

COMPOSICION LIPIDICA DE LA PLACENTA DE RATAS CON RESTRICCION DE PROTEINAS Y DEFICIENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES¹

Julia Araya A.,² Ana María Aguilera T.,³ Claudio Soto A.,³
y Lilia Masson⁴

Universidad de Chile
Santiago, Chile

RESUMEN

Se investigó el efecto de la restricción dietética y de la deficiencia de ácidos grasos durante la preñez, en la composición lípida y fosfolípida de la placenta de ratas a los 21 días post-concepción. El estudio se llevó a cabo en ratas hembra vírgenes de la cepa Wistar con un peso promedio de 130 g, las que se dividieron en tres grupos similares. Cada grupo fue alimentado desde antes y durante la preñez de la siguiente manera: el Grupo Control (C) consumió, *ad libitum*, una dieta con 25^o % de la caseína; el Grupo Desnutrido (D) se alimentó con el 50^o % (g/100 g rata) de la cantidad consumida de la misma dieta del grupo C, y al Grupo Desnutrido Deficiente (DD) se le asignó la misma cantidad consumida por el grupo D, pero de una dieta deficiente en AGE.

A los 21 días de edad gestacional, las ratas preñadas de los tres grupos, fueron sacrificadas y se les extrajeron los fetos y las placentas, los cuales se pesaron, liofilizando las placentas. La restricción de una dieta balanceada disminuyó significativamente el contenido de fosfolípidos ($P < 0.05$); la deficiencia severa de AGE sobreimpuesta a la restricción dietética alteró, además, el perfil de los ácidos grasos incorporados a los fosfolípidos, disminuyendo los ácidos grasos de las series n3 y n6 y no aumentando el eicosatrienoico. Ajeno a ello, retuvo los triglicéridos significativamente. Ambos tipos

Manuscrito modificado recibido: 25-7-85.

- 1 Este trabajo fue financiado en parte por el Grant B 1603-8422 de la Dirección General Académica, Departamento de Desarrollo de la Investigación, Universidad de Chile.
- 2 Profesor, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y Director Asociado del Departamento de Nutrición, Independencia 1027, 3er Piso, Santiago, Chile.
- 3 Egresados de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, quienes laboran en la preparación de sus Tesis de Pregrado en el Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 4 Profesor, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

de restricción redujeron el crecimiento fetal; el Grupo DD no modificó el peso placentario, pero sí disminuyó casi a la mitad el número de crías de la camada.

INTRODUCCION

La desnutrición materna o la deficiencia prolongada de ácidos grasos esenciales dañan la función reproductiva de la hembra. La restricción al 50% de una dieta balanceada durante la gestación interfiere el normal crecimiento de la placenta y el feto (1). Por otra parte, una deficiencia prolongada de ácidos grasos esenciales impuesta a la madre desde antes del inicio de la gestación, disminuye el peso del feto, de los órganos fetales y de la placenta (2).

Se ha comunicado que aun cuando la cantidad de lípidos en la placenta es pequeño (3), todos ellos cumplen funciones esenciales: como componentes estructurales, en las membranas; como fuente de energía metabólica intercelular, o como sustratos para la síntesis de hormonas esteroideas, etc.

En vista de la importancia de la naturaleza de los ácidos grasos incorporados a los lípidos, y la de éstos en la función de los tejidos, el propósito del presente estudio fue evaluar la composición lipídica de la placenta y la de las cadenas de los ácidos grasos incorporados a los fosfolípidos de este órgano, en ratas sometidas a restricción de proteína y a una deficiencia de ácidos grasos esenciales, desde antes de la preñez. Un segundo objetivo fue relacionar estos hallazgos con el peso fetal a los 21 días post-concepción.

