

72  
2e.j  
J

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SEPARACION  
DE FRACCIONES SUBCELULARES DEL  
HIGADO, DEL MUSCULO Y DE LA  
GLANDULA MAMARIA DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARTHA ELENA DEL PRADO MANRIQUEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1988  
PROFESIONAL  
QUIMICA



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 está 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.

# I N D I C E

	PAG.
I. INTRODUCCION.	1-7
II. OBJETIVOS.	8
III. MATERIALES Y METODOS	
1.- Animales.	9
2.- Obtención de los tejidos.	9
3.- Homogeneización.	9-12
3.1. Homogeneización en Potter Elvehjem.	
3.1.1. Homogeneizador.	
3.1.2. Método.	
3.2. Homogeneización en Polytron.	
3.2.1. Homogeneizador.	
3.2.2. Método.	
4.- Filtración del homogeneizado.	12
5.- Separación de las fracciones subcelulares por centrifugación.	12-14
6.- Tratamiento para los homogeneizados de la glándula mamaria previo a el fraccionamiento subcelular.	14-15
7.- Caracterización de las fracciones	

subcelulares.	15-20
7.1. Determinación de la actividad de la 5'Nucleotidasa.	
7.2. Determinación de la actividad de la succinato deshidrogenasa.	
7.3. Determinación de la actividad de la deshidrogenasa láctica.	
7.4. Determinación de la actividad de la glucosa-6-fosfato fosfatasa.	
8.- Cuantificación del fosfato inorgánico.	20
9.- Cuantificación de proteínas.	21

#### IV. RESULTADOS.

1.- Separación de los lípidos del homogeneizado de la glándula mamaria.	22-25
1.1. Formación del gradiente.	
1.2. Tipos de rotores.	
1.3. Tiempo de centrifugación.	
2.- Distribución de las actividades enzimáticas.	25-32
2.1. 5'Nucleotidasa.	
2.2. Succinato deshidrogenasa.	
2.3. Glucosa-6-fosfato fosfatasa.	

2.4. Deshidrogenasa láctica.	
3.- Recuperación de las actividades enzimáticas.	32-33
4.- Determinación de proteínas	33-34
V. DISCUSION.	35-44
VI. CONCLUSIONES.	45
VII. SECCION DE TABLAS.	46-60
VIII. SECCION DE FIGURAS.	61-79
IX. BIBLIOGRAFIA.	80-87

## I - INTRODUCCION

Para los mamíferos la lactancia es un proceso muy importante en la conservación de la cría y por lo tanto para la conservación de la especie.

Una mujer bien alimentada, puede mantener de manera adecuada el estado de nutrición de su hijo hasta el sexto mes de vida. En el medio rural, los niños suelen ser alimentados exclusivamente con leche materna por periodos de 9 a 12 meses ( 1 ).

La leche de cada especie está constituida biológicamente para satisfacer las necesidades de la nutrición de esa especie en particular, es adecuada al grado de madurez metabólica al nacimiento y a la velocidad de crecimiento posnatal. En la tabla 1 se muestran algunas de las diferencias en la composición de la leche humana madura comparada con la leche de vaca ( 2 ).

Además de los componentes nutricionales, la leche materna contiene factores inmunológicos que protegen al niño contra enfermedades respiratorias y enterales ( 2 ). En la tabla 2 se enlistan los factores anti infecciosos de la leche materna ( 3,4 ).

Los sustratos para la síntesis de los componentes de la leche pueden obtenerse tanto de la dieta de la madre como de la movilización de sus reservas corporales (particularmente del tejido adiposo) ( 5 ). La magnitud de esta movilización está directamente relacionada con el gasto de la lactancia y la ingesta ( 6 - 9 ).

En mujeres con dietas deficientes, los materiales proporcionados por la dieta son mínimos y deben recurrir a las reservas corporales con mayor intensidad ya que la composición láctea en cuanto a contenido calórico y de macronutrientes no muestra diferencias entre una madre bien nutrida y una mal nutrida (10- 11 ) aunque el volumen total producido es menor en mujeres mal nutridas ( 6 ).

En el caso de las mujeres con dieta baja en contenido proteico, debe ocurrir una movilización de aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas de los tejidos de la madre ya que los lípidos y carbohidratos no pueden ser sustratos para la síntesis de proteínas.

Se ha descrito en la literatura que por la acción de los glucocorticoides, el músculo cataboliza sus proteínas (12, 13), esto podría explicar que al menos



los aminoácidos provenientes de las proteínas musculares pudieran ser movilizados hacia el plasma y de ahí a la glándula mamaria para la síntesis de la leche.

Para que esto se cumpla, es necesario que exista una acción concertada de estos procesos, al menos durante la lactancia, y para ello se requiere de la participación de varios factores, entre ellos y en forma importante de las hormonas.

Por ejemplo, en la regulación del crecimiento y el desarrollo de la glándula mamaria, intervienen varias de ellas, y la prolactina ( PRL ) es la principal hormona que controla la actividad mamaria. En algunas especies, el lactógeno placentario ( LP ) parece tener un papel similar al de la prolactina y además, posee propiedades similares a la hormona de crecimiento ( HC ). Esta es responsable de la estimulación de la producción de somatomedina ( SM ) por el hígado, la cual junto con la insulina ( INS ) están involucradas en la multiplicación celular.

El ovario y la placenta de ciertas especies de mamíferos, secretan hormonas esteroides, estrógenos ( E2 ) y progesterona (Pg), que son los responsables de la diferenciación de la glándula mamaria. Los

glucocorticoides adrenales amplifican todos los efectos de la prolactina, las hormonas de la tiroides, pueden ser estimuladoras o inhibidoras dependiendo de la dosis y una hormona hipofisiaria, la oxitocina ( OXY ), es responsable del reflejo de bajada de la leche a través de su acción sobre las células mioepiteliales de la glándula mamaria ( fig. 1 ) ( 14 ).

La Prolactina tiene también un papel importante en la producción de la leche al aumentar la síntesis de caseína, alfa lactalbumina y ácidos grasos de cadena media ( 15 - 18 ). La acción de esta hormona podría concertar los procesos antes mencionados.

Sin embargo no sería necesario que la Prolactina fuera directamente responsable de esa acción sino que generara su efecto a través de los productos de otras glándulas. Por ejemplo, si las glándulas suprarrenales respondieran a las necesidades de la glándula mamaria, la acción de la Prolactina provocaría una elevación en los glucocorticoides circulantes, lo que lograría movilizar aminoácidos provenientes de los tejidos periféricos.

Ya que el evento inicial para la acción de una hormona polipeptídica involucra la unión específica

de esta a una molécula receptora que solo esta presente en la membrana plasmática de las células de los tejidos blanco (19-20), se puede sugerir la presencia de un receptor para la Prolactina en las suprarrenales, sin descartar la posible presencia de un receptor en las células musculares.

La presencia de un receptor específico para la Prolactina, en el tejido mamario fué establecida por Turkington ( 21 ) utilizando Prolactina unida covalentemente a Sepharosa y fué confirmado por Birkenshaw y Falconer (22) por medio de autorradiografía.

Los sitios receptores para la Prolactina han sido identificados en varios tejidos entre los que se encuentran, además de la glándula mamaria, el hígado, los ovarios, los testículos, la próstata, las glándulas adrenales, los riñones, etc. lo que indica que la Prolactina interviene en el metabolismo de esos tejidos ( 23 - 31 ).

Sin embargo, estos receptores fueron localizados y caracterizados en una fracción celular de glándula mamaria de coneja que contenía como contaminantes principales aparato de Golgi y retículo endoplásmico tanto liso como rugoso y no en una fracción purificada

de membrana plasmática, problema que representa serios obstáculos cuando se desea estudiar las propiedades de fracciones proteicas específicas como son los receptores y determinar sus mecanismos de acción. Por lo tanto es deseable disponer de una fracción subcelular purificada para realizar cualquier estudio de este tipo.

Existen descritos en la literatura esquemas para lograr aislar las diferentes fracciones subcelulares de varios tejidos, incluyendo la membrana plasmática ( 32 - 42 ). Sin embargo, cuando se desea utilizar alguno de estos métodos para aislar alguna fracción de un tejido distinto, es necesario determinar las condiciones óptimas para la aplicación de cada uno de los pasos descritos en el procedimiento original y realizar las modificaciones necesarias.

En vista de que nuestro interés es correlacionar en los diferentes tejidos de la rata, las variaciones en la concentración del receptor para la prolactina con el metabolismo intermediario bajo ciertas condiciones de nutrición, era necesario, como un primer paso fundamental, obtener las fracciones subcelulares de los diferentes tejidos de la rata e identificar en estas la fracción enriquecida con plasmalema. A partir de esta

preparación enriquecida puede realizarse una purificación de la membrana plasmática a fin de estudiar al receptor para la prolactina sin la interferencia de partículas subcelulares contaminantes.

## II - OBJETIVOS

Aislar fracciones subcelulares de la glándula mamaria, del músculo y del hígado de la rata.

Utilizando marcadores enzimáticos, identificar la localización de cada fracción subcelular y determinar su pureza.

Identificar en las fracciones subcelulares obtenidas la o las fracciones enriquecidas con membrana plasmática.

Conocer el efecto del método de homogeneización sobre la distribución subcelular en los diferentes tejidos de la rata.

### **III - MATERIALES Y METODOS**



### 1.- ANIMALES:

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembras adultas, no vírgenes, alimentadas "ad libitum" con NUTRICUBOS de Purina y agua.

### 2.- OBTENCION DE LOS TEJIDOS:

Las ratas se sacrificaron con CO<sub>2</sub>. Las glándulas mamarias inguinal y pectoral, el músculo de las extremidades posteriores y el hígado, se diseccionaron inmediatamente. Los tejidos se colocaron en vasos de precipitado que contenían solución fría de sacarosa 0.25M y el peso de los tejidos se determinó por diferencia. Los tejidos se cortaron en pedazos pequeños eliminándose el sobrenadante por decantación. Se añadió nuevamente solución fría de sacarosa y se picó el tejido finamente. El procedimiento se repitió hasta que el sobrenadante era claro.

Para evitar daños en las actividades enzimáticas todos los pasos siguientes fueron realizados manteniendo el tejido y las soluciones entre 0-5 grados C.

### 3.- HOMOGENEIZACION:

Se utilizaron dos métodos de homogeneización.

### 3.1. HOMOGENEIZACION EN FOTTER-ELVEHJEM:

#### 3.1.1. HOMOGENEIZADOR:

El homogeneizador consta de un tubo de vidrio de paredes lisas en el que se inserta un pistilo de teflón. El tubo que se mantiene en hielo durante todo el procedimiento se sube y se baja contra el pistilo que gira con ayuda de un motor, hasta que todo el material suba forzosamente entre las paredes del tubo y el pistilo (Fig.2).

#### 3.1.2. METODO:

El tejido finamente picado se colocó en el vaso del homogeneizador junto con 5 o 10 volúmenes de solución de sacarosa 0.25M si se trata del músculo y del hígado respectivamente y con 3 volúmenes de sacarosa 0.3M si el tejido era glándula mamaria. El tiempo de homogeneización varió dependiendo de la consistencia del tejido en estudio.

Por ejemplo, el hígado se homogeneizó durante 30 seg, mientras que el músculo y la glándula mamaria se homogeneizaron por 30 seg con intervalos de reposo de 30 seg hasta que se acumularon 7 min. Los intervalos de

reposito tuvieron como finalidad evitar el calentamiento de la muestra y la posible pérdida de actividad enzimática. En los experimentos diseñados para estudiar específicamente la succinato deshidrogenasa, el homogeneizado se preparó en una solución de sacarosa 0.25M adicionada de 1mM de EDTA.

### 3.2. HOMOGENEIZACION EN POLYTRON:

#### 3.2.1. HOMOGENEIZADOR:

El homogeneizador consta de un juego de cuchillas colocadas dentro de un cilindro de acero inoxidable dentado en el extremo inferior. Las cuchillas giran a velocidad graduable con ayuda de un motor. El tejido que se va a homogeneizar se coloca dentro de un vaso de vidrio especial. Las cuchillas se sumergen dentro del vaso que contiene el tejido a homogeneizar y se selecciona la velocidad. El tejido es homogeneizado cuando entra en contacto con las cuchillas y el borde del cilindro (Fig.3).

