteólisis en tres tejidos claves del organismo materno (*hígado, glándula mamaria y músculo*). El estudio fue muy completo por las mediciones que se realizaron ya que se tuvo el control de todas las variables de un trabajo experimental, previos y durante la intervención de la alimentación marginal y durante los análisis químicos de todas las mediciones que se obtuvieron. Los resultados muestran varios hallazgos importantes, que se irán discutiendo por tema.

1. CARACTERÍSTICAS DE LAS RATAS EN ESTUDIO.

La edad de los animales para iniciar un estudio de esta naturaleza es muy importante porque estos animales necesitan haber pasado el periodo de crecimiento; así, los pesos fluctúan entre 180 g y 280 g en el caso de la cepa Sprague-Dawley según como lo reportan varios autores (93-94). En este caso como en todos los trabajos del grupo del Dr Hernández-Montes se han utilizado ratas de un peso de 220 a 260 g al inicio del estudio, las ratas de este trabajo experimental iniciaron con un peso de 240 g. Después de las dos semanas de adaptación a su dieta correspondiente el peso corporal de las ratas de los dos grupos fue aumentando gradualmente sin ninguna diferencia entre ellos; esto se debe a que en la edad adulta las ratas incrementan su peso, esta observación se mantiene en los grupos testigos vírgenes mientras que los grupos de las ratas lactantes tienen un incremento por la gestación, en los dos grupos de alimentación el incremento de peso es similar hasta la lactancia. El consumo de alimento que tuvieron estas ratas durante todo el estudio dependen mucho de su estado fisiológico, es decir, las ratas lactantes aumentaron su consumo de alimento en comparación con el

grupo de ratas vírgenes, de la manera ya descrita en otros trabajos (8,42-44,46,51,52). Este aumento en el consumo de alimento se ha demostrado que se debe al incremento de energía mas que al medio hormonal de la lactancia (5), aunque no se debe dejar de tomar en cuenta que para el día 17 las crías ya iniciaron su ablactación y consumen del alimento sólido destinado a su madre.

Si se recuerda las diferencias en la composición química de las dos dietas utilizadas hacen la diferencia en el consumo de energía y proteína para las ratas KP ya que su alimento tiene menor cantidad (18%) de proteína y energía que la dieta testigo NP; y por lo tanto su consumo es 30 % menor sobre todo para las ratas lactantes con respecto a su grupo testigo lactante (NP).

2. COMPOSICIÓN CORPORAL DE LAS RATAS DURANTE LA LACTANCIA Y EL EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN MARGINAL.

La composición corporal de un organismo se puede analizar a varios niveles; métodos no invasivos como sucede en humanos a través de medidas antropométricas que incluyen peso corporal, talla, circunferencias y pliegues cutáneos; sirviendo para dar un aproximación de contenido de agua, de grasa y de masa libre de grasa. Recientemente se utilizan métodos invasivos que realizan mediciones mas exactas como es la densitometría, la dilución de deuterio, la impedancia bioeléctrica, que mediante el uso de modelos matemáticos se puede calcular los compartimentos corporales como es el % de agua, el % de masa grasa, la cantidad de minerales y el % de proteína; Estos métodos varían de lo impreciso a lo costoso (95).

El estudio de la composición corporal en el modelo animal es relativamente mas fácil y preciso. En el caso de la rata se realiza el análisis químico (contenido de proteínas, lípidos y agua) en la carcaza y de esta forma se hicieron las determinaciones en todos los estudios con que comparamos nuestros resultados.

En el periodo de lactancia, la composición corporal no influye sobre la preferencia en la utilización de algún sustrato en particular para la oxidación ya

que la utilización de la glucosa por la glándula mamaria no se ve afectada por las diferencias en la composición corporal (6). Aunque si existe correlación de la adiposidad de la madre con la cantidad de lípidos encontrados en la leche (40). En el estudio de Kanto y cols (96), la rata gestante contiene mayor cantidad de agua corporal que la rata virgen (rata total a la que solo se le retiró el pelo), esto se debe a la mayor hidratación que necesitan los tejidos del organismo materno y se cree que esta retención de agua se mantiene en la lactancia (96). Mientras que si se realiza este contenido de agua únicamente en la carcaza de la rata, se encuentra que se pierde una determinada cantidad de agua por el efecto de la lactancia (51). Estas diferencias se deben a que se utilizó diferente técnica de medición, mientras que en el primer estudio citado se realizó con una técnica de dilución en la rata total, en el segundo trabajo fue por pérdida de agua de la carcaza por calor. En este segundo estudio del Dr Hernández-Montes (51), la masa libre de agua (peso seco) fue menor para las ratas lactantes en comparación con su grupo virgen y a las ratas que se les proporcionó una dieta deficiente en proteína tuvieron una reducción del peso seco de su carcaza al día 14 de la lactancia, sin que en el peso corporal se presentaran diferencias significativas; por lo que se considera que la diferencia fue el contenido de agua de la carcaza.

