



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**RESTRICCIÓN PROTEÍICA DURANTE LA GESTACIÓN Y SU
EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MÁLICA EN EL
HÍGADO MATERNO DE LA RATA**

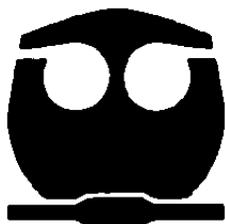
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

INGRID BERENICE DE LA PEÑA VALLEJO



MÉXICO, D. F.

2009



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE **PROFR:** HOMERO HERNÁNDEZ MONTES

VOCAL **PROFR:** ENRIQUE MORENO SAENZ

SECRETARIO **PROFRA:** ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

1er. SUPLENTE **PROFRA:** LAURA PENICHE VILLALPANDO

2° SUPLENTE **PROFR:** ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"



ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
ASESOR DEL TEMA



INGRID BERENICE DE LA PEÑA VALLEJO
SUSTENTANTE

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la Tutoría de la Dra. Elena Zambrano González .Este trabajo de tesis fue apoyado por las becas de CONACyT (No.de Registro 48839), del Gobierno Federal (No.de folio 20080028252) y del SNI-CONACyT a nombre del Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción el Dr. Fernando Larrea Gallo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo, paciencia, comprensión y amor y por heredarme lo más importante: sus valores, consejos y una educación. GRACIAS.

A mis hermanas Martha, Gloria, Debra y Michelle por su inmenso cariño, apoyo y por ser siempre un ejemplo a seguir y motivo de mi admiración.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme sentir el orgullo de pertenecer a nuestra máxima casa de estudios, por compartir conmigo su majestuosidad académica y por formarme como profesionista.

A mi gloriosa Facultad de Química y a mis Profesores por darme la oportunidad de recibir su gran conocimiento y por brindarme las herramientas necesarias para desempeñar mi carrera con criterio, ética y profesionalismo.

Al Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición “Salvador Zubirán”, al Departamento de Biología de la Reproducción y al Bioterio por las facilidades que se me otorgaron para la realización de mi trabajo de Tesis.

Al Jefe del departamento de Biología de la Reproducción el Dr.Fernando Larrea Gallo, por la beca otorgada para poder continuar y concluir mi trabajo de Tesis.

A la Dra.Elena Zambrano González por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis, por permitirme concluir mi fase académica con mucha satisfacción, por sus valiosos comentarios y sabios consejos.

A Claudia por brindarme su apoyo y asesoría experimental a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A los Profres Homero Hernández Montes y Enrique Moreno Saenz por sus comentarios tan valiosos para mejorar este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios por siempre estar conmigo cuidándome, por nunca abandonarme, por permitirme llegar hasta este momento tan importante en mi vida con salud, felicidad, satisfacción y junto a mi familia.

A mi padre Alfredo por siempre creer en mí, nunca abandonarme, quererme mucho, escucharme cuando lo he necesitado y por hacerme saber que la vida esta llena de metas y triunfos que esta es sólo una de tantas que faltan, siempre has sido para mí símbolo de respeto, admiración, sabiduría y fortaleza. Lo logramos. Te amo papito.

A mi madre Patricia porque has sabido ser una madre excepcional y una mujer ejemplar, por escucharme, apoyarme y demostrarme tu amor en cada cosa que haces por mí y por ser un pilar en mi vida. Este triunfo también es tuyo. Te amo mamita.

A mi hermana Marthita por ser la mejor hermana mayor, por ser un ejemplo para mí, por ser mi motivo de admiración, por tu amor, por enseñarme a ver la vida desde el mejor ángulo, por tus sabios consejos y por ayudarnos SIEMPRE, te amo hermanita.

A mi hermana Gloria por ser mi amiga, por ser la mejor Dra, por ser siempre un ejemplo y también motivo de mi admiración, por estar conmigo en cualquier momento, por tus sabios consejos, por tu amor, por compartir este logro conmigo, ha... y por cuidarme desde pequeña, te acuerdas? te amo Gollita.

A mi hermanitas Debrita y Michelle por su apoyo , amor incondicional y por alegrar mi día al ver sus caritas en la mañana y a quienes también dedicó este trabajo, esperando ser un buen ejemplo para ustedes. Las amo Pía y Susu.

A mis tíos Victor, Luis, Miguel, Jorge y Adrián por siempre ayudarnos cuando más lo necesitamos, este logro también es suyo, en especial a mi tío Adrián que aunque ya no estas presente, siempre vivirás en mi mente y mi corazón. GRACIAS.

A Marco por ser mi segunda casa en la facultad, por el gran apoyo que me brindaste, por creer en mí, por compartir conmigo esta etapa inigualable en mi vida. Gracias por tus consejos y por enseñarme que la vida se vive con seguridad, siempre creyendo en uno mismo sin dudar en nuestras decisiones. Este trabajo también es tuyo. MUCHAS GRACIAS.

A mis amigos Fabiola, Eduardo, Marisol, Isaac y Verito porque sin ustedes mi vida en la facultad no habría sido tan hermosa, única, divertida y terapéutica, por haber compartido conmigo risas, llanto, estres, satisfacciones y sobre todo por haber consolidado en este tiempo una mistad que espero trascienda esta maravillosa etapa de mi vida, GRACIAS MIS AMIGOS por ser parte de ella.

A mi colega y amiga Jazmín por tus pertinentes comentarios, por hacerme ver las cosas desde un punto de vista diferente pero siempre con la mejor intención y por hacer que el tiempo en el laboratorio fuera muy agradable y terapéutico, gracias por tu apoyo Jaz.

A mi Travi y Casqui por ser mis amigas desde niña, y a la Travi por acompañarme en mis desvelos, y ser una compañera inigualable, siempre las recordaré con mucho cariño.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1.INTRODUCCIÓN	
1.1.Programación durante el desarrollo.....	3
1.2.Embarazo.....	3
1.2.1.Adaptaciones fisiológicas durante el embarazo.....	4
1.2.2.Adaptaciones metabólicas durante el embarazo.....	6
1.3.Nutrición durante el embarazo.....	7
1.3.1.Desnutrición materna y fetal.....	9
1.4.Metabolismo durante el embarazo.....	11
1.4.1.Metabolismo de lípidos.....	13
1.4.2.Flujo materno de lípidos.....	14
1.4.3.Lipogénesis.....	15
1.4.4.Transporte del acetil-CoA mitocondrial al citosol.....	19
1.4.5.Fuentes de NADPH para la síntesis de ácidos grasos.....	20
2.JUSTIFICACIÓN.....	22
3.OBJETIVOS	
3.1.Objetivo general.....	23
3.2.Objetivos particulares.....	23
4.HIPÓTESIS.....	24
5.MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1.Modelo biológico.....	25
5.2.Modelo experimental.....	25
5.3.Elaboración de dietas.....	26

5.4.Obtención de muestras.....	26
5.5.Ensayo enzimático de la enzima málica.....	27
5.5.1.Cuantificación enzimática.....	27
5.5.2.Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	28
5.6.Determinación de lípidos en hígado por el método de Soxhlet.....	30
5.7.Determinación de proteínas por el método de Kjeldhal.....	31
5.8.Análisis estadístico.....	31
6.RESULTADOS	
6.1.Características generales de las madres.....	32
6.1.1.Peso corporal materno.....	32
6.1.2.Consumo de alimento materno.....	33
6.2.Parámetros maternos al día 19 de la gestación.....	33
6.2.1.Peso corporal materno.....	33
6.2.2.Peso absoluto y relativo del hígado materno.....	34
6.2.3.Peso y diámetro de la placenta.....	34
6.2.4.Grasa absoluta y grasa relativa en el hígado.....	35
6.2.5.Química sanguínea.....	36
6.2.6.Proteína en suero.....	36
6.2.7.Proteína total en hígado.....	37
6.3.Actividad de la enzima málica en el hígado.....	37
6.3.1.Actividad de la enzima málica con respecto a un gramo y al peso total del hígado.....	39
6.3.2.Relación entre la cantidad de grasa contenida en el hígado y la actividad de la enzima málica.....	40
6.4.Parámetros fetales al día 19 de la gestación.....	40
7.DISCUSIÓN.....	41
8.CONCLUSIONES.....	45
9.BIBLIOGRAFÍA.....	46

RESUMEN

Si bien es cierto que la nutrición es de suma importancia en la vida del ser humano, para la mujer embarazada es de índole vital, debido a que la gestación es un proceso predominantemente anabólico en donde se requieren sustratos no sólo para el mantenimiento del organismo materno sino también para la síntesis de tejido nuevo, requeridos principalmente para el sustento del feto. Es entonces necesario que exista una balanceada alimentación ya que de esto depende el adecuado desarrollo y maduración de los órganos del feto.

