



U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTONOMA  
METROPOLITANA

---

---

IZTAPALAPA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN ENERGETICO-  
PROTEINICA SOBRE EL CATABOLISMO DE LAS  
PROTEINAS EN LA RATA LACTANTE

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A :

**MARIA DEL CARMEN PRADO URIBE**

MEXICO, D. F.,

1997

---

ANA. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

PROYECTO PARCIALMENTE FINANCIADO  
POR CONACYT :  
26 4100-1054 PM

**SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS:**

**UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN NUTRICION, HOSPITAL DE PEDIATRIA. CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI. INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

---

*MAESTRIA DEL PADRON DE PROGRAMAS DE POSGRADO DE EXELENIA PARA CIENCIA Y TECNOLOGIA 1997-2001 CON NUMERO DE REGISTRO 309-0.*

MAESTRIA DEL PADRON DE PROGRAMAS DE POSGRADO DE EXELENIA PARA CIENCIA Y TECNOLOGIA 1997-2001 CON NUMERO DE REGISTRO 309-0.

---

Dedico este trabajo a la memoria de mi madre, María Uribe, porque aunque no esta conmigo siempre esta en mis pensamientos y en mi corazón.

A mi padre, Samuel Prado, por su apoyo incondicional, por su dedicación, por su confianza.  
Gracias.

A mis hermanos, en especial para Ignacio, Fernando y Andrés, por su apoyo incondicional.

A mi cuñada, Carmen, por ofrecerme su amistad.

A mis sobrinos, Andrea, Gabriel y Adrián, por los bellos momentos que pasamos juntos.

A Leonor, Ada, Irma, Leti, Susan, Juana, Edith, por su gran amistad y apoyo que me han brindado en todo momento.

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Homero Hernández Montes, por brindarme su tiempo y dedicación para la realización de este trabajo.

Al Dr. Salvador Villalpando, por haberme permitido realizar este trabajo en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición.

A cada uno de los investigadores de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, por todas sus sugerencias y comentarios para el enriquecimiento de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de la unidad.

A los Investigadores del laboratorio de Biología Celular de la UAM-I por su apoyo y estímulo que siempre me han brindado.

GRACIAS.

---

## INDICE

	Pag.
1. INTRODUCCION	2
2. ANTECEDENTES	
2.1 Nutrición	3
2.2 Alteraciones metabólicas en la glándula mamaria durante la lactancia	3
2.3 Alteraciones en el metabolismo del hígado durante la lactancia	4
2.4 Alteraciones en el metabolismo del músculo durante la lactancia	4
2.5 Metabolismo de proteínas	5
2.6 Catabolismo de proteínas	6
2.7 Los lisosomas y las catepsinas	6
2.8 La proteasa miofibrilar	6
2.9 El sistema de la ubiquitina y los proteasomas	7
2.10 Las calpaínas	7
2.11 Lactancia	8
2.12 Correlación en el metabolismo de los aminoácidos entre el músculo Esquelético y el hígado	9
2.13 Interrelación del músculo, hígado y glándula mamaria durante la Lactancia	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo general	11
4.2 Objetivo particular	11
5. HIPOTESIS	12
5.1 Hipótesis general	12
5.2 Hipótesis particular	12

---

## 6. MATERIAL Y METODOS

6.1	Animales de experimentación	13
6.2	Grupos de estudio	13
6.3	Sacrificio de los animales	14
6.4	Preparación del homogeneizado para medir catepsinas	15
6.5	Determinación de la actividad de la catepsina D	15
6.6	Preparación semipurificada de la proteasa miofibrilar	16
6.7	Determinación de la actividad proteolítica	16
6.8	Determinación de la concentración de proteínas en los homogeneizados	17
6.9	Análisis estadísticos	17

## 7. RESULTADOS

7.1	Consumo de alimento	18
7.2	Peso corporal	19
7.2.2	Ratas durante la gestación y la lactancia	20
7.3	Efecto de la restricción energético-proteínica sobre la fertilidad de la rata, el número y el peso de las crías en la camada	21
7.4	El crecimiento de las camadas utilizando como índice el peso corporal	22
7.5	Cambios en el peso de los tejidos	23
7.5.1	Glándula mamaria	23
7.5.2	Hígado	24
7.5.3	Músculo	25
7.6	Consumo de proteína	26
7.7	Consumo de energía	26
7.8.1	Actividad específica de la catepsina D	29
7.8.1.1	Glándula mamaria	29
7.8.1.2	Hígado	29
7.8.1.3	Músculo	30

---



7.8.2	Contenido total del enzima en diferentes tejidos	31
7.8.2.1	Glándula mamaria	31
7.8.2.2	Hígado	33
7.8.2.3	Músculo	34
7.9	Cambios en la actividad de la proteasa miofibrilar	35
8.	DISCUSION	
8.1	Efecto de la lactancia sobre el consumo de alimento	37
8.2	Efecto de la restricción sobre la fecundidad en la rata	38
8.3	Efecto de la restricción sobre el peso corporal de la madre y la camada	38
8.4	Efecto sobre el peso de los tejidos	38
8.5	Catabolismo de proteínas	40
9.	CONCLUSIONES	43
	BIBLIOGRAFIA	44

---

## RESUMEN

En los mamíferos existen dos factores que provocan la desnutrición, la restricción de proteínas y la restricción de energía. La rata alimentada con una dieta adecuada pierde masa corporal durante la lactancia, producto de un incremento en el catabolismo de sus proteínas. El objetivo de esta investigación fue el de estudiar el efecto de una restricción energético-proteínica, sobre la actividad de algunas enzimas proteolíticas (catepsina D, y proteasa miofibrilar) del hígado, el músculo y la glándula mamaria de la rata lactante. Material y métodos, se utilizaron dos grupos de ratas Sprague-Dawley, el grupo no restringido que fue alimentado a libre demanda durante todo el ciclo reproductor (de la 17 a la 22 semana de edad) y el grupo restringido alimentado con una restricción del 50% desde la semana 15. Las ratas fueron sacrificadas los días 7, 14, y 21 de la lactancia, los tejidos fueron disecados para preparar un homogeneizado que se utilizó como fuente de las enzimas. Los resultados muestran que la restricción energético-proteínica disminuye la eficiencia de la cruce (14.3%) si se compara con el grupo no restringido (69.2%). La actividad específica de la catepsina D en la glándula mamaria del grupo no restringido se incrementó en toda la lactancia (109.4, 132.6, 111.7  $\mu\text{g}$  de tirosina liberada/mg proteína, los días 7, 14 y 21 de lactancia) comparado con ratas vírgenes pareadas en edad (33.1, 28.47, 49.96  $\mu\text{g}$ ). El grupo restringido mostró el incremento únicamente en L7 y L143 (127.3, 147.7) con respecto a sus controles (54.1, y 56.2). La catepsina D en el hígado de las ratas no restringidas mostró un incremento significativo en los días 7, 14 y 21 de lactancia (92.6, 78.7 y 93.4  $\mu\text{g}$ ), en cambio, la actividad en el mismo órgano del grupo restringido mostró un aumento exclusivamente en L7 (85.8  $\mu\text{g}$ ). El músculo esquelético solo mostró diferencia significativa en el grupo restringido lactante el día L7 (14.3  $\mu\text{g}$ ) en comparación del grupo virgen (9.8  $\mu\text{g}$ ). El efecto de la restricción solo se observó en el grupo restringido virgen en L14 (8.7  $\mu\text{g}$ ) en comparación al grupo no restringido (12.8  $\mu\text{g}$ ). La actividad por gramo de tejido de la proteasa miofibrilar no mostró diferencias significativas, solo tendencias a incrementar la actividad en el grupo no restringido como efecto de la lactancia. En el grupo restringido mostró mayor actividad en las ratas vírgenes pareadas en edad con las lactantes, los días 7, 14 y 21 de lactancia (28.3, 27.0, 40.0 U/g de tejido) en comparación al grupo lactante (22.2, 20.5, 20.5 U/g de tejido respectivamente). De lo anterior se concluyó que

la restricción crónica energético-proteínica no produjo el aumento esperado en el catabolismo de proteínas en los tejidos de la rata lactante. Además estas ratas lactantes crónicamente restringida ha desarrollado un mecanismo de ahorro que le permite movilizar sus proteínas a menor velocidad que la rata no restringida. Y los mecanismos que controlan la actividad proteolítica en los tres tejidos estudiados son diferentes.

## 1. INTRODUCCION

El organismo materno de los mamíferos realiza durante la gestación y la lactancia, una serie de cambios en su metabolismo, para que el crecimiento y desarrollo de las crías sea adecuado. En el periodo de la lactancia la madre provee a las crías de un volumen de leche con una composición específica para cada especie, y para sintetizarla, la glándula mamaria exige al organismo materno los nutrimentos necesarios (1,2). Para cubrir esa demanda, el organismo materno emplea dos vías principales la dieta y la movilización de las reservas corporales, las cuales son generalmente acumuladas durante el embarazo.

Con respecto a la dieta se sabe que las hembras de varias especies incluyendo al hombre, incrementan su ingesta de alimentos durante la lactancia, y en especial en la rata ese aumento alcanza un 300% en el último tercio de la lactancia (3,4).

En relación a las reservas corporales, se conoce que durante el embarazo, el organismo materno acumula tejido adiposo el cual es metabolizado durante la lactancia tanto para proveer energía como para la síntesis de los lípidos de la leche (3,5,6). Se ha sugerido que también las proteínas pueden formar reservas, sin embargo, este tema es controvertido.

Naismith y Morgan (1976), han sugerido que el organismo materno de la rata genera una reserva de proteínas durante los dos primeros tercios del embarazo la cual es utilizada en el último tercio de la gestación como apoyo al crecimiento del feto que es mayor en este periodo (7). Aunque no se ha ubicado el sitio específico de esas proteínas de reserva, se ha propuesto al músculo esquelético como un posible sitio, puesto que, este tejido constituye cerca del 25% de las proteínas totales del organismo y el 40% del peso corporal (8).

Varios autores han observado que durante la lactancia en la rata y el ratón, el organismo materno pierde proteína corporal a pesar de incrementar el consumo de alimento. Esa pérdida se acentúa cuando se restringe la ingesta de alimentos de la madre durante el embarazo y la lactancia y en ambos casos la pérdida solo puede explicarse por su hidrólisis (3,6,9-12).

Aunque se han demostrado cambios en la actividad de dos enzimas lisosomales en el hígado y la glándula mamaria de la rata lactante alimentada a libre demanda no existe información directa de la actividad proteolítica en los tejidos de la rata sujeta a una restricción energético proteínica (13,14)

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 Nutrición.

El periodo más importante de los mamíferos tras su nacimiento es la lactancia, la cual se caracteriza por producir un gran número de cambios fisiológicos en el organismo materno entre los cuales se incluyen un aumento en el gasto cardiaco, la hipertrofia del hígado, el corazón, los intestinos y la glándula mamaria (15) y otras alteraciones importantes en el metabolismo de los tejidos de la madre lactante que inducen en ella un aumento en la ingesta de alimentos (16).

Como resultado de esos cambios se encuentran disponibles en la circulación, una alta concentración de sustratos como son la glucosa, los triacilgliceroles, ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos los cuales son utilizados preferentemente por la glándula mamaria para sintetizar los diferentes componentes de la leche y para el mantenimiento del tejido glandular.

Existen en la leche cuatro componentes principales: las proteínas (caseína, lactalbumina, lactoglobulina e inmunoglobulinas), los lípidos, la lactosa y los minerales. A ellos se suman otros componentes como son: vitaminas, enzimas, nucleótidos, etc. (17)

### 2.2 Alteraciones metabólicas en la glándula mamaria durante la lactancia.

Durante el periodo de lactancia la glándula mamaria requiere de sustratos para sintetizar los principales componentes de la leche (lactosa, caseína y lípidos) en concentración suficiente para producir un crecimiento y desarrollo adecuado de sus crías. Para animales de laboratorio alimentados con una dieta "normal", la glándula mamaria es capaz de sintetizar toda la lactosa y la caseína y cerca del 50% de los lípidos de la leche (18), por lo que una reducción en cualquier componente de la dieta puede afectar la concentración de los nutrimentos de la leche.

Se ha calculado que en el periodo de máxima producción de la leche la captación de glucosa por la glándula mamaria es cercana a los 5.4 gramos en 24 horas

lo que equivale a 30 mmoles, de los cuales 7 son utilizados para la síntesis de lactosa y el resto para la síntesis de triacilgliceroles (19).

