UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA EN LA DIETA DE LA RATA SOBRE LA PRODUCCION Y COMPOSICION DE LA LECHE"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JULIO FEREGRINO NOGUEZ

ASESORES: M. EN C. MARTHA E. DEL PRADO MANRIQUEZ
DR. HOMERO HERNANDEZ MONTES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1998

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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
Departamento de Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA F E S-CUAUTITLAN
P R E S E N T E

AT'N: Ing. Jaime de Anda Montañez
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F E S -C

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:
"Influencia de la Concentración de Proteína en la Dieta de la Rata Sobre la Producción y Composición de la Leche".

que presenta el pasante: Julio Peregrino Noguez
con numero de cuenta: 9156118-5 **para obtener el TITULO de:**
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicho tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, al 16 de Febrero de 1998

PRESIDENTE	I.B.Q. J. Francisco Montiel Sosa
VOCAL	M.V.Z. Jorge Torres Martínez
SECRETARIO	Dr. Homero Hernández Montes
PRIMER SUPLENTE	Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda
SEGUNDO SUPLENTE	Q.B.P. Ma. Elena Mondragón Esquivel.

ESTA TESIS FUE ELABORADA EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN NUTRICIÓN, HOSPITAL DE PEDIATRIA. CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. en C. MARTHA E. DEL PRADO MANRIQUEZ.

A mis padres:

Este trabajo esta dedicado especialmente a
Ma. Concepcion Noquez G. e Ignacio Feregrino C.
Por que gracias a la motivación y apoyo que me han otorgado
de manera desinteresada durante toda la vida, he logrado
concluir uno de mis objetivos principales.

A mis hermanos:

Jose, Margarita, Ignacio, Francisco,Miguel A., Juan D.,
Lourdes E.y Araceli. Por el apoyo que siempre he recibido y
Por confiar en mi les doy las gracias.

A Ivonne G., por su gran amistad que me ha ofrecido
siempre. A Manuel A. por sus valiosos consejos
que me ayudarón a mi desrrrollo como persona.
A mis cuñados(as) Marco A.M., Juan M. R.,
Marco A. P., Ana M. y Larisa C.
por ser excelentes personas.

A mis amigos de la FESC:
J. Armando M., C. Arturo V., Marco A.B.,
J. Patricio M., a los Rubenes, Rafael C., y
compañeros de Generación, por la amistad que siempre
hemos compartido.

Con especial agradecimiento a mi directora y asesora de tesis
Martha E. Del Prado, por darme la oprtunidad
de formar parte de su excelente equipo de trabajo.
Gracias por ser una persona magnífica.

Al Dr. Salvador Villalpando H. por permitirme
formar parte de la Unidad de Investigación Médica en
Nutrición para el desarrollo del presente trabajo.

Con cariño a Margarita C. (Pinky) y al Dr. Homero Hernandez
con los cuales tuve el agrado de formar un equipo de trabajo
muy especial.

Agradesco a mis compañeros y a los investigadores de la
UIM-N por su amistad, sugerencias y comentarios para
el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL.

RESUMEN.

ABREVIATURAS.

pag

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. EMBARAZO.

1.1.1 Metabolismo materno. 1

1.1.2 Crecimiento fetal. 3

1.2. LACTANCIA. 5

1.2.1 Anatomía de la Glándula Mamaria. 7

1.2.2 Lactogénesis. 8

1.2.3 Leche. 9

1.2.4 Mecanismos para la síntesis y secreción de leche. 10

1.2.4.1 *Síntesis y Secreción de Lípidos.* 11

1.2.4.2 *Síntesis de Proteínas en la Glándula Mamaria.* 14

1.2.4.3 *Secreción de iones.* 16

1.2.4.4 *Vía Paracelular.* 17

1.2.4.5 *Síntesis de Lactosa en la Glándula Mamaria.* 17

2. ANTECEDENTES.

2.1. RESTRICCIÓN ENERGÉTICO-PROTEICA.

2.1.1 Efecto sobre las crías. 20

2.1.2 **Efecto sobre producción y composición de leche.** 21

2.2. RESTRICCIÓN PROTEICA.

2.2.1 **Efecto sobre el desarrollo fetal, crecimiento de las crías y ganancia de peso de la camada.** 22

2.2.2 **Efectos de las restricciones proteicas y de la calidad proteica de la dieta sobre la producción y composición de la leche.** 24

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. 26

4. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL. 27

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES. 27

5. HIPÓTESIS. 28

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO. 29

6.2 CITOLOGÍA VAGINAL. 31

6.3 REGISTRO DEL CONSUMO DE ALIMENTO. 31

6.4 REGISTRO DE PESO CORPORAL DE LA RATA MADRE Y DE LAS CRÍAS. 32

6.5 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LECHE. 32

6.6 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE LECHE. 34

6.7 COMPOSICIÓN DE LECHE. 34

6.7.1 **Determinación de Proteínas.** 35

6.7.1.1 *Curva Patrón.* 37

6.7.1.2 *Determinación de la concentración de proteínas en la leche.* 37

6.7.2 **Determinación de Lípidos.** 38

6.7.3 **Determinación de Lactosa.** 38

6.7.4 **Determinación de la composición de los ácidos grasos de los lípidos de la leche.** 40

6.8 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD DE LECHE. 41

6.9 DETERMINACIÓN DEL AGUA CORPORAL DE LAS CRÍAS. 41

6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO. 41

7. RESULTADOS.

7.1 CONSUMO DE ALIMENTO DE LA RATA MADRE. 42

7.2 CONSUMO DE PROTEÍNAS DE LA RATA MADRE. 43

7.3 PESO CORPORAL DE LA RATA MADRE. 44

7.4 PESO Y NÚMERO DE CRÍAS AL NACIMIENTO. 45

7.5 CRECIMIENTO DE LAS CRÍAS. 46

7.6 COMPOSICIÓN LÁCTEA. 47

7.7 PRODUCCIÓN DE LECHE. 48

7.8 COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE. 49

8. DISCUSIÓN. 52

9. CONCLUSIONES. 56

10. BIBLIOGRAFÍA. 57

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

			pag
Figura	**1.**	Consumo de alimento de la rata madre durante el embarazo y la lactancia.	**42**
Figura	**2.**	Consumo de proteína de la rata madre durante el embarazo y la lactancia.	**43**
Figura	**3.**	Peso corporal de la rata madre.	**44**
Figura	**4.**	Peso corporal de las crías.	**46**

ÍNDICE DE TABLAS.

			pag.
Tabla	**1.**	Composición de la dieta.	**30**
Tabla	**2.**	Peso corporal y número de crías al nacimiento y al día 14 de lactancia.	**45**
Tabla	**3.**	Composición de la leche.	**47**
Tabla	**4.**	Volumen de leche y producción en 24 hrs. De lípidos, proteínas, lactosa y energía de la leche.	**48**
Tabla	**5.**	Porcentaje de ácidos grasos presentes en la leche.	**50**
Tabla	**6.**	Cantidad de ácidos grasos de cadena media y cadena larga presentes en la leche.	**51**

RESUMEN.

Durante el embarazo y la lactancia el organismo materno sufre de muchas adaptaciones metabólicas que le permiten hacer frente a la gran demanda de energía y de sustratos para el crecimiento del feto y para la producción de leche. La deficiencia en el consumo de alimento o de proteína durante el embarazo y la lactancia puede ocasionar un bajo peso de la cría al nacimiento y afectar la producción y composición láctea.

El objetivo de la presente investigación fué comparar la composición y la producción láctea en ratas alimentadas con dietas con niveles contrastantes de proteína desde antes del embarazo y durante la lactancia.

Metodología: Ratas Sprague-Dawley de 14 semanas de edad con un peso de 260 ± 20 g se asignaron aleatoriamente a dos grupos experimentales. Un grupo recibió una dieta con 18% de proteína (grupo NP) y al segundo grupo (grupo BP) se le proporcionó una dieta baja en su contenido de proteínas (11% de proteína). La dieta se les dió a los animales dos semanas antes del embarazo, durante el embarazo y la lactancia. El peso corporal de la madre, su consumo de alimento y el peso corporal de las crías se determinó diariamente. Entre el día 12 a 14 de lactancia se determinó la producción de leche en los animales de los dos grupos midiendo la transferencia de agua tritiada de la rata madre a las crías. Se determinó el contenido de proteínas, lactosa, lípidos y la composición de ácidos grasos en una muestra de leche.

Resultados: La leche producida por el grupo BP mostró una menor concentración de proteínas y una mayor concentración de lípidos en comparación con el grupo NP ($p<0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la concentración de lactosa y en la densidad energética de la leche. Las ratas del grupo BP produjeron un menor volumen de leche por día en comparación con las NP. La producción diaria de proteínas en la leche es significativamente menor en el grupo de ratas con la dieta BP La producción de lípidos y lactosa no mostró diferencias entre los grupos. La composición de ácidos grasos en la leche no fué significativamente diferente entre los grupos. Aunque el número de crías no se vió afectado por la restricción de proteína, el peso de la camada al nacimiento es significativamente menor en el grupo BP, la diferencia se mantiene hasta el día 14 de lactancia.

Conclusiones: La restricción de proteínas durante el embarazo en la rata repercute negativamente en el desarrollo del feto y en el peso al nacimiento de la cría. La producción diaria de proteínas en la leche de las ratas con restricción crónica de proteínas es menor lo cual repercute en un menor crecimiento de las crías. La densidad energética de la leche producida por las ratas restringidas crónicamente en proteínas se mantuvo similar a la del grupo no restringido debido a un incremento en el contenido de lípidos en la leche que puede estar relacionado con una mayor captación de ácidos grasos provenientes de la dieta.

ABREVIATURAS.

ATP : Adenosin Trifosfato.

ANOVA : Análisis de varianza.

BP : Baja en Proteínas.

C : Carbono.

°C : Grados Centígrados.

$CH\ Cl_3$: Cloroformo.

$CH_3\ OH$: Metanol.

CO_2 : Bióxido de Carbono.

dL : Decilitro.

g : Gramos.

GOD : Glucosa Oxidasa.

$G\text{-}6\text{-}PO_4$: Glucosa-6-fosfato.

$G\text{-}1\text{-}PO_4$: Glucosa-1-fosfato.

h : Hora.

H_2O_2 : Peróxido de Hidrógeno.

Ig : Inmunoglobulina.

Kg. : Kilogramo.

Kcal : Kilocaloria.

L : Litro.

mCi : Milicuries.

mg : Miligramos.

mL : Mililitro.

mmol : Milimol.

mmol/L : milimoles por litro.

NADPH : Nicotin Adenindinucleotido Fosfato.

Na_2SO_4 : Sulfato de Sodio.

NP : Normal en Proteínas.

nm : Nanómetros.

POD : Peroxidasa.

PO_4 : Fosfato.

PUFA : Ácido graso poliinsaturado.

RNA_m : Ácido Ribonucleico mensajero.

r.p.m. : Revoluciones por minuto.

UDP : Uridin difosfato.

UI : Unidades Internacionales.

U/mL : Unidades/mililitro.

UTP : Uridin Trifosfato.

vol. : Volumen.

α : Alfa.

β : Beta.

% : Porcentaje.

10x : Objetivo de 10 aumentos.

µl : Microlitro

µg : Microgramos.

± : Mas, Menos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EMBARAZO.

1.1.1 Metabolismo materno.

Durante el embarazo ocurren una serie de cambios en el organismo materno que le permiten hacer frente a esta etapa de elevadas demandas metabólicas (85). El incremento en el volumen sanguíneo es uno de los primeros cambios que ocurren en la madre gestante, en los humanos se presenta alrededor de las primeras diez semanas de embarazo (26) y en la rata a los doce días (39).

El intenso drenaje de metabolitos hacia el feto, que tiene lugar durante el último tercio del embarazo, obliga a la madre a someterse a una serie de adaptaciones metabólicas, las cuales están regidas por los cambios hormonales que en ella ocurren, así como por la continua pérdida de sustratos a través de la placenta (22).

El embarazo parece tener dos fases, "la fase materna" la cual prepara al organismo materno para satisfacer las futuras demandas del feto y "la fase fetal" durante la cual el feto presenta la máxima utilización de nutrimentos para su crecimiento (85). Durante los primeros dos tercios del embarazo se presenta un importante aumento en la ingesta de alimento por la madre, que puede ser desproporcionadamente alta en relación a las necesidades maternas, sin embargo gracias a esto y a pesar del progresivo crecimiento de las estructuras feto-placentarias, la madre acumula una considerable proporción de reservas energéticas en el tejido adiposo y de aminoácidos en el tejido muscular durante

esta etapa. El principal componente de las reservas corporales corresponde a los lípidos en el tejido adiposo que pueden llegar a representar el 28% del peso total ganado durante la gestación (25, 55, 85).

El acúmulo de lípidos en el organismo materno ocurre en presencia de una intensa hiperfagia e hiperinsulemia de la madre. Esta reserva lipídica es el resultado del aumento en la síntesis de ácidos grasos junto con el aumento en la captación de lípidos por el tejido adiposo (22).

Durante el último tercio de la gestación los niveles circulantes de glucosa de la madre disminuyen a pesar de que su capacidad gluconeogénica es mayor. La unidad feto-placentaria extrae glucosa y precursores gluconeogénicos como aminoácidos de la madre. La hipoglucemia materna es el resultado de la transferencia placentaria de glucosa, sustrato energético preferente para el feto (23, 68, 117). Esta hipoglucemia materna puede ser la responsable de su hiperfagia, la cual le facilita una mayor disponibilidad de sustratos provenientes de la dieta que, junto con la hiperinsulemia contribuyen a mantener el anabolismo materno (22). Los cambios en el consumo de alimento durante el embarazo han sido descritos en varias especies, en la rata, al día cinco de embarazo ya es notable el aumento en el consumo de alimento, proporcionalmente primero que en los humanos (100).

En la rata, la retención de lípidos y proteínas en el cuerpo materno comienza durante la primera semana de embarazo y continúa hasta cerca del término, cuando la mayoría del exceso de proteína es removida (2). En contraste, un

exceso de grasa persiste en el organismo materno después del alumbramiento (56).