#### 3.2.2. METODO:

El tejido finamente picado se colocó en un vaso de vidrio especial que se mantuvo en hielo durante todo el procedimiento. Ya que el tratamiento es muy vigoroso,

todos los tejidos se homogeneizaron solamente durante un min a la velocidad 5. Los volúmenes de solución de sacarosa empleados son los mismos que se mencionaron para la homogeneización en Potter-Elvehjem.

#### 4.- FILTRACION DEL HOMOGENEIZADO:

Después de homogeneizar por cualquiera de los dos procedimientos descritos, la preparación se filtró a través de una capa de organdi si se trataba de hígado y a través de dos capas de tul para el músculo y la glándula mamaria. Una fracción de este filtrado se conservó para las determinaciones químicas y enzimáticas.

#### 5.- SEPARACION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES POR CENTIFUGACION:

El procedimiento que se describe se realizó de igual forma para los tres tejidos solo que en el caso de la glándula mamaria la muestra se somete a un tratamiento previo que será descrito en el inciso 6.

El homogeneizado una vez filtrado se centrifugó a 1,000xg durante 10 min en una centrifuga Sorvall refrigerada modelo RC-5B utilizando un rotor SS-34. El

sobrenadante se decantó y se conservó para su empleo posterior.

El residuo que contiene principalmente los núcleos, las fracciones grandes de membrana y las células intactas se resuspendió en sacarosa 0.25M, se homogeneizó y se centrifugó nuevamente en las condiciones mencionadas. El residuo (R1) se resuspendió finalmente en 2 ml de sacarosa 0.25M. El sobrenadante de esta segunda centrifugación se combinó con el sobrenadante de la primera y se centrifugaron a 5,000xg durante 10 min. El residuo obtenido (R5) que está enriquecido con la fracción mitocondrial se lavó resuspendiéndolo en sacarosa 0.25M y centrifugándolo nuevamente en las mismas condiciones de velocidad y tiempo.

El residuo (R5) se resuspendió en 2 ml de sacarosa 0.25M.

El sobrenadante se centrifugó a 10,000xg durante 10 min. El residuo (R10) enriquecido en lisosomas, se lavó de la misma forma que el residuo R5 y finalmente se resuspendió en 2 ml de sacarosa 0.25M.

El sobrenadante se centrifugó a 20,000xg durante 20 min para obtener la fracción enriquecida en retículo endoplásmico liso (R20). El residuo, al igual que los anteriores se lavó y se resuspendió en sacarosa 0.25M.

Finalmente el sobrenadante se centrifugó a 100,000xg durante 60 min en una ultracentrifuga Beckman modelo LB-80 usando un rotor 80Ti. El sobrenadante obtenido es denominado fracción soluble o citosol. El residuo se resuspendió en 2 ml de sacarosa 0.25M.

Todas las fracciones aisladas fueron conservadas en frío hasta realizar la determinación de las actividades enzimáticas.

La figura 4 muestra el esquema de fraccionamiento por centrifugación diferencial que se realizó para la obtención de las fracciones subcelulares de la glándula mamaria, el músculo y el hígado.

#### 6.- TRATAMIENTO PARA LOS HOMOGENEIZADOS DE LA GLÁNDULA MAMARIA PREVIO A EL FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR:

La glándula mamaria contiene una gran cantidad de lípidos que flotan al aplicar cualquier método de separación. Debido que estos lípidos al flotar arrastran a una gran parte de los organelos se diseñó un procedimiento que permitiera separar los lípidos, antes de aplicar los métodos de separación subcelular.

Se preparó un homogeneizado en proporción 1:3 (p/v) de glándula mamaria en sacarosa 0.33M. Tres ml del homogeneizado una vez filtrado, se colocaron en el fondo de un tubo sobre el cual se depositaron 2.5 ml de

sacarosa 0.18M, 1.5 ml de sacarosa 0.12M y 1.0 ml de sacarosa 0.075M para generar un gradiente discontinuo de sacarosa. Todas las soluciones de sacarosa contenían 1mM de EDTA. Las soluciones fueron depositadas con la ayuda de una bomba peristáltica (Varioperpex LKB Productter) para evitar que el homogeneizado se resuspendiera en una de las soluciones de sacarosa de menor concentración.

Una vez formado el gradiente de flotación los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 2,000xg en una centrifuga DAMON IEC Div. modelo PR-J con un rotor 269 manteniendo la temperatura a 4 grados centígrados. Durante la centrifugación, los lípidos flotaron hacia la solución de sacarosa menos concentrada y pudieron separarse fácilmente con ayuda de una espátula. La sacarosa 0.075M se separó junto con la capa de lípidos por su apariencia turbia. Al volumen resultante se le agregaron 4 ml de sacarosa 0.4M con 1mM de EDTA para obtener una concentración final de sacarosa 0.25 (ver figura 5).

El procedimiento de fraccionamiento subcelular que se aplicó a este homogeneizado descremado fué el mismo que se describió para el hígado y el músculo.

#### 7.- CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES:

Las fracciones de los tres tejidos obtenidas de la centrifugación diferencial fueron caracterizadas mediante la determinación de la actividad de las siguientes enzimas: la 5'nucleotidasa (E.C. 3.1.3.5.) para identificar la membrana plasmática, la succinato deshidrogenasa (E.C. 1.3.9.9.) localizada en la membrana interna de la mitocondria, la glucosa-6-fosfato fosfatasa (E.C.3.3.3.9) que identifica a la fracción microsomal y la deshidrogenasa láctica (E.C.1.1.1.27) del citosol.

La determinación de las actividades de la succinato deshidrogenasa y de la glucosa-6-fosfato fosfatasa se realizó el mismo día del fraccionamiento subcelular ya que se observó que el congelamiento de la muestra disminuía la actividad enzimática.

La 5'Nucleotidasa y la deshidrogenasa láctica se determinaron al día siguiente del fraccionamiento, para ello el homogeneizado se conservó a -20 grados centígrados. Se ha descrito que estas enzimas son estables por semanas en soluciones congeladas ( 43 - 44 ).

#### 7.1.DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA 5'NUCLEOTIDASA:

Esta enzima cataliza la hidrólisis del fosfato que esterifica la posición 5' de la ribosa o desoxirribosa



en las moléculas de los nucleótidos. Esta enzima se asocia con la membrana citoplásmica ( 37 ).

Para la determinación se utilizó el procedimiento descrito por Touster y Aronson ( 34 ). La actividad enzimática se midió a 37 grados C en un volumen total de 500 $\mu$ l que contenía 5mM de AMP, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 50mM de un amortiguador de glicina pH 9.1 y 100 $\mu$ l de la fracción proteica. Después de 60 min, la reacción se detuvo adicionando TCA al 8%. Los tubos se centrifugaron a 1500rpm durante 10 min y una alícuota del sobrenadante se utilizó para analizar su contenido de fosfato inorgánico empleando el método de Fiske y Subbarow. Para cada fracción se incluyó un tiempo cero.

La actividad específica se expresa como  $\mu$ moles de fosfato liberado por mg de proteína en el tiempo y condiciones arriba indicadas.

## 7.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA:

La enzima succinato deshidrogenasa transfiere hidrógenos del ácido succínico a un colorante de tetrazolio, reduciéndolo en azul de formazan. Esta enzima se asocia con la membrana interna de la mitocondria ( 45 ).

Para su determinación se utilizó el procedimiento descrito por Pennington ( 45 ). Para ello, se incubaron durante 15 min a 37 grados C en un volumen final de 1.0 ml la fracción proteica, un amortiguador de fosfato 50mM, pH 7.4, 2-(p-yodo fenil) 3-(p-nitrofenil) 5-feniltetrazolio (INT) 0.1%, succinato de sodio 50mM y sacarosa 25mM. La reacción se detuvo con TCA al 10% y se adicionaron de 2.0 a 4.0 ml de acetato de etilo para extraer el formazan producido. Después de mezclar vigorosamente, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. La densidad óptica de la fase de acetato de etilo se midió a 490nm y la actividad de la enzima se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del formazan ( $20.1 \times 10^3$ ).

La actividad específica se expresa como nmoles de formazan producido por mg de proteína en las condiciones mencionadas.

### 7.3.DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA LACTICA:

En este ensayo se aprovecha la propiedad de esta enzima del citoplasma para catalizar en forma reversible la oxidación del ácido láctico, empleando los hidrógenos del NADH.

Para ello, se colocaron en una celda de 1cm de vía óptica y de 3.0 ml de capacidad, 100µl de piruvato de

sodio 0.01M, 100 $\mu$ l de NADH 2mM, 1.0 ml de amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4, 100-200 $\mu$ l de la solución proteica y agua destilada para obtener un volumen final de 3.0ml. Se determinó la disminución de la densidad óptica a 340 nm durante 3-5 minutos. La actividad de la enzima se calcula utilizando el coeficiente de extinción molar del NADH ( $6.22 \times 10^3$ ) ( 43 ).

La determinación para cada muestra se realizó por duplicado.

La actividad específica se expresa como nmoles de NADH oxidado por mg de proteína en un min en las condiciones indicadas anteriormente.

#### 7.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO FOSFATASA:

Esta enzima cataliza la hidrólisis del fosfato que esterifica el hidroxilo 6 de la glucosa 6-fosfato. La enzima se localiza en el retículo endoplásmico ( 38 ).

Para su determinación se utilizó el método descrito por Aronson y Touster ( 37 ). En un volumen final de 500 $\mu$ l se incubaron durante 60 min a 37 grados C, 100 $\mu$ l de glucosa 6-fosfato 0.1M, pH 6.5, 250 $\mu$ l de amortiguador de histidina 35mM, pH 6.5, 50 $\mu$ l de NaF 10mM y 100 $\mu$ l de la fracción proteica.

La reacción se detuvo adicionando 2.5ml de TCA al 8% y los tubos se centrifugaron durante 10 min a 1,500 rpm. De los sobrenadantes se tomaron alícuotas para determinar en ellos, por el método de Fiske y Subbarow, la concentración fosfato inorgánico liberado.

Cada determinación se realizó por duplicado y se incluyó un tiempo cero para cada fracción.

La actividad específica se expresa como nmoles de fosfato liberado por mg de proteína en el tiempo y condiciones descritas.

#### 8.-CUANTIFICACION DEL FOSFATO INORGANICO:

Se utilizó el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow ( 46 ).

El método consiste en hacer reaccionar el fosfato inorgánico, en medio ácido, con ácido molibdico para formar un compuesto de ácido fosfomolibdico, el cual se reduce con ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, para formar una sustancia de color azul intenso llamada azul de molibdeno.

Se construyó una curva patrón, que contenía concentraciones de fosfato inorgánico entre 0.15 a 1.5 $\mu$ M.

#### 9.- CUANTIFICACION DE PROTEINAS:

Se determinó la concentración de proteína utilizando el procedimiento descrito por Itzhaki y Gill ( 47 ).

El método se basa en la medición de la absorción en la región ultravioleta del complejo formado entre la proteína y el cobre en una solución de sulfato de cobre 0.21% en hidróxido de sodio 30%.

Cada fracción se diluyó en diferente proporción con agua destilada, para tener densidades ópticas dentro de los límites de sensibilidad de la curva estándar. Un ml de cada dilución se hace reaccionar con la solución alcalina antes mencionada. Una vez que la proteína reaccionó con el cobre durante 10 min, la mezcla de reacción se extrajo con 2 ml de tetracloruro de carbono para eliminar los lípidos que pueden interferir en la determinación.

La curva estándar se elaboró usando albúmina sérica bovina en un intervalo de concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/ml.

## IV - RESULTADOS

## 1.- SEPARACION DE LOS LIPIDOS DEL HOMOGENEIZADO DE LA GLANDULA MAMARIA:

En los primeros intentos para obtener fracciones subcelulares de la glándula mamaria, se presentó el problema de que los lípidos del tejido, al flotar, arrastraban consigo a las partículas subcelulares de manera que al realizar la centrifugación diferencial no era posible obtener residuo alguno.

Por lo tanto para aislar las fracciones subcelulares, fué necesario diseñar un procedimiento que sin dañar los organelos, permitiera separar los lípidos del tejido antes de realizar el fraccionamiento.