Esos grandes requerimientos de glucosala y los triacilgliceroles por la glándula durante la lactancia es el resultado de un incremento en la síntesis de lactosa y triacilgliceroles por la glándula para la leche lo que implica un aumento en la velocidad de captación de los sustratos por ese tejido aunado probablemente, a una disminución en el consumo de otros tejidos. Parte de esos requerimientos puede ser cubierta por la dieta y el resto se obtiene de la movilización de reservas corporales generadas durante el embarazo (20).

### 2.3 Alteraciones en el metabolismo del hígado durante la lactancia.

El hígado incrementa su peso cerca del 40% durante la lactancia y esa hipertrofia se ve acompañada por cambios en la actividad de varias enzimas involucradas tanto en el metabolismo de carbohidratos como en el de los lípidos, por ejemplo, la actividad de la glucocinasa aumenta en los días de máxima producción láctea mientras que la actividad de enzimas "clave" que participan en la gluconeogénesis disminuye o permanece constante. Esto sugiere que la glucólisis en el hígado de las ratas lactantes está aumentada.

También, la glucólisis hepática proporciona carbonos para la síntesis de ácidos grasos y dos de las enzimas involucradas en esa lipogénesis, la ATP-citrato liasa y la acetil-Coenzima A carboxilasa incrementan su actividad en el hígado en el periodo de mayor producción de leche (días 12-14 de lactancia). Estudios realizados "in vitro" han mostrado que la actividad de esas enzimas es dos veces mayor en los hepatocitos obtenidos de ratas lactantes si se compara con la actividad en las células obtenidas de ratas vírgenes (20).

### 2.4 Alteraciones en el metabolismo del músculo durante la lactancia.

Ya que el músculo esquelético representa el 40% de la masa corporal total y contiene el 25% de las proteínas totales del organismo, este tejido constituye una reserva de proteínas que puede ser utilizada por el organismo en diferentes condiciones de estrés, entre ellas, la lactancia. Roberts y Coward (21) y Grigor y col. (22) han

demostrado que una reducción en la concentración de proteínas en la dieta de la rata lactante produce la pérdida de proteína del músculo esquelético. Por otro lado diversos estudios, empleando diferentes metodologías (23-28), han observado la hidrólisis de proteínas musculares en el organismo intacto y han demostrado que la actina y la miosina son las proteínas principalmente hidrolizadas.

## 2.5 Metabolismo de proteínas.

Para mantener una concentración funcional intracelular de los diferentes tipos de macromoléculas, las células deben permanentemente sintetizar e hidrolizar cantidades adecuadas de cada macromolécula lo que les permite mantener un equilibrio dinámico, esta característica se hace más evidente en el caso de las proteínas, ya que cada una de ellas tiene una estructura primaria muy específica. Ambos procesos, síntesis e hidrólisis, se observan tanto en células maduras como en células en desarrollo, se realizan de forma continua y su velocidad depende de las funciones de cada célula y de los sustratos disponibles. El recambio de las proteínas se efectúa varias veces durante la vida de la célula.

La acción proteolítica puede observarse al menos en dos etapas de la vida de una proteína. En algunos casos la proteína recién sintetizada no es inmediatamente activa y es necesario que algún fragmento de esas proteínas sea removido para que el polipéptido se convierta en una proteína funcional. El caso más frecuente se presenta cuando se inician las modificaciones en la estructura de la proteína que conducen a su desnaturalización y como resultado de esto la proteína pierde su actividad biológica. Como resultado de esas modificaciones las proteínas comienzan a ser hidrolizadas en péptidos cada vez mas pequeños hasta producir aminoácidos que pueden ser reutilizados por la célula para la síntesis de nuevas proteínas o bien para ser metabolizados (29,30).

Es interesante hacer notar que mientras en la síntesis de las proteínas participa un mecanismo único, en su hidrólisis actúan varios sistemas intracelulares que pueden ser localizados en diferentes compartimentos celulares (lisosomal o no lisosomal) y cada uno de ellos requiere una señal específica que permite a las diferentes enzimas identificar a la o las proteínas que serán hidrolizadas (31).

## 2.6 Catabolismo de proteínas

Los sistemas proteolíticos intracelulares mejor conocidas son: el sistema de micro y macroautofagia en el que participan los lisosomas y que se involucra principalmente en la renovación de las estructuras celulares y los sistemas citoplasmáticos, el dependiente de ATP pero independiente de calcio que es el sistema de los proteasomas y la ubiquitina y el sistema independiente del ATP pero dependiente de calcio como son las calpaínas.

## 2.7 Los lisosomas y las catepsinas.

Los lisosomas son organelos producidos con la participación de los retículos endoplasmáticos y el aparato de Golgi, contiene un conjunto de enzimas hidrolíticas con pH óptimos ácidos, que pueden hidrolizar casi todos los biopolímeros presentes en las células (nucleasas, lipasas y proteasas que en este caso se llaman catepsinas) y participan entre otras funciones en la renovación de las estructuras y organelos celulares que han sido previamente endocitados.

Las catepsinas son proteasas cuya máxima actividad se muestra en la región ácida del pH (menor de 5) y se localizan en extractos acuosos de una gran cantidad de tejidos animales. Aunque algunas de estas enzimas utilizan "in vitro" sustratos sintéticos la mayoría de ellas requiere de proteínas desnaturalizadas como son la hemoglobina o la caseína. "In vivo" estas enzimas hidrolizan varias proteínas entre ellas la actina que constituye el 20 % de las proteínas miofibrilares musculares (32)

## 2.8 La proteasa miofibrilar.

Aproximadamente el 25 % de la proteína corporal es proteína muscular de la cual el 60 % es proteína miofibrilar y constituye una reserva de proteínas que puede ser movilizada. Son varios los sistemas enzimáticos que han sido involucrados en la degradación de las proteínas del músculo esquelético, entre ellas las catepsinas, las calpaínas y la proteasa miofibrilar (33,34).



Se ha demostrado que tanto en condiciones de desnutrición avanzada como de sepsis, se producen desarreglos de las proteínas miofibrilares produciéndose su hidrólisis y la posterior movilización de los aminoácidos, el mecanismo de esta respuesta a la sepsis permanece desconocido.

## 2.9 El sistema de la ubiquitina y los proteasomas.

Este sistema no lisosomal dependiente de ATP que fue originalmente identificado en los reticulocitos de conejo, y ha sido demostrado en una gran variedad de células eucariotas (37). Antes de que el complejo de los proteasomas inicie la hidrólisis de las proteínas, estas deben unirse a una pequeña proteína de 76 aminoácidos llamada ubiquitina (PM = 9 kDa). Su asociación con la ubiquitina identifica tanto a las proteínas anormales como a las proteínas que han sufrido modificaciones en su estructura secundaria o terciaria (38).

Aunque Wilkinson y Audhya (39) sugirieron que la ubiquitina se une a la histona H2A a través del grupo carboxilo de la glicina, Ciechanover y cols (40,41) han observado la unión de la ubiquitina a los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina y a los grupos N-terminal de las proteínas.

La conjugación de la ubiquitina con las proteínas por ser hidrolizadas requiere de que se forme la adenilil-ubiquitina, reacción que es catalizada por la enzima activadora de la ubiquitina (enzima E<sub>1</sub>) con la posterior formación de un enlace tioéster entre E<sub>1</sub> y la ubiquitina (complejo E<sub>1</sub>-Ub). Este proceso requirió la hidrólisis de ATP. La ubiquitina es transferida a la enzima E<sub>2</sub> (complejo E<sub>2</sub>-Ub) y esta ubiquitina "activada" es ahora transferida a las proteínas, este proceso es catalizado por el enzima E<sub>3</sub>. Este sistema queda bloqueado en condiciones donde se inhiba la síntesis de ATP (42).

## 2.10 Las calpaínas.

En el músculo, también se ha descrito la presencia de unas proteinasas neutras dependientes del calcio y que han sido llamadas calpaínas (CANPs). Estas enzimas se localizan en el sarcoplasma, y se cree que degradan las líneas Z de las miofibrillas y afectan ligeramente las líneas M sin causar algún otro cambio estructural evidente.

Las calpaínas degradan a la troponina, a la tropomiosina y a la proteína C , pero no hidrolizan a la actina, a la miosina o la  $\alpha$ -actina además, son las primeras proteasas musculares que se ha mostrado que degradan por completo ciertas proteínas miofibrilares purificadas, se ha sugerido que estas enzimas estén involucradas en la degradación intracelular de proteínas miofibrilares en el recambio de esas estructuras (35,36).

## 2.11 Lactancia.

Después del nacimiento, los mamíferos atraviesan un período crítico en donde la leche materna es su único alimento, el cual no puede ser fácilmente sustituido por otros alimentos debido a que la leche tiene propiedades laxantes y contiene anticuerpos que proporcionan al recién nacido un cierto grado de inmunidad pasiva. Además, la composición de la leche cubre las necesidades de las crías para que puedan mostrar un desarrollo rápido, siendo sus principales componentes : los lípidos, las proteínas, la lactosa y las sales minerales, los cuales varían en su concentración en el transcurso de la lactancia (43).

Los componentes proteínicos de la leche son sintetizados en las membranas del retículo endoplasmático rugoso, los componentes grasos se originan en el retículo liso formando pequeñas gotas que se movilizan hacia la región apical en donde son envueltas por una porción de la membrana celular después de lo cual son liberados al espacio alveolar.

La función de la glándula mamaria depende de múltiples y complejos factores neurales y endocrinos, algunos de los cuales participan en el desarrollo de las glándulas hasta alcanzar su estado funcional (mamogénesis), y otros son necesarios para mantener la lactancia La preparación de la lactogénesis involucra la secreción de la prolactina que es la hormona principal en la producción de la leche (17).

Se espera que durante la lactancia se produzca una cantidad adecuada de leche cuya composición, pueda satisfacer las necesidades nutricionales de los recién nacidos lo que les permitirá crecer y desarrollarse adecuadamente. Para sintetizar la cantidad necesaria de leche, la glándula mamaria debe ser abastecida de una gran cantidad de

nutrimentos que el organismo materno puede obtener de la dieta o de la movilización de las reservas corporales que son formadas durante el embarazo, por lo tanto, la dieta y el estado nutricional de la madre pueden afectar el volumen y la composición de la leche secretada (44,45,22).

Fomon ha observado que en una mujer desnutrida, el volumen de la leche secretada se ve disminuido pero el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos se ve poco afectado (46). El hecho de que en los países subdesarrollados las mujeres con desnutrición crónica produzcan leche, es una buena prueba de la capacidad del organismo materno para ajustarse a los niveles bajos de ingesta de alimentos. Esa adaptación puede incluir una mayor eficiencia en la absorción de los nutrimentos, el uso moderado de las reservas corporales, una disminución en la actividad física de la madre, un menor volumen de producción láctea y desafortunadamente la limitación en el crecimiento del infante (43).

En animales experimentales se han realizado estudios en los que se ha afectado el estado nutricional del animal lactante alimentándolo con dietas en las que se modifica la concentración de proteínas y carbohidratos, o bien se ha restringido la ingesta en forma aguda o crónica y se ha demostrado que algunas de esas condiciones comprometen el estado nutricional y el crecimiento de las crías ya que se afectan el volumen y la composición de la leche (44,45).

La restricción crónica de los alimentos se ha podido estudiar principalmente en modelos animales ya que en estos se puede tener un mejor control de las condiciones experimentales que simulan el estrés nutricional, que ha sido identificado en las mujeres lactantes que viven bajo condiciones severas de desnutrición en poblaciones rurales o en zonas marginadas. Se ha demostrado en esos estudios, que la restricción crónica afecta la concentración de proteína, lípidos y lactosa de la leche (44).

#### 2.12 Correlación en el metabolismo de los aminoácidos entre el músculo esquelético y el hígado.

El músculo esquelético constituye entre el 30 y el 40 % de la masa corporal de un organismo, contiene el 25% de las proteínas totales y por lo tanto algunos autores han sugerido que constituye la mayor reserva de proteínas. Cuando el organismo realiza ejercicio o se ve sujeto a un ayuno o a una dieta deficiente en proteínas, el músculo

realiza una serie de adaptaciones, dentro de las cuales aumenta el catabolismo de proteínas y los aminoácidos generados sirven como precursores para la gluconeogénesis (47-49).