Los lípidos y el comportamiento de su movilización en este periodo ha sido por demás estudiado y en este caso muestran resultados que coinciden con los ya reportados. Las ratas con la dieta NP de este estudio, presentan una movilización de los lípidos de la carcaza entre los días 14 y 21 de lactancia; aunque también se ha encontrado que otros depósitos de grasa como son el parametrial, el retroperitoneal y el subescapular disminuyen su tamaño y contenido de lípidos, este proceso de movilización de lípidos se anula cuando la rata lactante consume una dieta alta en lípidos (97); o se acentúa cuando la madre es múltipara (98). En caso de que las ratas consuman una dieta baja en proteínas, la movilización de lípidos de la carcaza se modifica, ya que se pierde de manera inmediata en la primera semana de lactancia (51). Caso similar con nuestros resultados de las ratas alimentadas con la dieta KP. Aunque a diferencia del estudio mencionado anteriormente con las ratas alimentadas con la dieta baja en proteína donde las

ratas tuvieron un mayor consumo de lípidos ya que la dieta recibida fue isocalórica contenía una cantidad mayor de lípidos y el organismo materno tuvo la oportunidad de formar mayor reservas para iniciar la lactancia, mientras que las ratas KP de este estudio, recibieron su dieta que también fue baja en energía y en lípidos, por lo que no pudieron formar una mayor reserva al inicio de la lactancia como en el caso anterior; pero la cantidad movilizada fue similar a la de las ratas con la dieta testigo. La movilización de lípidos ha sido una importante aportación de energía para el costo que exige la lactancia, también debe de encontrarse una aportación de las proteínas corporales a la poza de aminoácidos en este momento de síntesis de proteínas de la leche. Por algunos años se había establecido al tejido muscular como reservorio de proteínas, que podrían ser utilizadas para la gran demanda durante la lactancia; el estudio de Pine (99) en ratas alimentadas a partir del parto con una dieta baja en proteínas (9% de caseína) donde se presenta una pérdida de 5 g en la carcaza húmeda al día 12 de lactancia; mientras que las ratas alimentadas con la dieta del 21 % de caseína no tienen pérdida de proteína de la carcaza. Nuestros resultados de contenido de proteína en la carcaza de la rata lactante no presentan pérdida alguna; ni por efecto de la dieta marginal. Solo si comparamos las ratas lactantes KP con su grupo testigo virgen en el día 14 se observa un menor contenido de proteínas para la lactante. Puede ser considerado este día como el mas estresante para el organismo materno por su mayor demanda por la glándula mamaria para la máxima producción de leche.

Pine en otro estudio (47) justifica que la movilización de proteínas tisulares es tan rápida que no puede ser observada en la carcaza pero que los cambios se deberían ver a nivel de recambio; es decir, la diferencia entre la síntesis y la degradación de proteínas en los todos los tejidos. Según este estudio la pérdida de proteína muscular ocurrida entre los días 2 y 8 de lactancia es de apenas 133 mg aun cuando la rata consumió una dieta deficiente en proteína (9% de proteína). Sin embargo la síntesis de proteína en la glándula mamaria, se ve disminuida por efecto de la calidad y la cantidad de la proteína de la dieta (36)

3.- PESO DE LOS TEJIDOS DE LAS RATAS.

Los pesos de los tejidos han sido utilizado como referencia en varias estudios. En la lactancia, se habla de la hipertrofia de algunos de ellos como son intestino, estomago, hígado y glándula mamaria (43). En nuestro estudio, se encontró un aumento en el peso del hígado en las ratas lactantes en comparación con sus controles vírgenes tanto en las ratas del grupo NP como en el grupo KP. Esta hipertrofia del hígado se puede deber a la gran demanda del trabajo metabólico que realiza este órgano, siendo fundamental para todas las adaptaciones bioquímicas que suceden en la lactancia. Cuando la rata se alimenta durante la lactancia con una dieta de 21% de caseína, se promueve el anabolismo en el hígado al día 12, ya que se observa un aumento significativo en el peso del hígado, en la cantidad de proteína y en su contenido de ARN comparándose con los mismos indicadores de ratas alimentadas con una dieta baja al 9% de caseína (100). En el presente estudio no se encontró diferencia en el peso del hígado entre los dos grupos de alimentación NP y KP, aunque existe el antecedente que el peso de este órgano se ve afectado por una dieta con una proteína de baja calidad como es el trigo (36). Los datos que presentan los estudios donde si hubo efecto por la dieta se encuentran 3 g por arriba de los pesos del hígado de las ratas KP y los hígados de su grupo testigo se encuentran 4 g por debajo del peso del hígado de las ratas NP. Aun cuando se tratan de la misma cepa de ratas.