### 1.1. FORMACION DEL GRADIENTE:

Ya que la capa de lípidos flotaba, se pensó en la necesidad de colocar en su trayectoria algunos obstáculos que impidieran que durante su migración libre hacia la superficie arrastrara a las partículas subcelulares. Para ello se utilizaron gradientes discontinuos de sacarosa en donde el homogeneizado de la glándula mamaria formado en una solución concentrada de sacarosa, se colocaba en el fondo de los

tubos de plástico. Sobre este homogeneizado se depositaron varias capas de soluciones de sacarosa de menor concentración. Los gradientes de flotación que inicialmente se utilizaron fueron los siguientes.

- tipo 1 0.25M, 0.4M, 0.6M, 0.8M (homogeneizado)
- tipo 2 0.25M, 0.4M, 0.6M, 1.0M (homogeneizado)
- tipo 3 0.25M, 0.4M, 0.8M, 1.6M (homogeneizado)

El gradiente se centrifugó para separar la capa lipídica.

Si bien los tres gradientes cumplieron con el propósito de separar los lípidos, la recuperación de las actividades enzimáticas fué muy baja. Pensando que las partículas y sus enzimas pueden dañarse por la presencia de las concentraciones elevadas de sacarosa, se probó la preparación de gradientes de sacarosa en donde el homogeneizado fuera preparado en concentraciones isosmóticas de ella. Así fué como se encontró que con un gradiente de 0.075M, 0.12M, 0.18M, 0.3M (homogeneizado) se podían separar los lípidos y obtener recuperaciones de las actividades enzimáticas mayores al 90%.

#### 1.2. TIPOS DE ROTORES:



Las primeras centrifugaciones se realizaron en un rotor de ángulo fijo y no fué posible separar adecuadamente los lípidos ya que una parte quedaba adherida a las paredes del tubo. Esto se resolvió con la ayuda de un rotor de columpio que permitió que la capa de lípidos migrara a la superficie dejando a las partículas subcelulares libres concentradas al fondo del tubo.

### 1.3. TIEMPO DE CENTRIFUGACION:

Para evitar el daño de las enzimas, se probaron diferentes tiempos de centrifugación esperando obtener en el menor tiempo posible, la separación de la capa lipídica. Así, se probaron 5, 10, 15, 20 y 30 min de centrifugación a  $2,000 \times g$ . El tiempo óptimo para formar una capa compacta de lípidos, en la superficie del gradiente, fue de 10 min. Esta capa puede ser separada fácilmente con ayuda de una espátula. El exceso de lípidos adheridos a las paredes del tubo se eliminó con un hisopo.

Se observó que empleando tiempos de centrifugación mayores de 15 min, una capa de organelos comenzaba a formarse por debajo de la capa lipídica. A los 30 min esta capa tiene un grosor considerable. En vista de que

retirar esta última capa puede producir pérdidas apreciables de algunos organelos, se tomó la decisión de centrifugar todos los gradientes solamente durante 10 min.

El procedimiento resumido se describe en material y método.

## 2.- DISTRIBUCION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS:

### 2.1 5'NUCLEOTIDASA:

En la figura 6 se observa que la distribución de la actividad de la 5'Nucleotidasa en los homogeneizados del hígado muestra diferencias en relación con el método de homogeneización. Cuando el tejido se homogeneizó con Potter-Elvehjem, la actividad se concentró predominantemente en los residuos 1, 20 y 100 mientras que cuando se utilizó el Polytron, la enzima se distribuyó homogéneamente en todas las fracciones.

Los valores de la actividad específica y del porcentaje de actividad específica relativa se muestran en la tabla 3. El porcentaje de actividad específica relativa es el por ciento de la actividad de

cada fracción con respecto a la suma de actividades de todas las fracciones.

La distribución de la actividad de 5'Nucleotidasa en el músculo (Fig.7) no parece mostrar diferencias dependiendo del método usado para la homogeneización, aún cuando las condiciones fueron francamente diferentes pues la homogeneización utilizando Potter-Elvehjem duró 7 minutos con intervalos alternados de descanso, mientras que utilizando Polytron solo se homogeneizó durante 1 minuto.

Es importante observar que el mayor porcentaje de la actividad específica (34-38%) se localizó en el residuo 100.

Las actividades específicas y los porcentajes de la actividad específica relativa para el músculo, se muestran en la tabla 5.

La distribución de la actividad de 5'Nucleotidasa en la glándula mamaria tal como se muestra en la fig 8, tiene un comportamiento parecido a lo que se observó con el músculo, en donde la distribución se ve poco modificada por el método de homogeneización. Al utilizar ambos métodos, la actividad se hizo presente en todas las fracciones concentrándose en los

residuos 20 y 100 (27 y 29% para Potter y 26 y 22% para Polytron).

Los valores de actividad específica y los porcentajes de la actividad específica relativa para la glándula mamaria se muestran en la tabla 7.

## 2.2. SUCCINATO DESHIDROGENASA:

En los primeros estudios para establecer las condiciones óptimas para determinar la actividad de la deshidrogenasa succínica, las recuperaciones de la actividad eran menores al 30%. Por lo tanto se buscó en la literatura algunas condiciones que permitieran estabilizar la actividad durante los pasos de cualquier secuencia o tratamiento. Así, se encontró que el EDTA parece estabilizar la enzima (45) por lo que se decidió realizar algunos experimentos de aislamiento de la fracción mitocondrial (R-5) en presencia y en ausencia del EDTA. También, se estudió, en forma simultánea, el efecto de la concentración de proteína de esa misma fracción durante la incubación.

La tabla 9 muestra los resultados obtenidos en el homogeneizado y en la fracción mitocondrial. Se puede observar que al realizar la dilución 1:2 con sacarosa 0.25M de cada una de las fracciones, la actividad es la

mitad de la fracción sin diluir, sin embargo al diluir al doble (1:4) la fracción previamente diluida (1:2), la actividad es menor del 40% y al realizar una tercera dilución el efecto es mayor puesto que se observa solamente un 17% de la actividad de la fracción mitocondrial. Por el contrario, realizar las tres diluciones sucesivas de ambas fracciones con la sacarosa-EDTA se afecta en mucho menor proporción la actividad puesto que todos los valores fueron superiores al 43%.

A diferencia de lo que se observó para la distribución de la 5'Nucleotidasa, la actividad de succinato deshidrogenasa en hígado no mostró diferencias con el método de homogeneización utilizado, encontrándose la mayor actividad (60%) en el residuo 5 descrito clásicamente como fracción mitocondrial ( 38 ) (Fig 9).

En la misma forma se distribuyó la succinato deshidrogenasa en las fracciones subcelulares de músculo enriqueciendo el residuo 5 (Fig. 10).

Las actividades específicas y los porcentajes de la actividad específica relativa se muestran en las tablas 3 y 5 para el hígado y el músculo respectivamente.

La distribución de la succinato deshidrogenasa en la glándula mamaria mostró diferencias con los otros tejidos. La enzima no se distribuyó en forma predominante en una fracción sino que se encuentra distribuida entre las fracciones R 5 y R 100 independientemente del tipo de homogeneizador que se haya utilizado.

Esto pudiera significar la existencia de varias poblaciones mitocondriales en la glándula mamaria, o bien que el tratamiento previo del tejido para la separación de los lípidos pudiera afectar la densidad de las mitocondrias. Se ha descrito que la densidad de estos organelos se ve modificada cuando se someten a soluciones no isosmóticas. Rossano y Jones ( 48, 49 ) observaron que la densidad de las mitocondrias de la glándula mamaria de rata disminuía cuando se encontraban en un medio hipertónico.

Durante la separación de los lípidos de la glándula mamaria que se describe en este trabajo se utilizó un gradiente de flotación en el cual algunas fracciones subcelulares pueden estar en contacto con soluciones hipotónicas de sacarosa. Aún cuando el tiempo de exposición a este medio es breve (10 min),

puede ser suficiente para que la densidad de las mitocondrias sea modificada (Fig.11).

### 2.3. GLUCOSA 6-FOSFATO FOSFATASA:

La distribución de esta enzima en hígado y en músculo no mostró diferencias con el método de homogeneización.

En el hígado alrededor del 50% de la actividad específica relativa se localizó en las fracciones 20 y 100 (Fig.12). Fracciones que han sido descritas como enriquecidas con retículo endoplásmico ( 38, 39 ).

En el músculo, a diferencia de lo que se observó en el hígado, una parte importante de la actividad específica relativa se localizó en el citosol (39 y 36%) (Fig.13), esto significa que ambos procedimientos de homogeneización son vigorosos para tejidos como es el músculo ya que fraccionan el retículo endoplásmico en vesículas pequeñas que no son sedimentadas en 60 min a velocidades hasta de 100,000 veces la gravedad.

La actividad específica y los porcentajes de la actividad específica relativa se muestran en las tablas 4 y 6 para el hígado y el músculo respectivamente.

No fué posible determinar la actividad de la glucosa-6-fosfato fosfatasa en la glándula mamaria.

#### 2.4. DESHIDROGENASA LACTICA:

Esta enzima localizada en el citosol ( 39 ) mostró una distribución característica para los tres tejidos estudiados (Fig. 14-16).

En el hígado el 77% de la actividad se ubica en el sobrenadante al ser homogeneizado el tejido con el Polytron, mientras que cuando se utilizó el Potter dos fracciones la R 10 y el sobrenadante sumaron el 76%.

En el músculo y en la glándula mamaria fué posible detectar actividad de lactato deshidrogenasa en fracciones diferentes del citoplasma, así, mientras en el músculo el contenido de la actividad en las fracciones R5, R10, R20 y R100 alcanza valores alrededor del 40%, con una distribución casi homogénea, en la glándula mamaria se obtuvo un 49% de la actividad para las mismas fracciones con predominio de la fracción R5 (mitocondrial) en donde se observó casi el 25% de la actividad total.

La diferencia de estos tejidos con el hígado puede deberse a la presencia de vesículas que contienen en su interior o adsorbida en la parte



externa de su membrana, material citoplásmico lo que pudo modificar el patrón de distribución característico de la enzima del citosol.

En las tablas 4, 6 y 8 se muestran las actividades específicas y los porcentajes de actividad específica relativa para el hígado, el músculo y la glándula mamaria respectivamente.

### 3.- RECUPERACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS:

La tabla 10 muestra los porcentajes de recuperación logrados en todos los experimentos realizados.

Estas recuperaciones dependieron de las características del tejido utilizado. La enzima con mejor recuperación fue la 5'Nucleotidasa en donde se logró obtener más del 73% de la actividad en cualquier tejido.

Se logró una buena recuperación de la deshidrogenasa succínica tanto en el hígado como en la glándula mamaria, sin embargo en el músculo la recuperación promedio esta alrededor del 65%, probablemente debido a que se incluyen experimentos realizados en ausencia de EDTA.

La recuperación más baja fué la obtenida con la glucosa-6-fosfato fosfatasa (alrededor del 65%) tanto en el hígado como en el músculo.

En todos los casos las recuperaciones se calculan en función de la actividad mostrada por el homogeneizado total.

#### 4.- DETERMINACION DE PROTEINAS:

Como se indicó en material y métodos, la concentración de proteínas de cada fracción fué determinada utilizando el método descrito por Itzhaki y Gill ( 47 ).

Aunque para la mayoría de las muestras no hubo interferencia, las muestras de la glándula mamaria presentan turbiedad debida al alto contenido de lípidos de este tejido. Esta turbiedad produce una lectura inestable en el espectrofotómetro.

Para eliminar la turbidez, se trató la solución colorida con diferentes solventes para producir la solubilización de los lípidos. Para ello se probaron diclorometano, cloroformo, tolueno, hexano y tetracloruro de carbono, obteniendo con todos ellos dos fases, sin embargo, la extracción con tetracloruro de carbono produjo el mejor resultado pues la fase acuosa

puede ser obtenida con facilidad ya que el solvente permanece en el fondo del tubo. En la figura 17 se ilustran esquemáticamente los resultados obtenidos con los diferentes solventes.

Se confirmó, con una curva estándar, que la extracción con el tetracloruro de carbono no tuvo ningún efecto sobre el color desarrollado.

En las tablas 11, 12 y 13 se muestran los porcentajes de recuperación de proteína en las fracciones subcelulares del hígado, el músculo y la glándula mamaria respectivamente. En todos los casos se obtuvieron recuperaciones de más del 90%.

