30
21

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

"EFECTO DE UNA DIETA BAJA EN PROTEÍNA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (CATEPSINA L) EN LOS TEJIDOS DE LA RATA LACTANTE"

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ADRIANA MARGARITA DE LA PEÑA INFANZÓN

MÉXICO, D F 1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. SOTELO LÓPEZ ANGELA	_____
Vocal	Prof. OLIVA GONZÁLEZ MAGDALENA	_____
Secretario	Prof. HERNÁNDEZ MONTES HOMERO	_____
1er. Suplente	Prof. AGUILAR CABALLERO RAUL	_____
2do. Suplente	Prof. GIRAL BARNES CARMEN	_____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Investigación Médica en Nutrición,
Hospital de Pediatría, C.M.N. Siglo XXI, IMSS

Asesor del Tema:

_____

Dr. HOMERO HERNÁNDEZ MONTES

Sustentate: Adriana de la Peña I.

ADRIANA MARGARITA DE LA PEÑA INFANZÓN

Dedico este trabajo a la memoria de mi abuela Elena, por heredarme su sed de conocimiento.

A mis padres, Raúl y Guadalupe, por su entrega incondicional, por su dedicación, por su confianza.
Los amo. Gracias.

A Javier, porque si de algo estoy segura, es de que es el mejor hermano.
Por su apoyo silencioso pero efectivo, que en todo momento he sabido aprovechar.

A mi cuñada, Betzabeth, por hacer feliz a mi hermano, y por integrarse a mi familia.

A Lariza, por todas las materias que me enseñó y por todos los exámenes que le resolví. Nunca es tarde hacer buenas amigas.

A Josefa, Alma, Ale, Claudia, Ethna, Maggy, Patty, Chela, porque, en doce años de amistad hemos tejido una trenza en donde cada una es un gajo, en unas partes más fuerte en otras más débil pero con la certeza de que será para siempre.

A Ramón y Marifer, por el inmenso cariño que les tengo. Contarán conmigo para toda la vida.

A mis abuelos, tíos, primos y sobrinos por seguir siendo la consentida de muchos de ellos.

A mi alma mater por la formación profesional y personal , hoy estoy aquí con mi primer gran logro en la vida segura de conseguir muchos más.
Decir que soy egresada de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México no se platica, se siente.

A Amanda Peña por compartir su inmenso proyecto conmigo y por toda la ayuda recibida en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Homero Hernández por darme la oportunidad de conocer un poquito de la maravilla que son los átomos y las moléculas. sinceramente espero algún día regresar a este fascinante mundo.

A la Maestra Yolanda González porque si por alguien conocí la ciencia fue por ella.

A Rafa, por amenizar las largas horas de bioterio.

Índice General

	Página
Índice General	1
Índice de Gráficas	3
Índice de Anexos	4
Índice de Cuadros	5
Capítulo I.- Introducción	6
1.1 El proceso de la lactancia	6
1.2 Las proteínas de la leche	6
1.3 Los requerimientos de proteínas de la madre lactante	7
1.4 Energía	8
1.5 Estudios en animales	9
1.6 La rata lactante como modelo experimental	10
1.7 El requerimiento de proteína para la rata durante la gestación y la lactancia	10
Capítulo II.- Antecedentes	12
2.1 Efecto del embarazo y la lactancia en el metabolismo de proteínas de la rata madre	12
2.2 Las enzimas y su importancia	14
2.3 Las enzimas proteolíticas	14
2.3.1 La catepsina L	14
Capítulo III.- Planteamiento del Problema	16
Capítulo IV.- Objetivo	17
Capítulo V.- Material y Métodos	18
5.1 Animales	18
5.2 Dietas	20
5.3 Preparación del Homogeneizado	21
5.4 Síntesis del Sustrato	22
5.4.1 Purificación de la Azocaseína	22
5.5 Determinación de la Actividad Enzimática	23
5.5.1 Catepsina L	23
5.6 Determinación de la Concentración de Proteínas	24
5.6.1 Método	24
5.6.2 Curva de Referencia	25
5.6.3 Diluciones de los homogeneizados	25
5.7 Tratamiento Estadístico	25

Página

Capítulo VI.- Resultados 28

6.1 Peso Corporal de los animales 28
6.2 Consumo de Alimento 35
6.3 Consumo de Proteínas 42
6.4 Consumo de Calorías 50
6.5 Cambios en la actividad de la catepsina L por miligramo de proteína 57
6.5.1 Cambios en el hígado 57
6.5.2 Cambios en el músculo esquelético 58
6.5.3 Cambios en la glándula mamaria 58
6.6 Cambios en la actividad de la catepsina L por gramo de tejido 64
6.6.1 Cambios en el hígado 64
6.6.2 Cambios en el músculo esquelético 65
6.6.3 Cambios en la glándula mamaria 65
6.7 Cambios en el contenido de catepsina L en el órgano total 71
6.7.1 Cambios en el hígado 71
6.7.2 Cambios en el músculo esquelético 72
6.7.3 Cambios en la glándula mamaria 72

Capítulo VII.- Discusión 78

7.1 Del peso corporal de los animales 78
7.2 Del consumo del alimento 80
7.2.1 Durante el embarazo 80
7.2.2 Durante la lactancia 81
7.3 Del consumo de proteína 81
7.4 Del consumo de energía 83
7.5 Cambios en la actividad específica de la catepsina L 84
7.5.1 Cambios en el hígado 84
7.5.2 Cambios en el músculo esquelético 85
7.5.3 Cambios en la glándula mamaria 86

Capítulo VIII.- Conclusiones 87

Capítulo IX.- Bibliografía 89

Índice de Gráficas

Página

1.- Curva de Proteínas 27
2.- Peso Corporal de las ratas vírgenes alimentadas con la dieta NP y BP 31
3.- Peso Corporal de las ratas vírgenes y lactantes alimentadas con la dieta NP 32
4.- Peso Corporal de las ratas vírgenes y lactantes alimentadas con la dieta BP 33
5.- Peso Corporal de las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP y BP 34
6.- Consumo de alimento de las ratas vírgenes alimentadas con la dieta NP y BP 38
7.- Consumo de alimento de las ratas vírgenes y lactantes alimentadas con la dieta BP 39
8.- Consumo de alimento de las ratas vírgenes y lactantes alimentadas con la dieta NP 40
9.- Consumo de alimento de las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP y BP 41
10.- Consumo de proteínas de las ratas vírgenes alimentadas con la dieta NP y BP 46
11.- Consumo de proteínas de las ratas vírgenes y lactantes alimentadas con la dieta BP 47
12.- Consumo de proteínas de las ratas vírgenes y lactantes alimentadas con la dieta NP 48
13.- Consumo de proteínas de las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP y BP 49
14.- Consumo de energía de las ratas vírgenes alimentadas con la dieta NP y BP 53
15.- Consumo de energía de las ratas vírgenes y lactantes alimentadas con la dieta BP 54
16.- Consumo de energía de las ratas vírgenes y lactantes alimentadas con la dieta NP 55
17.- Consumo de energía de las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP y BP 56
18.- Cambios en la actividad específica de la catepsina L en el hígado 61
19.- Cambios en la actividad específica de la catepsina L en el músculo esquelético 62
20.- Cambios en la actividad específica de la catepsina L en la glándula mamaria 63
21.- Cambios en la actividad de la catepsina L por gramo de tejido en el hígado 68
22.- Cambios en la actividad de la catepsina L por gramo de tejido en el músculo esquelético 69
23.- Cambios en la actividad de la catepsina L por gramo de tejido en la glándula mamaria 70

Página

24.- Cambios en el contenido enzimático del hígado 75
25.- Cambios en el contenido enzimático del músculo esquelético 76
26.- Cambios en el contenido enzimático de la glándula mamaria 77

Apéndice

Página

1.- Número de animales a lo largo del estudio 93
2.- Peso promedio de las ratas a lo largo del estudio con desviación estándar y número de animales 94
3.- Consumo de alimento promedio de las ratas a lo largo del estudio con desviación estándar y número de animales 95
4.- Consumo de proteínas promedio de las ratas a lo largo del estudio con desviación estándar y número de animales 96
5.- Consumo de calorías promedio de las ratas a lo largo del estudio con desviación estándar y número de animales 97
6.- Datos de Actividad Específica de catepsina L por miligramo de proteína con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en el hígado 98
7.- Datos de Actividad Específica de catepsina L por miligramo de proteína con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en el músculo 99
8.- Datos de Actividad Específica de catepsina L por miligramo de proteína con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en la glándula 100
9.- Datos de Actividad de catepsina L por gramo de tejido con desv. Std. Y número de animales por grupo y por dieta en el hígado 101
10.- Datos de Actividad de catepsina L por gramo de tejido con desv. Std. Y número de animales por grupo y por dieta en el músculo 102
11.- Datos de actividad de catepsina L por gramo de tejido con desv. Std. Y número de animales por grupo y por dieta en la glándula 103
12.- Datos del contenido de catepsina L por órgano total con desv. Std. Y núm. de animales por grupo y por dieta en el hígado 104
13.- Datos del contenido de catepsina L por órgano total con desv. Std. Y núm. de animales por grupo y por dieta en el músculo 105
14.- Datos del contenido de catepsina L por órgano total con desv. Std. Y núm. de animales por grupo y por dieta en la glándula 106

Índice de Cuadros

	Página
Cuadro no. 1 Composición de las dietas	20
Cuadro no. 2 Datos para elaborar la curva de proteinas	26
Cuadro no. 3 Comparación del consumo de alimento en los grupos BP y NP durante la lactancia con su desv. Std.	37
Cuadro no. 4 Comparación del consumo de proteinas en los grupos BP y NP durante la lactancia con su desv. Std.	45
Cuadro no. 5 Comparación del consumo de energía en los grupos BP y NP durante la lactancia con su desv. Std.	52
Cuadro no. 6 Cambios en la actividad específica de la catepsina L por miligramo de proteína	60
Cuadro no. 7 Cambios en la actividad de la catepsina L por gramo de tejido	67
Cuadro no. 8 Cambios en el contenido de catepsina L en el órgano total de los orgános	74

1. INTRODUCCIÓN

Desde los principios de la historia, la leche materna ha sido esencial para la continuidad de la raza humana. Las necesidades nutricionales del infante se satisfacen mejor con la leche materna que con cualquier sustituto y ya que no se ha logrado mejorarla se sigue considerando como patrón de referencia. Se han identificado más de 100 componentes de la leche humana, la mayoría de ellos son nutrientes y unos pocos no son nutritivos.

1.1 El proceso de la lactancia

La lactancia implica una secuencia de eventos desde la síntesis de los componentes de la leche en los lactocitos de los alveolos, la liberación de la leche de los alveolos hacia los conductos, el paso de la leche a través de los conductos hacia los senos galactóforos y la extracción de la leche de los senos por el lactante.

Las glándulas mamarias son capaces de iniciar la lactancia en el postparto inmediato, de mantener la producción y la liberación continuas de la leche durante el período del amamantamiento. Durante esta etapa, que puede ser prolongada, la glándula es capaz de cambiar la composición de la leche para adecuarla a los requerimientos del lactante.

1.2 Las proteínas de la leche

Las proteínas específicas de la leche, como son la caseína, la lactoferrina, y la α -lactalbúmina son sintetizadas por la glándula mamaria pero otras, como la albúmina, se derivan de la sangre materna.

En el humano, la composición y la concentración de las proteínas en la leche cambian conforme avanza la lactancia. El nitrógeno y las proteínas totales tienen una mayor concentración en el calostro, disminuyendo rápidamente en el primer mes de la lactancia para luego reducirse más lentamente. Sin embargo el volumen de leche aumenta, de tal manera que al final de la lactancia, el infante ingiere un mayor volumen de leche, pero con una menor concentración de proteínas por unidad de volumen. (1)

1.3 Los requerimientos de proteínas de la madre lactante

Se puede definir el requerimiento de proteína como el nivel mínimo de proteína dietética que debe de consumir un individuo de cualquier especie, para mantener un balance de nitrógeno en equilibrio que le permita cubrir sus necesidades, bajo condiciones estables de energía y actividad física moderada.

En niños y mujeres embarazadas deben tomarse en cuenta las necesidades asociadas con la deposición de tejidos durante el crecimiento, para mantener un buen estado fisiológico. (2)

Cuando existe un aporte suficiente de proteínas exógenas, las proteínas del individuo guardan un estado de equilibrio dinámico por medio de un catabolismo constante de las proteínas viejas y la síntesis de nuevas proteínas, sin un cambio perceptible en el contenido total. A dicho fenómeno se le conoce como recambio de proteínas o índice de renovación, el cual varía ampliamente entre los diferentes tipos de proteínas y entre los tejidos individuales.

La renovación total periódica de las proteínas representa una demanda de aminoácidos muy superior a la cantidad aportada en la dieta, por lo que el balance se conserva reutilizando los aminoácidos producidos por la hidrólisis de las proteínas propias y sintetizando aminoácidos no esenciales. (3)

Los requerimientos maternos de nutrientes durante la lactancia y la dieta

La lactancia satisfactoria representa el mayor estrés nutricional impuesto por un proceso fisiológico al cuerpo humano. Las necesidades dietéticas de la mujer que lacta se ven afectadas por varios factores que cambian con el tiempo de la lactancia.

La leche contiene energía y nutrimentos que son aportados por el cuerpo materno. El proceso de la síntesis de los componentes de la leche requiere energía y nutrientes adicionales, algunos de los cuales deben ser tomados de los tejidos maternos.

La revisión de los costos de lactancia muestra que para obtener una salud óptima de largo plazo de la madre y el infante, se requiere un aumento en la ingesta de nutrimentos de la madre, aún en mujeres bien nutridas antes y durante la lactancia.

El hecho de que en los países subdesarrollados, las mujeres con desnutrición crónica produzcan leche, es una prueba de la capacidad del organismo materno para adaptarse a una ingesta deficiente de nutrientes. Esa adaptación puede incluir una mayor eficiencia en la absorción y/o en la utilización de los nutrientes, el agotamiento de las reservas corporales y una disminución en el volumen de leche producida, lo que podría tener como consecuencia la limitación en el crecimiento del infante o bien, la madre puede restringir su actividad física.

1.4 Energía

Para que la mujer lactante produzca un volumen de 850 ml/día se ha recomendado una ración dietética que ofrezca 500 Kcal/día adicionales a los requerimientos de la mujer no embarazada y no lactante.

La ración adicional de proteínas en la lactancia se calcula a partir de la cantidad de leche producida, multiplicada por un factor que determina la eficiencia de conversión de la proteína dietética a proteína de la leche y además por el valor biológico de la proteína en la dieta de la mujer. Se sabe que los requerimientos de proteínas aumentan a un máximo en el quinto mes postparto y después permanecen estables. Si la leche humana contiene en promedio 1.2g de proteína / 100ml y consideramos una producción de 850 ml diarios, la leche aporta aproximadamente 10 g de proteína; la RDA consideró como límite superior 15 g.

Ya que la RDA considera una eficiencia metabólica de 70% para las proteínas, la mujer que lacta necesitaría ingerir en su dieta de 16 a 17 g de proteína extra de la misma alta calidad para producir 10 g de proteína en la leche. Debido a que la mayor parte de las proteínas de la dieta no son de alta calidad, se considera necesario corregir la ingesta de proteínas por un factor de 1.25 para la dieta occidental, en la cual el 60% de las proteínas son de origen animal. Por lo que se recomienda aportar a la dieta de la mujer lactante un 20% más de proteína, que la cantidad de proteína recomendada para la dieta de la mujer no embarazada no lactante.

1.5 Estudios en animales

A través de la historia, los estudios en animales han contribuido enormemente a la comprensión de las funciones fisiológicas y bioquímicas de los nutrimentos. El uso de los animales de laboratorio en los estudios de la nutrición ofrece muchas ventajas y la metodología que se utiliza en esos estudios se aplica en forma más flexible.

En estos estudios se puede tener un control tanto cuali como cuantitativo de la dieta, pudiendo crearse deliberadamente deficiencias específicas y observar sus resultados. La vida más corta de los animales de laboratorio permite estudiarlos durante todo un ciclo de vida o a través de varias generaciones, para estudiar los efectos producidos a largo plazo por la deficiencia de algún nutrimento.

Ya que los animales pueden ser sacrificados, se puede realizar el análisis morfológico y bioquímico de sus tejidos, lo que permite identificar los posibles cambios que sufren los nutrimentos dentro en el organismo.

1.6 La rata lactante como modelo experimental

La lactancia en la rata dura alrededor de 21 días y se sabe que en el periodo comprendido entre los días 10 y 14 se tiene la mayor producción de leche. La rata presenta una serie de cambios fisiológicos dramáticos, por ejemplo, en la última semana de la lactancia existe un incremento de 300% en la ingesta de alimento, cuando se compara con la ingesta de una rata no embarazada no lactante (4,5). Se presenta también, la hipertrofia de varios órganos y tejidos diferentes de la glándula mamaria, como son el hígado, el riñón, el tracto gastrointestinal y el corazón, relacionado con este último, se observa un aumento del gasto cardiaco de 57%.

1.7 El requerimiento de proteína para la rata durante la gestación y la lactancia

Los requerimientos de la rata durante el embarazo y la lactancia han sido propuestos por el National Research Council (NRC), en su ultima revisión el año

de 1978. Dichos requerimientos se cubren con una dieta que contiene 13% de caseína y 5.6% de lipidos. Se considera que los nutrimentos obtenidos a partir de esa dieta son ideales para satisfacer las necesidades de la rata durante el crecimiento y es adecuada para cubrir la demanda del crecimiento fetal durante el embarazo y la producción de leche durante la lactancia.

Las recomendaciones son de 2.3 g de proteína/día para la rata gestante y de 4 g/día para la rata lactante, para calcular estos requerimientos el NRC consideró la calidad de la proteína (composición adecuada de aminoácidos) y su digestibilidad. (6)

II. ANTECEDENTES

2.1 Efecto del embarazo y la lactancia en el metabolismo de proteínas de la rata madre

En la actualidad es bien conocida la presencia de la reserva lipídica en el organismo materno, la cual se forma durante el embarazo y es consumida totalmente durante la lactancia, pero la información sobre el metabolismo de las proteínas es más limitado. (7,8,9)

Diferentes investigadores han observado, durante la lactancia, una pérdida de masa proteíca muscular, ya sea estudiando el contenido de proteínas en el carcas o en el músculo.

Desde 1950 Spray (9) reporta que la rata madre acumula proteínas, lípidos, potasio, zinc y cobre durante el embarazo para después eliminarlos durante la lactancia, en el caso de los lípidos se pierde la totalidad de lo retenido durante el embarazo y para las proteínas reporta únicamente una pérdida parcial (6 %).

Para 1980 Kanto y Clawson (7) proporcionan a las ratas de su estudio, la dieta referida por el NRC (13.2% de caseína) y obtienen que las ratas tienen una acumulación de lípidos, proteínas y cenizas durante el embarazo, pero al llegar al periodo de lactancia, hay una disminución del porcentaje de grasa y del contenido de proteínas y minerales traza del carcas, el cual es mayor para las ratas sometidas al régimen alimenticio, además de que se observa una disminución en la masa muscular.