Provocar deficiencia de ácidos grasos esenciales requiere largos períodos de tratamiento dietético. El animal desnutrido constituye un modelo en el que la deficiencia de ácidos grasos esenciales puede precipitarse en menor tiempo. Un diseño de esta naturaleza podría demostrar la susceptibilidad de los componentes lipídicos de la placenta a la desnutrición materna y a la deficiencia severa de ácidos grasos esenciales. Además, permitiría relacionar estos cambios con el retardo del crecimiento fetal.

MATERIAL Y METODOS

Dietas

La composición de las dietas experimentales se informa en la Tabla 1 A, y la composición de la grasa vegetal hidrogenada que se utilizó en las dos dietas experimentales aplicadas en el estudio, se detalla en la Tabla 1 B.

Animales

Se usaron 96 ratas hembra vírgenes, de la cepa Wistar, con 50 días de edad, cuyo peso promedio era de 130 g, las que se dividieron en tres grupos equivalentes. El Grupo Control (C) se alimentó *ad libitum* con una dieta balanceada preparada con caseína al 25%. El Grupo Desnutrido (D) recibió sólo el 50% (g dieta/100 g rata) de la dieta consumida por el

TABLA 1A
COMPOSICION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES
 (Expresada en gramos por kg de dieta)

Dieta*	Balanceada	Deficiente en ácido linoleico
Caseína	250	250
Maicena	250	250
Mezcla de vitaminas liposolubles ^o	20	20
Mezcla de vitaminas hidrosolubles ^o	30	30
Mezcla de minerales ^o	50	50
Chuño**	75	75
Glucosa	125	125
α-Celulosa	50	50
Manteca vegetal hidrogenada	100	150
Aceite de maíz (58.5 ^o /o linoleico)	50	0

* Valor calórico de 1 g de dieta balanceada o deficiente en ácido linoleico determinado en bomba calorimétrica, 4.12 Kcal.

^o Véase referencia (10).

** Del quechua *ch'uñu*, que significa papa helada, secada al sol.

TABLA 1B
CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS DE LA MANTECA VEGETAL
HIDROGENADA

Acidos grasos	Porcentaje de los esteres metílicos
Saturados C 12:0 — C 22:0	49.40
Monoinsaturados C 14:1 — C 22:1	38.10
Poliinsaturados C 18 — C 22 w 9	4.00
C 18 — C 20 w 6	
C 20 w 3	2.60
Relación <u>poliinsaturados</u> saturados	0.13

grupo C. Al Grupo Desnutrido y Deficiente en ácidos grasos esenciales (DD), se le ofreció la misma cantidad de dieta consumida por el Grupo D, pero deficiente en ácidos grasos esenciales, en la que el aceite de maíz de la dieta balanceada se reemplazó por grasa vegetal hidrogenada. Los animales de cada grupo se alojaron en jaulas individuales.

Cuando las ratas de los tres grupos experimentales alcanzaron un peso

promedio de 157 g, el grupo control a los 60 días, y los dos grupos desnutridos a los 75 días de edad, todas se aparearon con machos control por 12 horas, previa detección de la fase proestro en frotis vaginal. Después de detectar espermios en el frotis vaginal las ratas se reubicaron en jaulas individuales, y cada grupo preñado continuó con el mismo tratamiento dietético a que estaba sometido antes de iniciar la gestación.

El agua de bebida se suministró *ad libitum*. Desde el inicio de la experiencia, las condiciones ambientales fueron: 12 horas de luz y 12 de oscuridad, una temperatura de vivero de 25°C, y 75% de humedad.

A los 21 días post apareamiento, las ratas de los tres grupos fueron sacrificadas por decapitación, extrayéndose de inmediato las placentas y los fetos. Los fetos se pesaron y las placentas se recibieron en agua destilada a 0°C, se lavaron, secaron, se pesaron y fueron liofilizadas durante 24 horas en un liofilizador Labconco a -65°C.

Extracción y Cuantificación de Lípidos

La extracción de los lípidos totales se efectuó en placentas liofilizadas según el método de Bligh y Dyer (4).