## V - DISCUSSION

Cuando se desean realizar estudios metabólicos con organelos aislados, la ruptura del tejido elegido para obtener un homogeneizado, es un paso clave para el éxito del fraccionamiento posterior. Esta ruptura puede realizarse por choque osmótico, por vibración o por fuerza mecánica ( 36 ).

En los esquemas para aislar las fracciones subcelulares de diferentes tejidos, se describen con detalle la composición del medio de homogeneización, la relación del peso del tejido con el volumen del medio, el tipo de homogeneizador empleado, la medida del espacio entre el pistilo y el vaso de homogeneización, el número de golpes realizados, etc.

Las condiciones de homogeneización deben ser suficientemente severas para romper todas las células y permitir una recuperación adecuada de las partículas y a la vez suficientemente suaves para obtener los organelos "intactos".

La composición del medio de homogeneización y su pH también son importantes ya que la presencia de iones divalentes como el calcio y el magnesio tiende a mantener las membranas asociadas una con otra lo que puede afectar el procedimiento de separación, sin

embargo, estos iones son necesarios para estabilizar la membrana, el núcleo y la unión de los ribosomas al retículo endoplásmico rugoso ( 39 ). Una disminución en el pH puede hacer a las células más resistentes a la homogeneización.

Por lo general, el soluto más utilizado en los medios de homogeneización para la mayoría de los tejidos estudiados es la sacarosa ( 34- 39 ). Sin embargo, algunos investigadores prefieren el uso de otras soluciones, así, Neville ( 40 ) sugiere para el hígado la homogeneización en agua fría amortiguada con 1mM de  $\text{NaHCO}_3$ . Este medio por ser hipotónico usa la fuerza osmótica para reducir la cantidad de fuerza mecánica que debe aplicarse al tejido, sin embargo, debe tomarse en cuenta que en este medio los núcleos, las mitocondrias y los lisosomas sufren lisis.

#### RUPTURA DEL TEJIDO:

Para evaluar la efectividad del procedimiento de homogeneización pueden seguirse dos criterios. Si el organelo que se desea estudiar tiene una morfología característica como la mitocondria, la microscopía electrónica puede usarse para evaluar la distribución de esta partícula y el daño sufrido durante la

homogeneización. Si la fracción subcelular contiene algún compuesto o enzima característico, puede usarse este como marcador para seguir al organelo a través de el fraccionamiento.

Es deseable que el procedimiento de homogeneización permita obtener fragmentos grandes de membrana plasmática, ya que en general los fragmentos grandes de plasmalema son más fácilmente separados de otros componentes del homogeneizado mediante el uso de gradientes de concentración, en cambio, los microsomas que son el principal contaminante de casi todas las preparaciones de membrana plasmática son difíciles de separar de las vesículas pequeñas de plasmalema ( 34, 36, 37 ).

En el presente trabajo se utilizaron dos métodos diferentes de homogeneización: el homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem y el Polytron, utilizando como medio de homogeneización sacarosa 0.25M.

Como se observa en los resultados, el procedimiento de homogeneización puede modificar la distribución de algunas fracciones subcelulares. Al comparar los resultados obtenidos para la distribución de la 5-Nucleotidasa en el hígado y en el músculo se deduce que cuando se homogeneiza un tejido suave como es el

hígado, el método de homogeneización tiene gran repercusión en la distribución subcelular (ver fig. 6), mientras que para un tejido duro (músculo) el método de homogeneización tiene poca influencia sobre la distribución (ver fig. 7) puesto que la enzima membranal se encuentra homogéneamente distribuida en todas las fracciones empleando ambos tipos de homogeneizador. Esto se resume en el siguiente esquema:

TEJIDO	HOMOGENEIZACION	RESULTADOS
SUAVE (hígado)	Potter-Elvehjem	Procedimien- to suave. Tiempo corto.
	Polytron	Procedimien- to energético. Tiempo corto.



TEJIDO	HOMOGENEIZACION	RESULTADOS
	Potter-Elvehjem	Procedimien- to suave. Tiempo prolongado.
DURO (músculo)	Polytron	Procedimien- to enérgico. Tiempo corto.

#### FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR:

Los componentes de una célula se pueden separar utilizando las propiedades de las partículas tales como la masa, el volumen, la densidad, la forma y carga.

Durante la centrifugación diferencial es posible sedimentar las partículas más grandes como son los núcleos, los fragmentos grandes de plasmalema y las células intactas a una velocidad de centrifugación relativamente baja. Si la velocidad de centrifugación se aumenta, las mitocondrias sedimentan y a velocidades

mayores y durante periodos más largos pueden separarse los lisosomas y vesículas pequeñas de retículo endoplásmico.

Para realizar la separación de las fracciones subcelulares del hígado, del músculo y de la glándula mamaria se utilizaron las condiciones de centrifugación que se han descrito en otros trabajos ( 38, 39 ).

A pesar de que existen descritos métodos para aislar algunas fracciones de la glándula mamaria ( 32, 48, 49 ), en ellos no se menciona que se presenten dificultades debido a la gran cantidad de lípidos que tiene este tejido. En nuestra experiencia fué imposible aislar las fracciones subcelulares de la glándula mamaria sin antes eliminar la capa lipídica.

El procedimiento que se diseñó para separar los lípidos del homogeneizado de la glándula mamaria es muy sencillo y requiere de un tiempo breve para su realización lo que permite conservar las actividades enzimáticas estables. Si bien la distribución de la 5'Nucleotidasa no muestra alteraciones con este procedimiento, la distribución de la succinato deshidrogenasa resulta afectada (Fig.11) por lo que es necesario ajustar las condiciones para que las

mitocondrias recuperen su densidad caracterfstica y puedan ser sedimentadas con la velocidad descrita clásicamente para este propósito ( 38 ).

#### ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES:

La pureza de las fracciones subcelulares se determina con el uso de ensayos enzimáticos, químicos o con microscopía electrónica. La microscopía electrónica es útil cuando se estudian organelos con morfología caracterfstica como es el caso de las mitocondrias y los núcleos, pero los lisosomas, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico liso y la membrana plasmática durante la homogeneización forman vesículas lisas que son difíciles de diferenciar.

La medición de la actividad de enzimas que estén localizadas específicamente en un organelo es más conveniente para determinar la contaminación de una fracción dada.

Algunas enzimas se utilizan como marcadores ya que se ha establecido su localización celular por medio de técnicas histoquímicas, algunas de estas enzimas son la galactosidasa y 5'nucleotidasa para membrana plasmática, la succinato oxido reductasa para la mitocondria, la arilsulfatasa y la fosfatasa ácida para los lisosomas, la N-acetil-glucosamina galactosil

transferasa para el aparato de Golgi, la glucosa-6-fosfato fosfatasa y la citocromo c reductasa insensible a la rotenona para el retículo endoplásmico y enzimas involucradas en la glucólisis para caracterizar el citoplasma ( 39 ). En otros casos, algún compuesto químico localizado principalmente en un organelo como es el caso de DNA para el núcleo y el RNA para los ribosomas es utilizado para caracterizar esas fracciones .

En el presente trabajo se utilizó la medición de las actividades de enzimas características de cada fracción como indicadores de contaminación. Para caracterizar la membrana plasmática se utilizó la 5'Nucleotidasa, para la fracción mitocondrial se utilizó la actividad de succinato deshidrogenasa medida como succinato INT oxido reductasa, para indicar presencia de retículo endoplásmico se utilizó la glucosa-6-fosfato fosfatasa y para caracterizar el citoplasma la actividad de lactato deshidrogenasa.

Se debe mencionar que aún cuando durante el procedimiento de fraccionamiento subcelular se evitó el calentamiento de las muestras manteniéndolas en hielo, algunas enzimas llegan a inactivarse como se observa al analizar los porcentajes de recuperación

(tabla 10). Sin embargo aunque los rendimientos no sean del 100% la distribución de una fracción subcelular sigue el mismo patrón para cada tejido y para las condiciones de homogeneización utilizadas independientemente de la recuperación.

Touster ( 34 ) reporta recuperaciones para la 5'Nucleotidasa y para la glucosa-6-fosfato fosfatasa en hígado del 100%. Aunque el método utilizado para determinar las dos enzimas es el descrito por estos autores, no se obtuvieron los mismos rendimientos. Sin embargo hay que señalar que ellos no refieren sus rendimientos al homogeneizado total sino a la suma de actividades de lo que llaman fracción nuclear y extracto (homogeneizado sin fracción nuclear).

La membrana plasmática tiene un papel muy importante en el metabolismo intracelular ya que además de intervenir en el transporte de sustancias necesarias para la célula mediante difusión, transporte activo y endocitosis también interviene en el desecho de sustancias no deseadas (exocitosis).

La membrana plasmática está involucrada en la locomoción y quimiotaxis de la célula y en la comunicación de una célula con otra. Además, posee sitios receptores para algunas hormonas, necesarios

para que la hormona produzca un efecto desencadenando cambios metabólicos dentro de la célula.

Nuestro interés es utilizar al receptor de prolactina como un índice de la respuesta hacia la prolactina en los diferentes tejidos de la rata durante la lactancia y el destete. Por lo anterior, es importante establecer la metodología para aislar fracciones enriquecidas de plasmalema en diferentes tejidos ya que a partir de estas preparaciones puede purificarse la membrana plasmática mediante el uso de gradientes de sacarosa y ser utilizadas en los estudios del receptor para hormonas protéicas posteriormente.

## **VI - CONCLUSIONES**

1.- Las condiciones de homogeneización repercuten en la distribución subcelular de las fracciones de membrana plasmática del hígado, pero no influyen en el músculo y la glándula mamaria.

2.- En el hígado las fracciones enriquecidas con membrana plasmática son las obtenidas a 1,20 y 100 mil xg (75.2% de la actividad total). Las condiciones de homogeneización que permiten obtener fracciones enriquecidas de membrana plasmática en este tejido son las correspondientes al Potter-Elvehjem.

3.- Para la glándula mamaria y el músculo las fracciones enriquecidas con membrana plasmática son las obtenidas a 20 y 100 mil xg (55.76% y 55.1% de la actividad total).

4.- Se sugiere homogeneizar la glándula mamaria y el músculo en Polytron ya que este procedimiento consume menor tiempo disminuyendo así los daños en las actividades enzimáticas.



## VII - SECCION DE TABLAS

- TABLA 1 Composición de la leche humana.
- TABLA 2 Factores anti infecciosos de la leche materna.
- TABLA 3 Distribución de la 5'Nucleotidasa y la succinato deshidrogenasa en fracciones subcelulares del hígado.
- TABLA 4 Distribución de la glucosa-6-fosfato fosfatasa y de la deshidrogenasa láctica en fracciones subcelulares del hígado.
- TABLA 5 Distribución de la 5'Nucleotidasa y la succinato deshidrogenasa en fracciones subcelulares del músculo.
- TABLA 6 Distribución de la glucosa-6-fosfato fosfatasa y de la deshidrogenasa láctica en fracciones subcelulares de músculo.
- TABLA 7 Distribución de la 5'Nucleotidasa y la succinato deshidrogenasa en fracciones de la glándula mamaria.
- TABLA 8 Distribución de la deshidrogenasa láctica en fracciones subcelulares de la glándula mamaria.
- TABLA 9 Efecto del EDTA en la actividad de la deshidrogenasa succínica del hígado de la rata.
- TABLA 10 Recuperación de las actividades

enzimáticas en el hígado, el músculo  
y la glándula mamaria.

TABLA 11 Determinación y recuperación de  
proteínas en el hígado.

TABLA 12 Determinación y recuperación de  
proteínas en el músculo.

TABLA 13 Determinación y recuperación de  
proteínas en la glándula mamaria.

TABLA 1

COMPOSICION DE LA LECHE HUMANA Y DE LA LECHE DE VACA

CONSTITUYENTE (g/l)	LECHE HUMANA MADURA intervalo	LECHE DE VACA intervalo
Energía (Kcal/l)	446-1192	587-876
Proteínas totales	7.3-20	28.16-36.76
Caseína	1.6-6.8	21.90-28.0
Lactoalbúmina	1.4-6.0	1.40-3.3
Grasa total	13.4-82.0	34.00-61.0
Lactosa	49.0-95.0	45.00-50.0
Sodio	0.030-0.450	0.392-1.390
Potasio	0.425-0.735	0.380-2.870
Calcio	0.207-0.372	0.560-3.810
Fósforo	0.068-0.268	0.560-1.120

Obtenido de (2)

TABLA 2

**FACTORES ANTI INFECCIOSOS DE LA LECHE MATERNA**

- Factor de crecimiento de lactobacillus bifidus.
- Inmunoglobulina A secretora.
- Complemento ( C1 - C9 ).
- Lactoferrina.
- Lactoperoxidasa.
- Lisozima.
- Factor anti estafilococcico.
- Células de la leche.
- Factor lipídico.
- Macromoléculas.

