ACTIVIDAD DE GAMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA Y CONTENIDO DE GLUTATION EN LA GLANDULA MAMARIA DURANTE EL PROGRESO DE LA PREÑEZ Y LA LACTANCIA EN RATAS CRONICAMENTE DESNUTRIDAS[1]

Julia Araya[2], *Gonzalo Ramos*[3], *Ana María Aguilera*[4], *Carmen Paz Aguilera*[5] y *Darío Villalonga*[3]

Facultad de Medicina de la Universidad de Chile
Santiago, Chile

RESUMEN

Se estudio, en la rata, el efecto de la restricción de la ingesta de una dieta balanceada durante la preñez y lactancia, sobre la actividad de gama glutamil transpeptidasa (GGTP) (E.C.2.3.2.2.) en la glándula mamaria. Los resultados informan que la desnutrición calórico-proteínica impuesta permanentemente a la rata hembra, disminuye significativamente el crecimiento, contenido de DNA, contenido de proteína y actividad de GGTP en la glándula mamaria, desde el día 16 post-gestación hasta el 5º día de lactancia, lo que equivale a la duración del experimento. El peso de las crías al nacer y la ganancia de peso al 5º día de vida postnatal se encontró significativamente disminuida en el grupo desnutrido. Se postula que la disminución de la actividad de GGTP afectó el transporte de algunos aminoácidos y péptidos, en la glándula mamaria, originando una menor disponibilidad intracelular de aminoácidos necesarios para la síntesis de la proteína de la leche y, por lo tanto, una disminución en la secreción láctea.

Manuscrito modificado recibido: 18–8–88.

1 El estudio aquí descrito contó con el apoyo financiero del Proyecto 2669-8712. D.I.B., Universidad de Chile.

2 Profesora Titular y Directora del Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, 2º P, Santiago, Chile.

3 Tesistas de Pregrado, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

4 Ayudante *ad honorem* del Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina de la misma Universidad.

5 Médico Pediatra, Consultorio Quinta Buin, Servicio Nacional de Salud, Santiago, Chile.

INTRODUCCION

La alimentación al seno materno es el método de alimentación preferido para el lactante en todos los países del mundo. Esto es de particular importancia en muchos de los países en vías de desarrollo. No obstante, se desconoce la razón por la cual las madres desnutridas a menudo secretan menos leche que las madres bien nutridas.

A pesar de reconocer que la síntesis de leche tiene un alto costo metabólico para la madre (1), el efecto de la ingesta de energía y proteína durante la lactancia en la secreción láctea, ha recibido poca atención. Los estudios experimentales en ratas han demostrado que la proteína y la energía de la dieta influencian la secreción de leche, inferido esto por la ganancia de peso de las crías amamantadas (2). Sin embargo, la ganancia ponderal de la camada es un resultado combinado de la cantidad y calidad de la leche.

La glándula mamaria es muy eficiente en tomar aminoácidos de la circulación materna para la síntesis de la proteína de la leche (3).

Existen poderosas evidencias de que el ciclo gama glutamilo es un sistema transportador de aminoácidos en la glándula mamaria (4). El ciclo gama glutamilo fue originalmente propuesto por Meister (5), quien sugiere que sirve como un mecanismo para el transporte de algunos aminoácidos. La gama glutamil transpeptidasa (GGTP) (E.C.2.3.2.2.) es una enzima del ciclo gama glutamilo cuya principal función es catalizar la utilización inicial del glutatión (GSH) (6). La reacción entre el GSH y la GGTP involucra la transferencia de un segmento gama glutamilo a un aminoácido o péptido receptor (7). De acuerdo con ello, la GGTP cataliza la formación de gama glutamil aminoácidos, los que son transportados hacia dentro de la célula y liberados intracelularmente (6). Si el ciclo funciona como un transportador de aminoácidos, es posible que los factores que afectan al mecanismo de captura de aminoácidos por la glándula mamaria, afecte la actividad de la GGTP.