En 1982 Naishmith y col.(10) suministran una dieta pobre en proteínas (11%) a sus animales, lo cual produce una pérdida de proteína (5.8 g) en el carcas de la rata madre al día 16 de la lactancia, sin embargo, una dieta rica en proteínas (25%) produjo una ganancia (2.3g) .

Moore y Brasel (8) en 1984 muestran en ratas de la cepa *Osborne-Mendel*, que aquellos animales alimentadas con una dieta rica en proteína (25%) perdieron proteína (2.6%) durante la lactancia y aquellas restringidas en un 30% (17.5% de proteínas) tuvieron una pérdida mayor (10.6g).

De Santiago y col. (11) en 1991 en un estudio realizado con una dieta comercial (Chow,Purina) y con un consumo a libre demanda en ratas Sprague Dawley, detectó una disminución de proteínas en la masa muscular .

Durante 1993 y 1994 Hernández Montes H., et al. (12,13) observaron un incremento en la actividad proteolítica del hígado, la glándula mamaria (catepsina D y L) y el músculo esquelético (proteasa miofibrilar) de la rata lactante alimentada con una dieta comercial adecuada en energía y proteína. Estos incrementos se anularon 24 h después de que las crías fueron separadas de la rata madre.

En 1976 Naismith y Morgan (14) describen la característica bifásica del metabolismo de las proteínas durante el embarazo de la rata. Durante las dos primeras semanas de la gestación (fase ANABÓLICA) la rata almacena proteínas, mientras que en la tercera semana de gestación, la reserva proteínica es utilizada para favorecer el rápido crecimiento fetal (fase CATABÓLICA).

Una observación semejante hacen Beaton et al. (15) en 1954, al describir una disminución en el contenido de nitrógeno de sus ratas después de 15 días de embarazo y hasta el parto, coincidente con el crecimiento de los fetos.

Pine, Jessop et al. (16,17) en 1993 y 1994 realizan un estudio con ratas *Sprague - Dawley* , encontrando diferencias en el contenido de proteínas del carcas de los cuatro grupos estudiados, apoyando la teoría de los cambios en la masa proteínica durante la gestación, reportados anteriormente por Naismith.

Por otro lado, Remesar , Arola y col. (18) no encuentran variaciones en el contenido de proteínas del músculo estriado de la rata durante el ciclo reproductivo y Siebrits, et al. (19) no encuentran evidencia de la movilización de proteínas musculares para proporcionar aminoácidos para la biosíntesis de leche.

2.2 Las enzimas y su importancia

Las proteínas desempeñan papeles cruciales en prácticamente todos los procesos biológicos, casi todas las reacciones químicas en los sistemas biológicos están catalizadas por macromoléculas específicas denominadas enzimas. El hecho sorprendente es que todas las enzimas conocidas son proteínas y sus características más sobresalientes son su poder catalítico y especificidad. (20,21)

2.3 Las enzimas proteolíticas

La reacción catalizada por estas enzimas es la hidrólisis de un enlace peptídico. Y se han clasificado en cuatro clases: las proteasas con serina, las proteasas con cisteína, las proteasas con aspártico y las metalopeptidasas (comunmente con zinc) . (20)

2.3.1 La catepsina L

Desde la creación de un sistema de nomenclatura para las enzimas en 1950, las proteasas (peptido hidrolasas) no han encajado perfectamente en este sistema de clasificación y nomenclatura generado para las enzimas en particular, por lo que han surgido recientemente tres criterios para la clasificación de las peptidasas: (a) de acuerdo a la reacción que catalizan (b) la naturaleza química del sitio activo y (c) la relación evolutiva. Por lo que la catepsina L se puede clasificar como perteneciente a la familia de las papainas y cys-endopeptidasa. Cys, porque contiene una cisteína en su sitio activo y endopeptidasa porque actúa preferentemente en la región interna de las cadenas polipeptídicas, alejada de las regiones terminales, y de la presencia de grupos α amino y α carbolino libres. (22,23)

La hidrólisis de proteinas tisulares como un medio de obtener aminoácidos para el metabolismo del tejido y participante en el recambio de proteínas está mediada por proteasas (24) . Entre las proteasas tisulares se describen las enzimas de origen lisosomal, cuya característica principal es actuar en un pH óptimo ácido y otras proteasas no lisosomales cuyo pH óptimo generalmente es alcalino.

El lisosoma es un organelo limitado por una membrana que contiene varias decenas de enzimas diferentes, en su mayoria de la variedad "hidrolasas ácidas", estas reacciones catalíticas son del tipo: (25)

$$A\text{-}B \longrightarrow A\text{-}H + B\text{-}OH$$

La catepsina L, es una glucoproteína, que a pesar de ser la proteinasa lisosomal más poderosa, fue descubierta hasta hace poco tiempo, debido a su baja o ninguna actividad con los sustratos sintéticos convencionales (Bz-Arg-$NPhNO_2$ y Bz-Arg-NNap), aunque ha sido estudiada con otros sustratos como Bz-Arg-NH_2, Z-Lys-$OPhNO_2$, Z-Phe-Arg-Nmec y también con azocaseína. (26)

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el embarazo y la lactancia, el organismo materno realiza una serie de ajustes en su metabolismo para permitir que se lleve a cabo la correcta formación y desarrollo del feto en el primero y el crecimiento y desarrollo postparto en la segunda.

Una lactancia satisfactoria representa el mayor estres nutricional impuesto por un proceso fisiológico al organismo materno, a tal grado que durante este periodo la madre incrementa su ingesta y moviliza sus reservas corporales.

Se ha sugerido que durante los dos primeros tercios del embarazo en la rata, la madre forma una reserva de proteínas la cual es movilizada en el último tercio del embarazo para solventar la gran demanda que representa el crecimiento del feto, lo que significa que el organismo materno inicia la lactancia sin reservas proteínicas.

La concentración de proteínas consumidas en el alimento por la madre que esta lactando, permitirá o no, al organismo materno, cubrir las demandas de la lactancia y en caso negativo provocará que durante ese periodo la madre movilice cantidades variables de proteínas de sus tejidos. Esa movilización se producirá solamente si se incrementa la actividad de las proteasas en los tejidos.

No existen estudios que muestren el efecto crónico de la ingesta de diferentes concentraciones de proteínas por la rata, durante la lactancia, sobre la hidrólisis y la movilización de las proteínas de sus propios tejidos.

IV. OBJETIVO

Determinar la influencia de la administración crónica de una dieta baja en proteínas (11%) comparada con una dieta de concentración normal (18%), sobre el catabolismo de las proteínas en el hígado, el músculo y la glándula mamaria de la rata durante la lactancia, utilizando como indicador de la proteólisis a la catepsina L.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se utilizaron ratas blancas hembras de la cepa *Sprague-Dawley* de 14 semanas de edad con un peso de 260 ± 10 g, las cuales fueron colocadas en jaulas colectivas con un máximo de 8 animales. Las ratas se obtuvieron del bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Los animales se mantuvieron a 22°C con un ciclo luz : obscuridad de 12:12 horas, iniciándose el periodo luminoso a las 0700 h. El alimento y el agua estuvieron disponibles para que fueran consumidos a libre demanda.

Los animales fueron incluidos al azar en los grupos que enseguida se enlistan:

Grupo 1.- Ratas lactantes alimentadas durante todo el estudio solamente con una dieta de contenido normal en proteína (20 % de caseína) (18 animales)

Grupo 2.- Ratas vírgenes pareadas en edad con el grupo 1 (18 animales)

Grupo 3.- Ratas lactantes alimentadas durante todo el estudio exclusivamente con una dieta cuyo contenido fue bajo en proteína (12.3% de caseína) (18 animales)

Grupo 4.- Ratas vírgenes pareadas en edad con el grupo 3 (18 animales) (anexo 1)

El grupo de ratas vírgenes pareadas en edad es un control que se utiliza para conocer los posibles efectos ocasionados por la edad de los animales, sobre los parámetros estudiados y que podrían sumarse a los estímulos producidos por la lactancia.

Para lograr la adaptación de los animales a las dietas seleccionadas cada grupo fue alimentado exclusivamente con su dieta desde 2 semanas antes de la cruza. En todos los casos se registró cada tercer día, el peso corporal y la ingesta de alimento desde el primer día de la adaptación hasta el día del sacrificio.

Al alcanzar las 16 semanas de edad, los animales fueron cruzados durante una semana con machos de la misma cepa. Terminada la cruza las hembras fueron colocadas en jaulas individuales. Las ratas embarazadas fueron identificadas por los incrementos en el peso corporal.

El dia del parto se registró el número de crías y el peso de la camada, ajustando de inmediato la camada a 8 crías por cada rata con las cuales se continuó la lactancia. Este ajuste se realiza para homogeneizar el efecto del número de las crías en la producción de la leche.

Seis animales de cada grupo fueron sacrificados los días 7,14 y 21 de la lactancia, o de la edad equivalente en los grupos control. Estos días fueron seleccionados ya que el día 14 representa la máxima producción láctea y el día 21 es el último día de la lactancia. (Dando un total de 72 animales 36 para el grupo alimentado con la dieta NP y 36 para el alimentado con la dieta BP) (anexo 1).

5.2 Dietas

Se prepararon galletas a base de dos dietas isocalóricas semipurificadas las cuales fueron elaboradas en nuestro laboratorio, una contenía 12.3 y la otra 20% de caseína (equivalente a 11 y 18% de proteína). Se utilizó la caseína por ser una proteína de alta digestibilidad (90%). En cada caso la composición fue modificada en su contenido de glucosa, almidón y lípidos para hacerlas isocalóricas (3800 Kcal/kg) según se muestra en el cuadro número 2:

CUADRO 1

COMPOSICION DE LAS DIETAS

	11% Proteína			18% Proteína		
	g/Kg	g/100Kcal	Kcal/Kg	g/Kg	g/100Kcal	Kcal/Kg
Caseína	123 00	3 24	492	200 00	5 26	800
Glucosa	375 25	9 87	1501	346 75	9 12	1387
Almidón	375 25	9 87	1501	346 75	9 12	1387
Aceite vegetal	33 70	0 88	304	25 30	0 87	228
Celulosa	37 80			37 80		
Metionina	3.00			3 00		
Minerales	26.10			26.10		
Vitaminas	10.00			10.00		

Dietas isocalóricas 3800 Kcal/kg

Para evitar la confusión del alimento con el serrín de la caja, cada una de las dietas fue identificada con un color diferente, para eso se adicionó colorante vegetal de color verde para identificar a las galletas de la dieta Normal en proteína (2.5ml de colorante verde /1000ml de agua) y colorante naranja para las galletas de la dieta Baja en proteína (1.7 ml de colorante rojo + 0.8 ml de amarillo / 1000 ml de agua).

La concentración de 11% de proteína limita el aporte de aminoácidos pero permite el crecimiento y la lactancia en la rata (27,28).

5.3 Preparación del homogeneizado

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente después fueron disecados, el hígado, las glándulas mamarias (pectorales e inguinales) y el paquete muscular de la pata trasera izquierda (gastronemio, plantar, largo digital).

Los tejidos fueron finamente picados con tijeras y lavados tres veces con una solución de sacarosa 0.25 M, tris 0.01 M de pH 7.4 fría, para eliminar la sangre contaminante. Se elimino también el tejido conectivo.

Una vez lavados los tejidos se homogeneizaron con un homogeneizador tipo Polytron (Tissumizer, marca Tekmar) con el amortiguador previamente descrito (1:3 p/v). Los homogeneizados fueron utilizados como fuente de la enzima.

Todas las manipulaciones se realizaron en hielo.

5.4 Síntesis del Sustrato (azocaseína)

La azocaseína es un derivado de la caseína, en donde la tirosina e histidina, son copuladas con ácido sulfanílico o sulfanilamida en medio básico, el grupo azo - copulado confiere un color amarillo intenso a la proteína. La degradación proteolítica de la azocaseína produce péptidos solubles en ácido tricloroacético diluido que pueden ser cuantificados por su absorbancia a 366 nm. (26)

La azocaseína fue preparada de acuerdo con el método de Starkey (29). Para ello se prepararon dos soluciones:

Solución A: Se disolvieron 50 g de caseinato de calcio en un litro de tetra-borato de sodio 50 mM, la mezcla se mantuvo en agitación durante toda la noche. Después el pH fue ajustado a 9 con hidróxido de sodio y el material insoluble fue removido por centrifugación a 9000 x g por 40 min.

Solución B: Se disolvieron 5 g de ácido sulfanílico en 200 mL de agua y posteriormente se añadieron 12 mL de hidróxido de sodio 5 M. Se agregaron después 2.2 g de nitrito de sodio y se agitó hasta quedar completamente disuelto. Enseguida se adicionaron 18 mL de ácido clorhídrico 5M y se agitó exactamente durante 2 min para agregar 18 mL de hidróxido de sodio 5 M e inmediatamente se mezcló esta solución con la solución A. Esta última mezcla se mantuvo en agitación toda la noche a 4° C.

Todas las manipulaciones se realizaron en hielo.

5.4.1 Purificación de la azocaseína

Ya que partimos de un producto comercial es necesario purificar nuestro sustrato. La azocaseína fue precipitada por la adición, con agitación constante, de un amortiguador de formato de sodio-ácido fórmico 5 M, pH 4.

La azocaseína precipitada, fue colectada por centrifugación a 9000 x g durante 40 min y el sobrenadante fue descartado. El sedimento se disolvió en un volumen mínimo de Tris-HCl 2M, pH 9 y se dializó contra agua durante tres días, con 3 cambios diarios de agua.

La solución dializada fue liofilizada (Labconco 4451F) y el polvo obtenido fue conservado en refrigeración.

5.5 Determinación de la actividad enzimática

5.5.1 Catepsina L

Se aplicó con algunas modificaciones el método descrito por Barrett (26). Para lograr la activación de la enzima, 0.2 mL del homogeneizado fueron pre-incubados a 38°C durante 15 min con 0.55 mL de un amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5 que contiene 5 mM de cisteína. Transcurrido ese tiempo se agregaron 0.25 mL del sustrato (azocaseína al 4%) y se incubaron por 60 min. La reacción fue terminada por la adición de 3 ml de ácido tricloroacético 3% y el sobrenadante fue separado por centrifugación a 5000 x g durante 15 min. Los productos liberados por la acción de la enzima fueron medidos directamente en el sobrenadante por su absorción a 366 nm (Espectrofotómetro Philips modelo PU 8720).

Estas condiciones fueron previamente establecidas en nuestro laboratorio (30).

La actividad enzimática se informa como:

1. Actividad específica. Se expresa como las unidades de absorción a 366 nm producidas por miligramo de proteína, durante el tiempo de incubación.

2. Actividad por gramo de tejido. Se expresa como unidades de absorbancia a 366 nm producidas por un gramo de tejido húmedo.

3. Actividad total. Expresa el total de unidades totales de enzima contenidas en todo el órgano.

5.6 Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se realizó empleando el método de Lowry modificado por Hartree (31). Para lo cual se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: Se disolvieron 2 g de tartrato de sodio y potasio y 100 g de carbonato de sodio anhídro en 500 mL de hidróxido de sodio 1N y aforados con agua a un litro.

Solución B: Dos gramos de tartrato de sodio y potasio y un gramo de sulfato de cobre pentahidratado fueron disueltos en 90 mL de agua, agregando posteriormente 10 mL de hidróxido de sodio 1N.

Solución C: Se preparó una solución del reactivo del fenol de Folin-Ciocalteu (Sigma de México S.A. de C.V.) diluyendo 1 mL del reactivo concentrado con 15 mL de agua.

5.6.1 Método

A 0.4 mL del homogeneizado diluído (1:3) de la glándula virgen ó a 0.25 ml de las diluciones (1:10) del hígado, el músculo y la glándula mamaria de las ratas lactante se les adicionó agua suficiente para completar un volumen de 1 mL.

Después se agregaron a todos los tubos 0.9 mL de la solución A y se incubaron en un baño maría a 50° C por 10 min, posteriormente los tubos fueron mantenidos a 4°C durante 10 min y se les adicionó 0.1 ml de solución B.

La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min, se adicionaron 3 mL de la solución C y de inmediato se agitaron vigorosamente con la ayuda de un agitador tipo Vortex.

Los tubos fueron de nuevo incubados a 50°C por 10 min y enfriados a 4°C durante 10 min. Al finalizar se determinó la absorbancia a 740 nm.

5.6.2 Curva de Proteínas (Albúmina de suero de Bovino)

Esta curva fue preparada por triplicado mezclando diferentes volúmenes de una solución de albúmina de suero bovino (100 µg/ml). La adición de las soluciones A,B y C fue idéntica a la explicada en la sección 4.6.1. Un ejemplo se muestra en el cuadro 2.
La gráfica de estos datos se muestra en la gráfica1.

5.6.3 Diluciones de los homogeneizados

Los homogeneizados fueron diluidos en diferente proporción dependiendo de su contenido de proteínas. Para el hígado, el músculo y la glándula mamaria de las ratas lactantes se utilizó una dilución 1:100 (v/v) con sacarosa 0.25 M.

En el caso de la glándula mamaria de las ratas vírgenes se empleó una dilución 1:50.

5.7 Tratamiento estadístico

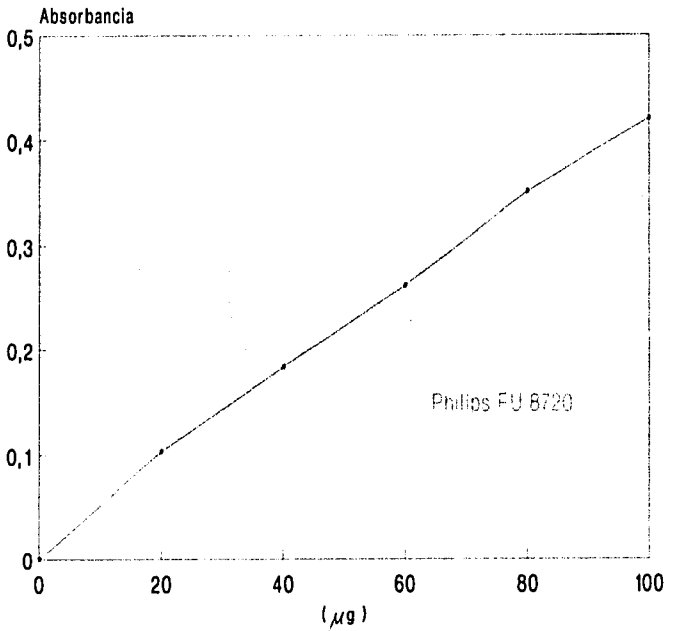
Todos los datos fueron analizados mediante ANOVA y t de Student en el programa MINITAB (Minitab, Inc. V 1.1).

CUADRO 2

DATOS PARA ELABORAR LA CURVA DE PROTEÍNA
(Albúmina de suero de Bovino)

Solución de albúmina (mL)	Concentración de albúmina (µg)	Absorbancia Promedio (740 nm)	Absorbancia restando el blanco
0	0	0.063	
0.2	20	0.166	
0.4	40	0.246	
0.6	60	0.324	
0.8	80	0.414	
1.0	100	0.484	

GRAFICA 1. CURVA DE PROTEINA
ALBUMINA DE SUERO DE BOVINO



VI. RESULTADOS

6.1 Peso corporal de los animales

El registro del peso corporal realizado cada tercer día en las ratas alimentadas con la dieta normal (NP) y con la dieta baja en proteína (BP), mostró que los animales de ambos grupos incrementaron su peso desde la primera semana de la adaptación (14 semanas de edad) y mantuvieron este incremento hasta la última semana de la lactancia (22 semanas de edad).