Cuantificación de Lípidos Totales

El extracto clorofórmico se evaporó bajo corriente de nitrógeno en un evaporador Meyer Organomation N evap., Modelo 111, a 30°C. Los lípidos se determinaron por gravimetría.

Fraccionamiento e Identificación de Lípidos Neutros

Los lípidos neutros se fraccionaron e identificaron por cromatografía en placa fina, para lo cual se utilizaron placas Sílica Gel G (20 x 20), Merck No. 5715.

Las placas fueron sembradas en bandas de 0.5 cm de ancho, usando un equipo Linomatt II Camag. Paralelamente se sembraron estándares de fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos y triglicéridos (Sigma Chemical Co.). Se usaron como fase móvil dos mezclas de solventes en forma consecutiva (5). éter de petróleo (40-60°) y dietil-éter, ácido acético (50:50:1 v/v); en la segunda etapa se empleó éter de petróleo (40-60°) y benceno (70:31 v/v). Las placas se revelaron sumergiéndolas en solución de acetato cúprico al 30% en ácido fosfórico al 80%, durante tres segundos, seguido de un calentamiento a 190°C por 8 minutos (6). Los diferentes lípidos fueron identificados por comparación con los R_f de sus respectivos estándares.

Fraccionamiento e Identificación de los Fosfolípidos

Los lípidos de 2 g de placentas liofilizadas fueron reconstituidos a 4 ml de cloroformo y 25 µl se sembraron en placas de Sílica Gel G (20 x 20). En la misma placa se aplicaron paralelamente cantidades conocidas de estándares de fosfatidil serina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil colina y difosfatidil glicerol (Sigma Chem.). Se utilizó como fase móvil una mezcla de cloroformo:metanol:ácido acético:agua (60:14:13:2, 4 v/v). Para el

revelado se aplicaron las mismas condiciones usadas para lípidos neutros, y los fosfolípidos fueron identificados comparándolos con los Rf de sus respectivos estándares.

Cuantificación de Lípidos Neutros y Fosfolípidos

La cuantificación de los lípidos neutros y fosfolípidos se realizó por densitometría de reflexión, utilizando un densitorefractómetro TLC/HPTLC Scanner Camag asociado a un inscriptor (7). El cálculo de las cantidades se efectuó tomando como base las áreas entregadas por el inscriptor para cada clase de lípidos, usando para ello un planímetro Elphor (Bender y Hobein) y esta área fue comparada con el área entregada por las cantidades conocidas y sembradas de cada tipo de estándar.

Determinación de los Ácidos Grasos en los Fosfolípidos de la Placenta

Los ácidos grasos de los fosfolípidos se analizaron por cromatografía de gas líquido de sus ésteres metílicos, preparados según Metcalfe (8), y se separaron usando un cromatógrafo Hewlett Packard 5.750. La separación, identificación y cuantificación de los ácidos grasos de los fosfolípidos se hizo utilizando el extracto de los fosfolípidos obtenidos a partir de su fraccionamiento, en placas de Silica Gel H Merck (20 x 20). La separación adecuada de los fosfolípidos del resto de los lípidos, se logró mediante el raspado de esta fracción desde la placa de Silica Gel G. La identificación de los ácidos grasos se hizo sobre la base de los tiempos de retención absolutos y relativos encontrados para los ácidos grasos estándares (PUFA 1, PUFA 2, Supelco Inc.). Se corrieron estándares en las mismas condiciones de trabajo de las muestras de placentas, pero en isoterma a 180°C, lo que permitió identificar ácidos grasos que no estaban en la mezcla de estándares. Para ello se utilizó el método del logaritmo del tiempo de retención versus el número de átomos de carbono en la cadena del ácido graso (5).