A partir de estos antecedentes, estudiamos el efecto de la desnutrición crónica materna en la actividad de GGTP en la glándula mamaria durante la preñez y al inicio de la lactancia y su relación con la ganancia de peso del recién nacido durante los primeros días de su vida postnatal.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se tomaron 140 ratas hembras recién destetadas de la cepa Wistar, y éstas se dividieron en dos grupos equivalentes. El grupo control (C) recibió *ad libitum* una dieta preparada con caseína al 25o/o y suplementada con 0.3o/o de DL metionina (Tabla 1), durante todo el experimento. Otro grupo de ratas se alimentaron con la misma dieta en forma restringida durante todo el estudio, entregándoles diariamente sólo el 50o/o de lo ingerido por el grupo C, y considerando los gramos consumidos por 100 gramos rata control, este grupo restringido se consideró como grupo desnutrido (D). Cuando ambos grupos alcanzaron pesos promedio de 150 ± 10 g el grupo control a los 50, y el desnutrido a los 80 días de edad, se

TABLA 1

COMPOSICION DE LA DIETA EXPERIMENTAL

Ingredientes	g/kg
Caseína[1]	250
DL-metionina	3
Maicena	247
Sacarosa	125
Chuño	75
Aceite de maíz	50
Aceite vegetal hidrogenado	100
Mezcla vitaminas liposolubles[2]	20
Mezcla vitaminas hidrosolubles[3]	30
Mezcla mineral[4]	50
Celulosa	50

1 Caseína libre de vitaminas, obtenida de Sigma Chemical Co. Aporta 86o/o de proteína.

2,3,4 Mezclas vitamínicas y minerales informadas en *Arch. Latinoamer. Nutr, 28:* 264-288, 1978.

cruzaron con machos control. Se consideró día 0 de la preñez el momento en que se detectaron espermatozoides en la vagina, ocasión en la que se aisló al macho.

Las ratas preñadas se ubicaron en jaulas individuales, se controló la ingesta de la dieta en el grupo control; al desnutrido se le ofreció sólo la mitad de esa misma dieta considerando los gramos de dieta consumidos por 100 gramos rata (g día/100 g). Se registró el peso diariamente, controlando además la temperatura (25oC), la humedad (75o/o) y la luz (12 hr luz/12 hr oscuridad) del vivero.

Todos los grupos tuvieron libre acceso al agua de bebida. Durante la lactancia e inmediatamente después del parto, las crías recién nacidas se pesaron y se ajustó la camada a ocho individuos por nodriza en ambos grupos, C y D. A los cinco días postnatales se pesaron las crías para obtener la ganancia de peso.

Obtención y Preparación de la Glándula Mamaria

A los 16, 18 ó 20 días por gestación, y al 5o día de lactancia, las ratas madres fueron sacrificadas, o por lo menos 15 ratas en cada oportunidad. Todos los grupos se sacrificaron a las 9 de la mañana, previo ayuno de 12 horas.

Se extirparon las glándulas mamarias en su totalidad, se pesaron y se procesaron para el estudio enzimático y para determinación de GSH y DNA.

Ensayo de la Gama Glutamil Transpeptidasa y Glutatión

La glándula mamaria fue homogeneizada en 5 volúmenes de buffer Tris/HCl pH 8.0 que contenía 8mM de $mgCl_2$ en frío (0ºC). El homogeneizado se usó para determinar la actividad de GGTP. La actividad de GGTP fue medida espectrofotométricamente a 37ºC observando la liberación de p-nitroanilida desde un donador gama glutamilo artificial, la gama glutamil paranitroanilida (8). Una unidad de enzima se define como un micromol de paranitroanilida liberada por minuto. La concentración de GSH se determinó por el método de Anderson y Meister (9). La DNA se determinó según Burton (10), y la proteína, de acuerdo con Lowry *et al.* (11). Los resultados fueron analizados estadísticamente, según la prueba "t" de Student.

RESULTADOS

La Tabla 2 informa la evolución del peso de las glándulas mamarias (abdominal e inguinal), en la preñez y lactancia y su contenido de DNA y proteína. Los resultados indican un aumento significativo en el peso de la glándula mamaria a partir del día 20 de preñez, duplicándose el valor al día 5º de lactancia en el grupo control. En el grupo desnutrido, aunque hubo un leve aumento del tamaño de la glándula mamaria durante el progreso de la gestación, éste fue casi impercetible; sólo al 5º día de lactancia aumentó al doble el valor del peso observado al día 16 post-concepción. Todos los pesos de glándula mamaria del grupo desnutrido —en cualquier etapa del estudio— fueron significativamente menores que los del grupo control. El contenido de DNA y de proteína siguieron la misma tendencia observada con el peso de glándula mamaria. El DNA y la proteína duplicaron el valor al día 5º de lactancia respecto al día 20 de preñez en ambos grupos, siendo este aumento significativamente inferior en el grupo desnutrido.

La actividad de la GGTP y el contenido de GSH durante el desarrollo de la glándula mamaria señalan un incremento progresivo de la actividad transpeptidásica durante la preñez, observándose un dramático aumento al 5º día, desde el inicio de la lactancia en el grupo control (Tabla 3). El grupo D exhibió una tendencia similar, pero con actividades significativamente menores, demostrando diferencias significativas a los días 16 y 20 post-gestación, y al día 5º de lactancia. El GSH, expresado por gramo de tejido mamario, fue similar en los dos grupos.