TABLA 3. EFECTO DEL TIPO DE HOMOGENEIZACION SOBRE LA DISTRIBUCION DE LAS DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DEL HIGADO DE LA RATA.

DISTRIBUCION DE LA 5'NUCLEOTIDASA

FRACCION	P O T T E R		P O L Y T R O N	
	Activ. especifica* ( $\mu$ molesP/mg prot.)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica ( $\mu$ molesP/mg prot.)	% activ. especific. relativa
HOMOG.	1.211		1.393	
R 1	1.401	18.5	1.493	18.2
R 5	0.550	7.34	1.437	17.5
R 10	1.094	14.46	1.439	17.5
R 20	1.678	22.18	1.579	19.27
R 100	2.611	34.52	2.145	26.16
Sn	0.211	2.9	0.107	1.3

DISTRIBUCION DE LA SUCCINATO  
DESHIDROGENASA

FRACCION	P O T T E R		P O L Y T R O N	
	Activ. especifica* (nmolesF/mg prot.)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica (nmolesF/mg prot.)	% activ. especific. relativa
HOMOG.	306.865		433.73	
R 1	541.93	30.2	661.45	33.4
R 5	1068.16	59.6	1134.15	57.2
R 10	73.31	4.2	120.31	6.5
R 20	55.09	3.1	31.08	1.6
R 100	46.6	2.6	17.74	0.9
Sn	7.46	0.4	7.45	0.4

\* Valor promedio de 4 experimentos.

La actividad de la 5'Nucleotidasa se expresa en  $\mu$ moles de fosfato liberado por mg de protefna y la actividad de succinato deshidrogenasa como nmoles de formazan producido por mg de protefna.

TABLA 4. EFECTO DEL TIPO DE HOMOGENEIZACION SOBRE LA DISTRIBUCION DE LAS DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DEL HIGADO DE LA RATA.

DISTRIBUCION DE LA GLUCOSA 6-P  
FOSFATASA

FRACCION	P O T T E R		P O L Y T R O N	
	Activ. especifica <sup>a</sup> ( $\mu$ molesP/mg prot.)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica ( $\mu$ molesP/mg prot.)	% activ. especific. relativa
HOMOG.	0.885		0.849	
R 1	0.934	16.33	0.341	5.8
R 5	0.542	9.5	0.85	14.5
R 10	1.43	25.0	1.201	20.4
R 20	2.58	27.6	1.88	32.0
R 100	1.235	21.6	1.605	27.3
Sn	-	-	-	-

<sup>a</sup> Valor promedio de 2 experimentos.

DISTRIBUCION DE LA DESHIDROGENASA  
LACTICA

FRACCION	P O T T E R		P O L Y T R O N	
	Activ. especifica <sup>a</sup> (nmolesNADH/mg prot.)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica (nmolesNADH/mg prot.)	% activ. especific. relativa
HOMOG.	8.935		9.25	
R 1	4.603	23.6	3.093	22.6
R 5	-	-	-	-
R 10	4.905	25.2	-	-
R 20	-	-	-	-
R 100	-	-	-	-
Sn	9.958	51.2	10.568	77.4

<sup>a</sup> Valor promedio de 4 experimentos.

La actividad de la glucosa 6-P fosfatasa se expresa en  $\mu$ moles de fosfato liberado por mg de proteína y la actividad de la deshidrogenasa láctica como nmoles de NAD reducido por mg de proteína.

TABLA 5 EFECTO DEL TIPO DE HOMOGENEIZACION SOBRE LA DISTRIBUCION DE LAS DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DEL MUSCULO DE LA RATA.

DISTRIBUCION DE LA 5'NUCLEOTIDASA

FRACCION	P O T T E R		P O L Y T R O N	
	Activ. especifica* ( $\mu$ molesP/mg prot)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica ( $\mu$ molesP/mg prot.)	% activ. especific. relativa
HOMOG.	0.224		0.275	
R 1	0.187	12.5	0.205	12.0
R 5	0.147	9.8	0.170	10.42
R 10	0.140	9.4	0.185	10.83
R 20	0.250	17.2	0.328	19.20
R 100	0.57	30.20	0.578	33.8
Sn	0.194	13.0	0.234	13.7

\* Valor promedio de 14 experimentos.

DISTRIBUCION DE LA SUCCINATO  
DESHIDROGENASA

FRACCION	P O T T E R		P O L Y T R O N	
	Activ. especifica* (nmolesF/mg prot)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica (nmolesF/mg prot)	% activ. especific. relativa
HOMOG.	90.375		113.9	
R 1	92.92	13.89	96.9	15.6
R 5	388.20	58.0	371.99	60.7
R 10	77.82	11.64	68.49	11.18
R 20	67.42	10.1	52.62	8.59
R 100	34.48	5.15	17.91	2.42
Sn	7.99	1.19	4.5	0.7

\* Valor promedio de 10 experimentos.



TABLA 6 EFECTO DEL TIPO DE HOMOGENEIZACION SOBRE LA DISTRIBUCION DE LAS DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DEL MUSCULO DE LA RATA.

FRACCION	P U T T E R		P O L Y T R O N	
	Activ. especifica* (nmolesP/mg prot)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica (nmolesP/mg prot)	% activ. especific. relativa
HOMOG.	57.835		74.85	
R 1	-	-	23.075	7.5
R 5	28.58	14.2	26.845	8.7
R 10	29.38	14.6	44.265	14.4
R 20	26.285	13.0	44.14	14.4
R 100	39.505	19.6	56.795	18.5
Sn	77.685	38.6	112.055	36.5

\* Valor promedio de 2 experimentos.

DISTRIBUCION DE LA DESHIDROGENASA LACTICA

FRACCION	P O T T E R		P O L Y T R O N	
	Activ. especifica* (nmolesNADH/mg prot)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica (nmolesNADH/mg prot)	% activ. especific. relativa
HOMOG.	40.82		34.47	
R 1	15.31	12.8	21.05	16.9
R 5	14.64	12.2	12.1	9.7
R 10	9.54	8.0	8.1	6.5
R 20	10.178	8.5	8.9	7.1
R 100	19.47	16.2	19.46	15.5
Sn	50.7	42.3	55.67	44.4

\* Valor promedio de 4 experimentos.

TABLA 7 EFECTO DEL TIPO DE HOMOGENEIZACION SOBRE LA DISTRIBUCION DE LAS DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES DE LA GLANDULA MAMARIA DE LA RATA.

DISTRIBUCION DE LA 5'NUCLEOTIDASA

FRACCION	POTTER		POLYTRON	
	Activ. especifica* ( $\mu$ molesP/mg prot)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica ( $\mu$ molesP/mg prot)	% activ. especific. relativa
HOMOGE.	1.878		1.912	
R 1	0.871	10.24	1.344	12.79
R 5	0.995	11.7	1.643	15.64
R 10	0.885	10.4	1.469	13.98
R 20	2.299	27.03	2.699	25.69
R 100	2.444	28.73	2.285	21.75
Sn	1.012	11.0	1.068	10.16

DISTRIBUCION DE LA SUCCINATO  
DESHIDROGENASA

FRACCION	POTTER		POLYTRON	
	Activ. especifica (nmolesF/mg prot)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica (nmolesF/mg prot)	% activ. especific. relativa
HOMOGE.	20.79		21.38	
R 1	11.58	7.89	9.95	5.85
R 5	35.86	24.43	49.43	29.38
R 10	29.67	20.21	36.67	21.58
R 20	29.2	19.89	35.28	20.88
R 100	37.48	25.53	35.28	20.76
Sn	2.99	2.04	3.13	1.84

\* Valor promedio de 4 experimentos.

TABLA 8 EFECTO DEL TIPO DE HOMOGENEIZACION SOBRE LA DISTRIBUCION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE LA GLANDULA MAMARIA.

DISTRIBUCION DE LA DESHIDROGENASA LACTICA

FRACCION	P O T T E R		P O L Y T R O N	
	Activ. especifica* (nmolesNADH/mgprot)	% activ. especific. relativa	Activ. especifica (nmolesNADH/mg prot)	% activ. especific. relativa
HOMOG.	7.999		7.17	
R 1	5.46	21.6	5.717	20.6
R 5	5.947	23.5	7.24	26.1
R 10	2.197	8.7	2.193	7.9
R 20	1.953	7.7	1.993	7.2
R 100	2.483	9.8	2.305	8.4
Sn	7.213	28.6	8.327	30.0

\* Valor promedio de 3 experimentos.

TABLA 9 EFECTO DEL EDTA EN LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA DEL HIGADO DE LA RATA.

HOMOGENEIZADO TOTAL				RESIDUO MITOCONDRIAL				
	SACAROSA	%	SACAROSA EDTA	%	SACAROSA	%	SACAROSA EDTA	%
SIN DILUIR	269.45		374.12		892.32		834.41	
1: 2	132.93	49	167.96	45	389.84	44	308.85	47
1: 4	48.95	37	81.79	49	115.62	30	169.95	44
1:8	15.92	32	35.02	43	19.9	17	86.76	51

El homogeneizado y la fracción R5 fueron preparados en la forma descrita en material y métodos empleando sacarosa 0.25M adicionada de EDTA. Las diluciones se realizaron con las mismas soluciones. Las actividades están representadas como nmoles de formazan producido en 15 min de incubación.

TABLA 10 RECUPERACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LOS DIFERENTES TEJIDOS.

5'NUCLEOTIDASA	HIGADO		MUSCULO		GLANDULA MAMARIA	
	# exp.	% recuperación*	# exp.	% recuperación	# exp.	% recuperación
POTTER	4	83.32( 8.69)	14	91.81(21.53)	4	87.44(10.42)
POLYTRON	2	72.87( 2.21)	13	96.41(21.08)	2	99.65( 7.57)
SUCCINATO DESHIDROGENASA						
POTTER	4	83.06(14.72)	10	66.54(28.73)	4	94.30(11.31)
POLYTRON	2	82.40( 4.10)	9	65.37(13.34)	2	89.40(11.31)
GLUCOSA-6-FOSFATO FOSFATASA						
POTTER	2	66.44( 1.18)	2	61.80( 3.39)		
POLYTRON	2	68.40( 4.10)	2	63.41(13.85)		
LACTATO DESHIDROGENASA						
POTTER	4	70.28(20.36)	4	75.27(16.14)	3	83.62(16.51)
POLYTRON	4	65.11(22.78)	4	83.20( 7.98)	3	96.50(22.19)

\* % recuperación promedio. ( ) Desviación estandard.

**TABLA I DETERMINACION Y RECUPERACION DE PROTEINAS EN HIGADO**

FRACCION	P O T T E R *			P O L Y T R O N **		
	mg prot./ml	mg prot. total	% recuperación	mg prot./ml	mg prot. total	% recuperación
Homog.	21.37(4.07)	587.99(123.32)	107.17(18.63)	22.39(3.32)	594.34(100.88)	101.26(11.86)
R 1	33.52(5.97)	150.92(32.07)		30.31(7.74)	121.29(48.75)	
R 5	22.30(7.09)	58.87(15.90)		26.46(8.64)	78.13(37.13)	
R 10	12.98(2.46)	29.23(6.74)		17.86(1.92)	42.10(7.10)	
R 20	14.64(3.61)	32.75(8.58)		17.36(4.09)	38.41(11.02)	
R 100	19.46(5.75)	48.06(16.67)		19.39(5.41)	45.86(17.2)	
Sn	9.82(1.48)	300.52(70.82)		10.28(1.07)	274.47(49.02)	

\* Valores promedio de 10 experimentos. ( ) desviación estandard.

\*\* Valores promedio de 6 experimentos.