La cuantificación de los ácidos grasos se realizó tomando en cuenta los porcentajes de éstos, obtenidos en el integrador automático, con la cantidad de lípido contenido en la alícuota inyectada, previamente cuantificado por gravimetría. Se consideró, además, el PM de los ácidos grasos y su aporte al extracto total. Esto permitió expresar los resultados en miligramos de ácidos de los fosfolípidos por gramo de placenta húmeda.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza. Posteriormente se aplicó el test múltiple de Kramer (9) a fin de determinar la significación estadística entre los grupos, en relación al tratamiento dietético.

RESULTADOS

En la Tabla 2 se detalla el efecto que la restricción de una dieta balanceada y la restricción de una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales,

TABLA 2

GANANCIA DE PESO DURANTE LA PREÑEZ, PESO FETAL, PESO PLACENTA Y PORCENTAJE DE AGUA DE LAS PLACENTAS DE LAS RATAS CONTROL, DESNUTRIDAS Y DESNUTRIDAS DEFICIENTES EN ACIDOS GRASOS ESENCIALES, A LOS 21 DIAS POST-CONCEPCION

	Control	Desnutrido	Desnutrido y deficiente en ácidos grasos esenciales
Ganancia de peso (g/21 días)	112.91 ± 18.33 ^a °	47.64 ± 13.15 ^b	41.49 ± 10.79 ^b
Peso placenta (g)	0.48 ± 0.04 ^a	0.43 ± 0.02 ^b	0.49 ± 0.04 ^a
Agua placenta (°/o)	87.37 ± 0.36 ^a	86.30 ± 0.28 ^b	86.10 ± 0.20 ^b
Peso fetal (g)	3.60 ± 0.51 ^a	3.04 ± 0.14 ^b	3.03 ± 0.27 ^b
Fetos en la camada (n)	10	8	6
n ^{oo}	32	32	32

° Valores promedio ± 1 desviación estándar.

oo Número de ratas preñadas en cada grupo.

* Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05).

impuestas a las hembras desde antes de la gestación, ejerció en la ganancia de peso durante 21 días de preñez, el peso fetal, peso y porcentaje de agua de la placenta, así como número de animales por camada. Se puede evidenciar que la restricción de los dos tipos de dieta disminuyó significativamente los parámetros estudiados, a excepción del peso de la placenta de ratas con deficiencia severa de ácidos grasos esenciales (AGE) el que no aparece diferente del control. Al comparar el porcentaje de agua de la placenta de los dos grupos desnutridos, se observa que ambos valores son similares, pero significativamente menores que los del grupo control. Por otra parte, aun cuando la restricción con los dos tipos de dieta disminuyó el número de animales de la camada, el grupo restringido con deficiencia drástica de AGE fue menor en relación a los otros dos grupos.

La composición lipídica de la placenta del grupo Control (C), desnutrido (D) y desnutrido con deficiencia severa de AGE (DD), se presenta en Tabla 3. La desnutrición provocada por restricción de la dieta disminuyó significativamente el contenido de fosfolípidos; además, la superimposición de una deficiencia de ácidos grasos esenciales, disminuyó significativamente los ácidos grasos incorporados a los fosfolípidos y aumentó significativamente el contenido de triglicéridos.

El contenido de cada uno de los fosfolípidos identificados en la placenta de los tres grupos de ratas se informa en la Tabla 4. En ella se puede observar que mientras la restricción de alimentos sólo elevó el contenido de fosfatidil glicerol, la deficiencia de AGE disminuyó significativamente la fosfatidil colina y esfingomiélna, dejando inalterados el resto de los fosfolípidos.

