



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPOSICION TISULAR Y CRECIMIENTO POST-
NATAL DE CRIAS AMAMANTADAS POR RATAS
SOMETIDAS A RESTRICCION ALIMENTARIA
DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MA. DE LOURDES BARBOSA CORTES

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	Páginas
Indice de figuras	
Indice de tablas	
Resumen	
I- Introducción	1
A. Generalidades	
B. Antecedentes científicos	
II- Objetivos	13
III- Hipótesis	14
IV- Material y métodos	15
A. Protocolo de trabajo	
B. Metodología	
C. Técnicas bioquímicas	
Análisis estadístico	
V- Resultados	35
VI- Discusión	65
VII- Conclusiones	96
VIII- Bibliografía	98

Indice de figuras

- 1.- Técnicas bioquímicas I.
- 2.- Técnicas bioquímicas II.
- 3.- Curva estandar de proteínas por Microbiuret.
- 4.- Curva estandar de DNA.
- 5.- Curva estandar de RNA.
- 6.- Peso corporal de la rata madre lactante.
- 7.- Patrón de ingesta de la rata madre lactante.
- 8.- Ingesta de la rata madre lactante referida a 100 g de peso corporal.
- 9.- Peso corporal de la cría.
- 10.- Peso corporal de la cría al nacimiento y al finalizar la lactancia.
- 11.- Curva de ajuste polinomial del peso de las crías.
- 12.- Longitud de las crías.
- 13.- Curva de ajuste polinomial de la longitud de las crías.
- 14.- Longitud de la cría al nacimiento y al finalizar la lactancia, a los 21 días de edad.
- 15.- Peso húmedo total del hígado.
- 16.- Peso húmedo del hígado por cada 100 g de peso corporal.
- 17.- Peso seco del hígado por gramo.
- 18.- Peso seco del hígado por célula.

- 19.- Contenido de proteína del hígado por órgano.
- 20.- Contenido de proteína del hígado por célula.
- 21.- Contenido de DNA del hígado por órgano.
- 22.- Peso celular del hígado
- 23.- Contenido de RNA de hígado por órgano.
- 24.- Contenido de RNA del hígado por célula.
- 25.- Peso húmedo del músculo.
- 26.- Peso húmedo del músculo por cada 100 g de peso corporal.
- 27.- Peso seco del músculo por tejido total.
- 28.- Peso seco del músculo referido a gramo de tejido.
- 29.- Contenido de proteína muscular en el tejido total.
- 30.- Contenido de proteína muscular por gramo de tejido.
- 31.- Contenido de DNA total del músculo.
- 32.- Contenido de DNA en el músculo referida a gramo de tejido.
- 33.- Contenido de RNA total del músculo.
- 34.- Contenido de RNA en el músculo referida a gramo de tejido.

Indice de tablas

- I Composición del alimento para roedores. Nutricubos Purina Co.
- II Curva estandar del Microbiuret.
- III Dilución de tejidos.
- IV Curva estandar de DNA.
- V Curva estandar de RNA.
- VI Peso corporal de las ratas madres lactantes.
- VII Ingesta de la rata madre lactante.
- VIII Peso corporal de las ratas madres lactantes.
- IX Longitud de las ratas lactantes
- X Peso húmedo y seco del hígado, absoluto y por cada 100 g de peso corporal.
- XI Hígado. Contenido de proteínas, RNA y DNA por gramo de tejido.
- XII Hígado. Contenido de peso seco, proteína, RNA, DNA por gramo de tejido.
- XIII Hígado. Contenido de peso seco, proteína y RNA por célula.
- XIV Peso húmedo y seco del músculo, absoluto y por cada 100 g de peso corporal.
- XV Músculo. Contenido de proteínas, RNA y DNA por tejido total.
- XVI Músculo. Contenido de peso seco, proteína, RNA y DNA por gramo de tejido.

RESUMEN.

Se evaluó la repercusión de una restricción global de calorías consumidas por la rata madre durante el embarazo y la lactancia sobre el crecimiento postnatal y la composición corporal de las crías. Se utilizaron dos grupos de ratas Sprague-Dowley, uno alimentado "ad libitum" grupo de ratas madre control (RC) y otro alimentado con 70% del consumo de la dieta normal grupo de ratas madre con restricción (RR) a partir del octavo día de embarazo se registró diariamente el consumo de alimento y peso de los animales. El día del parto se ajustaron las camadas a 8 crías y se registró diariamente el peso y la ingesta de la rata madre así como el peso y la longitud de la cola de las crías. Los días 7, 14 y 21 de lactancia se sacrificaron las crías de las ratas "ad libitum" (grupo crías control = CC) y las crías de las ratas con restricción (crías con restricción = CR). Se diseccionaron el hígado y los músculos de las extremidades posteriores. Los tejidos de las crías de una misma madre, fueron preparados en un solo homogeneizado, en el cual se determinaron los pesos húmedo y seco y las concentraciones de proteína, DNA y RNA. El grupo de RC antes del embarazo consumieron 18 g y aumentó a 60 g durante el máximo de lactancia. Las ratas madres aumentaron su peso de 240 g antes del embarazo a 290 g durante la lactancia en tanto que las restringidas mantuvieron su peso en 250 g. Al nacimiento no hubo diferencias en el peso de las crías, a partir del 5º día las crías restringidas (CR) tuvieron un peso menor, al 21º día

día la diferencia entre ambos grupos fue de 7 g. El crecimiento en longitud de la cola presentó diferencia significativa entre los dos grupos, el grupo de restricción fue menor a partir del 16º día de lactancia. En el hígado al 7º día de lactancia la concentración de DNA en el grupo CR fue significativamente menor, sin diferencia en ninguno de los otros parámetros estudiados entre ambos grupos. Al 14º día existió diferencia significativa en el contenido de RNA por órgano total. Al 21º día todos los parámetros estudiados fueron similares aunque tendieron a ser menores en el grupo CR cuando se expresaron por tejido total. En el músculo, al séptimo día de lactancia el peso seco, proteínas, RNA y DNA de las restringidas fueron significativamente menores. Al 14º y 21º día no existieron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados entre ambos grupos. Con estos datos se concluye que la restricción calórica global de 30% de la madre durante la lactancia afecta negativamente el crecimiento postnatal en peso y longitud de la cría, así como la composición tisular de hígado y masa muscular detectada durante la primera semana.

I INTRODUCCION

La leche esta diseñada biológicamente para satisfacer las necesidades nutricionales de cada especie. La condición y el grado de madurez metabólica al nacimiento, la duración del periodo de lactancia, la tasa de crecimiento postnatal temprano y la susceptibilidad a enfermedades específicas varía de una especie a otra. En la rata al igual que en otras especies la época postnatal temprana especialmente el periodo de lactancia, constituye una etapa crítica para su desarrollo y crecimiento posteriores. El estado nutricional de la madre juega un papel importante en este proceso ya que el efecto de la lactancia depende mucho de aquel (1).

Algunos estudios recientes han informado acerca de la repercusión que tienen sobre la lactancia y el crecimiento de las crías la restricción alimentaria materna desde el embarazo y la lactancia. Las crías de ratas restringidas durante el periodo de lactancia tienen una velocidad de crecimiento menor a la de las crías de ratas alimentadas adecuadamente (2). No se ha explicado el efecto que podría tener la restricción de la rata madre desde la etapa temprana del embarazo y durante la lactancia sobre el crecimiento físico y la composición tisular, específicamente del hígado y del músculo de la cría.

A. GENERALIDADES

1. La glándula mamaria en el mamífero.

Han sido caracterizadas 4237 especies de mamíferos hasta el momento. La característica esencial que los distingue es la presencia de glándulas mamarias en la hembra, cuya secreción es la fuente de nutrientes para el recién nacido, además de la viviparidad y la presencia de pelo, sin embargo la secreción de leche tiene un significado más extenso que el puramente nutritivo, constituye una fase de la vida de los mamíferos durante la cual la protección materna es necesaria y más pronunciada y la interacción madre-hijo esta encaminada a ser significativa para el futuro desarrollo social del recién nacido. En muchas especies, la secreción de leche en el período inmediato al postparto contiene anticuerpos, que confiere a la prole inmunidad a infecciones (3).

El número y distribución de las glándulas varía mucho entre las especies, con un rango de 2 a 25, en el hombre se presentan dos en el tórax ventral; en la vaca, 4 en la región inguinal; en el puerco, 10-14 pares a lo largo de toda la longitud del tórax ventral y abdomen; en el Coypu las glándulas estan situadas dorsalmente.

La rata se caracteriza por tener seis pares de glándulas, tres de ellas son torácicas, una abdominal y dos inguinales. La estructura mamaria en este animal aparece como una tira de tejido desde el cuello hasta el ano; con la única excepción del área

constituida por las costillas (4).

La glándula mamaria de todas las especies tiene la misma estructura básica que es, a la vez simple y relativamente homogénea, es un órgano de origen ectodérmico. Su primordio es una cresta que se forma lentamente y se divide en esbozos independientes que se disponen por parejas metaméricas en el lugar en el cual se emplazarán los futuros pezones. Los esbozos así formados producen arborizaciones en el tejido mesenquimatoso, cada una de éstas organizada alrededor de un conducto. Las sucesivas arborizaciones forman una pequeña red de canaliculos por dónde discurrirá la leche (5).

La leche es sintetizada por células epiteliales especializadas (células secretorias) que captan sustancias de la sangre, están agrupadas a la vez en sacos espirales o alveolos, la leche es secretada hacia su luz y después drena a través de un sistema de ductos arborizados, hacia el exterior del cuerpo generalmente mediante un órgano especializado llamado pezón. El orden de los alveolos y ductos que son descritos como racimos, es comparado a un racimo de uvas sobre su vástago. Los grupos de alveolos que drenan a través de un ducto común constituyen un lóbulo. Las glándulas están situadas bajo la epidermis (piel) y sobre la pared externa del cuerpo (5).

2. Fisiología de la glándula mamaria del mamífero.

La mama adulta está compuesta de tejido glándular y graso, con tejido fibroso intercalado. En cada mama el tejido glándular está organizado en 15 a 20 lóbulos, cada uno formado a su vez por

varios lobulillos. Los lobulillos están constituidos por unidades funcionales llamadas alveolos que están encargados de secretar leche. Estos grupos de alveolos están comunicados por pequeños ductos que se unen para formar conductos galactoforos o lactíferos, uno por cada lóbulo, los cuales se dirigen hacia el pezón y se ensanchan bajo la areola pigmentada para formar un seno galactoforo que se abre directamente en la superficie del pezón (5).

La leche se sintetiza en el citoplasma de las células alveolares y es extraída hacia la luz alveolar. Alrededor de los alveolos hay células mioepiteliales que se contraen y movilizan la leche de los alveolos hacia los conductos. La leche viaja a través de éstos y se acumula en los senos, donde está disponible para la cría al succionar. La lactancia implica la síntesis de la leche en los alveolos (lactopoyesis), su almacenamiento en los conductos y los senos galactoforos y por último un complejo reflejo aunado por la estimulación sensorial del pezón y seguido por la liberación de oxitocina hipofisiaria que permite la contracción de células mioepiteliales, responsables de la eyección de la leche. A este proceso se le conoce como reflejo de "bajada de la leche" (6,7). La cría introduce el pezón en la parte posterior de la boca y rodea la areola con los labios. Cuando se eleva la mandíbula inferior, se comprime el tejido mamario entre la lengua y la mandíbula superior, se ejerce presión del frente de la boca hacia atrás y se extrae leche del pezón. Se cree que la succión es secundaria a los movimientos. Cuando se baja la mandíbula, la presión sobre el pezón y la areola disminuye y deja que los senos se llenen otra vez. La

repetición del proceso de succión causa ondas del estímulo hacia el hipotálamo el cual a su vez estimula a la pituitaria posterior para que se libere más oxitocina (8).

3. Control hormonal de la lactancia en los mamíferos.

Las hormonas involucradas en la síntesis y expulsión de la leche son: la prolactina, hormona de crecimiento, somatomamotropina coriónica y oxitocina. La producción de prolactina comienza durante el embarazo tanto por la pituitaria anterior como por la placenta y aumenta su nivel plasmático progresivamente durante el embarazo. Los estrógenos son esenciales para la producción de prolactina, pero su alto nivel durante el embarazo inhibe la liberación de prolactina (9).

La oxitocina se almacena en la pituitaria posterior. Esta hormona se encarga principalmente de la transferencia de la leche de las células epiteliales de los alveolos hacia los conductos y luego a los senos donde esta a disposición de la cría (10). Al iniciar el período de amamantamiento, la succión de la cría estimula los reflejos de descenso en el pecho y entonces se puede retirar fácilmente la leche que esta en los senos y en los grandes conductos. El estímulo táctil de la succión desencadena impulsos nerviosos de los receptores en el pecho hacia el hipotálamo. El hipotálamo estimula a la pituitaria para que libere oxitocina (11). La oxitocina se transporta por la sangre a diferentes tejidos, tanto al útero, donde estimula su involución, como a la glándula mamaria donde causa contracción de las células

mioepiteliales que rodean los alveolos y los conductos pequeños, lo cual permite la expulsión de la leche a través de los conductos. Durante el amamantamiento el aumento del aporte sanguíneo al pecho manifestado por un aumento en la presión y la temperatura, proporciona un mejor acceso para la oxitocina circulante hacia el mioepitelio (12).

4. Nutrición durante el embarazo y la lactancia del humano.

La importancia de la nutrición en la reproducción es evidente, basta considerar que el tejido ya sea materno o fetal está formado de nutrientes que provienen de la dieta materna pasada o presente (13). Una mujer bien nutrida cuando concibe y cuya dieta durante el embarazo contiene nutrientes en cantidad, calidad y proporción suficiente para satisfacer sus requerimientos, tendrá menos complicaciones durante el embarazo y el parto, y su hijo tiene mayores probabilidades de nacer saludable (el peso del infante al nacer es crítico para su supervivencia) que el de una mujer cuyo estado nutricional es marginal o francamente deficiente (14,15).

La mujer que inicia el embarazo con un buen estado nutricional, con reservas corporales suficientes, puede tener un margen de seguridad en el aporte de nutrientes al feto, aún si su ingesta alimenticia durante el embarazo se limita.

Los efectos de un mal estado nutricional previo al embarazo puede compensarse en parte por el mejoramiento de la dieta durante el

embarazo. Por otra parte, una buena nutrición durante el embarazo representa el cimiento de una lactancia exitosa (16-19).

5.- Nutrición en la rata.

Los indicadores del estado nutricional en la rata se han evaluado a través de diferentes estudios (20). Un buen estado nutricional se manifiesta através del peso y longitud corporales, que sean los adecuados para la edad del animal. Además el estado físico y funcional están integrados y existe ausencia de infección u otra patología. Los indicadores de desnutrición en la rata se han obtenido mediante diferentes modelos experimentales de restricción de nutrientes. En forma aguda: ayuno total (horas) o restricciones a corto plazo (días) o en forma crónica: restricciones a largo plazo (semanas).

Para producir un estado nutricional deficiente en la rata se realiza una restricción alimentaria la cual puede ser de diferentes tipos:

- 1.- Restricción energética global. En la cual no se varía la proporción de nutrientes sino que únicamente se disminuye el aporte de energía, mediante una disminución en la cantidad del alimento que se ofrece al animal.
- 2.- Restricción deficiente en algún nutriente manteniendo el mismo aporte energético (isocalórica). En este tipo de restricción se reduce la proporción de un nutriente específico (de interés a estudiar). Ejemplo dieta sin proteínas, manteniendo el aporte de calorías a expensas de otros nutrientes energéticos, ejemplo:

carbohidratos o grasa.

3.- Restricción deficiente de algún nutriente y además reducción en el aporte de energía (hipocalórica).

La magnitud de la restricción se hace de acuerdo a los requerimientos para la rata (21). Dependiendo de la severidad de tal restricción se observa un deterioro proporcional sobre el estado nutricional del animal y de la composición de sus tejidos. Con una restricción media 25 % de los requerimientos el grado de desnutrición en la rata es moderado. Como indicadores se observa pérdida de peso y disminución en la longitud durante la etapa de crecimiento. Los mecanismos de adaptación compensatorios se manifiestan por dilución, por disfunción y atrofia del órgano total. Corresponde a una desnutrición marginal o de primer grado en el humano, algunos de los signos como la calidad del pelo y la mayor presencia de infecciones que se hacen manifiestos. Con una restricción del 50 % de los requerimientos el grado de desnutrición en la rata es severo, teniendo como indicadores pérdida de la homeostasis y alteración grave de la función y muerte. Corresponde a una desnutrición de 2 y 3 grado en el humano.

La lactancia es un periodo crítico en la vida de la cría ya que representa la etapa de mayor vulnerabilidad tisular a cualquier estímulo. La desnutrición a partir del nacimiento hasta el destete, impone mayor efecto sobre la división celular a diferencias de etapas tardías de la vida, en que el efecto de desnutrición es más notable sobre el tamaño celular.

6. Justificación del modelo animal.

Los estudios en animales han contribuido enormemente a la comprensión de la fisiología y bioquímica de la nutrición. Se ha aportado mucho al conocimiento actual sobre reproducción, lactancia y crecimiento. Los experimentos en animales son esenciales debido a las restricciones éticas para la experimentación en humanos.

Existen muchas ventajas en el uso de animales de laboratorio para el estudio de la nutrición y la lactancia: se puede controlar la dieta tanto cualitativa como cuantitativamente, y crear ciertas deficiencias específicas para observar los resultados (22). Los animales se pueden sacrificar para analizar diferentes tejidos. La gestación de los animales de laboratorio permite estudiarlos durante todo un ciclo de vida o a través de varias generaciones. Estas ventajas dan una mayor precisión en las variables bajo control y observaciones reales de los cambios fisiológicos y biológicos que serían imposibles observar en los humanos. Por otro lado, las diferencias de especie requieren de mucha cautela en la posible extrapolación entre los hallazgos en animales y el hombre (23).

7.- La rata lactante como modelo experimental.

La lactancia en la rata dura alrededor de 21 días y se considera el período comprendido entre el 10 y el 14 como el de mayor actividad. La rata presenta una serie de cambios fisiológicos como: hipertrofia de la glándula mamaria, del hígado, del riñón,

del tracto alimentario y del corazón, así como aumento del trabajo cardíaco (24,25).

Durante el periodo de máxima producción de leche, la glándula recibe 10% del gasto cardíaco, mientras que solo recibe el 0.5% en ratas no lactantes. El flujo sanguíneo a la glándula durante la lactancia es de 0.5 ml/min/g, lo cual incrementa la disponibilidad de sustratos y hormonas a este tejido en la proporción necesaria para la biosíntesis de leche (26-29). Además durante este periodo, la rata aumenta su ingesta en un 300% a pesar de lo cual no aumenta de peso.

A todos estos cambios fisiológicos hay que sumar los cambios en el metabolismo de los diferentes tejidos de la rata que amamanta cuyo fin es asegurar una correcta producción de leche, que va ser responsable de un crecimiento y desarrollo normal de las crías. La camada al nacer pesa alrededor de 70 g y cuando se destetan tres semanas después pesan 400 g, esto equivale a que el peso total de la camada es 50% más que el peso de la madre (24).

B. ANTECEDENTES CIENTIFICOS.

Para los mamíferos la alimentación con leche materna representa un medio para alcanzar su desarrollo completo, ya que constituye una fuente de nutrimentos adecuada en cantidad y calidad para lograrlo.

Las demandas nutricionales de la madre durante la lactancia son mayores que la del embarazo, existe una relación muy importante entre la alimentación materna y el éxito de la lactancia (30).