TABLA 12 DETERMINACION Y RECUPERACION DE PROTEINAS EN MUSCULO

FRACCION	P O T T E R *		% recuperación	P O L Y T R U N **		% recuperación
	mg prot./ml	mg prot. total		mg prot./ml	mg prot. total	
Homog.	39.28(8.94)	968.03(210.57)	93.26(14.29)	41.77(6.19)	1072.44(175.78)	96.22(15.75)
R 1	39.44(11.07)	392.92(148.21)		44.48(11.49)	556.62(207.06)	
R 5	14.64(2.35)	34.52(7.33)		16.54(5.42)	39.61(17.50)	
R 10	11.74(1.44)	24.27(3.69)		11.43(2.21)	22.97(2.40)	
R 20	12.02(1.28)	24.37(2.52)		11.80(1.53)	23.83(3.06)	
R 100	16.10(1.95)	37.58(6.09)		14.75(4.17)	33.55(9.34)	
Sn	13.49(1.63)	377.25(59.89)		13.50(1.62)	349.31(59.0)	

\* Valores promedio de 14 experimentos. ( ) desviación estandard.

\*\* Valores promedio de 14 experimentos.

TABLA 13. DETERMINACION Y RECUPERACION DE PROTEINAS EN GLANDULA MAMARIA

FRACCION	P O T T E R *			P O L Y T R O N **		
	mg prot./ml	mg prot. total	% recuperación	mg prot./ml	mg prot. total	% recuperación
Homog.	12.54(2.09)	211.73(31.41)	116.77(10.51)	13.08(1.79)	236.17(55.39)	113.94(14.72)
R 1	12.17(1.67)	33.26(7.62)		14.73(4.57)	46.21(17.92)	
R 5	8.53(1.09)	17.91(2.61)		9.55(0.41)	23.70(2.81)	
R 10	8.84(1.53)	17.02(3.90)		8.80(1.06)	17.14(5.14)	
R 20	8.58(0.99)	15.76(3.29)		8.63(0.81)	15.86(3.99)	
R 100	9.4(0.7)	18.13(3.18)		9.84(0.75)	18.93(3.53)	
Sn	9.37(0.56)	166.67(37.57)		9.80(0.42)	164.09(54.95)	

\* Valor promedio de 6 experimentos. ( ) desviación estandar.

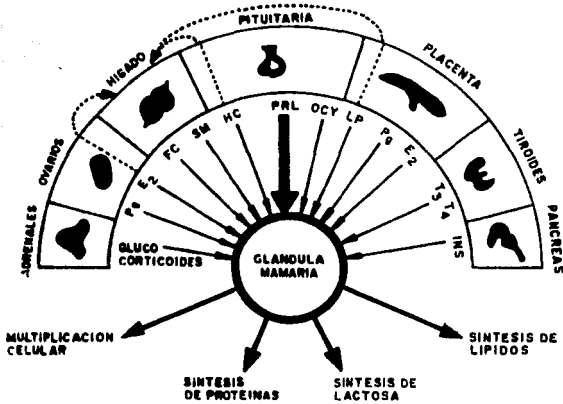
\*\* Valor promedio de 5 experimentos.



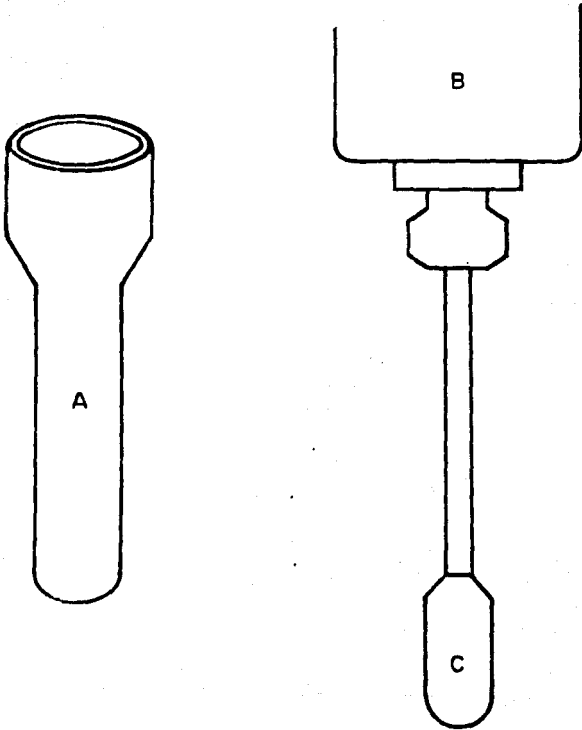
## VIII - SECCION DE FIGURAS

- FIG. 1 Hormonas que intervienen en el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria.
- FIG. 2 Homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem.
- FIG. 3 Homogeneizador de tipo Polytron.
- FIG. 4 Esquema de fraccionamiento subcelular.
- FIG. 5 Gradiente discontinuo de sacarosa.
- FIG. 6 Distribución de 5'Nucleotidasa en fracciones subcelulares del hígado.
- FIG. 7 Distribución de 5'Nucleotidasa en fracciones subcelulares de músculo.
- FIG. 8 Distribución de 5' Nucleotidasa en fracciones subcelulares de glándula mamaria.
- FIG. 9 Distribución de la deshidrogenasa succínica en fracciones subcelulares del hígado.
- FIG. 10 Distribución de la deshidrogenasa succínica en fracciones subcelulares del músculo.
- FIG. 11 Distribución de la deshidrogenasa succínica en fracciones subcelulares de la glándula mamaria.

- FIG. 12 Distribución de la glucosa-6-fosfato fosfatasa en fracciones de el hígado
- FIG. 13 Distribución de la glucosa-6-fosfato fosfatasa en fracciones de músculo.
- FIG. 14 Distribución de la deshidrogenasa láctica en fracciones de hígado.
- FIG. 15 Distribución de la deshidrogenasa láctica en fracciones de músculo.
- FIG. 16 Distribución de la deshidrogenasa láctica en fracciones de glándula mamaria.
- FIG. 17 Solventes utilizados en la determinación de proteínas.



**FIG.1 HORMONAS QUE INTERVIENEN EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA GLANDULA MAMARIA.**

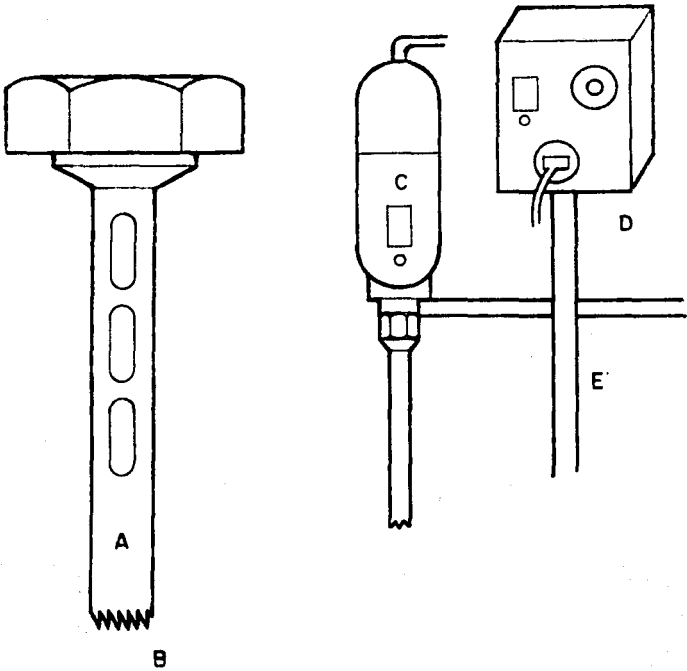


**FIG.2 HOMOGENEIZADOR DE TIPO POTTER- ELVEHJEM.**

**A: VASO DE HOMOGENEIZACION.**

**B: MOTOR.**

**C: PISTILO DE TEFLON.**



**FIG.3** HOMOGENEIZADOR DE TIPO POLYTRON.

**A:** CILINDRO DE ACERO INOXIDABLE QUE CONTIENE LAS CUCHILLAS DEL HOMOGENEIZADOR.

**B:** BORDE DENTADO.

**C:** MOTOR DEL HOMOGENEIZADOR.

**D:** CONTROL DE VELOCIDAD.

**E:** SOPORTE DEL HOMOGENEIZADOR.

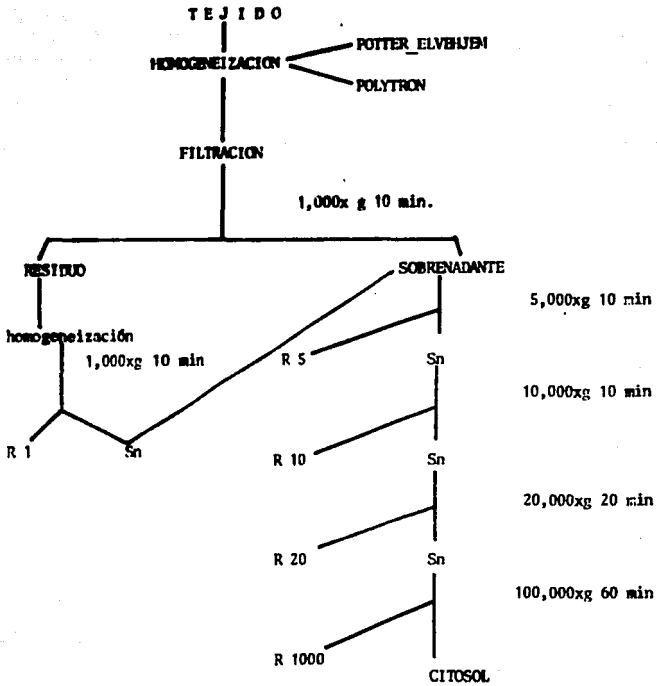
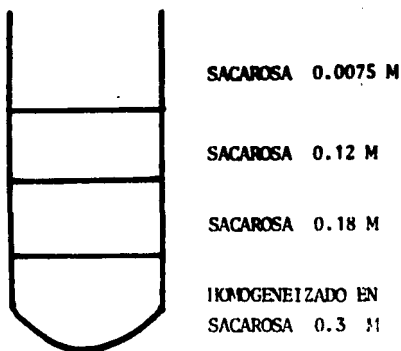


FIG. 4 ESQUEMA DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR POR CENTRIFUGACION DIFERENCIAL.

En material y método se describe detalladamente el procedimiento para realizar el fraccionamiento. El índice de la letra R indica la velocidad de centrifugación por mil a la que se obtuvo ese residuo. Sn= sobrenadante.

## GLANDULA MAMARIA



CENTRIFUGAR 10 MIN A  $2,000 \times g$

RETIRAR LOS LIPIDOS

AÑADIR SACAROSA 0.4 M

RESUSPENDER

FIG. 5 GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA EMPLEADO PARA SEPARAR LOS LIPIDOS DEL HOMOGENEIZADO DE LA GLANDULA MAMARIA.

En material y método se describe el procedimiento completo.



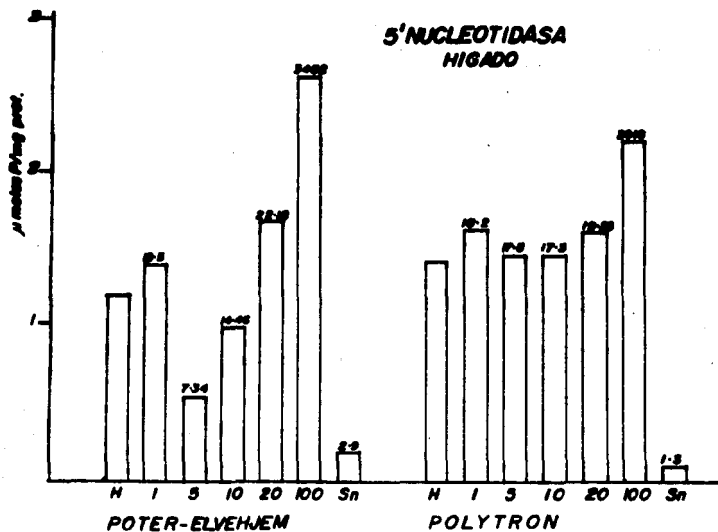


FIG. 6 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA 5'NUCLEOTIDASA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DEL HIGADO.

El porcentaje de la actividad especifica relativa de cada fraccion se muestra sobre las columnas.

El numero en las abscisas se refiere a la velocidad por mil a la que se obtuvo ese residuo.

H= Homogeneizado total.

Sn= Sobrenadante o citosol.