El contenido GSH de la glándula mamaria experimentó un aumento significativo en ambos grupos entre el día 16 y 18 post-gestación, seguido de una significativa disminución en el período comprendido entre los días 18 y 20 de la preñez ($P \ll 0.001$). Luego, al 5º día de lactancia se registraron concentraciones significativamente superiores a las encontradas en cualquiera de las etapas estudiadas durante la preñez.

El peso de las crías al nacer y su ganancia de peso al 5º día postnatal, alimentadas por sus propias madres pero ajustadas en ambos grupos a ocho crías por camada desde el momento de nacer, se informa en la Tabla 4. Además, se muestra la ganancia ponderal de las ratas madres al final de la preñez y al 5º día de lactancia respecto al peso postparto. Puede

TABLA 2

PESO Y CONTENIDO DE DNA Y PROTEINA DE LA GLANDULA MAMARIA A LOS 16, 18 Y 20 DIAS POST-CONCEPCION Y AL 5º DIA DE LACTANCIA EN RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS

Edad materna (días)	Edad (día) postconcepción y postparto	Estado fisiológico	Glándula mamaria de ratas control		
			Peso total (g)	DNA (mg/g)	Proteína (mg/g)
66	16	Preñez	3.77 ± 1.47 [a]	6.82 ± 0.57 [a]	277 ± 32 [a]
68	18	Preñez	4.56 ± 1.93 [a]	9.51 ± 0.73 [a]	380 ± 29 [a]
80	20	Preñez	6.72 ± 2.45 [a]	23.32 ± 2.18 [a]	609 ± 43 [a]
85	5	Lactancia	11.12 ± 3.17 [a]	53.60 ± 4.93 [a]	1370 ±127 [a]
			Glándula mamaria en ratas desnutridas		
96	16	Preñez	2.27 ± 1.15 [a]	5.24 ± 0.48 [b]	174 ± 23 [b]
98	18	Preñez	2.94 ± 1.43 [b]	7.85 ± 0.93 [b]	268 ± 29 [b]
100	20	Preñez	3.69 ± 1.52 [b]	15.09 ± 1.07 [b]	371 ± 36 [b]
105	5	Lactancia	5.14 ± 1.86 [b]	31.82 ± 4.15 [b]	716 ± 82 [b]

Los valores son promedios ± una desviación estándar de 15 determinaciones diferentes. Los promedios no significativamente diferentes, tienen la misma letra sobreescrita en sentido vertical. Al comparar el grupo control con el desnutrido, el nivel de significancia considera valores menores de $P < 0.01$.

advertirse que las madres del grupo desnutrido ganaron el 57o/o del peso logrado por el grupo control durante la preñez, pero durante la lactancia mantuvieron el peso post-parto; en cambio las nodrizas control ganaron peso durante dicho período. El peso de las crías de madres desnutridas, al nacer y al 5º día de vida postnatal fue significativamente menor que el de las crías del grupo control.

TABLA 3

CONTENIDO DE GLUTATION Y ACTIVIDAD DE GAMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA EN GLANDULA MAMARIA A DIFERENTES ESTADOS DE LA PREÑEZ Y LACTANCIA EN RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS

Estado fisiológico	Ratas control	
	GSH (mg/g tejido)	GGTP* (µg/g tejido)
Preñez 16 días	a 0.87± 0.06	a 1.40 ±0.11
Preñez 18 días	a 0.95 ±0.09	a 2.28 ±0.19
Preñez 20 días	a 0.60 ±0.07	a 4.91 ±0.15
Lactancia (5º día)	a 1.46 ±0.23	a 8.74 ±0.65
	Ratas desnutridas	
Preñez 16 días	a 0.74 ±0.06	a 1.27 ±0.08
Preñez 18 días	b 0.90 ±0.07	b 2.18 ±0.17
Preñez 20 días	b 0.57 ±0.08	b 3.86 ±0.18
Lactancia (5º día)	b 1.39 ±0.18	b 7.47 ±0.33

Los valores son promedios ± una desviación estándar de 15 determinaciones diferentes. Al comparar las ratas control con las desnutridas de la misma edad gestacional o postparto, los datos no significativos estadísticamente ($P < 0.05$) tienen la misma letra sobreescrita.