Las necesidades de los tejidos maternos, de la placenta y el feto aumentan los requerimientos de proteína durante el embarazo. Cerca del 60% del total de la proteína acumulada es localizada en los productos de la concepción (feto, líquido amniótico y placenta), el resto representa la ganancia del útero, de la glándula mamaria y de la sangre. La proteína representa alrededor de 1 Kg de los 12 Kg de peso ganados por la madre durante el embarazo, cerca del 50% de esta proteína es depositado en el feto, 25% en el útero y los pechos, 10% en la placenta y 15% en la sangre y el fluido amniótico . La acumulación de proteína en el feto es mayor durante el último cuarto de la gestación que corresponde al periodo de máximo crecimiento fetal (69).

1.1.2 Crecimiento fetal.

El crecimiento del feto durante el embarazo y la producción de leche durante la lactancia son procesos que requieren del aporte extra de nutrimentos y de energía para la madre ya que el aumento en el tamaño de tejidos metabólicamente activos y el aumento de la síntesis tisular ocasiona el aumento en el metabolismo basal. El aumento en las necesidades del concepto (feto, líquido amniótico y placenta) induce el incremento en el consumo de alimento de la madre y de cambios en el organismo materno necesarios para manejar la gran cantidad de nutrientes y consumo de oxígeno. Al mismo tiempo, la vascularización

uterina se expande para mantener al concepto con una cantidad adecuada de nutrientes y oxígeno. Desde el momento en que el concepto tiene una mayor demanda metabólica que el tejido materno, lo cual ocurre hacia el final de la gestación, éste recibe más nutrientes por unidad de masa corporal que la madre. Mas aún, puede ser capaz de competir con la madre por los nutrientes disponibles (19, 67).

El feto recibe a través del cordón umbilical glucosa que constituye el principal sustrato fetal, además de lactato y de aminoácidos lo que conduce a la acumulación de glucógeno en hígado y músculo y de triacilgliceroles en el hígado y en el tejido adiposo (69). En promedio, el feto representa aproximadamente el 25% de la ganancia total de peso materno, la placenta cerca del 5% y el fluido amniótico el 6%. La unidad feto-placentaria crece exponencialmente en el último tercio de la gestación y alrededor de 6 a 8 g de proteína por día son retenidos por esta en la última mitad del embarazo. Se ha estimado que el feto utiliza alrededor de 2.8 g de proteína/Kg/día en el último trimestre para la síntesis de tejido nuevo y para la obtención de la energía necesaria para todos los procesos biosintéticos (85).

La síntesis de nuevas estructuras condiciona un elevado paso transplacentario de aminoácidos a medida que avanza el embarazo, con lo cual el metabolismo nitrogenado materno se ve sometido a una fuerte presión metabólica que será en gran medida soslayada por el aumento en la ingesta y por la aparición de diversos mecanismos destinados a ahorrar nitrógeno (69).

El metabolismo nitrogenado fetal se caracteriza por dos fenómenos básicos. En primer lugar, por un elevado recambio proteico, es decir, altas tasas de síntesis y degradación, que resultan en un acúmulo neto de proteínas, pero que implica una elevada tasa de reciclaje de aminoácidos (53). En segundo lugar, la elevada capacidad degradadora de aminoácidos por parte del feto, que se traduce en una fuerte producción de urea que es exportada en grandes cantidades hacia la madre (11).

Condicionada sin duda por los altos requerimientos fetales, la captación umbilical de aminoácidos equivale aproximadamente a un 85% de la captación uterina (1). La placenta transporta activamente los aminoácidos de la circulación materna a la fetal, los niveles de aminoácidos plasmáticos fetales son siempre mayores a los maternos, lo que implica un paso transplacentario en contra de gradiente de concentración (69). El flujo umbilical no se ve afectado por el ayuno materno y la captación fetal es similar sea cual sea el estado nutricional del animal (47).

1.2 LACTANCIA.

Durante la lactancia aumenta el gasto cardiaco, se hipertrofia el hígado, corazón, intestino y glándula mamaria y aumenta la ingesta de la madre de manera importante. La demanda energética que impone la lactancia, excede calóricamente a la ingesta dietaria de la madre, debido a ello ocurre una importante movilización de las reservas corporales grasas acumuladas durante el

embarazo y se produce una pérdida de la masa proteica corporal de la madre lactante (49). Al mismo tiempo, el balance del recambio proteico parece inclinarse más hacia la degradación en la glándula mamaria, hígado y músculo esquelético (107).

Durante la lactancia, la glándula mamaria aumenta sus requerimientos de sustratos para la producción láctea. Este aumento se cubre en parte por el aumento en la ingesta de alimentos, la otra parte es cubierta por la disminución en la utilización de sustratos por los tejidos periféricos y por un aumento en su capacidad de exportar sustratos a la circulación. De acuerdo con esto, la síntesis de lípidos disminuye y la degradación de lípidos aumenta en el tejido adiposo durante la lactancia. Estos cambios tienen como resultado que menos glucosa y triacilgliceroles sean captados por los tejidos y más ácidos grasos y glicerol sean liberados a la circulación (106).

Los requerimientos maternos para muchos nutrimentos dependen de la cantidad de estos secretados en la leche, el requerimiento de un nutriente es usualmente mayor que la cantidad de este secretada en la leche ya que, la trasferencia de energía y nutrimentos de la dieta a la leche no es cien por ciento eficiente. En la práctica, la madre subsidia la lactancia movilizando los nutrimentos almacenados durante la gestación (91). Los requerimientos de energía para la lactancia dependen principalmente del volumen de leche producida. (91, 106).

1.2.1 Anatomía de la Glándula Mamaria.

Aunque la localización y la forma externa de la glándula mamaria difiere de una especie a otra, el mecanismo de la producción de leche es extraordinariamente similar en todos los mamíferos (63). La glándula mamaria es una estructura glandular cutánea altamente especializada, compuesta de elementos involucrados en la producción y eyección de la leche (17). La glándula mamaria durante el embarazo sufre una serie de procesos de crecimiento y maduración, cuya característica dominante es la hiperplasia. Este crecimiento permite la proliferación del epitelio mamario, unidad funcional que más tarde se encargará de la síntesis de la leche (107). El componente básico de la glándula mamaria son los acines, los cuales están constituidos por una sola capa de células epiteliales dispuestas en torno a una cavidad llamada lumen acinar. Las células epiteliales descansan sobre una membrana basal y entre estas se encuentran las células mioepiteliales. La leche pasa de las células epiteliales al lumen acinar y es evacuada por medio de un pequeño conducto, el canal galactóforo. La glándula mamaria en todos los mamíferos consiste de una serie de estos ductos de origen epitelial que se extienden desde la tetilla, hasta los racimos acinares a través del tejido adiposo mamario (63, 96) .

Las ratas suelen tener 6 pares de glándulas mamarias, tres de estos pares son torácicos, uno abdominal y dos inguinales, este complejo glandular mamario se presenta como una tira de tejido que se extiende desde el cuello hasta el ano en las ratas lactantes (4, 103-104). En la mayoría de los animales, incluyendo a los roedores, los pezones tienen un solo canal galactóforo que termina en una

cisterna, la cual se comunica al exterior a través de un canal terminal al final de la tetilla (17, 96).

La tetilla, la cual sirve como punto terminal de los ductos lactóforos, se encuentra rodeada de una areola de piel pigmentada, esta areola contiene glándulas sebáceas y sudoríparas. Las areolas sirven como punto terminal de la cuarta parte del nervio intercostal, el cual, al recibir un estímulo manda señales hacia la hipófisis posterior para iniciar la secreción de la oxitocina y a la hipófisis anterior para estimular la secreción de prolactina (17, 63).

1.2.2 Lactogénesis.

Durante el embarazo el complejo acinar donde la leche producida es almacenada, se incrementa en número y complejidad, así como las células que recubren los acines y los pequeños ductos lactóforos maduros. La secreción de leche se encuentra controlada por las elevadas concentraciones de hormonas esteroideas principalmente progesterona (63, 95). El incremento en la producción de leche ocurre del día 2 al 14 de lactancia, tres cuartas partes de este aumento es causado por un incremento en la proliferación celular y una cuarta parte por un incremento en la actividad celular (38). Al momento del parto, una serie de cambios hormonales , dispara la secreción de leche (63). La lactogénesis se puede definir como el inicio de una abundante secreción de leche y ocurre concomitantemente con el parto en la mayoría de las especies (9, 20).

En las ratas, la leche aparece en los ductos mamarios 4 horas antes de que nazca la primera cría (43) mientras que en la vaca la lactogénesis coincide con el parto (70). En el humano y en cuyos, la lactogénesis se presenta hasta el segundo o tercer día postparto (65).

Una vez que la lactancia ha comenzado, la secreción de la leche en los acines es continua (61). La eyección de la leche de los acines ocurre gracias a la contracción de las células mioepiteliales, en respuesta al incremento de los niveles plasmáticos de oxitocina ocasionados por la succión (63, 66, 95).

1. 2.3 Leche.

Las crías de la mayor parte de los mamíferos se desarrollan en la placenta y nacen bastante indefensas. Tras su nacimiento se nutren de leche que posee un elevado contenido calórico y un equilibrio de nutrientes que satisface las necesidades del recién nacido durante este periodo crítico de desarrollo, y les permite un crecimiento adecuado hasta que son capaces de ingerir alimento sólido. La característica que distingue a los mamíferos es la capacidad de producción y secreción de leche en la glándula mamaria para alimentar a su descendencia después del parto (63, 64). Durante el proceso de síntesis de leche el tejido mamario aumenta la síntesis de proteínas estructurales, catalíticas y de exportación y por lo tanto la captación de aminoácidos aumenta (105).

La leche es un fluido biológico de complejidad excepcional que contiene miles de componentes (66). La composición de la leche es especifica de especie y está constituida por proteínas específicas, lípidos diseñados para ser fácilmente

digeridos, lactosa, minerales, vitaminas y otros componentes (32). La leche no solo provee los nutrientes para el crecimiento físico del recién nacido, también contiene elementos de protección y defensa contra agentes patógenos (64, 66).

La concentración de proteínas en la leche es variable de especie a especie, mientras en el hombre es apenas de 1.0%, en la rata es de 8.4% y en el conejo alcanza casi el 9%. El contenido de lípidos también es mayor en la leche de la rata en comparación con la leche humana mientras que el contenido de lactosa es menor (111).

Aunque la composición de la leche varía de una especie a otra, los procesos bioquímicos involucrados en su síntesis son esencialmente los mismos en todos los mamíferos (66).

1.2.4 Mecanismos para la Síntesis y Secreción de Leche.

Una capa de células epiteliales cuboidales, separadas del espacio intersticial por una membrana basal, son las responsables de la elaboración de todos los componentes de la leche, excepto de los componentes derivados del sistema linfoide, los cuales presumiblemente entran a la leche pasando entre las células epiteliales mamarias (99).

La disponibilidad de sustratos para la glándula mamaria es un factor muy importante en la regulación de la velocidad de síntesis de leche. Una vez que los sustratos se encuentran dentro de las células secretoras de la glándula mamaria, los siguientes factores regulatorios son la actividad de enzimas que inician su metabolismo y de otras enzimas claves en las vías metabólicas relevantes para

que, finalmente sean extruídos a la luz acinar convertidos en otros productos (111).

Se han definido claramente cinco vías especificas que son utilizadas por el epitelio mamario para la síntesis y secreción de la leche. Estas vías operan paralelamente para la transformación de los precursores derivados de la sangre o de el fluido intersticial para la formación de la leche (63, 65).

Cuatro de estas vías secretoras están sincronizadas en las células epiteliales de la glándula mamaria: exocitosis, síntesis y secreción de lípidos, transporte a través de la membrana apical y la pinocitosis-exocitosis de proteínas extracelulares. La quinta vía, la vía paracelular, permite la transferencia directa de materiales entre el espacio intersticial hacia el espacio de la leche Cuantitativamente, la vía responsable de la mayoría del volumen de la leche es la exocitósis, la cual es responsable de la elaboración de la mayoría de los componentes de la fracción acuosa de la leche como las proteínas, lactosa, calcio, fosfatos y citratos (63).

1.2.4.1. *Síntesis y Secreción de Lípidos.*

Los lípidos, son la principal fuente de substratos energéticos en la leche, aportando alrededor de 500 Kcal/g en comparación con las 30-65 Kcal/g que proporcionan las proteínas y carbohidratos (31, 62). Mas del 98% de los lípidos de la leche son triacilgliceroles (61), otros lípidos de la leche son el colesterol, los fosfolípidos, las vitaminas A, E y K (63).

La proporción de ácidos grasos sintetizados en la glándula mamaria se encuentra altamente relacionada con la dieta Los ácidos grasos y el glicerol necesarios para la síntesis de los triacilgliceroles de la leche se derivan de la circulación y de la síntesis de novo dentro de la glándula mamaria (111).

Los ácidos grasos son sintetizados a partir de Acetil-CoA, por una serie de reacciones catalizadas por la Acetil CoA carboxilasa y la sintetasa de los ácidos grasos. La reacción requiere de ATP y de equivalentes reductores en forma de NADPH (61). En la mayoría de los animales no rumiantes la fuente principal de átomos de carbono para la síntesis de Acetil CoA es la glucosa, alrededor del 50-60% de la glucosa captada por la glándula es convertida a lípidos (111). El lactato. la leucina y la alanina pueden también ser usados como fuentes de átomos de carbono (35, 83). La síntesis de ác. grasos a partir de Acetil CoA puede resumirse de la siguiente manera:

$$\text{Acetil CoA} + CO_2 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Acetil CoA carboxilasa}} \text{Malonil CoA} + \text{ADP} + P_i$$

$$\text{Acetil CoA} + 7\ \text{Malonil} + 14\ \text{NADPH} + 14\ \text{H} \xrightarrow{\text{Ácido graso sintetasa}} \text{Ácido Palmítico (C16)} + 7\ CO_2 + 8\ \text{CoA} + 14\ \text{NADPH} + 6\ H_2O.$$

Más del 70% de los ácidos grasos sintetizados a partir de glucosa dentro de la glándula, son ácidos grasos de cadena media gracias a la presencia en la

glándula mamaria de una tioesterasa que termina prematuramente la elongación de la cadena hidrocarbonada (14, 48, 62).