La glándula mamaria en estado basal es un tejido prácticamente inactivo cuando el organismo no cursa por ningún estado fisiológico de reproducción; en el embarazo este tejido empieza a responder a los cambios hormonales para prepararse para la lactancia, en este periodo llega a ser el tejido mas activo e importante por la captación de sustratos y la síntesis de nutrimentos necesarios para la síntesis de la leche. En los estudios de Pine (47), una dieta del 9% de caseína es suficiente para ver reducido el peso de la glándula mamaria abdominal, su contenido de proteína y ARN. Pero una dieta con una concentración de 13% de caseína, no tuvo efecto en el peso total de la glándula mamaria (51). En los experimentos de este estudio la dieta marginal no tuvo ningún efecto en el peso de

la glándula mamaria, ya que el aumento que presentó este tejido es similar en los dos grupos de alimentación. Si se recuerda, el peso se tomó del tejido húmedo sin considerar la cantidad de leche que pudiera contener el tejido. Los pesos del tejido muscular consideró a toda la carcaza del animal y no se detectó ninguna pérdida en el peso de este tejido.

4. ACTIVIDAD ESPECIFICA Y TOTAL DEPENDIENTE DE ATP⁺ Y CUMARINA EN LOS TEJIDOS DE LAS RATAS.

La actividad específica como total de los proteasomas fueron considerados en los tres tejidos donde puede estar aumentada la hidrólisis de proteínas. Existen una serie de trabajos que han descrito muy bien los cambios en la síntesis de proteína por efecto de la dieta; El grupo de Sampson y cols (36), encuentran correlación entre la velocidad de síntesis de proteínas en el hígado y en la glándula mamaria con la calidad y la cantidad de proteína administrada en la dieta. Cuando el consumo de proteína es menor al requerimiento, la velocidad de síntesis del hígado se ve limitada por el suministro de aminoácidos (37). Y a manera de regulación la hidrólisis de proteína debe estar aumentada tomando en cuenta que disminuye el peso y la cantidad de proteína del hígado. Esto mismo puede suceder en el periodo de lactancia, donde se ve aumentado el requerimiento de energía y de proteína, que el hígado regule mejor sus proteínas aumentando la hidrólisis de proteínas que pueden ser las de circulación o en último de los casos las propias, para la síntesis de enzimas necesarias en esta etapa como son las que intervienen en la glucólisis y lipogénesis (43). Esto coincide con la actividad hidrolítica de los proteasomas, que se tomó como un indicador de la hidrólisis de proteína, la cual se encuentra aumentada cuando la rata consume la dieta KP que es una dieta marginalmente baja en proteínas y en su mayoría de origen vegetal y en un día clave para el desarrollo de la lactancia como lo es el día 14, que corresponde al día de máxima producción de leche y de máximo requerimiento. Una dieta con 13% de caseína condiciona a la rata lactante

a una mayor actividad hidrolítica de la catepsina D en este mismo día y la catepsina L al día 7 de lactancia (51) El hígado como órgano total tiene una actividad hidrolítica menor al primer día de la lactancia para los dos grupos de las diferentes dietas, esto puede ser que este día todavía no existe un aumento en el requerimiento ni utilización de aminoácidos importante, si regresamos a ver que este día el consumo de alimento es similar al de las ratas vírgenes.

La glándula mamaria en la lactancia, tiene una actividad importante en todos los pasos anabólicos como es la lipogénesis, glucólisis y síntesis proteica (45); finalmente, estos pasos requieren en cierta forma energía y sustratos que deben de llegar de circulación o ser obtenidos a partir de otras vías metabólicas, como la proteólisis. Las proteínas que llegan a la glándula mamaria, deben de estar en constante recambio, tanto para la síntesis propias de la leche como las estructurales y reguladoras, la glándula mamaria a partir del día 14 de lactancia aumenta la actividad de los proteasomas, para aumentar la proteólisis de proteínas que pueden ser de vida corta o anormales (54), si recordamos la velocidad que existe en la síntesis proteica, tendría que ser mayor el error en su síntesis (49) y consecuentemente mayor su hidrólisis, como regulación de las proteínas anormales. Las ratas con alimentación marginal (KP) mostraron mayor actividad de los proteasomas desde el día 14 de lactancia en comparación con el grupo NP, se podría pensar que es por el esfuerzo adicional que finalmente llevan la síntesis de otras proteína, pero se desconoce de cuales específicamente se tratarían. La hidrólisis proteica que realizan los proteasomas en el tejido mamario en la lactancia, tiene comportamiento diferente para los dos grupos de estudio, mientras que para el grupo NP, la mayor actividad total que tiene este tejido es al día 14 de lactancia; el grupo KP, tiene una mayor actividad total y se incrementa aun mas al final de la lactancia, que podría indicar el inicio de la regresión del tejido glandular.

La actividad específica de los proteasomas que dependen de ATP en el músculo no mostró ningún efecto por el tipo de dieta consumida. Pero es notoria la mayor actividad que tuvieron los dos grupos de ratas al día 14, que vuelve a coincidir con el día de mayor estrés nutricional, por el aumento en el requerimiento del día de máxima producción de leche.