La gráfica 2 muestra los cambios en el peso de las ratas vírgenes (no embarazadas, no lactantes) alimentadas durante todo el estudio con la dieta NP o con la dieta BP. Ya que estos animales son los controles de edad de los grupos experimentales, la gráfica se dividió en cuatro secciones, la de adaptación a las dietas, que es igual para todos los animales y las secciones equivalentes a los periodos de cruza, embarazo y lactancia.

Durante las dos semanas de adaptación el mayor incremento lo registraron las ratas alimentadas con la dieta baja en proteína, sin embargo, solo se identificó una diferencia significativa con el grupo alimentado con la dieta normal ($p= 0.018$) en el tercer día de la adaptación. En total, el incremento de peso en las ratas de la dieta baja en proteína fue de 17 g mientras que para las ratas alimentadas con la dieta normal fue únicamente de 13.8 g.

En el período de la cruza, el aumento de peso, fue mayor para las ratas alimentadas con la dieta BP (24.5 g) pero no se observó ninguna diferencia significativa con el grupo NP (23.4 g).

En la etapa del embarazo (17-19 semanas de edad), la ganancia de peso fue mayor en las ratas alimentadas con la dieta normal en proteína (44.8 g vs 42 g de la dieta baja), este aumento continúa hasta la última semana de la

lactancia donde la ganancia de peso para las ratas NP es de 54.8 g y para las ratas BP es de 52.2 g.

Por otro lado, en las gráficas 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos con las ratas embarazadas y lactantes alimentadas con la dieta NP y BP respectivamente y se comparan con los pesos de sus controles vírgenes pareados en edad, (ratas vírgenes durante todo el estudio, gráfica 2). Se observa que las ratas embarazadas y lactantes alimentadas con la dieta NP como las de la dieta BP, presentan pesos mayores que sus correspondientes controles vírgenes, esa diferencia es debida al aumento en el peso del útero y los fetos en el embarazo y por el aumento en el peso de la glándula mamaria y otros órganos en la rata lactante.

Los animales que alcanzan el mayor peso al final del embarazo, son aquellos alimentados con la dieta BP (409 .3 g) mientras que los alimentados con la dieta NP pesan, al final del embarazo 368.4 g. Después del parto, tanto las ratas de la dieta NP como las de la dieta BP, muestran evidentemente una brusca disminución de peso.

En los primeros días de la lactancia, las ratas alimentadas con la dieta NP muestran un peso ligeramente mayor que el de sus correspondientes controles vírgenes pero a partir del séptimo día de la lactancia y hasta el final de ésta, el peso de las ratas lactantes es menor que el de sus controles vírgenes. Esta diferencia no es estadísticamente significativa. Podemos decir que las ratas lactantes tienden a igualar el peso de sus controles vírgenes (gráfica 3).

Por otro lado, en los primeros días de la lactancia, las ratas alimentadas con la dieta BP muestran, a diferencia de los animales alimentadas con la dieta

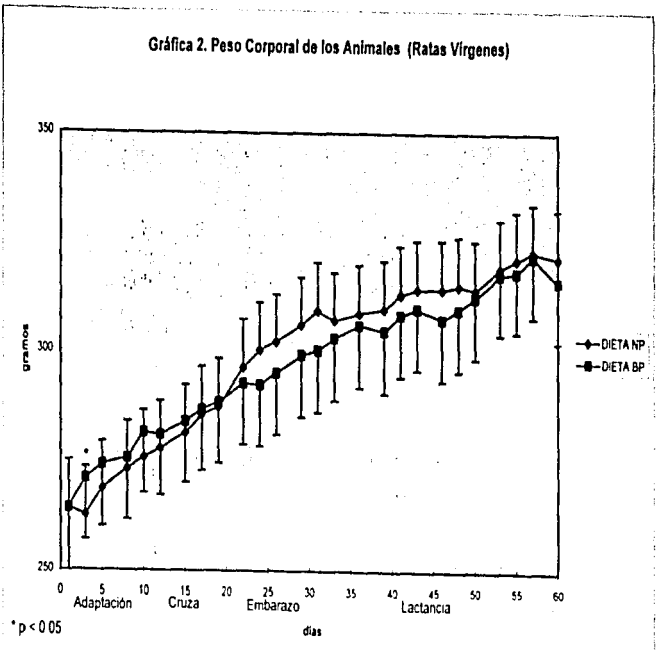
NP, un peso ligeramente menor al de sus controles vírgenes, pero al séptimo día el peso es ligeramente mayor al de los controles. Esa diferencia se mantiene hasta el final de la lactancia y es significativa ($p<0.02$) a los 5, 14 y 16 días de lactancia (gráfica 4).

La gráfica 5 compara los cambios en el peso corporal de las ratas embarazadas y lactantes alimentadas con la dieta NP y BP.

Durante el embarazo las ratas alimentadas con la dieta NP como las de la dieta BP, presentan una ganancia de peso de 104.4 y 145.3g respectivamente, en el caso de las ratas NP el mayor peso, se registró a los 19 días de embarazo, con una disminución de 11.5 g al llegar a los 21. Por el contrario, las ratas alimentadas con la dieta BP presentaron el mayor peso a los 21 días y es en este único día, cuando la diferencia en el peso de las ratas BP es significativa con respecto a las ratas NP.

Después del parto, el peso promedio de las ratas alimentadas con la dieta NP fue de 316.5 g mientras que el de las ratas de la dieta BP era de 308.35, esto es al iniciar la lactancia las ratas NP tienen 8.15 g más de peso que las ratas de la dieta BP. El peso para las ratas de la dieta NP fue mayor durante los primeros siete días de la lactancia y fue a partir del noveno día, cuando se observó en las ratas BP un incremento moderado pero constante en el peso de las ratas lactantes hasta que en el último día de la lactancia el peso de estos animales era mayor que el de las ratas NP. Por el contrario, el peso de las ratas alimentadas con la dieta NP disminuyó a partir del séptimo día de lactancia y se mantuvo por debajo del peso de las ratas BP hasta el último día de la lactancia. Esta diferencia es significativa a los 14,16 y 19 días de lactancia con valores de $p< 0.004$, 0.03 y 0.03, respectivamente.

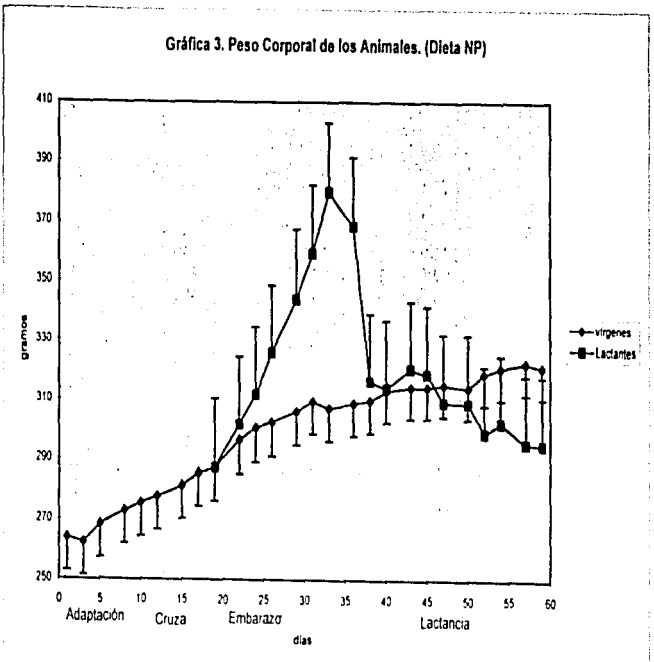
Estos resultados se muestran en la gráfica 5. (anexo 2)



Núm de animales por dieta

adaptación - cruza = 36

embarazo - lactancia = 18

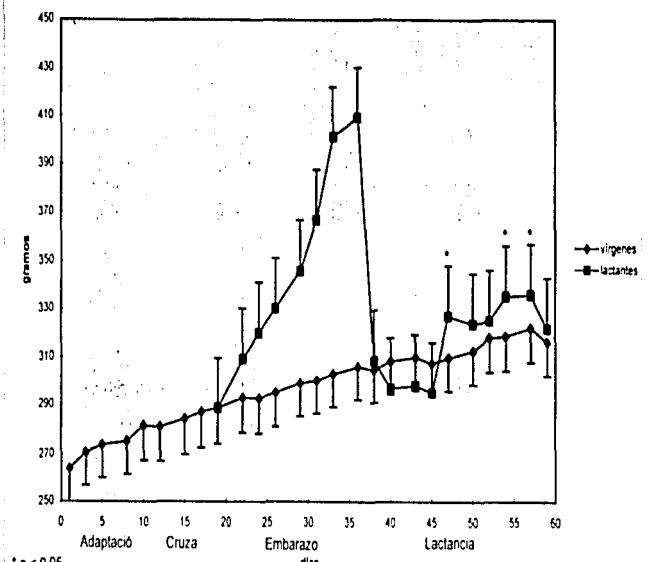


Núm de animales (embarazo y lactancia)

virgenes = 18

lactantes = 18

Gráfica 4. Peso Corporal de los Animales. (Dieta BP)

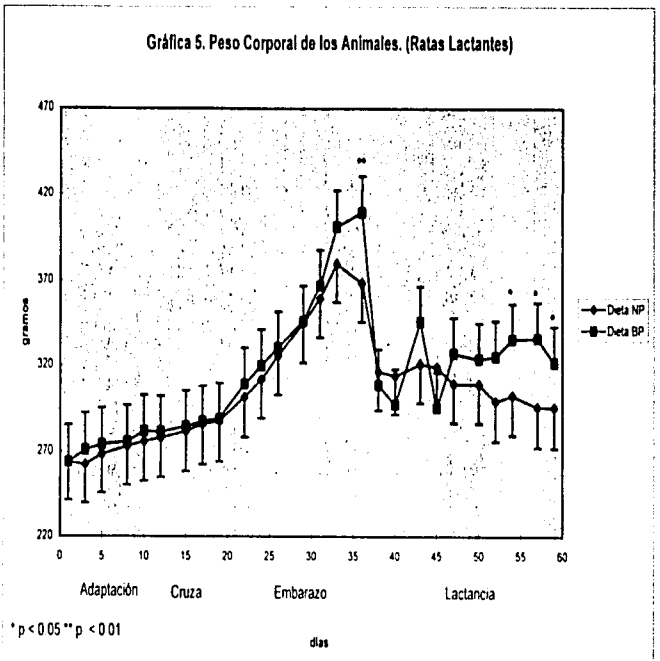


* p < 0 05

Núm de animales (embarazo y lactancia)

virgenes = 18

lactantes = 18



Núm. de animales por dieta
adaptación - cruza = 36
embarazo - lactancia = 18

6.2 Consumo de alimento

Se registró cada tercer día el consumo de alimento de los animales durante el embarazo y la lactancia y el de los grupos control (ratas vírgenes pareadas en edad).

Desde el periodo de adaptación, las ratas vírgenes alimentadas con la dieta baja en proteína (BP) , consumieron una cantidad mayor de alimento con respecto a las ratas alimentadas con la dieta que contiene la cantidad recomendada de proteína (NP). Esta diferencia en el consumo de alimento fue significativa ($p<0.001$) hasta el día 19 de la lactancia. Aunque el último día de la lactancia las ratas alimentadas con la dieta NP presentaron una mayor ingesta que las ratas BP, los valores no mostraron diferencia significativa. (gráfica 6)

En la primera semana de adaptación, las ratas alimentadas con la dieta BP consumieron en promedio 24.5 g de alimento mientras que las ratas alimentadas con la dieta NP consumieron 20.6 g. Durante la segunda semana, las ratas de la dieta BP consumieron en promedio 22 g de alimento y las de la dieta NP 18.5 g. Esto muestra que el consumo de alimento disminuyó con respecto a la primera semana y en mayor proporción en las ratas BP (gráfica 6).

En el periodo de cruza, la diferencia persistió y las ratas alimentadas con la dieta BP ingirieron una cantidad significativamente mayor que las alimentadas con la dieta NP.

El consumo de alimento en las ratas control (no embarazadas no lactantes) en las semanas equivalentes al embarazo y la lactancia

En el lapso equivalente al embarazo (semanas 17 a la 19 de edad) las ratas control alimentados con la dieta BP también consumieron una mayor

cantidad de alimento que las ratas alimentadas con la dieta NP. Sin embargo, este último grupo mostró un consumo muy constante, cercano a los 16 g, si se compara con el grupo de la dieta BP(gráfica 6).

En el período equivalente a la lactancia (semanas 20 a la 22) observamos que las ratas vírgenes alimentadas con la dieta BP mantuvieron su ingesta constante en las dos primeras semanas (alrededor de los 20.2 g) sin embargo en la tercera semana estas ratas presentaron una disminución en el consumo de alimento. El grupo de ratas vírgenes alimentadas con la dieta NP mostró un consumo muy constante solo en la primera semana (16.7 g).

El consumo de alimento en las ratas embarazadas

Durante las dos primeras semanas las ratas embarazadas alimentadas con la dieta BP, mostraron una ingesta semejante a la del grupo control, pero entre los días 14 y 18 se observó un incremento significativo ($p<0.001$) que desaparece al llegar el día del parto (día 21) ya que los animales mostraron una reducción en su ingesta (gráfica 7).

A diferencia de las ratas BP, las ratas embarazadas alimentadas con la dieta NP mostraron siempre una diferencia significativa con respecto a sus controles vírgenes, pero también mostraron la reducción en su ingesta el día del parto (gráfica 8).

El consumo de alimento en las ratas lactantes

A partir de el cuarto día de lactancia las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP presentaron un aumento significativo ($p<0.001$)en el consumo de alimento con respecto a sus controles vírgenes, el cual se incremento constantemente hasta el día 21.

Un efecto similar se observó en el grupo alimentado con la dieta BP. (gráficas 7,8 y 9)

Las variaciones semanales en el consumo de alimento se muestran en el cuadro 3. (anexo 3)

CUADRO 3

Comparación del consumo de alimento en los grupos BP y NP durante la lactancia con su desviación estándar

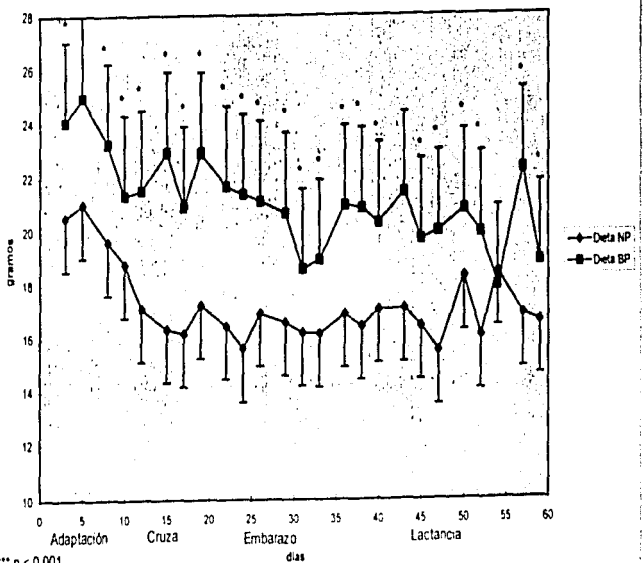
SEMANA	ALIMENTO CONSUMIDO Grupo Control (gramos)		BP/NP	ALIMENTO CONSUMIDO Lactancia (gramos)		BP/NP
	NP	BP		NP	BP	
1	16.32 (1.2)	20.34 (3.2)	1.246	30.13 (5.2)	31.68 (7.6)	1.051
2	17.6 (1.7)	19.5 (2.8)	1.107	43.1 (6.7)	47.5 (8.2)	1.102
3	16.1 (2.7)	18.3 (2.8)	1.136	57.6 (8.3)	62.9 (8.9)	1.092

El número de animales por grupo es de 18 y por dieta es de 36.

La desviación estándar es el promedio de las desviaciones de los consumos de cada semana. (DS)

Se puede observar que durante las tres semanas del estudio, el consumo de alimento fue mayor, tanto para las ratas lactantes como para las vírgenes, en los animales alimentados con la dieta BP en la etapa de la lactancia .

Gráfica 6. Consumo de Alimento. (Ratas Vírgenes)



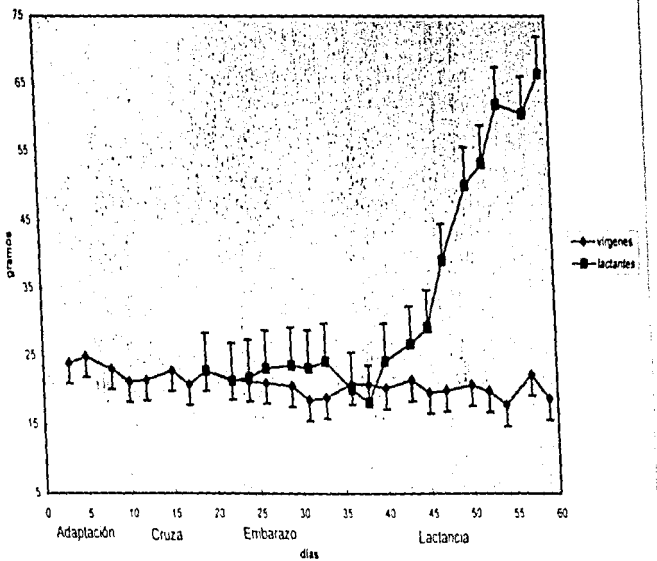
*** p < 0 001

Núm. de animales por deta

adaptación - cruza = 36

embarazo - lactancia = 18

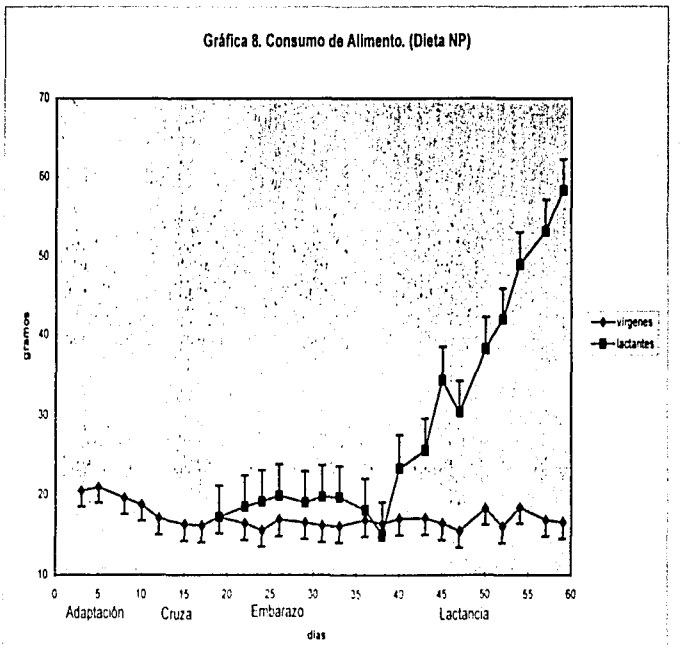
Gráfica 7. Consumo de Alimento. (Dieta BP)



Núm de animales (embarazo y lactancia)

vírgenes = 18

lactantes = 18

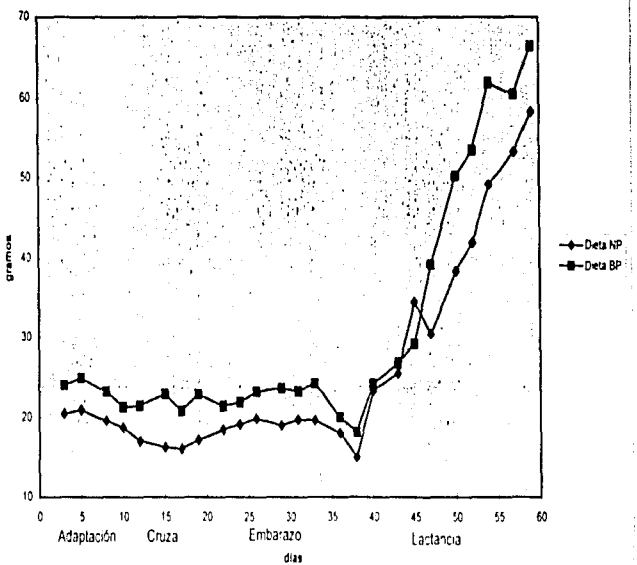


Núm de animales (embarazo y lactancia)

vírgenes = 18

lactantes = 18

Gráfica 9. Consumo de Alimento. (Ratas Lactantes)



Núm de animales por dieta

adaptación - cruza = 36

embarazo - lactancia = 18

6.3 Consumo de Proteínas

La concentración de proteínas consumidas por los animales de los grupos NP y BP fue calculada a partir del alimento total consumido y del cual se llevó un registro cada tercer día durante todo el estudio. La concentración de proteínas en las galletas fue verificada utilizando el método de nitrógeno total descrito por Kjeldahl (32).