Los lípidos de la leche que no son sintetizados dentro de la glándula mamaria provienen de la dieta, de las lipoproteinas sintetizadas por el hígado y de los ácidos grasos movilizados del tejido adiposo. Los lípidos de la dieta son transportados en la circulación en forma de quilomicrones, y son utilizados por las células de la glándula mamaria gracias a la presencia de la lipoproteina lipasa en la superficie del endotelio vascular. Esta enzima, remueve los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 de los triacilgliceroles liberando ácidos grasos libres y monoglicéridos. Los ác. grasos libres entran a través de difusión, del espacio sub endotelial al interior de la célula mamaria (61).

Los ácidos grasos sintetizados en el citoplasma celular son convertidos a triacilgliceroles en el sistema de Golgi después de lo cual coalescen en gotas de grasa que se dirigen hacia la membrana apical de la célula, en donde son envueltas en la membrana para posteriormente ser extruidas de la célula como un glóbulo de grasa de la leche (52, 63).

La membrana que rodea los glóbulos de grasa tiene como función proporcionar fosfolípidos y colesterol al recién nacido y prevenir la unión de los glóbulos de grasa (63).

1.2.4.2 *Síntesis de Proteínas en la Glándula Mamaria.*

Las proteínas constituyen más del 50% del peso seco de una célula, y forman parte de enzimas, proteínas estructurales, nutrientes, hormonas, agentes protectores, toxinas y otras. La mayoría de las proteínas contenidas en la leche, son sintetizadas por las células epiteliales en la glándula mamaria a partir de amino ácidos derivados del flujo sanguíneo (24).

Los ribosomas que se encuentran en el retículo endoplásmico rugoso sintetizan las proteínas, las cuales son transferidas al Aparato de Golgi para ser organizadas, empacadas dentro de vesículas secretoras y secretadas por exocitósis. (54).

La caseina es la principal proteína de la leche, se encuentra formando micelas con calcio y fosfato. Los grupos fosfato unidos por enlaces covalentes con las moléculas de caseina, unen también a través de un enlace iónico al calcio, este complejo formado se une a su vez a otra molécula de caseina fosforilada para formar partículas micelares. Las micelas de caseina funcionan como fuente de nutrientes para el recién nacido, aportando aminoácidos, calcio y fosfatos (24)

Las proteínas más abundantes en el suero de la leche son la β-Lactoglobulina y la α-Lactoalbumina. La β-Lactoglobulina constituye aproximadamente el 50% del total de las proteínas contenidas en el suero de la leche mientras que la α-Lactoalbumina representa aproximadamente el 25% del total de las proteínas Esta última además de su papel nutricional consitituye la proteína "B" del complejo enzimático de la lactosa sintetasa (24)

Algunas otras proteínas menos abundantes en el suero de la leche son la albúmina sérica, las inmunoglobulinas, la lactoferrina, la lactoperoxidasa y la β2-Microglobulina. La albúmina es una proteína del suero y no es sintetizada por la glándula mamaria, presumiblemente entra a la leche por pinocitosis-exocitosis, se incrementa durante la mastitis y la involución de la glándula mamaria Su función es desconocida. (24)

Las Inmunoglobulinas que incluyen la IgG 1 y 2, la IgA y la IgM se encuentran en muy altas concentraciones en el calostro y le confieren inmunidad pasiva al neonato La lactoferrina es una proteína que une hierro y tiene propiedades bacteriostáticas, se encuentra relativamente en bajas concentraciones durante la lactancia pero se incrementa durante la mastitis e involución de la glándula. La lactoferrina tal vez es un inmunomodulador, constituye la mayor fuente de resistencia contra enfermedades no especificas La lactoperoxidasa tiene propiedades antibacteriales (24)

Las proteínas pueden atravesar el epitelio mamario intactas, desde el fluido intersticial por transporte a través de la membrana apical o por la vía paracelular (63). Algunos componentes como las inmunoglobulinas (101), se unen a un receptor en la membrana basal de la célula, el complejo Inmunoglobulina-receptor es endocitado completo dentro de una envoltura y transferido a través de la célula para ser secretado en el lado apical de la célula (24, 66). Esta vía es probablemente responsable de la secreción de hormonas peptídicas en la leche

como la prolactina y la insulina, otras proteínas plasmáticas tal vez entran en la leche por la misma vía (66)

La captación de amino ácidos por la glándula mamaria para su metabolismo posterior depende de la concentración arterial de amino ácidos, de la velocidad del flujo sanguíneo hacia el tejido y de un efectivo sistema de transporte, el cual los pueda transferir a través de la membrana basal hacia el interior de la célula (24). Los amino ácidos, una vez dentro de las células pueden someterse a una polimerización directa por el RNAm en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso para formar las proteínas de la leche, participar en reacciones metabólicas para producir CO_2, urea, poliaminas y amino ácidos no esenciales. Pueden ser retenidos como parte estructural o como parte del mecanismo enzimático de las células(24).

1.2.4.3 *Secreción de iones.*

La membrana apical de la célula es permeable para un número limitado de iones y otros componentes incluyendo al agua, sodio, potasio, cloruros y glucosa (69). La concentración de estos componentes es característico de cada especie El mecanismo involucrado en la regulación de la concentración de iones monovalentes es actualmente desconocido (63).

1.2.4.4 *Vía Paracelular.*

La vía paracelular permite la trasferencia de sustancias entre las células epiteliales (63). El paso de substancias a través de los espacios entre las células acinares, normalmente es impedido por las firmes uniones intracelulares de células acinares adyacentes. Durante el embarazo y también durante la mastitis e involución del seno, estos empalmes disminuyen la fuerza de su unión. permitiendo que los constituyentes del plasma pasen directamente a la leche Bajo estas condiciones, la secreción láctea contiene una elevada concentración de sodio, cloruros y una baja concentración de lactosa, potasio y calcio (60, 72-73).

1.2.4.5 *Síntesis de Lactosa en la Glándula Mamaria.*

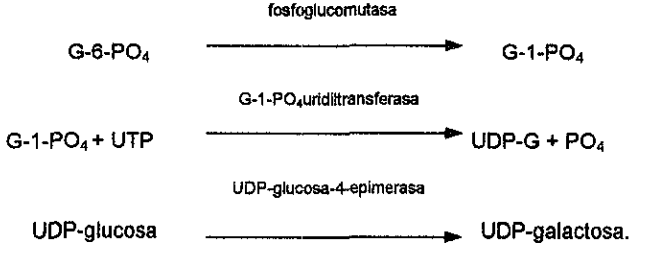
La lactosa es el principal carbohidrato de la leche, es sintetizada dentro del sistema de vesículas secretoras de Golgi en las células alveolares mamarias. La galactosiltransferasa, unida a las vesículas de Golgi, junto con la proteína soluble α-lactoalbumina actúan para sintetizar la lactosa. La unión de la proteína reguladora (alfa-lactoalbúmina) a la galactosil trasferasa, incrementa la afinidad de la enzima por la glucosa (61).

Debido a que la membrana del Aparato de Golgi es impermeable a la lactosa, y que este disacárido es osmóticamente activo, el agua se desplaza hacia adentro de los espacios de las vesículas de Golgi. En la mayoría de los mamíferos la

velocidad de síntesis de la lactosa sirve como control principal del volumen de la leche producida (61).

En la glándula mamaria de los no rumiantes, la glucosa sirve como el sustrato principal para la síntesis de lactosa y para la síntesis de lípidos (61).

La glucosa que entra a la célula va directamente al aparato de Golgi, donde es combinada con UDP-galactosa para formar lactosa. El resto, es convertida a Glucosa-6-fosfato por la hexosa cinasa. Tres pasos son necesarios para la conversión de la G-6-PO_4 hacia UDP-galactosa (61). Esta reacción reversible es catalizada primero por la fosfoglucomutasa que contiene un resto de serina que es esencial para esta actividad, el grupo hidroxilo de la serina se esterifica con ácido fosfórico, que pasa desde la posición 6 a la posición 1 de la glucosa, El segundo paso, la reacción reversible, se encuentra regulada por la glucosa-1-PO_4 uridiltransferasa que convierte la glucosa-1-fosfato más trifosfato de uridina que es el dador inmediato de fosfatos y por lo tanto de energía, en uridin-difosfo-glucosa. Por la conversión reversible de la UDP-glucosa en UDP-galactosa se produce por epimerización enzimática de la UDP-glucosa en el carbono 4 del resto de la glucosa por la acción de la UDP-glucosa-4-epimerasa (46) .



La síntesis de lactosa es activada por iones metálicos, los cuales se unen a dos sitios de la galactosil transferasa. El magnesio se une al sitio I, su función es estabilizar la conformación activa de la enzima (78). El calcio probablemente se una al segundo sitio formando un puente entre la enzima y el sustrato. Al final la α-lactoalbumina y la glucosa, junto con el complejo enzimatico-UDP galactosa interactuan para forman la lactosa. Se ha sugerido que la concentración de α-lactoalbumina, calcio y glucosa en las vesículas secretoras de Golgi tal vez regula la síntesis de lactosa (61, 110).

2. ANTECEDENTES.

Uno de los principales problemas de salud pública en los países en desarrollo es la presencia de un deficiente grado de nutrición que está relacionado con la elevada incidencia de mortalidad prenatal y crecimiento atrofiado (109). Las dietas en estos países son típicamente marginales en energía, pero la importancia de la deficiencia en proteína, tanto en cantidad como en calidad no debe ser ignorado (30, 98).

2.1 RESTRICCIÓN ENERGÉTICO-PROTEICA.

2.1.1 Efecto sobre las crías.

Estudios realizados en varias especies de mamíferos han mostrado que la restricción energética impuesta durante el embarazo, tiene efectos deletéreos sobre el compartimento materno y en mayor proporción sobre las crías (86).

La restricción en el consumo de alimento de la rata madre durante el embarazo, del 25% al 50% de la ingesta habitual del animal, conduce a la reducción en el crecimiento de los fetos que se refleja en un menor peso de la cría al nacimiento. Las crías pueden pesar al nacimiento 25% o hasta 50% menos que las crías del grupo alimentado normalmente (3, 6, 115).

La reducción en el consumo energético durante el embarazo no solo disminuye el crecimiento de los fetos sino que puede disminuir el número de células por órgano y aumentar la mortalidad fetal (86, 112, 116).

La restricción energético-proteica durante el período de la lactancia entre el 25% al 63% del consumo habitual de los animales o crónicamente impuesta durante el periodo de embarazo y lactancia, repercute en una menor ganancia posnatal de peso en las crías en los grupos restringidos con valores que van del 87 al 22% de los mostrados por las crías del grupo control. Los estudios disponibles en esta área han mostrado que el impacto negativo en el crecimiento de las crías es mayor al aumentar el grado de restricción o la duración de la misma (89, 102, 113-114) .

2.1.2 Efecto sobre producción y composición de leche.

El desarrollo de la lactancia en la rata evaluado a través de la composición y producción láctea puede verse comprometido por la restricción en el consumo de alimento de la rata madre durante el embarazo, la lactancia o durante estas dos etapas (12,13, 28, 37, 42, 79-80, 89-94, 108, 113).

Algunos investigadores han mostrado que la restricción del alimento a la rata madre durante el embarazo y la lactancia en valores que van del 50 al 75% del consumo a libre demanda, ocasiona la disminución del 10 al 50% en el volumen de leche producido (37,89,108,113).

Los cambios en la composición de la leche ocasionados por la restricción de alimento a la rata madre no son tan claros. Algunos autores han mostrado que la concentración de proteínas y de lípidos en la leche no se modifican por la restricción de alimento, sin embargo se ha observado la disminución en la concentración de lactosa, lo que reduce la densidad energética de la leche producida por el grupo restringido (37, 89, 113). Algunos otros investigadores han mostrado un aumento en la concentración de proteínas en la leche en ratas restringidas al 50% durante el embarazo y la lactancia o solo durante la lactancia (37, 80, 89), mientras que otros no han encontrado cambios en la composición láctea por efecto de la restricción de alimento (7, 12, 82, 102).

2.2 RESTRICCIÓN PROTEICA.

2.2.1 Efecto sobre el desarrollo fetal, crecimiento de las crías y ganancia de peso de la camada.

La reducción en el consumo de proteínas durante el embarazo reduce la velocidad de crecimiento del feto e incrementa la mortalidad fetal en todos los mamíferos estudiados. El efecto deletéreo de la restricción proteica materna en el crecimiento del feto es notable alrededor del día 12 de embarazo y llega a ser más severo durante la ultima semana de gestación (86).

En estudios realizados en ratas alimentadas con una dieta con el 4 al 6% de caseina durante el embarazo, se observó que el peso de los fetos era del 20 al 40 % menor que el de los fetos de un grupo control con 20% de caseina (3, 6, 21, 45, 51, 115). En el cerdo, la deficiencia de proteínas durante el embarazo causa un déficit del 33% en el peso al nacimiento de las crías (77). En los monos rhesus alimentados durante la gestación con una dieta que contiene solamente el 25% del contenido de proteínas de la dieta del grupo control, se observó una reducción del 15% en el peso corporal de los neonatos (41). En otros estudios con monos a los que se les proporcionó 1, 2 o 4 g de proteína /kg /día durante el embarazo, se observó que la restricción proteica ocasionó un elevado índice de pérdidas fetales por aborto, de nacimientos prematuros y mortalidad perinatal (41, 81).

Estudios en cuyos han mostrado que la restricción de proteínas a partir de la segunda mitad del embarazo produce un incremento significativo en la mortalidad fetal y una perdida del 25% en el peso de las crías al nacimiento (114).

La restriccion en la ingesta de proteína en la última semana del embarazo causa un disminución de menor magnitud en el peso corporal de las crías al nacimiento que cuando la restricción se establece desde el inicio de la gestación (57, 59). La reducción en el crecimiento del feto ocasionado por la restricción de proteínas se ha relacionado con la reducción en el número de células en varios órganos (112, 116).

Las ratas alimentadas con una dieta con un bajo contenido de proteína muestran un menor flujo de nutrientes desde la circulación materna hacia el feto, en relación

a los valores mostrados por las ratas control (45, 51). Por ejemplo, la transferencia del ácido α-amino isobutírico de la sangre materna al feto es menor en ratas alimentadas con una dieta con 6% de caseina durante el embarazo en comparación con las ratas alimentadas con la dieta con 27% de caseina (87- 88).