De este modo durante esta etapa es necesario que la disponibilidad de nutrientes sea la adecuada para cubrir el requerimiento energético. Cuando hay restricción por deficiencia de proteínas en la dieta, el metabolismo materno comienza a degradar las reservas corporales antes de tiempo, alterando algunas vías de síntesis como la lipogénesis que necesita de cofactores como el NADP, que en su forma reducida es indispensable para este proceso, esto se logra gracias a la enzima málica, la cual participa en la síntesis de ácidos grasos en el hígado.

Se sabe que el desarrollo del feto muestra fuerte relación con el estado nutricional materno. Lo anterior encuentra apoyo en diversas investigaciones con modelos animales y estudios epidemiológicos en donde la dieta materna durante la gestación provoca efectos sobre la organización del sistema nervioso así como en la constitución de diversos órganos, que pueden persistir en la edad adulta, es decir la deficiencia alimenticia durante el periodo de la gestación puede causar efectos irreversibles en la descendencia.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la restricción proteínica en la dieta al día 19 de la gestación, sobre las reservas de grasa y la actividad de la enzima málica en el hígado de la rata madre.

Se utilizó como modelo biológico la rata preñada de la cepa Wistar, se establecieron dos grupos, el grupo control (C) que fue alimentado con dieta isocalórica con 20% de proteína a lo largo del embarazo, y el grupo restringido (R) que fue alimentado con dieta con 10% de proteína durante la gestación. Las ratas se sacrificaron el día 19 del embarazo, se extrajo y se pesó el hígado, a dicho órgano se le realizaron varias determinaciones: 1) la cantidad de grasa utilizando el método de Soxhlet, 2) la cantidad de proteínas totales utilizando el método de Kjeldhal, 3) la actividad de la enzima málica realizada por método

espectrofotométrico. Por otra parte se obtuvo el diámetro y peso placentario. De cada una de las crías se registró el peso corporal, se sacrificaron y se obtuvo el peso del hígado y del cerebro.

El empleo de este modelo permitió identificar que la dieta baja en proteínas durante la gestación de la rata hasta el día 19 causó disminución en el peso corporal de la rata madre, así como del peso de su hígado, esto a su vez redujo la cantidad de grasa acumulada en el hígado, además también se encontró disminuida la actividad de la enzima málica.

El peso corporal, el peso del hígado y cerebro de las crías de madres restringidas no resultaron ser significativamente menores con respecto al grupo control, lo cual nos habla de la capacidad que tuvieron las madres restringidas para adaptarse ante la restricción proteínica y así poder proveer a sus crías los nutrientes necesarios para su adecuado desarrollo hasta el día 19 de gestación.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que los cambios que ocurren en el organismo materno durante el embarazo en la rata al consumir dieta deficiente en proteínas, conlleva a la alteración en las reservas lipídicas del hígado, viéndose afectada al día 19 de la gestación al menos una de las enzimas que intervienen en el proceso de la lipogénesis: la enzima málica.

1.INTRODUCCIÓN

1.1.PROGRAMACIÓN DURANTE EL DESARROLLO

El desarrollo del individuo depende de manera directa, de las condiciones nutricionales durante la gestación y periodo postnatal ya que la baja o deficiente calidad de la dieta en estas etapas críticas del desarrollo infantil puede provocar alteraciones tanto en la organización del sistema nervioso como en la constitución de diversos órganos, que pueden persistir en la edad adulta^{1,2,3,4,5}.

El individuo mal nutrido se adapta a su ambiente restringido en nutrientes mediante el lento aumento del peso corporal sobre todo en los periodos tempranos del desarrollo, además de ajustar su metabolismo a la deficiente disponibilidad de nutrientes. Estudios epidemiológicos demuestran la relación entre deficiencias nutricionales durante el desarrollo temprano con diferentes enfermedades en la vida adulta, principalmente relacionadas con el uso y tolerancia de la glucosa, la resistencia a la insulina^{6,7,8} con hipertensión y daño vascular^{9,10} y otras más vinculadas con el síndrome metabólico.

El desarrollo de modelos animales que tratan de explicar cómo se establece la programación metabólica del individuo en etapas tempranas del desarrollo, abordan como variables el funcionamiento de la placenta, flujo de sangre uterina, hipoxia materna y limitación de la energía y de la proteína materna con la consecuente limitación del feto. De estos modelos, la desnutrición materna es el paradigma que más se ha utilizado para inducir alteraciones en el metabolismo^{11,12}.

1.2.EMBARAZO

Se entiende como gestación a la secuencia de procesos que comienza con la fecundación, continúa con la implantación y el desarrollo embrionario y fetal, hasta terminar normalmente con el nacimiento, unas 38-40 semanas después en la mujer¹³, sin embargo en la rata su gestación dura tan sólo 21 días.

1.2.1. Adaptaciones fisiológicas durante el embarazo.

Es un proceso predominantemente anabólico en donde se requieren sustratos no sólo para el mantenimiento del organismo materno sino también para la síntesis de membranas embrionarias y de órganos como la placenta e indudablemente para el mantenimiento del mismo feto^{13,15}.

Por esta razón la mujer y otros mamíferos como la rata sufren en esta etapa una serie de cambios fisiológicos para desarrollar y mantener la síntesis necesaria para sostener el crecimiento del feto. Por citar algunos cambios se encuentran los siguientes:

- La placenta se desarrolla para transferir nutrientes y eliminar desechos provenientes del feto, sin embargo no es su única función, las demás se explicarán más adelante.
- El volumen de la sangre materna se incrementa hasta en un 50%, mientras que el hígado, corazón, pulmones, de la mamá trabajan fuertemente para brindarle al feto nutrientes y oxígeno y eliminar los desechos de ambos tanto de la mamá como de los del feto^{14,15}.
- El útero se expande y los músculos que soportan al feto crecen para sostener el aumento del peso fetal^{13,14,15}.
- La grasa corporal aumenta con la finalidad de generar almacenamientos de energía que necesitará para la última etapa de la gestación y la lactancia¹⁴.
- La capacidad del filtrado de los riñones aumenta lo que facilita la eliminación más rápida de los desechos adicionales que produce el feto¹³.

Por otra parte las hormonas juegan un papel muy importante en el transcurso del embarazo. La placenta se encarga de producir *progesterona*, *estrógenos*, *gonadotropina coriónica humana (GCh)*, *relaxina* y *somatotropina coriónica humana (SCH)*, hormonas que en conjunto son esenciales para que la gestación transcurra de forma normal.

La función más importante de la *gonadotropina coriónica humana (GCh)* es impedir la involución normal del cuerpo lúteo al final del ciclo sexual femenino por lo que gracias a esta hormona el cuerpo lúteo secreta cantidades

mayores de estrógenos y progesterona para impedir la menstruación, sin embargo también ayuda al crecimiento del endometrio y a la acumulación de grandes cantidades de nutrientes al principio del embarazo.

Además contribuye en la dilatación del cuello uterino durante el parto, efectos que facilitan el nacimiento del bebé.

La *progesterona* en un principio proporciona sustancias nutritivas que se necesitan para el desarrollo de la mórula y del blastocito. También ayuda al mantenimiento del endometrio al principio del embarazo por lo que desempeña un papel importante en la nutrición del embrión recién formado. También reduce las contracciones uterinas que puedan causar un aborto espontáneo.