* µg = Micromoles de sustrato transformado. * (< gama glutamil p-nitroanilida) por minuto a 37ºC en el homogeneizado de glándula mamaria en buffer Tris 0.1 M en una relación 1:4 (peso/vol.).

DISCUSION

Los resultados de este estudio demostraron que la desnutrición calórico-proteínica impuesta a la madre desde temprana edad, disminuyó el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria, evidenciado por el menor tamaño, contenido de DNA y proteína. Estos hallazgos son consistentes

TABLA 4

GANANCIA DE PESO MATERNO DURANTE LA PREÑEZ Y LACTANCIA, PESO AL NACER, Y GANANCIA DE PESO DE LAS CRIAS A LOS 5 DIAS DE VIDA POSTNATAL, DE RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS

	Ratas	
	Control	Desnutridas
Ganancia de peso materno al final de la preñez (g)	a 106.7± 11.0	b 60.72± 9.35
Ganancia de peso materno a los 5 días de lactancia (g)	a 18.17± 5.92	a -0.33± 3.69
Peso al nacer una cría (g)	a 5.45± 0.49	b 4.71± 0.25
Peso al 5º día postnatal (g)	a 9.09± 0.77	b 7.41± 0.79
Ganancia de peso (g)	a 0.73± 0.05	b 0.54± 0.02

Valores promedio ± una desviación estándar de 15 determinaciones diferentes.
Ratas control (a) versus desnutridas (b), $P < 0.01$.

con los informados por Ravi y Ganguli (12). La desnutrición materna también afectó la actividad de la GGTP en la glándula mamaria, pero mantuvo la concentración de GSH por gramo de órgano.

El ciclo gama glutamil ha sido postulado como un mecanismo de transporte de algunos aminoácidos y peptidos en la glándula mamaria (8). La menor actividad de la transpeptidasa evidenciada en el grupo desnutrido, permitiría postular que el sistema de transporte de algunos aminoácidos estaría disminuido en las glándulas de ese grupo.

El notable aumento de la actividad de GGTP al 5º día de lactancia fue evidente en ambos grupos de ratas, siendo significativamente inferior en el grupo desnutrido. Este aumento de la actividad de la GGTP cuando se establece la lactancia, ya había sido comunicado por Puente *et al.* (13). Se ha documentado, además, que la actividad de esta enzima corre paralela con la captación de aminoácidos en el tejido mamario (14).

La secreción láctea de una nodriza generalmente se ha deducido de la ganancia de peso de las crías, al menos en ratas de laboratorio (15). Asimismo, se ha informado que el primer factor que reduciría el volumen de leche secretada sería la restricción de calorías y/o proteína (16). En una revisión sobre composición de la leche en nodrizas de comunidades pobres, no se detectaron diferencias entre el contenido de proteína y lactosa con el de la leche de nodrizas bien alimentadas (17).

Ya que según algunos investigadores la restricción calórico-proteínica no afecta la composición de la leche, el hallazgo en este estudio de una baja actividad de GGTP en la glándula mamaria, indicaría que uno de los sistemas involucrados en el transporte de aminoácidos estaría deprimido y, por lo tanto, la secreción láctea podría estar disminuida a causa de una menor síntesis de proteína de leche. Apoya esta hipótesis el menor crecimiento de las crías alimentadas por sus madres desnutridas durante los primeros cinco días de vida postnatal. Varias investigaciones han demostrado que la deficiencia de aminoácidos limita la producción de leche en animales de vivero (18).

En este estudio, es probable además, que la desnutrición limitara la disponibilidad de aminoácidos en la sangre materna para la síntesis proteínica en la glándula mamaria.

La restricción calórico-proteínica crónica de la madre durante la preñez y la lactancia provocó cambios dramáticos en la ganancia de peso materno y en el desarrollo de la glándula mamaria, así como en la actividad de una enzima mamaria a la cual se le atribuye un rol importante en el transporte de algunos aminoácidos.

Se ha comunicado recientemente (19) que el consumo de dietas restringidas, por la nodriza, durante siete días de lactancia, provoca cambios en las actividades específicas (ug/mg prot.) de por lo menos 15 enzimas de glándula mamaria, y estando simultáneamente disminuída la producción de leche. En cambio, la composición de la leche no fue diferente a la de las ratas control.

No se discute en el estudio objeto de esta comunicación, las influencias hormonales por efecto de la desnutrición calórico-proteínica en la disminución de la actividad de GGTP en glándula mamaria.