La ganancia de peso posnatal de las crías también se ve comprometido si se somete a la madre durante la etapa de lactancia a una restricción de proteínas. Estudios recientes han mostrado que las crías de las ratas alimentadas con una dieta con 9 al 10% de caseina durante la lactancia tienen una ganancia de peso del 20 al 94% menor que la que presentan las crías de un grupo control con un adecuado aporte de proteínas (15, 74-76).

No solo la restricción de proteína afecta negativamente el crecimiento de las crías, el tipo de proteína también es un factor determinante en este fenómeno Las crías de ratas alimentadas durante la lactancia con una dieta con 25% de gluten de trigo tienen un peso corporal menor al destete en comparación con el grupo alimentado con la dieta de gluten de trigo suplementada con lisina y treonina (15, 27, 44).

2.2.2 Efecto de la restricción proteica sobre la composición y producción de la leche.

Se ha observado que el efecto primario de la deficiencia de proteína en la dieta durante la lactancia es la reducción del 12 al 35% en el volumen de la leche (12, 58, 74-76, 84, 92). La composición láctea también se afecta, se ha mostrado una

reducción en el contenido de nitrógeno de un 22%, una disminución en la concentración de proteínas hasta en un 20% y un incremento del 20 al 30% en la concentración de lípidos en la leche en ratas alimentadas con dietas bajas en proteínas e isoenergéticas con relación al grupo control (7, 15, 74-76, 91).

La influencia de la calidad de la proteína sobre la producción de leche ha sido estudiada en ratas alimentadas con una dieta con proteína de trigo con proteína de trigo suplementada con lisina y treonina. La producción de leche en las ratas alimentadas con gluten más aminoácidos fue 53% menor en comparación a el grupo de caseina pero 36% mayor en comparación con el grupo no suplementado (29, 91-92, 94).

Algunos estudios sugieren que la restricción proteica y/o energética durante el embarazo y la lactancia disminuyen el rendimiento en la producción de leche en las ratas por un decremento en la proliferación celular y en la masa activa de la glándula mamaria (91).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La restricción proteínica durante el periodo de lactancia, disminuye la concentración de proteínas en la leche de las ratas lactantes y en consecuencia disminuye en gran magnitud el crecimiento de las crías.

Se desconocen los efectos sobre la composición y producción láctea y su repercusión sobre el crecimiento de las crías de la restricción de proteínas en la dieta de la rata madre desde antes del embarazo y hasta la lactancia.

4. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Comparar la composición y la producción láctea en ratas alimentadas con dietas purificadas isoenérgeticas con niveles contrastantes de proteína, desde antes del embarazo y hasta la lactancia para ver el efecto que tiene la restricción proteica de la dieta.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

4.2.1 Comparar el consumo de alimento y el peso corporal de la rata madre al proporcionar durante el periodo de adaptación, embarazo y lactancia, dietas isoenérgeticas con diferentes niveles de proteína para establecer los efectos de la dieta.

4.2.2 Comparar el número, peso de las crías al nacimiento y su crecimiento durante las 2 primeras semanas de vida de las crías de ratas alimentadas con dietas con niveles contrastantes de proteína durante el embarazo y la lactancia, con la finalidad de conocer los efectos que causa la restricción de proteínas.

4.2.3 Comparar la concentración de proteínas, lípidos, lactosa y ácidos grasos de la leche producida por ratas alimentadas crónicamente con una dieta baja en proteína, con las alimentadas con la dieta con contenido normal en proteína para establecer las diferencias.

4.2.4 Comparar el volumen y la producción en 24 horas, de los principales macronutrimentos en la leche de ratas alimentadas crónicamente con dietas isoenérgeticas con niveles contrastantes de proteína, con la finalidad de establecer los niveles de producción láctea en relación al tipo de dieta.

5. HIPÓTESIS

5.1 Las ratas alimentadas con la dieta con bajo contenido de proteínas disminuirán su peso corporal y aumentarán su ingesta total de alimento durante la lactancia en comparación con las ratas alimentadas con la dieta con contenido normal de proteína.

5.2 El número, el peso al nacimiento y el crecimiento durante la lactancia de las crías, de las ratas con restricción proteinica, es inferior en comparación con las ratas alimentadas con la dieta normal en proteínas.

5.3 El contenido de proteínas y lactosa será menor y el de lípidos mayor en la leche de ratas con restricción proteínica en comparación con la leche de ratas alimentadas con la dieta normal en proteínas.

5.4 La producción de leche en las ratas con restricción crónica de proteínas, es menor en comparación con la producción de leche de las ratas que recibieron una dieta normal en proteínas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley alimentadas a libre demanda con un alimento comercial (Laboratory Rodent Diet, PMI Feeds Inc, St Louis MO, USA) hasta las 14 semanas de edad. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz obscuridad de 12h. En esta edad, las ratas cuyo peso corporal se encontró entre 260 y 280g fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos experimentales.

Al primer grupo recibió una dieta purificada con 18% de proteinas que corresponde al contenido habitual de proteínas en la dieta de la rata (dieta NP), el segundo grupo recibió una dieta con un 11% de proteína que representa una dieta con un bajo contenido de proteínas en relación a la dieta habitual de la rata (dieta BP). Las dietas se diseñaron para tener la misma densidad energética (Tabla 1).

A la semana 16 de edad, las ratas con un peso corporal entre 260 y 280 g, se aparearon con machos de la misma especie. Mediante una citología vaginal, se determinó el primer dia de gestación y en ese día las ratas preñadas se transfirieron a jaulas individuales, respetando su grupo de alimentación.

Los animales consumieron alimento y bebieron agua a libre demanda durante todo el periodo de la gestación. El día del parto, que se consideró como el primer dia de lactancia, se ajustó la camada de cada rata a ocho crías.

Tabla 1. Composición de las dietas con contenido normal (NP) y bajo en proteína (BP). Los valores se muestran en gramos por kg de mezcla.

Ingredientes	Dieta NP	Dieta BP
	g/kg	
Caseina[3]	200	123.06
Glucosa	346.75	375.25
Almidón de maíz	346.75	375.25
Aceite de maíz	25.3	33.7
Celulosa[5, 6]	37.8	37.8
Metionina[4, 6]	3.0	3.0
Mezcla de minerales[1, 6]	26.1	26.1
Mezcla de vitaminas[2, 6]	10	10

[1] Mezcla de minerales, contenido por kg de mezcla: molibdato de amonio 0.025g, carbonato de calcio 292.9g, fósfato de calcio 4 9g, súlfato cúprico 1.56g, cítrato férrico 6.23g, súlfato de magnesio 99 8g, súlfato de manganeso 1.21g, yoduro de potasio 0.005g, fósfato de potasio 343 1g, cloruro de sodio 250.6g, selenito de sodio 0.015g, cloruro de zinc 0 2g

[2] Mezcla de vitaminas, contenido por kg de mezcla: ácido p-aminobenzoico 11 01g, ácido ascórbico 101.66g, biotina 0.044g, cianocobalamina 2.97g, pantotenato de calcio 6 61g, citrato de colina 349.69g, ácido fólico 0 20g, inositol 11 01g, menadiona 4.95g, niacina 9.91g, piridoxina Hcl 2.20g, riboflavina 2.20g, tiamina HCl 2.20g, palmitato de retinol anhidro 3.96g, ergocalciferol anhidro 0.44g, DL-α-acetato tocoferol anhidro 24 23g, almidón de maíz 466.67g.

[3] Caseinato de calcio; Biotecnología y Nutrición, contenido por 100g: proteínas 86-90g, minerales 3-8g, grasa 0-2g, humedad 0-6 2g

[4] DL- Metionina, aproximadamente 99.5%; SIGMA, St. Louis, USA.

[5] α-Celulosa; SIGMA ALDRICH CHEMIE, Steinheim, Germany.

[6] La proporción de energía/nutrimento fue similar en ambas dietas.

6.2 CITOLOGÍA VAGINAL.

A las ratas hembras se les depositó alrededor de 0.2 ml de solución salina al 0.85% en el orificio vaginal con una micropipeta de plástico y se recuperó, inmediatamente después, con la misma pipeta la mayor cantidad de la solución salina de la vagina de la rata. La solución se depositó en un portaobjetos debidamente etiquetados y se observó la preparación en el microscopio de luz con un objetivo de 10x. La citológia vaginal se consideró positiva al observar en la preparación la presencia de espermatozoides y la rata se transfirió a una jaula individual respetando el grupo de alimentación al que se había asignado.

6.3 REGISTRO DEL CONSUMO DE ALIMENTO.

A partir del primer día de adaptación y hasta el día 14 de lactancia se registró el consumo de alimento de la rata madre. Los animales recibieron diariamente 200 g del alimento correspondiente a su grupo de alimentación, al dia siguiente se recolectó el alimento residual y se pesó. El consumo de alimento se calculó como la diferencia entre el alimento colocado y el residual.

6.4 REGISTRO DEL PESO CORPORAL DE LA RATA MADRE Y DE LAS CRÍAS.

A partir del primer día de adaptación y hasta el día 12 a 14 de lactancia se registró el peso corporal de la rata madre con una báscula electrónica OHAUS con una sensibilidad de 0.01 g.

El día del parto, se registró el número y el peso corporal de todas las crías de cada camada con una báscula electrónica OHAUS con una sensibilidad de 0.01 g, posteriormente la camada se ajustó a 8 crías por rata. El peso de las crías se registró durante la lactancia en el momento en el que se llevó a cabo el registro del peso corporal de la rata madre.

6.5 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LECHE.

Se determinó la producción de leche en las ratas lactantes de los dos grupos experimentales determinando la trasferencia de agua tritiada de la rata madre a las crías por el método descrito por Godbole (16) y modificado por Warman (108). Del día 12 al 14 de lactancia, la rata madre recibió por vía intraperitoneal 1mCi de agua tritiada, una hora después, se tomó una muestra de sangre de la cola de la rata bajo anestesia con éter. La sangre se centrifugó y se colocarón 10 μl de plasma en un frasco vial con 10 ml de liquido de centelleo INSTA-GEL (Packard). La radiactividad presente en el plasma se determinó con un contador líquido de centelleo (Beckman LS 600 LL). A la rata madre se le dió a beber agua con la misma actividad presente en el plasma, para mantener los niveles circulantes del

radioisótopo constantes durante 24 horas. El día siguiente a la administración del agua tritiada, se obtuvo sangre de la cola de la rata madre y de las 8 crías bajo anestesia con éter. La sangre se centrifugó, y se determinó la actividad específica del isótopo en el plasma de la madre y de las crías .

La producción de leche se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$Fm = \ln \left[\left(\frac{SAp}{SAd} \times \frac{TW}{Lw} \right) + 1 \right] \frac{V}{TW}$$

Donde:

SAp = Actividad específica en la sangre de las crías.

SAd = Actividad específica en la sangre de la madre.

LW = Contenido de agua en la leche.

TW = Agua total a partir de leche = Lw + Mw

Mw = Agua metabólica

Fm = Ingesta diaria de leche de la cría.

V = Agua corporal total de la cría.

El agua metabólica se refiere al agua que puede obtener un individuo después de la oxidación completa de los macronutrimentos de la dieta. El agua metabólica se calculó utilizando los resultados de composición de la leche de las ratas y los factores de agua metabolica reportados para los principales macronutrimentos y calculados en roedores del desierto (97). Los valores de producción de leche en 24 horas, junto con los datos de composición láctea se utilizaron para calcular la producción en 24 horas de proteínas, lípidos y lactosa.

6.6 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LECHE.

La leche se obtuvo de los mismos animales que se utilizaron para la determinación de producción de leche, todos los animales se ordeñaron a la misma hora del día independientemente del tipo de dieta a la cual correspondía el animal. Las ratas sólo se ordeñaron una vez para evitar cambios en la composición de la leche (36).

Veinticuatro horas después de la administración del agua tritiada a la rata madre y después de la toma de sangre, se retiraron a las crias de la rata madre durante 4h antes de la ordeña. La rata madre recibió 4 UI de oxitocina intraperitonealmente, 5 minutos después se anestesió a la rata con pentobarbital sódico (35 mg/kg de peso) administrado intraperitonealmente. La ordeña se realizó de forma manual cuando la rata se encontraba en la etapa de anestesia. La leche de una misma rata se mezcló y se congeló a -20° C hasta su análisis.

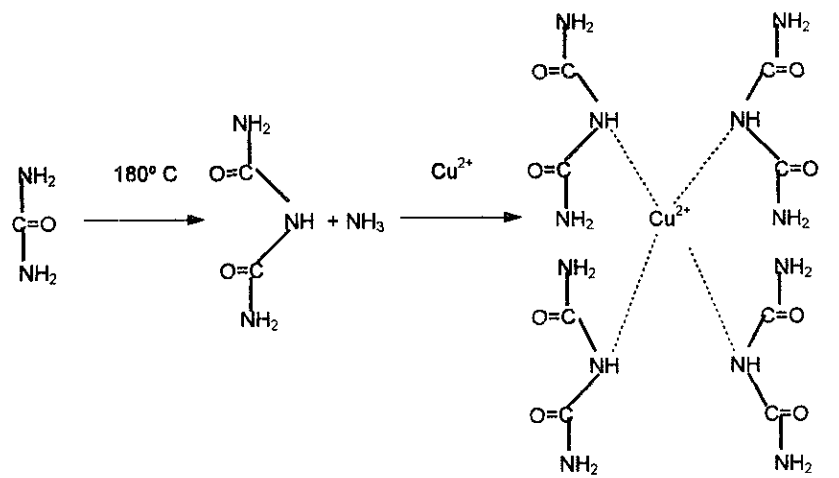
6.7 COMPOSICIÓN DE LECHE.

Se determinó la concentración de proteínas, lípidos, lactosa y ácidos grasos en la leche de las ratas lactantes en los dos grupos experimentales.

6.7.1 Determinación de Proteínas.

La concentración de proteínas en la leche se determinó por el método de Lowry (50). El método utiliza el reactivo de Biuret complementado con reactivo de fenol Ciocalteu. En la formación del color intervienen dos reacciones:

(a)La reacción inicial es la interacción de la proteína y los iones Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La reacción de Biuret se basa en que al calentar la urea a una temperatura de unos 180° C, se descompone transformándose en un producto llamado biuret, el cual, en presencia de iones Cu^{2+}, en solución alcalina, forma un complejo de color violeta. La reacción tiene lugar como sigue:



Urea Biuret Complejo Cu

Esta reacción colorida la dan sustancias que contengan dos $-CONH_2$, $-CH_2NH_2$, $-C(NH)(NH_2)$, o $-CSNH_2$, unidos, sea directamente entre sí, sea a través de un

átomo de carbono o nitrógeno y estructuras peptídicas que contengan, como mínimo, dos enlaces peptídicos.