Por su parte las funciones de los *estrógenos* (estradiol, estronal y estriol) son básicamente tres: (1) aumentar el tamaño del útero; (2) aumentar el tamaño de las mamas y (3) aumentar el tamaño de los genitales externos de la madre con la finalidad de volver más flexibles los ligamentos pélvicos de la madre para que se realice más fácil el paso del feto por el canal del parto, este último también se logra con la participación de la *relaxina*.

La hormona **somatomamotropina coriónica humana (SCh)** tiene como función disminuir la sensibilidad a la insulina para la utilización de la glucosa en la madre ya que este sustrato es el principal utilizado por el feto para obtener la energía requerida para su crecimiento.

También estimula la liberación de ácidos grasos a partir de los depósitos de grasa de la madre y con ello brinda una fuente alternativa de energía para atender el metabolismo del feto durante esta etapa^{13,15}.

Puntualizando la importancia de la placenta como un órgano trascendental a lo largo de la gestación, su función no se limita a un sitio de intercambio de nutrientes y desechos entre la madre y el feto, ya que también dirige la nutrición embrionaria al almacenar los nutrientes como los hidratos de carbono, proteínas, hierro y calcio, que se liberan en la circulación fetal según se requiera.

Y como se mencionó anteriormente también produce las hormonas que se necesitan para que el embarazo se desarrolle normalmente. Esto a su vez la hace asumir muchas funciones que fuera del embarazo están localizadas en otras glándulas endocrinas como son la hipófisis, las suprarrenales y los ovarios¹⁶.

Este órgano también permite que el oxígeno y nutrientes se difundan de la sangre materna a la fetal, mientras que el dióxido de carbono y otros desechos lo hacen en sentido opuesto. También funge como barrera protectora puesto que algunos microorganismos no pueden cruzarla.

Es por esto que la función de este órgano es especializado y no es limitante a una única función¹³.

1.2.2. Adaptaciones metabólicas durante el embarazo.

Diversos estudios se han realizado para conocer más acerca de la fisiología del embarazo, en los cuales se ha preferido utilizar a las ratas como modelo biológico. Lo que se ha encontrado es que no sólo en la mujer sino también en otros mamíferos como la rata, los cambios hormonales se llevan a cabo para satisfacer los requerimientos de sustratos energéticos y estructurales, con la finalidad de mantener el adecuado crecimiento y desarrollo del concepto, las cuales condicionan los cambios metabólicos que ocurren en la madre¹⁷.

Las adaptaciones fisiológicas y metabólicas que se llevan a cabo durante esta etapa involucran la máxima conservación de energía y el eficiente uso de nutrientes para el mutuo beneficio de la madre y el desarrollo del bebé¹⁸.

Se han hecho diversos estudios donde sugieren que el embarazo es un proceso que consta de dos fases: la fase anabólica (comprendida del día 1-14 en la rata y los primeros dos tercios en la mujer) durante este periodo la madre incrementa sus reservas tanto de proteínas como de lípidos lo que ocurre en presencia de una intensa hiperplasia y de una hiperinsulinemia materna¹⁹ aunque la glucemia se encuentre inalterada, el crecimiento fetal y sus requerimientos metabólicos son mínimos; la segunda fase es catabólica y comienza el día 15 para concluir el día 21 en la rata y en la mujer se ubica en el último trimestre del embarazo, ésta etapa comprende el crecimiento rápido del feto por lo que las reservas de almacenamiento son retiradas. Se ha descrito además, que en esta fase puede estar aumentada la sensibilidad a la insulina.

La utilización de proteínas y lípidos para el almacenamiento en periodos tempranos en el embarazo subsidia el alto costo de las demandas energéticas en el último periodo del embarazo^{20,21,22} Cómo se explica a continuación:

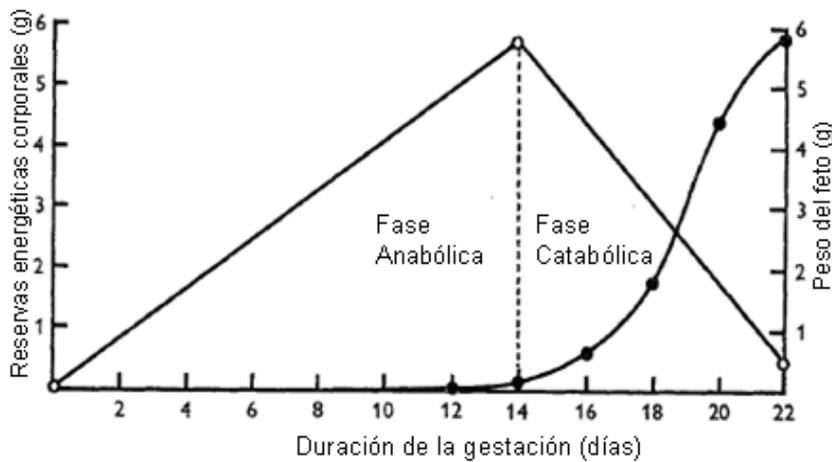


Fig.1 Representación esquemática de la ganancia de reservas energéticas y corporales en el primer periodo de la gestación reportado por Naismith (1969) y la ganancia del peso fetal. Tomado de los datos de Beaton, Beare, Ryu y McHenry, 1954.

1.3.NUTRICIÓN DURANTE EL EMBARAZO

La nutrición es el conjunto de procesos químicos que realiza el organismo digiriendo, absorbiendo y utilizando los nutrientes contenidos en los alimentos para su crecimiento, mantenimiento y reparación²³.

Pero, si bien es cierto que una buena alimentación es de suma importancia a lo largo de la vida del ser humano también lo es durante el embarazo. Por tal motivo la gestación constituye una de las etapas de mayor vulnerabilidad nutricional en la vida de la mujer. Existe una importante actividad anabólica que determina un aumento de las necesidades nutricionales en relación al periodo preconcepcional^{13,14}. Al igual que existe una actividad catabólica en el último trimestre del embarazo enfocado al crecimiento máximo del feto y esto se produce porque el cuerpo de la madre utilizó los depósitos almacenados maternos previamente formados^{13,14,15}.

Los elementos básicos de la nutrición del feto son glucosa, aminoácidos, lípidos, agua, iones, minerales y vitaminas^{15,24,25}.

Cada uno de estos componentes atraviesa la placenta por distintos mecanismos.

Por otra parte el consumo de glucosa y oxígeno por la placenta son muy altos, principalmente para abastecer los requerimientos que exige el cerebro del feto. Así 2/3 partes de la glucosa liberada por la circulación materna es consumida por el tejido útero-placenta²⁶ para dirigirse a diversos órganos del feto dependiendo sus prioridades.

Por su parte los requerimientos proteínicos durante el embarazo se incrementan en promedio en 12%. La acumulación total de proteínas en el embarazo es 925 g, equivalente a 0,95 g/kg/día.

Mientras que los lípidos deben aportar no más del 30% de las calorías totales. Cabe mencionar que son importantes los ácidos grasos esenciales de la familia omega 3 y 6 porque son utilizados fundamentalmente para el buen funcionamiento del sistema útero-placentario y para el desarrollo del sistema nervioso y la retina del feto durante el embarazo^{17,27}.

Estos cambios del metabolismo están dados por una acelerada síntesis, necesaria para la expansión del volumen sanguíneo materno, el crecimiento de las mamas, del útero y muy especialmente el aumento de los tejidos fetales y placentario¹⁷.

Como nutrientes necesarios durante el embarazo también se encuentran las vitaminas y los minerales ya que estos intervienen en el desarrollo de los huesos del feto y del tejido conectivo. Por citar algunos ejemplos el folato y la vitamina B₁₂ tiene una singular importancia para la síntesis de ácidos nucleicos y un aumento de eritrocitos en sangre. Por otra parte el hierro es necesario para la síntesis de hemoglobina y otras proteínas que lo necesiten. El zinc por su parte es importante para evitar malformaciones congénitas^{14,24,25}.

Es por esta razón que también las vitaminas y los minerales durante esta etapa en la mujer aumenta su demanda por parte del organismo como se muestra a continuación.

Tabla 1. Ingesta recomendada de nutrientes según el Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (IDR 2001).