El músculo esquelético, ha mostrado en algunos estudios tener una participación activa en la lactancia, ya que en este periodo es franca la reducción en la síntesis de sus proteínas (43, 35) en los días 12 y 21 de lactancia. Por otro lado, en el día 15 de lactancia, la concentración de lisina libre en la poza de aminoácidos del músculo se correlaciona con el contenido de lisina en la dieta que consume la rata (33). En el presente estudio se mostró que en el tejido muscular total, la mayor actividad de los proteasomas fue el día de máxima producción de leche (día 14) en el grupo NP y además fue mayor que en el grupo de experimentación.

Se debe de considerar que cuando se habla de actividad enzimática como es en este caso los proteasomas, no siempre quiere decir que todo el sistema de proteólisis este aumentado, ya que cada uno de los complejos enzimáticos pueden responder a situaciones diferentes de estrés (101).

5. PRODUCCIÓN DE LECHE Y DE NUTRIMENTOS AL DIA 14 DE LACTANCIA.

Los cambios en la producción de leche y en su composición, han sido bien estudiados por efecto de los cambios en la dieta; Crnic (100) encuentra que una dieta baja en proteína (8% de caseína) ocasiona una leche con una disminución en el contenido de N total en la leche y un aumento en el contenido de lípidos estos datos coinciden con un trabajo del grupo del Dr Homero Hernández (8). Pero limitando la cantidad de alimento al 60% del consumo *ad-libitum* no ocasiona cambios en el contenido de lípidos y nitrógeno de la leche producida.

El estudio de Grimble, encuentra que la producción de leche se ve severamente reducido por la dieta con una proteína pobre en calidad (maíz) pero no se encontró diferencia en la composición de la leche (26). Los cambios en la composición de la leche también puede presentarse por el numero de tetadas previas, hora del día y por el día de la lactancia (94). Mientras que una dieta marginal consumida por la rata afecta la cantidad de leche consumida, que se

debe directamente a la baja calidad de la proteína, que es de origen de trigo y la deficiencia en un 20% de la cantidad total de proteína consumida por la rata afecta la cantidad de proteína en la leche en un 35%. La cantidad de lípidos contenidos en la leche de las ratas con la dieta KP tuvieron un aumento del 20%, que pudieran provenir de los lípidos de las reservas corporales (27). La cantidad de lactosa resulto menor para el grupo de las ratas alimentadas con la dieta experimental. Estos cambios en la leche producida por las ratas con la dieta KP, trae como consecuencia que la rata aun con una dieta marginal sea capaz de ofrecerle una leche con una densidad energética adecuada.

La producción diaria de energía, proteínas y lactosa destinadas a la producción de leche, se vio afectada por la dieta marginal y esto se ve reflejado finalmente en el crecimiento de sus crías, sobre quien finalmente se puede valorar todos los cambios anteriores.

6. CRECIMIENTO DE LAS CRÍAS DEL NACIMIENTO HASTA EL DIA21 DE LACTANCIA.

La dieta que una madre consuma durante el embarazo, es determinante para el desarrollo intrauterino de la cría, ya que las deficiencias en la dieta pueden traer consecuencias irreversible para el desarrollo de su cría. Una dieta con restricción en la proteína (8%) consumida por una madre, programa a la cría para que en la edad adulta maneje de manera diferente la vía glucolítica (102), y presentan deficiencias en las funciones del cerebro (38), pero pueden revertir el retraso en el crecimiento con una dieta adecuada (103). La dieta marginal que fue consumida por las ratas del grupo KP desde antes de la cruce, no tiene ningún efecto sobre el peso al nacimiento ya que parece haberse adaptado a las deficiencias de la dieta.

Al día 5 de lactancia, ya se hace una diferencia en el peso de las crías KP; porque se va retrasando la curva de ganancia de peso normal que presentan las ratas del grupo testigo. Las deficiencia en la proteína de la dieta puede ocasionar

desde un leve retraso en el crecimiento de las crías hasta una franca desnutrición, esto depende de la intensidad y duración de la restricción de la madre (32), existen otros estudios donde se ha utilizado diferente fuente de proteína vegetal como frijol y maíz y han ocasionado una restricción en el crecimiento longitudinal (29). La restricción en el peso corporal que tienen las crías de las ratas KP, hacia el final de la lactancia es de casi el 30%, similar al retraso que presentaron las crías de las ratas con restricción de proteína al 11% (8).

CONCLUSIONES

Con estos resultados y con su análisis, se puede considerar lo siguiente:

1. La dieta de experimentación, definida como marginal, no produjo ningún retraso en la ganancia de peso por el embarazo de la rata, ni en la lactancia provocó cambios en el peso corporal, por lo que parece que el organismo se ajusta a la dieta, durante las semanas previas al embarazo.
2. El organismo materno con alimentación marginal, maneja de manera diferente la movilización de lípidos corporales, haciéndolo en las dos primeras semanas de lactancia.
3. Por lo menos la carcasa no es el reservorio de proteínas del organismo en la lactancia, ya que no se encontró movilización en este tejido que subsidiara la demanda de proteínas durante la lactancia.
4. Además del estrés de la lactancia, una alimentación marginal, provoca en el organismo la mayor participación del sistema de los proteasomas en el recambio de proteínas en el hígado, al día 14 de lactancia.
5. Los proteasomas en la glándula mamaria, participan en la hidrólisis de proteínas (se sugiere que sean proteínas anormales y de vida corta), por su elevada actividad de síntesis-hidrólisis. Y se observó un aumento en la actividad específica en la rata con alimentación marginal a partir del día 14.