Se ha descrito que en el tejido muscular el metabolismo de aminoácidos es muy activo, siendo el sitio de mayor oxidación de los aminoácidos alifáticos; este proceso se incrementa cuando el organismo ha sufrido un período de ayuno y los animales deben cubrir sus necesidades calóricas haciendo uso de las proteínas corporales disponibles. Los aminoácidos liberados en mayor proporción por la proteólisis muscular son la alanina y la glutamina (49) y son utilizados para la síntesis de proteínas del hígado, entre ellas, la albúmina (50).

### 2.13 Interrelación del músculo, hígado y glándula mamaria durante la lactancia.

Los nutrimentos necesarios para la síntesis de la leche son obtenidos de la circulación, ya que la mayor parte de ellos provienen de la dieta (20). Existe evidencia que muestra que durante la lactancia el organismo materno de varias especies, pierde masa muscular aún en aquellos organismos bien alimentados (51-54). Lo anterior significa que las proteínas musculares pueden ser hidrolizadas hasta aminoácidos, los cuales son transportados a la circulación de donde son captados por varios tejidos entre ellos la glándula mamaria en donde son utilizados para sintetizar las proteínas tanto del lactocito como de la leche (55) y para la síntesis de lípidos en este mismo tejido (56) o bien los aminoácidos pueden ser utilizados por el hígado y seguir dos posibles rutas, su inclusión en la poza de aminoácidos para la síntesis de proteínas o bien son oxidados y convertidos en ácidos grasos, de esta forma el hígado produce y transporta hacia la circulación proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, cuerpos cetónicos, glucosa y urea (55)

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Durante el embarazo y la lactancia el organismo materno realiza una serie de ajustes en su metabolismo que le permiten formar reservas corporales (proteínas y lípidos), para cubrir el desarrollo del feto en el primero y, el crecimiento y desarrollo de la cría en la segunda, a través de la síntesis de un volumen suficiente de leche cuya composición debe ser adecuada para la especie. Se ha descrito que durante esas etapas ocurre una pérdida de proteínas en el organismo materno, la cual solo puede explicarse por un incremento en la hidrólisis de proteínas. Trabajos previos mostraron que la catepsina D, una proteasa lisosomal, no incrementa su actividad durante la lactancia, sin embargo, la actividad de la proteasa miofibrilar mostró un aumento hacia el último tercio de la lactancia.

Cuando los organismos no disponen de una alimentación adecuada para cubrir sus requerimientos energéticos, son capaces de hidrolizar proteínas de sus tejidos para disponer de aminoácidos a partir de cuya oxidación pueden obtener energía. Estas condiciones podrían verse incrementadas en el organismo materno si, durante el embarazo y la lactancia se ve restringido en su ingesta energético-proteínica.

Se desconoce si una restricción energético-proteínica durante la lactancia, incrementa el catabolismo de las proteínas en el hígado, el músculo esquelético y la glándula mamaria de la rata madre.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general.

Estudiar la influencia de una restricción energético-proteínica crónica del 50%, sobre la hidrólisis de proteínas en el músculo, el hígado y la glándula mamaria de la rata madre durante la lactancia.

222862

#### 4.2. Objetivo particular.

Estudiar la influencia de la restricción energético-proteínica crónica del 50% sobre la actividad de la catepsina D y la proteasa miofibrilar, como indicadores del catabolismo de proteínas en el hígado, el músculo y la glándula mamaria de la rata lactante.

### 5. HIPOTESIS.

#### 5.1 Hipótesis general.

La restricción energético-proteínica crónica del 50% en la rata madre producirá un incremento en el catabolismo de las proteínas de sus tejidos durante la lactancia.

#### 5.2 Hipótesis particular.

Las ratas alimentadas crónicamente con una restricción energético-proteínica del 50% desde dos semanas antes del embarazo y hasta completar la lactancia mostrarán, durante la lactancia, un incremento en la actividad de la catepsina D y de la proteasa miofibrilar en el hígado, la glándula mamaria y el músculo esquelético.

## 6. MATERIAL Y METODOS.

### 6.1 Animales de experimentación.

Se realizó un diseño experimental prospectivo en el que se emplearon ratas blancas de la cepa Sprague-Dawley de 14 semanas de edad con un peso de  $260 \pm 20$  g las cuales fueron colocadas en jaulas colectivas con un máximo de ocho animales. El área se mantuvo a 22° C y con un ciclo luz-obscuridad de 12:12 h, iniciándose el periodo luminoso a las 7 :00 h. Los animales restringidos se colocaron en jaulas individuales, fueron alimentados con Nutricubos de Purina (23% de proteína, 3% de lípidos, 49% de hidratos de carbono, 6% de fibra) en las cantidades que se indican más adelante.

### 6.2 Grupos de estudio.

Los animales que cumplieron con el requisito de peso corporal (~240-280 g) fueron incluidos aleatoriamente en cualquiera de los siguientes grupos hasta cubrir un número de ocho animales por grupo. Desde la semana de adaptación (semana 14 de edad) hasta el día del sacrificio se registraron, tres veces a la semana, el peso de los animales y el consumo de alimento.

#### 6.2.1. Grupos control ( no restringidos ).

##### 6.2.1.1 Ratas vírgenes

Los animales fueron alimentados desde la semana 14 hasta la semana 22 con alimento comercial y agua ofrecidos a libre demanda.

##### 6.2.1.2 Ratas lactantes

Alcanzada la semana 16 los animales seleccionados fueron cruzados durante 7 días con ratas machos de la misma cepa. El registro del peso de los animales cada tercer día, permitió identificar a las hembras embarazadas.

El día del parto, que fue considerado el primer día de lactancia, se registró el peso de la camada y el número de crías que la formaban.

Ese mismo día se ajustó el número de crías a 8 animales por rata madre y desde ese día también se registró el incremento en el peso de la camada.

#### 6.2.2 Grupos experimentales ( restringidos ).

Estos grupos fueron alimentados diariamente desde la semana 14 hasta la semana 22 con el 50% del alimento ingerido por los grupos control.

##### 6.2.2.1 Ratas vírgenes

Animales restringidos no embarazados no lactantes.

##### 6.2.2.2 Ratas lactantes

Animales restringidos desde el período de adaptación, el embarazo y hasta el término de la lactancia.

#### 6.3 Sacrificio de los animales.

Los madres lactantes (controles y restringidas) fueron sacrificadas por dislocación cervical los días 7, 14 y 21 de la lactancia, fechas que representan el inicio de la lactancia, el tiempo de máxima producción de leche en la rata y el último día de la lactancia, respectivamente. Para evitar la influencia de variaciones los sacrificios se realizaron entre las 9:00 y las 10:00 h de la mañana. Inmediatamente después del sacrificio se disecaron el hígado, las glándulas mamarias (pectoral, abdominal e inguinal) y el paquete muscular completo de la extremidad posterior derecha. Los tejidos fueron conservados en recipientes de vidrio mantenidos en hielo a 4°C.

Los animales vírgenes fueron sacrificados en las fechas correspondientes a la edad de las ratas lactantes (pareados en edad).

Los tejidos fueron lavados con una solución de sacarosa 0.25 M amortiguada con 0.01 M de tris, pH 7.4 (AST), para eliminar la sangre y la leche que permanecían en los tejidos y posteriormente fueron cuidadosamente liberados tanto de tejido adiposo como de tejido conectivo. Todas las manipulaciones fueron realizadas en frío a 4°C.



#### 6.4 Preparación del homogeneizado para medir catepsinas.

El homogeneizado se preparó utilizando el método descrito por Iodice y Leang (57), para eso, el tejido previamente separado fue finamente cortado con tijeras, se tomaron muestras de 4 g, las cuales fueron colocadas en tubos de plástico e inmediatamente lavadas en varias ocasiones, con la solución AST, hasta que la solución sobrenadante quedó transparente.

En seguida los fragmentos fueron homogeneizados en cinco volúmenes (p/v) de la solución AST. Los homogeneizados se colocaron en frascos de vidrio y de inmediato se prepararon diluciones con la solución AST para ser utilizadas en la determinación de la actividad de la catepsina D. Las diluciones fueron de 1:3 para el hígado y 1:1 para la glándula mamaria. Los homogeneizados del músculo no se diluyeron. En este caso también, todas las manipulaciones se realizaron a 4°C.

#### 6.5 Determinación de la actividad de la catepsina D.

La actividad enzimática de la catepsina D se determinó utilizando, con algunas modificaciones, el método descrito por Iodice y Leang (57). Para eso, las diferentes fracciones fueron incubadas por una hora a 45° C con 2% de hemoglobina y 0.2% Tritón X-100 en presencia de un regulador de formato de sodio 0.177 M de pH 3.5. El volumen final fue de 1.1 mL.

Al finalizar la incubación, la reacción se detuvo por la adición de 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 3%. Se agregaron a cada tubo 0.25 mL de agua, se agitaron vigorosamente en un agitador tipo vortex y se incubaron nuevamente por 10 min. Terminado este periodo las muestras fueron centrifugadas a 3,000 xg max. durante 17 min. Un mililitro de cada sobrenadante fue colocado en tubos por separado a los cuales les fueron agregados 2 mL de hidróxido de sodio 0.63 M y 0.60 mL del reactivo de Folin diluido 1:3. Cinco minutos después se midió la absorbancia a 700 nm y las lecturas fueron interpoladas en una curva estándar de tirosina.

La actividad se informa como actividad específica ( $\mu\text{g}$  de tirosina liberados por miligramo de proteína por una hora de incubación), como actividad por gramo de tejido o como la actividad total contenida en todo el órgano en estudio.

## 6.6 Preparación semipurificada de la proteasa miofibrilar.

Se siguió el método descrito por Mayer y cols (58), con modificaciones sugeridas por Hall-Angeras y col. (59). Después de disecado, el paquete muscular de la extremidad posterior derecha de la rata fue mantenido a 4°C. Una vez que el tejido fue liberado de los tejidos graso y conectivo, se registró el peso del tejido y se cortó finamente.

Tres gramos del tejido cortado fueron homogeneizados (Tissumizer, Tekmar) con cinco volúmenes (p/v) de una solución que contiene fosfato de potasio 0.01 M y cloruro de potasio 0.05 M a pH 7.7 (AFP). El homogeneizado fue filtrado a través de organdi y posteriormente centrifugado por 20 minutos a 5000 xg max (Centrífuga Beckman J-6B).

El sedimento fue lavado dos veces con la solución AFP, pesado y resuspendido en un volumen de AFP equivalente a cuatro veces el peso de la fracción miofibrilar. Esta suspensión fue utilizada como fuente de la enzima.

## 6.7 Determinación de la actividad proteolítica.

La actividad fue determinada utilizando el método de Hall-Angeras col. (59) en donde se incuban a 37°C: en un volumen final de 1 mL, 0.2 mL de la fracción miofibrilar diluida 1 :4 con 0.2% de azocaseína en presencia de un amortiguador de glicina 0.05 M de pH 9.5 que contiene cloruro de potasio 0.6M. Después de 60 min, la reacción fue terminada por la adición de 2 mL de ácido tricloroacético al 5%. Los tubos fueron centrifugados durante 20 min a 3300 xg y en los sobrenadantes fueron identificados los productos liberados de la azocaseína por la acción de la enzima por su absorbancia a 366 nm .

La actividad específica de la enzima se informa como las unidades de absorbancia a 366 nm ( $A_{366}$ ) liberadas por cada mg de proteína durante la hora de incubación. La actividad también se informa como  $A_{366}$  liberadas por gramo de tejido húmedo o bien como el contenido total de la enzima en cada órgano.

## 6.8 Determinación de la concentración de proteínas en los homogeneizados.

La concentración de proteínas en los homogeneizados fue determinada utilizando las modificaciones sugeridas por Hartree al método de Lowry (60). Para eso, una alícuota de los homogeneizados fue previamente diluida 1:100 con agua; solamente la fracción semipurificada de la proteasa miofibrilar fue diluida 1:50. Muestras de 0.250 mL de los homogeneizados de todos los hígados y músculos y los de las glándulas de las ratas lactantes y de la fracción miofibrilar o 0.4 mL de los homogeneizados de las glándulas de las ratas vírgenes, fueron adicionadas de agua hasta alcanzar un volumen de un mililitro. Posteriormente se mezclaron con 0.9 mL de una solución que contiene 0.2% de tartrato de sodio y potasio y 10% de carbonato de sodio en hidróxido de sodio 1N. La mezcla se incubó a 50°C durante 10 min. Al término de ese tiempo, los tubos fueron colocados en el laboratorio refrigerado durante 5 min y después se les agregó 0.1 mL de una solución de tartrato de sodio y potasio al 0.2% y sulfato de cobre (pentahidratado) al 0.1%. Las mezclas fueron agitadas con un vortex y se dejaron reposar durante 10 min a la temperatura ambiente. Finalmente se agregaron a los tubos 3 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:16. Las mezclas fueron agitadas y sucesivamente incubadas a 50°C por 10 min y en el laboratorio refrigerado 10 min al término de lo cual se determinaron las absorbancias a 700 nm. Las lecturas fueron interpoladas en una curva estándar de albúmina de suero de bovino.