SUMMARY

GAMMA GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE ACTIVITY AND GLUTATHIONE CONTENT IN THE MAMMARY GLAND OF CHRONICALLY MALNOURISHED RATS DURING PREGNANCY PROGRESS AND LACTATION

The influence of early and chronically dietary protein and energy restriction on gamma glutamyl transpeptidase (GGTP: E.C.2.3.2.2.) activity of the mammary gland of pregnant and lactating rats, was studied. Rats fed a restricted amount of a 25% casein diet throughtout gestation and lactation decreased mammary gland weight, DNA, and protein content. The GGTP activity in the mammary gland of the malnourished group was significantly decreased during all of the experimental trial period, and a decrease of offspring weight gain was also observed in that group. The inhibition of GGTP activity in the mammary gland caused by effects of maternal protein and energy undernutrition, could have depressed mammary uptake of amino acids, suggesting a reduced milk protein content and/or milk output.

BIBLIOGRAFIA

1. Society for Pediatric Research. Promotion of breast feeding: Recommendations of the Councils of the Society for Pediatric Research and American Pediatric Society, and of the American Academy of Pediatrics. **Pediatr. Res., 16**: 264-265, 1982.
2. Romero, J. J., R. Canas, R. L. Baldwin & L. J. Koong. Lactational efficiency complex of rats: Provisional model for interpretation of energy balance data. **J. Dairy Sci., 59**: 57-57, 1976.
3. Viña, J., I. R. Puertes, J. M. Estrela, J. R. Viña & J. L. Galbis. Involvement of gamma glutamyl-transferase in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. **Biochem. J., 194**: 99-102, 1981.
4. Viña, J. & J. R. Viña. Role of gamma glutamyl-transpeptidase in the regulation of amino acid uptake by mammary gland of the lactating rat. In: **Functions of Glutathione, Biochemical, Physiological, Toxicological and Chemical Aspects.** A. Larson, *et al.* (Eds.). New York, N. Y., Raven Press, 1983, p. 23-30.
5. Meister, A. On the enzymology of amino acid transport. **Science, 180**: 33-39, 1973.
6. Tate, S. C. & A. Meister. Gamma glutamyl-transpeptidase: Catalytic, structural and functional aspects. **Mol. and Cell. Biochem., 39**: 357-368, 1981.
7. Tate, S. S. & A. Meister. Interaction of gamma glutamyl-transpeptidase with amino acids dipeptides and derivatives and analogs of glutathione. **J. Biol. Chem., 249**: 7593-7602, 1974.
8. Allison, P. D. Evidence that transpeptidation is a significant function of gamma glutamyl-transpeptidase. **J. Biol. Chem., 256**: 2992, 1981.
9. Anderson, M. E. & A. Meister. Dynamic state of glutathione in blood plasma. **J. Biol. Chem., 255**: 9530-9533, 1980.
10. Burton, K. A study of the conditions and mechanism of diphenylamine reaction for the calorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. **Biochem. J., 62**: 315-323, 1956.
11. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem., 193**: 265-275, 1951.
12. Ravi, R. T. & N. C. Ganguli. Effect of dietary protein restriction on chromatin protein of rat mammary gland. **J. Nutr., 110**: 144-151, 1980.
13. Puente, J., M. S. Vargas, G. Beckaus & M. Sapag-Hagar. Gamma glutamyl-transpeptidase activity and cyclic AMP levels: In rat liver and mammary gland during lactogenic cycle and in oestradiol-progesterone pseudo-induced pregnancy. **FEBS Lett., 99**: 215-218, 1979.
14. Viña, J., I. R. Puertes, G. T. Sáez & R. Viña. Role of prolactin in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rats. **FEBS Lett., 126**: 250-252, 1981.
15. Sampson, D. A. & G. P. Jansen. Protein and energy nutrition during lactation. **Ann. Rev. Nutr., 4**: 43-67, 1984.
16. Jansen, G. R. & W. C. Monte. Amino acid fortification of bread fed at varying levels during gestation and lactation in rats. **J. Nutr., 107**: 300-309, 1977.
17. Jelliffe, D. B. & E. F. P. Jelliffe. The volume and composition of human milk in poorly-nourished communities. A review. **Am. J. Clin. Nutr., 31**: 492-515, 1978.
18. Shingoethe, D. J., E. C. Hageman & B. L. Larson. Essential amino acids for milk protein synthesis in the *in vitro* secretory cell and stimulation by elevated levels. **Biochem. Biophys. Acta, 148**: 469-674, 1967.

19. Murray, R. G., J. E. Allan, J. M. Carington, A. Curne, A. Geursen, D. Young, M. P. Thompson, E. B. Haynes & R. Coleman. Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissue and enzymes in lactating rats. **J. Nutr., 117** 1249-1258, 1987.