6. El tejido muscular presenta mayor actividad de los proteasomas en el día 14 de lactancia.
7. Finalmente, una alimentación inadecuada presenta una reducción en la producción de leche y en el contenido de algunos nutrimentos importantes, especialmente proteína.
8. Y estos cambios a quien mayormente afectan es al desarrollo de la cría a partir del día 5, agudizándose mas hasta al final de la lactancia. Es de suponerse que es de este quinto día cuando las deficiencias de energía y nutrimentos empieza afectar la producción de leche y por ende a la cría.

BIBLIOGRAFIA

1. Higuchi T, Negoro H, Arita J (1989) Reduced responses of prolactin and catecholamine to stress in the lactating rat. *J Endocrinol* 122:495-498.
2. Altemus M, Deuster PA, Galliven E, Carter CS, Gold PW (1995) Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in lactating women *J Clin Endocrinol Metab* 80:2954-2959
3. Lovelady AC, Lonnerdal B, Dewey KG (1990) Lactation performance of exercising women. *Am J Clin Nutr* 52:103-109.
4. Koiter TR, Moes H, Valkhof N, Wijkstra S (1999) Interaction of late pregnancy and lactation in rats. *J Reprod Fertility* 115:341-347.
5. Fleming AS (1976) Control of food intake in the lactating rat: Role of Suckling and hormones. *Phys Behav* 17:841-848.
6. Butte NF, Hopkinson JM, Mehta N, Moon JK, Smith EO (1999) Adjustments in energy expenditure and substrate utilization during late pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 69:299-307.
7. Subcommittee on nutrition during lactation national academy of Sciences. (1991) Milk composition. In "Nutrition during lactation". National academy press, Washington D.C. 113-152.
8. Cervantes Rodríguez M (1997) Influencia de la concentración de proteínas de la dieta sobre la producción y composición de la leche en ratas y su efecto en la composición corporal de sus crías. TESIS. Licenciatura en Nutrición. Universidad Veracruzana.
9. Picciano MF (1998) Human milk: nutritional aspects of a dynamic food. *Biol. Neonate* 74:84-93.
10. Villalpando HS, De Santiago MS (1990) La lactancia y el metabolismo de proteínas. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 47:181-185.
11. Jessop SN (1997) Protein metabolism during lactation. *Proc Nutr Soc* 56:169-175.
12. Bourne RA, Bryant JA (1974) Effects of prolactin on the synthesis of casein in rabbit mammary tissue. *Int J Biochem* 5: 45-48.

13. Gelfand RA, Barrett EJ (1987) Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man. *J Clin Invest* 80:1-16.
14. Raskin RL, Raskin M, Baldwin RL (1974) Effects of chronic insulin and cortisol administration on lactational performance and mammary metabolism in rats. *J Dairy Sci* 56:1033-1041.
15. Sugden PH, Fuller SJ (1991) Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem J* 273:21-37.
16. Marinchenko GV, Mc Namara JP, Becker-KhaleelB, Parmley K (1992) Growth hormone alters metabolic effects and proteolysis of insulin in adipose tissue during lactation. *Proc Soc Exp Biol Med* 200:657-666.
17. Viña JR, Williamson DH (1981) Utilization of L-alanine and L-glutamine by lactating mammary gland of the rat. *Biochem J* 196:757-762.
18. Collier JR, McNamara PJ, Wallace RC, Dehoff HM (1984) A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. *J Anim Sci* 59:498-510.
19. Flint DJ, Clegg RA, Knight CH (1984) Stimulation of milk secretion with inhibition of milk ejection by corticosteroids during extended lactation in the rat. *J Endocrinol* 103: 213-218.
20. American Institute of Nutrition (1977) Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107:1340-1348.
21. American Institute of Nutrition (1980) Second report of the ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1726.
22. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN_93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
23. Villalpando SF, Butte NF, Wong WW, Flores-Huerta S, Hernandez-Beltran MJ, Smith EO, Garza C (1992) Lactation performance of rural mesoamerindians. *Eur J Clin Nutr* 46:337-348.