Como se mencionó con anterioridad, el consumo total de alimento fue mayor en las ratas BP, sin embargo ya que la galleta NP contiene una mayor concentración de proteína que la BP (18 y11%, respectivamente), el consumo de proteína es mayor en las ratas alimentadas con la dieta NP durante todo el estudio. Esa diferencia entre los grupos es significativa con un valor de $p< 0.001$.

El consumo de proteína de las ratas alimentadas con la dieta NP en la primera semana de adaptación fue de 3.7g/día, en promedio y de 3.3g/día durante la segunda semana de adaptación. En el caso de las ratas alimentadas con la dieta BP el consumo de proteína durante la primera semana de adaptación fue de 2.7g/día y de 2.42g/día en la segunda semana. Como se ve, durante la adaptación, el consumo de proteína disminuye igual que disminuyó el consumo de alimento total, pero en este caso, las ratas alimentadas con la dieta NP consumieron la mayor cantidad de proteína. (gráficas 6 y 10).

La disminución en el consumo de proteínas durante la adaptación, es mayor en las ratas alimentadas con la dieta NP, sin embargo, a pesar de esa disminución, el consumo continúa significativamente mayor en las ratas alimentadas con la dieta NP (gráfica 10).

Durante la semana 16 (semana de cruza) los animales control de ambos grupos (NP y BP) no mostraron una mayor disminución en el consumo de proteína (3 gramos para NP y 2.5 para BP). Durante las semanas 18 a la 20 (semanas equivalentes al embarazo), el consumo de proteína del grupo control BP, se mantuvo en 2.25 gramos, valor que permanece constante hasta la semana 23 que equivaldría al periodo de lactancia . El grupo control alimentado con NP incrementa ligeramente su ingesta hacia la semana 23 (3.6 gramos/día) aunque ese incremento no es estadísticamente significativo (gráfica 10).

El consumo de proteínas en las ratas embarazadas

Las ratas embarazadas alimentadas con la dieta BP muestran un consumo de proteínas significativamente mayor al de sus controles vírgenes pareadas en edad (día 14 al día 20). El día previo al parto (día 21) las ratas disminuyeron el consumo de alimento hasta igualarlo al de sus correspondientes controles vírgenes (gráfica 11), por lo tanto el consumo de proteínas y energía disminuye en forma equivalente.

En las ratas alimentadas con la dieta NP la diferencia significativa en el consumo de proteínas se observó mucho antes que en el grupo BP (día 7) y así se conservó hasta el día 18 del embarazo, pero, al igual que en el grupo BP estos animales mostraron una disminución en el consumo de proteínas el día 21 del embarazo (gráfica 12).

El consumo de proteínas en las ratas lactantes

El primer día de lactancia, las ratas alimentadas con la dieta NP mostraron un consumo de proteínas menor al de sus controles vírgenes. A partir

del cuarto día de lactancia se observa un incremento en el consumo de proteínas que se mantiene hasta el último día de la lactancia. Ese aumento en el consumo de proteínas es significativamente diferente al consumo del grupo control (gráfica 12). Un comportamiento similar se observó en el grupo alimentado con la dieta BP (gráfica 11).

En conclusión, tanto en las ratas embarazadas como en las ratas lactantes de la dieta NP el consumo de proteínas observado fue mayor que el de las ratas alimentadas con la dieta BP (cuadro 4, gráfica 13). (anexo 4)

CUADRO 4

Comparación del consumo de proteínas en los grupos BP y NP durante la lactancia con sus desviaciones estándar

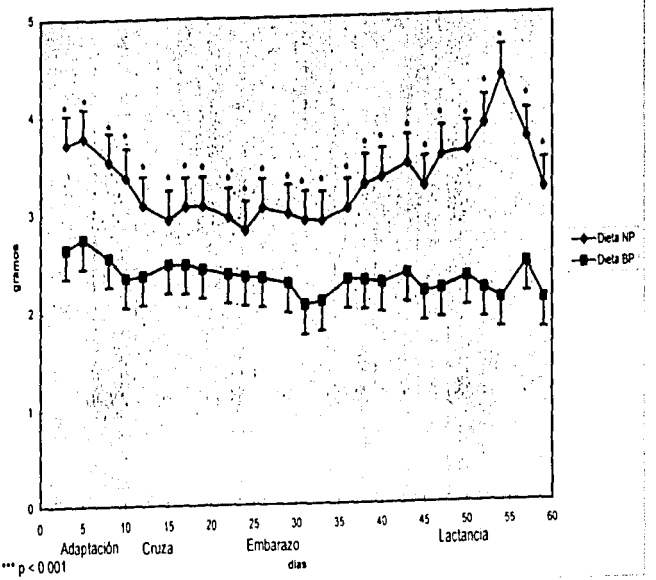
SEMANA	ALIMENTO CONSUMIDO (gramos) BP	NP	BP / NP	PROTEINA CONSUMIDA (gramos) BP	NP	BP / NP
1	31 68 (7 6)	30 13 (5 2)	1 051	3.48 (0.9)	5.42 (0.93)	0.642
2	47 5 (8 2)	43 1 (6 7)	1 102	5.22 (0.8)	7.76 (1.3)	0.673
3	62 9 (8 9)	57 6 (8 3)	1 092	6.92 (0.93)	10.37 (1.7)	0.667

El número de animales por grupo es de 18 y por dieta es de 36.

La desviación estándar es el promedio de las desviaciones de los consumos de cada semana. (DS)

Como se puede observar el consumo de proteínas, al igual que el del alimento total, aumenta conforme avanzan los días de lactancia, sin embargo, mientras que el consumo del alimento total es mayor para las ratas alimentadas con la dieta BP, el consumo de proteínas lo es para las ratas alimentadas con la dieta NP.

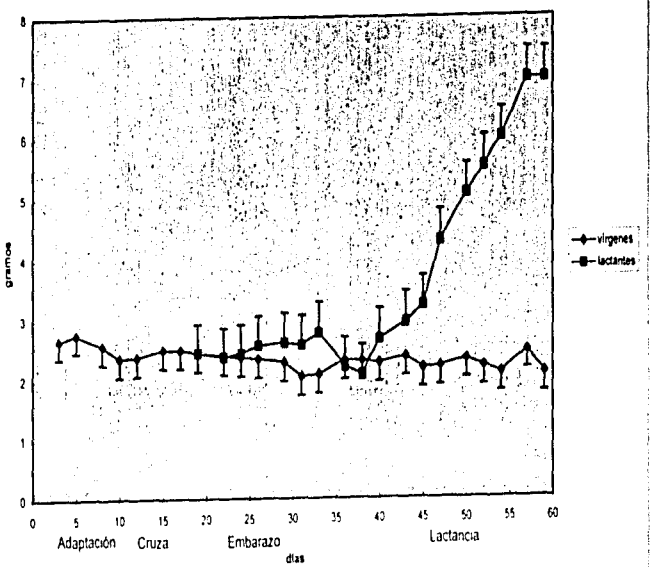
Gráfica 10. Consumo de Proteínas. (Ratas vírgenes)



*** $p < 0.001$

Núm. de animales por dieta
adaptación - cruza = 36
embarazo - lactancia = 18

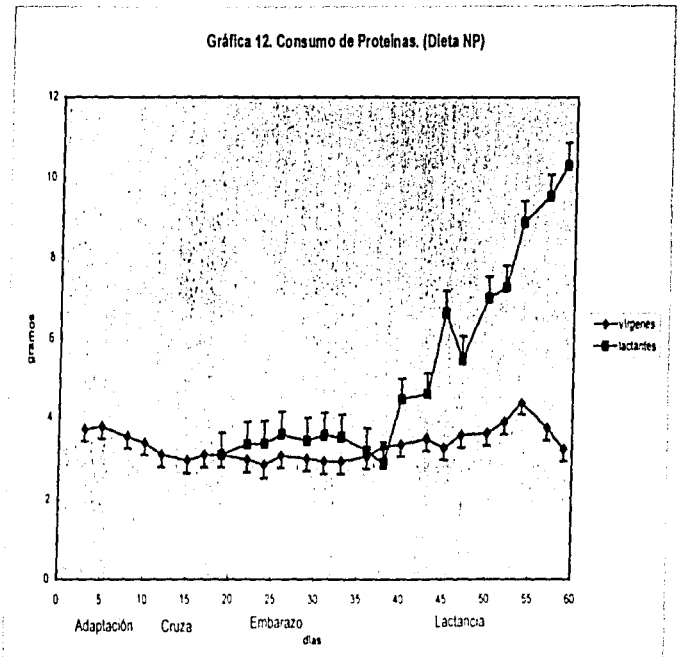
Gráfica 11. Consumo de Proteínas. (Dieta BP)



Núm de animales (embarazo y lactancia)

vírgenes = 18

lactantes = 18

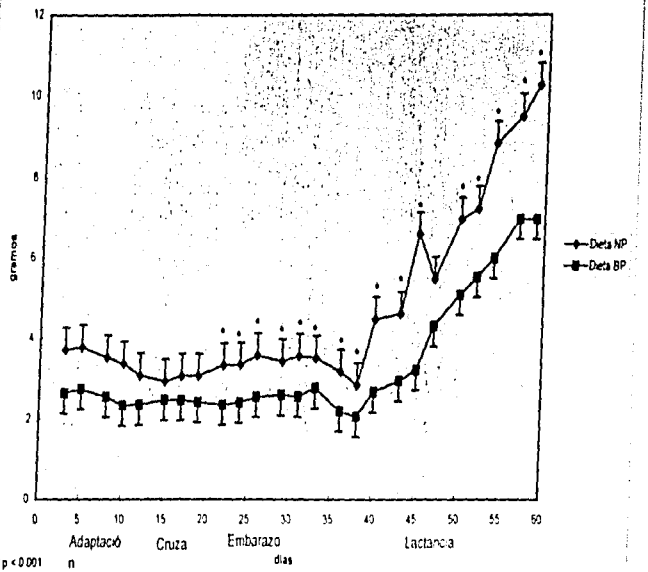


Núm de animales (embarazo y lactancia)

vírgenes = 18

lactantes = 18

Gráfica 13. Consumo de Proteínas. (Ratas Lactantes)



*** p < 0.001

Núm. de animales por dieta

adaptación - cruza = 36

embarazo - lactancia = 18

6.4 Consumo de calorías

El consumo de calorías al igual que el de proteínas, es un cálculo que se obtuvo a partir del consumo total de alimento registrado cada tercer día durante el estudio.

Semanas de adaptación

Durante la primera semana de adaptación, los animales alimentados con la dieta BP consumieron 93.1kcal/día en promedio, aunque este consumo disminuyó ligeramente hacia el final de la segunda semana de adaptación. El consumo de energía de los animales alimentados con la dieta NP fue menor (78.9 Kcal/día, en promedio) al del grupo BP.

El mayor consumo de calorías por los animales BP fue significativo y esa diferencia se mostró durante toda la duración del estudio. (gráfica 14).

Período de cruza

En el periodo de la cruza (semana 16) el consumo de calorías de las ratas vírgenes se volvió más constante, en ambos grupos de animales (64.11 kcal/día para NP y 85.4 kcal/día para BP) y el consumo también fue mayor en las ratas alimentadas con la dieta BP.

El consumo de energía en las ratas control (no embarazadas no lactantes) en las semanas equivalentes al embarazo y la lactancia

A las 17 semanas de edad (equivalente a la primera semana del embarazo), el consumo de energía de las ratas control alimentadas con la dieta BP disminuyó un poco en comparación con la semana anterior (80.4 kcal/día), sin embargo aunque el consumo disminuyó en la semana 18 (73.53 kcal/día), se restableció en la semana 19 (79 kcal/día).

El comportamiento de las ratas vírgenes alimentadas con la dieta NP se mantuvo muy parecido al observado en la semana 16 (62.5 kcal/día en promedio (gráfica14).

Al alcanzar la semana 20 los animales control pareados en edad alimentados con la dieta BP mostraron un consumo constante (76.5 kcal), similar al observado en las semanas anteriores, sin embargo en los primeros días de la última semana (semana 22) se observó un incremento en el consumo (84.6 kcal) el cual disminuyó, posteriormente, a los niveles previos.

El consumo en los animales alimentados con la dieta NP, continuó constante hasta la semana 21 (62 kcal/día en promedio), pero a partir de la semana 22 el consumo se volvió muy irregular. Se observó una disminución en el día 61 (gráfica 14).

El consumo de energía en las ratas embarazadas

Los animales alimentados con la dieta BP presentaron, durante los primeros 11 días de embarazo, un consumo muy semejante al de sus controles vírgenes, pero a partir del día 14 y hasta el día 18, el consumo de energía de las ratas embarazadas es significativamente mayor que el de sus correspondientes controles vírgenes, sin embargo, al llegar a los 21 días del embarazo el consumo de energía igualó el consumo de los controles vírgenes (gráfica 15).

Las ratas embarazadas alimentadas con la dieta NP, mostraron una diferencia en el consumo de energía con respecto a sus controles vírgenes desde el día 7 y hasta el día 21 del embarazo observándose también una disminución en los días finales del embarazo (gráfica 16).

El consumo de energía en las ratas lactantes

El día del parto, considerado como el primer día de la lactancia, los animales alimentados con BP mostraron una disminución en el consumo de energía, inclusive por debajo de sus controles vírgenes pero después de este día se observa un aumento en la ingesta el cual va siendo progresivo hasta terminar la lactancia. Durante todo este periodo la diferencia en el consumo entre las ratas lactantes y sus controles vírgenes, es significativa (gráfica 17).

Las ratas alimentadas con la dieta NP mostraron un comportamiento semejante (gráfica 17). (anexo 5)

CUADRO 5

Comparación del consumo de energía en los grupos
BP y NP durante la lactancia con su desviacion estándar

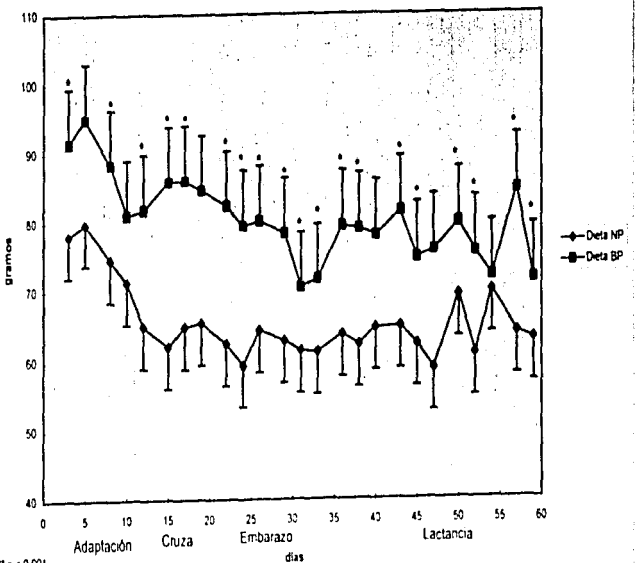
SEMANA	ALIMENTO CONSUMIDO (gramos)		PROTEINA CONSUMIDA (gramos)		CALORIAS CONSUMIDAS (calorías)		BP/NP
	NP	BP	NP	BP	NP	BP	
1	30 13 (5 2)	31 68 (7 6)	5 42 (0 93)	3 48 (0 9)	114.49 (29.3)	120.4 (31.9)	1.113
2	43 1 (6 7)	47 5 (8 2)	7 76 (1 3)	5 22 (0 8)	163.78 (27)	180.5 (29.3)	1.138
3	57 6 (8 3)	62 9 (8 9)	10 37 (1 7)	6 92 (0 93)	218.88 (31.8)	239.02 (25.8)	1.107

Los valores incluyen los consumos promedio por semana de 36 animales.

La desviación estándar es el promedio de las desviaciones de los consumos de cada semana. (DS)

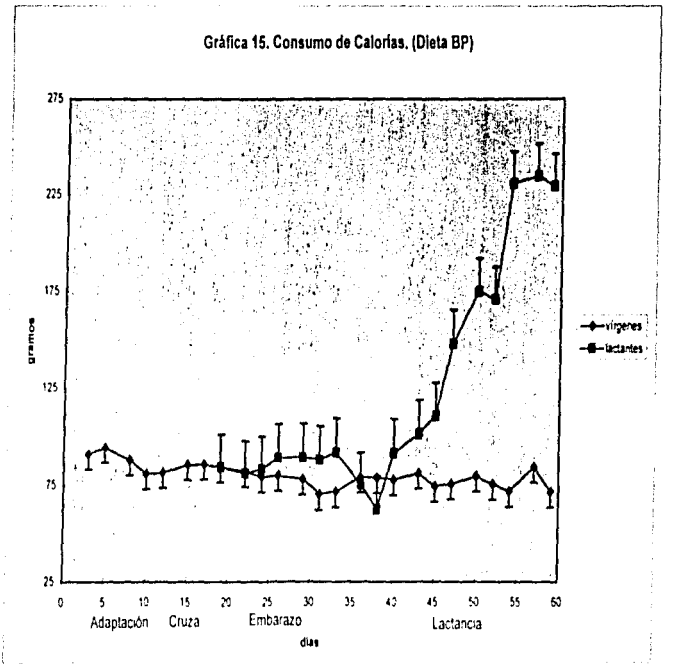
Se puede observar que la energía consumida va aumentando conforme aumentan los días de lactancia, se observa lo mismo en el caso de el consumo de alimento y de proteínas, solo que el alimento y las calorías se consumen en mayor proporción por las ratas alimentadas con la dieta BP y las proteínas por las alimentadas con la NP.