Para lograr una lactancia adecuada, la madre debe disponer de substratos en cantidades suficientes para la síntesis de los componentes de la leche, ya sea a partir de la dieta materna o de sus reservas corporales acumuladas durante el embarazo (30). Si la dieta no es suficiente, las reservas maternas deben ser movilizadas para sintetizar la leche necesaria para el crecimiento de la cría (31-34).

En la rata, se acumulan lípidos durante el embarazo (35), estos depósitos de lípidos son movilizados durante la lactancia (36,37), aunado a esto, la ingesta diaria de la rata aumenta importantemente durante esta etapa para responder a la gran demanda que implica la síntesis de leche (38,39).

La velocidad de crecimiento y desarrollo de la cría de la rata, puede alterarse si se modifica la cantidad o calidad de comida disponible durante la lactancia (40).

Existen varios métodos utilizados para producir desnutrición en las crías de ratas lactantes, se pueden colocar camadas grandes con una rata madre, separar a los crios de la madre durante una porción del día, reducir el número de tetas de la madre, alimentar a la madre con una dieta de bajo contenido protéico o reducir el consumo diario de la madre en un 40-50 % (41,42).

Los dos últimos métodos afectan el estado nutricional de la madre y probablemente disminuyen la cantidad de leche producida sin que la composición de la misma esté alterada (43).

Se ha informado que la restricción alimentaria de las crías de la rata durante la lactancia altera el desarrollo posterior del animal (43). Las ratas con un acceso ilimitado a la leche materna durante las primeras tres semanas de vida, son más grandes en la edad adulta que las que tienen un limitado acceso a la lactancia.

La desnutrición posnatal tiene un gran impacto en el desarrollo de diferentes tejidos de la rata, se ha informado una disminución en el tamaño del hígado, páncreas e intestino (44).

En ratas con retardo en el crecimiento intrauterino ocasionado por una insuficiencia vascular placentaria se observó que el peso corporal y el peso de algunos tejidos tales como el hígado y el cerebro se recuperaron cuando se les sometió a una alimentación posnatal adecuada, lo anterior pone de manifiesto la importancia que tiene la alimentación durante la lactancia (45).

II OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto de la restricción alimentaria calórica global en la rata madre durante el embarazo y la lactancia sobre el crecimiento postnatal de las crías amamantadas.
2. Estudiar la composición del hígado y del músculo esquelético definida por el contenido de peso seco, proteínas y ácidos nucleicos, en las crías de ratas restringidas durante el embarazo y la lactancia.

III HIPOTESIS

1. La restricción alimentaria calórica global durante el embarazo y la lactancia conduce a una disminución en el crecimiento postnatal de las crías.

2. Las crías amamantadas por ratas sometidas a restricción alimentaria, presentan una disminución en la masa proteica del hígado y del músculo esquelético como una manifestación de una menor velocidad de crecimiento.

III HIPOTESIS

1. La restricción alimentaria calórica global durante el embarazo y la lactancia conduce a una disminución en el crecimiento postnatal de las crías.

2. Las crías amamantadas por ratas sometidas a restricción alimentaria, presentan una disminución en la masa proteica del hígado y del músculo esquelético como una manifestación de una menor velocidad de crecimiento.

IV MATERIAL Y METODOS

A. Protocolo de trabajo.

Se utilizaron 50 ratas hembras, vírgenes, adultas de la cepa Sprague-Dowley mantenidas en condiciones de 12 hs luz-obscuridad (0700-1900 h) y temperatura de 22°C, alimentadas "ad libitum" con un preparado comercial Chow Purina (tabla No I) desde los 21 días de edad. A las 13 semanas de edad los animales fueron desparasitados con metronidazol.

Posteriormente se realizó el marcaje de los animales para su identificación mediante el sistema de perforación auricular (46). A la semana 15 las ratas hembras con peso corporal entre 220 y 260g fueron seleccionadas para su cruce con un macho de su especie. Los machos fueron colocados en las jaulas con 6 hembras a las 16:00 hs y retirados a la mañana siguiente a las 9:00 hs. El diagnóstico de embarazo se realizó mediante frotis vaginal, el cual consistió en introducir una puntilla de poliestireno a la vagina para administrar 0.5 ml aproximadamente de solución salina, la muestra de líquido fue colocada en un porta-objetos para observar la presencia de espermatozoides mediante la utilización de un microscopio óptico. El día que se observó la presencia de espermatozoides en la vagina fue considerado como primer día de embarazo. Posterior al diagnóstico de embarazo y durante toda la etapa de lactancia se registro diariamente el consumo de alimento; cuyo suministro a cada animal (100 g) fue proporcionado alrededor de las 9:00 am y retirado al día

TABLA I
 COMPOSICION PROMEDIO DE NUTRICIBOS
 PARA ROEDORES *
 100 g/peso húmedo

Nutriente	g	Nutriente	mg
Kilocalorias	372.01	Tiamina	0.0113
Proteina	26.1	Riboflavina	0.091
Grasa	2.8	Niacina	1.07
Carbohidratos	55.1	Acido pantótenico	0.26
Fibra	6.8	Acido fólico	0.067
Cenizas	9.9	Piridoxina	0.068
Calcio	1.1	Biotina	0.0079
Fosfato	0.68	B-12 mcg	2.5
Potasio	1.25	Vitamina A UI	125
Sodio	0.45	Vitamina D UI	300
Hierro	0.0225		
Zinc	0.0065		

* Purina Co.

siguiente el residuo no consumido a la misma hora. La diferencia entre el alimento colocado y el alimento residual fue considerada como el alimento consumido. Al octavo día de embarazo los animales fueron asignados a cada uno de los dos grupos de estudio.

Grupo I: Ratas alimentadas "ad libitum". Se les suministró "ad libitum" agua y alimento sólido para roedores (pellets) como se indicó anteriormente. La composición del alimento se muestra en la tabla I.

Grupo II: Ratas con restricción alimentaria. Se les suministró diariamente el 70% del peso promedio de los pellets consumidos el día anterior por el grupo I y se les mantuvo en estas condiciones de alimentación durante toda la lactancia. El agua se les puso a disponibilidad todo el tiempo. Los animales fueron pesados diariamente. No fue tomado en cuenta el desperdicio estimado en menos del 2% del alimento consumido.

A las ratas de ambos grupos se les permitió llevar a término el embarazo. El primer día posparto se ajustaron las camadas a 8 crías por rata, 5 machos y 3 hembras. El estudio de la cría fue realizado en ratas machos solamente. Este día fue considerado como el primer día de lactancia. La lactancia se desarrolló hasta los 21 días postparto, y suspendida por separación de las crías de la rata madre (49).

B. Metodología.

Estudio en la cría. La valoración del crecimiento postnatal se llevó a cabo mediante el registro diario del peso corporal y

la longitud de la cola. Para la composición de los tejidos se llevaron a cabo sacrificios los días 7, 14 y 21 de lactancia, que corresponden a la primera semana, a la etapa de máxima producción láctea y al final de la lactancia respectivamente. Al día uno de lactancia no se realizó el estudio de la composición de las crías porque la disección de los órganos no fue posible. Se registró cuidadosamente a las crías que fallecieron espontáneamente, las cuales fueron respuestas para mantener la camada en 8 miembros. En caso de que se descompletara el número de crías en el grupo bajo restricción se excluían del estudio; a fin de mantener control sobre la restricción alimentaria.

Valoración del crecimiento: La longitud de la cola fue medida adosandola a una superficie rígida, se utilizó un vernier colocando el brazo fijo en la base de la cola y se deslizó el móvil hasta la punta. La precisión del instrumento era de 0.1 cm. El peso corporal se midió en una balanza granataria marca Dhaus cuya precisión es de 0.1g.

Valoración de la composición de los tejidos de la cría. En los días señalados anteriormente, las crías machos de 6 ratas por grupo fueron sacrificadas con éter (47), entre las 9:00 y las 11:00 de la mañana. Se disecaron el hígado y paquete muscular de las extremidades posteriores. Los tejidos fueron pesados en una balanza granataria con una sensibilidad de 0.01g para determinar el peso húmedo. Una fracción de este fue homogeneizado en un homogeneizador marca Polytron a una velocidad media por 30 seg (No. 50 del control) para el hígado y a velocidad alta (No. 80 del control) por 60 segundos aproximadamente para el músculo, mientras los tejidos eran mantenidos en hielo. Los

tejidos se homogeneizaron en solución salina isotónica en proporción 1:10 (p/v). En alícuotas del homogeneizado se cuantificó la concentración de proteínas por el método descrito por Itzhaki y Gill (48). Se extrajeron los ácidos nucleicos por el procedimiento de Schneider (49). La concentración de DNA y RNA se determinó en el extracto mediante la reacción colorimétrica de la desoxirribosa con difenilamina y la ribosa con orcinol según los métodos descritos por Burton y Munro respectivamente (50,51).

Justificación del modelo experimental.

En la rata si se restringe la ingesta desde el día cero de embarazo disminuye el número de implantaciones y aumenta la reabsorción de los productos como respuesta a una desnutrición aguda, motivo por el cual se inició la restricción después de la implantación del huevo, y durante toda la etapa de la lactancia para simular un cuadro de desnutrición crónica que permitiera el estudio de las crías en la etapa postnatal.

Con respecto al modelo de restricción alimentaria es importante señalar dos aspectos:

1. La restricción fue de tipo calórica global ya que no se modificó la composición del alimento, sino que únicamente se disminuyó la cantidad de alimento administrado en 30% del grupo "ad libitum".
2. A partir del inicio de la lactancia se considero la restricción alimentaria sobre el binomio madre-crias, es importante señalar que alrededor del 16 día de edad de la cría

comienza a comer alimento sólido. Debido a la carencia de cajas metabólicas no se llevó control sobre el alimento consumido por la cría a partir de ésta edad, solamente control sobre el alimento que se administro al grupo "ad libitum" y al de restricción.

FIGURA 1

TECNICAS BIOQUIMICAS I

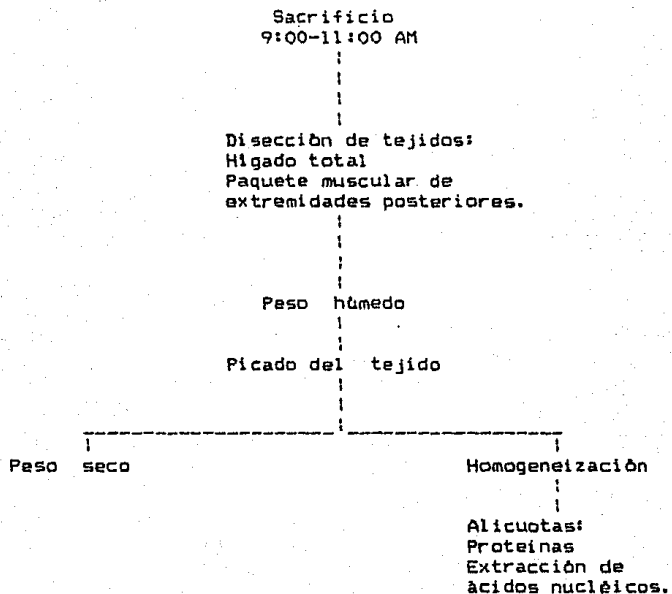


FIGURA 2

TECNICAS BIODUIMICAS II

Tejido homogeneizado (dilución 1:10 p/v)

Dilución
de los tejidos
homogeneizados

Determinación
de proteínas
Microbiuret

Extracción
de ácidos nucleicos
Toma de la muestra:
Hígado 0.5 ml
Músculo 1.0 ml
Extracción ácida
fría
HCL04 0.2 N
Temperatura 0-4 °C

Fracción
ácida soluble
(Moléculas de
bajo peso)
Descartar.

Residuo
(Proteínas y
lípidos)
Etanol 95%

Residuo
Etanol-éter
(3:1)

Descartar
sobrenadante
(fosfolípidos)

Extracción
ácida
caliente
HCL04 0.6N
70°C

Sobrenadante
Productos
hidrolizados
de RNA y
DNA.

C. Técnicas bioquímicas.

Peso seco.

Método gravimétrico.

Una fracción del tejido previamente picado y con peso entre 0.2 a 0.5 g fue colocado en vasos de precipitado, en una estufa Thelco por 24 hs a 100 C hasta obtener peso constante, lo que es equivalente a la pérdida total del contenido de agua.

Proteínas.

Método Microbiuret Itzhaki y Gill (48)

La reacción de Biuret forma un complejo colorido entre la proteína y el sulfato de cobre en el medio alcalino (0.21% CuSO_4 en NaOH) que se cree que sucede a través de la coordinación de un átomo de cobre por 4 péptidos ligando nitrógeno acompañado de la pérdida de un protón por cada uno de los cuatro grupos amida sustituidos.

Se realizan dos curvas de dosis-respuesta una en presencia de NaOH únicamente (blanca) y otra en presencia de CuSO_4 en NaOH (azul), con el objeto de corregir cualquier interferencia debida a la presencia de materiales que interfieren en la absorción, en el espectro ultravioleta. Para ello se resta la densidad óptica de la solución de proteína en presencia de alcalí, y densidad óptica en presencia de cobre.

La lectura se realiza a 310 nm y la absorción es proporcional a

la concentración de proteína (estandar preparado con albúmina de suero bovino).

TABLA II

METODO MICROBIURET: OBTENCION DE CURVAS ESTANDAR

Proteína + NaOH (curva blanca)

Concentración de proteína (BSA) mg	---	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
H ₂ O ml	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
NaOH 30% ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Proteína + CuSO₄ en NaOH (curva azul)

Concentración de proteína (BSA) mg	---	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
H ₂ O ml	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
CuSO ₄ 0.21% en NaOH 30% ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Representada en la figura 3

Fig. 3
CURVA ESTANDAR DE
PROTEINAS MICROBIVRET

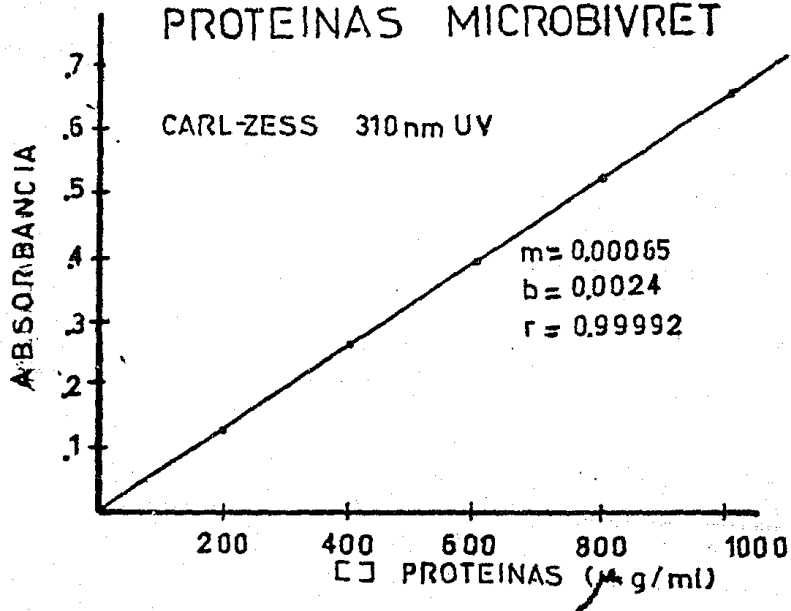


TABLA III

Dilución de los tejidos con solución salina

Etapa	Hígado	Músculo
L 7	1:200	1:200
L14	1:500	1:200
L21	1:500	1:200

Se tomó 1.0 ml del homogeneizado de hígado y músculo a las diluciones indicadas arriba y se les hizo reaccionar con los mismos reactivos utilizados en la curva estándar en tubos de vidrio de 11 x 150. Posteriormente se les agregó 1.0 ml de tetracloruro de carbono (CCl₄) para extraer los lípidos contaminantes. Se centrifugaron a 3000 g x 10 min. Se tomaron alícuotas del sobrenadante para ser leídas a 310 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Extracción de Ácidos Nucléicos. Método de Schneider (49)

Para determinar los ácidos nucleicos es necesario remover los componentes celulares que pueden interferir en la reacción química. Para ello es necesario que se extraigan los ácidos nucleicos del homogeneizado del tejido y se proceda a la

aplicación de procedimientos específicos para la determinación de RNA y DNA en el extracto.

Procedimiento para la extracción:

1. Precipitación de proteínas y ácidos nucleicos. Separación de componentes de bajo peso molecular que pueden interferir con la determinación final, (como carbohidratos) mediante el tratamiento de ácido frío. Se tomó una alícuota del homogeneizado de 0.5 y 1.0 ml, de hígado y músculo respectivamente y se colocaron en tubos de 13 x 100 en hielo, se agregaron 2.5 ml de HClO₄ 0.2N y se agitaron. Se dejaron en reposo por 15 min y posteriormente se centrifugaron a 3000 g x 15 min en una centrifuga Diamond.

2. Se descartó la fracción ácida soluble y al residuo del tejido se le agregaron 2.5 ml de etanol al 95% en frío, con el objeto de extraer los lípidos. Se agitaron los tubos y se repitió la centrifugación en iguales condiciones. Se descartó el sobrenadante nuevamente.

3. Se agregaron al residuo 2.5 ml de etanol-éter (3:1) en frío para descartar fosfolípidos. Se agitó y centrifugó nuevamente.

4. Extracción en caliente (Hidrólisis) con HClO₄ 0.6 N. Una vez desechado el sobrenadante de etanol-éter, al residuo obtenido se le agregaron 1.3 ml de H₂O y 1.3 ml de HClO₄ 0.6 N, se agitó y se colocaron en baño de agua a 70 °C durante 20 min. Al final de la incubación se centrifugaron a 3000 g x 20 min. El proceso de extracción en caliente implica la hidrólisis del ácido

nucléico, por el ácido caliente, donde el producto de la hidrólisis de ambos DNA y RNA consistirá en bases de purina y de pirimidina libres, así como nucleósidos.

5. El sobrenadante ácido con los productos hidrolizados de RNA y DNA se congeló a -30°C para someterlos a su determinación posterior. Los ácidos nucleicos contienen tres componentes: a) bases pirimidicas y puricas b) ribosas o desoxirribosas y c) fósforo. Consecuentemente los métodos de determinación de los ácidos nucleicos pueden basarse en la absorción ultravioleta de las bases, en las reacciones específicas para las pentosas o bien en la estimación del fósforo en el extracto. El color específico desarrollado en las reacciones para determinar ribosa y desoxirribosa permiten la estimación del RNA y DNA independientemente.

Determinación de DNA.

Método de Burton, modificado por Gilers-Myers (50)

La reacción colorimétrica para la determinación e identificación del ácido desoxirribonucleico, está fundamentada en la utilización de difenilamina, en presencia de una mezcla de ácidos acético y perclórico, más acetaldehído.

El color es desarrollado al llevarse a cabo la reacción entre la difenilamina y la pentosa del DNA, que producen la liberación de fosfato después de que la amina es combinada con la desoxirribosa, cuando la reacción se mantiene a 37°C por 24 hs.

El estandar para la determinación de DNA se preparò de la siguiente manera: se pesaron 0.01 g de DNA de timo de ternera (Sigma), que fueron disueltos en 5.0 ml de H₂O caliente, e incubados a 37°C en HClO₄ 2.0 M caliente, se aforò a 100 ml con el mismo ácido y se conservò en refrigeración a 4°C.

TABLA IV

Curva estandar de DNA.