24. Gonzalez-Cossio T, Habicht JP, Rasmussen KM, Delgado HL (1998) Impact of food supplementation during lactation on infant breast-milk intake and on the proportion of infants exclusively breast-fed. *J Nutr* 128:1692-1702.
25. Motil KJ, Thotathuchery M, Bahar A, Montandon CM (1995) Marginal dietary protein restriction reduced nonprotein nitrogen, but not protein nitrogen, components of human milk. *J Am Coll Nutr* 14:184-191.
26. Grimble RF (1981) The effect of dietary protein concentration and quality on the hormonal status, protein metabolism and milk protein concentration of rats. *Ann Nutr Metab* 25:221-227.
27. Neville MC, Picciano MF (1997) Regulation of milk lipid secretion and composition. *Ann Rev Nutr* 17:159-184.
28. Clement CK, Tay M, Glasier A, McNeilly AS (1992) Endocrine control of lactation. In "Mechanism regulating lactation and infant nutrient utilization" Picciano MF, Lönnerdal B. ed Wiley-Liss. New York. pag 35-42.
29. Del Angel A, Quirarte G, Feria-Velasco A (1990) Effects of protein restriction of rats fed with corn and corn-bean diets, on their body and cephalic growth. *Arch Invest Med* 21:325-330.
30. Rocha De Melo AP, Guedes RC (1997) Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Braz J Med Biol Res* 30:663-669.
31. Marin MC; De Tomas ME, Serres C, Mercuri O (1995) Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr* 125:1017-1024.
32. Tirapegui JO, De Angelis RC (1985) Marginal protein deficiency in pregnant rats. Changes in offspring body composition. *Arq Gastroenterol* 22:83-87.
33. Jansen GR, Schibly MB, Masor M, Sampson DA, Longenecker JB (1986) Free amino acid levels during lactation in rats: Effects of protein quality and protein quantity. *J Nutr* 116:376-387.
34. Shepherd PR, Crowther NJ, Dosal M, Azanne SE (1997) Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br J Nutr* 78:121-129.

35. De Santiago S, Hernández-Montes H, Flores-Huerta S, Villalpando S (1991) Changes in the composition of mammary tissue, liver and muscle of rat dams during lactation and after weaning. *J Nutr* 121:37-43.
36. Sampson DA, Hunsaker HA, Jansen GR (1986) Dietary protein quality, protein quantity and food intake: Effects on lactation and on protein synthesis and tissue composition in mammary tissue and liver in rats. *J Nutr* 116:365-375.
37. Eisenstein RS, Harper AE (1991) Relationship between protein intake and hepatic protein synthesis in rats. *J Nutr* 121:1581-1590
38. Galler JR, Tonkiss J (1991) Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 121: 752-769.
39. Villalpando S, Butte NF, Flores-Huerta S, Thotathuchery M (1998) Qualitive analysis of human milk produced by women consuming a maize-predominant diet typical of rural mexico. *Ann Nutr Metab* 42:23-32.
40. Barbosa L, Butte NF, Villalpando S, Wong WW, Smith EO (1997) Maternal energy balance and lactation performance of mesoamerindians as a function of body mass index . *Am J Clin Nutr* 66:575-583.
41. Del Prado M, Villalpando S, Gordillo J, Hernández-Montes H (1999) A high dietary lipid intake during pregnancy and lactation enhances mammary gland lipid uptake and lipoprotein lipase activity in rats. *J Nutr* 129 1574-1578.
42. Williamson DH, Munday MR, Jones RG (1984) Biochemical basis of dietary influences on the synthesis of the macronutrients of rat milk. *Fed Proc* 43:2443-2447.
43. Williamson DH (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Letts* 117:K93-K105.
44. De Santiago S, Torres N, Suyawan A, Tovar AR, Hutson SM (1998) Regulation of branched-chain amino acid metabolism in the lactating rat. *J Nutr* 128: 1165-1171.
45. Naismith DJ, Morgan BL (1976) The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. *Br J Nutr* 36: 563-566.

46. Gallardo Bolaños A (2001) Influencia de la concentración de proteínas en la dieta sobre las reservas corporales de la rata durante el periodo de gestación. TESIS. Licenciatura Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
47. Pine AP, Jessop NS, Allan GF, Oldham JD (1994) Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 4 Tissue protein synthesis and turnover associated with mobilization of maternal protein. *Br J Nutr* 72: 831-844.
48. Sainz RD, Calvert CC, Baldwin RL (1984) 3-methyl-histidine excretion by lactating and non lactating rats. *Proc Am Sci* 35: 311-312.
49. Young VR, Yu YM, Fakagawa NK (1992) Whole Body energy and nitrogen (protein) relationships. In "Energy metabolism : Tissue determinant and cellular corollaries". Edited by JM Kinney and HN Tucker. Raven Press. N.Y.
50. Viña JP, Puertes IJ, Viña JJ, Gabis JA (1981) Involvement of γ -glutamyl-transferase in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. *Biochem J* 194:99-102.
51. Peña Irecta A (1999) Influencia de la administración crónica de diferentes concentraciones de proteína en la dieta sobre la composición corporal y la proteólisis en algunos tejido de la rata durante la lactancia y el destete. TESIS. Maestría en Nutrición Humana. Universidad Iberoamericana.
52. Ayala Moreno MR (2000) Efecto de la restricción energético-proteinica sobre la composición corporal y la proteólisis muscular en la rata madre lactante. TESIS. Licenciatura en Química en Alimentos. UNAM.
53. Mortimore GE, Pösö AR (1987) Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Ann Rev Nutr* 7539-564.
54. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL (1999) Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Am Soc Nutr Sci* 129:227S-237S.
55. Sugden PH, Fuller SJ (1991) Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem J* 273: 21-37.