Necesidades energéticas y de nutrientes durante el embarazo y la lactancia	Mujer adulta (20-45 años)	Durante el embarazo	Durante la lactancia
Proteína (g)	60	70	80
Vitamina A(mg)	750	1000	1200
Vitamina D(mg)	2.5	10	10
Vitamina E(mg)	8	10	12
Vitamina K(mg)	65	67	65
Vitamina C(mg)	60	70	80
Tiamina(mg)	1	1,5	1,6
Riboflavina(mg)	1,5	1,8	2
Niacina(mg)	14	17	20
Vitamina B12(mg)	2	3	3
Calcio(mg)	800	1200	1200
Fósforo(mg)	800	1200	1200
Hierro(mg)	15	30	30
Magnesio(mg)	280	350	400
Zinc(mg)	12	15	20
Yodo(mg)	150	175	200
Calorias	2000	2300	2600

Durante el embarazo la alimentación se vuelve de suma importancia, sin embargo lo es más la calidad de los nutrientes que se ingieren durante esta²⁷. Una buena nutrición durante el embarazo muestra menos complicaciones durante este periodo y en el parto, además la madre producirá un infante mas sano y con mejores condiciones físicas después del parto, que una progenitora cuyo estado nutricional es insuficiente^{20,28,29}.

1.3.1.Desnutrición materna y fetal.

La nutrición adecuada durante el embarazo no sólo es importante para la madre sino también para el feto ya que los mecanismos reguladores de los tejidos maternos se aseguran de abastecer de todos los nutrientes el cerebro de la madre, para inmediatamente abastecer después el cerebro del feto^{30,31,32}.

Cuando la desnutrición materna es grave entonces se restringe el crecimiento del feto y la placenta, mientras que durante la desnutrición moderada el crecimiento del feto puede sacrificarse para mantener la función de la placenta³⁰.

También se sabe que en condiciones no favorables al inicio de la gestación se produce un retardo simétrico en el crecimiento, en donde el

cuerpo completo del feto es afectado. El número total de células en todas las partes del cuerpo es reducido. Por otro lado condiciones desfavorables a finales de la gestación, producen efectos asimétricos los cuales afectan el número total de células de los diferentes órganos fetales. Cada órgano es afectado de forma diferente de acuerdo al ritmo de crecimiento de cada uno y dependiendo del tiempo preciso de cuando al feto estuvo expuesto a la condición desfavorable, en este caso a la desnutrición fetal^{31,33}.

En el último trimestre, la desnutrición puede resultar en la disminución inmediata del crecimiento fetal y alterar la interacción metabólica entre el feto y la placenta mientras que la desnutrición prolongada puede disminuir el ritmo de crecimiento fetal de manera irreversible por lo que hay reducción del tamaño del bebé al nacer^{30,34}.

Por otra parte cuando la demanda nutricional es mayor que el aporte placentario en el feto, se desencadena la desnutrición fetal (Figura 2). El feto humano es capaz de adaptarse a la desnutrición. Sus respuestas incluyen cambios metabólicos y cambios en la producción fetal y placentaria de hormonas reguladoras del crecimiento³⁰.

La desnutrición fetal prolongada se refleja en la disminución en el ritmo de crecimiento, esto hace que la capacidad del feto para adaptarse a la desnutrición, reduzca el uso de sustratos así como su metabolismo. Si disminuye el ritmo de crecimiento en el último trimestre de la gestación el feto desarrollará órganos de tamaños desproporcionados debido a que los órganos y tejidos que están creciendo rápidamente en esta etapa de la gestación son los más afectados^{30,35}.

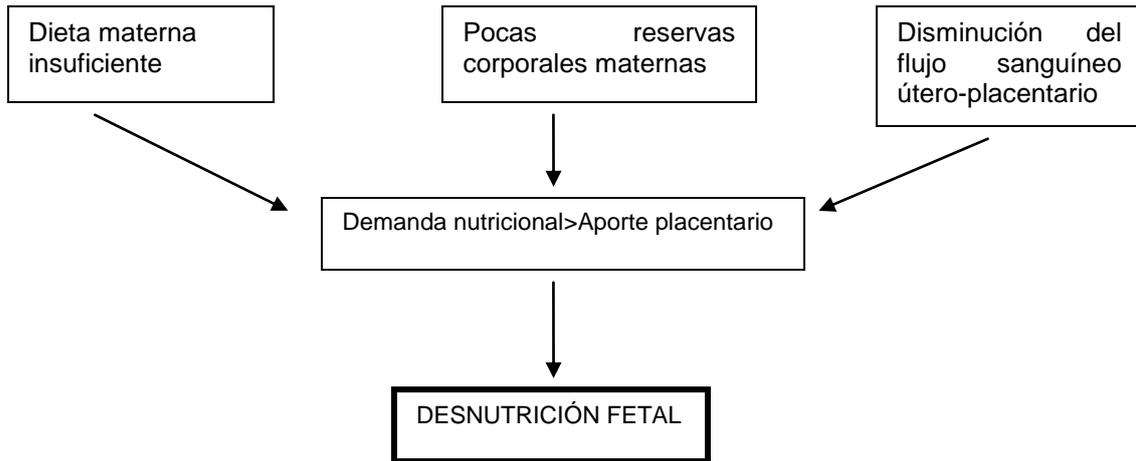


Fig.2.Origen de la desnutrición fetal.
(Tomado de Barker,1998)

1.4.METABOLISMO DURANTE EL EMBARAZO

Cómo se mencionó anteriormente el balance energético a través de la gestación, depende de la estrecha relación madre-placenta-feto mediada por hormonas, garantizando la conservación de energía y el adecuado aprovechamiento de nutrientes, siendo los lípidos como las demás biomoléculas, de capital importancia en el proceso de formación del nuevo bebé. En la formación de sistemas fetales como el nervioso y en el balance de requerimientos extra de energía en el embarazo avanzado es indispensable la utilización de los lípidos^{36,37,38}.

Dentro de los órganos y tejidos que poseen considerablemente la actividad de almacenamiento de lípidos principalmente se encuentran: el hígado, el intestino, los riñones, y el tejido adiposo³⁹.

El hígado es el órgano (Figura 3) principal del metabolismo de carbohidratos, proteínas, lípidos, porfirinas y ácidos biliares al igual que es responsable de la mayor producción de fuentes energéticas endógenas usadas por el cuerpo. Es un importante sitio de almacenamiento de glucógeno, amino ácidos, de vitaminas y lípidos.

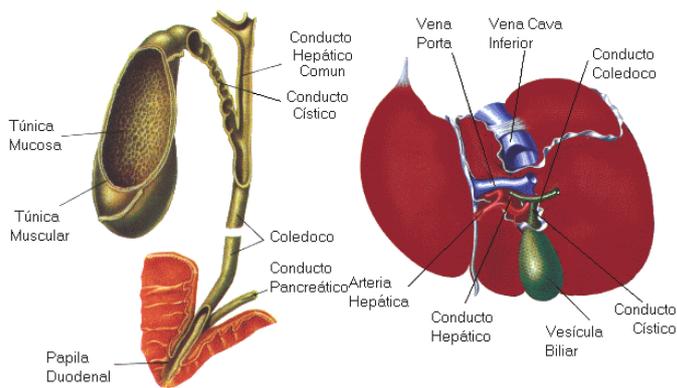


Fig 3.El hígado es el órgano que por su tamaño, por el número, variedad y complejidad de sus funciones ocupa un lugar primordial en el metabolismo del organismo. (Tomado de Brunicardi FC, Andersen DK, Dunn DL y Hunter JG,1987)

Bajo circunstancias normales el hígado funciona como un sitio temporal de almacenamiento tanto para los lípidos sintetizados en el hígado como para los absorbidos obtenidos de la dieta⁴⁰.

Esta formado por células denominadas hepatocitos.