Difenilamina 4.0%

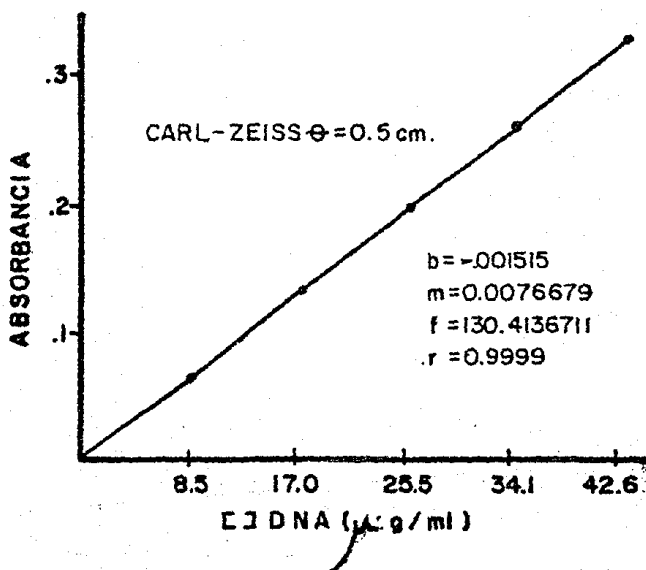
CH ₃ COOH ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Sol. de DNA ml	---	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
DNA microg/ml	20	40	60	80	100	---
HClO ₄ 2.0 N ml	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	---
Acetaldehido 1.6 mg/ml ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Representada en la figura 4

Se tomaron 0.4 ml de los extractos de los tejidos muestras y se les adicionaron 0.6 ml de HClO₄ 0.2 N. Posteriormente se les sometió al mismo tratamiento que la curva estandar. Los tubos se agitaron, incubaron a 37°C durante 24 hs y fueron leídos a 600 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss. La determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

Fig. 4

CURVA ESTANDAR DNA
POR DIFENILAMINA



Determinación de RNA.**Método de Munro-Fleck (51)**

El método utiliza el orcinol (método colorimétrico) y la reacción consiste de la conversión de la pentosa en presencia de ácido caliente a furfural que hace reacción con el orcinol y desarrolla un color que va de amarillo a verde. La proporción del color desarrollado guarda relación directa con la concentración de orcinol. Las condiciones óptimas se obtienen después de calentar a 100°C durante 20 minutos. La reacción del orcinol está sujeta a la interferencia de otros carbohidratos tales como hexosas, pentosas y heptosas.

Estandar de RNA. Se pesaron 0.01 g de RNA de levadura (Sigma) que fueron disueltos en 5.0 ml de H₂O y se agregó ácido HCL04 0.5 M caliente a 50°C e incubó entre 12 y 20 hs a 37 C luego se aforó a 100 ml y se guardó en refrigeración a 4°C.

TABLA V

Curva estandar de RNA

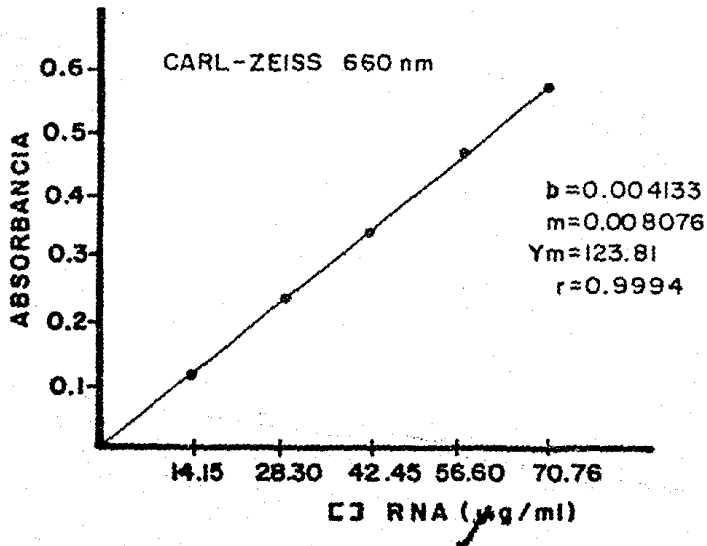
RNA (frío) ml	—	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
HClO ₄ 0.5 M ml	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	—
Acetato còprico 0.5% ml	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Orcinol 1% HCl ml	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

Representada en la figura 5

Los tubos fueron tapados, agitaron y colocaron en baño de agua en ebullición por 20 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyeron a 660 nm en un espectofotómetro Carl-Zeiss. Las determinaciones se hicieron por cuadruplicado.

Fig. 5

CURVA ESTANDAR RNA POR ORCINOL



Análisis Estadístico.

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estandar.

Se realizaron las siguientes pruebas estadísticas:

Prueba "t" Student (52) para el análisis de los datos de composición de los tejidos entre los grupos experimentales y los grupos control.

La homogeneidad de la varianza fue probada por prueba de Bartlett's que corrige para "n" desiguales. Cuando las varianzas que se compararon no fueron homogéneas los datos fueron transformados por el procedimiento de Leven's utilizando el paquete computacional Systat (53).

La comparación entre el grupo experimental y el control fueron por medio de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Para comparar dentro de un mismo grupo experimental se realizó análisis de varianza de una vía.

La diferencia fue considerada como significativa cuando el ANOVA y la prueba de "t" de Student identificó diferencias en un nivel de $p < 0.01$.

Se realizó el ajuste polinomial de las curvas de crecimiento por medio de regresión polinomial, paso a paso eligiendo el mejor ajuste con objeto de obtener la mejor representación gráfica de las curvas de crecimiento.

V. RESULTADOS

Valoración de la rata madre lactante.

En la tabla VI, figura 6, se presenta el peso corporal promedio de las ratas madre. Las ratas alimentadas "ad libitum" presentan un peso corporal promedio mayor que el de las ratas bajo restricción alimentaria (280 ± 20 vs 250 ± 15 g) ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas a través de los 21 días de lactancia en cada uno de los grupos estudiados.

El patrón de ingesta de dieta no purificada (nutricubos purina Co.) se muestra en la tabla VII, figura 7. Las ratas alimentadas "ad libitum" aumentan su ingesta a partir del primer día de lactancia de 19.8 ± 5.9 g hasta 68.6 ± 7.27 g ($p < 0.001$) al finalizar la lactancia. En el grupo de ratas bajo restricción alimentaria se mantuvo la ingesta a un 70% de la ingesta promedio diaria de las alimentadas "ad libitum". Al expresarse la ingesta por cada 100 g de peso corporal, se observó que fue de 7.65 ± 2.18 g el primer día de lactancia hasta 24.79 ± 2.35 g al final de lactancia en el grupo "ad libitum" (Tabla VII). La ingesta del grupo bajo restricción aumentó a 20.3 ± 0.36 g de 5.57 ± 0.39 g (Fig. 8).

Fig. 6

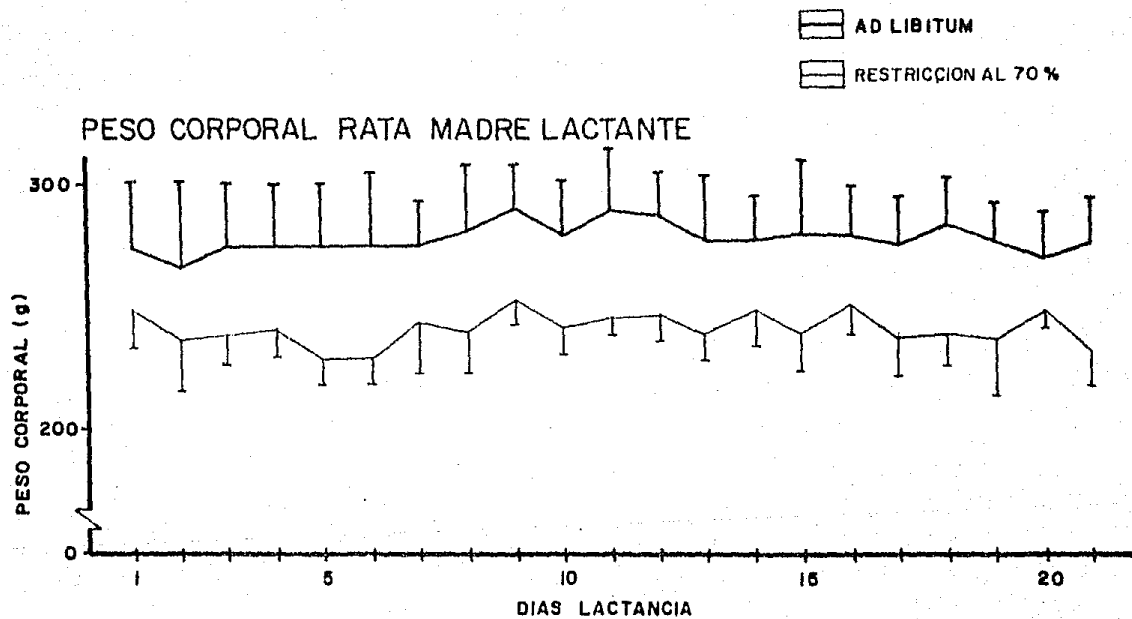


TABLA VI
PESO CORPORAL DE LAS RATAS MADRES LACTANTES

DIAS DE LACTANCIA	PESO (g)					
	"AD LIBITUM"			CON RESTRICCION		
	numero	promedio	D.S.	numero	promedio	D.S.
1	36	277.78	26.6	23	250.7	15.7
2	27	267.33	25.34	18	238.6	21.3
3	32	276.06	24.29	15	240.0	12.1
4	21	273.95	25.33	11	244.09	10.18
5	28	276.07	23.69	7	230.0	10.7
6	18	275.5	29.10	14	230.4	11.7
7	14	276.21	18.44	19	245.89	18.48
8	26	252.81	27.6	10	241.7	15.71
9	18	290.66	18.21	12	253.91	10.34
10	22	279.27	22.44	7	243.86	10.85
11	17	291.29	25.61	12	246.58	6.95
12	22	287.41	18.19	6	248.83	10.17
13	30	278.1	26.44	7	240.71	11.15
14	19	278.37	17.26	13	250.92	15.37
15	23	281.95	29.24	9	240.66	15.8
16	18	281.66	19.39	6	253.0	11.78
17	19	275.00	20.99	8	238.25	15.25
18	19	283.47	19.59	13	240	12.88
19	19	278.05	14.99	7	238.0	23.2
20	19	271.89	20.03	6	249.17	6.71
21	13	276.54	19.29	9	233.0	13.19

ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) POR DOS VIAS $p < 0.001$

Fig. 7

CONSUMO DIETA RATA MADRE LACTANTE

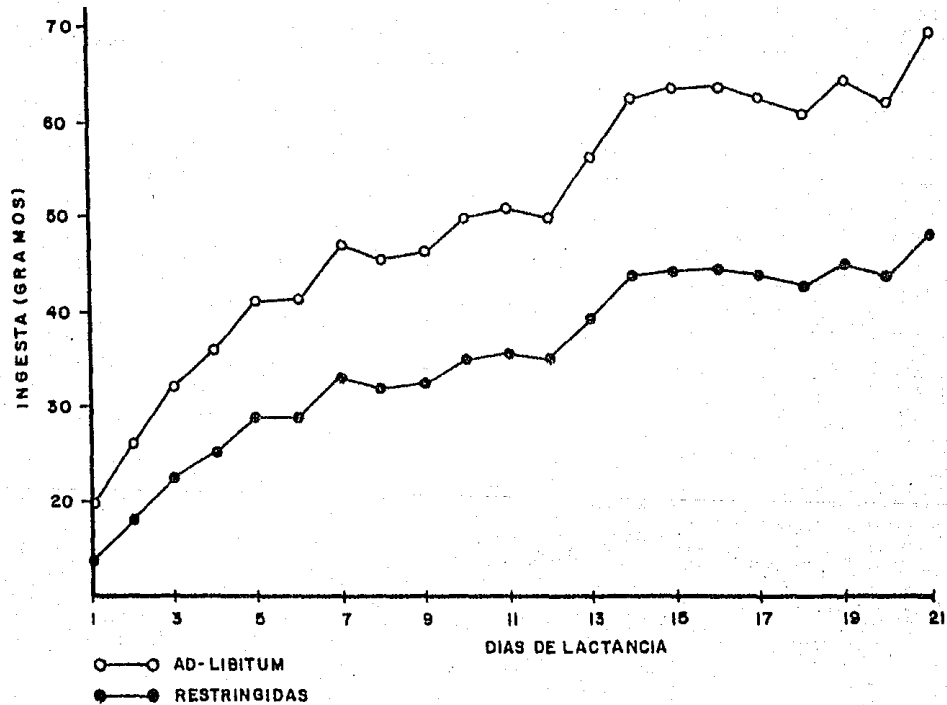


Fig. 8

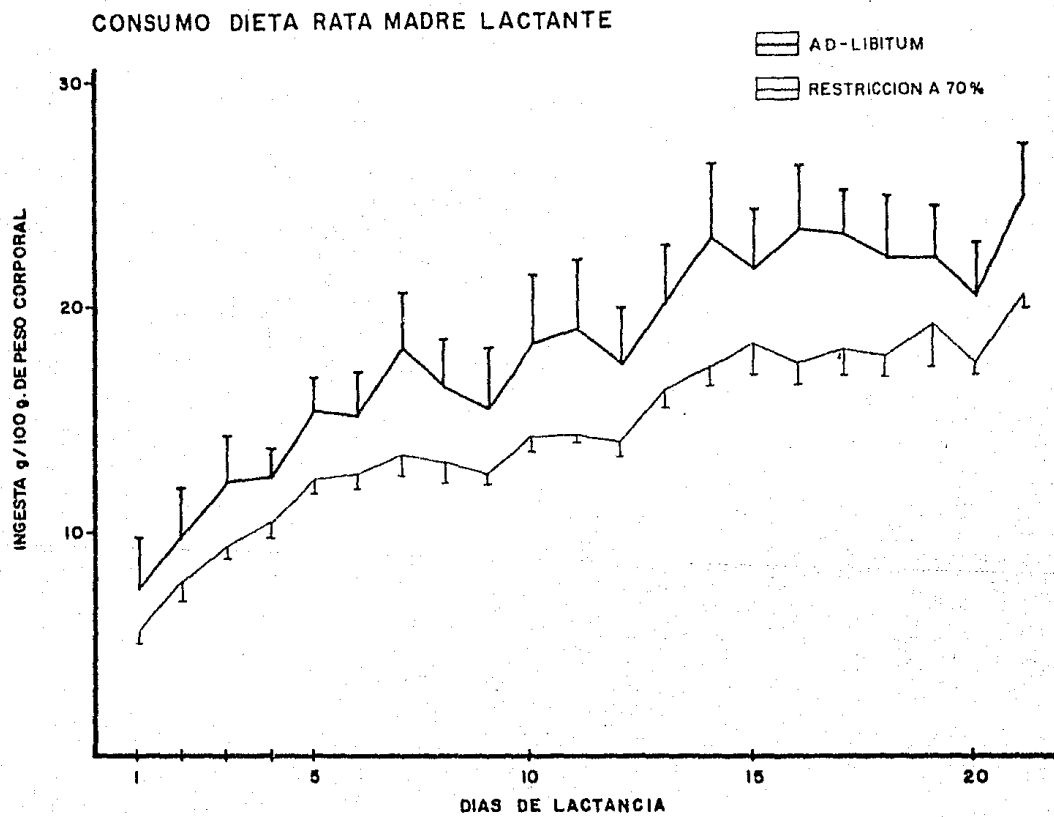


TABLA VII

INGESTA DE DIETA NO PURIFICADA* DE LAS RATAS MADRES DURANTE LA LACTANCIA

DÍAS DE LACTANCIA	GRAMOS/24 h				GRAMOS/100 g PESO CORPORAL			
	AD LIBITUM		CON RESTRICCIÓN		AD LIBITUM		CON RESTRICCIÓN	
	PROMEDIO	D.S.	PROMEDIO	D.S.	PROMEDIO	D.S.	PROMEDIO	D.S.
1	19.8	5.9	13.9	4.1	7.65	2.18	5.57	0.39
2	26.2	6.2	18.3	4.4	9.79	2.27	7.74	0.75
3	32.15	5.7	22.5	4.3	12.42	2.13	9.4	0.49
4	36.1	6.9	25.2	4.8	12.65	1.85	10.43	0.64
5	41.2	10.3	28.9	7.2	15.50	1.35	12.59	0.62
6	41.4	5.5	29.0	3.9	15.19	1.87	12.62	0.66
7	47.1	7.7	33.0	5.4	18.25	2.35	13.5	1.04
8	45.5	7.7	31.8	5.4	16.48	2.11	13.21	0.91
9	46.2	8.2	32.3	5.8	15.68	2.69	12.74	0.55
10	49.8	9.3	34.9	6.5	18.47	2.91	14.34	0.73
11	50.6	8.6	35.6	6.0	19.09	3.05	14.45	0.40
12	49.82	4.4	34.9	3.1	17.52	2.12	14.05	0.62
13	56.0	4.66	39.2	3.3	20.45	2.77	16.32	0.88
14	62.2	7.5	43.5	5.3	23.17	3.23	17.40	1.15
15	62.9	8.0	44.0	5.6	21.68	2.69	18.36	1.34
16	63.1	7.1	44.2	5.0	23.18	2.99	17.51	0.93
17	62.3	5.3	43.4	3.7	23.14	2.08	18.29	1.25
18	60.4	8.2	42.3	5.7	22.16	2.76	17.72	0.98
19	63.8	8.6	44.6	6.0	22.16	2.46	19.21	1.99
20	61.6	11.4	43.1	8.0	20.32	2.39	17.45	0.40
21	68.6	7.27	48.02	5.1	24.79	2.35	20.30	0.36

*Nutricubos Purina Co.
ANOVA DE UNA VIA p 0.001

Valoración del crecimiento de la cría.

En la tabla VIII, figura 9 se presentan las variaciones del peso corporal de las crías amamantadas tanto por ratas alimentadas "ad libitum" como ratas bajo 30% de restricción. El peso corporal de las crías "ad libitum" aumentó de 7.0 ± 0.6 g a las 24 hs hasta 37.9 ± 6.0 g ($p < 0.001$) a los 21 días de edad, en que fueron destetadas (Fig. 10). El grupo de crías bajo restricción tuvo un peso corporal de 6.1 ± 0.5 g a las 24 hs de nacimiento alcanzando 30.3 ± 4.5 g ($p < 0.001$) el día 21 de edad. El peso corporal de este grupo fue siempre menor que el de las crías "ad libitum" a lo largo de los 21 días de lactancia. Siendo la diferencia significativa ($p < 0.001$) (Tabla VIII, Fig. 11).