Gráfica 14. Consumo de Calorías. (Ratas Vírgenes)



*** $p < 0.001$

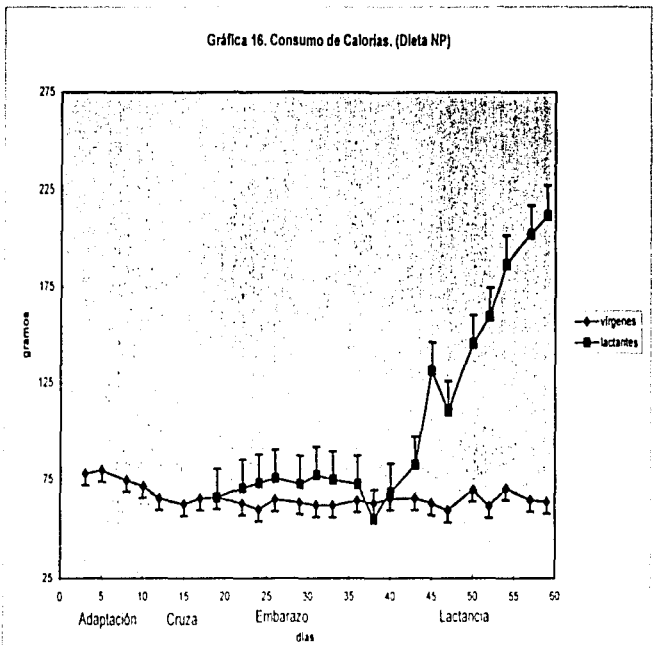
Num. de animales por dieta
adaptación - cruza = 36
embarazo - lactancia = 18



Núm de animales (embarazo y lactancia)

vírgenes = 18

lactantes = 18

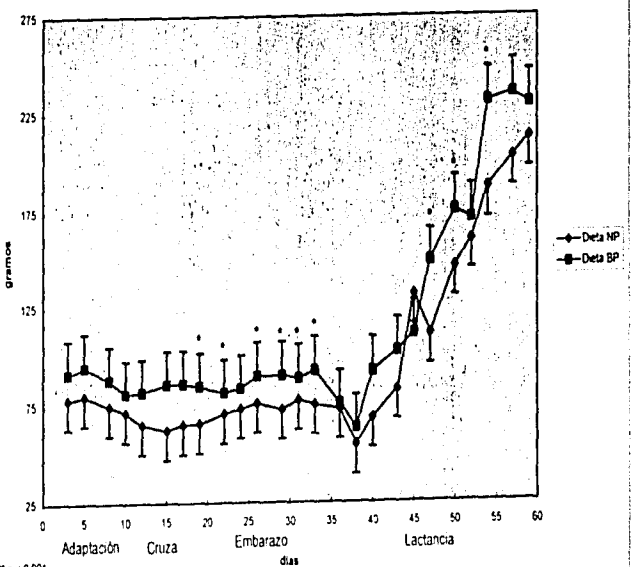


Núm. de animales (embarazo y lactancia)

vírgenes = 18

lactantes = 18

Gráfica 17. Consumo de Calorías. (Ratas Lactantes)



*** $p < 0.001$

Núm. de animales por dieta

adaptación - cruza = 36

embarazo - lactancia = 18

6.5 Cambios en la actividad de la Catepsina L por miligramo de proteína

6.5.1 Cambios en el hígado

Ratas control (no embarazadas, no lactantes)

Como se observa en la gráfica 18, los animales control alimentados con la dieta NP presentaron en la semana 20 (equivalente a la primera semana de lactancia) una actividad específica de 163.3 mU/mg de proteína ± 38.6, la cual mostró una tendencia a incrementarse con la edad (225.6 ± 25.4 en la semana 22). Aunque los controles BP mostraron el mismo comportamiento con la edad, sus valores fueron menores a los de los controles NP (de 133.3 ± 31.7 en la semana 20 a 196.8 ± 24.4 en la semana 22), sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (cuadro 6).

Ratas lactantes

Las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP presentaron un incremento en la actividad específica de la catepsina L (292.8 ± 46.2, $p<0.01$) el día de la mayor producción de leche (día 14 de la lactancia), sin embargo en la etapa final de la lactancia (día 21) la actividad regresó a niveles comparables con los mostrados por las ratas vírgenes de la misma edad (228 ± 21.7).

Aunque el grupo BP mostró un patrón similar, el incremento en la actividad de la catepsina L se observó desde el séptimo día de la lactancia (230.7 ± 59.1) con un incremento adicional el día 14 (281.6 ± 35.3).

En forma similar al grupo NP la actividad disminuyó al final de la lactancia a valores cercanos a los obtenidos en las ratas control (no embarazadas no lactantes pareadas en edad)(cuadro 6, gráfica 18). (anexo 6)

6.5.2 Cambios en el músculo esquelético

Ratas control (no embarazadas, no lactantes)

La actividad específica de la catepsina L observada en el músculo esquelético de los animales control alimentados con ambas dietas (NP y BP) mostró la actividad mas baja de los tres tejidos estudiados y no se observaron variaciones durante las tres semanas equivalentes al periodo de la lactancia (semanas 20 a la 22) (gráfica 19).

Ratas lactantes

La actividad en el músculo esquelético no mostró ningún cambio por efecto del tiempo de lactancia o por la dieta con la que fueron alimentadas los animales estudiados (cuadro 6, gráfica 19). (anexo 7)

6.5.3 Cambios en la glándula mamaria

Ratas control (no embarazadas, no lactantes)

Como se observa en la gráfica 20, los animales control alimentados con la dieta NP presentaron en la semana 20 (equivalente a la primera semana de lactancia) una actividad específica de 69.3 mU/mg de proteína ± 20.1, la cual se mantuvo en valores similares hasta la semana 22 (66± 16.8 mU/mg de proteína). Aunque los controles BP mostraron un comportamiento similar con la edad, la actividad en la semana 20 mostró un valor menor (17.33± 12.2 mU/ mg de proteína), los valores en los días 14 y 21 fueron (66.7 ± 22.7 y 64 ± 28, respectivamente).

Ratas lactantes

Las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP mostraron un incremento continuo en la actividad específica de esta enzima desde el día 7 hasta el día 21 de la lactancia (176.8± 51.3 para L-7, 234 ± 58.1 para L-14 y 262.4 ± 66.5 para L-21) en todos los casos la actividad fue mayor a la mostrada por el tejido de las ratas vírgenes de la misma edad ($p<0.001$).

En el tejido de los animales lactantes BP se observó un aumento en la actividad de la catepsina L desde el séptimo día de la lactancia (170.4 ± 53) con un incremento posterior el día 14 (279± 76.2), sin embargo, la actividad no se modificó el día 21 (252.7 ± 65.3) (cuadro 6, gráfica 20). (anexo 8)

CUADRO 6

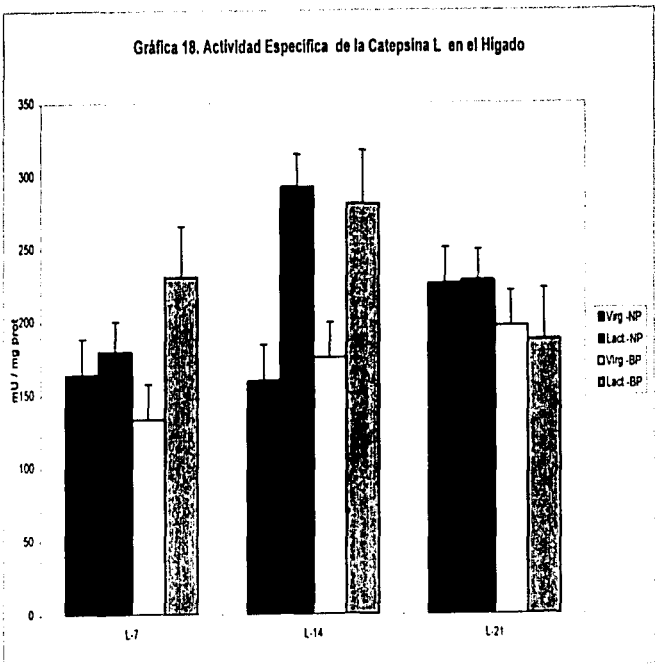
Cambios en la actividad específica de la catepsina L por miligramo de proteína

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEINA					
	VIRGEN			LACTANTE			VIRGEN			LACTANTE		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
HÍGADO	163 3 (38 6)	159 2 (27 3)	225 6 (25 4)	179 3 (39 1)	292 8 [b] (46 2)	228 (21 73)	133 3 (31 7)	175 3 (87 3)	196 8 (24 4)	230 7 [b] (59 1)	281 6 [c] (35 3)	187 3 (37)
MUSCULO ESQUELÉTICO	6 (2 19)	5 33 (2 07)	10 (2 19)	8	12	10 66 (7 44)	6 67 (2 07)	6 (2 19)	8 67 (5 89)	6 67 (4 84)	6 (2 19)	8 (3 58)
GLÁNDULA MAMARIA	69 3 [a] (20 1)	50 67 (14 05)	66 (16 8)	176 8 [b] (51 3)	234 [a] (58 1)	262 4 (66 5)	17 33 (12 2)	66 7 (22 7)	64 (28)	170 4 [c] (53)	279 [c] (76 2)	252 7 [a] (65 3)

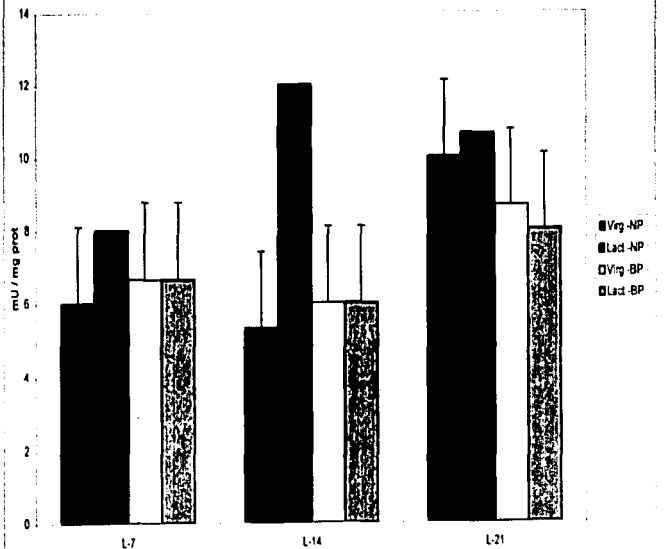
Actividad Específica expresada como las milunidades de absorción a 365 nm producidas durante el tiempo de incubación por miligramo de proteína con su desviación estándar. (DS)

a) b) C) Diferencia significativa entre rata lactante y su correspondiente control virgen, tanto de la dieta NP como de la dieta BP.
a) $p < 0.001$ b) $p < 0.01$ c) $p < 0.05$

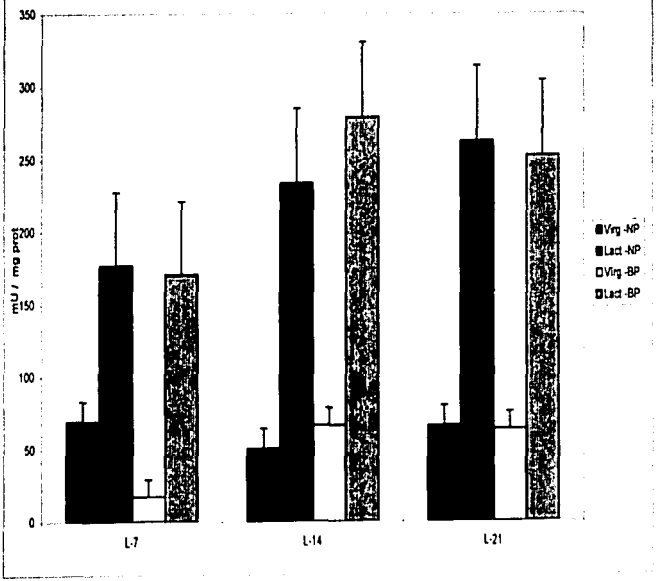
d) Diferencia significativa entre ratas vírgenes de la dieta NP y ratas vírgenes de la dieta BP.
d) $p < 0.05$


Gráfica 18. Actividad Especifica de la Catepsina L en el Higado
350
300
250
200
150
100
50
0
mU / mg prot
L-7
L-14
L-21
Virg -NP
Lact -NP
Virg -BP
Lact -BP

Gráfica 19. Actividad Específica de la Catepsina L en el Músculo Esquelético



Gráfica 20. Actividad Específica de la Catepsina L en la Glándula Mamaria



6.6 Cambios en la actividad de la Catepsina L por gramo de tejido

En vista de que la actividad enzimática que nosotros estudiamos puede afectar la concentración de proteínas y este componente nos sirvió como referencia en la actividad específica, los cambios en la actividad enzimática también deben ser analizados en relación a un fragmento del tejido (gramo) el cual incluye a todos los componentes químicos de ese tejido, incluyendo el agua.

6.6.1 Cambios en el hígado

Ratas control (no embarazadas no lactantes)

Como se observa en la gráfica 21, los animales control alimentados con la dieta NP presentaron en la semana 20 (equivalente a la primera semana de lactancia) una actividad específica de 16.98 ± 3.0 U/g de tejido, la cual mostró una tendencia a incrementarse con la edad (19 ± 3.5 en la semana 22). Aunque los controles BP mostraron el mismo comportamiento con la edad, sus valores fueron menores (14.96 ± 2.19 U/g de tejido en la semana 20 y 15.60 ± 4.23 en la semana 21), que los valores mostrados por los controles NP, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. La actividad en las ratas control alimentadas con la dieta BP también se incrementó en la semana 22 mostrando valores significativamente mayores(24.17 ± 3.69 U/g, $p < 0.05$) que el grupo NP, (cuadro 7, gráfica 21).

Ratas Lactantes

El día de la mayor producción de leche (L-14), las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP, presentaron un incremento muy significativo en la actividad de la catepsina L (39.12 ± 5.02 U/g de tejido, $p<0.001$) con respecto a la actividad mostrada por el grupo no embarazado no lactante, y aunque la actividad de la enzima disminuyó hacia el final de la lactancia (día 21, 34.57 ± 4.48 U/g) la

diferencia no es estadísticamente significativa con respecto a L-14, pero sí lo es cuando se compara con el grupo virgen ($p<0.001$, cuadro 7, gráfica 21).

El grupo BP mostró un patrón similar, incrementando su actividad proteolítica desde L-7 (17.16 ± 1.84 U/g de tejido) alcanzando su máximo el día catorce de la lactancia (28.68 ± 4.84 U/g) para disminuir ligeramente en L-21 (21.67 ± 2.73 U/ g tejido). (cuadro 7, gráfica 21). (anexo 9)

6.6.2 Cambios en el músculo esquelético

Ratas control (no embarazadas no lactantes)

Como sucedió cuando los resultados fueron referidos por miligramo de proteína, la actividad en el músculo mostró los niveles más bajos de los tres tejidos estudiados.

Aunque se observaron pequeños cambios en la actividad proteolítica durante las semanas 20 a 22 de edad, de ambos grupos (NP y BP), las diferencias no fueron estadísticamente significativas (gráfica 22).

Ratas Lactantes

La actividad observada en las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP fue mayor que la encontrada en los animales BP en las tres fechas estudiadas, sin embargo, la única diferencia significativa ($p<0.01$) fue obtenida a los siete días de la lactancia (gráfica 22). (anexo 10)

6.6.3 Cambios en la Glándula Mamaria

La actividad en los tejidos de las ratas vírgenes fue siete veces menor que la observada en el hígado de esos animales, independientemente de la dieta recibida, pero a su vez fue cuatro veces mayor que la actividad mostrada por el músculo.

Ratas Controles (no embarazadas no lactantes)

La actividad permaneció sin cambios durante las tres semanas estudiadas (20 a la 22 de edad) en los animales alimentados con la dieta NP (2.63 ± 0.89 U/g de tejido para L-7 y 2.43 ± 0.21 en L-21) mientras que en las ratas BP la actividad fue incrementándose con la edad, sin embargo solo se observó una diferencia significativa en la semana 20 (0.675 ± 0.05, $p<0.05$), entre los grupos con diferente dieta (ver gráfica 23) .

Ratas lactantes

La lactancia produjo un fuerte incremento de la actividad proteolítica en el tejido mamario. En el grupo NP se observó un aumento progresivo de la actividad desde L-7 (16.12 ± 3.564 U/g de tejido) hasta L-21(26.26 ± 3.9), esto representa un incremento desde seis hasta once veces la actividad encontrada en el tejido de los controles no embarazados, no lactantes de la misma edad ($p<0.001$, gráfica 23).