En el hepatocito existe todo un conjunto de vías metabólicas bien descritas:

- Vía glucolítica, que degrada el glucógeno y la glucosa hasta ácido pirúvico y láctico.
- La glucogénesis ó síntesis de glucógeno hepático.
- La gluconeogénesis, que convierte en glucosa sustancias que originalmente no son carbohidratos (aminoácidos provenientes de las proteínas).
- Lipogénesis; es la síntesis de grasa a partir de acetil-CoA.
- Lipólisis: degradación de grasas para la obtención de la energía.
- Ciclo de los ácidos tricarbóxicos: es el sitio en donde concurren diferentes metabolitos (provenientes de proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucléicos) para ser oxidados hasta CO_2 , H_2O y energía liberada en forma de ATP que es la moneda del metabolismo energético de las células.
- Síntesis y degradación de proteínas y ácidos nucléicos.

El conjunto de todas estas vías constituye lo que entendemos por metabolismo intermedio. Para fines de este trabajo se revisará únicamente el metabolismo de lípidos.

1.4.1. Metabolismo de lípidos.

Los lípidos pertenecen a un grupo importante dentro de nuestra alimentación y por lo tanto de nuestro metabolismo.

Son moléculas orgánicas que se encuentran en la naturaleza y constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos pero cuya característica en común y definitoria es su insolubilidad en agua^{41,42,43}.

Son compuestos derivados de ácidos grasos y estos a su vez se conforman por ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas (Figura 4).

Los ácidos grasos tienen cuatro misiones fisiológicas principales:

- 1) Formar parte de la estructura de fosfolípidos y glicolípidos. Estas moléculas anfipáticas son componentes importantes de las membranas biológicas.
- 2) Muchas proteínas se modifican por la unión covalente de ácidos grasos, que las dirigen hacia posiciones en las membranas.
- 3) Los ácidos grasos son moléculas combustibles, que se almacenan como triacilglicérolos, que son ésteres de glicerol sin carga eléctrica.
- 4) Hay derivados de ácidos grasos que actúan como hormonas o mensajeros intracelulares^{41,43,44}.

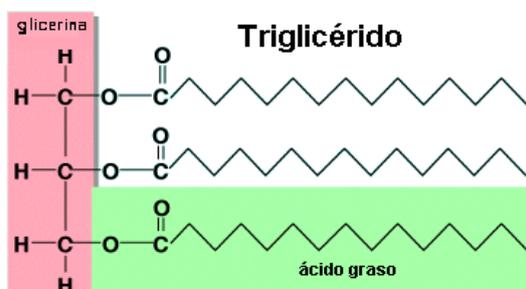


Fig 4. Estructura química de un triglicérido, triéster del glicerol con tres ácidos carboxílicos de cadena larga. (Tomado de Stryer, Berg y Tymoczko, 1995)

Además del papel desempeñado por los ácidos grasos en las funciones fisiológicas antes mencionadas y de suma importancia, durante el embarazo existen demandas adicionales energéticas principalmente durante los dos primeros tercios de la gestación, por esta razón grandes cantidades de grasa materna se acumulan como banco de energía⁴⁵. El principal componente de las reservas energéticas que almacena la madre corresponde a las grasas, que en la mujer llegan a contribuir hasta un 28% del peso que ésta gana en la gestación⁴⁶.

Cómo se mencionó anteriormente, durante el último tercio del embarazo, tal almacenamiento prácticamente se detiene y la mayor parte de la energía requerida para la formación de nuevos tejidos es ahora utilizada para el crecimiento del feto⁴⁵.

1.4.2. Flujo materno de lípidos

El proceso de adaptación del sistema materno al metabolismo lipídico consta además del almacenamiento de grasas en un periodo temprano⁴⁷, con un aumento en la absorción intestinal de nutrientes acompañado de un incremento en la demanda de los mismos⁴⁸ y un importante flujo, particularmente de FFA (free fatty acids) y LC-PUFAS (long chain polyunsaturated fatty acids) de la madre al feto⁴⁹.

La función y utilidad de los ácidos grasos también se ve reflejada en el feto ya que aunque la glucosa es el nutriente primario para el feto, las LC-PUFAS son necesarios, particularmente el ácido araquidónico (AA.20:4n-6) y el ácido docosahexanoico (DHA.22:6n-3) para la formación de membranas en órganos tales como el cerebro⁵⁰, además el ácido araquidónico es también un precursor importante de las moléculas lipídicas de señalización.

Aunque los triglicéridos no sean capaces de atravesar la barrera placentaria, la presencia de receptores de lipoproteínas, junto con la lipoproteína lipasa (LP) y actividades de lipasa intracelular permiten al feto la liberación de PUFAS transportadas en el plasma materno como triglicéridos. Un desarrollo normal del feto necesita de la disponibilidad tanto de ácidos grasos esenciales como de LC-PUFAS^{51,52}.

1.4.3.Lipogénesis.

Si durante el embarazo las reservas corporales y energéticas son importantes entonces es necesario tener una idea clara de que es lo que sucede metabólicamente con esta vía de almacenamiento durante la gestación.

Actualmente cerca del 55.16% del consumo de calorías en la dieta mexicana típica consta de lípidos^{6,53}. En general la incorporación de los lípidos exógenos al organismo se efectúa en tres fases : 1) digestión, 2) absorción y 3) transporte (Figura 5).

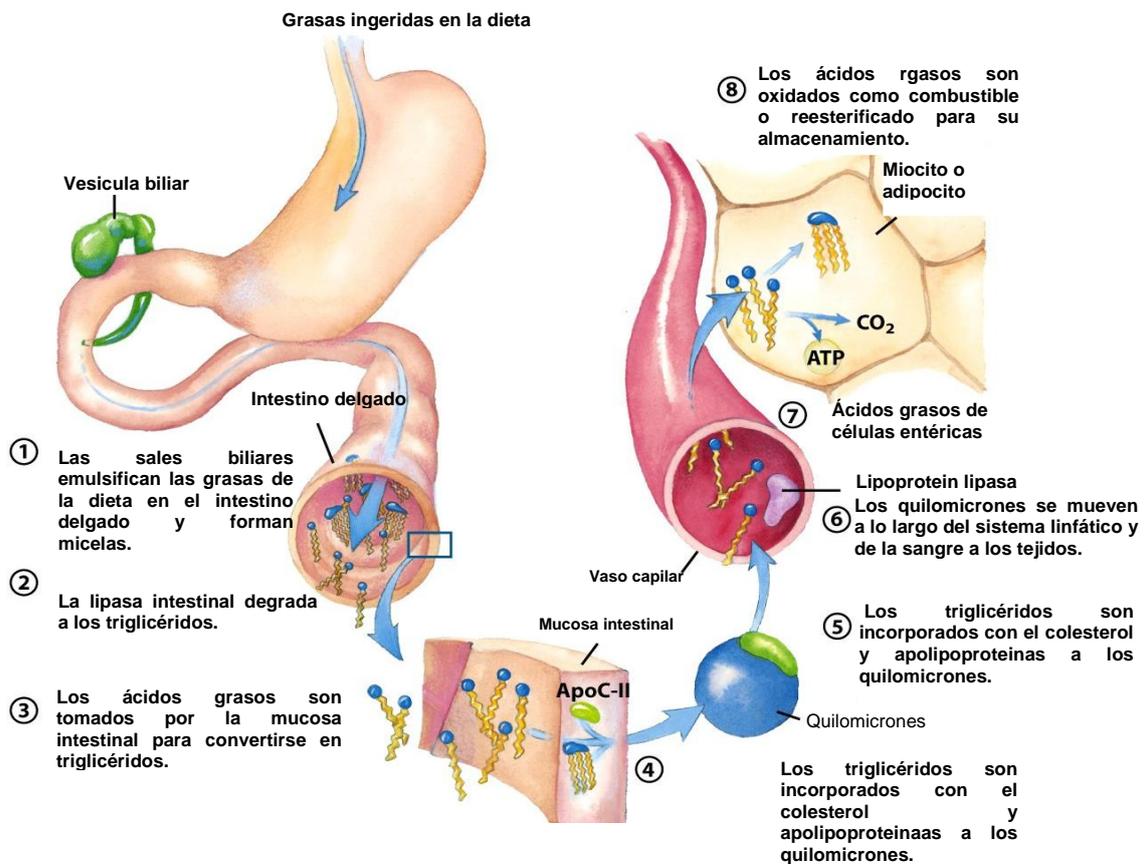


Fig 5.Incorporación de lípidos obtenidos de la dieta a través de la digestión, absorción y transporte de las grasas para incorporarse como almacenamiento o utilizarse como energía según el organismo lo requiera.(Tomado de Nelson y Cox,2001)

La **fase de digestión** se lleva a cabo en el lumen del intestino, e incluye una alteración de la naturaleza química o del medio del lípido de tipo físico o enzimático. La vesícula biliar libera ácidos biliares conjugados como la lecitina y colesterol al intestino delgado, a través del conducto biliar, que tiene la capacidad de romper los glóbulos de lípidos en micelas más pequeñas, esto

hace más vulnerable la acción de las enzimas. Este proceso se denomina *emulsificación*.