Fig. 9

PESO CORPORAL DE LA CRIA

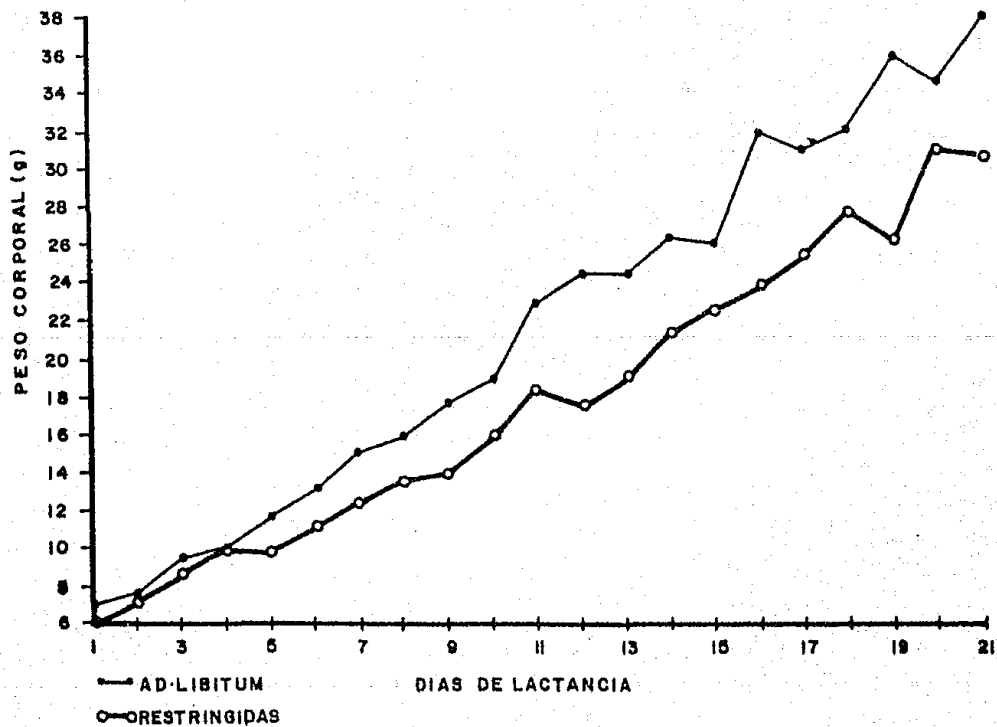


FIG. 11

AJUSTE POLINOMIAL

PESO DE CRÍAS LACTANTES

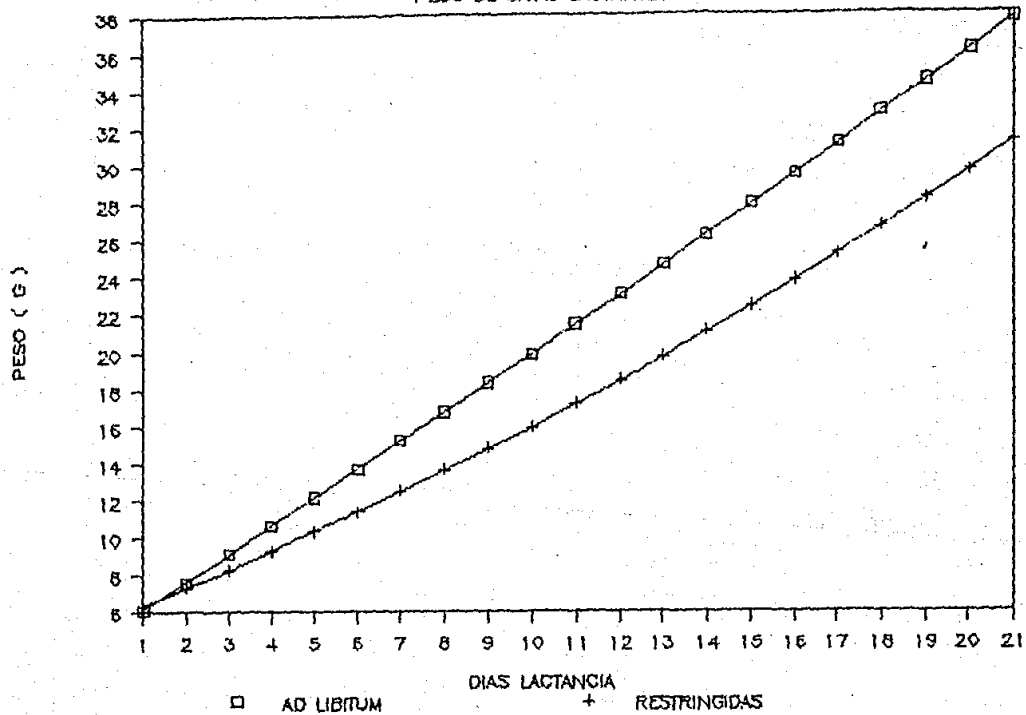


Fig. 10

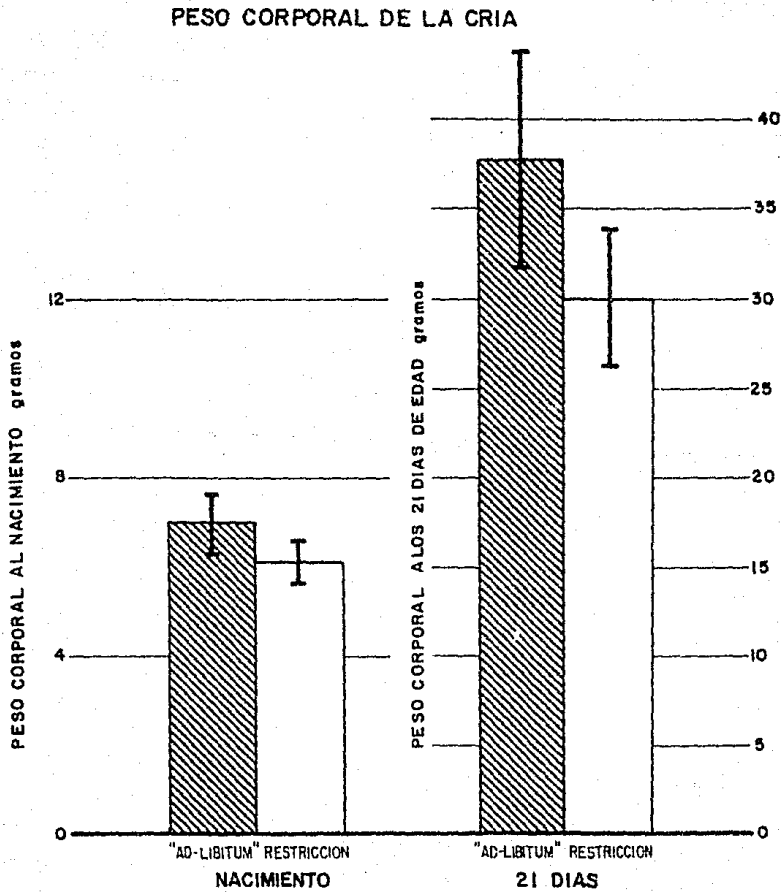


TABLA VIII
 PESO DE LAS RATAS LACTANTES

DIAS DE LACTANCIA	PESO g					
	"AD LIBITUM"			RESTRICCION		
	numero	promedio	D. S.	numero	promedio	D.S.
1	191	7.0	0.6	208	6.1	0.5
2	109	7.6	0.9	24	7.2	0.4
3	76	9.5	1.6	24	8.7	0.3
4	61	9.8	0.7	32	10.0	0.6
5	54	11.77	1.0	63	9.9	1.1
6	82	13.0	1.3	37	11.2	1.3
7	64	15.3	1.6	126	12.4	1.8
8	75	15.9	1.4	35	13.6	1.4
9	47	17.8	1.6	80	14.0	2.1
10	67	18.9	1.9	37	15.9	2.3
11	53	23.0	3.5	39	18.4	2.4
12	15	24.5	0.9	78	17.4	2.4
13	68	24.3	3.0	29	19.0	2.4
14	44	26.3	2.7	106	21.3	2.9
15	84	26.3	2.8	15	22.5	2.6
16	70	31.9	5.4	56	23.8	3.1
17	117	30.8	5.2	31	25.3	2.6
18	103	32.0	4.3	55	27.6	3.1
19	38	35.8	5.0	71	26.1	3.7
20	90	34.4	4.5	63	31.0	3.6
21	56	37.9	6.0	118	30.3	4.5

ANOVA DE UNA Y DOS VIAS $p < 0.001$

La longitud de las colas de las crías es la medida que permite evaluar el crecimiento longitudinal de la rata. En el grupo de crías restringidas este parámetro fue menor que en las "ad libitum", la diferencia fue significativa ($p < 0.001$) (Fig. 12 y 13).

Las longitudes el primer día de lactancia fueron de 1.85 ± 0.18 vs 1.66 ± 0.13 cm, en las crías "ad libitum" y en las restringidas respectivamente. Al finalizar la lactancia alcanzaron una longitud de 9.37 ± 0.54 y 8.21 ± 0.61 cm respectivamente (Tabla IX).

Fig. 12

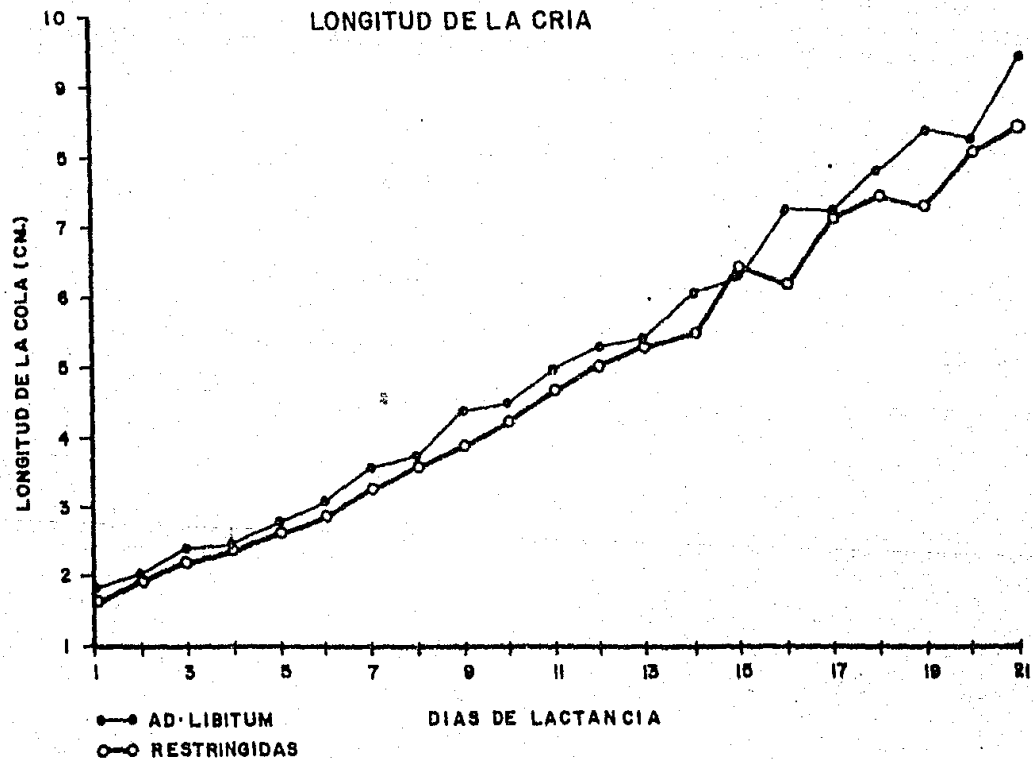


FIG. 13

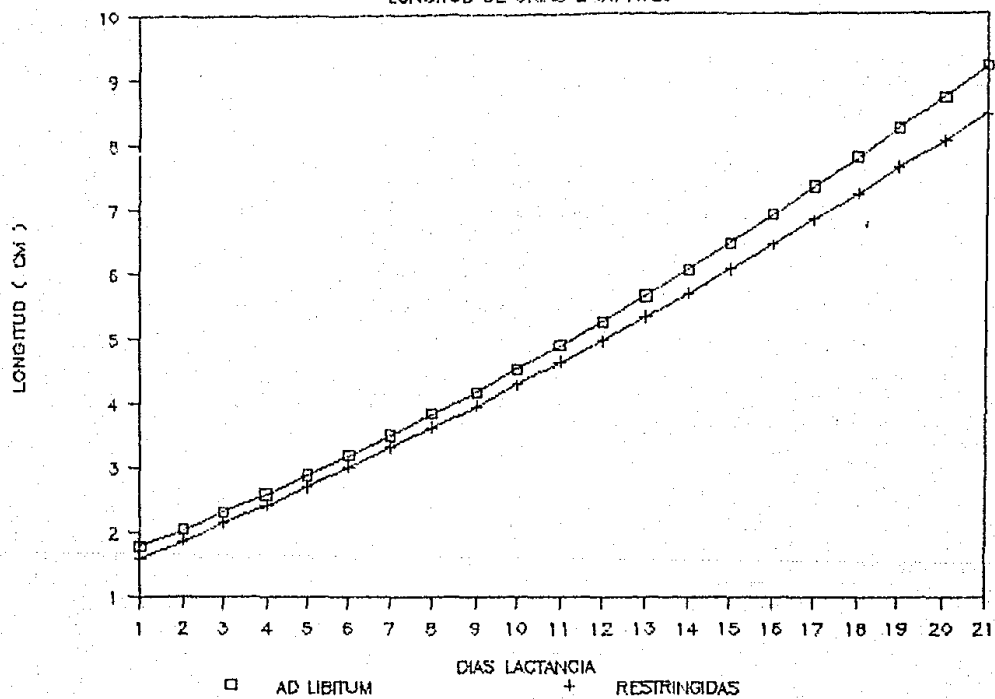
AJUSTE POLINOMIAL
LONGITUD DE CRIAS LACTANTES

Fig. 14

LONGITUD DE LA CRIA

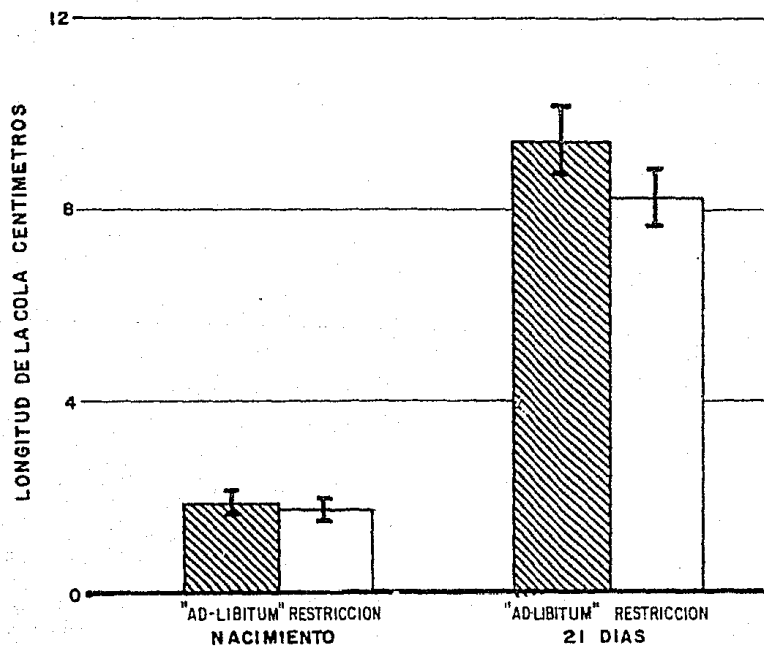


TABLA IX
LONGITUD DE LA COLA DE LAS RATAS LACTANTES

DIAS DE LACTANCIA	LONGITUD (cm)					
	"AD LIBITUM"			CON RESTRICCION		
	numero	promedio	D.S.	numero	promedio	D.S.
1	196	1.85	0.18	220	1.66	0.13
2	100	2.01	0.21	38	1.94	0.11
3	59	2.43	0.24	23	2.19	0.12
4	60	2.48	0.14	32	2.43	0.09
5	62	2.8	0.17	64	2.63	0.20
6	74	3.06	0.32	37	2.86	0.2
7	56	3.56	0.21	123	3.27	0.33
8	63	3.72	0.19	42	3.58	0.34
9	39	4.4	0.22	81	3.87	0.31
10	59	4.49	0.36	37	4.23	0.38
11	46	4.97	0.4	39	4.65	0.48
12	16	5.28	0.14	78	5.0	0.51
13	58	5.4	0.28	29	5.28	0.51
14	40	6.05	0.49	95	5.43	0.49
15	75	6.29	0.39	15	6.43	0.23
16	76	7.21	0.47	56	6.14	0.68
17	117	7.20	0.62	30	7.06	0.46
18	95	7.77	0.47	55	7.40	0.42
19	38	8.31	0.28	70	7.25	0.78
20	100	8.18	0.74	54	8.03	0.55
21	58	9.37	0.53	97	8.21	0.61

ANOVA DE UNA Y DOS VIAS $p < 0.001$

Valoración de la composición de los tejidos en la cría.

El contenido de proteínas, DNA y RNA fueron informados en gramos en peso total del órgano para el hígado o peso total del tejido para el músculo, y además corregido por 100 g de peso corporal. Se consideró como tejido total a la cantidad de masa muscular obtenida de las dos extremidades posteriores de la cría, después de una cuidadosa disección. El contenido de materia seca (peso seco), proteínas, RNA y DNA se expresan tanto como en mg por gramo de tejido, como mg por órgano total o por tejido total. En el caso de hígado se calculó el número de células, así como las concentraciones de peso seco, proteínas y RNA por célula de acuerdo a las siguientes fórmulas (54-56):

$$\text{No. de células (millones)} = \frac{\text{mg de DNA por órgano total} \times 1000}{6.2}$$

$$\text{Peso celular (ng)} = \frac{\text{peso del órgano total g} \times 1000}{\text{No. de células (millones)}}$$

$$\text{Peso seco por célula} = \frac{\text{mg de peso seco por órgano total} \times 1000}{\text{No. de células (millones)}} \\ (\text{pg})$$

$$\text{Proteína por célula} = \frac{\text{mg de proteína por órgano total} \times 1000}{\text{No. de células (millones)}} \\ (\text{pg})$$

$$\text{RNA por célula} = \frac{\text{mg de RNA por órgano total} \times 1000}{\text{No. de células (millones)}} \\ (\text{pg})$$

Hígado.

El peso húmedo de ambos grupos aumentó progresivamente con la edad, con diferencias significativas según el siguiente esquema 7 d > 14 d > 21 d. Sin embargo las diferencias entre los grupos "ad libitum" (CC) y restringidas (CR) no fueron significativas en ninguna de las edades (Tabla X, Fig. 15 y 16).

El peso seco referido como mg/g de tejido presentó el mismo patrón descrito para el peso húmedo (Tabla XI), al referirse como mg/órgano total únicamente fue mayor en el grupo "ad libitum" a los 21 días de edad ($p < 0.001$) (Tabla X, Fig. 17). Cuando se calculó la concentración de peso seco por célula, se encontró que fue mayor en el grupo de restricción a los 7 y 21 días de edad en comparación con el grupo "ad libitum" pero únicamente fue significativo a los 7 días ($p < 0.01$) (Tabla XIII, Fig. 18).