56. Rathmacher JA, Nissen SL (1998) Development and application of a compartmental model of 3-methylhistidine metabolism in humans and domestic animals. *Adv Exp Med Biol* 445: 303-324.
57. Benynon RJ, Bond JS (1986) Catabolism of intracellular protein: molecular aspects. *Am J Physiol* 251:C141-C152.
58. Hamel FG, Bennet RG, Harmon KS, Duckworth WC (1997) Insulin inhibition of proteasome activity in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun* 234:671-674.
59. Rawlings DN, Barrett JA (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290:205-218.
60. Williams AB, Decourten-Myers GM, Fischer JE, Luo G, Sun X, Hasselgren P (1999) Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *FASEB J* 13:1435-1443.
61. Turner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA (1988) Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from *mdx* mice. *Nature* 335:735-738.
62. Tanaka K, Tamura T, Tanahashi N (1996) Protein and gene structure of 20S and 26S proteasomes. In "Intracellular protein catabolism" edited by Koichi Suzuki and Judith S Bond. *Advances in experimental medicine and biology* Volume 389, 1996. Plenum Press, N Y.
63. Rivett J (1993) Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J* 291:1-10.
64. Hilt W, Heinemeyer W, Wolf DH (1996) the proteasome and protein degradation in yeast In "Intracellular protein catabolism" edited by Koichi Suzuki and Judith S Bond. *Advances in experimental medicine and biology* Volume 389, 1996. Plenum Press, N Y.
65. Reidlinger J, Pike AM, Savory PJ, Murray RZ, Rivett AJ (1997) Catalytic properties of 26S and 20S proteasomes and radiolabeling of MB1, LMP7, and C7 subunits associated with trypsin-like and chymotrypsin-like activities. *J Biol Chem* 272: 24899-24905.

66. Ping MC, Vu JH, Proske RJ, Slaughter CA, De Martino GN (1994) Identification, purification and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20S proteasome. *J Biol Chem* 269:3539-3547.
67. Kuehn L, Dahlmann B (1997) Structural and functional properties of proteasome activator PA28. *Mol Biol Rep* 24: 89-93.
68. Beal RE, Toscano-Cantaffa D, Young P, Rechsteiner M, Pickart CM (1998) The hydrophobic effect contributes to polyubiquitin chain recognition, *Biochem* 37:2925-2934.
69. Solomon V, Baracos V, Sarraf P, Goldberg A (1998) Rates of ubiquitin conjugation increased when muscles atrophy, largely through activation of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci* 95: 12602-12607.
70. Jentsch S (1992) The ubiquitin-conjugation system. *Ann Rev Genet* 26:179-207.
71. Wilkinson KD (1994) Cellular roles of ubiquitin. In "Heat shock proteins in the nervous system". Edited by Cheetham ME, Brion JP, Anderton BH. Acad Press Limited. London.
72. Wilkinson KD (1995) Roles of ubiquitinylation in proteolysis and cellular regulation. *Annu Rev Nutr* 15:161-189.
73. Tipler CP, Hutchon SP, Hendil K, Tanaka K, Fishel S, Mayer RJ (1997) Purification and characterization of 26S proteasomes from human and mouse spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3:1053-1060.
74. Yamin TT, Miller DK (1997) The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation. *J Biol Chem* 272:21540-21547.
75. Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138.
76. Solomon V, Goldberg A (1996) Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* 271: 26690-26697.
77. Fagan JM, Waxman LI, Goldberg AL (1987) Skeletal muscle and liver contain a soluble ATP+ubiquitin-dependent proteolytic system. *Biochem J* 243: 335-343.

78. Temparis S, Asensi M, Taillandier D, Aurousseau E, Larbaud D, Obled A, Bechét D, Ferrara M, Estrela JM, Attaix D (1994) Increased ATP-Ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res* 54: 5568-5573.
79. Wing SS, Goldberg AL (1993) Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am Phys Soc* 264: E668-E676.
80. Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K, Lieberman M, Fischer JE, Hasselgren PO (1994) Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 94: 2255-2264.
81. Voisins L, Breuillé D, Combaret L, Pouyet C, Taillandier D, Aurousseau E, Obled C, Attaix D (1996) Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest* 97: 1610-1617.
82. Hobler SC, Tiao G, Fischer JE, Manaco J, Hasselgren P (1998) Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific protease inhibitors. *Am J Physiol* 274: R30-R36.
83. Mitch WE, Bailey JL, Wang X, Jurkovitz C, Newby D, Price SR (1999) Evaluation of signals activating ubiquitin-proteasome proteolysis in a model of muscle wasting. *Am J Physiol* 276: C1132-C1138.
84. De Santiago S, Alonso L, Ramirez I, Ortiz N, Tovar A, Torres N, Bourges H (2000) Metabolizable energy from a predominantly vegetable diet consumed by Mexican rural lactating women. *Nutr Res* 20: 215-224.
85. Driscoll J, Goldberg AL (1989) Skeletal muscle proteasome can degrade proteins in an ATP-dependent process that does not require ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 787-791.
86. Hartree EF (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48: 422-427.
87. Winton AL, Winton KB (1957) Análisis de alimentos. Editorial Continental, S.A., México, D.F. 64-81.