## 6.9 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en las ratas lactantes fueron contrastados con los datos de las ratas vírgenes y los resultados de los grupos restringidos con los no restringidos, a través de un análisis de varianza seguido de un análisis de la t de student. El valor mínimo de significancia fue de 0.05.

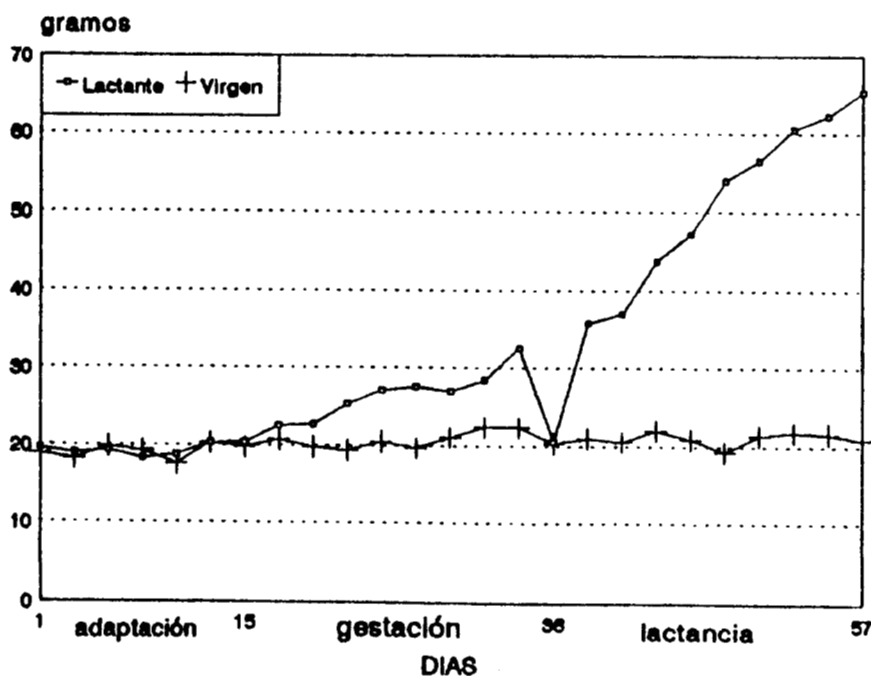
## 7. RESULTADOS.

### 7.1 Consumo de alimento.

El consumo de alimento de los grupos no restringidos tanto vírgenes como lactantes, durante las dos semanas de adaptación, fue de  $19.2 \pm 0.6$  g. Desde la primera semana de gestación se observó un incremento en la ingesta ( $21.8 \pm 1.2$  g) y fue en las dos semanas siguientes cuando se observaron los mayores consumos en los grupos de las ratas embarazadas ( $26.6 \pm 1.1$  y  $27.9 \pm 2.4$  g, respectivamente) mientras que la ingesta de los grupos de ratas vírgenes de la misma edad, se mantuvo constante ( $20.1 \pm 0.5$ ,  $19.8 \pm 0.5$  y  $21.9 \pm 0.7$  g, respectivamente). La rata embarazada disminuyó su consumo el día del parto ( $20.6 \pm 3.7$  g), para después incrementar constantemente la ingesta ( $38.8 \pm 4.2$ ,  $52.5 \pm 4.8$ ) hasta que en la última semana de la lactancia el consumo fue cercano al 300% ( $62.6 \pm 2.4$  g) del consumo de las ratas vírgenes de la misma edad ( $21.6 \pm 0.2$ ), se representan en la siguiente gráfica:

Gráfica 1

#### COMPARACION DEL CONSUMO DE ALIMENTO

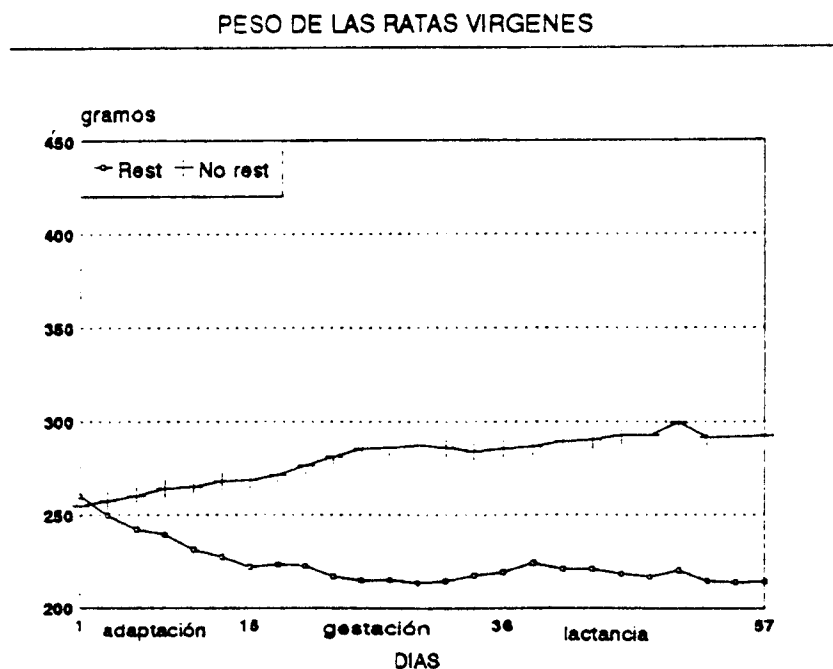


## 7.2 Peso corporal.

### 7.2.1 Ratas vírgenes.

Las ratas vírgenes no restringidas mostraron un incremento constante en el peso corporal desde la primera semana de adaptación (semana 15 de edad,  $257.5 \pm 2.1$  g) hasta la semana equivalente al final de la lactancia (semana 22 de edad,  $291.8 \pm 0.4$  g). Por el contrario, el peso de las ratas vírgenes restringidas disminuyó de forma drástica desde la primera semana de adaptación ( $245.8 \pm 8.3$  g) hasta la última semana de la lactancia (semana 22 de edad,  $214.0 \pm 0.3$  g). La caída es mas importante en las dos primeras semanas del estudio (gráfica 2).

Gráfica 2



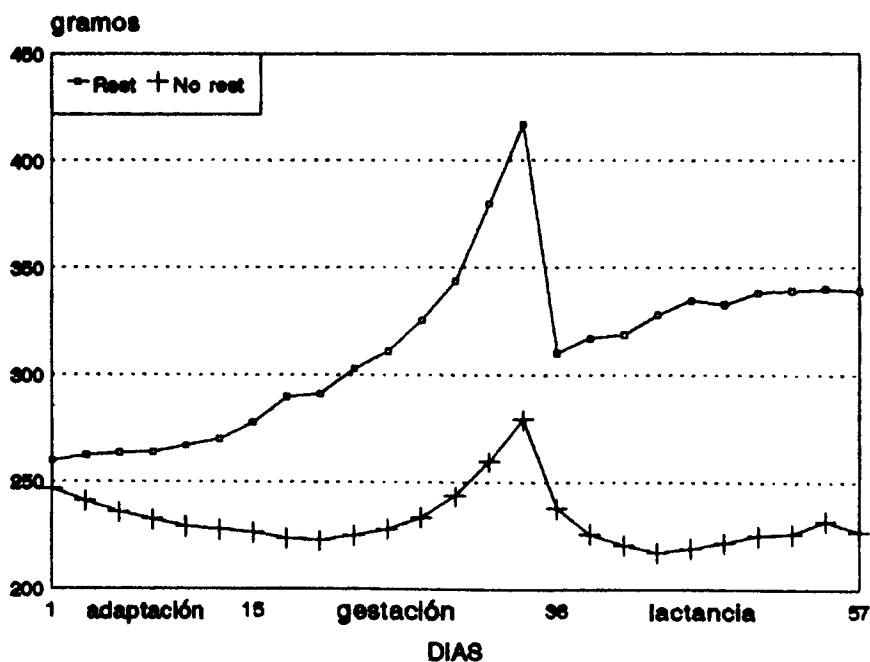
### 7.2.2 Ratas durante la gestación y la lactancia.

Durante el embarazo, todas las ratas ganaron peso, sin embargo la ganancia de peso en las ratas restringidas fue mucho menor considerando la ganancia hasta el día anterior del parto (36.8 g vs 93.5 de las no restringidas). En ambos casos, el mayor incremento en el peso de la rata gestante ocurrió en la última semana del embarazo (66.8 g para los animales no restringidos y de 32.2 para los restringidos ).

Después del parto, observamos que las ratas restringidas pierden peso desde el día del parto (237.9 ± 32.4 g) hasta el final de la primera semana de lactancia (217.3 ± 12.9 g) para posteriormente recuperar un poco de peso hacia el final de la lactancia (227.0 ± 11.8 g). En contraste los animales no restringidos ganaron permanentemente peso desde el segundo día de lactancia (310.3 ± 22.8 g) hasta el final de ella (338.2 ± 21 g), gráfica 3.

Gráfica 3

#### PESO DE LAS RATAS DURANTE LA GESTACION Y LA LACTANCIA



**7.3 Efecto de la restricción energético-proteínica sobre la fertilidad de la rata, el número y el peso de las crías en la camada.**

El cuadro 1 muestra que los animales restringidos tuvieron un porcentaje de embarazos mucho menor (14.4%) que los animales control (69.2%). Sin embargo, aunque la restricción no afectó significativamente el número de crías en las camadas (10.3 crías  $\pm$  1.2 de las ratas restringidas por 11.2  $\pm$  1.4 de los controles no restringidos), el peso de las camadas provenientes de las madre restringidas fue 25% menor ( $p < 0.002$ ) que las camadas control.

**Cuadro 1. Efecto de la fertilidad en la rata, el numero de crías y el peso de la camada.**

Grupo	n	Tasa de fecundidad <sup>1</sup>	Número de crías	Peso de la camada sin ajustar
No restringido	52	69.2	11.2 $\pm$ 1.4	87.0 $\pm$ 14.3
Restringido	132	14.4	10.3 $\pm$ 1.2	66.6 $\pm$ 8.6
p			0.22	0.0065

n representa el número de animales estudiados.

<sup>1</sup> representa los embarazos obtenidos / total de animales expuestos al macho

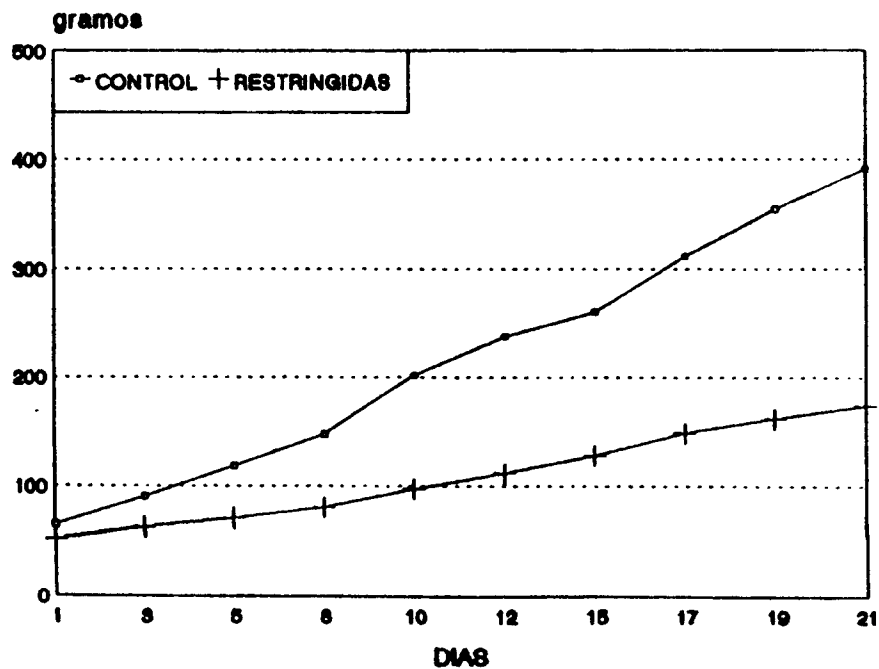
222862

#### 7.4 El crecimiento de las camadas utilizando como índice el peso corporal.

En la gráfica 4 se observa el cambio en el peso corporal de las crías desde el día de su nacimiento hasta el destete (día 21 de la lactancia). Como se indicó en el párrafo anterior, las crías restringidas mostraron una diferencia significativa en su peso desde el nacimiento ( $52.6 \pm 5.3$  g vs  $64.9 \pm 6.7$  g de la camada control ajustada,  $p < 0.001$ ), diferencia (12.3 g) que fue incrementándose hasta llegar al final de la lactancia (47, 121 y 191.4 g para la primera, segunda y tercera semanas de lactancia, respectivamente).