(b) La segunda reacción se utiliza para obtener una mayor sensibilidad. Se utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu (reactivo de fenol). La reducción de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolíbdico presentes en el reactivo, a azul de molibdeno y azul de tungsteno respectivamente, forma un complejo de color azul obscuro. La reducción de los ácidos se lleva a cabo por la acción del complejo de cobre proteína y a la presencia de compuestos fenólicos tales como la tirosina, triptófano y la histidina contenidos en la proteína. Estos últimos aminoácidos también dan color en ausencia de Cu^{2+}, en tanto que el resto de la proteína no da color sino existen esos iones en el medio. Aproximadamente el 75% del color que se forma depende de la prescencia de Cu^{2+} (5)

Para la determinación de proteinas se prepararon las siguientes soluciones:

* Solución A:	Carbonato de Sodio Anhidro	.....	100 g
	Tartrato de Na y K	.....	2 g
	Hidroxido de Sodio 1N	.....	500 ml
	Agua Destilada c.b.p.	.....	1000 ml
* Solución B:	Tartrato de Na y K	.....	2 g
	Sulfato de Cobre . $5H_2O$	.....	1 g
	Hidroxido de Sodio 1N	.....	10 ml
	Agua Destilada c.b.p.	.....	100 ml
* Solución C:	Reactivo Folin Ciocalteus	.....	1 vol.
	Agua Destilada	.....	15 vol.

* Solución estándar de albúminasérica bovina (SIGMA), con una concentración de 100 µg/ml.
* Solución problema (leche de rata con una dilución 1:100).

6.7.1.1 *Curva Patrón.*

La curva patrón se preparó adicionando en tubos de ensaye 0, 100, 200, 400. 600, 800 y 1000 µl de la solución estándar de albúmina sérica bovina (100 µg/ml), para obtener una curva estándar con 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg de albúmina por ml. Posteriormente, se adicionó agua destilada hasta completar un volumen final de 1 ml. A todos los tubos se les adicionaron 0.9 ml de la solución A , se agitaron y se incubaron durante 10 minutos a 50°C y durante 5 minutos a 4°C Después, se agregaron 0.1 ml de la solución B y se dejaron reposar los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por ultimo, se agregaron 3 0 ml de la solución C y se incubaron los tubos durante 10 minutos a 50°C y se dejaron enfriar. Las absorbancias de las diferentes concentraciones de albúmina se leyeron antes de 30 minutos en un espectrofotómetro (Philips PU 8720 UV/VIS) a 740 nm.

6.7.1.2 *Determinación de la concentración de proteínas en leche.*

La muestra de leche (congelada a -20°C) se descongeló en un baño Maria a 37°C y se homogeneizó por agitación antes de tomar la alicuota. La concentración de proteinas se determinó en 50µl de leche por el procedimiento descrito para la solución de albúmina bovina. Se calculó la concentración de la solución problema por interpolación en la curva de calibración.

6.7.2 Determinación de Lípidos.

La concentración de lípidos en la leche de rata se determinó por gravimetría después de extraer los lípidos de la leche por el método de Folch & Stanley (10) En un un tubo cónico, se agregaron 300 µl de leche, 3.4 ml de una solución de cloroformo-metanol (2:1) y 1.2 ml de una solución de cloruro de sodio al 0.7%. La mezcla se agitó en Vortex durante 5 min. A continuación, la mezcla se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada. La fase de Cloroformo fué transferida a un tubo cónico a peso constante y se evaporó a temperatura ambiente en una campana extractora. El tubo y la fase lipídica se pesó y el porcentaje de lípidos en la leche se determinó por diferencia de pesos.

6.7.3 Determinación de Lactosa.

El contenido de lactosa se determinó cuantificando la concentración de glucosa por el método de glucosa oxidasa, hidrolizando previamente la lactosa de la leche con β-galactosidasa (33).

La muestra de leche (congelada a -20°C) se descongeló en un baño María a 37°C y se homogeneizó por agitación antes de tomar la alicuota. La hidrólisis de la lactosa de las muestras de leche de rata y del estándar de lactosa (concentración de 40 mg/ml) se realizó por triplicado colocando 50µl de leche y de la solución estándar de lactosa en tubos de ensaye, más 5µl de la enzima β-D-Galactosidasa y 45 µl de agua destilada. La mezcla se incubó por 4 horas a 38 °C y posteriormente se aforó a 1 ml con agua destilada.

La determinación de glucos se basa en la oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno formado, reacciona bajo la influencia de la enzima peroxidasa (POD) con fenol y 4-aminoantípirina para formar un complejo rojo violeta de quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa.

$$\text{Glucosa} + O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Ácido Glucónico} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Aminoantipirina} + \text{p-HBS} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Complejo quinona.}$$

Para determinar la cantidad de glucosa de las muestras se construyó una curva de calibración de glucosa, preparando una solución estándar de glucosa a una concentración de 200 mg/dl. A partir de esta se obtuvieron las soluciones de 150, 100 y 50 mg/dl por medio de una dilución seriada. En una serie de tubos 15µl de las soluciones estándar de glucosa de 200, 150, 100 y 50 mg/dl por triplicado, a continuación se les agregó 1.5 ml del reactivo de Glucosa Trinder STANBIO (el reactivo constituido contiene: 4-aminoantipirina 0.38 mmol/L; fenol 0.75 mmol/L; glucosa oxidasa 15 0 U/mL; peroxidasa 1.5 U/mL y mutaratosa 2.0 U/mL) y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos en la obscuridad y se leyó la absorbancia a 500nm en un espectrofotómetro (Philips PU 8720 UV/VIS).

La concentración de lactosa de la muestra de leche y del estándar de lactosa se determinó en 15µl del hidrolizado por el procedimiento descrito para las soluciones estándar de glucosa. Se calculó la concentración de la solución problema por interpolación en la curva de calibración.

6.7.4 Determinación de la composición de los ácidos grasos en los lípidos de la leche.

La composición de ácidos grasos de los triacilgliceroles contenidos en la leche, se determinó mediante la separación de estos por cromatografía de gases utilizando estándares de referencia para identificar los tiempos de retención. Los lípidos se transesterificaron con metanol y se identificáron como ésteres metílicos (18). Se colocaron 30 mg de lípidos en un frasco vial y 0.75 ml de la mezcla de reacción (CH_3OH-$CHCl_3$-H_2SO_4, 100:100:1) y se dejó durante 48h en la obscuridad y a temperatura ambiente. Se utilizó ácido margárico como estándar interno Una vez transcurridas las 24h se agregó una pisca de zinc y se evaporó el solvente a sequedad en baño de agua. Al enfriarse la mezcla se adicionó 1ml de agua destilada y un 1ml de hexano, y se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. La fase de hexano se separó y secó con Na SO_4 anhidro. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos de la leche se analizaron en 0,2µl de la fase de hexano en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 serie II) con una columna capilar de 100m con CP-Sil 88% como fase estacionaria. Se programaron dos rampas de temperatura para separar a todos los ácidos grasos.

6.8 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD EN LECHE.

La cantidad de agua de la leche se determinó por gravimetria En frascos viales a peso constante se colocaron 200 µl de leche y se evaporo el agua de la muestra en una estufa a 80° C por 24 horas. Se registró el peso de la muestra antes y después de su desecación, el contenido de agua se determinó por diferencia.

6.9 DETERMINACIÓN DEL AGUA CORPORAL DE LAS CRÍAS.

La cantidad de agua corporal de las crías se determinó por gravimetria. Las crías se sacrificaron con éter y se licuaron con 100 ml de agua destilada. El licuado se colocó en una charola previamente pesada, y se llevó a sequedad en un horno a 120°C por varios días hasta que el peso se conservó constante. El contenido de humedad se determinó por diferencia.

6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se expresaron como promedios ± desviación estándar. Las series longitudinales de datos (crecimiento de las crías, consumo de alimento y peso materno) se analizaron con una prueba de ANOVA para mediciones repetidas. Los datos de composición y producción láctea se compararon con una prueba de t de Student.

7. RESULTADOS.

7.1 CONSUMO DE ALIMENTO DE LA RATA MADRE.

La Figura 1 muestra el consumo de alimento en las ratas de los grupos NP y BP. Ninguno de los grupos incrementó notoriamente su consumo de alimento durante el periodo de embarazo. El consumo de alimento disminuyó en los días cercanos al parto. No se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento durante la etapa de embarazo entre los grupos de estudio. A partir del primer día de lactancia la ingesta de alimento se incrementó gradualmente en los dos grupos de dieta. No se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento entre el grupo BP y NP a lo largo del periodo de lactancia, aunque al obtener los valores del consumo total de alimento del día 1 al 14 de lactancia estos fueron 9.5% menores para el grupo BP con relación al grupo NP.

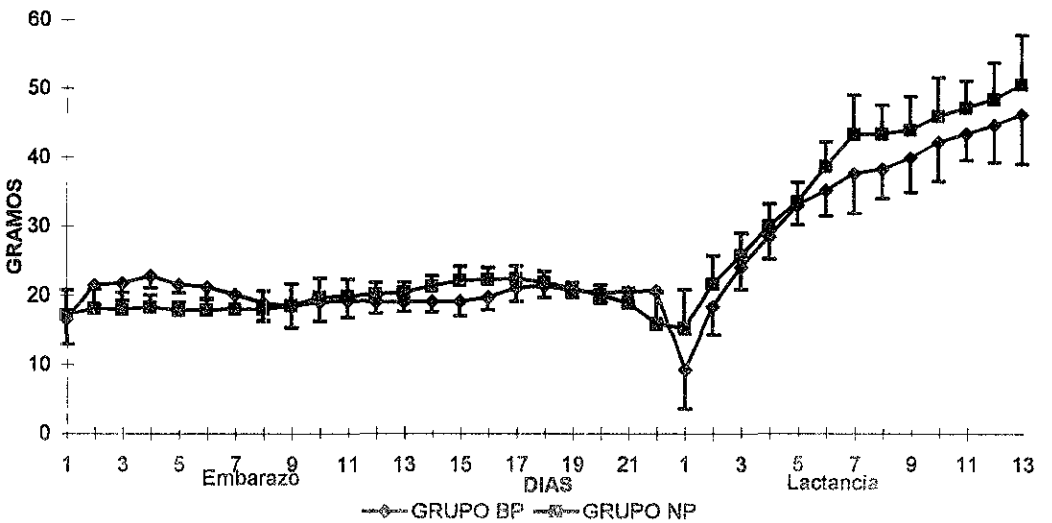


Figura 1. Consumo de alimento de la rata madre durante el embarazo y la lactancia, con una dieta que contiene 18% (NP) y 11% (BP) de proteína. Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar con 9 animales en cada grupo.

7.2 CONSUMO DE PROTEÍNAS DE LA RATA MADRE.

La Figura 2 muestra el consumo de proteínas durante el embarazo y la lactancia en las ratas de los dos grupos de dieta. El consumo de proteínas fué menor para el grupo BP debido a la restricción en la cantidad de proteina impuesta desde la preparación de la dieta. La diferencia en el consumo de proteína entre los grupos se acentúa más durante la lactancia debido a las pequeñas diferencias en el consumo de alimento que existen entre los grupos (ver Figura 1). Por lo tanto el consumo total de proteína del día 1 al 14 de lactancia fue 44% menor para el grupo BP con relación al grupo NP.

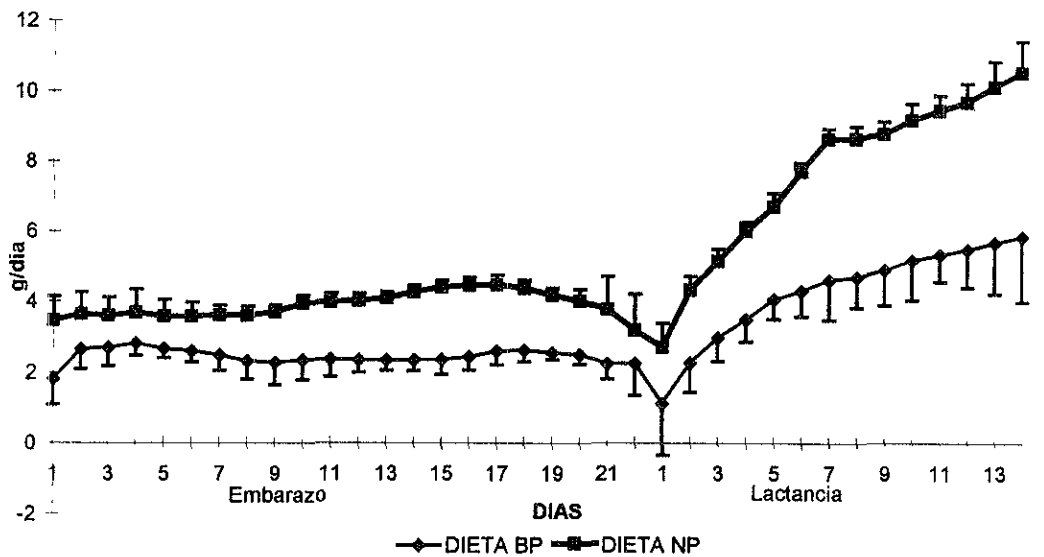


Figura 2. Consumo de proteína de la rata madre durante el embarazo y la lactancia con una dieta que contiene 18% (NP) y 11% (BP) de proteína. Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar con 9 animales en cada grupo. El cosumo total de proteína del día 1 al 14 de lactancia fue significativamente menor para el grupo BP $p<0.05$.

7.3 PESO CORPORAL DE LA RATA MADRE.

En la Figura 3 se muestra el peso corporal de la rata madre durante el embarazo y hasta el día 14 de lactancia de las ratas alimentadas crónicamente con una dieta que contiene 18% (NP) y 11%(BP) de proteína. El peso corporal al primer día de embarazo fué similar entre los grupos y fué incrementando gradualmente durante el transcurso de esta etapa. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en el peso corporal de las madres durante el embarazo. A partir del primer día de lactancia (día del parto), las ratas madre diminuyeron su peso corporal. No se encontraron diferencias significativas en el peso corporal de las ratas al final del periodo de lactancia.