TABLA 3

COMPOSICION LIPIDICA DE LA PLACENTA DE RATAS CONTROL
DESNUTRIDAS Y DESNUTRIDAS DEFICIENTES EN ACIDOS GRASOS
ESENCIALES, A LOS 21 DIAS POST-CONCEPCION

Lípidos (mg/placenta húmeda)	Grupos de ratas		
	Control	Desnutridas	Desnutridas y deficientes en ácidos grasos esenciales
Lípidos totales	13.62 ± 3.39 ^o	12.31 ± 1.86	10.61 ± 2.11
Fosfolípidos	7.89 ± 1.22 ^{a*}	6.13 ± 0.64 ^b	5.56 ± 1.89 ^b
Esteroles	1.54 ± 0.40	1.52 ± 0.54	1.23 ± 0.43
Acidos grasos	2.61 ± 0.94 ^a	2.34 ± 0.65 ^a	1.47 ± 0.60 ^b
Triglicéridos	0.29 ± 0.25 ^a	0.33 ± 0.24 ^a	0.93 ± 0.55 ^b
Esteres de esteroles	1.61 ± 0.74	1.36 ± 1.00	1.30 ± 0.64
Relación insaturados /saturados	1.07 ± 0.07	0.79 ± 0.11	0.87 ± 0.05
n ^{oo}	12	9	7

^o Valores promedio ± 1 desviación estándar.

^{oo} Número de determinaciones. En cada determinación se emplearon las placentas de cuatro ratas preñadas.

* Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05).

La composición de los ácidos grasos incorporados en los fosfolípidos de las placentas de los tres grupos experimentales, expresados en microgramos por gramo de placenta húmeda se detalla en Tabla 5. La restricción de una dieta balanceada afectó únicamente el contenido de los derivados del α linolénico componentes de los fosfolípidos. La deficiencia severa de ácidos grasos esenciales sumada a la restricción de dieta redujo significativamente el contenido de ácido linoleico y los derivados altamente insaturados del ácido linoleico y α linolénico, y aumentó significativamente el enosatrienoico (20:3w9).

DISCUSION

Los datos obtenidos al estudiar el efecto que la restricción de una dieta balanceada y la deficiencia de ácidos grasos esenciales (AGE) sobreimpuesta a la restricción dietética, ejerce en la composición lipídica de la placenta y en el crecimiento fetal, sugieren que aun cuando los dos tipos de insulto afectan de igual maera el crecimiento fetal, el peso y la composición lipídica de la placenta son afectados de diferente manera. Al considerar el efecto que tuvo sobre el peso de la placenta a los 21 días post-concepción, sólo se advierte daño en el grupo con restricción de dieta

TABLA 4

COMPOSICION FOSFOLIPIDICA DE PLACENTAS DE RATAS CONTROL, DESNUTRIDAS, Y DESNUTRIDAS DEFICIENTES EN ACIDOS GRASOS ESENCIALES, A LOS 21 DIAS POST-CONCEPCION

Fosfolípidos (mg/g placenta húmeda)	Grupos de ratas		
	Control	Desnutridas	Desnutridas y deficientes en ácidos grasos esenciales
Fosfatidil serina	0.214 ± 0.08 ^o	0.189 ± 0.10	0.09 ± 0.09
Esfingomielina	1.12 ± 0.18 ^{a*}	1.06 ± 0.26 ^a	0.63 ± 0.33 ^b
Fosfatidil colina	3.34 ± 0.50 ^a	3.32 ± 0.42 ^a	1.79 ± 0.64 ^b
Fosfatidil etanol-amina	1.67 ± 0.40	1.73 ± 0.34	1.46 ± 0.83
Fosfatidil glicerol	1.19 ± 0.32 ^a	2.34 ± 0.34 ^b	1.27 ± 0.36 ^a
n ^{oo}	12	9	7

^o Valores promedio ± 1 desviación estándar.

^{oo} Número de determinaciones. En cada determinación se emplearon todas las placentas de cuatro ratas preñadas.

* Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05).

balanceada (D), el que exhibe un peso significativamente menor con respecto al grupo Control (C) y al grupo con deficiencia severa de AGE (DD). Es probable que el menor número de animales del grupo DD gestados en cada camada pueda explicar la diferencia entre los grupos D y DD.