Gráfica 4

#### CRECIMIENTO DE LAS CAMADAS





## 7.5 Cambios en el peso de los tejidos.

### 7.5.1 Glándula mamaria

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 2 en donde se observa que la restricción en el consumo de alimento afectó de manera significativa el peso de la glándula mamaria tanto de las ratas vírgenes como de los animales lactantes en todas las edades estudiadas.

Como se esperaba, el tejido obtenido de las ratas lactantes mostró diferencias significativas con el tejido de las ratas vírgenes en todos los días estudiados, tanto en los grupos restringidos como en los no restringidos ( $p < 0.001$ ). Para los dos grupos, la mayor diferencia se observó el día 14 de la lactancia, mientras que el peso del tejido mamario en las ratas vírgenes no mostró diferencias significativas en todo el periodo estudiado.

Sin embargo, a pesar de que se observó un aumento en el peso de la glándula de las ratas restringidas, ese aumento solo alcanzó, en todas las semanas de lactancia, el 60% de los aumentos observados en las ratas no restringidas.

Cuadro 2. Cambios en el peso de la glándula mamaria durante la lactancia.

GRUPOS	Días de lactancia			
	7	14	21	
No restringida	Virgen	5.65 ± 1.40	5.24 ± 1.17	5.96 ± 0.96
	Lactante	13.85 ± 1.10 <sup>ooo</sup>	16.84 ± 2.62 <sup>ooo</sup>	15.80 ± 2.58 <sup>ooo</sup>
Restringida	Virgen	3.17 ± 0.99 <sup>***</sup>	3.40 ± 0.94 <sup>***</sup>	3.09 ± 0.96 <sup>***</sup>
	Lactante	5.85 ± 0.48 <sup>ooo</sup>	8.33 ± 2.57 <sup>oo</sup>	6.15 ± 1.19 <sup>ooo</sup>

Se muestra el promedio y la desviación estandar.

Comparación Restringido vs No restringido \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$

Comparación Lactante vs Virgen °  $p < 0.05$ , °°  $p < 0.01$ , °oo  $p < 0.001$

Se estudiaron seis animales en cada grupo.

### 7.5.2 Hígado.

El efecto de la restricción energético-proteínica sobre el peso del hígado de las ratas vírgenes y lactantes se muestra en el cuadro 3, en donde se observa que el peso del hígado de las ratas restringidas tanto vírgenes como lactantes, es inferior al de las ratas no restringidas.

La lactancia en los animales control mostró un efecto estimulante y el peso del tejido de las ratas lactantes fue significativamente mayor que el de los animales vírgenes, observándose un incremento progresivo al avanzar la lactancia ( 31,45 y 71% en la primera, segunda y tercera semana de lactancia, respectivamente). Sin embargo, en las ratas restringidas el incremento mayor se observó en el día 14 de lactancia cuando ocurre la máxima producción de leche ( 32,41 y 28%).

Cuadro 3. Cambios en el peso del hígado durante la lactancia.

GRUPOS	Días de lactancia			
	7	14	21	
No restringida	Virgen	10.76 ± 0.74	10.36 ± 0.72	9.80 ± 0.62
	Lactante	14.18 ± 1.60 <sup>ooo</sup>	15.04 ± 1.33 <sup>ooo</sup>	16.80 ± 2.62 <sup>ooo</sup>
Restringida	Virgen	6.11 ± 0.52 <sup>***</sup>	7.01 ± 2.32 <sup>***</sup>	6.01 ± 0.78 <sup>***</sup>
	Lactante <sup>o</sup>	8.07 ± 1.08 <sup>***</sup>	9.90 ± 2.74 <sup>***</sup>	7.75 ± 0.94 <sup>oo</sup> <sup>***</sup>

Se muestra el promedio y la desviación estandar.

Comparación Restringido vs No restringido \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

Comparación Lactante vs Virgen <sup>o</sup> p<0.05, <sup>oo</sup> p<0-01, <sup>ooo</sup> p<0.001

Se estudiaron seis animales en cada grupo.

### 7.5.3 Músculo

El cuadro 4 muestra el efecto de la alimentación de las ratas con la restricción energético-proteínica del 50% sobre el peso del paquete muscular de la extremidad posterior derecha.

Se puede observar que en las ratas vírgenes no restringidas no se observaron cambios durante la lactancia, pero los animales restringidos mostraron una disminución significativa en el peso del músculo en toda la lactancia.

El peso del paquete muscular de las ratas lactantes no restringidas no mostró cambios a lo largo de la lactancia, es más, el peso del tejido no fue significativo en comparación al peso del tejido en la ratas vírgenes de la misma edad. El tejido de las ratas restringidas lactantes mostró un peso menor al de las ratas lactantes no restringidas con diferencia estadísticamente significativa en los 7 y los 21 días, aún al de sus grupos vírgenes pareados en edad, sin embargo a los 14 días no se observa diferencia.

Cuadro 4. Cambios en el peso del paquete muscular de la pata trasera durante la lactancia

GRUPOS	Días de lactancia			
	7	14	21	
No restringida	Virgen	10.47 ± 0.69	10.63 ± 2.44	11.01 ± 2.29
	Lactante	9.52 ± 1.71	10.87 ± 2.13	10.93 ± 1.78
Restringida	Virgen	10.71 ± 1.87**	9.75 ± 1.44	8.76 ± 1.24*
	Lactante	7.19 ± 0.35 <sup>ooo</sup>	9.21 ± 2.43	7.16 ± 1.46 <sup>***</sup>

Se muestra el promedio y la desviación estandar.

Comparación Restringido vs No restringido \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

Comparación Lactante vs Virgen ° p<0.05, °° p<0-01, °°° p<0.001

Se estudiaron seis animales en cada grupo

## 7.6 Consumo de proteína.

La cantidad de proteína ingerida por los diferentes grupos estudiados se muestra en el cuadro 5. La ingesta recomendada por el National Council Research (NCR) para una rata adulta es de 4 gramos al día y se puede observar que las ratas vírgenes no restringidas mantienen un consumo cercano a la recomendación desde la primera semana de adaptación (semana 15) hasta la semana 22 (equivalente a la última semana de lactancia).

El grupo gestante aumenta ligeramente su ingesta en la primera semana (12%) pero muestra incrementos mayores en las dos semanas siguientes (40 y 54%, respectivamente). Las semanas de lactancia muestran, como era de esperarse, incrementos notables en la ingesta de proteínas y alcanzan ingestas de 8.9, 12 y 14.4 g lo que corresponde a 204, 275 y 330% de la ingesta en el período de adaptación.

Dado que las ratas restringidas recibieron el 50% del alimento del grupo no restringido, el grupo virgen mantuvo una ingesta de 2.3 g por día, cantidad inferior a la recomendación. Esta ingesta inferior se mantuvo durante toda la gestación mientras que en las tres semanas de lactancia, la ingesta fue superior a la recomendación.

## 7.7. Consumo de energía

El cuadro 6 muestra el consumo de energía en kcalorías por día de los grupos en estudio. El consumo por los animales del grupo no restringido durante las dos semanas de adaptación fue de  $60.21 \pm 2.60$  Kcal/día, en promedio. Las ratas gestantes mostraron un incremento principalmente en las dos últimas semanas del embarazo (39 y 53%, respectivamente), mientras que para las tres semanas de la lactancia los incrementos fueron de 103, 175 y 197%, respectivamente. El consumo de las ratas vírgenes restringidas se mantuvo todo el tiempo muy cerca de 32.19 kcal/día mientras que el consumo de las ratas lactantes, como era de esperarse, se incrementa hasta alcanzar un 300% del consumo en el periodo de adaptación.

**Cuadro 5. Consumo de proteína por las ratas no restringidas y restringidas durante los periodos de adaptación, embarazo y lactancia.**

		Consumo de proteína (gramos)			
		<u>No restringidas</u>		<u>Restringidas</u>	
Periodo	Semana	Virgen	Lactante	Virgen	Lactante
Adaptación	1	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.1	2.1 ± 0.0	2.2 ± 0.0
	2	4.3 ± 0.3	4.3 ± 0.2	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1
Gestación	1	4.5 ± 0.1	4.9 ± 0.3	2.2 ± 0.0	2.5 ± 0.1
	2	4.5 ± 0.1	6.1 ± 0.2	2.3 ± 0.0	2.9 ± 0.2
	3	5.0 ± 0.1	6.7 ± 0.6	2.4 ± 0.1	3.4 ± 0.3
Lactancia	1	4.8 ± 0.1	8.9 ± 0.9	2.3 ± 0.0	4.4 ± 0.4
	2	5.4 ± 1.4	12.0 ± 1.0	2.4 ± 0.0	6.0 ± 1.0
	3	4.9 ± 1.4	14.4 ± 0.5	2.4 ± 0.0	7.5 ± 0.6

Se muestra el promedio y la desviación estandar.  
Se estudiaron seis animales en cada grupo.

**Cuadro 6. Consumo de energía por las ratas no restringidas y restringidas durante los periodos de adaptación, embarazo y lactancia.**

		Consumo de energía ( kcal/día )			
		<u>No restringidas</u>		<u>Restringidas</u>	
Periodo	Semana	Virgen	Lactante	Virgen	Lactante
Adaptación	1	59.7 ± 2.5	60.8 ± 0.9	29.9 ± 0.9	30.6 ± 0.3
	2	60.0 ± 4.3	60.2 ± 3.2	29.7 ± 1.4	32.2 ± 0.9
Gestación	1	63.3 ± 1.6	68.8 ± 4.0	31.1 ± 0.1	35.2 ± 1.7
	2	62.5 ± 1.7	83.9 ± 3.7	32.8 ± 1.0	40.4 ± 2.5
	3	69.2 ± 2.3	92.4 ± 9.2	33.9 ± 1.4	47.3 ± 4.1
Lactancia	1	66.7 ± 2.2	122.3 ± 13.4	32.3 ± 0.8	60.8 ± 6.0
	2	75.2 ± 19.4	165.6 ± 15.1	34.2 ± 1.1	82.9 ± 14.2
	3	67.5 ± 1.5	179.4 ± 7.6	33.7 ± 0.8	104.2 ± 8.1

Se muestra el promedio y la desviación estandar  
Se estudiaron seis animales en cada grupo.

## **7.8. Cambios en la actividad de la catepsina D.**

### **7.8.1 Actividad específica.**

#### **7.8.1.1 Glándula mamaria.**

El cuadro 7, muestra las modificaciones en la actividad de la proteasa lisosomal por efecto de la lactancia. La actividad en el tejido de las ratas vírgenes no restringidas no mostró ninguna modificación en los días equivalentes a los 7, 14 y 21 días de lactancia mientras que la actividad en los animales vírgenes restringidos mostró valores de actividad mayor que los no restringidos, sin embargo, las diferencias significativas solo se obtienen a las edades equivalentes a los 14 y 21 días de lactancia, principalmente en esta última fecha.

La lactancia, como se esperaba, muestra un efecto muy importante sobre la actividad específica de la enzima cuando se compara con la actividad de los animales vírgenes obteniéndose incrementos en todas las edades (7, 14 y 21 días de lactancia). Las ratas lactantes no restringidas mostraron incrementos significativos de 230, 365 y 223 %, respectivamente mientras que las diferencias en los animales restringidos fueron de 235, 262% en los días 7 y 14 de lactancia pero no se observa ningún cambio al 21 día de lactancia, dado que la actividad en la glándula mamaria virgen fue muy alta.