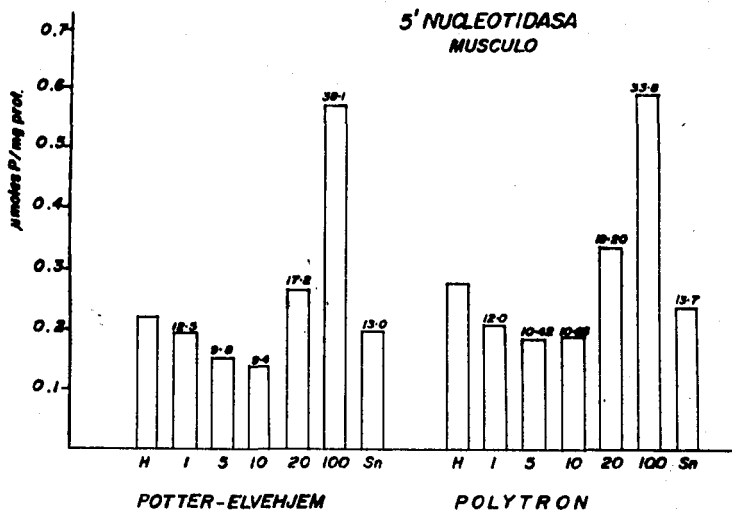


FIG. 7 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE 5'NUCLEOTIDASA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DEL MUSCULO.

El porcentaje de la actividad especifica relativa de cada fraccion se muestra sobre las columnas.

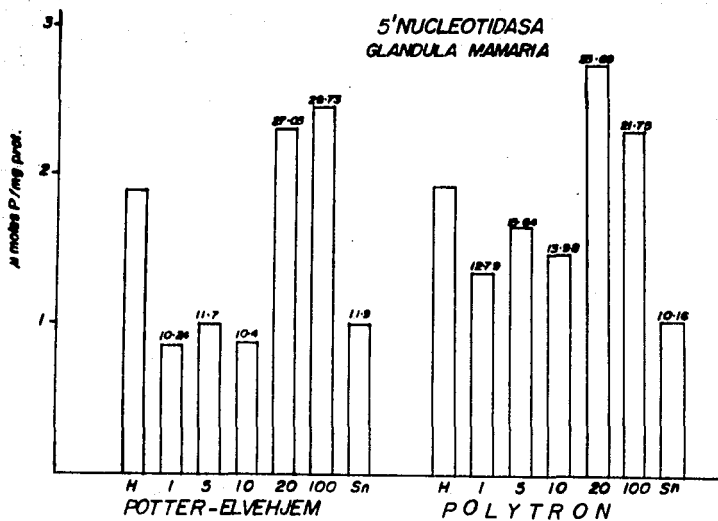


FIG. 3 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE 5'NUCLEOTIDASA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE LA GLANDULA MAMARIA.

El porcentaje de la actividad especifica relativa de cada fraccion se muestra sobre las columnas.

**SUCCINATO DESHIDROG.  
HIGADÓ**

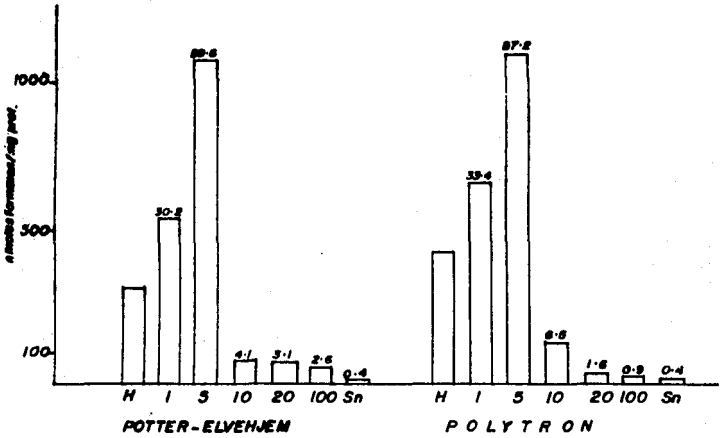


FIG. 9 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA SUCCINICA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DEL HIGADO.

El porcentaje de la actividad especifica relativa de cada fracción se muestra sobre las columnas.

SUCCINATO DESHIDROG.  
MUSCULO

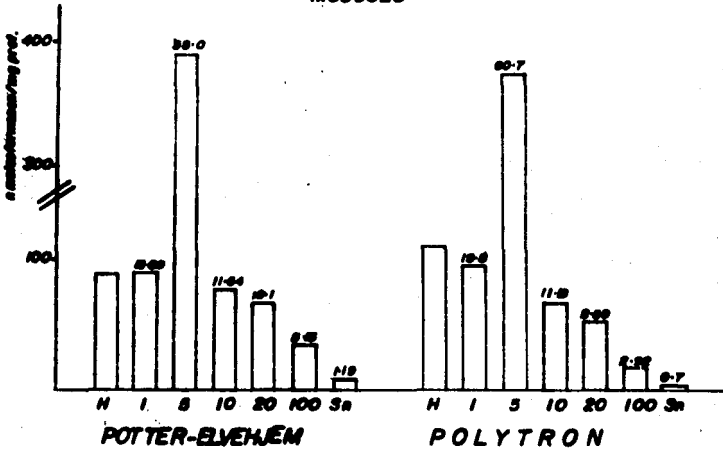


FIG. 10 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA  
DESHIDROGENASA SUCCINICA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES  
DEL MUSCULO.

El porcentaje de la actividad especifica relativa  
de cada fracción se muestra sobre las columnas.

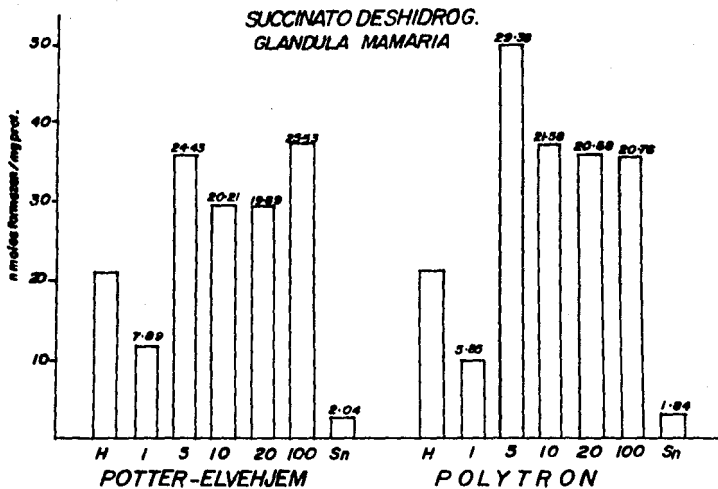


FIG. 11 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA  
DESHIDROGENASA SUCCINICA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES  
DE LA GLANDULA MAMARIA.

El porcentaje de la actividad especifica relativa  
de cada fracción se muestra sobre las columnas.

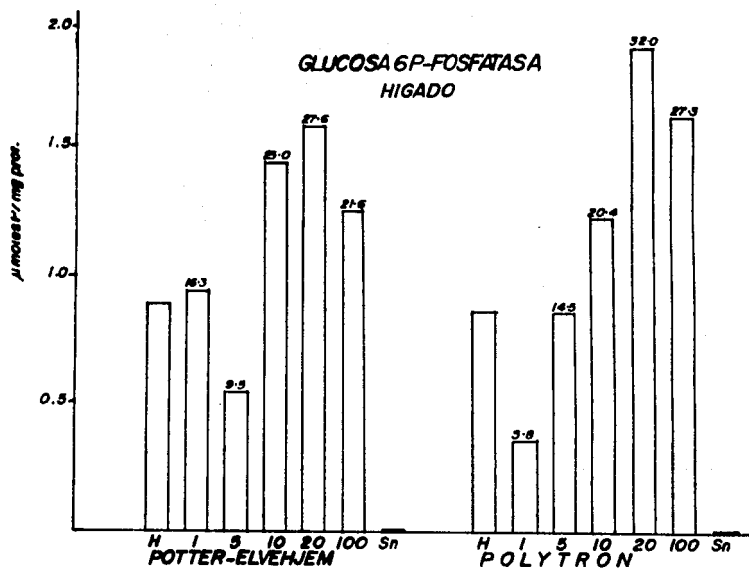


FIG. 12 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO FOSFATASA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DEL HIGADO.

El porcentaje de la actividad especifica relativa de cada fracción se muestra sobre las columnas.

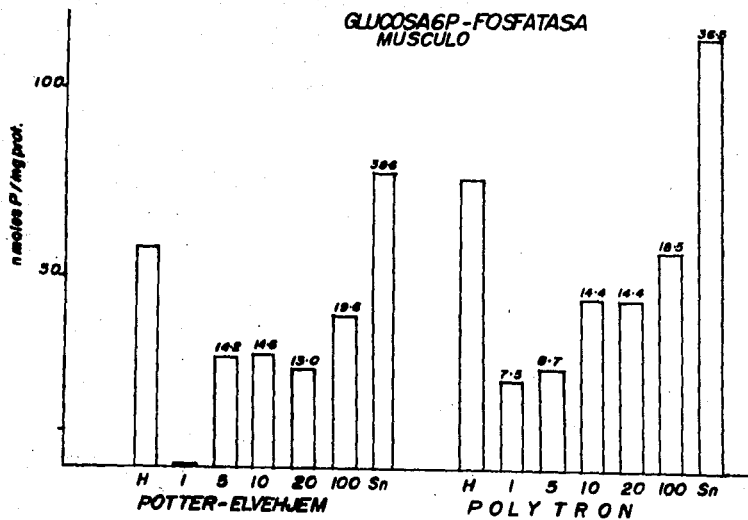


FIG. 13 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO FOSFATASA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DEL MUSCULO.

El porcentaje de la actividad especifica relativa de cada fracción se muestra sobre las columnas.



LACTATO DESHIDROG.  
HIGADO

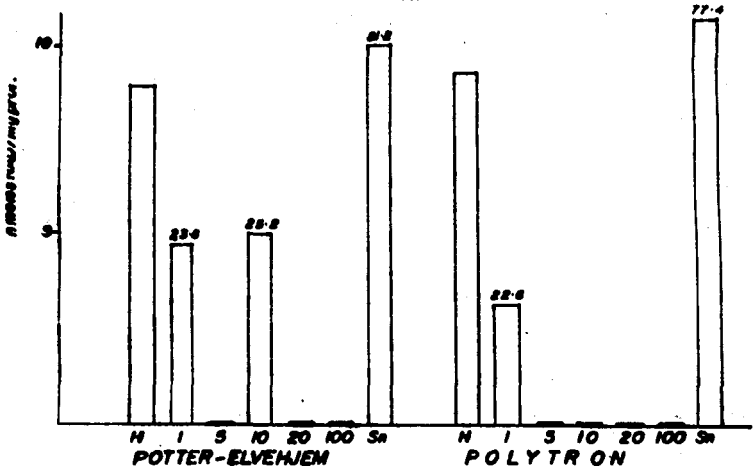


FIG. 14 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA LACTICA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DEL HIGADO.

El porcentaje de la actividad especifica relativa de cada fracción se muestra sobre las columnas.

LACTATO DESHIDROG.  
MUSCULO

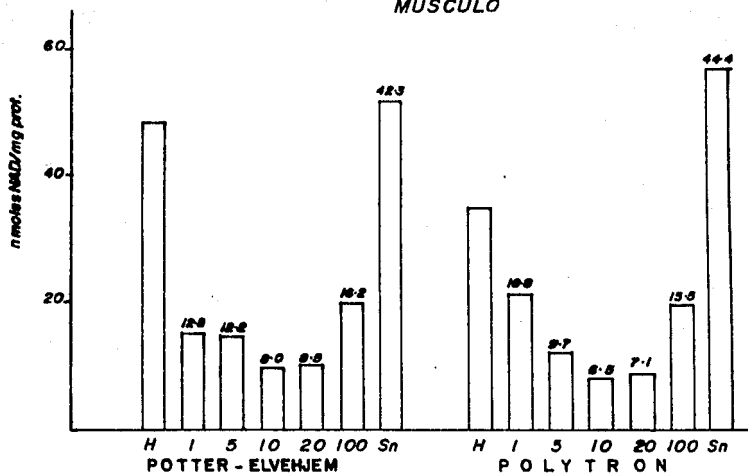


FIG. 15 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA LACTICA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DEL MUSCULO.