El páncreas produce tres enzimas hidrolíticas que tienen sustratos lipídicos y se secretan al duodeno. Estas son la lipasa pancreática, la colesteroesterasa y la fosfolipasa A. La lipasa actúa sobre los triglicéridos para liberar ácidos grasos libres y forma monoglicéridos, diglicéridos y glicerol. Las colesteroesterasas rompen los enlaces estéricos y liberan ácidos grasos libres y colesterol libre: la fosfolipasa A hidroliza los fosfolípidos exógenos.

Durante la **fase de absorción** los componentes se dirigen al interior de las células de la mucosa, un proceso de reordenamiento regenera los triglicéridos y los ésteres de colesterol, que son liberados a la circulación por un mecanismo de pinocitosis inversa que inicia la fase de transporte.

En la **fase de transporte** los ácidos grasos de cadena corta e intermedia se unen a la albúmina y se transportan a la circulación portal, mientras que los ácidos grasos de cadena larga se empaquetan en quilomicrones en las células de la mucosa y son liberados al conducto torácico del sistema linfático para después penetrar al sistema circulatorio^{41,44,17}.

Al llegar al hígado los ácidos grasos, triglicéridos y quilomicrones se combinan con proteínas que se sintetizan en el hígado para formar lipoproteínas. Las lipoproteínas pasan a la circulación para ser utilizadas por otros tejidos con la ayuda de una lipasa lipoproteínica, que es liberada por las distintas células que forman los tejidos y que hidrolizan sin preferencia los triglicéridos unidos a las lipoproteínas^{54,55}.

Los ácidos grasos obtenidos se utilizan dependiendo de los requerimientos del organismo ya sea como combustible o para almacenamiento como es el caso del embarazo donde también la demanda es alta de glicerol y colesterol^{51,46}.

Los ácidos grasos se sintetizan en el citosol por una vía diferente de la β -oxidación, como se muestra en el siguiente esquema^{42,44}.

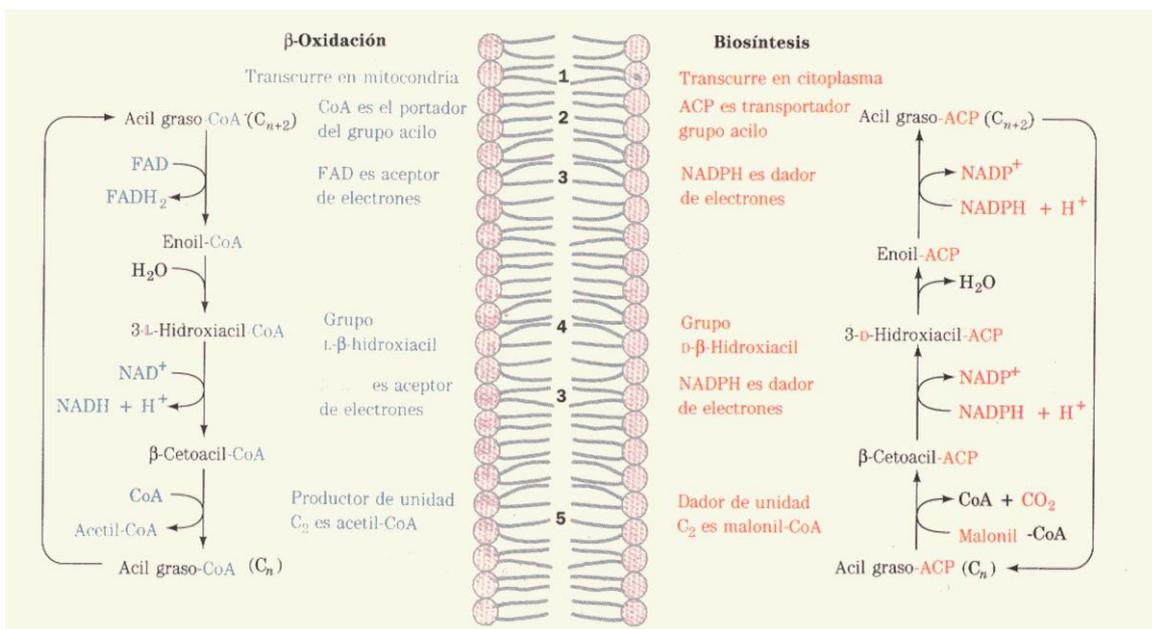


Fig 6. Diferencias entre las ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos y su biosíntesis con respecto a: (1) localización celular; (2) portador del grupo acilo; (3) aceptor/dador de electrones; (4) estereoquímica de la reacción de hidratación/deshidratación, y (5) forma en que las unidades C_2 se producen o se ceden. (Tomado de Voet y Voet, 1990)

La síntesis y regulación de los ácidos grasos están reguladas de forma recíproca de modo que no pueden ser activadas a la vez (Figura 6).

La acetil CoA carboxilasa el punto clave de control, es estimulada por la insulina e inhibida por el glucagón y la adrenalina como se muestra a continuación.

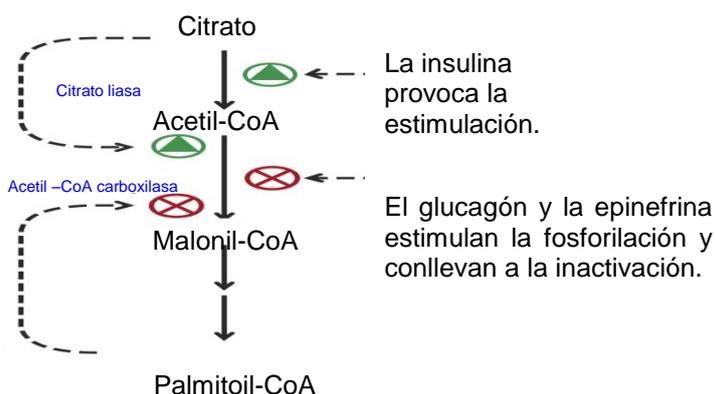


Fig 7. La acetil-CoA carboxilasa esta controlada por tres señales conjuntas: la de la insulina, el glucagón y la adrenalina. Sin embargo el citrato también la regula. Así pues, esta enzima clave está sujeta a una regulación tanto global como localizada. (Tomado de Voet y Voet, 1990)

La síntesis de los ácidos grasos (Figura 8) se inicia con la carboxilación del acetil-CoA hasta malonil-CoA, la etapa limitante. Esta reacción, dirigida por ATP, está catalizada por la acetil-CoA carboxilasa enzima que utiliza biotina.

Los intermediarios en la síntesis de ácidos grasos están ligados a una proteína portadora de acilos (ACP).