#### **7.8.1.2 Hígado**

El cuadro 8 compara las actividades obtenidas en los homogeneizados obtenidos del hígado de los animales. La actividad en el tejido de las ratas virgen mostró un ligero incremento con la edad ( $46.3 \pm 14.8$  a  $63.9 \pm 26.8$   $\mu\text{g}$  tirosina liberados/mg de proteína), pero sin ninguna significancia. En este caso la restricción no produjo ninguna modificación en la actividad y los valores obtenidos en el tejido de las ratas vírgenes restringidas muestra valores similares a los obtenidos en las vírgenes no restringidas.

Como consecuencia de la lactancia, el tejido obtenido de los grupos no restringidos mostró un incremento en la actividad específica de la catepsina D de 100, 43 y 46 % para los días 7, 14 y 21 de la lactancia, respectivamente. La rata lactante restringida mostró incrementos en su actividad en los días 7 y 14 de la lactancia al compararse con los animales vírgenes, sin embargo no se observó ninguna diferencia el día 21 de la lactancia debido esencialmente a que el valor en el tejido de las ratas

vírgenes de esa edad, fue de nuevo, muy alto. La restricción en la alimentación de los animales no reflejó ningún efecto en la actividad de la catepsina D en el hígado.

**Cuadro 7. Efecto de la restricción energético-proteínica sobre la actividad específica de la catepsina D en la glándula mamaria de la rata durante la lactancia.**

Días de lactancia	Actividad de catepsina D ( $\mu\text{g}$ tirosina liberada/mg proteína)			
	<u>No restringidas</u>		<u>Restringidas</u>	
	Virgen	Lactante	Virgen	Lactante
7	33.1 $\pm$ 11.8	109.4 $\pm$ 39.3 <sup>ooo</sup>	54.1 $\pm$ 24.5	127.3 $\pm$ 17.9 <sup>oo</sup>
14	28.47 $\pm$ 8.2	132.6 $\pm$ 27.5 <sup>ooo</sup>	56.2 $\pm$ 26.0*	147.7 $\pm$ 67.4 <sup>o</sup>
21	49.96 $\pm$ 21.2	111.7 $\pm$ 29.6 <sup>ooo</sup>	151.4 $\pm$ 65.2**	153.4 $\pm$ 51.0

Se muestra el promedio y la desviación estandar.  
 Restringida vs No restringida \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 Lactante vs Virgen °  
 Se estudiaron seis animales en cada grupo.

### 7.8.1.3 Músculo

Este tejido mostró la menor actividad de catepsina D de los tres tejidos estudiados. Las ratas vírgenes no restringidas no mostraron cambios en la actividad con la edad y aunque las ratas vírgenes restringidas mostraron valores ligeramente inferiores a los no restringidos, la diferencia no es significativa.

En este tejido la lactancia no presentó ningún efecto sobre la actividad enzimática por lo que no se observaron cambios significativos ni en los animales lactantes no restringidos ni en los animales lactantes restringidos.



**Cuadro 8. Efecto de la restricción energético-proteínica sobre la actividad específica de la catepsina D en el hígado de la rata lactante.**

Días de lactancia	Actividad de catepsina D ( $\mu\text{g}$ tirosina liberada/mg proteína)			
	<u>No restringidas</u>		<u>Restringidas</u>	
	Virgen	Lactante	Virgen	Lactante
7	46.3 $\pm$ 14.8	92.6 $\pm$ 18.6 <sup>ooo</sup>	55.8 $\pm$ 10.7	85.8 $\pm$ 27.6 <sup>o</sup>
14	54.7 $\pm$ 12.7	78.7 $\pm$ 12.3 <sup>oo</sup>	48.1 $\pm$ 9.9	70.4 $\pm$ 36.4
21	60.6 $\pm$ 21.4	93.4 $\pm$ 27.2 <sup>oo</sup>	74.0 $\pm$ 25.1	75.3 $\pm$ 36.4

Se muestra el promedio y la desviación estandar.  
Lactante vs virgen <sup>o</sup>p<0.05 <sup>oo</sup>p<0.01  
Se estudiaron seis animales en cada grupo.

## 7.8.2 Contenido total de la enzima en los diferentes tejidos.

### 7.8.2.1 Glándula mamaria

En el cuadro 10, se observa de manera muy marcada el efecto de la lactancia en el contenido enzimático de la glándula mamaria durante los días 7, 14, 21 de la lactancia.

Primero, se puede ver que la actividad en los animales vírgenes restringidos es menor a la actividad mostrada por el tejido de los animales no restringidos y en segundo lugar que la lactancia tiene una influencia positiva produciendo un incremento del contenido de la enzima. Llama la atención que el contenido se incrementa en el tejido de los animales no restringidos desde los 7 días de la lactancia (9.4 veces más que su respectivo control pareado en edad), obteniendo el mayor contenido el día 14 de la

222862

lactancia ( 22.4 veces mayor que su control virgen y 46 % mayor que el tejido a los 7 días de lactancia) para disminuir hacia el final de la lactancia ( 8 veces más que el control pareado en edad pero representa el 60% de la actividad observada el día 14).

**Cuadro 9. Efecto de la restricción energético-proteínica sobre la actividad específica de la catepsina D en el músculo de la rata lactante.**

Días de lactancia	Actividad de catepsina D ( $\mu\text{g}$ tirosina liberada/mg proteína)			
	<u>No restringidas</u>		<u>Restringidas</u>	
	Virgen	Lactante	Virgen	Lactante
7	11.7 $\pm$ 2.9	13.4 $\pm$ 3.3	9.8 $\pm$ 4.9	14.3 $\pm$ 5.7 <sup>o</sup>
14	12.8 $\pm$ 3.1	10.8 $\pm$ 4.2	8.7 $\pm$ 2.7*	11.9 $\pm$ 4.7
21	11.5 $\pm$ 2.6	15.2 $\pm$ 3.3	13.4 $\pm$ 4.7	11.6 $\pm$ 4.0

Se muestra el promedio y la desviación estandar.  
Lactante vs virgen \*p<0.05 \*\*p<0.01  
Se estudiaron seis animales en cada grupo.

Las ratas restringidas lactantes mostraron también un incremento en el contenido de la actividad al compararlos con las ratas vírgenes pero la actividad no alcanzó en ninguna edad el contenido obtenido en los tejidos de los animales no restringidos. Por ejemplo, aunque el aumento que se observa a los 7 días de la lactancia es de 25 veces el valor de su rata pareada en edad, el valor de la actividad total (74.34  $\pm$  13.45 mg de tirosina/ todo el órgano) este valor representa el 55% del incremento en la rata no restringida de la misma edad.

### 7.8.2.2 Hígado

El cuadro 11 muestra que la actividad total de catepsina D en el hígado de las ratas restringidas es significativamente menor que la actividad en las ratas no restringidas, mostrando poca variación con la edad.

La lactancia muestra un efecto muy importante en ambos grupos incrementando la actividad total. Aunque los valores en el tejido de las ratas restringidas continúan siendo menores que en las ratas no restringidas, la proporción de aumento por efecto de la lactancia es similar en ambos grupos observándose como diferencia el patrón de la respuesta. Mientras el mayor incremento se observa a los 14 días de lactancia en las ratas restringidas (124%), en el grupo control se muestra a los 21 días (145%).

Cuadro 10. Efecto de la restricción energético-proteínica sobre la actividad total de la catepsina D en la glándula mamaria de la rata lactante.

Días de lactancia	Actividad de catepsina D (mg de tirosina liberada/todo el órgano)			
	<u>No restringidas</u>		<u>Restringidas</u>	
	Virgen	Lactante	Virgen	Lactante
7	14.3 ± 11.9	135.5 ± 22.4 <sup>ooo</sup>	2.95 ± 0.9*	74.3 ± 13.4* <sup>ooo</sup>
14	8.87 ± 5.1	199.1 ± 43.1 <sup>ooo</sup>	6.98 ± 1.93	90.8 ± 38.5 <sup>ooo</sup>
21	14.6 ± 5.3	118.9 ± 81.1 <sup>ooo</sup>	5.37 ± 2.3***	95.7 ± 37.9 <sup>ooo</sup>

Se muestra el promedio y la desviación estandar.  
 Restringida vs No restringida \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 Lactante vs Virgen  
 Se estudiaron seis animales en cada grupo.

### 7.8.2.3 Músculo

Este tejido mostró el contenido enzimático más bajo de los tres tejidos estudiados, observándose en las ratas vírgenes restringidas una actividad significativamente menor ( $p < 0.001$ ) que las ratas no restringidas, cuadro 12.

La lactancia mostró efectos diferentes en ambos grupos, mientras se observó un incremento significativo (69%,  $p < 0.05$ ) en las ratas restringidas, en las ratas no restringidas no hubo cambios o la actividad mostró una tendencia a disminuir.

**Cuadro 11. Efecto de la restricción energético-proteínica sobre la actividad total de la catepsina D en el hígado de la rata lactante**

Días de lactancia	Actividad de catepsina D (mg de tirosina liberada/órgano total)			
	No restringidas		Restringidas	
	Virgen	Lactante	Virgen	Lactante
7	92.3 ± 22.5	165.1 ± 19.3 <sup>∞</sup>	59.7 ± 24.1*	112.6 ± 21.8 <sup>**</sup>
14	100.6 ± 22.9	167.8 ± 21.1 <sup>∞∞</sup>	46.1 ± 13.9 <sup>***</sup>	103.4 ± 45.3 <sup>°</sup>
21	78.7 ± 27.6	193.2 ± 29.1 <sup>∞∞</sup>	66.5 ± 15.9	102.3 ± 32.4 <sup>***</sup>

Se muestra el promedio y la desviación estandar.

Restringida vs No restringida \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  Lactante vs Virgen<sup>°</sup>

Se estudiaron seis animales en cada grupo.

**Cuadro 12. Efecto de la restricción energético-proteínica sobre la actividad total de la catepsina D en el músculo de la rata lactante**

Días de lactancia	Actividad de catepsina D (mg de tirosina liberada/órgano total)			
	No restringidas		Restringidas	
	Virgen	Lactante	Virgen	Lactante
7	18.3 ± 1.3	15.6 ± 1.5	8.8 ± 2.5***	13.9 ± 3.2
14	18.6 ± 4.7	15.0 ± 4.3	8.2 ± 0.9***	13.8 ± 5.7
21	19.7 ± 6.2	18.9 ± 2.7	12.8 ± 3.8*	12.8 ± 6.5

Se muestra el promedio y la desviación estandar.  
 Restringida vs No restringida \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 Lactante vs Virgen°  
 Se estudiaron seis animales en cada grupo.

## 7.9 Cambios en la actividad de la proteasa miofibrilar.

### 7.9.1 Actividad por gramo de tejido.

En el cuadro 13, se observa que la actividad de esta enzima en las ratas vírgenes no restringidas se incrementa con la edad y que los animales restringidos muestran un incremento adicional en todas las edades, sin embargo, aunque la tendencia es evidente las desviaciones observadas impiden reconocer las diferencias. Resulta interesante que los valores obtenidos en el tejido de las ratas lactantes no restringidas también aumenta pero los niveles de actividad son parecidos a los obtenidos con las ratas vírgenes restringidas. Las ratas lactantes restringidas muestran actividades similares a los de las ratas lactantes no restringidas, manteniéndose la actividad constante en todos los días estudiados.

**Cuadro 13. Efecto de la restricción energético-proteínica sobre la actividad de la proteasa miofibrilar en el músculo esquelético de la rata**

	Actividad de la proteasa miofibrilar (U/g de tejido)			
Días de lactancia	No restringidas		Restringidas	
	Virgen	Lactante	Virgen	Lactante
7	10.5 ± 5.3	23.5 ± 10.2	28.3 ± 17.4	22.2 ± 4.3
14	15.3 ± 8.7	25.7 ± 15.7	27.0 ± 8.4	20.5 ± 8.9
21	24.2 ± 16.8	44.0 ± 27.9	40.0 ± 28.2	20.5 ± 11.7

Se muestra el promedio y la desviación estandar.  
Se estudiaron seis animales en cada grupo

## 8. DISCUSION.

### 8.1 Efecto de la lactancia sobre el consumo de alimento.

Una característica del período de la lactancia es el incremento en la ingesta de alimento de la madre (Williamson 1980) aumento que es necesario junto con la movilización de las reservas corporales para proporcionar a la glándula mamaria los nutrientes necesarios para la biosíntesis de la leche (6, 22, 61). Nuestro estudio confirma las observaciones de otros grupos pues observamos que durante la lactancia las ratas lactantes incrementaron constantemente su ingesta y en la última semana el alimento consumido fue de  $62.6 \pm 2.4$  g lo que representa tres veces la cantidad ingerida por las ratas control (no embarazadas, no lactantes, pareadas en edad,  $21.6 \pm 0.2$  g).