Fig. 15

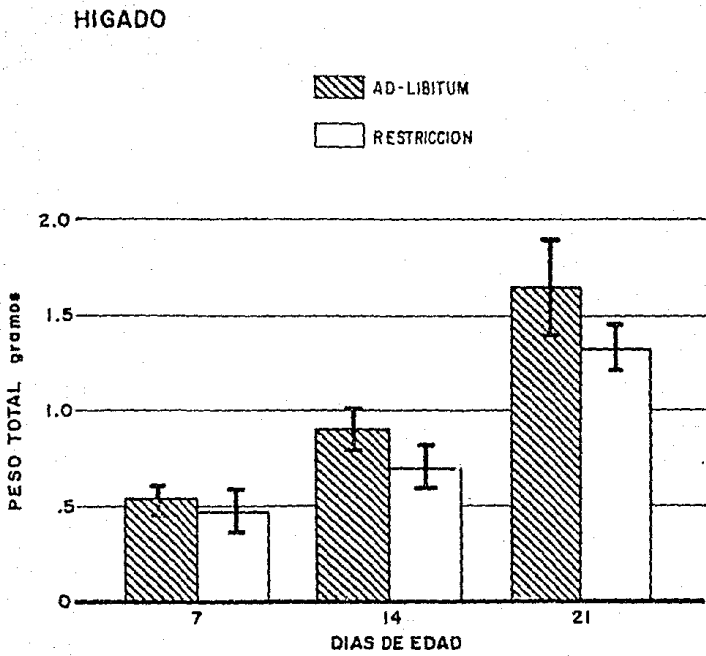


Fig. 16

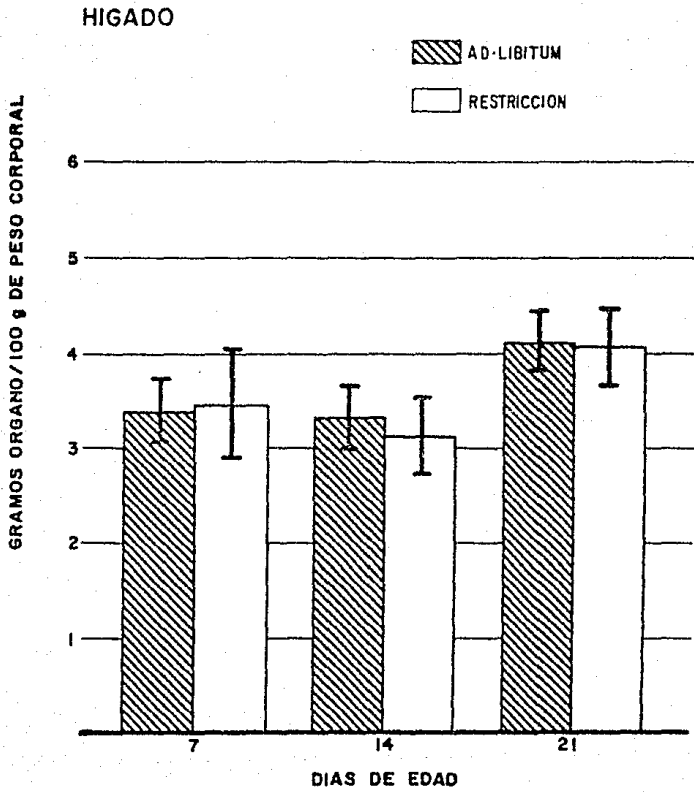


Fig. 17

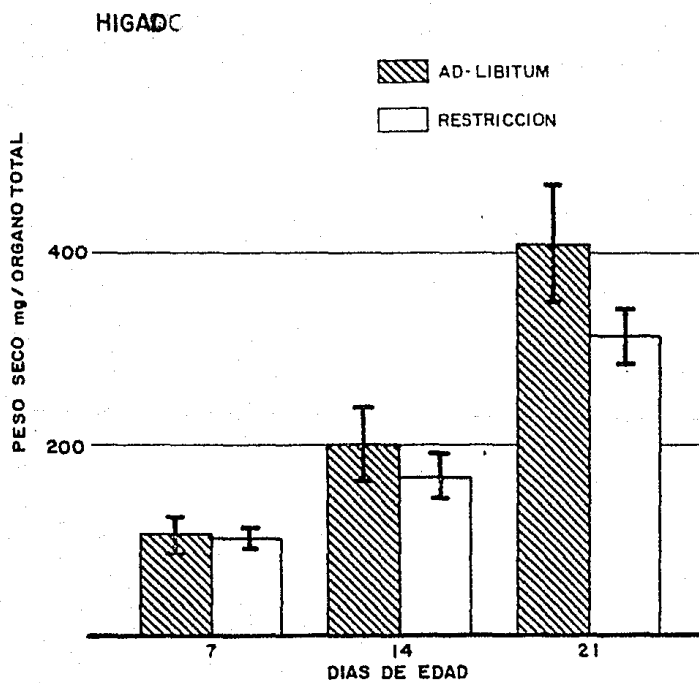


Fig. 18

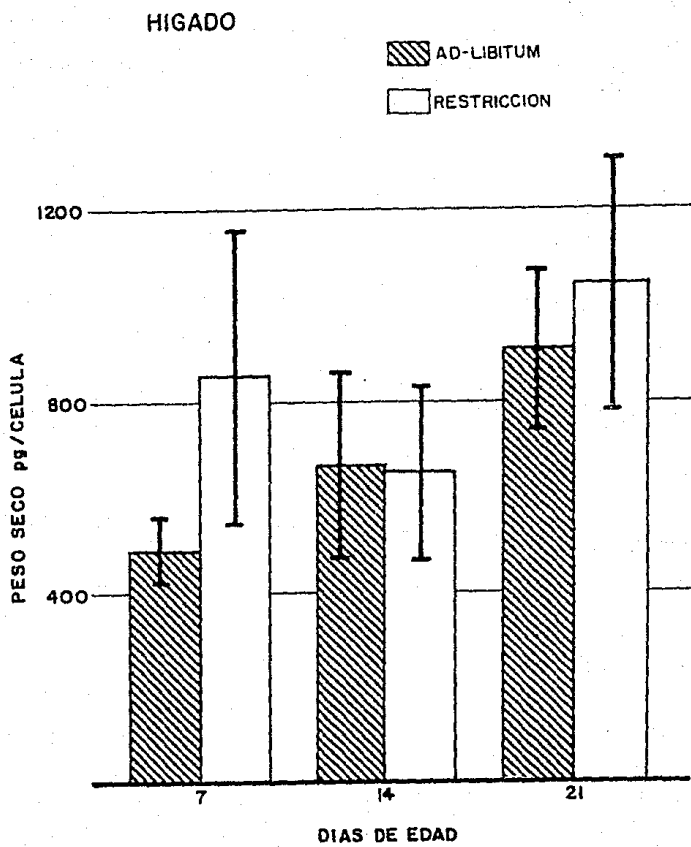


TABLA X
 PESO HUMEDO Y SECO DEL HIGADO, ABSOLUTO Y POR CADA 100g DE PESO CORPORAL

GRUPO	PESO HUMEDO						PESO SECO	
	DIAS DE EDAD	(n)	ABSOLUTO (g)		g/100g PESO CORPORAL		ABSOLUTO mg/TEJIDO TOTAL	
			CC	(n)	CR	CC	CR	CC
7	(6)	0.53	(8)	0.47	3.36	3.48	114.2	98.86
		0.08		0.09	0.34	0.68	14.92	16.18
14	(6)	0.87	(5)	0.72	3.29	3.12	197.71	164.38
		0.17		0.11	0.35	0.38	37.99	24.3
21	(6)	1.66	(5)	1.3	4.1	4.06	416.32*	314.33
		0.31		0.13	0.34	0.38	61.46	27.78

CC = Crías Control

CR = Crías con Restricción

Resultados expresados
 como Promedio
 ± Desviación Estandar

"t" Student

* p<0.01

El contenido de proteínas expresado tanto en mg/g de tejido, como en mg por órgano total aumentó progresivamente con la edad, en ambos grupos de tal manera que se triplicó en los primeros 21 días de edad. Las diferencias no fueron significativas entre los grupos "ad libitum" y restringidas en ninguna de las edades estudiadas (Tablas XI y XII, Fig. 19 y 20).

El contenido de DNA por órgano total aumentó progresivamente con la edad en ambos grupos, mientras que al referirse por g de tejido el contenido disminuyó progresivamente (tablas XI y XII). Esta aparente contradicción guarda relación en su primer término con el aumento en el número de células por el crecimiento del órgano. En el segundo término la disminución de DNA se explica por un aumento en el tamaño de las células que redonda en un menor número de unidades celulares por gramo.

La concentración de DNA por órgano total fue menor en el grupo restringido que en el "ad libitum", pero la diferencia fue significativa únicamente a los 7 días de edad (1.45 ± 0.17 vs 0.81 ± 0.33) ($p < 0.001$) (Tabla XI, Fig. 21). Este mismo patrón se observa cuando se informa el DNA en mg por gramo de tejido (Tabla XII). El cálculo del número de células por órgano (Tabla XIII) mostró que la celularidad del hígado en el grupo de restricción menor a los 7 y 21 días ($p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente) (tabla XIII).

A los 14 días el grupo restringido comparado con el "ad libitum" no mostró diferencia significativa. (Tabla XIII).

Fig. 19

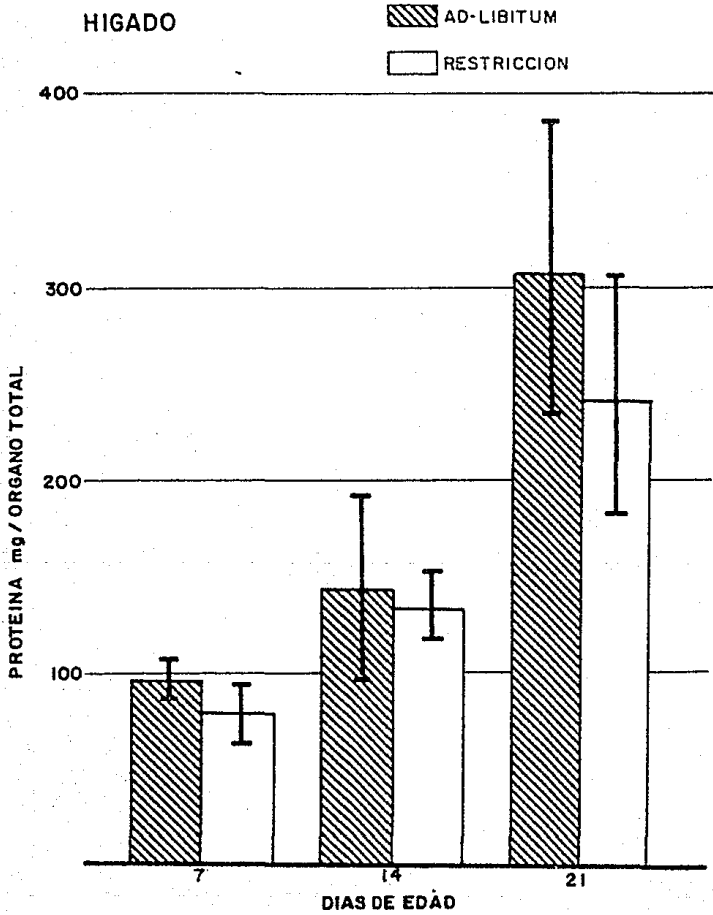


Fig. 20

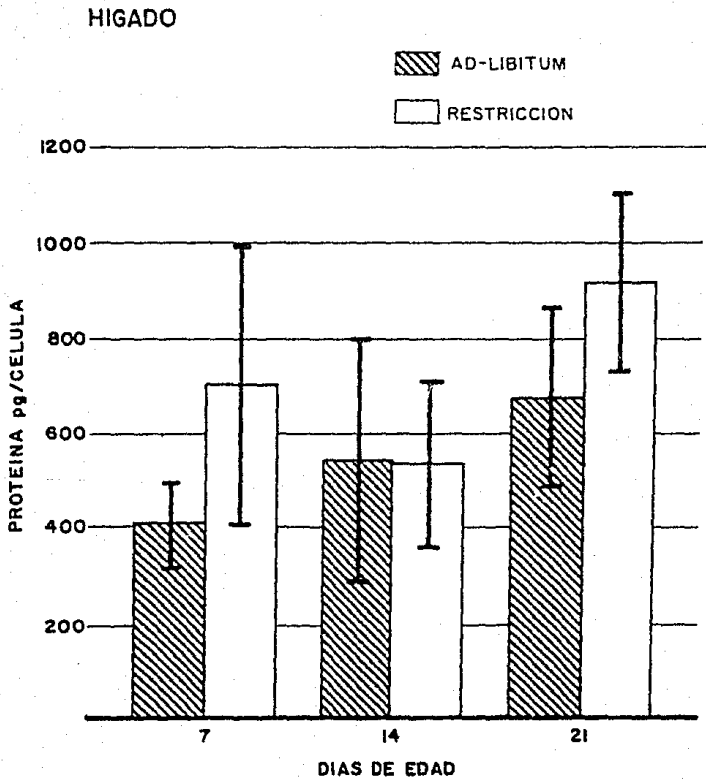
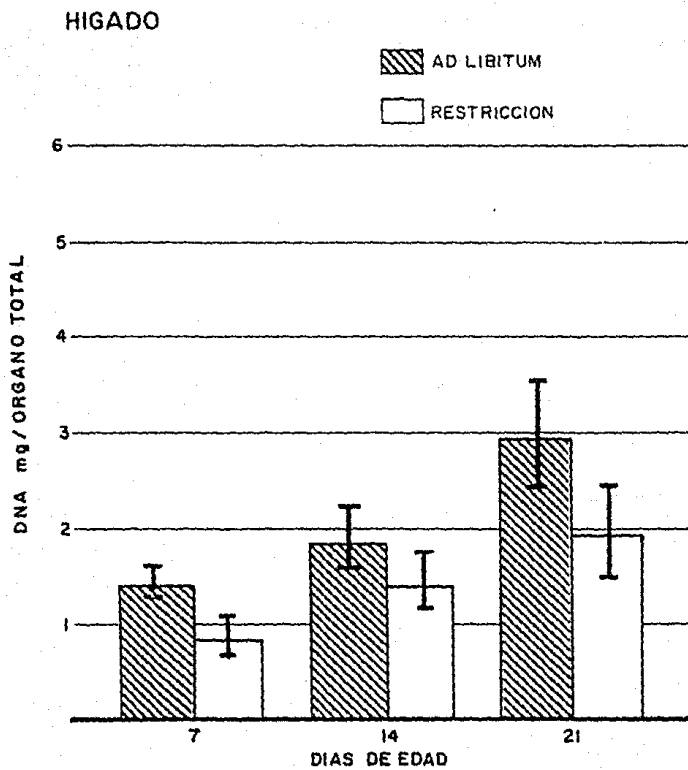


Fig. 21



El peso por célula aumentó con la edad. En las restringidas el peso de cada célula tendió a ser mayor aunque la diferencia fue sólo significativa a los 7 días ($p < 0.01$). Esta hiperplasia puede compensar el menor número de células de tal manera que no existan diferencias en el peso total del órgano entre ambos grupos (Tabla XIII, Fig. 22).

La concentración de RNA por órgano total fue menor en el grupo de restricción a los 14 días (5.25 ± 0.89 vs 3.18 ± 0.43 mg) ($p < 0.001$) y a los 21 días de edad (9.08 ± 1.41 vs 6.71 ± 0.76 mg) ($p < 0.005$) (Tabla XI, Fig. 23). Mientras que analizado por célula, el contenido de RNA fue mayor ($p < 0.01$) en el grupo de restricción a los 7 días de edad (9.88 ± 1.26 vs 18.32 ± 6.86) sin diferencia a las otras edades (Tabla XIII, Fig. 24). El contenido de RNA por gramo de tejido fue similar entre los dos grupos y a las tres edades estudiadas (Tabla XII).

Fig. 22

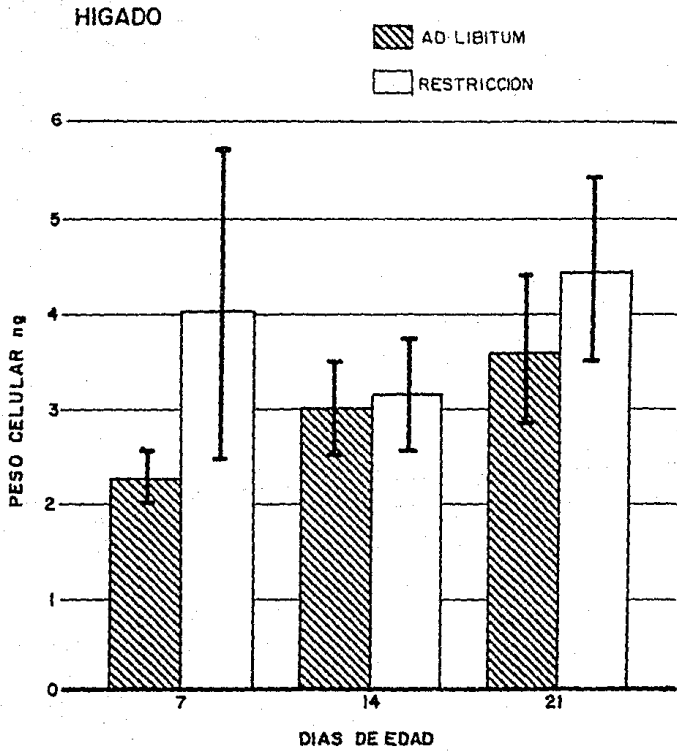


Fig. 23

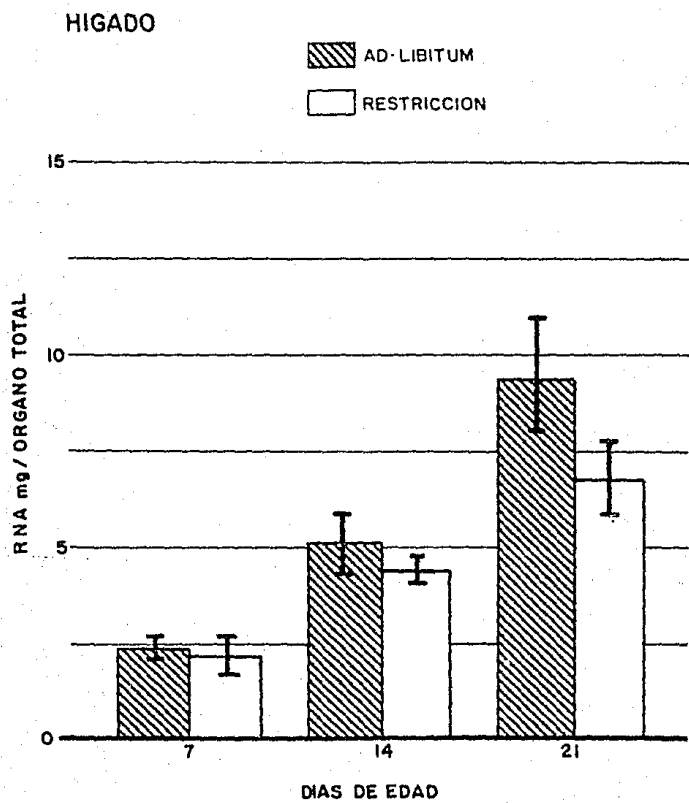


Fig. 24

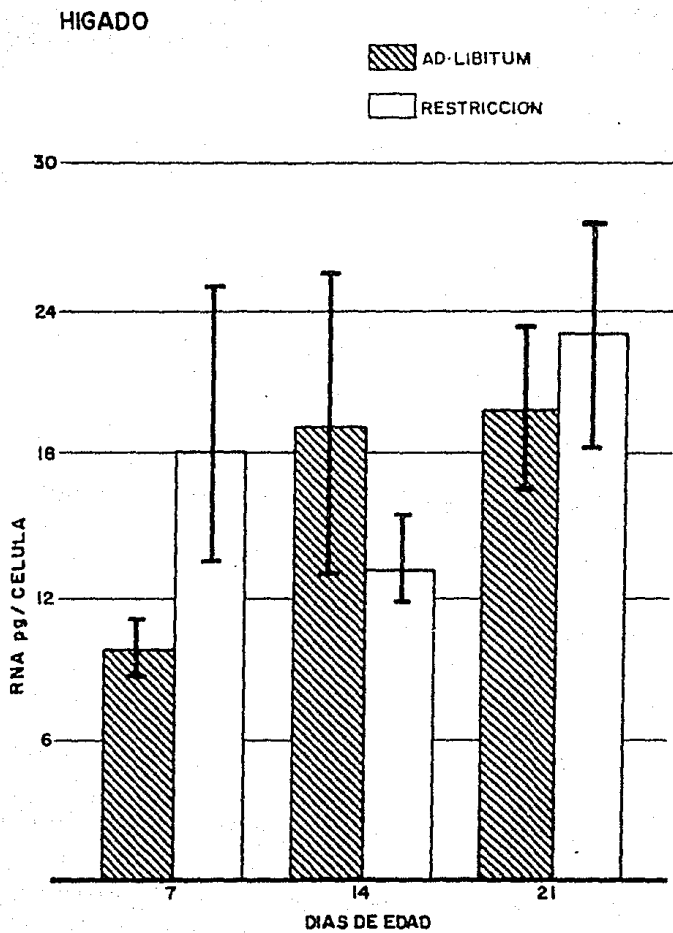


TABLA XI

HIGADO. CONTENIDO DE PROTEINAS, RNA Y DNA POR ORGANIO

GRUPO	CONTENIDO EN EL ORGANIO (mg)								
	(n)	PROTEINA			RNA		DNA		
		CC	(n)	CR	CC	CR	CC	CR	
DIAS DE EDAD	7	(6)	95.86	(8)	79.61	2.31	2.14	1.45	0.81*
			20.5		13.15	0.34	0.46	0.17	0.33
14	(6)	148.53	(5)	136.98	5.25	3.18*	1.78	1.45	
		46.86		37.67	0.89	0.43	0.41	0.31	
21	(8)	312.06	(5)	269.76	9.08	6.71**	2.92	1.87	
		85.01		33.48	1.41	0.76	0.65	0.45	