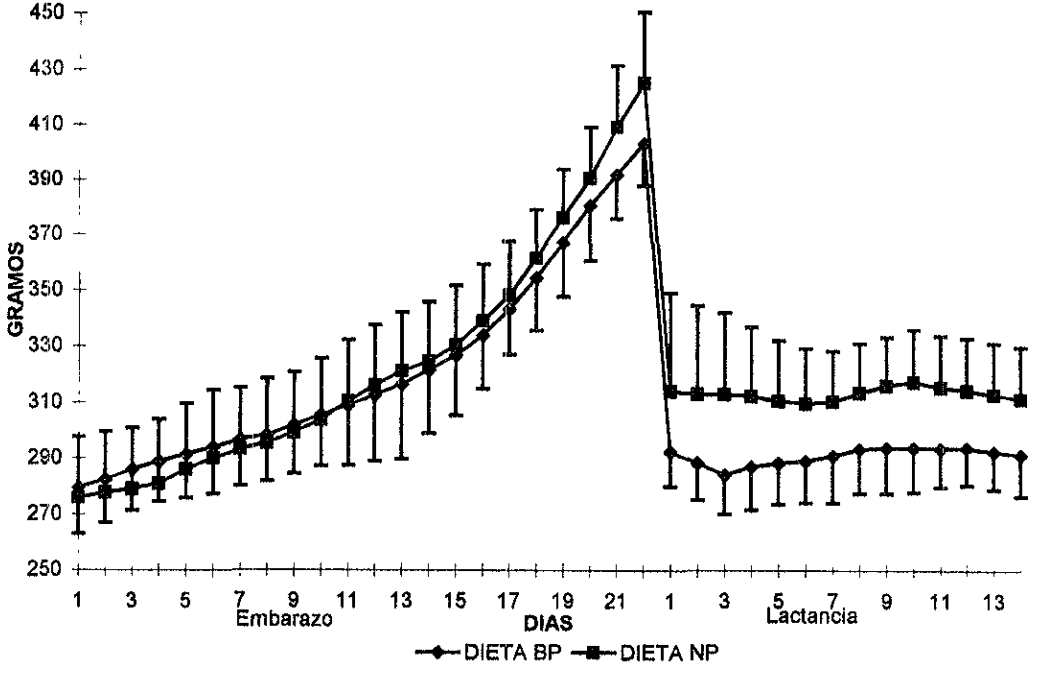


Figura 3. Peso corporal de la rata madre alimentada crónicamente desde antes de el embarazo y hasta el día 14 de lactancia con una dieta que contiene 18% (NP) y 11% (BP) de proteína. Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar con 9 animales en cada grupo.

7.4 PESO Y NÚMERO DE CRÍAS AL NACIMIENTO

El número y peso de las crías al nacimiento y al día 14 de lactancia se presenta en la Tabla 2 No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en el número de crías al nacimiento El peso de la camada, el peso por cría al nacimiento y el peso por cría al día 14 de lactancia, son significativamente menores en el grupo BP con relación al grupo NP

Tabla 2. Peso corporal y número de crías al nacimiento y al día 14 de lactancia en ratas alimentadas crónicamente con una dieta que contiene 18% (NP) y 11% (BP) de proteína.

Grupo	No. de crías	Peso camada	Peso cría	Peso cría
		al nacimiento (g)		al día 14 (g)
NP	11.8 ± 1.30	84.47 ± 11.18	7.06 ± 0 57	31 24 ± 2 83
BP	11.7 ± 1.66	68.48 ± 13.87*	5 74 ± 0 71*	25 57 ± 1 18*

Los valores se muestran como promedio ± la desviación estándar con 9 animales cada grupo. Las diferencia estadísticamente significativas entre los grupos NP y BP se muestran sí * $p < 0\ 05$

7.5 CRECIMIENTO DE LAS CRÍAS.

Al nacimiento las crías del grupo BP tienen un peso corporal 19% menor que el peso corporal de las crías del grupo NP. Durante el transcurso de la lactancia la diferencia en el peso corporal de las crías se mantiene. A partir del dia 5 de lactancia el peso corporal de las crias del grupo BP fué significativamente menor que el del grupo NP. Al día 14 de lactancia se encontró una diferencia en el peso corporal de las crias de 18% a favor del grupo de crías cuya madre recibió la dieta con 18% de proteína.

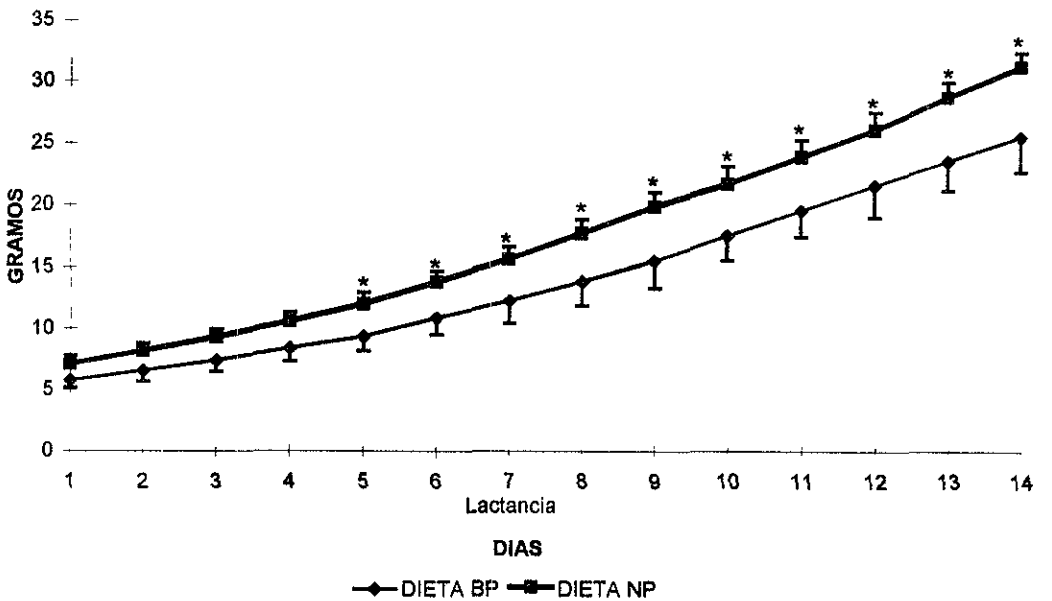


Figura 4. Peso corporal de las crías de madres alimentadas con una dieta que contiene 18% (NP) y 11% (BP) de proteína. Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar. El peso corporal de las crías del grupo BP fue significativamente menor a partir del día 5 de lactancia en comparación con las crías del grupo NP *$p<0.05$.

7.6 COMPOSICIÓN LÁCTEA.

En la Tabla 3, se muestra la concentración de los principales macronutrimentos de la leche de ratas alimentadas crónicamente con una dieta que contiene 18% (NP) y 11% (BP) de proteína La concentración de lípidos en la leche de las ratas alimentadas con la dieta BP es significativamente mayor en relación al grupo NP. Sin embargo, la concentración de proteínas en la leche del grupo BP fué significativamente menor en relación a la producida por el grupo NP No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la concentración de lactosa y en la densidad energética de la leche.

Tabla 3. Composición de la leche en ratas alimentadas crónicamente con una dieta que contiene 18% (NP) y 11% (BP) de proteína.

		Composición Láctea			
Grupo	n	Lípidos	Proteínas	Lactosa	Energía
		g/dl			Kcal/dl
NP	9	13.8 ± 1.5*	13.5 ± 2.3	2.9 ± 0.6	190 1 ± 21.2
BP	9	16.0 ± 1.7	11.0 ± 0.8*	3.0 ± 0.6	200.8 ± 16.4

Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se muestran sí *$p < 0.05$

7.7 PRODUCCIÓN DE LECHE.

En la Tabla 4 se muestran los valores de producción de leche de las ratas alimentadas crónicamente con una dieta que contiene 18% (NP) y 11% (BP) de proteína. El volumen de leche producido por el grupo de ratas del grupo BP fué significativamente menor que el que presentó el grupo NP. La producción diaria de proteínas por el grupo de ratas alimentadas con la dieta BP fué significativamente menor con relación al grupo NP, mientras que la producción diaria de lípidos, lactosa y energía en la leche no mostró diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 4. Volumen de leche y producción en 24 hrs. de lípidos, proteínas, lactosa y energía en la leche de ratas alimentadas crónicamente con una dieta que contiene 18% (NP) y 11% (BP) de proteína.

Grupo	Volumen	Lípidos	Proteína	Lactosa	Energía
		g/día			
	ml/día				Kcal/día
NP	42.2 ± 4.3	5.8 ± 0.6	5.7 ± 1.0	1.2 ± 0.3	79 8 ± 8.4
BP	36.6 ± 4.2*	5.8 ± 0.6	4.3 ± 0.4**	1.1 ± 0.3	73.0 ± 6.2

Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar con 9 animales en cada grupo. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos NP y BP se muestran sí *p < 0.05 o sí **p< 0 01

7.8 COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE.

En la Tabla 5, se muestra la composición de ácidos grasos de la leche de ratas alimentadas desde antes del embarazo y durante la lactancia con una dieta con 18% (NP) y 11% (BP) de proteína. No se encontraron diferencias en la composición de ácidos grasos en la leche de los dos grupos de estudio.

La Tabla 6 muestra la concentración de los ácidos grasos en la leche expresada en g/dL. Se agruparon los ácidos grasos de seis a catorce carbonos que pueden ser indicadores de la síntesis de ácidos grasos en la glándula mamaria y por otra parte se sumaron los ácidos grasos de dieciseis y de dieciocho carbonos y se utilizaron como indicadores de los ácidos grasos captados por la glándula mamaria de la circulación y cuyo origen es la dieta.

No se encontraron diferencias en la concentración de los ácidos grasos provenientes de la síntesis *de novo* en la glándula mamaria entre los grupos de estudio, sin embargo, la concentración de los ácidos grasos provenientes de la dieta fué significativamente mayor en el grupo BP

Tabla 5. Porcentaje de los ácidos grasos presentes en la leche de ratas alimentadas crónicamente con dietas con 18% (NP) y 11% (BP) de proteína.

Ácidos grasos	Grupo	
	NP	BP
	%	
C6	1.34 ± 1.41	0.57 ± 0.56
C8	4.33 ± 0.85	4.14 ± 1.44
C10	15.00 ± 2.02	13.99 ± 2.20
C12	12.77 ± 2.00	11.49 ± 0.91
C14	11.91 ± 1.93	11.19 ± 1.32
C16	24.32 ± 1.95	26.29 ± 2.28
C16-1	2.48 ± 0.65*	3.27 ± 0.67
C18	2.66 ± 0.26	2.69 ± 0.22
C18-1	17.14 ± 3.15	18.33 ± 1.27
C18:2	7.08 ± 1.56	7.11 ± 1.99
C20:1	0.17 ± 0.13	0.20 ± 0.07
C18:3	0.25 ± 0.09	0.28 ± 0.19
C20:4	0.54 ± 0.16	0.45 ± 0.25
suma de C6 a C14	45.35 ± 5.72	41.39 ± 3.94
suma C16 + 18	51.46 ± 4.57	54.70 ± 3.61
PUFA	0.79 ± 0.20	0.72 ± 0.41

Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar con 9 animales en cada grupo. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos NP y BP se muestran sí $*p < 0.05$

Tabla 6. Concentración de ácidos grasos de cadena media y larga presentes en la leche de ratas alimentadas crónicamente con dietas con 18% (NP) y 11% (BP) de proteína

Grupo	n	Lípidos	C6-C14	C16 + C18
			g/dl	
NP	9	13.81 ± 1.55*	6.26 ± 1.07	7.22 ± 1.11
BP	9	16.05 ± 1.71	6.65 ± 1.06	8.88 ± 1.10*

Los valores se muestran como promedio ± desviación estándar. Las diferencias estadísticas significativas entre los grupos NP y BP se muestran sí *$p < 0.05$

8. DISCUSIÓN.

Una adecuada nutrición de la madre durante el embarazo y durante la etapa posterior al parto es indispensable para el crecimiento de la cría. Durante estas etapas críticas de la vida, la sangre materna y la leche son las únicas fuentes de alimentación para el feto y el neonato.

La desnutrición materna se ha asociado con bajo peso de las crías al nacimiento y con un pobre crecimiento del neonato. Durante el ciclo reproductivo, el organismo materno utiliza parte de la energía que ingiere para mantener el costo de la reproducción, como es la síntesis y mantenimiento del tejido fetal o la síntesis de los componentes de la leche. Si el alimento no está disponible libremente, el organismo materno tiene que establecer prioridades y tendrá que sacrificar la formación de reservas corporales, el número de crías y el crecimiento de estas post nacimiento.

La restricción crónica de proteínas se eligió para la presente investigación, por ser un modelo de las condiciones que experimentan las mujeres de muchos países en desarrollo. Este modelo permite estudiar las adaptaciones del organismo materno a la deficiencia de proteínas establecida aún antes de iniciar su ciclo reproductivo.

Una adaptación que se presenta en el organismo materno durante el embarazo y la lactancia es el incremento en la ingesta de alimento. Los animales de los dos grupos de dieta estudiados mostraron un aumento importante en su consumo de alimento especialmente durante la etapa de la lactancia. Aunque el grupo BP recibió la dieta a libre demanda no mostró un aumento en su consumo de alimento en mayor proporción que el grupo NP, lo cual hubiera podido compensar la deficiencia de proteína en su dieta. Esto sugiere que el consumo de alimento no está determinado por el contenido de proteína en la dieta. Otros autores han mostrado que la restricción de proteínas en la dieta de la rata solamente durante el periodo de lactancia reduce el consumo de alimento (12).