### 8.2 Efecto de la restricción sobre la fecundidad en la rata.

En un estudio realizado por Young y Rasmussen, informan que una restricción energético proteínica del 50% en las ratas afecta la tasa de fecundidad de la rata en un 56.5 %, en comparación con las ratas alimentadas a libre demanda (12,62). Esos datos concuerdan parcialmente con nuestros resultados en donde la tasa de concepción de las ratas restringidas fue de 14.3%. Esta diferencia podría estar relacionada con el tipo de dieta suministrada en los dos estudios, ya que nosotros utilizamos un alimento comercial mientras que Young y Rasmussen utilizaron una dieta purificada. De acuerdo con Gupta y colaboradores la reducción en la fecundidad puede estar ocasionada ya sea porque la rata restringida libere un menor número de óvulos o bien porque hay una deficiencia en la implantación (63).

### **8.3 Efecto de la restricción sobre el peso corporal de la madre y la camada.**

En varias especies de mamíferos durante la lactancia se ha observado una pérdida de proteína corporal, en las ratas esa pérdida se ha observado en diferentes tejidos (3, 6, 10, 50, 53). Si la madre presenta desnutrición durante el embarazo, la pérdida de peso corporal materno es menor, en proporción, a la reducción en el peso de los fetos. Esto se ha interpretado como que el organismo materno puede mantener los nutrimentos disponibles en compartimentos diferentes para evitar que los fetos agoten los almacenes maternos (61).

El impacto de la restricción también afecta el periodo de lactancia y en el presente estudio observamos que al restringir a las ratas con el 50% del alimento, iniciando la restricción dos semanas antes de la cruce y hasta el término de la lactancia, se provocó una desnutrición materna que afectó el peso de las crías al nacimiento y un pobre crecimiento durante la lactancia, lo que concuerda con lo observado por Roberts y Cowrad y Sadurskis, quienes refieren una disminución en el peso de la madre y de las crías durante la lactancia cuando se aplicó una restricción del 30%, proponiendo que el crecimiento anormal de las crías puede ser el resultado de una reducción en la producción de leche (21, 62), sin embargo Sadurskis y colaboradores no encontraron ninguna diferencia en la composición de la leche de los dos grupos de ratas, por lo que parece poco probable que el factor responsable del crecimiento desigual de las crías en el grupo restringido, sea exclusivamente la pobre calidad de la leche (2,64).

### **8.4 Efecto sobre el peso de los tejidos.**

Es bien sabido que la restricción del alimento en forma aguda o crónica, produce grandes cambios en el peso de varios tejidos ya que la actividad metabólica decae con la restricción (22) y con la edad (50). Las diferencias significativas observadas en el peso de la glándula mamaria y del hígado de los animales restringidos, es debido según Elia (50) al ajuste que realiza el organismo para que el peso de los órganos sea proporcional al peso corporal lo que podría significar que las diferencias en la velocidad metabólica puede ser explicada por un cambio en el tamaño del órgano.

La restricción de alimento marca grandes cambios en el hígado de la rata que parece estar relacionado con la ingesta de alimento (22).



Durante el período de lactancia la síntesis de proteínas en la glándula mamaria es fuertemente estimulada y ese estímulo se observa también en la masa proteínica del hígado, del músculo esquelético y del tracto gastrointestinal. Durante la gestación y la lactancia tanto el tracto gastrointestinal como el hígado muestran un marcado aumento en el peso mientras que, el crecimiento del músculo esquelético es lento.

Millican y colaboradores estimaron que el peso del hígado el día 15 de la lactancia, correspondió al 8.3% del peso corporal total de la rata alimentadas a libre demanda, porcentaje mayor al 4.9% del mismo tejido pero en el animal virgen (65). Nuestros resultados mostraron una diferencia importante ya que el porcentaje calculado para el hígado de la rata virgen fue de 3.85% mientras que el de la rata lactante fue de 4.5%, como se ve el incremento es de solo 16% mientras Millican y col. obtuvieron un incremento del 70%; la diferencia en los resultados podría estar determinada por las diferencias en las especies estudiadas, es más, nuestros resultados en las ratas restringidas muestra que el porcentaje de aumento en el peso del hígado de las ratas restringidas con respecto al peso corporal total de la rata fue de 3.2% para los animales vírgenes y de 4.3% para las ratas lactantes. Como se ve estos resultados son muy parecidos a los obtenidos con los animales no restringidos lo cual podría confirmar que las diferencias pueden estar relacionadas con la especie.

Millican y col. proponen que el aumento en el peso del hígado es resultado tanto de la hiperplasia y de la hipertrofia de las células existentes.

La glándula mamaria de la rata lactante, como era de esperarse, es el tejido que mostró las mayores diferencias con respecto al tejido en el animal virgen, es importante señalar que los mayores aumentos durante la lactancia se observaron en el día 14 de lactancia (145% para la restringida vs 221% para las no restringidas), que es el periodo, en la rata, donde se observa la mayor producción de leche. Los incrementos observados en las ratas restringidas son 40% mas bajos que los incrementos en los tejidos de las ratas no restringidas. Ya que se conoce que durante la lactancia los animales no restringidos muestran un aumento tanto en el gasto cardiaco como en el flujo sanguíneo en la glándula mamaria (15), esto podría justificar las diferencias observadas en este estudio en el peso de este tejido entre los grupos no restringidos y restringidos.

Algunos autores han sugerido al músculo como la principal reserva corporal de proteínas ya que constituye el 25% del total de las proteínas corporales. Se ha descrito

que esta reserva contribuye a la poza corporal de aminoácidos libres durante la lactancia ya que en esta etapa el organismo materno requiere de proteínas y energía en cantidades suficientes para abastecer de aminoácidos a la glándula mamaria para que esta pueda realizar la síntesis de proteínas de la leche (5). Por lo anterior y, tomando en consideración que el músculo es un tejido con un metabolismo de los aminoácidos muy activo (28) se esperaría una fuerte reducción en el peso de este tejido en la rata lactante restringida.

Sin embargo, nuestros resultados muestran que el músculo fue el tejido que mejor se conservó durante la lactancia en condiciones de restricción.

Por lo tanto, Tawa y colaboradores estudiaron en ratas macho, el efecto de la alimentación por siete días con una dieta de 1% de  $\alpha$ -lactalbumina sobre el catabolismo y el recambio de proteínas en algunos músculos, cabe mencionar que esa concentración de proteínas limita el crecimiento de los animales. Sus resultados mostraron que aún en esas condiciones, el peso de dos músculos, el soleo y el extensor largo digital, no es modificado mientras que el peso del hígado sufre una disminución del 33%. El estudio del catabolismo y la síntesis de las proteínas que fue realizado en rebanadas de los músculos (soleo, extensor largo digital y diafragma) mostró una reducción de ambos procesos en el músculo de los animales alimentados con la dieta deficiente en proteínas (28,49).

#### 8.5 Catabolismo de proteínas.

Para que los aminoácidos de las proteínas sean movilizados hacia los tejidos que los requieren es necesario que las proteínas sean hidrolizadas. Son varios los sistemas que participan en el catabolismo de las proteínas y en nuestro estudio se analizaron dos de esos sistemas en función de la experiencia previa de nuestro grupo (14) además se considera de importancia que en la literatura no hay información de estos procesos durante la lactancia.

Nuestros datos mostraron que la actividad de catépsina D en los tres tejidos estudiados se ve afectada de manera diferente por la lactancia y por la restricción energético-proteínica. Observamos que la actividad basal en los días equivalentes al día 14 de la lactancia (en los animales vírgenes pareados en edad, no restringidos) el hígado

mostró la mayor actividad ( $54.7 \pm 12.7$   $\mu\text{g}$  de tirosina liberados/mg de proteína) seguido de la glándula mamaria ( $28.47 \pm 8.2$ ) mientras que el músculo mostró la actividad más baja ( $12.8 \pm 3.1$ ). Estos datos confirman las observaciones de otros investigadores realizadas en otras condiciones (66). Existe la información de que la actividad metabólica basal del hígado es 15 a 40 veces mayor que la del músculo (50).

El efecto de la lactancia en el hígado se mostró por un incremento de 43% en la actividad, aumento similar al observado en las ratas restringidas (46%) un incremento semejante se obtuvo en todos los días estudiados y aunque no fue significativa se observa una tendencia en el tejido de las ratas lactantes restringidas a mostrar una actividad menor a la de las ratas no restringidas.

Conde y Scornik estudiaron la síntesis y degradación de proteínas en el hígado del ratón macho y mostraron la importancia del catabolismo de las proteínas para controlar el peso del órgano (67).

Como respuesta a la restricción, la glándula mamaria virgen mostró un ligero incremento en la actividad pero esta no fue significativa, sin embargo, la respuesta a la lactancia fue dramática, se observó, un incremento mayor de 300% y 400% en los días 7 y 14 de lactancia en los animales no restringidos mientras que los aumentos en los animales restringidos fueron menores, se mantuvieron cerca de 200% en los mismos días. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en el peso del tejido, en donde se observó que las glándulas de los animales lactantes restringidos mostraron un peso que representa el 40% del peso del tejido de los animales no restringidos, esto es, si la actividad proteolítica se relaciona con el recambio de las estructuras celulares, el tejido restringido requiere una actividad menor pues tiene una menor cantidad de tejido que debe ser recambiado.

Benuck y cols (68) encontraron que la actividad de la catepsina D se modifica con la edad en el hígado, el cerebro y el pulmón. Si las ratas de 12 meses de edad son alimentadas durante un mes con una dieta pobre en proteína (8% de caseína) la actividad de catepsina D aumenta en el cerebro y el hígado pero no en el pulmón.

Aunque esas observaciones pueden coincidir con nuestros resultados en el hígado y la glándula mamaria, tenemos diferencia con la respuesta del músculo, sin embargo es importante recordar que en el tejido muscular son varios los sistemas que

222862

participan en el recambio de las proteínas entre los que podemos mencionar las enzimas lisosomales como es el caso de las catepsinas, enzimas que nosotros estudiamos y los sistemas no lisosomales entre las que podemos nombrar a las calpaínas, el sistema proteasomas-ubiquitina y la proteasa miofibrilar (69). Para explicar estas diferencias, puede proponerse que, en las condiciones de nuestro estudio los sistemas no lisosomales sean más importantes en producir la proteólisis y por lo tanto que esas enzimas sean las responsables de la pérdida de proteínas en la rata lactante.

Un índice diferente que se ha sugerido para medir el recambio de proteínas del músculo es la medida de la producción de N-metil-histidina un aminoácido que está presente preferentemente en la actina y la miosina del músculo esquelético, y cuya vía de excreción del cuerpo es la orina (24).

Haverberg reporto que la restricción energético-proteínica en la rata mantiene una excreción casi constante de la N-metilhistidina por más de una semana a pesar de una rápida pérdida de peso corporal durante este intervalo (24). Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la actividad de la proteasa miofibrilar por efecto de la lactancia o de la restricción, lo que sugiere que la rata restringida logró una adaptación en su metabolismo y trata de conservar la proteína miofibrilar del músculo durante la deficiencia de proteínas.

## 9. CONCLUSIONES

En la rata Sprague-Dawley la alimentación crónica con una restricción energético-proteínica al 50% mostró efectos dramáticos en el organismo materno afectando el peso corporal y la tasa de fecundidad.

Aunque no afectó el número de crías al parto, el peso al nacimiento de las camadas de las ratas restringidas fue 20% inferior al de los animales no restringidos, diferencia que se incrementó hasta un 55% al final de la lactancia.

La lactancia produjo un aumento en el peso del hígado y la glándula mamaria aún en los animales restringidos, sin embargo los tejidos de los animales restringidos mostraron pesos menores. La lactancia y la restricción afectaron en menor proporción el peso del músculo.

La actividad proteolítica se vio estimulada en el hígado y la glándula mamaria de las ratas de ambos grupos por efecto de la lactancia, pero, los incrementos fueron menores en los tejidos de las ratas restringidas.

La proteólisis fue menor en el músculo si se compara con los otros dos tejidos estudiados lo que puede explicar el menor efecto mostrado en ese tejido, por la restricción y la lactancia.