CC = Crfas Control

CR = Crfas con Restricción

Resultados expresados
como Promedio

* p < 0.001

** p < 0.005

‡ Desviación Estandar

"†" Student

TABLA XII

HIGADO. CONTENIDO DE PESO SECO, PROTRINA, RNA Y DNA POR GRAMO DE TEJIDO

GRUPO	CONTENIDO EN mg POR GRAMO DE TEJIDO									
	PESO SECO				PROTEINA		RNA		DNA	
DIAS DE EDAD	(n)	CC	(n)	CR	CC	CR	CC	CR	CC	CR
7	(6)	214.53	(8)	211.72	182.05	170.85	4.35	4.54	2.75	1.73 *
		17.3		24.1	48.0	21.32	0.51	0.55	0.37	0.65
14	(6)	227.09	(5)	228.18	174.11	187.42	6.12	4.46	2.05	2.01
		16.24		15.23	60.7	23.23	1.15	0.72	0.33	0.37
21	(8)	252.09	(5)	241.63	185.61	206.8	5.51	5.15	1.80	1.44
		13.62		4.18	25.73	11.99	0.47	0.16	0.50	0.32

CC = Crías Control

CR = Crías con Restricción

Resultados Expresados como Promedio
± Desviación Estandar

"t" Student

* $p < 0.001$

TABLA XIII

HIGADO. CONTENIDO DE PESO SECO, PROTEINA Y RNA POR CELULA

DIAS DE EDAD	N° CELULAS				PESO POR CELULA		CONTENIDO EN LA CELULA (µg)					
	10 ⁶				ng		PESO SECO		PROTEINA		RNA	
	(n)	CC	(n)	CR	CC	CR	CC	CR	CC	CR	CC	CR
7	(6)	234.67	(8)	130.69 ⁿ	2.29	4.1 ^{**}	490.57	856.43 ^{**}	410.2	707.3	9.88	18.32 ^{**}
		27.78		53.3	0.29	1.61	69.82	309.15	92.78	290.78	1.26	6.86
14	(6)	287.66	(5)	233.23	3.09	3.17	667.73	650.36	548.71	544.41	19.25	13.56
		67.57		50.85	0.49	0.6	193.31	182.48	251.76	166.56	6.39	1.67
21	(8)	499.19	(5)	275.44 ^{**}	3.64	4.48	910.7	1051.25	680.11	923.01	19.85	23.0
		105.71		49.29	0.78	0.95	169.02	263.19	189.42	187.29	3.58	4.74

CC = Crías Control

CR = Crías con Restricción

Resultados Expresados como Promedio ± Desviación Estandar

"t" Student

* p<0.001

** p<0.01

Másculo

El peso húmedo del tejido total en gramos referido a 100% de peso corporal aumentó progresivamente con la edad en ambos grupos, duplicándose entre el día 7 y 21 de edad, el incremento más rápido ocurrió después del día 14 (Tabla XIV). El peso fue similar entre el grupo "ad libitum" y el de restricción a las tres edades estudiadas (fig. 25 y 26).

El peso seco expresado en mg/tejido total presentó diferencias significativas entre el grupo "ad libitum" y de restricción a los 7 días de edad ($p < 0.001$) (Tabla XIV, Fig. 27). Al analizarse el contenido de peso seco en mg/g de tejido no se observó diferencia significativa excepto al séptimo día en el cual el peso seco fue menor en las restringidas ($p < 0.01$) (tabla XVI, Fig 28).

El contenido muscular protéico aumentó progresivamente con la edad, con un aumento de casi 6 veces entre el 7o y 21o día en las "ad libitum" y casi 8 veces en las restringidas (Tabla XV, Fig. 29). Aún cuando las restringidas tendieron a tener una concentración menor que las "ad libitum" la diferencia fue significativa ($p < 0.001$) sólo al séptimo día. Un patrón similar se observó cuando el contenido fue expresado por gramo de tejido (Tabla XVI, Fig. 30).

La concentración de DNA por tejido total fue menor en el grupo de restricción a los 7 días de edad ($P < 0.01$) (Tabla XV). No hubo diferencias en las otras edades, ni cuando se analizó por gramo de tejido (Tabla XVI).

Fig. 25

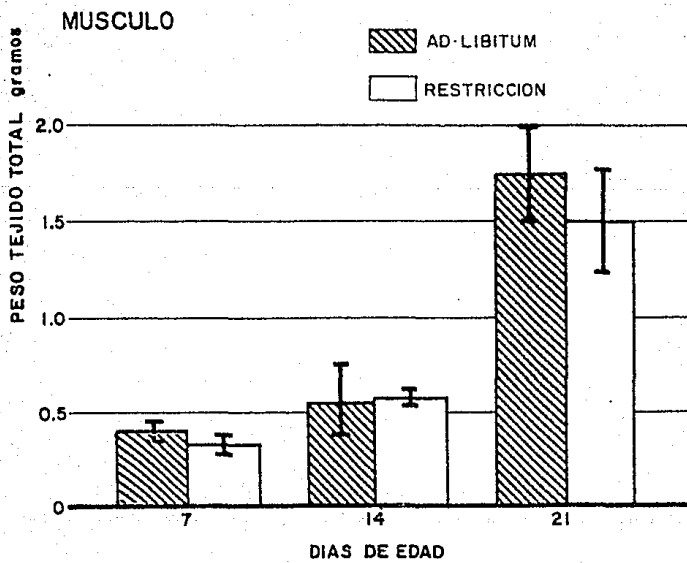


Fig. 26

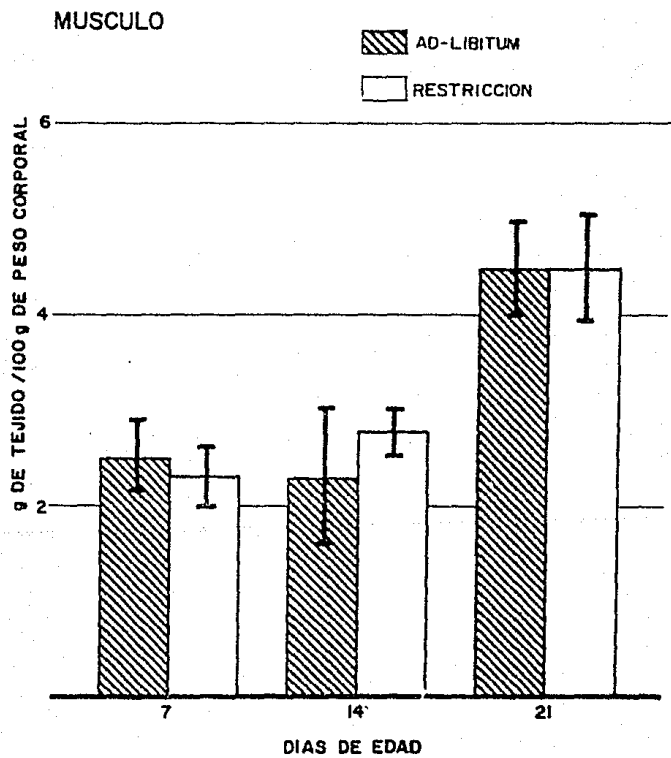


Fig. 27

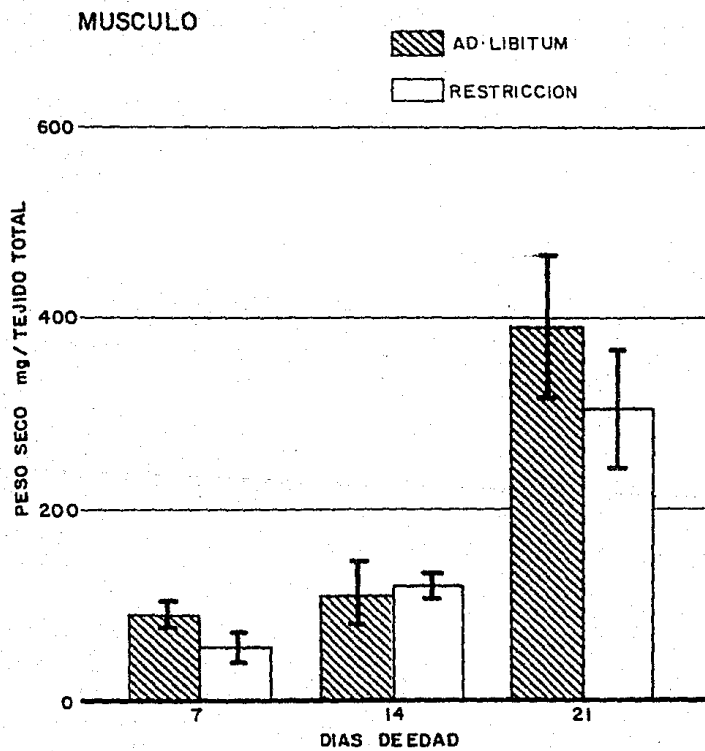


Fig. 28

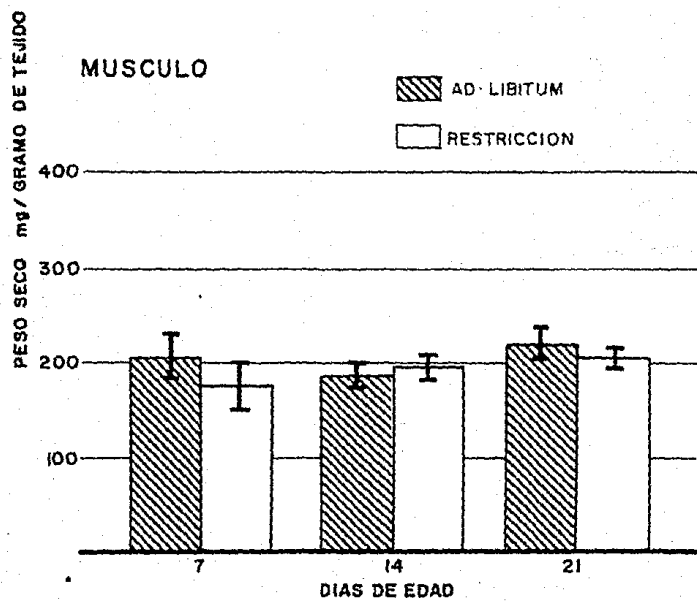


Fig. 29

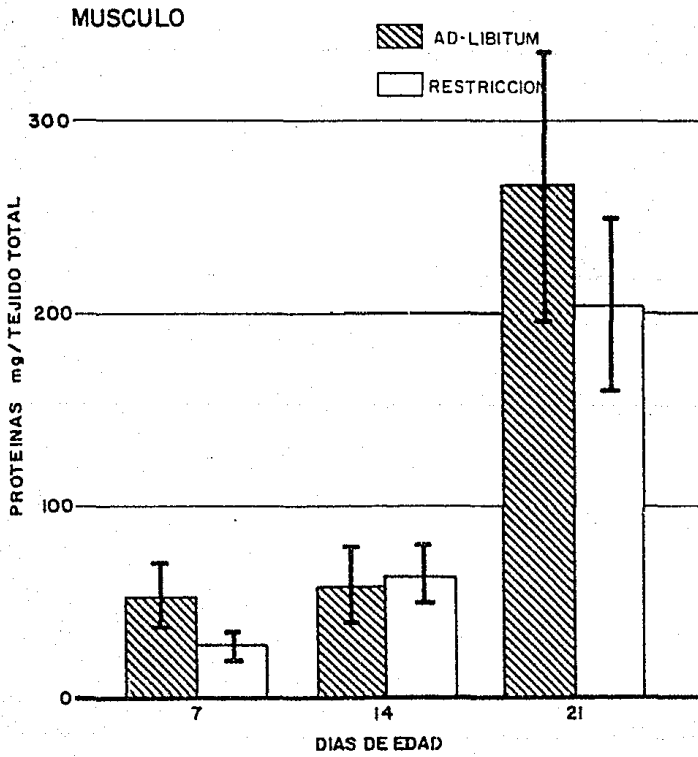
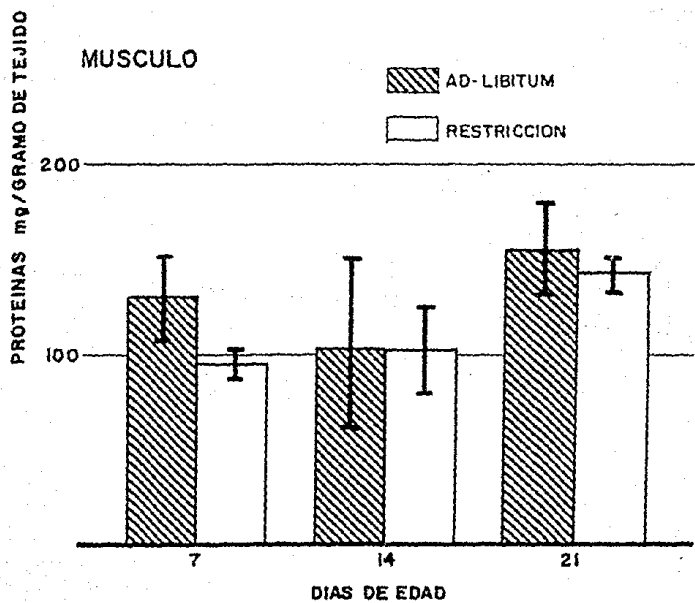


Fig. 30



El DNA por tejido total presentó tendencia a aumentar con la edad, mientras que el DNA por gramo de tejido presentó un patrón contrario o sea una tendencia a ser menor (Figuras 31 y 32).

La concentración de RNA del músculo presentó el mismo comportamiento descrito para el DNA. Fue menor en el grupo de restricción a los 7 días de edad (0.61 ± 0.1 mg/tejido total) ($p < 0.001$), y similar en ambos grupos, a las otras edades (Tabla XV). No existieron diferencias entre los grupos al reportarse por gramo de tejido (Tabla XVI). Se observó que la concentración de RNA por tejido total fue mayor a los 21 días en comparación con las edades previas, mientras que por gramo de tejido resultó lo opuesto (Figuras 33 y 34).

En consideración de que la fibra muscular es una célula multinucleada (57) los parámetros estudiados no fueron analizados en su contenido por célula.

Fig. 31

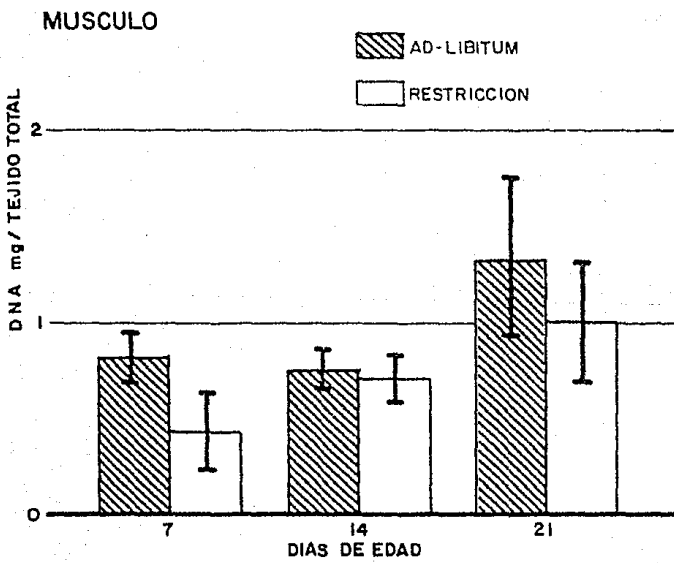
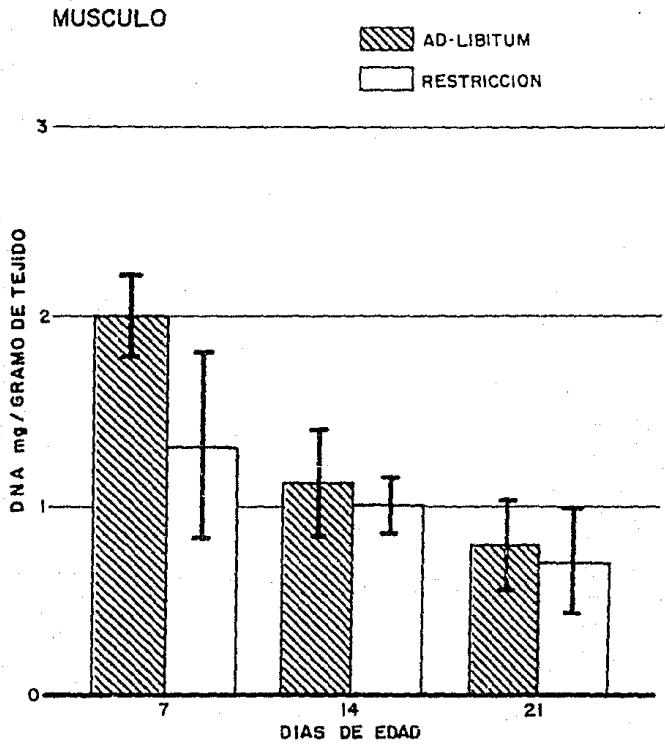