Durante el embarazo, la madre experimenta una importante ganancia de peso. Este aumento en el peso corporal se encuentra estrechamente relacionado con el desarrollo de los productos de la concepción que son el feto, la placenta y el líquido amniótico (22), así como por el acumulo de reservas energéticas en el tejido adiposo y de aminoácidos en el tejido muscular (85). Las ratas de nuestro estudio no mostraron diferencias significativas en la ganancia de peso corporal durante el embarazo aunque hacia el final de este, el grupo de ratas que consumieron la dieta con bajo contenido en proteínas muestran un peso corporal menor en relación al grupo NP. No es posible determinar con exactitud que componente de la ganancia de peso materno (fetos o reservas corporales) se vio más afectado con la restricción de proteína impuesta desde antes de la concepción pero podría asumirse que el compartimento fetal fué el mas afectado al observar el bajo peso al nacimiento que mostraron las crías del grupo BP

Durante la lactancia la hiperplasia del hígado, la glándula mamaria y el intestino y el aumento en el volumen sanguíneo mantienen el peso corporal de la madre por arriba de los valores mostrados antes de la gestación (109) a pesar de que durante este periodo se presenta una importante movilización de las reservas corporales grasas acumuladas durante el embarazo (36). Esta movilización de reservas corporales responde a las importantes demandas energéticas que impone el periodo de lactancia. Las ratas madre del grupo BP mostraron una mayor perdida de peso corporal durante la lactancia en relación al grupo NP. Existen evidencias experimentales que muestran que aún los animales alimentados a libre demanda muestran pérdidas en su masa proteica corporal (49), es probable que los animales alimentados con la dieta con bajo contenido de proteína aumenten esta movilización para proporcionar más aminoácidos a la circulación que puedan ser utilizados por la glándula mamaria para la síntesis de leche.

En el embarazo, la síntesis de nuevas estructuras condiciona un elevado paso transplacentario de aminoácidos a medida que avanza esta etapa, con lo cual el metabolismo nitrogenado materno se ve sometido a una fuerte presión metabólica

(69).La restricción de proteínas durante el embarazo disminuye la captación de aminoácidos por la placenta (51, 87-88). No se han asociado anormalidades congénitas con la restricción de proteínas o de energía durante la gestación, sin embargo, se ha reportado reducciones en el tamaño de la camada. La magnitud de esta reducción depende de la intensidad y del tiempo del embarazo en la cual se imponga la restricción. Algunos autores no reportan diferencias en el tamaño de la camada entre animales restringidos y no restringidos cuando se establece una restricción del 50% o una dieta baja en caseina después del día 5 de embarazo (51, 85). Algunos otros autores han reportado que la restricción de proteína tiene repercusiones sobre el número de crías al nacimiento por la reabsorción de los fetos *in utero* (8). En nuestro estudio no se observó efecto de la restricción de proteínas sobre el número de crías al nacimiento, esta diferencia puede atribuirse al tiempo en el que se inició la restricción de proteínas y resalta la importancia de los mecanismos de adaptación maternos a la restricción crónica de proteínas.

La restricción de proteínas desde antes de la gestación afectó el crecimiento de la cría *in utero* repercutiendo en un menor peso de las crías al nacimiento. La diferencia en el peso al nacimiento entre las crías del grupo BP y NP se mantuvo hasta el día 14 de lactancia.

La composición de la leche en la rata es afectada por la restricción de proteína en la dieta de la madre durante el embarazo o la lactancia. Las ratas que recibieron la dieta con bajo contenido de proteínas tuvieron en su leche una menor concentración de proteína y un mayor contenido de lípidos en relación a las ratas alimentadas con la dieta con adecuado contenido de proteína, estos datos coinciden con publicaciones previas (7, 15, 74-76, 91). La lactosa es uno de los componentes mas estables de la leche (61), no observamos cambios en la concentración de lactosa en relación con el contenido de proteína de la dieta de la rata. A pesar de los cambios en la concentración de los diferentes macronutrimentos de la leche ocasionados por la restricción de proteína, es importante destacar que la leche producida por los dos grupos experimentales

mostró la misma densidad energética. La deficiencia en el aporte de energía a partir de aminoácidos en la leche del grupo BP fué compensada por un aumento en el aporte de energía a partir de lípidos.

Los ácidos grasos de los triacilgliceroles de la leche provienen de la dieta, de la síntesis en el tejido mamario o de la movilización de los lípidos almacenados en tejido adiposo (62, 110). El análisis en la composición de los ácidos grasos en la leche puede ser un indicativo del origen de los lípidos de la leche. La mayor concentración de lípidos en la leche de las ratas del grupo BP estuvo relacionada con una mayor transferencia de los lípidos provenientes de la dieta, no se encontraron diferencias entre los grupos en la cantidad de ácidos grasos sintetizados por la glándula mamaria.

El efecto primario de la deficiencia de proteína en la dieta durante la lactancia es la reducción del 12 al 35% en el volumen de la leche (12, 58, 74-76, 84, 92). Las ratas alimentadas con la dieta con bajo contenido de proteínas presentaron una menor producción de leche que repercutió en una importante disminución en la producción diaria de proteína. Esta diferencia en la producción diaria de proteínas por la rata lactante sometida a la restricción de proteína puede ser la responsable del menor crecimiento de las crías durante la lactancia ya que la producción de lactosa, lípidos y la producción de energía por 24h no mostró diferencias entre los grupos de alimentación.

Los resultados de este estudio demuestran que la restricción crónica de proteína en la dieta de la rata durante el ciclo reproductivo repercute negativamente en el peso de la cría al nacimiento y en su crecimiento post parto. Esta deficiencia en el crecimiento de la cría durante el periodo de la lactancia está relacionado con la disminución en la producción diaria de proteínas en la leche de los animales restringidos.

9. CONCLUSIONES.

- La restricción de proteínas en la dieta de la rata impuesta aún antes de el embarazo afecta el desarrollo intrauterino y se refleja en un menor peso de las crías al nacimiento.

- La restricción crónica de proteínas en la dieta de la rata ocasiona una reducción significativa en el volumen y en el contenido de proteínas de la leche lo que repercute negativamente en el crecimiento de la cría posparto.

- La densidad energética de la leche producida por el grupo BP se mantuvo similar a la del grupo NP debido a un incremento en el contenido de lípidos El aumento en el contenido de lípidos en la leche del grupo BP puede estar relacionado con una mayor captación de ácidos grasos provenientes de la dieta

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Battaglia, F.C., and Meschia, G. **Foetal and placental metabolism.** Proc. Nutr. Soc. 1981; 40: 99-113.
2. Beaton, G.H., Beare, J., Ryu, M.H., and Mc Henry, E.W. **Protein metabolism in the pregnant rat.** J. Nutr. 1954; 54: 291.
3. Berg, B.N. **Dietary restrictión and reproduction in the rat.** J. Nutr.1965, 87: 344.
4. Bisset, E.S., Clarke, P.M., Dodd, F.H., and Foot, A.S. J. Dairy Res. 1950; 17: 117.
5 Cannon, C.D., Olitzky, I., Inkpen, J.A. Proteínas en: Química Clinica (Henry y col. Eds.), pp. 401-409, 2ª ed., Edit. JIMS, Barcelona España, 1980.
6. Chow, B.F., and Lee, C.J. **Effect of dietary restrictions of pregnant rats on body weight gain of the offspring.** J. Nutr. 1964; 82: 10.
7. Crnic, S.L. and Chase, P. **Models of infantile undernutrition in rats, effects on milk.** J.Nutr. 1978; 108 : 1755-1760.
8. Fisher, C.J., and Leathem, J.H. **Effect of a protein-free diet on protein metabolism in the pregnant rat.** Endocrinology 1965; 76: 454.
9. Fleet, I.R., Goode, I.A., Haman, M.H., Laurie, M.S., Linzell, J.L., and Peaker, M. **Secretory activity of goat mammary gland during pregnancy and the onset of lactation.** J. Physiol. 1975; 251: 763-773.
10. Folch, J., Lees M., and Sloane Stanley, G.H. **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue.** J. Biol. Chem. 1957; 226 . 497-509.
11. Gresham, E.L., Janes, E.J., Raye, J.R., Battaglia, F.C., Makowski, E.L., Meschia, G. **Production and excretion of urea by the fetal lamb.** Pediatrics 1972; 50: 372-379.

12.Grigor, M.R., Allan, J.E., Carrington, J.M., Carne, A., Geursen, A., Young, D., Thompson, M.P., Haynes, E.B. and Coleman, R.A. **Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactanting rats.** J. Nutr. 1987; 117 : 1247-1258.

13.Grigor, M R., Thompson, M.P. **Diurnal regulation of milk lipid production and milk secretion in the rat: effect of dietary protein and energy restriction.** J. Nutr. 1987; 117: 748-753.

14.Grigor, M.R. Warren, S.M. **Dietary regulation of mammary gland lipogenesis in lactating rats.** Biochem. J. 1980; 188 : 61-65.

15.Grimble, R.F. **The effect of dietary protein concentration and quality on the hormonal status, protein metabolism and milk protein concentrations of rats.** An. Nutr. Metab. 1981; 25 : 221-227.

16.Godbole, V.T., Grundleger, M.L., Pasquine, T.A., and Tehene, S.W **Composition of Rat Milk from Day 5 to 20 of lactation and Milk Intake of Lean and preobese Zucker pups.** J Nutr. 1981; 111 480-487.

17.Gould, S.F. **Anatomy of de Breast. In Lactation: Physilogy, Nutrition and Breast-Feeding** (Neville M.C., and Neifert, M.R., eds.),. Plenum Press, New York, 1983. pp. 23-47.

18.Hachey, P. L., Silber, G.H., Wong, G.H., and Garza, C. **Human lactation II. Endogenous fatty acid synthesis by the mammary gland.** Pedriatr. Res. 1989; 25: 63-68.

19.Hammond, J. **Physiological factors affecting birth weight.** Proc. Nutr. Soc. 1944; 2: 8.

20.Hartmann, P.E. **Changes in the composition and yield of the mammary secretion of the cows during the initiation of lactation.** J. Endocrinology. 1973; 59: 231-247.

ESTA
SALIR DE LA BIBLIOTECA

21.Hastings-Roberts, M.M., and Zeman, F. **Effects of protein deficiency, pair-feeding, or diet supplementation on maternal, fetal and placental growth in rats.** J. Nutr. 1977; 107: 973.

22.Herrera, E. **Adaptaciones metabólicas en la madre durante la gestación en: Bioquímica Perinatal** (Herrera, E. ed.), Edit. Fundación Ramón Areces. Madrid, España 1986. pp 9-28.

23.Herrera, E , Knopp, R.H., and Freinkel, N. **Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrigen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat.** J. Clin. Invest. 1969; 48: 2260-2272.

24.Hurley, W.L. **Milk proteins and proteins synthesis in: Lactation Biology.** encontrado en Internet 1997.

25.Hytten, F.E., and Leitch,I. **The Physiology of Human Pregnancy**, , 2ª ed., Edit. Blackwell Scient. Publ., Oxford 1971. pp. 332

26.Hytten, F.E., and Paintin, D.B. **Increase in plasma volume during pregnancy.** T. Obstet. Gynaecol. Br. Common. 1963; 70: 402.

27.Jansen, G.R., Chase, H.P. **Effect of feeding lysine and threonin fortified bread during gestation and lactation on growth of the offspring in rats.** J.Nutr. 1976; 106: 33-40 .

28.Jansen, G.R., Grayson, C., Hunsaker, H. **Wheat gluten during pregnancy and lactation: effects on mammary gland development and pup viability.** Am. J. Clin. Nutr. 1987; 46: 250-257.

29.Jansen, G.R., Monte, W.C. **Aminoacid fortification of bread fed at varying levels during gestation and lactation in rats.** J. Nutr. 1977; 107 300-309.

30.Jansen, G.R. **The importance of protein quality in human nutrition. In soy protein and human nutrition** (H.L Wilcke, D.T. Hopkins, D.H. Waggle.) Academic Press. New York 1979. pp 149-170

31.Jennes, R.(). **The composition of milk, in:** Lactation: A Comprensive Teatrise, Volume III,(B.L. Larson and V.R. Smith, eds.). Academic Press, New York 1974. pp. 3-107

32.Jensen, R.G., Ferris, A.M., and Lammi-Keete, C.J. **The composition of milk fat.** J. Dairy Sci. 1991, 74: 3228-3243.

33 Jensen, R.G., Neville, M.C. Human lactation. **Milk components and methodologies.** Plenum press, New York, 1985 . pp. 97-112.

34.Kanto, U., Clawson, A.J. **Effect of energy intake during pregnancy and lactation on body composition in rats.** J. Nutr. 1980; 110: 1829-1839.

35.Katz, J., Wals, P.A.., and Van de Velde, R.L. **Lipogenesis by acini from mammary gland of lactating rats.** J. Biol. Chem. 1974; 249. 7348-7357.

36.Keen, V.L., Lonnerdal, B., Clegg, M., and Hurly, L. **Developmental changes in the composition of rat milk : trace elements, mineral, protein, carbohydrate and fat.** J. Nutr., 1981; 111 : 226-230.

37.Kliwer, R.L. Rasmussen, K.M. **Malnutrition during the reproductive cycle: effects on galactopoietic hormones and lactational performance in the rat.** Am. J. Clin. Nutr. 1987; 46: 926-935.

38.Knigth, C.H., Docherty, A.H., and Peaker, M. **Milk yiel in rats in relation to the activity and size of the mammary secretory cell population.** J. Dairy Res 1984; 51: 29-35.

39.Knopp, R.H., Boroush, M.A., and O'Sullivan, J.B. **Lipid methabolism in pregnancy, II. Postheparin lipolitic activity and hypertriglyceridemia.** Metabolism 1975; 24: 481.

40.Knopp, R.H., Saudek, C.D., Arky, R.A., and O'Sullivan, J.B. **Two phases of adipose tissue metabolism in pregnancy: maternal adaptations for fetal growth.** Endocrinology 1973; 92: 984-988.

41.Kohrs, M.B., Harper, A.E., and Kerr, G.R. **Effects of a low- protein diet during pregnancy on the rhesus monkey.** Am. J. Clin. Nutr 1976; 29: 136.

42.Koski, K.G., Hill, F.W., Lönnerdal, B. **Altered lactational performance in rats, fed low carbohydrate diets and its effect on growth of neonatal rat pups.** J. Nutr. 1990; 120: 1028-1036.