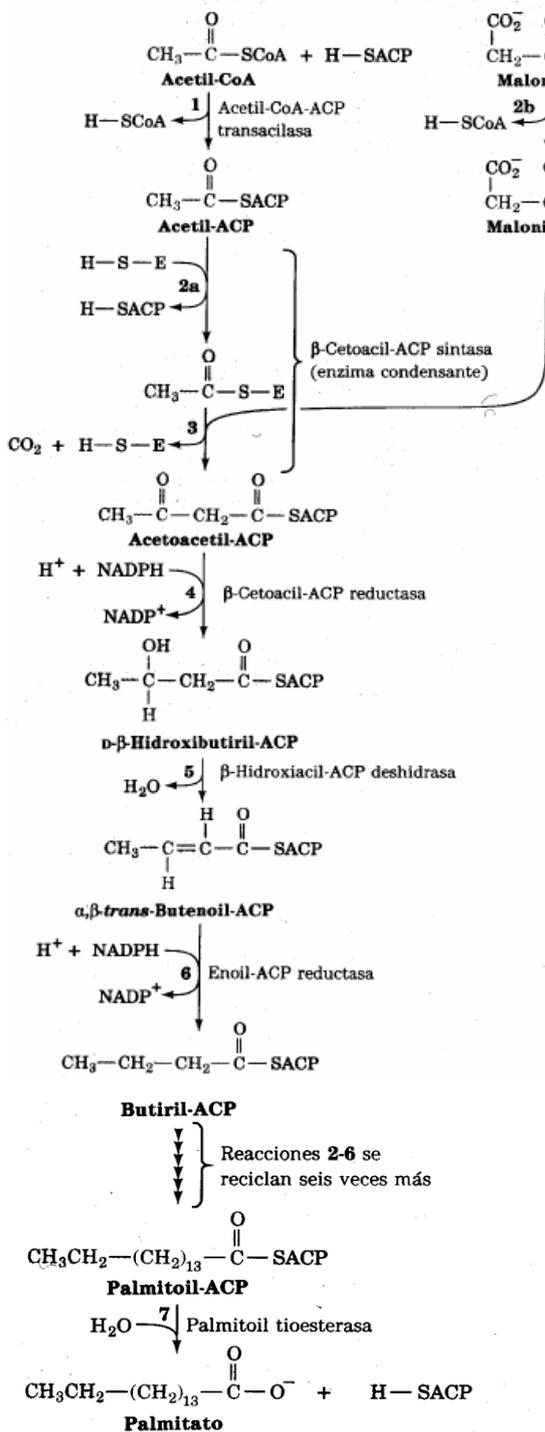


Fig 8. Secuencia de reacciones en la biosíntesis de ácidos grasos. Al formar palmitato, se repite la ruta siete ciclos, en cada uno de ellos se alarga en C₂ con una etapa final de hidrólisis. (Tomado de Voet y Voet, 1990)

1.- El acetil-ACP se forma a partir del acetil-CoA, y el malonil-ACP a partir del malonil-CoA.

2.- El acetil-ACP y malonil-ACP se condensan para formar acetoacetyl-ACP, en una reacción facilitada por la eliminación de CO₂ de la unidad malonilo activada.

3 y 4.- A esto sigue una reducción, una deshidratación y una segunda reducción. El reductor en estas etapas es el NADPH.

5.- El butiril-ACP formado en esta vía está preparado para un segundo ciclo de elongación, partiendo de la adición de una unidad de dos carbonos procedente del malonil-ACP.

6.- Siete ciclos de elongación producen palmitoil-ACP hasta palmitato.

La síntesis de palmitato requiere ocho moléculas de acetil-CoA, catorce de NADPH y siete de de ATP ^{41,42,43,44}.

1.4.4. Transporte del acetil-CoA mitocondrial al citosol.

Como se mencionó anteriormente la síntesis de ácidos grasos requiere de la aportación de 8 moléculas de acetil-CoA, 14 de NADPH y 7 de ATP. Los ácidos grasos se sintetizan en el citosol, mientras que el acetil-CoA se forma a partir del piruvato en la mitocondria. Así pues, el acetil-CoA debe transferirse desde la mitocondria al citosol para la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, las mitocondrias no son fácilmente permeables al acetil-CoA. La barrera para transportar el acetil-CoA queda salvada por el citrato, el cual transporta grupos acetilo a través de la membrana interna mitocondrial. En la matriz mitocondrial, por condensación de acetil-CoA y oxalacetato, se forma citrato (Figura 9).

Cuando alcanza niveles altos, el citrato se transporta hasta el citosol, donde se escinde por la acción de la citrato liasa-ATP.

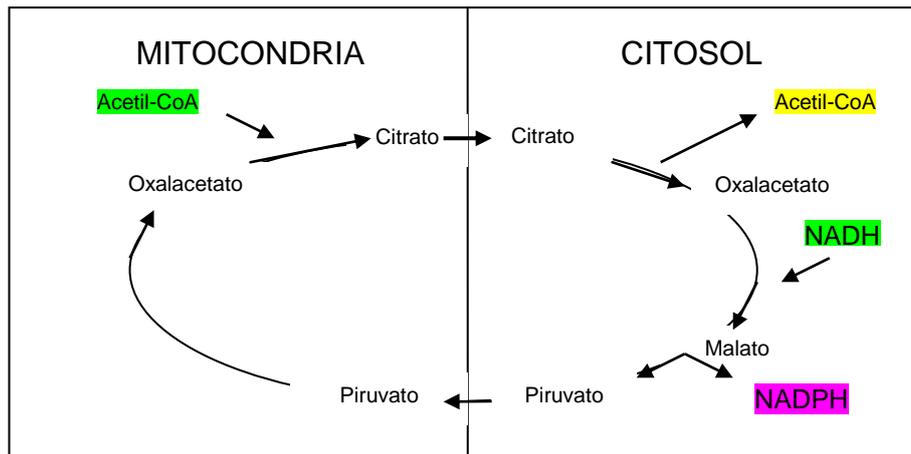


Fig 9. El acetil-CoA se transfiere desde la mitocondria al citosol y el potencial reductor del NADH se convierte en NADPH mediante esta serie de reacciones. (Tomado de Stryer, Berg y Tymoczko, 1995)

1.4.5. Fuentes de NADPH para la síntesis de ácidos grasos.

El oxalacetato formado en la transferencia de grupos acetilo al citosol debe ahora retornar a la mitocondria. La membrana interna mitocondrial es impermeable al oxalacetato. Por tanto son necesarias una serie de reacciones para superar la barrera (Figura 10). Lo más importante es que estas reacciones generan la mayor parte del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos.

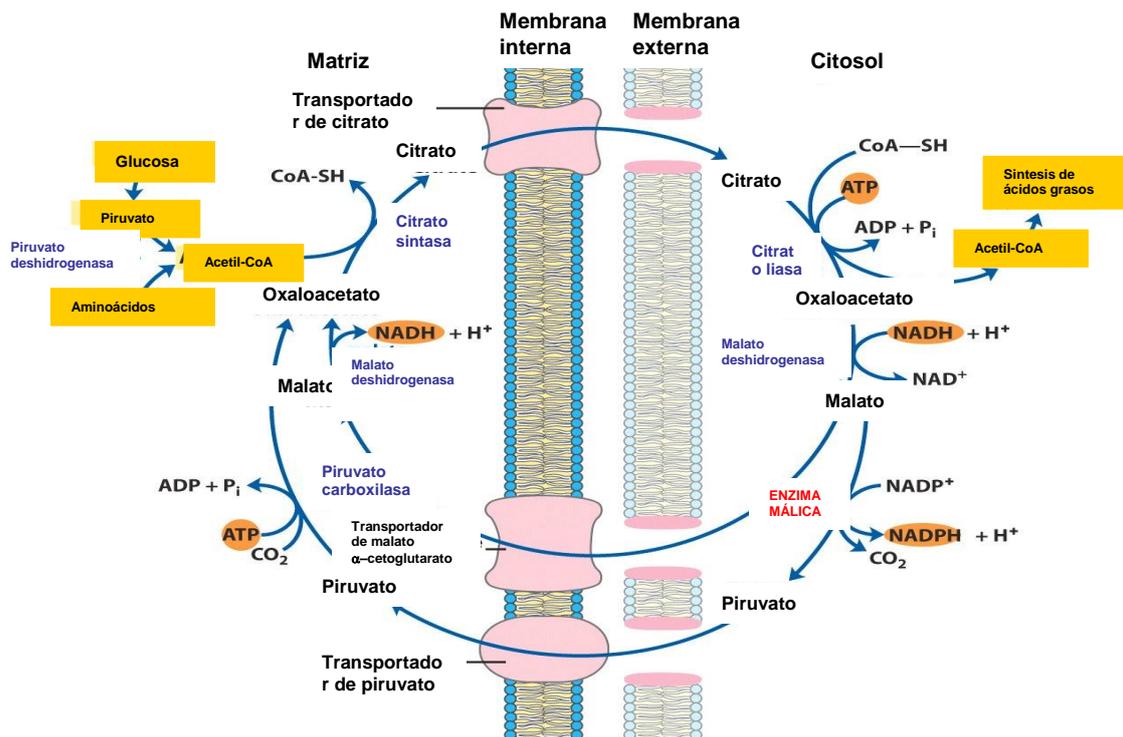


Fig 10. Se forman 8 NADPH cuando 8 moléculas de acetil-CoA son transferidas al citosol para la síntesis del palmitato. Los 6 NADPH adicionales que se requieren para este proceso proceden de la vía de las pentosas fosfato. (Tomado de Nelson y Cox, 2001)

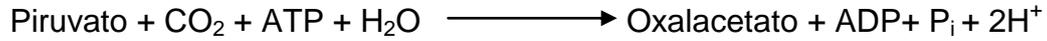
Primero, el oxalacetato es reducido a malato por la NADH. Esta reacción está catalizada por la *malato deshidrogenasa* del citosol.