Fig. 32



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 33

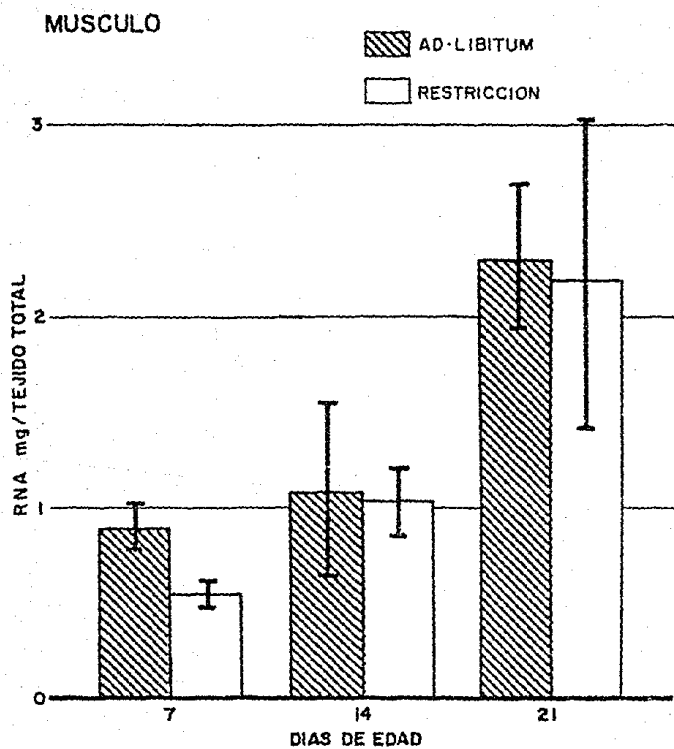


Fig. 34

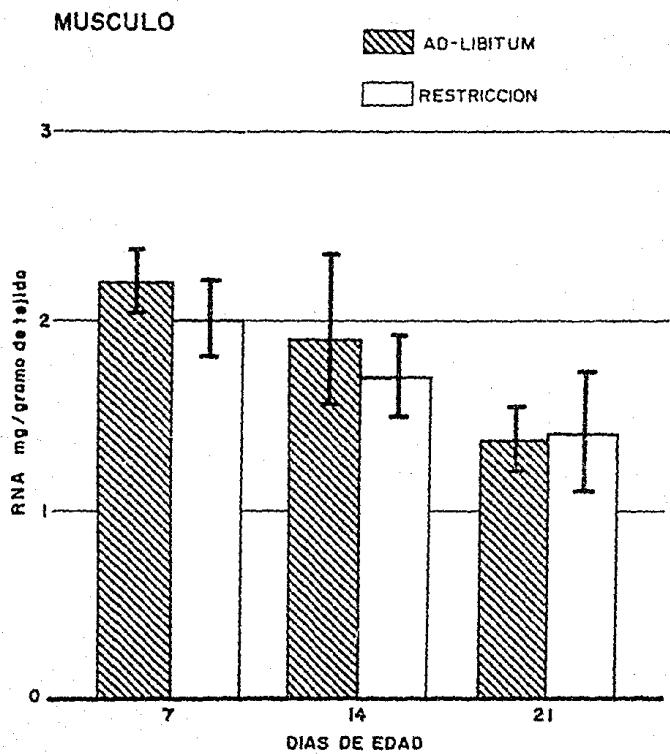


TABLA XIV

PESO HUMEDO Y SECO DEL MUSCULO, ABSOLUTO Y POR CADA 100g DE PESO CORPORAL

GRUPO	PESO HUMEDO						PESO SECO	
	ABSOLUTO (g)		g/100g PESO CORPORAL				ABSOLUTO mg/TEJIDO TOTAL	
DIAS DE EDAD	(n)	CC	(n)	CR	CC	CR	CC	CR
7	(6)	0.4	(6)	0.31	2.54	2.27	66.74*	54.99
		0.05		0.05	0.37	0.28	15.14	15.9
14	(6)	0.59	(5)	0.65	2.3	2.81	110.29	123.78
		0.16		0.12	0.69	0.12	32.05	10.62
21	(8)	1.77	(5)	1.47	4.49	4.5	395.11	306.09
		0.32		0.32	0.5	0.55	79.63	65.35

CC= Crias Control

CR= Crias con Restricción

Resultados expresados como Promedio \pm Desviación Estandar

"t" Student * p<0.01

TABLA XV
MUSCULO. CONTENIDO DE PROTEINAS, RNA Y DNA POR TEJIDO TOTAL

GRUPO	CONTENIDO EN EL TEJIDO TOTAL (mg)							
	PROTEINA				RNA		DNA	
EDAD EN DIAS	(n)	CC	(n)	CR	CC	CR	CC	CR
7	(6)	53.24	(8)	25.22*	0.89	0.61*	0.80	0.42**
		15.65		5.14	0.14	0.1	0.14	0.24
14	(6)	65.71	(5)	67.94	1.17	1.09	0.68	0.69
		33.72		8.48	0.53	0.13	0.2	0.13
21	(8)	281.19	(5)	205.52	2.28	2.09	1.22	0.96
		62.05		44.46	0.42	0.78	0.3	0.3

CC = Crfas control

CR = Crfas con Restricción

Resultados expresados

como Promedio \pm Desviación Estandar

* $p < 0.001$

** $p < 0.01$

"t" Student

TABLA XVI
MÚSCULO, PESO SECO, CONTENIDO DE PROTEÍNAS, DNA Y RNA

Grupo	n	mg por Gramo de Tejido			
		Peso Seco	Proteína	DNA	RNA
AD LIBITUM					
EDAD EN DIAS					
7	6	214.91 ^A	130.32 ^A	1.98	2.19
		13.64	22.39	0.24	0.18
14	6	185.09	107.47	1.14	1.89
		5.95	39.33	0.25	0.45
21	8	223.03	159.51	0.69	1.30
		13.56	20.62	0.17	0.25
RESTRICCIÓN ALIMENTARIA					
EDAD EN DIAS					
7	8	175.68	86.0	1.31	2.0
		21.91	14.7	0.52	0.19
14	5	190.99	104.03	0.98	1.68
		16.7	14.31	0.14	0.18
21	5	108.98	140.51	0.68	1.40
		4.15	7.45	0.26	0.34

Promedio ± Desviación Estándar

"t" Student * p < 0.001

VI. DISCUSION.

Modelo de restricción alimentaria.

Principalmente en los países en vías de desarrollo existen numerosas madres en las áreas rurales y urbanas pobres, quienes mantienen una lactancia con volúmenes de leche aparentemente suficientes para el crecimiento de sus hijos a pesar de una nutrición subóptima o marginal, de las que no se conocen cuáles son las adaptaciones metabólicas que tiene que efectuar su organismo para sostener la lactancia (58-61). Cuando en las ratas se restringe la dieta materna, se afecta el peso y se altera la conducta de las crías (62,63), la afectación es directamente proporcional a la severidad de la restricción, así cuando a la rata se le suministra el 75% de lo que ingiere "ad libitum", es capaz de producir leche en cantidad suficiente para el crecimiento de sus crías, pero necesita utilizar sus reservas corporales, cuando se les suministra sólo el 50% de la alimentación "ad libitum" la rata es incapaz de sostener la producción láctea y por lo tanto tampoco sostiene el crecimiento de la camada (64). Dado que éticamente no es posible estudiar estos aspectos en los humanos se eligió un modelo experimental en que pudieran explorarse algunas de las adaptaciones metabólicas durante el embarazo y la lactancia. En la rata se ha observado que cuando se le restringe la ingesta desde el día cero de embarazo disminuye el número de implantaciones y aumenta la reabsorción de los productos como respuesta a una desnutrición

aguda (65,67), motivo por el que se inició la restricción después de la implantación del huevo, y se continuó durante la lactancia para simular un cuadro de desnutrición crónica que permitiera el estudio de las crías en la etapa postnatal.

Adaptaciones en la rata madre.

Las ratas madres durante la lactancia alimentadas "ad libitum" aumentan su ingesta en 300% y su peso corporal en 20% en comparación a la rata control (virgen), datos que coinciden con lo reportado previamente para ratas de la misma cepa y de edad similar (68,69). El peso corporal del grupo bajo restricción, no alcanzó el peso del grupo "ad libitum", incluso su peso permaneció similar al de la rata virgen, por lo que el suministro de sólo el 70% de lo que ingiere el grupo "ad libitum" afectó importantemente el estado nutricional, no obstante que ambos grupos tienden a sostener su peso a través de los 21 días de lactancia (64).

A partir del 16° día de lactancia la cría inicia su ingesta de alimento sólido por lo que se reduce el alimento administrado y por lo tanto el consumo a la rata madre, esto equivale que a partir de éste tiempo la restricción alimentaria es mayor del 70% por lo que la ingesta registrada esta sobrestimada. Cabe señalar que el factor de consumo de alimento por la cría también está presente en el grupo "ad libitum" por lo que la subestimación es para ambos grupos.

Cuando la rata se alimenta "ad libitum" produce alrededor de 40ml

de leche por día, cantidad que expresada por kg de peso es mayor al compararse a otros mamíferos, esto es posible porque durante la lactancia utiliza sus reservas corporales acumuladas desde antes y durante el embarazo, y aumenta la ingesta alimentaria hasta por tres veces más que antes del embarazo (70-74). En este estudio el peso de la rata madre restringida fue menor que el de la rata madre "ad libitum" y la diferencia se mantuvo sin variación durante toda la etapa de amamantamiento, no obstante la restricción alimentaria y el gasto impuesto por la lactancia, ante estas condiciones esto puede suceder si el animal moviliza sus reservas grasas (75-76) y posiblemente tejido muscular, como ha sido reportado en modelos semejantes (77-82). Aunque en este trabajo no se realizó el estudio de la producción y composición de la leche, es importante señalar que Rasmussen reporta que la composición de la leche en ratas que ingieren el 75% de la ingesta "ad libitum" no presentan variación, hay que considerar que el proceso de síntesis de leche no se ve afectado, en tanto que con ingesta por abajo del 60% si se afectan las concentraciones de proteínas, lípidos, lactosa y contenido calórico (83).

Peso corporal de las crías.

Los datos obtenidos a las 24 hs posteriores al parto muestran que el peso de la cría al nacimiento no fue afectado por la restricción alimentaria materna, a pesar de que el peso corporal materno a este tiempo es menor en el grupo de restricción en comparación al grupo "ad libitum". El peso de las crías al

nacimiento concuerda con lo reportado en la literatura para la rata Sprague-Dowley (48,66). Veinticuatro horas posteriores al nacimiento se realizó el ajuste de la camada a 8 crías, con el cuidado de mantener el número hasta que finalizará la lactancia, las diferencias en el tamaño de la camada pueden representar un factor moderador en el efecto de la restricción materna sobre el crecimiento de la cría (84,85).

El peso del grupo de crías en restricción fue menor a partir del 5° día, con una diferencia de casi 7 g al finalizar la lactancia por lo que se observa que las ratas madres bajo restricción alimentaria no pueden sostener el incremento de peso adecuado para la cría. Si analizamos el porcentaje de ganancia de peso por cada semana, encontramos que del nacimiento al 7° día existe una ganancia del 100 % en ambos grupos; de este día al 14 la ganancia de peso fue del 72 % y del 14 al 21 fue de 44 % para los dos grupos. Si analizamos el registro de peso por día: del nacimiento al 14 día presenta una ganancia de peso de aproximadamente 2 g; a partir del 15° día el aumento es de alrededor de 3 g, a este tiempo se presenta la introducción de alimento sólido en la rata, ya que la cría es capaz de roer por sí misma el alimento expuesto a la madre y en los roedores menores se describe un aumento de peso en el momento de la ablactación (86,87).

Longitud de la cría.

La valoración de la medición de la longitud de la cola en la rata ha sido considerada una forma práctica y de mayor precisión para

el registro del crecimiento longitudinal. En nuestro estudio observamos que al nacimiento no existe diferencia entre nuestros grupos, a partir del 15^o día la diferencia fue manifiesta y llegó a ser hasta de 1.0 cm a los 21 días de edad, por lo que consideramos que la restricción alimentaria materna tuvo efecto sobre el crecimiento longitudinal de la cría. Únicamente cuando se somete a la rata a una restricción severa del 50 % va a existir una reducción en la talla y en el peso corporal de la rata, tanto al nacimiento como al finalizar la lactancia, llegando a ser alrededor del 50 % del reportado para el grupo "ad libitum".

Composición tisular de la cría.

De acuerdo al objetivo de estudiar el efecto de una restricción calórica global del 30% en la rata lactante sobre la composición tisular de la cría con referencia al crecimiento, se seleccionaron dos tejidos para dicha evaluación: tejido hepático y músculo esquelético. Las razones para la selección de estos tejidos fueron las siguientes: 1) el hígado es considerado el órgano principal del metabolismo de los nutrientes, 2) El crecimiento de la masa muscular fue examinado por ser un blanco importante en caso de privación nutricional, ya que constituye el 45% del peso corporal total.

Desde hace tiempo diferentes técnicas bioquímicas han hecho posible estudiar en forma cuantitativa el crecimiento celular de los tejidos. En 1962 Enesco y LeBlond (88) midieron el contenido de DNA de diferentes órganos de la rata, siendo capaces de

calcular el número de células de una manera simple, el contenido total analizado de DNA dividido entre 6.2 picogramos (contenido de DNA de todas las células diploides de la rata). Una vez que el número de células es determinado, el contenido total de proteínas y lípidos por célula, así como el peso por célula se pueden determinar simplemente con registro del peso del órgano y determinación del contenido total de proteínas y lípidos en el órgano y posteriormente dividir por el número de células.

De esta manera es posible conocer el crecimiento celular, y diferenciar la contribución por aumento en el número celular y la contribución por aumento del tamaño celular. Aunque este tipo de análisis da idea del promedio del contenido por célula, no necesariamente refleja el contenido real por célula única, ya que puede variar la composición entre una célula y otra. Dentro de estas limitaciones, este análisis brinda información general o panorámica de lo que sucede a un nivel celular.

Hígado.

El peso total del órgano así como el referido a 100 g de peso corporal, fue similar entre los dos grupos. En cada una de las edades estudiadas el peso del órgano correspondió al adecuado para la edad, (89,90). La restricción no presentó efecto sobre el peso total del hígado.

Referente a la composición celular, se muestran diferencias significativas entre los grupos estudiados a la edad de 7 días. Los resultados presentados aquí indican que existe una reducción en el contenido de DNA por gramo de tejido y en el contenido total del órgano, así como un incremento en el peso celular, peso seco, RNA y concentración de proteínas por célula. Se observa una reducción en el crecimiento celular, que se manifiesta por la reducción en el número de células lo cual explica el aumento en el peso celular y en el contenido de peso seco, proteína y RNA por célula. Es importante mencionar que el contenido de RNA y proteína por órgano total no disminuyó en forma similar al contenido de DNA y del número de células.

En el estado de desnutrición existe el mecanismo compensatorio de disminuir la masa metabólicamente activa (como lo demuestra la disminución de la celularidad del hígado), al mismo tiempo que aumenta la eficiencia celular a fin de reducir el gasto metabólico (aumento de peso celular, proteínas, y RNA) (91,92). A la edad de 14 días se observó que los valores de los parámetros estudiados en el grupo bajo restricción se asemejan a las del

grupo "ad libitum". El número de células aumenta en un 100%, cercano al descrito para el grupo "ad libitum". Se ha señalado que durante la lactancia las crías, son capaces de presentar una "recuperación", cuando la restricción no es muy severa, se presenta un aumento en la celularidad o crecimiento celular y deja de manifiesto el efecto de que una alimentación adecuada proporcionada a través de la leche, es capaz de cubrir los requerimientos necesarios para el desarrollo tisular postnatal.

A los 14 días únicamente se presentó el efecto de la restricción sobre el contenido de RNA por órgano total, los demás parámetros estudiados fueron similares al grupo "ad libitum". Esta edad de la cría coincide con el tiempo descrito de máxima producción láctea, y presenta un efecto compensatorio por parte de la rata madre.

A la edad de 21 días de edad, se vuelve a observar un patrón similar al de 7 días, el menor contenido de peso seco, DNA y RNA por tejido total del hígado en las crías nos habla de la restricción dietaria. Sin embargo los resultados por célula nos demuestran que son similares a las concentraciones de las de una rata bien alimentada, lo que nos hablaría del mecanismo compensatorio de la célula para mantener la eficiencia metabólica del órgano.

En el hígado se puede observar un aumento en el crecimiento celular, así como en las concentraciones de los parámetros estudiados por órgano total de alrededor del 100%, entre los 14 y 21 días de edad, esta aceleración del crecimiento hepático coincide con la introducción de alimento sólido en la

alimentación de la cría.

Los datos que reportamos en cuanto a concentraciones por órgano total y peso del tejido, a los 21 días de edad coinciden con los reportados por otros autores para la rata Sprague-Dowley a esta misma edad (45,90).

Músculo

El número de fibras musculares en la rata, se define alrededor del nacimiento, mientras que el número de núcleos continúa en aumento hasta por tres meses y se asocia a hipertrofia muscular (45). Debido a que las células del músculo esquelético son multinucleadas, la cuantificación de DNA no es un buen indicador de celularidad, por lo que no se hizo el análisis por célula.

A los 7 días de edad, el peso húmedo y seco de la masa muscular al igual que todos los parámetros estudiados fueron menores en el grupo bajo restricción. Se ha reportado previamente que la restricción alimentaria lleva a una disminución en el peso de diferentes tejidos así como en el contenido total de DNA, RNA y proteínas, estos datos que han sido reportados para hígado, cerebro, corazón y riñón (90).

En este trabajo se brinda información primaria en cuanto a la composición tisular del músculo esquelético ya que se observó que la restricción calórica global de 30% sobre la rata madre durante la lactancia, es capaz de afectar la masa muscular de la cría en su composición celular. Sin embargo este efecto detectado a los 7 días de edad, no es continuo, por el contrario a los 14 días de edad no existe diferencia entre el grupo de crías "ad libitum" y

el de restricción. El peso húmedo y peso seco, así como concentraciones totales de proteínas, DNA y RNA fueron similares entre ambos grupos.

A pesar de que la restricción continuó a lo largo de la lactancia, a los 21 días de edad la cría no presentó alteración en su tejido muscular, la velocidad de crecimiento del músculo aumentó alrededor del 100% entre los 14 y 21 días, no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros estudiados en ambos grupos.

Glore (57) estudió la composición de la fibra muscular en la cría durante la lactancia, su objetivo fue conocer el efecto de una restricción alimentaria del 50% sobre la celularidad. Reporta que la desnutrición no causa disminución en el número de células, y presenta únicamente una reducción en el número de núcleos y en la longitud y ancho de la célula muscular. Por lo que respecta a este trabajo, la restricción del 30% no afectó la composición de la fibra muscular.

De acuerdo a los datos si la masa muscular no se ve afectada, surge la pregunta: A qué se debe la disminución en el peso corporal que presenta la cría a partir del 5^o día de edad? Algunos autores han reportado que bajo una restricción del 75% de la ingesta "ad libitum" las crías tienen un peso corporal menor, y presentan una reducción importante en el contenido de grasa corporal, en comparación al grupo control bien alimentado. En el día 14 de lactancia se reporta $34.2 \pm 11.2g$ de grasa en el carcas para la rata control, mientras que el grupo en restricción presenta $20.3 \pm 9.1 g$ (93).

En este trabajo no se realizó la cuantificación de lípidos, ni de agua corporal, por lo que no podemos aportar información al respecto, pero se asume que la masa muscular no presentó variación bajo la restricción, se puede postular que la disminución en peso corporal que presentan las crías tal vez es debida, a la disminución de agua y sobre todo del contenido de lípidos. Se describe que durante la etapa de lactancia, el crecimiento rápido en la rata es a expensas de grasa, después del destete el porcentaje de grasa disminuye y se mantiene constante posteriormente (84).

Debido a que en el crecimiento se ven involucrados muchos tejidos resulta extremadamente difícil el poder definirlo en términos de un sólo tejido. Sin embargo, durante la desnutrición existe pérdida del tejido graso en prioridad a la masa magra (94-97).

VII. CONCLUSIONES

1. La lactancia en la rata Sprague-Dowley bien alimentada presenta un aumento de 300% en su ingesta alimentaria y de 20% en su peso corporal.

2. En la rata madre bajo restricción calórica global del 30%, no se presenta el aumento de peso descrito durante la lactancia. Conserva su peso similar al descrito antes del embarazo.

3. La restricción calórica global de la madre a partir del día 7 de embarazo y durante la lactancia no afecta el peso ni la longitud de la cría al nacimiento.