43.Kuhn, N.J. Lactogenesis: **The search for trigger machanism in diferent species.** In Comparative aspects of Lactation (M. Peaker, eds.). Academic Press. London 1977. pp. 165-172

44.Kwong, E., Barnes, R.H. **Comparative contributions of dietary protein quality and quantity to growth during gestatión, lactation, and postweaning in the rat.** J.Nutr. 1977;107: 420-425.

45.Lederman, S.A., and Rosso, P. **The effects of food restriction during pregnancy on maternal weight and body composition.** Fed. Proc. 1978; 37: 1465.

46.Lehninger, A.L. Bioquímica.Ediciones Omega., 2ª Edición. Barcelona, España 1981. pp. 654-655.

47.Lemons, J.A., and Schreiner, R.L. **Aminoacid metabolism in the ovine fetus.** Am. J. Physiol. 1983; 244: 459-466.

48.Libertini, L.J., and Smith, S. **Purification and propierties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which modifies the product especificity of fatty acid synthetase.** J. Biol. Chem. 1978; 257: 1393-1401.

49.Lönnerdal B. Forsum E. Hambreus L. **A longitudinal study on the protein, nitrogen and lactose contents of human milk in Swedish well-nourished mothers.** Am. J. Clin. Nutr. 1976; 29: 1127-1133.

50.Lowry, H.O., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, J.R. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 1951; 193 · 256-275.

51.Malandro, M.S., Berveridge, M.J., Kielberg, M.S., and Novak, D.A. **Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placental amino acid transport.** Am. J. Physiol. 1996; 271 (Cell Physiol. 40): C295-C303

52.Mather, I.H. **Proteins of the milk fat globule membrane as markers of mammary ephitelial ceels and alical plasma membrane.** In the mammary gland: Development, regulation and function (M.C. Neville and C.W. Daniels, eds.). Plenum Press, New York 1985. pp. 268

53.Meier, P.R., Peterson, R.G., Bonds, D.R., Meschia, G., and Battaglia, F.C. **Rathes of protein shyntesis and turnover in fetal life.** Am. J. Physiol. 1981; 240: 320- 324.

54.Mercier, J.C., and Gaye, P.(1983). **Milk protein synthesis.** In Biochemistry of lactation (T.B. Mepham, de.). Elsevier, Amsterdam. pp. 177-229

55.Moore B.J. Brasel J.A. **One cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation, no lactation, and recovery : Efects of carcass composition in ad libitum fed and food restricted rats** J. Nutr 1984; 114 : 1548-1559.

56.Naismith, D.J. **The requirement for protein, and the utilization of protein and calcium during pregnancy.** Metabolism 1966; 15: 582.

57.Naismith, D.J. **The foetus as a parasite.** Proc. Nutr. Soc. 1969; 28: 25.

58.Naismith, D.J., Richardson, D.P., Pritchard, A.E. **The utilization of protein and energy during lactation in tha rat, with particular regard to the use of fat accumulated in pregnancy.** British J. Nutr. 1982; 48: 433-441.

59.Naismith, D.J. **Adaptations in the metabolism of protein during pregnancy and their nutritional implications.** Nutr. Rep. Int. 1973; 7: 383.

60.Neville, M.C., Allen, J.C., Archer, P.G., Seacat, J., Casey, C., Sawiicki, V., Oliva-Rasbach, J., and Neifert, M. **Studies in human lactation, 7. Milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis.** Am. J. Clin. Nutr. 1991a; 54: 81-93.

61.Neville, M.C., Allen, J.C., and Watters, C. **The mechanism of milk secretion.** In Lactation: Physiology, Nutrition, and Breast-Feeding (Neville, M.C., Neifert, M.R., eds.). Plenum Press, New York 1983. pp. 49-102

62.Neville, M.C., Frances, P.M. **Regulation of milk lipid secretion and composition.** Annu. Rev. Nutr. 1997; 17: 159-184.

63.Neville, M.C. **Milk secretion: An overview.** encontrado en Internet: e-mail: peggy.neville@uchsc.edu. 1997.

64.Neville, M.C., Neifert, M.R. **An introduction to lactation and breast-feeding.** In Lactation: Physiology, Nutrition, and Breast-Feeding (Neville, M.C., Neifert, M.R., eds.). Plenum Press, New York 1983. pp 3-18

65.Neville, M.C. **Regulation of mammary development and lactation.** In Lactation: Physiology, Nutrition, and Breast-Feeding (Neville, M.C., Neifert, M.R., eds.). Plenum Press, New York 1983. pp. 103-140.

66.Neville, M.C. **C. Sampling and storage of human milk: Implications for sampling and storage. The estructure of milk. Chapter 2 in:** Handbook of milk composition (Jensen, G.R., de.) pp. 63-79. Academic Press. 1995.

67.Palacín, P.M. **Estructura de la placenta y transferencia placentaria de metabolitos en:** Bioquímica Perinatal (Herrera, ed.) Edit. Fundación Ramón Areces., Madrid España 1986. pp. 47-74.

68.Palacín, P.M., Lasunción, M.A., and Herrera, E. **Transporte de metabolitos a través de la placenta.** Rev. Esp. Pediat. 1984; 40: 163-198.

69.Pastor, A.M., y Remesar, X. **Metabolismo de aminoácidos en la madre durante la gestación en:** Bioquímica Perinatal (Herrera, E., ed.). Edit Fundación Ramón Areces., Madrid España 1986. pp. 29-46.

70.Peaker, M., and Linzell, J.L. **Citrate in milk: Harbinger of lactogenesis.** Nature 1975; 253: 464-465.

71.- Peaker, M.(1983). **Secretion of ions and water.** In Biochemistry of lactation (T.B. Mephan, de.) Elsevier, New York. pp. 285-307.

72.Peaker, M. **The aqueous phase of milk: Ion and water transport in:** Comparative Aspects of Lactation (Peaker, de.) Academic Press, New York 1977. pp. 113-134.

73.Peaker, M. **Ion and water transport in the mammary gland, in :** Lactation A Comprhensive Treatise (M. Peaker, de.) Academic Press, New York 1978. pp. 437-462.

74.Pine A.P. Jessop N.S. and Allan G.F. **Maternal reserves and their influence on lactational performance in rats 4. Tissue protein synthesis and turnover associated with mobilization of maternal protein.** British J. Nutr. 1994; 72 : 831-844.

75.Pine A.P. Jessop N.S. **Maternal reserves and their influence on lactational performance in rats 3. The effects of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition.** British J Nutr. 1994; 72 : 815-830.

76.Pine A.P. Jessop N.S. and Olldhan J.D. **Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats.** British J. Nut. 1994; 71 : 13-27.

77.Pond, W.G., Strachan, D.N., Shina, Y.N., Walker, E.F., Jr., Dunn, J.A., and Barnes, P.H. **Effect of protein deprivation of swing during all or part of gestation on birth weight, postnatal growth rate and nuclei acid content or brain and muscle of progeny.** J. Nutr. 1969; 99: 61.

78.Powell, J.T., and Brew, K. **Metal ion activation of galactosyl transferase.** J. Biol. Chem. 1976; 251: 3645-3652.

79.Rasmussen, K.M. **The influence of maternal of maternal nutrition on lactation.** Annu. Rev. Nutr. 1992; 12: 103-117.

80.Rasmussen, K.M. Warman N.L. **Effects of maternal malnutrition during the reproductive cycle on growth and nutritional status of sucklin rat pups.** Am. J. Clin. Nutr. 1983; 38 : 77-83.

81.Riopelle, A.J., Hill, C.W., and Li, S.C. **Protein deprivation in primates, V. Fetal mortality and neonatal status of infant monkeys born of deprived mothers.** Am. J. Clin. Nutr. 1975; 29· 989.

82.Roberts, S.B., Cole, T.J., Coward, W.A. **Lactational performance in relation to energy intake in the baboon.** Am. J. Clin. Nutr. 1985; 41: 1270-1276

83.Robinson, A.M., and Williamson, D.H. **Comparison of glucose metabolism in the lactating mammary gland of the rat *in vivo* and *in vitro*.** Biochem. J. 1977; 164: 153-159.

*84.*Romero, J.J., Canas, R., Baldwin, R.L., Koong, L.J. **Lactational efficiency complex of rats: provisional model for interpretation of energy balance data.** J. Dairy Sci. 1976; 59: 57-67.

85.Rosso, P., and Cramoy, C. **Nutrition and Pregnancy in: Human Nutrition A Comprensive Treatise, Vol. 1: Nutrition Pre-and Postnatal Development** (Winick, M., de.) Plenum Press, New York, 1979. pp. 133-228.

86.Rosso, P. **Maternal nutrition, nutrient exchange and fetal gowth, in: Nutritional disorders of american women. Vol. 5** (M. Winick, de.), Current Concepts in Nutrition. John Wiley & Sons, Inc., New York 1977. pp. 3-25.

87.Rosso, P. **Maternal-fetal exchange during malnutrition in the rat. Transfer of alpha-amino isobutyric acid.** J.Nutr. 1977; 107: 2002.

88.Rosso, P. **Maternal-fetal exchange during malnutrition in the rat. Transfer of glucose and methyl (alpha-D-U-^{14}C glucose) pyranoside.** J.Nutr. 1977; 107: 2006.

89.Sadurski, A., Sohlström, A., Kabir, N., Forsum, E. **Energy restriction and the partitoning of energy among the cost of reproduction in rats in relation to growth of the progeny.** J. Nutr. 1991; 121: 1798-1810.

90.Sampson, D.A., Hunsaker, H.A., Jansen, G.R. **Dietary protein quality and food intake: effects on lactation and on protein synthesis and tissue composition in mammary tissue and liver in rats.** J. Nutr. 1986; 116: 365-375.

91.Sampson, D.A., and Jensen, G.R. **Protein and energy nutrition during lactation.** Annu. Rev. Nutr. 1984; 4: 43-67.

92.Sampson, D.A., Jansen, G.R. **Measurement of milk yeld in the lactating rat from pup weigh and weigh gain.** J. Pediatr Gastroenterol. Nutr. 1984; 3: 613-617.

93.Sampson, D.A., Jansen, G.R. **Protein synthesis during lactation: no circadian variation in rats fed diets varying in protein quality and level of intake.** J Nutr. 1983; 114: 1470-1478

94.Sampson, D.A., Jansen, G.R. **The effect of dietary protein quality and feeding level on milk secretion mammary protein synthesis in the rat.** J Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1983; 4: 274-283.

95.Schmidt, G.H. **La glándula mamaria y su secreción en:** Biologia de la lactación. Edit. Acribia. Zaragoza España 1974. pp. 11-15.

96.Schmidt, G.H. **Anatomia de la glándula mamaria en:** Biologia de la lactación., Edit. Acribia. Zaragoza España 1974. pp. 16-42.

97 Schmid-Nielsen, K. **Terrestrial animals in dry heat: desert rodents. In:** Handbook of Physiology. Section 4. Adaptation to environment (Dill, D.B., Adolph, E.F., and Wilburg, C.G., eds.). American Physiological Society, Washington, D.C, 1964. pp. 493-507.

98.Scrimshaw, N.S.**Trough a glass darkly: discerning the practical implications of human dietary protein-energy enterrelationships.** Nutr. Rev. 1977; 35:321-337.

99.Seelig, L.L. Jr., and Beer, A.E. **Transepithelial migration of leukocytes in the mammari gland of lactating rats.** Biol. Reprod. 1981; 22: 1157-1163.

100.Slonaker, J.R. **The effect of copulation, pregnancy, pseudopregnancy and lactation on the voluntary activity and food consuption of the albino rat.** Am. J. Physiol. 1924-25; 71: 362.

101.Solari, R., and Kraehenbuhl, J.P. **Receptor-mediated transephitelial transport of polimeric inmunoglobulins.** In The mammary gland.(M.C Neville and C.W. Daniel, eds.), pp. 269-300. Plenum Press, New York, 1987.

102.Taylor J.B. Calvert C.C. Baldwin R.L. and D.Sainz R. **Effects of dietary protein, fat and restriction on body composition and energy balance in lactanting rats.** J.Nutr. 1986; 116 : 1519-1528.

103.Turner, C.W., and Gomez, E.T. Mo. Agr. Expt. Sta. Res. Bull. 1935; 182.

104.Turner, C.W., and Schultze, A.B. Mo. Agr. Expt. Sta. Res. Bull. 1931; 157

105.Villalpando S., De Santiago S. **La lactancia y el metabolismo de proteínas.** Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1990; 47 : 181-185.

106.Viña, J.R. **Metabolismo de la glándula mamaria durante la lactancia en:** **Bioquímica Perinatal** (Herrera, ed.), pp. 427-440, Edit. Fundación Ramón Areces, Madrid España 1986.

107.Vorherro H. **The breast : Morphology, physilogy and lactation.** New York . Academic Press, 1974

108.Warman, N.L., Rasmussen, K.M. **Effects of malnutrition during the reproductive cycle on nutritional status and lactational performance of rat dams.** Nutr. Res. 1983; 3: 527-545.

109.Waterlow, J.C. **Crisis for nutrition. Sixth boyd orr memorial lecture.** Proc. Nutr. Soc. 1981; 40: 195-207.

110.Williamson, D.H. **Integration of metabolism in tissues of the lactating rat.** FEBS Lett. 1980; 117: K93-K105:

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

112.Winick, M. **Cellular growth of the placenta as an indicator of abnormal fetal growth, in** **Diagnosis and tratment of fetal disorders** (K. Adamson, ed.), p. 83, Springer-Verlag New York Inc., New York 1969.

113.Young C.M. M.N.S. and Rasmussen M. **Effects of varing degrees of chronic dietary restriction in rat dams on reproductive and lactational**

performance and body composition in dams and their pups. Am. J. Clin. Nutr 1985; 41 : 979-987.

114.Young, M., and Widdowson, E.M. **The influence of diets deficient in energy, or in protein on coneptus weight, and the placental transfer of a non-metabolisable amino acid in the guinea pig.** Biol. Neonate 1975; 27: 184.

115.Zeman, F. J. **Effect on the young of a rat of maternal protein restriction.** J. Nutr. 1967; 93. 167.

116.Zeman, F. J. **Effect of protein deficiency during gestation on postnatal cellular development in the young rat.** J. Nutr. 1970; 100: 530.

117. Zorzano, A., and Herrera, E. **Effect of anesthetics and starvation on in vivo gluconeogenesis in virgin and pregnant rats.** Metabolism 1974; 33: 553-558.