A pesar de que el contenido de lípidos totales es menor en los grupos D y DD con respecto al grupo C, éstos no alcanzan diferencias significativas. Sin embargo, la restricción dietética disminuyó significativamente el contenido de fosfolípidos y ácidos grasos. El aumento significativo de los triglicéridos placentarios únicamente es atribuible al efecto de la deficiencia severa de AGE si comparamos los dos grupos con restricción de alimento.

El desarrollo y diferenciación de la placenta exige la síntesis de nuevas células cuyas membranas contienen fosfolípidos. Se ha evidenciado que el retículo endoplasmático de la placenta sintetiza fosfolípidos. Estos se ubican en un gran porcentaje en las membranas, donde cumplen roles estructurales y en la organización de las actividades enzimáticas (11). Un menor contenido de fosfolípidos por efecto de la restricción dietética y un cambio en el perfil de los fosfolípidos evidenciado en el grupo con restricción severa de AGE, permite especular un probable daño en la función metabólica celular.

Por otra parte, la acumulación de triglicéridos y el menor contenido de ácidos grasos en la placenta del grupo DD, sugeriría una menor disponibilidad de ácidos grasos libres para el metabolismo placentario o

TABLA 5

COMPOSICION DE LOS ACIDOS GRASOS INCORPORADOS A LOS FOSFOLIPIDOS DE LAS PLACENTAS DE RATAS CONTROL, DESNUTRIDAS, Y DESNUTRIDAS DEFICIENTES EN ACIDOS GRASOS ESENCIALES, A LOS 21 DIAS POST-CONCEPCION

Acido graso (mg/g placenta)	Grupos de ratas		
	Control	Desnutridas	Desnutridas y deficientes en ácidos grasos esenciales
Saturados (C14; C16; C18:0)	2.86 ± 0.41 ^o	2.59 ± 0.29	2.03 ± 0.42
Monoinsaturados (C16; C18; C20:1)	1.20 ± 0.21 ^{ab*}	1.08 ± 0.16 ^a	1.70 ± 0.48 ^b
Linoleico (C18: 2w6)	0.95 ± 0.17 ^a	0.76 ± 0.14 ^a	0.41 ± 0.07 ^b
Araquidónico (C20: 4w6)	1.02 ± 0.16 ^a	0.80 ± 0.19 ^a	0.53 ± 0.11 ^b
Eicosatrienoico (C20: 3w6)	0.05 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.02 ^b
Derivados linoleico (C20:4; C22:5w6)	0.36 ± 0.02 ^a	0.30 ± 0.06 ^a	0.12 ± 0.03 ^b
α linolénico (C18: 3w3)	0.04 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^{a,b}	0.07 ± 0.02 ^b
Derivados α linolénico (C20:5; C22:5; C22:6w3)	0.45 ± 0.10 ^a	0.14 ± 0.03 ^b	0.16 ± 0.03 ^b
n ^{oo}	5	5	5

^o Valores promedio ± 1 desviación estándar.

^{oo} Número de determinaciones. En cada determinación se emplearon todas las placentas de cuatro ratas preñadas.

* Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.005$).

para su eventual transferencia hacia el lado fetal. En especial, ello atañe a aquellos ácidos grasos que son capaces de atravesar la barrera placentaria.

La privación de una dieta balanceada no modificó el contenido ni la composición de los ácidos grasos incorporados a los fosfolípidos, efecto que se logra sólo si a la restricción se suma la deficiencia de ácidos grasos esenciales. La cantidad significativamente menor de ácido linoleico en la placenta y de los derivados del ácido linoleico y α linolénico en el grupo DD, es indicativa de una baja disponibilidad de sustratos de compuestos importantes reguladores de las funciones a nivel celular, como son las prostaglandinas, los tromboxanos, etc.