4. La restricción alimentaria del 30% durante el embarazo y la lactancia conduce a una disminución en el crecimiento postnatal de las crías.

5. Este tipo de restricción afecta negativamente el crecimiento postnatal en peso hasta un 20% y el crecimiento longitudinal en un 12% al finalizar la lactancia, en relación al grupo bien alimentado.

6. La restricción calórica presenta un efecto negativo sobre la celularidad hepática y sobre el incremento de la masa proteica muscular que se detecta a los 7 días de edad. A partir del 14^o día, etapa de mayor producción láctea, se observó una tendencia a la recuperación en ambos tejidos. Al día 21 de edad el efecto de la restricción se manifestó únicamente en el contenido total de peso seco y RNA del hígado, ya que los valores

de los demás parámetros estudiados los días 14 y 21 de edad fueron similares entre el grupo alimentado "ad libitum" y el grupo bajo restricción y coinciden con valores reportados para la rata de esta edad.

7.- Las crías amamantadas por ratas sometidas a restricción alimentaria, presentan una disminución en la masa proteica del hígado y del músculo como manifestación de la menor velocidad de crecimiento, detectada únicamente en la primera semana de nacimiento, al parecer al 14^o día de lactancia intervienen otros mecanismos, a fin de sostener la velocidad de crecimiento. Estos bien pudieran ser por parte de la cría: mayor captación de leche a fin de cubrir las necesidades energéticas del crecimiento (98), introducción de alimento sólido, aumento en la eficiencia de la utilización de energía y nutrientes (99-101), y sacrificio en la acumulación de grasa postnatal a fin de sostener la masa magra (101), y por parte de la madre: utilización de reservas corporales como una adaptación metabólica a fin de cubrir una lactancia y crecimiento de la camada adecuados (102-104).

8. Los resultados obtenidos en este trabajo son manifestación de los mecanismos de adaptación que presentan los seres vivos con el fin de sostener un proceso biológico a pesar de una dieta desfavorable.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Beal AV. Nutrición en el Ciclo de la vida. ed. Limusa, México 1983. pp. 195-233.
2. Rasmussen KM, ScD, Warman NL, MNS. Effect of maternal malnutrition during the reproductive cycle on growth and nutrition status of suckling rats pups. Am J Clin Nutr 1983; 38:77-83.
3. Mephan B, Arnold E. The Secretion of Milk. Institute of Biology. Studies in Biology. London G. B. 1976 pp 1-11.
4. Vaughan TA. Mamíferos. Mamíferos no euterios: monotremas y marsupiales. Ed. Interamericana 3a ed. México, 1986. pp. 46-77.
5. Gould SF. Anatomy of the Breast. En: Neville MC, Neifert MR, eds. Lactation. Physiology, Nutrition and Breast-feeding. New York: Plenum Press, 1983 pp. 23-47.
6. Neville MC. Prolactin Secretion through the life cycle. Milk Ejection and Oxitocin. En: Neville MC, Neifert MR, eds. Lactation, Physiology, Nutrition and Breast-feeding. New York: Plenum Press, 1983: 117-124.
7. Voloschin LM, Tramezzani JH. Milk ejection reflex linked to slow wave sleep in nursing rats. Endocrinology 1979; 105: 1202-1207.

8. McNeilly AS, McNeilly JR. Spontaneous milk ejection during lactation and its possible relevance to success of breast-feeding. Br Med J 1978; 2: 466-468.
9. Noil GL, Suh HK, Frantz AG. Prolactin release during nursing and breast stimulation in post partum and non-post partum subjects. J Clin Endocr 1974; 38: 413-423.
10. Neville MC, Allen JC, Wallers C. "The mechanism of milk secretion". En: Neville MC, Neifert MR, eds. Lactation, Physiology, Nutrition and breast feeding. New York: Plenum Press, 1983 pp. 49-102.
11. Bisset GH. Neurohypophysiol hormones, en: Peptide Hormone. Persons. J. A. Ed. Macmillan Press Lt. Londres 1976.
12. Forsyth JA. The endocrinology of lactation. En: Mephan TB, ed. Biochemistry of lactation. Elsevier Science publishers Amsterdam. 1983 pp. 309-349.
13. Adair LS, Pollitt E, Mueller WH. Maternal anthropometric changes during pregnancy and lactation in a rural Taiwanese population. Hum Biol 1983; 55: 771-783.
14. Beal AV. Nutrición en el Ciclo de la vida. México, Limusa 1983: 135-194.

15. Naweshwara Rao C, Narasinga Rao BS. Nitrogen balance in pregnancy and lactation in women whose protein intake is marginal. *Indian J Res* 1974; 62: 1619-1626.
16. Casey CE, Hambidge KM. Nutritional aspects of human lactation. En Neville, MC, Neifert MR, eds. *Lactation, Physiology, Nutrition and Breast feeding*. New York: Plenum Press, 1983 pp. 199-239.
17. Bauman DE, Neville MC. Nutritional and physiological factors affecting lactation. *Fed Proc* 1984; 43: 2430-2431.
18. Butte NF, Garza C, Stuff JE, Smith ED, Nichols BL. Effect of maternal diet and body composition on lactation performance. *Am J Clin Nutr* 1984 39: 296-306.
19. Gibbs CE, Seitchick J. Nutrition and Pregnancy. En: Goodhart RS, Shils MD, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. New York: Lea-Febriger, 1980 pp. 743.
20. Winick M and Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr* 1966, 89:300-310.
21. Warner RG and Brevet LH. Nutrient requirements of the laboratory rat. En: *National Academy requirements of laboratory animal*. Washington: Printing and Publishing Office. 1972, 56-93.

22. Williamson DH, Munday MR, Jones RG. Biochemical basis of dietary influences on the synthesis of the macronutrients of rat milk. Fed Proc 1984; 43: 2442-47.
23. Mephan TB, ed. Physiological aspects of lactation. En Biochemistry of lactation (Mephan TB., ed) Elsevier. New York. 1983 pp 3-28.
24. Williamson DH. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. Febs Lett (suppl) 1980;117: K93-K105.
25. Campbell RM, Fell BF. Gastrointestinal hypertrophy in the lactating rat its relation to food intake. J. Physiol. (London) 1964; 171: 90-97.
26. Williamson DH. Tissue-specific direction of blood metabolite. Society for experimental Biology Symposium 1973; 27: 283-298.
27. Wilde CJ, Kuhn NJ. Diurnal variation and response to food withdrawal of lactosa synthesis in lactating rats. Biochem J 1978; 174: 319-325.
28. Katz J, Wals PA, Van de Velde RL. Lipogenesis by acini from mammary gland of lactating rats. J Biol Chem 1974; 249: 7348-7357.

29. Grigor MR, Warren SM. Dietary regulation of mammary lipogenesis in lactating rats. *Biochem J* 1980; 188: 61-65.
30. Whitehead RG, Lawrence M, and Prentice. Maternal nutrition and breast-feeding. *Hum Nutr Appl Nutr* 1986; 40A Suppl: 1-10.
31. Moore BJ, Brasel JA. One cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation or nolactation, and recovery: Effects on carcass composition in "ad libitum" feed and food restricted rats. *J Nutr* 1984; 114: 1548-1559.
32. Roberts SB, Coward WA. Lactation increase the efficiency of energy utilization in rats. *J Nutr* 1984; 114: 2193-2200.
33. Zanartu DC, Polan E, Ferreri LE, McGilliard ML. Effect of stage of lactation and varying available energy intake on milk production, milk composition and subsequent tissue enzymic activity. *J Dairy Sci* 1983; 66: 1644.
34. McGregor CA, Stokes MR, Hoover WH, Leonard HA, Junkins LL, Jr. Sniffen CJ, Mailman RW. Effect of dietary concentration of total nonstructural carbohydrate on energy and nitrogen metabolism and milk production of dairy cows. *J Dairy Sci* 1983; 66:39.
35. Sinnet-Smith PA, Vernon RG, Mayer J. Lipogenic enzymes in rat maternal adipose tissue in the perinatal period. *Biochem J* 1980; 186: 937-944.

36. Steingrimsdottir L, Brasel JA, Greenwood MR. Diet, pregnancy and lactation: effects on adipose tissue, lipoprotein lipase and fat cell size. *Metab* 1980; 29: 837-841.

37. Flint DJ, Sinnet-Smith PA, Vernon GR. Role of insulin receptors in the changing metabolism of adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *Biochem J* 1979; 182: 421-427.

38. Tachi N, Tomogane H, Yokoyama A. Diurnal patterns of food intake and plasma corticosterona levels in lactating rat. *Physiol Behav* 1981; 27: 481-486.

39. Strubbe JH, Gorissen J. Meal patterning in the lactating rat. *Physiol Behav* 1980; 25: 775-777.

40. Winddowson EM, Mc.Cance RA. The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. *Proc Royal Soc* 1963; 153: 329-342.

41. Crnic LS, Chase HP. Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk. *J Nutr* 1978; 108: 1755-1760.

42. Sampson DA, Hunsaker HA, Jansen GR. Dietary protein quality, protein quantity and food intake: effects on lactation and on protein synthesis and tissue composition in mammary tissue and liver rats. *J Nutr* 1986; 116: 365-375.

43. Del Angel A, Feria-Velazco A. Efecto de la restricción proteínica sobre el crecimiento de ratas adultas y en desarrollo (primera y segunda generaciones). Arch Invest Med 1982; 13:43-49.
44. Firmsansyah A, Suwandito L, Penn D, Lebenthal E. Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. Am j Clin Nutr 1989; 50: 261-8.
45. Chung-Ja M, Gelardi NL, William O. Growth and cellular composition in rats with intrauterine growth retardation effects of postnatal nutrition. J Nutr 1987; 117: 1463-1468.
46. Harkness EJ, Wagner EJ. Biología y Clínica de conejos y roedores. 1980. Ed. Acribia Zaragoza, España. pp. 1-6.
47. Sampson DA, Masor M, Jansen GR. Protein synthesis in rat tissues during lactation. Biochem J 1984, 224: 681-683.
48. Itzhaki R, Gill AM. A microbiuret method for estimating proteins. Ann Biochem 1964; 9: 401-410.
49. Schneider WC. A method for extraction of nucleic acids. J Biol Chem 1945; 161: 293-298.
50. Giles KW, Myers A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature (London) 1965; 206:

- 51.- Munro HN, Fleck A. The determination of nucleic acids. *Methods Biochem Anal* 1956; 14: 114-176.
52. Ostle B. *Estadística aplicada*. México Limusa, 7a edición 1981. pp 47-62.
53. Wilkinson L. *SYSTAT: The System for Statistics*. Evanston, IL:SYSTAT, Inc., 1987.
54. Winick M, Noble A. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Develop Biol* 1965; 12: 451-466.
55. Sotelo A, Sousa V, De León ME, Parra A. Cortisone-induced changes in body and tissue growth of protein deficient lactating rats. *Nutr Rep Inter* 1979; 20: 643-652.
56. Parra A, Sousa V, Argote R, Sotelo A. Discordant lipogenic and anabolic effects of exogenous insulin protein-deficient lactating rats. *Nutr Rep Inter* 1979 20: 653-662.
57. Glore SR, Layman DK. Cellular development of skeletal muscle of rats during recovery from prolonged undernutrition. *J Nutr* 1987; 117: 1767-1774.
58. Edozien JC, Rahim Khan MA, Waslien CI. Human protein deficiency: results of a Nigerian village study. *J Nutr*, 1976; 106: 312-328.

59. Prentice AM, Roberts SB, Prentice A, Paul AA, Watkinson M, Watkinson A, Whitehead RG. Dietary supplementation of lactating Gambian women. I. Effect on breast-milk volume and quality. *Hum Nutr Clin Nutr* 1983; 37C: 53-64

60. Prentice AM, Whitehead RG, Roberts SB, Paul AA, Watkinson M, Prentice A, and Watkinson AA. Dietary supplementation of Gambian nursing mothers and lactational performance. *Lancet* 1980; 2: 886-888.

61. Coward WA, Paul AA, Prentice AM. The impact malnutrition on human lactation: observations in community studies. *Fed Proc* 1984; 43: 2432-2437.

62. Cowley JJ, Griesel RD. The effect on growth and behavior of rehabilitating first and second generation low protein rats. *Anim Behav* 1966; 14: 506-517.

63. Srivastava U, Uv. M-L., Bhargava S, and Goswami T. Metabolism of nucleic acids and protein in the liver, brain and kidney of female rats subjected to dietary restrictions during the period of gestation as well as the period of growth gestation and lactation. *Can J Physiol Pharm* 1972; 50: 832-839.

64. Young MC, MNS, Rasmunssen MK, ScD. 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 1985; 41: 979-987.

65. Lee CJ, Chow BF. Protein metabolism in the offspring on the underfed mother rats. J Nutr 1965; 97: 439-443.

66. Warman NL, Rasmussen KM. Effects of malnutrition during the reproductive cycle on nutritional status and lactational performance of rat dams. Nutr Ref 1983; 3:527-45.

67. Lederman SA, Rosso P. Effects of food restriction on fetal and placental growth and maternal body composition. Growth 1980; 44: 77-88.

68. Hastings-Roberts MM, Zeman FJ. Effects of protein deficiency, pair-feeding, or diet supplementation on maternal, fetal and placental growth in rats. J Nutr 1977; 107: 973-982.

69. Ozelci A, Romsos DL, Leveille GA. Influence of initial food restriction on subsequent body weight gain and body fat accumulation in rats. J Nutr 1978; 108: 1724-1732.

70. Naismith DJ. The role of body fat, accumulated during pregnancy, in lactation the rat. Proc Nutr Soc 1971; 30: 93A-94A (abs).

71. Kanto U, Clawson AJ. Effect of energy intake during pregnancy and lactation on body composition in rats. J. Nutr 1980; 110:

1829-1839.

72. Naismith DJ, Richardson DP, Pritchard AE. The utilization of protein and energy during lactation in the rat, with particular regard to the use of fat accumulated during pregnancy. Br J Nutr 1982; 48: 433-441.

73. Prentice AM, Whitehead RG. The energetics metabolic of human reproduction. Symp Zool Soc London 1987; 57: 275-304.

74. Cannas R, Romero JJ, Baldwin RL. Maintenance energy requirements during lactation in rats. J. Nutr 1982; 112: 1876-1880.

75. Vernon RG, Flint DJ. Adipose tissue: metabolic adaptation during lactation. Symp Zool Soc London 1984; 51: 119-45.

76. Taylor JB, Calvert CC, Baldwin RL, Sainz RD. Effects of dietary protein, fat, and restriction on body composition and energy balance in lactating rats. J Nutr 1986; 116: 1519-28.

77. Sainz RD, Calvert CC, Baldwin RL. 3-Methylhistidina excretion by lactating and nonlactating rats. Proc Am Soc Anim Sci Western Section 1984; 35: 311-312.

78. Jansen GR, Hunsaker H. Effect of dietary protein synthesis during lactation in rats. J Nutr 1986; 116: 957-968.

79. Millican PE, Vernon RG, Pain VM. Protein metabolism in the mouse during pregnancy and lactation. *Biochem J* 1987; 248: 251-257.
80. Motil KJ, Montandon CM, Hachey DL, Boutton TW, Klein PD, Garza C. Whole-body protein metabolism in lactating and nonlactating woman. *J Appl Physiol* 1989; 66(1): 370-376.
81. Sadurskis A, Kabir N, Wagner J, Forsum E. Energy metabolism, body composition, and milk production in healthy Swedish women during lactation. *Am J Clin Nutr* 1988; 48: 44-49.
82. Bryant DTW, Smith RW. The effect of lactating on protein synthesis in ovine skeletal muscle. *J Agric Sci Camb* 1982; 99: 319-23.
83. Rasmussen KM, Fischbeck KL. Effect of repeat reproductive cycles on pregnancy outcome in "ad libitum" fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr* 1987; 117: 1959-1966.
84. Kennedy GC. Interaction between feeding behavior and hormones during growth. In: *Annals of New York Academy of Sciences. Neural regulation of food and water intake.* New York 1969 pp. 1049-1061.
85. Mattheij JAM, Gruisen EFM, Swarts JJM. The suckling induced rise of plasma prolactin in lactating rats: Its dependence on

stage of lactation and litter size. Hormone Res 1979; 11: 325-336.

86. Cummins AG, Steele TW, Labrooy JT, Shearman JC. Maturation of the rat small intestine at weaning: changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora, and mucosal immune activity. Gut 1988; 29: 1672-1679.

87. Lee PC, Leberthal E. Early weaning and precocious development of small intestine in rats: genetic, dietary or hormonal control. Pediatr Res 1983; 17: 645-50.

88. Enesco N, LeBlond CP. Increase in cell number as a factor in the growth of young male rats. J Embryol Exp Morphol 1962; 10 pp 530-562.

89. Young CM, MS, RD, Lee PC, PhD, LeBental E, MD. Maternal dietary restriction during pregnancy and lactation: effect on digestive organ development in suckling rats. Am J Clin Nutr 1987; 46: 36-40.

90. Srivastava U, Vu My-lien, Goswami T. Maternal dietary deficiency and cellular development of progeny in the rat. J Nutr 1974; 104: 512-520.

91. McNurlan MA, Tomkins AM, Garlick PJ. The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. Biochem J 1979; 178: 373-379.

92. French S. Metabolic adaptation in protein-energy malnutrition. J Amer Coll Nutr 1986; 5: 371-381.
93. Young CM, MNS, Rasmussen KM, ScD. 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 1985; 41: 979-987.
94. Goodman MN, Ruderman NB. Starvation in the rat. I. Effect of age and obesity on organ weights, RNA, DNA, and protein. Am J Physiol 1980; 239 (Endocrinol. Metab. 2): E269-E276.
95. Goodman MN, Larsen PR, Kaplan, MM, Aoki TT, Young VR, Ruderman NB. Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. Am J Physiol 1980; 239 (Endocrinol. Metab. 2) E277-E286.
96. Dunn MA, Houtz SK, Hartsook EW. Effects of fasting on muscle protein turnover, the composition of weight loss and energy balance of obese and non-obese Zucker rats. J Nutr 1982; 112: 1862-1875.
97. Goodman MN, Lowell B, Belur E, Ruderman NB. Sites of protein conservation and loss during starvation: influence of adiposity. Am J Physiol 1984; 246 (Endocrinol. Metab. 9) E-383-E390.

98. Lucas A, Ewing G, Roberts SB, Coward WA. How much energy does the breast fed infant consume and expend? Br Med J 1987; 295:75-77.

99. Roberts SB, Coward WA. The effects of lactation on the relationship between metabolic rate and ambient temperature in the rat. Ann Nutr Metab 1985; 29: 19-22.

100. Nelssen JL, Lewis AJ, Peo ER, Jr, Moser BD. Effect of source of dietary energy and energy restriction during lactation on sow and litter performance. J Anim Sci 1985; (60); 1:171-178.

101. Greeley MG, Meade RJ, Hanson LE. Energy and protein intakes by growing swine. I. Effects on rate and efficiency of gain and on nutrient digestibility. J Anim Sci 1964; 23: 808.

102. Flatt WP, Moe PW. Energy utilisation from diet and body stores. En lactation, ed. Falconer, I.R. London: Butter worths. 1971 pp. 341-47.

103. Illingworth PJ, Jung RT, Howie PW, Leslie P, Isles TE. Diminution in energy expenditure during lactation. Br Med J 1986; 292: 427-1.

104. Manning-Dalton C, Allen LH. The effects of lactation on energy and protein consumption post-partum weight change and body composition of wellnourished North American women. Nutr Res 1983; 3: 293-308.