88. Helrick K (1990) Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 15 th edition, AOAC, Inc. Washington, D.C. pp 16.
89. Godbole YV, Grundleger LM, Pasquine AT, Thenen WS (1981) Composition of rat milk from day 5 to 20 of lactation and milk intake of lean and preobese Zucker pups. *J Nutr* 111: 480-487.
90. Warman NL, Rasmussen KM (1983) Effects of malnutrition during the reproductive cycle on nutritional status and lactational performance of rat dams. *Nutr Res* 3: 527-545.
91. Folch J, Lees M, Sloane Stanley G (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226: 497-509.
92. Trinder P (1969) Determination of glucose in blood using glucose-oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 6:24-28.
93. Allen LH, Zeman FJ (1971) Influence of increased postnatal food intake on body composition of progeny of protein-deficient rats. *J Nutr* 101:1311-1318
94. Keen CL, Lönnerdal B, Clegg M, Hurley L (1981) Developmental changes in composition of rat milk: Trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat *J Nutr* 111:226-236.
95. Wells JCK, Fuller NJ, Dewit O, Fewtrell MS, Elia M, Cole TJ (1999) Four-component model of body composition in children: density and hydration of fat-free mass and comparison with simpler models. *Am J Clin Nutr* 69:904-912.
96. Kanto U, Clawson AJ (1980) Effect of energy intake during pregnancy and lactation on body composition in rats. *J Nutr* 110:1829-1839.
97. Moore BJ, Olsen JL, Marks F, Brasel JO (1984) 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* 114:1566-1573.
98. Jen KL, Juuhl N, Lin PK (1988) Repeated pregnancy without lactation: Effects on carcass composition and adipose tissue cellularity in rats. *J Nutr* 118:93-98.
99. Pine P, Jessop NS, Oldham JD (1994) Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. *Br J Nutr* 71:13-27.
100. Crnic LS, Chase HP (1978) Models of infantile undernutrition in rats: Effects on milk *J Nutr* 108 1755-1760.

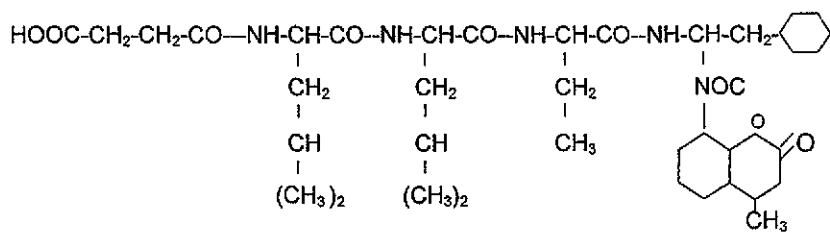
- 101.** Authier F, Posner BI, Bergeron JJM (1996) Endosomal proteolysis of internalized proteins. FEBS Letters 389:55-60.
- 102.** Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Illes RA, Germain JP, Going TCH, Bailey RA (1997) Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. J Clin Invest 100:1768-1774.
- 103.** Anderson GD, Ahokas RA, Lipshitz J, Dilts PV (1980) Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on maternal weight gain and fetal birth weight in the rat. J Nutr 110:883-890.

ANEXO 1

EXTRUCTURA QUIMICA DEL SUSTRATO

N-Succ-Leu-Leu-Val-Tyr-7-aminometil -Coumarina

(peso Molecular 763.9)



ANEXO 2

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Los reactivos utilizados en esta técnica fueron de la marca Sigma-Aldrich (St Louis, MO) y Merck (México).

Solución A

Pesar 100 g de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3); 2 g de tartrato de sodio y potasio 2 g disolver con agua bidestilada agregar 500 mL de hidróxido de sodio al 1 N (NaOH). aforar con agua bidestilada a 1000 mL.

Solución B

Pesar 2 g de tartrato de sodio y potasio; 1 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); disolver con agua bidestilada y agregar 10 mL de hidróxido de sodio 1N (NaOH). Aforar con agua bidestilada a 100 mL.

Solución C

Se prepara hasta el momento de usarse.

reactivo de Folin - Ciocalteus 1 vol

agua destilada 15 vol

de preferencia en un recipiente ámbar para protegerlo de la luz.

*Para saber cuanto se va a preparar, aplicar la siguiente formula:

$$VT = (\text{No de tubos} \times 3 \text{ mL}) + 1 \text{ mL}$$

$$V \text{ agua} = VT \times 0.9375$$

$$V \text{ reactivos} = VT - V \text{ agua}$$

Solución estándar de albúmina sérica bovina.

Para prepara la solución estándar de una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tomando en cuenta que la albúmina sérica bovina (SBA) tiene 94% de proteína, pesar 106 mg de SBA, disolver y aforar con agua bidestilada a 100 mL. Hacer alícuotas de 10 mL aproximadamente y congelarlas. Para cada curva estándar se utiliza una alícuota.