En conclusión, la composición lipídica de la placenta se ve afectada

especialmente en su contenido de fosfolípidos y ácidos grasos libres por efecto de una restricción dietética impuesta a la madre. Los cambios en la composición lipídica de este órgano son más dramáticos si a la restricción dietética se agrega una deficiencia de ácidos grasos esenciales. Ambos tipos de insultos nutricionales maternos, se reflejan en un peso fetal significativamente menor a los 21 días post-concepción.

SUMMARY

LIPID COMPOSITION OF THE PLACENTA OF RATS WITH PROTEIN RESTRICTION AND ESSENTIAL FATTY ACID DEFICIENCY

The influence of diet restriction and EFA deficiency during pregnancy in the rat on the lipid and phospholipids composition of the placenta was investigated. Female virgin albino Wistar rats weighing 130 ± 4 g, were assigned to three equivalent groups. Prior mating and during pregnancy each group of rats received the following regimen: Animals in the Control Group (C) were fed a 25% casein diet in *ad libitum* quantities; the dietary Restricted Group (D) received the same control diet in amounts calculated to approximate 50% (g/100 g rat) of the intake of group C; the Deficient and Restricted Group (DD) rats were fed a restricted amount of the EFA deficient diet.

On the 21st day of gestation pregnant animals were sacrificed. The fetuses and placentae obtained by caesarium section were isolated and weighed. A 50% food restriction before and during pregnancy resulted in a significant decrease in phospholipid contents ($p < 0.05$); severe EFA deficiency superimposed to 50% food restriction, moreover induced significant changes in the fatty acid pattern of phospholipids, decreasing n3 and n6 fatty acids and increasing eicosatrienoic acid. There was an accumulation of triglycerides in the placenta of rats fed on the EFA deficient diet. In the two restricted groups fetal weight was reduced, but although in the DD group, placental weight was not affected, litter size was dramatically reduced.

BIBLIOGRAFIA

1. Araya, J., M. C. Reyes, C.M. Baginsky & M. Ruz. Crecimiento celular de útero, placenta y feto durante la restricción calórica materna en ratas. Arch. Latinoamer. Nutr. 33: 814-825, 1983.
2. Menon, N.K., C. Moore & G.A. Dhopeswarkar. Effect of essential fatty deficiency on maternal placental and fetal tissues. J. Nutr., 111: 1602-1610, 1981.
3. Diamant, Y.Z., & E. Shafir. Enzymes of carbohydrate and lipid metabolism in the placenta and liver of pregnant rats. Biochimica et Biophysica Acta, 279: 424-439, 1972.
4. Bligh, E.G. & W.J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canad. J. Biochem. Phys. 37: 911-917, 1959.
5. Ackman, R.G. Influence of column temperature in the gas-liquid chromatographic separation of methyl esters of fatty acids on polyester substrates. J. Gas Chromat., 1: 11-16, 1963.
6. Karlsson, I. & L. Svennerholm. Biochemical development of rat forebrains in severe protein and essential fatty acid deficiencies. J. Neurochem., 31: 657-662, 1978.
7. Painter, P.C. Simultaneous measurement of lecithin, sphingomyelin, phosphatidyl glycerol phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine and phosphatidyl serine

- in amniotic fluid. *Clin. Chem.*, **26**: 1147-1151, 1980.
8. Metcalfe, L.D. & A.A. Schmitz. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, **33**: 363-364, 1961.
 9. Kramer, C.Y. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. *Biometrics*, **12**: 307-310, 1956.
 10. Araya, J. & M. Ruz. Influencia de la situación nutricional preconcepcional materna sobre el crecimiento y desarrollo fetal en ratas. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **31**: 133-145, 1981.
 11. Dharni, M.S.I., F.A. de la Iglesia & G. Feuer. Fatty acid content and composition of phospholipids from the endoplasmic reticulum in developing rat liver. *Research Com. in Chem. Pathol and Pharmacol.*, **32**: 99-110, 1981.