El porcentaje de la actividad especifica relativa de cada fracción se muestra sobre las columnas.

LACTATO DESHIDROG.  
GLANDULA MAMARIA

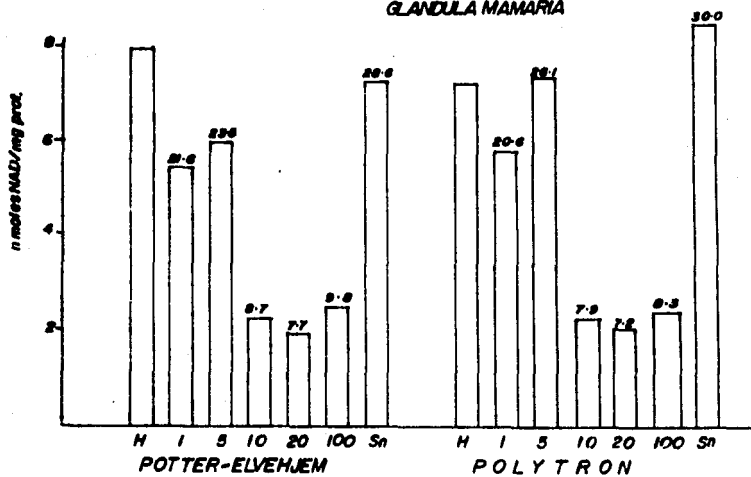
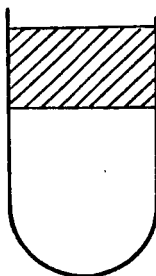


FIG. 16 DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA LACTICA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE LA GLANDULA MAMARIA.

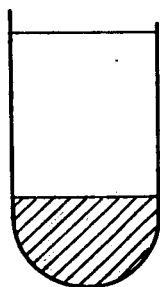
El porcentaje de la actividad especifica relativa de cada fracción se muestra sobre las columnas.



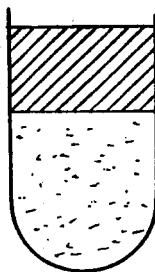
DICLOROMETANO



HEXANO



TETRACLORURO DE  
CARBONO



TOLUENO

FIG. 17 SOLVENTES USADOS PARA EXTRAER LOS LIPIDOS EN LA DETERMINACION DE PROTEINAS.

La parte sombreada representa la fase no acuosa.

## **IX - BIBLIOGRAFIA**

1.- Casey,C.E., Hambidge,M.K.: Nutritional aspects of human lactation. En: Neville,M.C., Neifert,M.R. (Eds.). Lactation. Physiology, nutrition and breast feeding. New York, Plenum Press, 1983, p.p. 230-231.

2.- Beal,U.A.: Nutrición en el ciclo de la vida. México, LIMUSA, 1983, pp. 195-232.

3.- Neville,M.C., Allen,J.C., Watter,C.: The immunology of breast milk. En: Neville,M.C., Neifert,M.R. (Eds.). Lactation. Physiology, nutrition and breast feeding. New York, Plenum Press, 1983, p.p. 249-270.

4.- Maddux,G.M.: Consideraciones inmunológicas. En: Yunza, D.A. (Eds.). Consideraciones biosociales de la lactancia materna. Publicaciones del Instituto Nacional de la Nutrición, 1983, p.p. 31-54.

5.- Williamson,D.H.: Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. FEBS Letters., 1980; 117: Suppl. K93-K105.

6.- Whitehead,R.G.: Effect of diet on maternal health and lactational performance. En:Whitehead,R.G.(Eds.) Maternal diet, breast-feeding capacity, and lactational infertility. Tokyo, The United Nations University, 1983, pp.24-54.

7.- Agius, L., Backshoor, P.J., Williamson, D.H.: Rates of triacylglycerol entry into the circulation in the lactating rat. *Biochem.J.* 1981; 196: 637-640.

8.- Williamson, D.H., Munday, M.R., Jones, R.G.: Biochemical basis of dietary influences on the synthesis of the macronutrients of rat milk. *Fed.Proc.* 1984; 43: 2443-2447.

9.- Agius, L., Robinson, A.R., Girard, J.R., Williamson, D.H.: Alterations in the rate of lipogenesis in vivo in maternal liver and adipose tissue on premature weaning of lactating rats. A possible regulatory role of Prolactin. *Biochem.J.* 1979; 180: 689-692.

10.- Martínez, C., Chávez, A.: Nutrition and development of infants in poor rural areas. I Consumption of mothers milk by infants. *Nutr. Rev. Internat.*, 1971; 4: 130-149.

11.- Prentice, A.M., Whitehead, R.G., Roberts, S.B., Paul, A.A.: Longterm energy balance in childbearing Gambian women. *Amer.J.Clin.Nutr.*, 1981; 34: 2790-2799.

12.- Goldberg, A.L.: Protein turnover in skeletal muscle. II Effects of denervation and cortisone on protein catabolism in skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 1969; 224: 3223-3229.

13.- Goldberg,A.L., Goodman,H.M.: Relationship between cortisone and muscle work in determining muscle size. *J. Physiol.* 1969; 200: 667-675.

14 .- Kelly,P.A., Katch,M., Ferland,LH., Houdebine, L.M., Teyssot,B.: The interaction of prolactin with its receptors in target tissues and its mechanism of action. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 1984; 40:379-437.

15.- Neville,M.C., Berga,S.E.: Cellular and molecular aspects of the hormonal control of mammary function. En: Neville,M.C., Neifert,M.R.(Eds.). *Lactation. Physiology, nutrition and breast feeding.* New York, Plenum Press, 1983, pp. 141-177.

16.- Turkington,R.W., Brew,K., Vanaman,T.C., Hill,R.L.: The hormonal control of lactose synthetase in the developing mouse mammary gland. *J.Biol.Chem.*, 1968; 243:3382-3387.

17.- Rilema,J.A., Schneider-Kuznia,M,: Observations on the early actions of prolactin on RNA and casein synthesis in mouse mammary gland explants. *Hormone Res.*, 1980; 12: 218-223.

18.- Shiu,R.P., Friesen,H.G.: Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function. *Ann.Rev.Physiol.*, 1980; 43:83-96.



19.- Catt,K.J., Harwood,J.P., Aguilera,G.,  
Dufau,M.L.: Hormonal regulation of peptide receptors  
and target cell responses. Nature,1979; 280: 109-115.

20.- Posner,B.I.: Polypeptide hormone receptors:  
Characteristics and applications.  
Can.J.Physiol.Pharmacol., 1975; 53: 689-703.

21.- Turkington,R.W.: Stimulation of RNA synthesis  
in isolated mammary cells by insulin and prolactin  
bound to Sepharose. Biochem.Biophys.Res.Commun. 1970;  
41: 1362-1367.

22.- Birkenshaw,M., Falconer,I.R.: Localization of  
prolactin labelled with radioactive iodine in rabbit  
mammary tissue. J. Endocrinol. 1972; 55: 323-334.

23.- Calvo,J.C., Finocchiaro,L.,Luthy,I.,  
Charreau,E.H., Calandra,R.S., Engstrom,B., Hansson,U.:  
Specific prolactin binding in the rat adrenal gland:  
its characterization and hormonal regulation.  
J.Endocr., 1981; 89: 317-325.

24.- Marshall,S.,Hyang,H.H., Kledzik,G.S.,  
Campbell,G.A., Meites,J.: Glucocorticoid regulation of  
prolactin receptors in kidneys and adrenal of male  
rats. Endocrinology., 1978; 102: 869-875.

25.- Nagasawa,H.,Sakai,S.,Banerjee,M.R.: Prolactin  
Receptor. Life Sci., 1979; 24: 193-208.

- 26.- Posner, B.I., Kelly, P.A., Shiu, P.C.R.,  
Friesen, H.G.: Studies of insulin, growth hormone and  
prolactin binding: tissue distribution, species  
variation and characterization. *Endocrinology*, 1974;  
95:521-531.
- 27.- Posner, B.I., Kelly, P.A., Friesen, H.G.:  
Induction of a lactogenic receptor in rat liver:  
Influence of estrogen and the pituitary.  
*Proc.Nat.Acad.Sci. USA.*, 1974; 71: 2407-2410.
- 28.- Shiu, R.P.C., Kelly, P.A., Friesen, H.G.:  
Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic  
hormones. *Science*, 1973; 180:968-971.
- 29.- Shiu, R.P.C., Friesen, H.G.: Properties of  
prolactin receptor from the rabbit mammary gland.  
*Biochem.J.*, 1974; 140: 301-311.
- 30.- Frantz, W.L., Mc Indoe, J.H., Turkington, R.W.:  
Prolactin receptors: Characteristics of the particulate  
fraction binding activity. *J. Endocr.*, 1974; 60:  
485-497.
- 31.- Barash, I., Madar, Z., Gertler, A.: Down  
regulation of prolactin receptors in the liver, mammary  
gland and kidney of female virgin rat, infused with  
ovine prolactin or human growth hormone.  
*Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1983; 116: 644-650.

- 32.- Mehard,C.W.: Isolation of mitochondria from mouse mammary gland. En: Fleischer,S. y Packer,L. Methods in enzymology Vol. 33. New York, Academic Press, 1975, pp.305-310.
- 33.- Kidwai,A.M.: Isolation of plasma membrane from smooth, skeletal, and heart muscle. En: Dennis, M.G. y Dennis, E.A. (Eds.). Methods in enzymology Vol.33. New York, Academic Press, 1975, pp.134-144.
- 34.- Touster,O.,Aronson,N.N.,Dulaney,J.T., Hendrickson,H.: Isolation of rat liver plasma membranes. Use of nucleotide pyrophosphatase and phosphodiesterase I as marker enzymes. J.Cell.Biol., 1970; 47:604-618.
- 35.- Ray, T.K.: A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver. Biochim.Biophys.Acta., 1970; 196:1-9.
- 36.- De Pierre,J.W., Karnovsky,M.L.: Plasma membranes of mammalian cells. A review of methods for their characterization and isolation. J.Cell.Biol., 1973; 56: 275-303.
- 37.- Aronson,N.N., Touster,O.: Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. En: Dennis,M.G. y Dennis, E.A.(Eds.). Methods in

enzymology Vol. 33. New York, Academic Press, 1975, pp. 90-102.

38.- De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F.: Tissue Fractionation studies. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.*, 1955; 60:604-617.

39.- Fleischer, S., Kervina, M.: Subcellular fractionation of rat liver. En: Fleischer, S., Packer, L. (Eds.). *Methods in enzymology* Vol 31. New York, Academic Press, 1974, pp. 6-40

40.- Neville, D.M.: Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1968; 154: 540-552.

41.- Maunsbach, A.B.: Isolation of kidney lysosomes. En: Fleischer, S., Packer, L. (Eds.). *Methods in enzymology* Vol. 31. New York, Academic Press, 1974, pp. 330-339.

42.- Misselwitz, H.J., Will, H.: Mass isolation of cell surface membrane fragments from pigeon heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1979; 553: 197-212.

43.- Kornberg, A. Lactic Dehydrogenase of muscle. En: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.) *Methods in enzymology* Vol 1. New York, Academic Press, 1955, pp. 441-443.

44.- Heppel, J., Hilme, R., 5'Nucleotidases. En: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds). Methods in enzymology Vol 2. New York, Academic Press, 1955, pp. 546-550.

45.- Pennington, R.J.: Biochemistry of dystrophic muscle. Mitochondrial succinate-tetrazolium reductase and adenosine triphosphatase. Biochem.J., 1961; 80:649-654.

46.- Lindber, O., Ernster, L.: Determination of organic phosphorus compounds by phosphate analysis. En: Glick, D. (Eds). Methods of Biochemical Analysis Vol 3. New York, Interscienc. Publis., 1956, pp. 1-22.

47.- Itzhaki, R.F., Gill, D.M.: A micro-biuret method for estimating proteins. Anal. Biochem., 1964; 9:401-410.

48.- Rosano, T.G., Jones, D.H.: Developmental changes in mitochondria during the transition into lactation in the mouse mammary gland. I Behavior on isopycnic gradient centrifugation. J.Cell.Biol., 1976; 69: 573-580.

49.- Jones, D.H., Rosano, T.G.: Studies of mitochondrial development prior to lactogenesis in the mouse mammary gland. Arch.Biochem.Biophys., 1972; 153: 130-138.