La ratas alimentados con la dieta BP mostraron un patrón similar aunque en este grupo la mayor actividad se observó en el día 14 de la lactancia (24.32 ± 8.99 U/g de tejido). La actividad observada en estos animales fue del mismo orden de magnitud que la observada en los grupos NP. (anexo 11)

CUADRO 7

Cambios en la actividad de la catepsina L por gramo de tejido

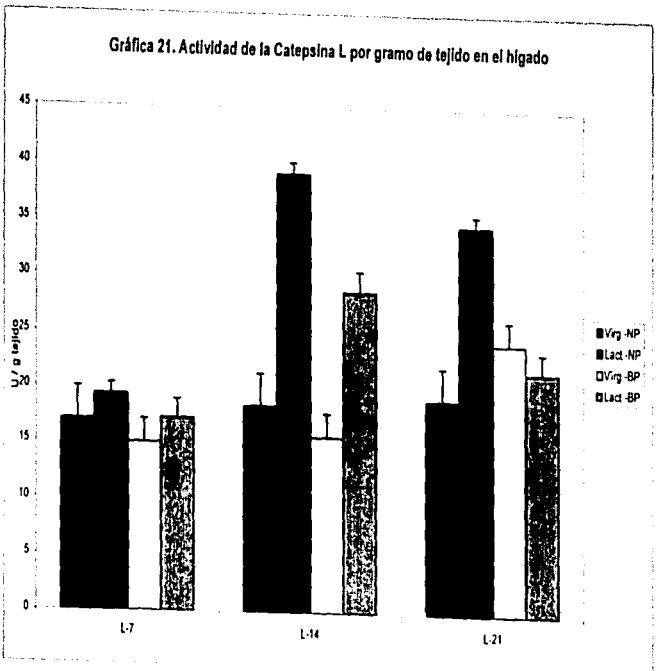
	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEINA					
	VIRGEN			LACTANTE			VIRGEN			LACTANTE		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
HÍGADO	16.98 (3.0)	18.34 (5.75)	19.00 (3.5)	19.32 (0.769)	39.12 [a] (5.02)	34.57 [a] (4.48)	14.96 (2.197)	15.60 (4.23)	24.17 [d] (3.69)	17.16 (1.841)	28.68 [c] (4.84)	21.67 (2.73)
MÚSCULO ESQUELÉTICO	0.533 (0.47)	0.567 (0.153)	0.933 (0.115)	1.0 [a] (0.187)	1.5 (0.566)	0.90 (0.141)	0.767 (0.501)	0.500 (0.400)	0.418 (0.390)	0.368 (0.166)	1.025 (0.512)	0.800 (0.224)
GLÁNDULA MAMARIA	2.633 [d] (0.896)	1.767 (0.49)	2.433 (0.21)	16.12 [b,a] (3.54)	19.67 [a] (5.72)	26.26 [a] (3.9)	0.675 (0.655)	2.833 (0.611)	3.467 (0.808)	8.933 [a] (0.70)	24.32 [b] (3.99)	22.173 [a] (0.63)

Actividad específica expresada como las unidades de absorción a 366 nm producidas durante el tiempo de incubación por gramo de tejido con su desviación estándar (DS)

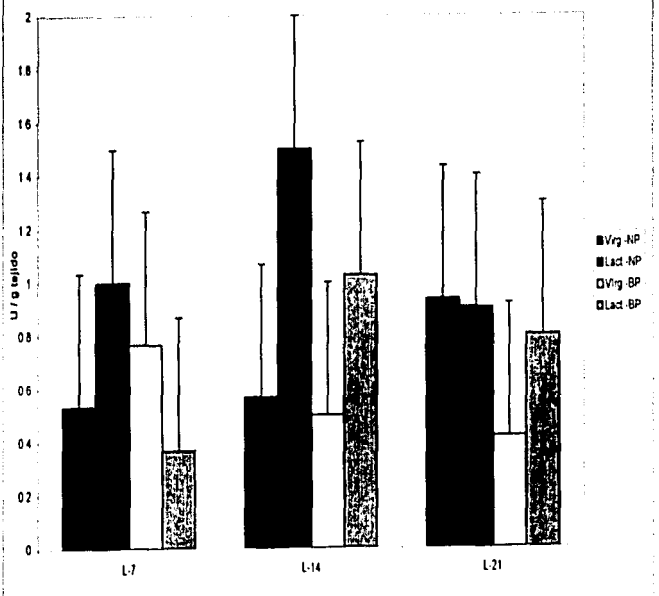
a) b) c) Diferencia significativa entre rata lactante y su correspondiente control virgen, tanto de la dieta NP como de la dieta BP.
a) $p < 0.001$ b) $p < 0.01$ c) $p < 0.05$

d) Diferencia significativa entre ratas vírgenes de la dieta NP y ratas de la dieta BP.
d) $p < 0.05$

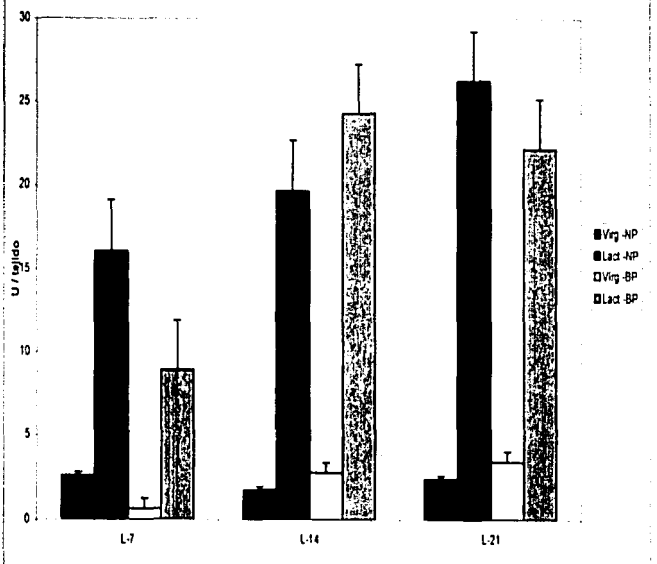
e) Diferencia significativa entre ratas lactantes de la dieta NP y ratas lactantes de la dieta BP.
e) $p < 0.05$


Gráfica 21. Actividad de la Catepsina L por gramo de tejido en el hígado
U / g tejido
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
L-7
L-14
L-21
Virg -NP
Lact -NP
Virg -BP
Lact -BP

Gráfica 22. Actividad de la Catepsina L por gramo de tejido en el músculo



Gráfica 23. Actividad de la Catepsina L por gramo de tejido en la glándula mamaria



6.7 Cambios en el contenido de la catepsina L en el órgano total

Nuestros resultados también pueden ser analizados calculando el contenido total de enzima de cada órgano, lo que nos da una idea de la máxima capacidad proteolítica de un tejido, por eso en esta sección la actividad se informa como el total de unidades de absorbancia a 366 nm (U tot) que producirían todas las moléculas de enzima contenidas en el órgano completo.

6.7.1 Cambios en el hígado

Ratas control (no embarazadas no lactantes)

La actividad total en el hígado de los animales vírgenes de ambos grupos (NP y BP) con edades de 20 a 22 de semanas (equivalentes a las tres semanas de lactancia) mostraron un ligero incremento con la edad (de 182 ± 34.6 Unidades totales en L-7 a 205.9 ± 49.8 U tot en L-21 para NP y de 173 ± 24.7 U tot en L-7 a 223.4 ± 57.6 U tot en L-21 para BP) sin embargo, esos incrementos no fueron estadísticamente significativos (gráfica 24, cuadro 8).

Ratas lactantes

La lactancia muestra un efecto muy significativo en la actividad enzimática del hígado de los animales alimentados con la dieta NP pues produce un incremento de 20% en la primera semana (236.4 ± 35.6 U tot) y de 130% en las dos semanas siguientes (446.7 ± 53.9 U tot) cuando el contenido se compara con las actividades de sus controles vírgenes correspondientes (198.3 ± 58.1 U tot).

Los resultados observados en el hígado de las ratas alimentadas con la dieta baja en proteína mostraron un comportamiento semejante, sin embargo el incremento en la primera semana fue de 39% (259 ± 19.4 U tot) y un aumento posterior en las dos semanas siguientes hasta alcanzar un 67% (312.2 ± 37.1 U tot) Se puede ver que el incremento en el tejido de la rata alimentada con una dieta deficiente en proteínas fue inferior al de los animales alimentados con la concentración adecuada de proteína. (anexo 12)

6.7.2 Cambios en el músculo esquelético

Ratas control (no embarazadas no lactantes)

Durante la semana 21 (equivalente a la segunda semana de lactancia), la actividad en las ratas vírgenes fue mayor en los animales alimentados con la dieta NP (8.01 ± 2.75 U tot), sin embargo no se mostró ninguna diferencia significativa con los controles BP (7.06 ± 4.4 U tot). La actividad en la semana 22 también fue mayor en el grupo alimentado con la dieta NP (11.03 ± 2.18 U tot), pero en esta ocasión la diferencia si es significativa ($p<0.05$, BP 3.26 ± 1.46) (cuadro 8, gráfica 25).

Ratas lactantes

En todo el período de la lactancia, las ratas alimentadas con la dieta NP mostraron una actividad mayor que sus controles vírgenes, sin embargo la diferencia no fue significativa en ningún caso (cuadro 8, gráfica 25).

Aunque en las ratas alimentadas con BP, la mayor actividad se observó a los catorce días de la lactancia (13.32 ± 5.61U tot), Los valores no fueron estadísticamente diferentes ni de sus controles ni del grupo NP (cuadro 8, gráfica 25). (anexo 13)

6.7.3 Cambios en la glándula mamaria

Ratas control (no embarazadas no lactantes)

Aunque los animales alimentados con la dieta NP mostraron una actividad ligeramente mayor que el grupo BP, en las tres semanas equivalentes a la lactancia, la comparación estadística no mostró diferencias significativas entre ellas (cuadro 8, gráfica 26).

Ratas lactantes

A los siete, catorce y veintiún días de lactancia, las glándulas de las ratas lactantes alimentadas con la dieta NP, mostraron mayor actividad proteolítica que las ratas vírgenes ($p<0.001$, $p<0.05$ y $p<0.001$, respectivamente), siendo la mayor actividad la correspondiente al día 21.

En los animales alimentados con la dieta BP se observó un comportamiento similar al de las ratas NP y aunque la mayor actividad se mostró el día 14 de la lactancia, no hay diferencias significativas ni dentro del mismo grupo, ni con las ratas NP (cuadro 8, gráfica 26). (anexo 14)

CUADRO 8

Cambios en el contenido de catepsina L en el órgano total

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEINA					
	VIRGEN			LACTANTE			VIRGEN			LACTANTE		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
HÍGADO	182 (34 6)	198 3 (58 1)	205 9 (49 8)	236 4 [c] (35 6)	446 7[a] (53 9)	451 2[a,e] (47 9)	173 (24 7)	161 3 (37)	223 4 (57 6)	259 [a] (19 4)	270 3 [c] (21 4)	312 2 [c] (37.1)
MUSCULO ESQUELÉTICO	6 81 (5 53)	8 01 (2.75)	11 03 [d] (2 18)	12 55 (1 714)	19 41 (3 26)	11 96 (3 11)	4 77 (1 8)	7 06 (5 4)	3 26 (2 46)	6 39 (4 47)	13 32 (7 6)	7 6 (3 73)
GLÁNDULA MAMARIA	16 92 (8 07)	12 81 (5 75)	38 7 (29 6)	157 1 [a] (22 9)	319 3 [c] (133 2)	367 8 [a] (43)	7 71 (6 31)	15 26 (8 23)	11 51 (12 03)	126 1 [a] (20 12)	383 5 [b] (169 4)	356 7 [a] (52 7)

Actividad Específica expresada como las unidades de absorción a 366 nm producidas durante el tiempo de incubación por gramo de tejido con su desviación estándar (DS)

a) b) C) Diferencia significativa entre rata lactante y su correspondiente control virgen, tanto de la dieta NP como de la dieta BP.

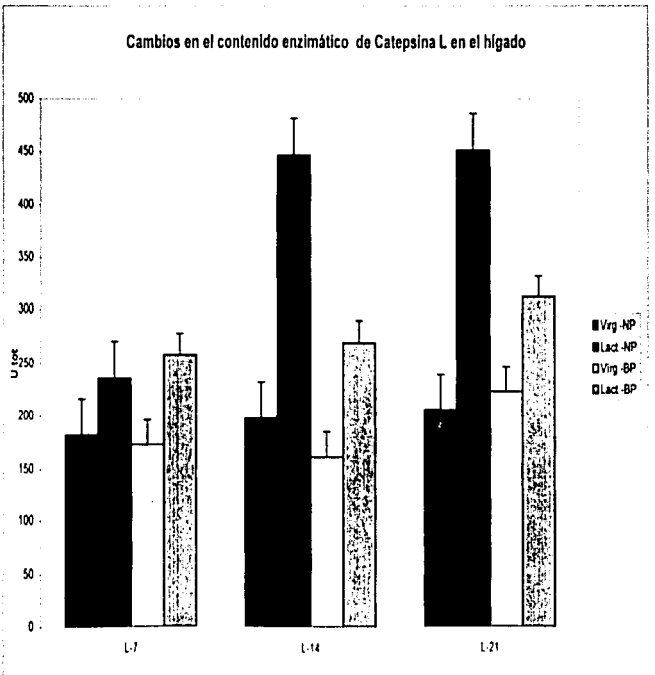
a) $p < 0.001$ b) $p < 0.01$ c) $p < 0.05$

d) Diferencia significativa entre ratas vírgenes de la dieta NP y ratas vírgenes de la dieta BP.

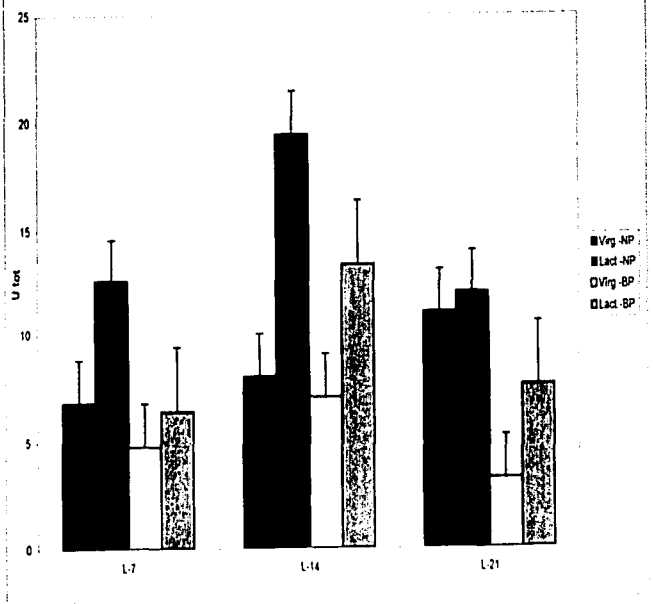
d) $p < 0.05$

e) Diferencia significativa entre ratas lactantes de la dieta NP y ratas lactantes de la dieta BP.

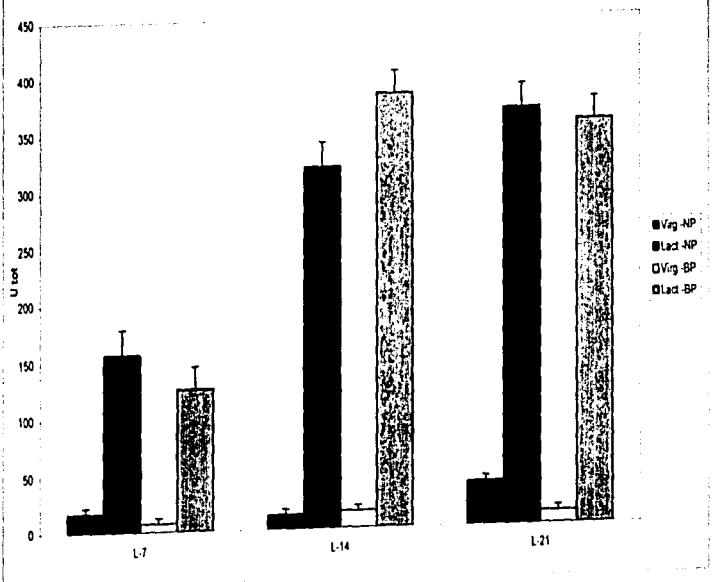
e) $p < 0.05$


Cambios en el contenido enzimático de Catepsina L en el hígado
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
U/gpt
L-7
L-14
L-21
Virg -NP
Lact -NP
Virg -BP
Lact -BP

Gráfica 25. Cambios en el contenido enzimático de Catepsina L en el músculo



Gráfica 26. Cambios en el contenido enzimático de Catepsina L en la glándula mamaria



VII. DISCUSIÓN

7.1 Del peso corporal de los animales

A lo largo de la gestación la rata incrementa su peso corporal como resultado del crecimiento fetal, por la formación de las reservas corporales y por la hidratación de los tejidos. Todo esto origina una diferencia significativa en el peso corporal de las ratas embarazadas con respecto a los animales vírgenes. Nuestros datos confirman los resultados obtenidos previamente por otros grupos para ratas de la misma cepa y de edad similar (7,11,15,33) .

Cabe recordar que en las ratas alimentadas con la dieta NP este incremento fue 1.2 veces mayor que los controles (no embarazadas) y de 1.4 veces para los animales alimentados con la dieta BP.

En nuestra experiencia el aumento en el peso corporal de ambos grupos de roedores durante el embarazo, se observó a partir del séptimo día del embarazo (equivalente a la semana 17 de edad). sin embargo Remesar y cols (18) informa que las diferencias en el peso de los animales las obtiene a partir del día 12 de la gestación, esta diferencia puede explicarse por que esos investigadores emplearon una cepa diferente a la utilizada en nuestro estudio.

Nuestros resultados mostraron que, a pesar de que las ratas del grupo BP fueron animales restringidos en proteínas, el peso de estos no presentó una diferencia significativa en los valores de peso corporal cuando se compara con el peso de las ratas alimentadas con la dieta NP. Estos resultados difieren de los presentados por Rosso y col. (34) quienes observaron que una reducción en la ingesta de proteínas produce una reducción de 20% en el peso corporal, sin embargo este efecto lo obtuvieron ya que la dieta que ofrecieron a sus animales contenía 6% de caseína lo que representa una reducción de al menos 60% la

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

concentración de proteína recomendada para la rata adulta. La menor concentración utilizada en nuestro estudio fue de 11% lo que representa una reducción de 39% de la concentración recomendada.

En otro tipo de estudio en donde se aplicó una restricción energético-proteínica del 40%, Kanto y Clawson (7) observaron una reducción de 24% en el peso corporal de las ratas restringidas. La cantidad de proteína ofrecida en esa restricción fue cercana al 12.6%, lo cual es un valor similar al empleado en nuestro estudio (12.3%), sin embargo en el estudio de esos investigadores se muestra como el metabolismo de las proteínas depende de la cantidad de energía ofrecida en la dieta. Por el contrario en nuestro estudio se cuidó que la dieta baja en proteínas mantuviera un valor isoenergético con respecto a la dieta NP, lo que podría explicar que no se presente la pérdida de peso en nuestros animales (35). Por otro lado, el efecto tan marcado observado por Kanto y Clawson (7), en la reducción del peso de las ratas restringidas puede también explicarse ya que en ese estudio se utilizó proteína de soya, la cual se sabe es deficiente en algunos aminoácidos indispensables (36), en nuestro caso utilizamos caseína la cual es reconocida como una proteína de alta calidad (37).

Como ha sido informado previamente, el peso de las madres disminuyó bruscamente cerca del parto (15), en el caso de las ratas alimentadas con la dieta NP la disminución se dio a partir del día 19 (2 días antes del parto) y para los animales alimentados con la dieta BP lo fue inmediatamente después del parto. Vale la pena mencionar que las ratas alimentadas con la dieta BP llegaron al final del embarazo con mayor peso (Gráfica 5) y presentaron mayores problemas en el parto dando como consecuencia sangrado en los ojos.

Después del parto, tanto los animales alimentados con la dieta NP como con la BP mostraron una reducción en el peso corporal hasta igualar los pesos de sus controles vírgenes pareados en edad. Estos datos confirman los resultados obtenidos previamente por otros grupos de investigadores(7,33).

Durante la lactancia los pesos de las ratas alimentadas con la dieta NP no fueron significativamente diferentes del peso de sus controles (gráfica 3), lo cual concuerda con lo señalado por Naismith y Robinson(33), Beaton y cols (15) y Kanto y Clawson (7), inclusive Remesar (18) informa también de la disminución que nosotros observamos a los 20 días de lactancia, esta disminución en el peso se atribuye a un consumo máximo de los componentes corporales de la madre para ser utilizados en la síntesis de la leche. Estas observaciones no concuerda con lo reportado por De Santiago y col. (11).

En contraste, el peso en la última semana de lactancia, de las ratas alimentadas con la dieta BP fue significativamente mayor que sus controles vírgenes alimentados con la misma dieta. Observaciones similares fueron informadas por otros investigadores (9,11).

7.2 Del consumo del alimento

7.2.1 Durante el embarazo

El consumo de alimento de los dos grupos experimentales en estudio (NP y BP) fue similar al de sus controles vírgenes desde el periodo de adaptación hasta la primera semana del embarazo, pero a partir de la segunda semana del embarazo el consumo fue significativamente mayor que el de los controles, mostrando más tarde una disminución hacia el día 19 del embarazo (Gráfica 7 y 8). Esta reducción en la ingesta puede ser utilizada como una señal de que la rata entra en trabajo de parto. Estos resultados concuerdan con lo señalado por

Beaton y col (15) y Moore y Brasel (8). Este incremento en el consumo de alimento podría coincidir con la formación de las reservas corporales de proteínas y lípidos reportadas por varios grupos de investigadores (14,15,16,17).