La restricción crónica energético-proteínica no produjo el aumento esperado en el catabolismo de proteínas en los tejidos de la rata lactante.

La rata lactante crónicamente restringida ha desarrollado un mecanismo de ahorro que le permite movilizar sus proteínas a menor velocidad que la rata no restringida.

Los mecanismos que controlan la actividad proteolítica en los tres tejidos estudiados son diferentes.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Williamson DH (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Letts* 117 Suppl: K93-K105.
- 2) Williamson DH, Munday MR, Jones RG (1984) Biochemical basis of dietary influences on the synthesis of the macronutrients of rat milk. *Federation. Proc.* 43: 2424-2447.
- 3) Moore BJ, Brasel A (1984) One cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation, and recovery: effects on carcass composition in ad libitum-fed and food-restricted rats. *J Nutr.* 114:1548-1559.
- 4) DeSantiago S, Henández-Montes H, Flores-Huerta S, Villalpando, S (1991) Changes in the composition of mammary tissue, liver and muscle of rat dams during lactation and after weaning. *J Nutr.* 121:37-43.
- 5) Spray CM (1950) A study of some aspects of reproduction by means of chemical analysis. *Br J Nutr.* 54:291-304.
- 6) Kanto U, Clawson AJ (1980) Effect of fenergy intake during pregnancy and lactation on body composition in rats *J Nutr.* 110:1829-1839.
- 7) Naismith DJ, Morgan BLG (1976) The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. *Br J Nutr.* 36:563-566.
- 8) Kettelhut IC, Wing SS, Goldberg AL (1988) Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metab Rev.* 4:751-772.
- 9) Glore SR, Layman DK (1985) Loss of tissues in female rats subjected to food restriction during lactation or during both gestation and lactation. *J Nutr.* 115:233-242.
- 10) Pine AP, Jessod NS, Oldham JD (1994) Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. *Br J Nutr.* 71:13.27.
- 11) Johnson CL (1973) Some aspects of changing body composition of mice during successive pregnancies and lactations. *J Endocr.* 56:37-46.
- 12) Young CM, Rasmussen KM (1985) Effects of varying 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* 41:979-987.

- 13) Hernández-Montes H, Escudero I, Nájera M, Villalpando S (1993) Cathepsin D activity changes during lactation and weaning in liver, muscle and mammary gland of the rat. *FASEB J.* 7:A156.
- 14) Hernández-Montes H, Escudero I, Nájera M, Villalpando S (1994) Cathepsin L and myofibrillar protease in liver and muscle of lactating and weaning dams. *FASEB J.* 8:A173.
- 15) Chatwin AL, Linzell JL, Setchell BP (1969) Cardiovascular changes during lactation in the rat. *J. Endocrinol* 44: 247-254.
- 16) Fell BF, Smith KA, Campbell RM (1963) *J. Path. Bact.* 85: 179-188.
- 17) Fawcett DW (1986) Glándula mamaria. En Fawcett DW (de) *Tratado de histología.* 11a edición. Editorial Mc Graw-Hill, México, D.F., pp 909-920.
- 18) Williamson, D.H. y Robinson, A.M. (1977) Control of glucose metabolism in lactating-rat mammary gland : effects of other substrates, insulin and starvation. *Biochem soc trans* 5:829-833
- 19) Carrick, D.T. y Kuhn, N.J. (1978) Diurnal variation and response to food withdrawal of Lactose Synthesis in Lactating Rats, *Biochem. J.* 174: 319-325
- 20) Williamson DH (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. 117 suppl : K93-K104
- 21) Roberts SB, Coward WA (1984) Lactation Increases the efficiency of energy utilization in rats *J Nutr* 114: 2193-2200
- 22) Grigor MR, Allan, JE, Carrington JM, Carne A, Geursen A, Young D, Thompson MP, Haynes EB, Coleman RA. (1987) Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactating rats, *J. Nutr.* 117: 1247-1258
- 23) Rooyackers OE, Wagenmakers AJM (1996) Tracer Kinetics are of limited value to measure in vivo protein synthesis and degradation rates in muscle of anesthetized rats. *Metabolism.* 45: 1279-1283.
- 24) Haverberg LN, Deckelbaum L, Bilmazes Ch, Munro HN, Young VR (1975) Myofibrillar protein turnover and urinary N-methylhistidine output. *Biochem. J.* 152: 503-510
- 25) Ballard FJ, Tomas FM, Stern LM (1979) Increased turnover of muscle contractile proteins in Duchenne muscular dystrophy as assessed by 3-methylhistidine and creatinine excretion. *Clin Sci* 56 : 347-352.

- 26) Sainz RD, Calvert CC, Baldwin RL (1984) 3-Methylhistidine excretion by lactating and nonlactating rats. *J. Anim. Sci.* 59, Suppl. 1 505 A.
- 27) Furuno K, Goodman MN, Goldberg AL (1990) Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *J. Biol. Chem.* 265: 8550-8557
- 28) Tawa Jr NE, Kettelhut IC, Goldberg AL (1992) Dietary protein deficiency reduces lysosomal and nonlysosomal ATP-dependent proteolysis in muscle. *Am. J. Physiol.* 263 (Endocrinol. Metab. 26): E326-E334.
- 29) Mayer RJ, Doherty F (1986) Intracellular protein catabolism :state of the art. *FEBS Letters* 198: 181-193.
- 30) Dice JF (1987) Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. *FASEB J* 1 :349-357.
- 31) Beynon RJ, Bond JS (1986) Catabolism of Intracellular protein: molecular aspects. *Am. J. Physiol.* 125 (Cell Physiol 20): C141-C152
- 32) Schwartz WN, Bird JWC (1977) Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D. *Biochem. J.* 167: 811-820.
- 33) Mayer M, Amin R, Milholland RJ, Rosen F (1976) Possible significance of myofibrillar protease in muscle catabolism. Enzyme activity in dystrophic, tumor-bearing and glucocorticoid-treated animals. *Exp. Mol. Pathol.* 25 :9-19.
- 34) Hall-Angeras M, Hasselgren PO, Dimlich RVW, Fischer JE (1991) Myofibrillar proteinase, cathepsin B, and protein breakdown rates in skeletal muscle from septic rats. *Metabolism* 40 : 302-306.
- 35) Dayton WR, Reville WJ, Goll DE, Stromer MH (1976) A  $Ca^{2+}$ -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 15 :2159-2167.
- 36) Pontremoli S, Viotti PL, Michetti M, Sparatore B, Salamino F, Melloni E (1990) Identification of an endogenous activator of calpain in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 171 : 569-574.
- 37) Rapoport S, Dubiel W, Müller M (1985) Proteolysis of mitochondria in reticulocytes during maturation is ubiquitin-dependent and is accompanied by a high rate of ATP hydrolysis. *FEBS Letters* 180: 249-252.
- 38) Hershko A, Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61 :761-807.



- 39) Wilkinson KD, Audhya TK (1981) Stimulation of ATP-dependent proteolysis requires ubiquitin with the COOH-terminal sequence. *J Biol Chem* 256 : 9235-9241
- 40) Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A (1984) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem* 24 : 27-53.
- 41) Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown : Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 77 : 1783-1786.
- 42) Wilkinson KD (1995) Roles of ubiquitinylation in proteolysis and cellular regulation. *Annu Rev Nutr* 15 : 161-169.
- 43) Beal VA (1993) Lactancia. En Beal VA (ed) *Nutrición en el ciclo de vida*. 1a edición. Editorial LIMUSA, México, D.F, pp 196-233
- 44) Rasmussen KM (1992) The influence of maternal nutrition on lactation. *Annu Rev Nutr* 12 : 103-107 31)
- 45) Allen JC, Keller RP, Archer P, Neville MC (1991) Studies in human lactation : milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. *Am J Clin Nutr* 54 : 69-80.
- 46) Fomon SJ (1974) Nutrición del lactante. En Fomon SJ (ed) *La leche humana y la lactancia materna*. 1a edición. Editorial Mosby/Doyma, Madrid, España, pp 400-414.
- 47) de Mello MAR (1994) Effects of intrauterine and postnatal protein-calorie malnutrition on metabolic adaptations to exercise in young rats. *Brazilian J Med Biol Res* 27 :2461-2466.
- 48) Samonds KW, Hegsted DM (1978) Protein deficiency and energy restriction in young cebus monkeys. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 75 :1600-1604.
- 49) Tawa Jr EN, Goldberg AL (1992) Suppression of muscle protein turnover and amino acid degradation by dietary protein deficiency. *Am J Physiol* 263 (Endocrinol. Metab. 26): E317-E325.
- 50) Elia M (1992) Organ and tissue contribution to metabolic rate Kinney JM, Tucker HN (eds) *Energy metabolism : tissue determinants and cellular corollaries*. Raven Press Ltd., New York, pp 61-77.
- 51) Kanto U, Clawson AJ (1980) Effect of energy intake during pregnancy and lactation on body composition in rats. *J Nutr* 110 : 1829-1839.

- 52) Moore BJ, Brassel JA (1984) One cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation or no lactation, and recovery : effects on carcass composition in ad libitum-fed and food-restricted rats. *J Nutr* 114 : 1548-1559.
- 53) De Santiago S, Hernández-Montes H, Flores-Huerta S, Villalpando S. (1991) Changes in the composition of mammary tissue, liver and muscle of rat dams during lactation and after weaning. *J Nutr* 121 : 37-43.
- 54) Pine AP, Jessop NS, Oldham JD (1994) Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. *Br J Nutr* 71 : 13-27.
- 55) Williamson DH, Munday MR, Jones RG (1984) Biochemical basis of dietary influences on the synthesis of the macronutrients of rat milk. *Federation Proc.* 43: 2443-2447.
- 56) Viña JR, Williamson DH (1981) Effects of lactation on L-leucine metabolism in the rat. *Biochem J.* 194 : 941-947.
- 57) Iodice AA, Leong VR, Weinstock IM (1966) Separation of cathepsin A and D of skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 117:477-486.
- 58) Meyer M, Amin R, Shafrir E (1974) Rat myofibrillar protease: enzyme properties and adaptive changes in conditions of muscle protein degradation. *Arch Biochem Biophys.* 161: 20-25.
- 59) Hall-Angeras M, Hasselgren P-O, Dimilich RVW, Fisher JE (1991) Myofibrillar proteinase, cathepsin B, and protein breakdown rates in skeletal muscle from septic rats. *Metabolism* 40: 302-306.
- 60) Hartree EF (1971) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 48:422-427.
- 61) Anderson GD, Ahokas RA, Lipshitz J, Dilts PV Jr. (1980) Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on maternal weight gain and fetal birth weight in the rat. *J Nur.* 110 :883-890.
- 62) Alexander MH, Lazan KS, Rasmussen KM (1988) Effect of chronic protein-energy malnutrition on fecundability, fecundity and fertility in rats. 118 :883-887.
- 63) Gupta SR, Lacy B (1967) Effects of protein calorie deficiency on the reproductive performance of female rats. *Indian J Med Res* 55 : 904-910.
- 64) Sandurskis A, Sohlström A, Kabir N, Forsum E (1991) Energy Restriction and the partitioning of energy among the costs of reproduction in rats in relation to growth of the progeny. *J Nutr.* 121 :1798-1810.

222862

- 65) Millican PE, Vernon RG, Pain VM (1987) Protein metabolism in the mouse during pregnancy and lactation. *Biochem J* 248 :251-257.
- 66) Garlick P. Protein turnover in the whole animal and specific tissues. In : Florkin M, Neuberger A, Van Deenen LLM, Ed. Protein metabolism. *Comprehensive biochemistry*, vol 19B Part I ; 1980 :77.
- 67) Conde RD, Scornik OA, (1976) Role of protein degradation in the growth of livers after a nutritional shift. *Biochem J* 158 :385-390.
- 68) Benck M, Banay-Schwartz M, DeGusman T, Vizi ES, Kekes-Szabo A, Lajtha A (1995) Effect of diet on tissue protease activity. *J Neurosci Res* 40 :675-679.
- 69) Taillandier D, Aourousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin A, Ducastaing A, Bigard X, Guezennec CY, Schmid HP, Attaix D (1996) Coordinate activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J* 316 :65-72.

Esta tesis fue aprobada por el jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud el día 18 de diciembre de 1997.

Tutor:



Dr. Homero Hernández Montes

Secretario:



M. en C. María de Lourdes Pérez Chabela

Vocal:



Dra. Alda Rocio Ortiz Muñiz

---