7.2.2 Durante la lactancia

El consumo de alimento de las ratas lactantes tanto del grupo BP como del NP se incrementa paulatinamente desde el quinto día postparto, duplicando su ingesta alrededor del día 14 de la lactancia y triplicándolo en los últimos días de la lactancia verificando lo reportado previamente por algunos autores (8,11).

Cabe mencionar que a partir del día 18 de lactancia las crías pueden iniciar el consumo del alimento sólido que deja la madre, por lo que el registro del consumo de la madre podría estar ligeramente sobrestimado.

Esta hiperfagia mostrada por las madres durante la lactancia se ha relacionado con los elevados niveles de prolactina (hiperprolactinemia), que se producen por la succión de la cría, lo cual estimula el centro del apetito de la madre (38).

7.3 Del consumo de proteína

Las necesidades de proteína varían en las diferentes etapas fisiológicas del ciclo reproductor de la rata. Durante la gestación la madre requiere una mayor cantidad de proteína para la síntesis de los tejidos del feto y de otros tejidos de la madre, como lo son el útero y las glándulas mamarias que sufren una hipertrofia durante este período y en esa situación es necesario evitar la degradación de los tejidos. En contraste, durante la lactancia la demanda de proteína por parte del animal depende de las necesidades de nitrógeno orientadas esencialmente a la síntesis de la leche.

En el caso especial de la rata la leche contiene ocho veces más proteína que la leche humana (10), lo cual justifica el uso de esta especie en nuestro estudio y explica en parte la enorme demanda de este nutrimento en este periodo (39). Durante la lactancia se observa un incremento en la síntesis de proteínas por el tejido mamario, ese incremento es crucial no solo para la síntesis de proteínas de la leche, sino también para el mantenimiento de las proteínas involucradas tanto en el metabolismo del lactocito, como de las proteínas necesarias para el recambio de los organelos celulares (40,41,42).

Nuestros resultados mostraron que las ratas sometidas a la restricción proteínica (BP) consumieron una mayor cantidad de alimento (25%), durante el embarazo y la lactancia, que las ratas NP. Supusimos que las ratas BP al ingerir una mayor cantidad de alimento lo hacían para poder cubrir la cantidad de proteínas que le demanda la lactancia puesto que estos animales son alimentados con una dieta deficiente en proteínas (13%, esto es el 61% de la concentración recomendada), sin embargo, al calcular la cantidad de proteína consumida por BP resultó ser el 66% de la recomendación (Cuadro 4), esto es, a pesar de que las ratas consumieron una mayor cantidad de alimento, la ingesta de proteínas continúa siendo deficiente.

De acuerdo a las recomendaciones de la NRC (6) una rata debe consumir 4 gramos de proteína al día, al alimentar nosotros al grupo NP con la dieta al 20% cumplimos la recomendación ya que los animales no embarazados no lactantes consumen cerca de 20 gramos de alimento diariamente. Nuestros experimentos mostraron que durante el embarazo la rata incrementa poco la ingesta de alimento (máximo 2 gramos por día en ambos grupos NP y BP) y que es durante la lactancia que el incremento es muy apreciable. Si consideramos la ingesta de proteínas durante la primera semana de lactancia los animales NP incrementaron

su consumo de 3.7 a 6.0 gramos, para la segunda semana la ingesta aumentó a 8.62 gramos y en la tercera semana, cuando se alcanza la ingestión máxima de alimento, estos animales ingirieron 11.52 gramos de proteína, es casi el triple de lo que ingiere la rata virgen o la rata embarazada. En tanto que los animales BP vírgenes y embarazados consumieron 2.84 gramos, que aumentó en la primera semana de lactancia a 3.9 gramos, en la segunda semana aumentó a 5.84 y en la tercera semana 7.73, esto es durante el periodo de la lactancia la rata BP consume cerca del 67% de la cantidad de proteína que se recomienda para esa especie.

Nuestros datos son comparables a los obtenidos por De Santiago y cols (11) en ese estudio se utilizó una dieta comercial no purificada y se informa que el consumo fue de 13.8 gramos en la tercera semana de la lactancia, si consideramos que la digestibilidad de las proteínas contenidas en los alimentos comerciales es cercana al 80%, esa ingesta corresponde a 11 gramos de proteína utilizable.

7.4 Del consumo de energía

Durante el embarazo las ratas del grupo NP ingirieron en promedio cerca de 76 calorías por día, si este valor se compara con el consumo de las ratas vírgenes del mismo grupo (70.56 calorías) observamos un incremento de solo 8%. Como es de esperarse durante la lactancia se observan los cambios mas importantes, ya que en la primera semana la ingesta calórica fue de 114.5 calorías (un incremento de 50%), en la segunda semana fue de 163.8 (o sea un incremento adicional de 65%) observándose en la tercera semana una ingesta de 218.9 calorías (esto es un incremento de 73% sobre la semana anterior).

Hemos mencionado que las ratas BP ingirieron una mayor cantidad de alimento que las ratas NP lo que debe reflejarse principalmente en la ingesta de energía, ya que tuvimos que adicionar mas carbohidratos y lípidos a la dieta BP para hacerla isocalórica con la dieta NP. Las ratas embarazadas de este grupo mostraron una ingesta de 80.63 calorías por día, la cual se incrementó en la primera semana de lactancia a 120.4 (49% más), en la segunda semana a 180.5 (un incremento de 60%) alcanzando en la tercera semana una ingesta de 239 calorías, lo que representa un aumento de tres veces la cantidad consumida por las ratas embarazadas.

7.5 Cambios en la actividad específica de la catepsina L

7.5.1 Cambios en el hígado

Tal y como se menciono anteriormente (cuadro 6, gráfica 18), la actividad específica en el hígado de las ratas vírgenes tanto del grupo NP como del grupo BP aumentó progresivamente conforme transcurre la edad, observando un incremento mayor en BP (47%) que en NP (37%) a pesar de que los valores de actividad específica son semejantes.

Para las ratas lactantes el incremento de la actividad en el día de la máxima producción de leche fue de 83% para las ratas alimentadas con la dieta NP y de 60% para las ratas alimentadas con la dieta BP. Cabe mencionar que la actividad en el tejido de las ratas lactantes BP se incrementa desde el día 7 de la lactancia, hecho que no sucede en el grupo NP.

Este incremento es atribuible entre otras cosas al incremento en el gasto cardiaco que muestra la madre durante la lactancia y que produce un mayor volumen circulante. Esto produciría un incremento en la síntesis de proteínas del

plasma en el hígado y por lo tanto un incremento en el recambio de ellas (4). Parecería, entonces, que las ratas BP realizan ajustes temporales diferentes cuando se comparan con las ratas NP.

7.5.2 Cambios en el músculo esquelético

Como se describió en resultados, la catepsina L en el músculo de las ratas lactantes y de las ratas vírgenes, de ambas dietas, no mostraron variaciones durante las tres semanas equivalentes al periodo de lactancia.

Se ha sugerido que el músculo puede ser la mayor reserva proteica del organismo, por el hecho de que este tejido representar el 40% del peso corporal y su contenido proteico es el 25% de las proteínas corporales totales. Por lo anterior los músculos pueden ser una fuente muy importante de aminoácidos en el caso de una deficiencia de estos. Esos aminoácidos quedan disponibles gracias a la activación de los procesos catabólicos. Cuando el organismo requiere un exceso de aminoácidos para realizar ciertas funciones, como en el caso de la lactancia, el metabolismo de las proteínas se modifica y el músculo puede resultar una reserva importante de proteínas corporales.

Ya que en el catabolismo de las proteínas pueden participar varios sistemas enzimáticos, el hecho de que en nuestro estudio no se haya obtenido ninguna respuesta de la catepsina L a la lactancia, indica simplemente que esta enzima no es la responsable de la movilización de proteínas que ha sido descrita por otros autores (43).

7.5.3 Cambios en la glándula mamaria

En contraste con lo observado en el hígado, el tejido mamario de los controles vírgenes alimentados tanto con la dieta NP como BP mostraron valores de actividad específica semejantes durante toda la lactancia (62 y 65mU/mg de proteína, respectivamente).

El efecto de la lactancia sobre la actividad en este tejido fue dramático, ya que los animales lactantes alimentadas con la dieta NP incrementaron su actividad desde etapas tempranas, pues al séptimo día ya se observa un aumento de 150%, incrementándose posteriormente hasta 361% el día de la mayor producción de leche, manteniéndose en valores cercanos a este hasta el final de la lactancia. Resultados similares fueron obtenidos con las ratas alimentadas con la dieta BP.

Durante el embarazo, se producen una serie de cambios hormonales en la madre, que conllevan a un crecimiento y proliferación de la glándula mamaria, los que se caracterizan por un incremento en el número de alveolos que son la región de la glándula encargada de sintetizar la leche. Al llegar la etapa de amamantamiento se estimula la secreción continua de la leche, por lo que la glándula se encuentra en gran actividad, tanto para la síntesis de la leche, como para la renovación continua de sus propias estructuras, lo cual se refleja claramente en el incremento de la actividad enzimática en comparación con los valores basales (44).

VIII. CONCLUSIONES

1. La restricción proteínica (12.3% de caseína) en la rata embarazada y lactante no produjo cambios en la ganancia de peso con respecto a los animales alimentados con una dieta cuyo contenido de proteína es normal (20% de caseína) en ninguna de las etapas estudiadas.

2. Durante la última semana de la lactancia la rata madre incrementó su ingesta en un 300% en los dos grupos estudiados, como respuesta a una demanda nutricional mayor para disponer de sustratos suficientes para la síntesis de los componentes de la leche.

3. La actividad específica de la catepsina L se incrementó en el hígado de las ratas alimentadas con la dieta NP como respuesta a la lactancia. El incremento alcanzó el 82% en la etapa de la máxima producción de leche con respecto a las vírgenes pareadas en edad.

4. El incremento en la actividad de la catepsina L en el hígado de los animales alimentados con la dieta baja en proteína (BP) fue solamente de un 60% lo que sugiere un control en la movilización de las proteínas.

5. En el tejido mamario, la actividad específica de la catepsina L mostró un incremento mayor al 300% en las ratas alimentadas con la dieta normal en proteína, como resultado de la hiperplasia del tejido y la necesidad creciente de renovar las estructuras celulares.

6. La respuesta del tejido mamario de las ratas alimentadas con la dieta deficiente en proteína (BP) fue similar al de los animales alimentados con la dieta normal en proteína.

7. Los datos obtenidos en el músculo esquelético de las ratas control alimentadas con ambas dietas, mostraron que este tejido contiene la actividad proteolítica mas baja de los tres tejidos analizados. La actividad enzimática no muestra ninguna modificación por efecto de la lactancia.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Beal A., (1993) Nutrición en el ciclo de la vida, ed. Limusa S.A. de C.V. pp135-229.

2. FAO/WHO/UNU., (1985) Energy Requirements. Technical Report Series. 724. WHO; Geneva.

3. MC Gilvery, R.W., (1982) Bioquímica. ed. Interamericana 1a edición. pp48-58 88-96.

4. Williamson D., (1980) Integration of Metabolism in Tissues of the Lactating Rat FEBS LETTERS 117:K93-K105.

5. Campbell R.M., Fell B.F., (1973) Gastrointestinal hypertrophy in the lactating rat its relation to food intake J. Physiol. 27:283-298.

6. National Research Council (NRC), (1978) Nutrient requirements of the laboratory rat. National Academy Press. Washington D.C. USA.

7. Kanto U., Clawson A.J., (1980) Effect of Energy Intake during Pregnancy and Lactation on Body Composition in Rats J. Nutr. 110:1829-1839.

8. Moore B.J., Brasel J.A., (1981) One Cycle or Reproduction Consisting of Pregnancy. Lactation and No Lactation, and Recovery: Effects on Carcass Composition in Ad Libitum-Fed and Food Restricted Rats J. Nutr. 114: 1548-1559.

9.Spray C.M., (1950) A Study of Some Aspects of Reproduction by Means of Chemical Analysis. Br. J. Nutr. 4:356-360.

10.Naishmith J., Richarson D.P., Pritchard E., (1982) The utilization of protein and energy during lactation un the rat, with particular regard to use of fat accumulated in pregnancy Br. J. Nutr. 48:433-441.

11.DeSantiago S., Hernández M.H., Flores H. S., Villalpando S., (1991)Changes in the Composition of Mammary Tissue, Liver and Muscle of Rat Dams During Lactation and After Weaning J. of Nutr. 121: 37-43.

12.Hernández - Montes H.,Escudero I., Villalpando S., (1993)Cathepsin D activity changes during lactation and weaning in liver, muscle and mammary gland of the rat FASEB J. 7:A156.

13. Hernández - Montes H.,Escudero I., Nájera M., Villalpando S., (1994) Cathepsin L and myofibrillar protease in liver and muscle of lactating and weaning dams FASEB J. 8:A 173.

14. Naismith D.J., Morgan B.L.G., (1976) The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat Br. J. Nutr. 36:536-566.

15. Beaton G.H., Beare J., Ryu H.M., (1954) Protein Metabolism in the pregnant rat J. Nutr. 54:291-304.

16. Pine A.P., Jessop N.S., (1994) Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats Br. J. Nutr. 71: 13-27.

17. Pine A.P., Jessop N.S., Allan G.E., (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.

18. Remesar X., Arola LL., Palou A., (1981) Body and Organ Size and Composition During the Breeding Cycle of Rats (*Rattus norvegicus*) Lab. Animal science 13: 67-70.

19. Siebrits F., Martinez J.A., Buttery P.J., (1985) The Effect of Lactation on the Fractional synthetic rate of protein in the liver and muscle of the Rat J. Biochem 17: 731-732.

20. Stryer, (1992) Bioquímica. Tomo I. Tercera ed. Editorial Reverté . España pp15 183-184.

21. Dixon, Webbs, (1958), Enzymes , Longmans , Great Britain pp182-183, 228.

22. Rawlings N.D., Barret A.J., (1994) Classification of Peptidases Meth. In Enzymology 244:1-15.

23. Rawlings N.D., Barret A.J., (1994) Families of Cysteine Peptidases, Meth. In Enzymology 244:461-468.

24. Young, V.R., (1970) The role of skeletal and cardiac muscle in the regulation of the protein metabolism. In: Mammalian protein metabolism (Munro,H.N., ed.). pp585-674, Academic Press, New York.

25. Alberts, (1987) Biología molecular de la célula. Ediciones Omega S.A. España pp391-396.

26. Barrett A.J.,Kirschke H., (1981) Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L Meth. In Enzymology 80:535-581.

27. Harlan TEKLAND. Research diets. Reference Guide

28. Sampson D.A., Jansen G.R., (1984) Protein and energy nutrition during lactation. Annu,Rev. Nutr. 4:43-67.

29. Starkey, P.M., (1977) Elastase and Cathepsin G, the serine proteinase of human neutrofil leucocytes and spleen. In: Proteinases in mammalian cells and tissues (Barret, A.J., ed.) p. 83, North - Holland Publishing Company, Amsterdam

30. Barrett A.J.,Kirschke H., (1981) Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L Meth. In Enzymology 80:535-581.

31. Hartree E.F., (1972) Determination of Protein: A modification of que Lowry method that gives a Linear Photometric Response Anal. Biochemistry 48:422 -427

32. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, (AOAC) .(1984) 14 ed. Washington D.C.

33. Naismith D.J., Robinson S.M., (1987) Adaptations in protein metabolism during lactation in the rat Br. J. Nutr. 58:533-538.

34. Rosso P., Streeter M., (1979) Effects of Food or Protein Restriction on Plasma Volume Expansion in Pregnant Rats J. Nutr. 109:1887-1892.

35. Vernon R., Young Ming Y., Fukagawa N., Whole Body Energy and Nitrogen (Protein) Relationships (1992) Energy Metabolism:Tissue Determinants and Cellular Corollaries, Raven Press Ltd pp 139-161

36.Contenido de aminoácidos de alimentos y datos biológicos sobre las proteínas FAO, Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Servicio de Ciencia y Politica de la Alimentación, Dirección de Nutrición, Roma (1970).

37. Eggum B., Jansen J., Larsen T., (1989) Protein quality and digestable energy of selected foods determined in balance trials with rats Plant Food H.U.M. Nutr. 39:13-21

38. Gettens G.T., Moury B., (1989) Prolactin stimates intake in a dosedependent mammer Am. Phy. Soc. R276-R280

39. Sampson D.J., Jansen R., (1984) Protein synthesis during lactantion: No circadian variation in mamary gland and liver of rats fed diets varying in protein quality and level of intake J. Nutr. 114:1470-1478

40. Zartarian G. N., Galler J.R., Munro Hamish., (1980) Marginal Protein Deficiency in Pregnant Rats. I. Changes in Maternal Body Composition J. Nutr. 110:1291-1297

41. Williamson D.H., (1984) Munday M.R., Biochemical basis of dietary incluences on the synthesis of macronutrients of rat milk Fed. Proc. 43: 2442-2447

42. McCarger L.J., Baracos V.E., (1989) Influence of Dietary Carbohidrate to fat ratio on whole body nitrogen retantion and body composition in adult rats J. Nutr. 119:1240-1245

43. Kostoglodova E., (1997) catabolismo de proteínas en el músculo, trabajo monográfico de actualización, Facultad de Química

44. Neville M.C. , Neifert M., (1985)Lactation, Physiology,Nutrition, and Breast - Feeding.Plenum Press, pp 34 - 46

Anexo1. Número de animales a lo largo del estudio

	Dieta Normal en Proteina		Dieta Baja en Proteina	
	Ratas virgenes	Ratas Lactantes	Ratas virgenes	Ratas Lactantes
Adaptación	36	—	36	—
Cruza	36	—	36	—
Embarazo	18	18	18	18
Lactancia (7dias)	6	6	6	6
Lactancia (14 dias)	6	6	6	6
Lactancia (21 dias)	6	6	6	6

Total de animales por dieta: 36

Total de animales en el estudio: 72

Anexo 2. Peso promedio de las ratas a lo largo del estudio con desviación estándar y número de animales

ADAPTACIÓN

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA			DIETA BAJA EN PROTEÍNA		
DÍA	Promedio	Desv. Std.	Número animales	Promedio	Desv. Std.	Número Animales
1	257.9	14.6	35	268.6	14.8	34
3	262.5	11.8	34	270.9	16.5	34
5	268.47	13	34	274	15.5	34
8	273.1	14.5	34	275.6	15.7	34
10	275.6	14.4	34	281.5	15.4	34
12	277.8	15.5	34	281	15.5	34

CRUZA

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA			DIETA BAJA EN PROTEÍNA		
DÍA	Promedio	Desv. Std.	Número animales	Promedio	Desv. Std.	Número Animales
15	281.4	16.6	35	284.1	16.9	36
17	285.6	16.2	34	286.8	16.5	35
19	287.4	16.8	34	288.5	17.4	35

EMBARAZO / LACTANCIA

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	VIRGEN			LACTANTE			VIRGEN			LACTANTE		
DIA	P	DS	N	P	DS	N	P	DS	N	P	DS	N
22	296	13.9	17	301	21.2	16	292	11.8	17	309	19.3	16
24	300	15.4	17	311	27.5	16	292	14.2	17	319	21.2	16
26	302	14.4	17	325	33.1	16	295	14.6	17	330	21.8	16
29	306	16.8	18	344	40.8	16	299	18.1	17	345	22.5	16
31	309	14.1	17	359	41.9	16	300	17.5	17	366	29.2	16
33	307	14.9	18	379	34.6	16	302	17.9	17	401	29.8	16
36	308	14.1	18	368	43.2	17	306	22.5	17	409	19.6	16
39	309	14.2	18	316	26.9	18	304	16.9	16	308	25.5	17
41	313	13.7	18	314	26.8	13	308	19.5	16	296	17.8	10
43	314	14.3	18	320	23.1	5	309	16.6	18	345	22.5	6
46	314	13.1	18	319	22.7	6	307	14.6	17	294	22.6	9
48	315	14.6	13	309	24.3	12	309	15.8	12	326	20.5	7
50	314	15.1	13	308	23.8	16	312	16.4	12	323	25.3	13
53	319	13.4	12	298	27.2	12	317	16.3	12	324	32.5	10
55	321	14.1	8	302	26.2	10	318	16.8	12	335	12.9	9
57	322	14.1	7	295	37.9	8	321	16.5	6	335	13.4	8
60	321	13.1	7	295	20.6	7	316	10.4	5	321	14.4	5
62	318	14.6	6	315	4.2	2	307	16.3	2	314	17.3	5

P= promedio DS = desviación estándar N= núm. de animales

Anexo 3. Consumo de alimento promedio de las ratas a lo largo del estudio con desviación estándar y número de animales

ADAPTACIÓN

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA			DIETA BAJA EN PROTEÍNA		
DÍA	Promedio	Desv. Std.	Número animales	Promedio	Desv. Std.	Número Animales
1						
3	20.5	2.1	36	24.1	4.4	36
5	20.9	2.5	36	24.9	2.9	36
8	19.6	2.2	36	23.2	3.9	36
10	18.7	2.7	36	21.3	2.8	36
12	17.1	2.1	36	21.5	3.1	36

CRUZA

	DIETA NORMAL EN PROTEINA			DIETA BAJA EN PROTEÍNA		
DÍA	Promedio	Desv. Std.	Número animales	Promedio	Desv. Std.	Número Animales
15	16.3	1.8	36	22.9	3.5	36
17	16.2	2.0	36	20.8	3.3	34
19	17.2	2.1	36	22.9	5.1	34

EMBARAZO / LACTANCIA

	DIETA NORMAL EN PROTEINA						DIETA BAJA EN PROTEINA					
	VIRGEN			LACTANTE			VIRGEN			LACTANTE		
DÍA	P	DS	N	P	DS	N	P	DS	N	P	DS	N
22	16.4	0.7	17	18.5	2.7	16	21.6	2.5	16	21.4	3.7	16
24	15.8	0.7	17	19.2	3.1	16	21.3	2.8	16	21.9	3.3	16
26	16.9	1.5	17	19.9	3.9	16	21.1	1.4	16	23.3	4.7	16
29	16.5	1.5	18	19.0	3.1	16	20.6	3.1	16	23.7	4.8	16
31	16.2	0.8	18	19.8	3.5	16	18.5	2.3	16	23.3	5.5	16
33	16.1	2.4	16	19.7	2.7	17	18.8	0.9	16	24.3	3.8	16
36	16.8	0.8	17	18.1	2.1	16	20.9	1.4	16	20.1	5.6	16
39	16.4	0.9	18	15.1	5.4	16	20.8	3.3	18	20.1	6.4	16
41	17	1.5	18	23.4	5.7	12	20.2	3.3	16	18.2	6.7	16
43	17.1	1.2	18	25.5	4.5	5	21.4	3.1	18	24.3	9.9	9
46	16.4	1.4	16	34.5	9.1	6	19.6	2.8	18	26.8	8.5	6
48	15.5	2.6	15	30.4	4.6	11	19.9	3.1	13	29.2	7.4	8
50	18.2	1.2	13	38.2	6.2	15	20.7	2.5	12	39.1	8.7	9
53	16	3.3	11	41.9	7.5	11	19.9	2.9	12	50.1	8.7	12
55	18.4	3.1	7	49.1	10.1	10	17.9	3.1	10	53.3	12	10
57	16.8	1.9	7	53.2	7.3	8	22.3	2.6	5	61.9	6.1	9
60	16.6	0.9	7	58.3	4.1	4	18.8	4.1	5	60.5	6.6	5
62	14.8	0.9	6	61.5	12.8	4	13.7	3.9	2	66.4	4.1	4

P= promedio DS = desviación estándar N= núm. de animales

Anexo 4. Consumo de proteínas promedio de las ratas a lo largo del estudio con desviación estándar y número de animales

ADAPTACIÓN

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA			DIETA BAJA EN PROTEÍNA		
DÍA	Promedio	Desv. Std.	Número animales	Promedio	Desv. Std.	Número Animales
1						
3	3.7	0.4	36	2.6	0.5	36
5	3.8	0.4	36	2.7	0.3	36
8	3.5	0.4	36	2.5	0.4	36
10	3.4	0.5	36	2.3	0.3	36
12	3.1	0.4	36	2.4	0.3	36

CRUZA

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA			DIETA BAJA EN PROTEÍNA		
DÍA	Promedio	Desv. Std.	Número animales	Promedio	Desv. Std.	Número Animales
15	2.9	0.3	36	2.5	0.4	36
17	3.1	0.5	36	2.5	0.6	34
19	3.1	0.4	36	2.4	0.4	34

EMBARAZO / LACTANCIA

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	VÍRGEN			LACTANTE			VÍRGEN			LACTANTE		
DÍA	P	DS	N	P	DS	N	P	DS	N	P	DS	N
22	2.9	0.14	17	3.3	0.5	16	2.4	0.3	16	2.4	0.4	16
24	2.8	0.13	17	3.3	0.6	16	2.3	0.3	16	2.4	0.4	16
26	3.1	0.27	17	3.6	0.7	16	2.3	0.2	16	2.6	0.5	16
29	2.9	0.27	18	3.4	0.6	16	2.3	0.3	16	2.6	0.5	16
31	2.9	0.16	18	3.5	0.6	16	2	0.2	16	2.6	0.6	16
33	2.9	0.5	16	3.5	0.5	17	2.1	0.11	16	2.7	0.4	16
36	3.1	0.15	17	3.2	0.7	16	2.3	0.15	16	2.7	0.6	16
39	2.9	0.2	18	2.8	0.9	16	2.3	0.3	18	2.1	0.7	16
41	3.1	0.3	18	4.5	1.1	12	2.2	0.3	16	2.6	1.1	16
43	3.1	0.2	18	4.6	0.8	5	2.3	0.3	18	2.9	0.9	9
46	2.9	0.2	16	6.6	1.9	6	2.2	0.3	18	3.2	0.8	6
48	2.8	0.4	15	5.5	0.8	11	2.3	0.3	13	4.3	0.9	8
50	3.3	0.2	13	6.9	1.3	15	2.2	0.3	12	5.1	0.7	9
53	2.8	0.5	11	7.2	2.1	11	2.1	0.3	12	5.5	0.9	12
55	3.3	0.5	7	8.8	1.8	10	2.5	0.5	10	5.9	1.3	10
57	3.0	0.3	7	9.5	1.2	8	2.1	0.3	5	6.9	0.6	9
60	2.9	0.2	7	10.3	2.0	4	2.1	0.4	5	6.9	0.8	5
62	2.7	0.2	6	10.3	2.4	4	1.5	0.4	2	7.6	0.2	4

P= promedio DS = desviación estándar N= num. de animales

Anexo 5. Consumo de calorías promedio de las ratas a lo largo del estudio con desviación estándar y número de animales

ADAPTACIÓN

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA			DIETA BAJA EN PROTEÍNA		
DÍA	Promedio	Desv. Std.	Número animales	Promedio	Desv. Std.	Número Animales
1						
3	77.9	8.3	36	91.4	16.6	36
5	79.8	9.6	36	94.9	11.1	36
8	74.5	8.5	36	88.3	14.9	36
10	71.3	10.3	36	81	10.7	36
12	64.9	7.9	36	81.7	11.7	36

CRUZA

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA			DIETA BAJA EN PROTEINA		
DÍA	Promedio	Desv. Std.	Número animales	Promedio	Desv. Std.	Número Animales
15	62.0	7.0	36	85.7	13.9	36
17	64.8	9.8	36	85.9	21.6	34
19	65.4	8.1	36	84.5	13.1	34

EMBARAZO / LACTANCIA

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEINA					
	VIRGEN			LACTANTE			VIRGEN			LACTANTE		
DIA	P	DS	N	P	DS	N	P	DS	N	P	DS	N
22	62.4	2.9	17	70.4	10.4	16	82.3	9.6	16	81.3	14.7	16
24	59.3	2.9	17	73	11.9	16	79.4	6.9	16	83.5	12.7	16
26	64.3	5.7	17	75.6	14.8	16	80.1	5.4	16	89.6	17.8	16
29	62.8	5.7	18	72.4	12.1	16	78.4	11.8	16	89.6	18.2	16
31	61.4	3.3	18	77.2	13.8	16	70.5	8.6	16	88.6	21.2	16
33	61.2	10.4	16	74.8	8.6	17	71.7	3.7	16	92.3	14.6	16
36	63	2.9	17	72.4	16.6	16	79.4	5.3	16	75.5	20.6	16
39	62.3	3.8	18	54.3	22.8	16	79.1	12.3	18	62.9	25.9	16
41	64.7	5.8	18	68.1	29.4	12	78	12.3	16	92.2	37.8	16
43	64.8	4.5	18	82.5	35.8	5	81.4	11.7	18	101	32.1	9
46	62.3	5.4	16	131	34.5	6	74.7	10.6	18	110	28.2	6
48	58.7	9.8	15	110	23.8	11	74.7	11.6	13	148	33.1	8
50	69.3	4.6	13	145	23.7	15	75.8	8.2	12	174	26.7	9
53	60.9	12.6	11	159	28.4	11	79.8	11.3	12	170	29.1	12
55	69.9	11.9	7	186	38.2	10	75.5	19.3	10	213	43.6	10
57	64	7.4	7	202	27.7	8	72	9.8	5	235	23.2	9
60	62.9	3.5	7	211	29.5	4	84.6	15.7	5	229	25.3	5
62	56.4	3.5	6	228	43.7	4	71.5	14.8	2	246	22.7	4

P= promedio DS = desviación estandar N= núm. de animales

Anexo 6. Datos de Actividad Específica de Catepsina L por miligramo de Proteína, con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en el hígado

	DIETA NORMAL EN PROTÉINA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	Virgen			Lactante			Virgen			Lactante		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
HÍGADO	200	192	256	228	292	256	112	284	208	164	300	232
	224	180	244	204	256	212	144	164	192	220	268	132
	144	160	192	192	372	204	164	164	168	316	320	156
	136	132	224	148	268	244	116	272	184	188	292	212
	140	132	212	184	276	224	172	88	232	208	228	192
	136			120			92	80		288		200
Promedio	163	159	225	179	292	228	133	175	196	230	281	187
Desv. Std.	38.6	27.3	25.4	39.1	46.2	21.7	31.7	87.3	24.4	59.1	35.3	37
Núm. de animales	6	5	5	6	5	5	6	6	5	6	5	6

Anexo 7. Datos de Actividad Específica de Catepsina L por miligramo de Proteína, con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en el músculo

	DIETA NORMAL EN PROTEINA						DIETA BAJA EN PROTEINA					
	Virgen			Lactante			Virgen			Lactante		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
HÍGADO	8	4	12	8	12	20	4	4	20	4	4	12
	8	4	8	8	12	8	4	8	8	8	8	4
	8	8	8	8	12	4	8	4	4	16	8	4
	4	4	8	8	12	4	8	8	8	4	4	12
	4	8	12	8	12	8	8	4	4	4	8	8
	4	4	12	8	12	20	8	8	8	4	4	8
Promedio	6	5.3	10	8	12	10.6	6.7	6	8.7	6.7	6	8
Desv. Std.	2.19	2.07	2.19	-	-	7.4	2.07	2.19	5.9	4.8	2.19	3.58
Núm. de animales	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Anexo 8. Datos de Actividad Específica de Catepsina L por miligramo de Proteína, con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en la glándula mamaria

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	Virgen			Lactante			Virgen			Lactante		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
HÍGADO	88	52	140	132	164	236	28	92	36	172	228	232
	72	64	192	168	220	168	20	60	92	136	260	184
	48	36		124	316	288	4	48	64	156	376	212
				232	188	272				128	192	220
				228	228	348				260		344
					288							324
Promedio	69.3	50.7	66	176	234	262	17.3	66.7	64	170	279	252
Desv. Std.	20.1	14.1	36.8	51.3	58.1	66.5	12.2	22.7	28.0	53	76.2	65.3
Núm. de animales	4	4	3	5	6	5	4	4	4	5	4	6

Anexo 9. Datos de Actividad de la Catepsina L por gramo de tejido, con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en el hígado

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	Virgen			Lactante			Virgen			Lactante		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
HÍGADO	22.1	24.9	16.6	19.6	46.0	29.2	17.4	19.0	24.4	16.6	30.8	24.2
	15.2	22.4	17.0	18.0	40.4	35.6	13.6	16.2	21.8	20.6	33.6	19.0
	15.0	19.6	16.8	19.6	40.8	29.2	15.2	20.2	24.0	16.2	32.0	20.6
	13.8	12.6	24.8	20.0	34.8	38.3	16.6	12.2	19.4	17.8	26.1	25.0
	18.0	12.2	19.8	19.4	33.6	35.3	12	10.4	30.4	15.6	21.6	19.6
	17.8					39.8			25			
Promedio	16.9	18.3	19.0	19.3	39.1	34.6	14.9	15.6	24.2	17.2	28.7	21.7
Desv. Std.	3	5.7	3.5	0.77	5.0	4.5	2.2	4.2	3.7	1.8	4.8	2.73
Núm. de animales	6	5	5	5	5	6	5	5	6	5	5	5

Anexo 10. Datos de Actividad de la Catepsina L por gramo de tejido, con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en el músculo

	DIETA NORMAL EN PROTÉINA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	Virgen			Lactante			Virgen			Lactante		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
MÚSCULO ESQUELÉTICO	0.6	0.4	1	0.9	1.9	1.0	0.8	0.1	0.9	0.4	1.6	1.1
	0.2	0.7	1	0.8	1.1	1.0	0.2	0.9	0.1	0.6	1.3	0.5
	0.1	0.6	0.8	0.9		0.7	1.5	0.5	0.4	0.2	0.7	0.8
	0.1			1.2		0.9	0.2		0.2	0.4	0.5	0.7
	1.1			1.2			1.0			0.2		0.9
	1.1						0.9					
Promedio	0.53	0.56	0.93	1.0	1.5	0.9	0.76	0.5	0.41	0.37	1.02	0.8
Desv. Std.	0.47	0.15	0.11	0.18	0.56	0.14	0.50	0.4	0.39	0.18	0.51	0.22
Núm. de animales	6	3	3	5	2	4	6	3	4	5	4	5

Anexo 11. Datos de Actividad de la Catepsina L por gramo de tejido, con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en la glándula mamaria

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	Virgen			Lactante			Virgen			Lactante		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
GLÁNDULA MAMARIA	3.2	1.2	1.3	13.8	15.0	29.2	1.5	3.5	3.0	8.4	16.8	21.4
	3.1	2.0	3.7	22.1	17.6	19	0.9	2.7	3.0	7.8	34.6	22.2
	1.6	2.1	2.3	14.3	21.4	27	0.1	2.3	4.4	9.6	27.4	21.6
				16.6	12.4	30	0.2			9.0	29.6	23.2
				13.8	27.6	26.2				9.4	13.2	22.2
					24	26.2				9.4		
Promedio	**2.6**	**1.7**	**2.4**	**16.2**	**19.6**	**26.3**	**0.67**	**2.83**	**3.47**	**8.9**	**24.3**	**22.1**
Desv. Std.	**0.89**	**0.49**	**1.2**	**3.5**	**5.7**	**3.9**	**0.6**	**0.61**	**0.81**	**0.7**	**8.9**	**0.63**
Núm. de animales	**3**	**3**	**3**	**5**	**6**	**6**	**4**	**3**	**3**	**6**	**5**	**5**

Anexo 12. Datos del Contenido de Catepsina L por órgano total, con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en el hígado

	DIETA NORMAL EN PROTÉINA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	Virgen			Lactante			Virgen			Lactante		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
HÍGADO	221	242	278	220	516	439	192	191	231	245	270	282
	157	257	233	184	382	391	152	160	118	284	273	310
	141	218	176	277	451	424	205	204	248	236	285	284
	155	141	185	258	406	500	152	131	201	272	265	374
	203	131	154	240	477	499	161	118	264	255	255	310
	213								276			
Promedio	182	198	205	236	446	451	173	161	223	258	270	312
Desv. Std.	34.6	58.1	49.8	35.6	53.9	47.9	24.7	37	57.6	19.3	21.4	37.1
Núm. de animales	6	5	5	5	5	5	5	5	6	5	5	5

Anexo 13. Datos del Contenido Catepsina L por órgano total, con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en el músculo

	DIETA NORMAL EN PROTÉINA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	Virgen			Lactante			Virgen			Lactante		
Dias de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
MÚSCULO ESQUELÉTICO	8.3	6.1	13.0	13.6	21.7	14.6	4.6	1.49	1.3	6.2	21.1	9.9
	3.0	9.9	7.98	9.5	17.1	13.4	4.4	12.6	6.0	10.3	18.5	1.5
	1.8	10.7	11.6	13.6		7.5	3.5	7.4	2.3	13.2	7.4	4.8
	1.3	5.2	11.5	12.7		12.1	5			3.0	6.2	10.4
	13.7			13.2			5.5			3.2		7.8
	12.6						3.8			2.2		10.9
Promedio	**6.8**	**8.0**	**11.0**	**12.5**	**19.4**	**11.9**	**4.7**	**7.1**	**3.3**	**6.4**	**13.3**	**7.6**
Desv. Std.	**5.5**	**2.7**	**2.1**	**1.7**	**3.2**	**3.1**	**1.8**	**5.4**	**2.4**	**4.5**	**7.6**	**3.7**
Núm. de animales	**6**	**4**	**4**	**5**	**2**	**4**	**6**	**3**	**3**	**6**	**4**	**6**

Anexo 14. Datos del Contenido Catepsina L por órgano total, con desviación estándar y número de animales por grupo y por dieta en la glándula mamaria

	DIETA NORMAL EN PROTEÍNA						DIETA BAJA EN PROTEÍNA					
	Virgen			Lactante			Virgen			Lactante		
Días de Lactancia	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
GLANDULA MAMARIA	11.8	12.1	14.2	164	175	324	14.3	23.2	20.8	130	240	283
	26.2	15.7	30.3	150	274	327	7	21.3	0.8	129	531	416
	12.7	18.3	71.6	192	312	424	1.7	6.9	1.3	98	556	338
		5.1		145	207	412		9.6	22.9	130	409	315
				132	416	346				157	178	380
					529	371				109		405
Promedio	16.9	12.8	38.7	157	319	367	7.7	15.3	11.5	126	383	356
Desv. Std.	8.1	5.7	29.6	22.9	133	43	6.3	8.2	12	20.1	169	52.7
Núm. de animales	3	4	3	5	6	6	3	4	4	6	5	6