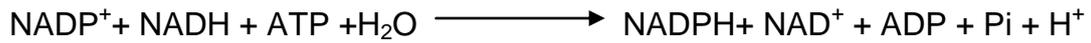
Segundo, el malato es descarboxilado oxidativamente por la **enzima málica dependiente de NADP⁺**.



El piruvato formado en esta reacción difunde rápidamente a la mitocondria, donde es carboxilado hasta oxalacetato por la piruvato carboxilasa.



La suma de estas tres reacciones es :



Así pues, se genera un NADPH por cada acetil-CoA transferido desde la mitocondria al citosol^{41,42,43,44}.

2.JUSTIFICACIÓN

Estudios clínicos epidemiológicos en poblaciones humanas y diversos trabajos experimentales entre ellos los realizados dentro del proyecto de investigación con la Dra. Elena Zambrano González han demostrado que la restricción proteínica en etapas críticas del desarrollo afecta irreversiblemente la fisiología y el metabolismo del individuo adulto y por lo tanto la predisposición a enfermedades como la diabetes, hipertensión arterial, resistencia a la insulina y obesidad.

Sin embargo se sabe que ante la deficiencia proteínica en etapas tempranas del desarrollo como la gestación no sólo se afecta la futura descendencia sino también la madre, ya que su organismo además de sufrir los cambios pertinentes del embarazo también tiene que realizar mecanismos de adaptación causados por la restricción, todo esto con la finalidad de garantizar al feto su desarrollo.

Por otra parte se ha demostrado en varias especies de mamíferos incluyendo a la humana que cuando hay restricción de proteínas durante el embarazo el hígado sufre alteraciones en la acumulación de grasas, por lo que en el presente estudio se analizará el impacto de la restricción proteínica en el hígado, un órgano que por su multifuncionalidad desempeña un papel muy importante en el metabolismo, y si esto a su vez impacta en la actividad de una enzima lipogénica en la rata madre a los 19 días de la gestación.

3.OBJETIVOS

3.1.Objetivo general

Determinar el efecto de la restricción proteínica en la dieta durante el periodo de gestación sobre las reservas de grasa y la actividad de la enzima málica en el hígado materno de la rata.

3.2.Objetivos particulares

Determinar el efecto de dietas isocalóricas, con diferente contenido de proteína, sobre la ingesta de alimento diario y el peso corporal de ratas gestantes de la cepa Wistar.

Determinar si la dieta restringida en proteínas provoca cambios en el tamaño, contenido de grasa y de proteína en el hígado materno de la rata gestante.

Determinar el efecto de la restricción proteínica durante el embarazo sobre la actividad de la enzima málica en el hígado de la rata al día 19 de la gestación.

4.HIPÓTESIS.

La restricción proteínica en la rata durante la gestación producirá una disminución en las reservas lipídicas del hígado y afectará de manera negativa la actividad de la enzima málica involucrada en la lipogénesis de ese órgano.

5.MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.Modelo biológico

Los animales que se utilizaron para esta investigación fueron ratas de la cepa Wistar de 240 ± 20 gramos de peso de 10 a 12 semanas de edad, las cuales se mantuvieron en un cuarto del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ) bajo condiciones controladas como la temperatura 22 ± 2 °C y con ciclos de luz/obscuridad de 12 hrs.

Cabe mencionar que antes del estudio los animales fueron alimentados con dieta del bioterio (Purina 5001) el alimento y el agua estuvieron disponibles a libre demanda.

Ratas hembras fueron apareadas con machos de la misma cepa, los animales se colocaron en cajas de acrílico (dos hembras con un macho) durante cinco días. Durante estos días se realizaron frotis vaginales que en presencia de espermatozoides se consideró el inicio de la gestación.

Las ratas preñadas se colocaron en cajas individuales para monitorear la ingesta (utilizando la dieta experimental asignada) y el peso del animal diariamente por las mañanas de 9:00-10:00 am hasta el día 19 de la gestación.

Todos los procedimientos realizados con los animales empleados fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal de este Instituto.

5.2.Modelo experimental

Una vez que las ratas se consideraron preñadas entonces aleatoriamente les fue asignando, una de las dos dietas pertenecientes al experimento.

Grupo control (C). A lo largo del periodo de gestación las ratas fueron alimentadas con la dieta a base del 20% de caseína.

Grupo restringido (R). A lo largo del periodo de gestación las ratas fueron alimentadas con una dieta isocalórica pero con diferente contenido de proteína, es decir una dieta a base del 10% de caseína.

Cabe mencionar que la composición de la dieta control pertenece a las últimas recomendaciones de la National Research Council (NRC) de 1993,

para roedores durante el periodo de gestación y lactancia, denominada AIN-93G, modificado por el grupo de trabajo de la Dra. Elena Zambrano González ².

5.3.Elaboración de dietas

Las dietas que se utilizaron para este experimento contenían la misma cantidad de calorías pero diferente contenido de proteínas, la dieta control (20% de caseína) y la dieta restringida (10% de caseína) para compensar la proporción de proteína se utilizó mayor cantidad de carbohidratos con la finalidad de mantener el mismo contenido energético.

La composición química de estas dietas y el porcentaje de cada uno de los nutrientes, se muestra en la tabla No.2

Tabla No.2 Composición de las dietas isocalóricas utilizadas en el estudio.
Tomado de: Modificado de Reeves et al,1993.

Materia prima	Dieta caseína al 10% para 7Kg (%)	Dieta caseína al 20% para 7Kg (%)
Caseína	10	20
Cistina	0,15	0,3
Mezcla de vitaminas	1	1
Mezcla de minerales	3,5	3,5
Colina	0,165	0,165
Aceite	5	5
Celulosa	5	5
Almidón	37,59	32,52
Dextrosa	37,59	32,52

Las dietas se prepararon en la Unidad de Tecnología de Alimentos del Instituto¹.

5.4.Obtención de muestras

Al día 19 de gestación las ratas se sacrificaron por decapitación, recolectando la sangre en tubos de vidrio. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 1500 rpm en una centrífuga Sorvall[®] modelo RT7 durante 15 minutos.

Se extrajo el hígado registrando su peso en una Balanza Sartorius[®] con 0,001g de sensibilidad, se pesó aproximadamente del lóbulo inferior derecho 1g para determinar la actividad de la enzima málica.

5.5. Ensayo enzimático de la Enzima Málica

Aproximadamente 1g de hígado se homogeneizó en un mortero frío con 7mL de amortiguador frío (25mM Tris-HCl pH 7,8,0,2% Tritón X-100).

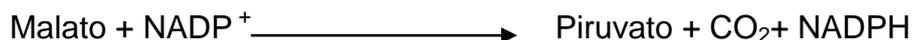
El homogeneizado fue centrifugado a 14 000 rpm (26000g) a 4°C durante 20 minutos en una centrífuga J2-M1 Beckman ® con el rotor No.20.

El sedimento se resuspendió con 5 mL del mismo amortiguador y se agitó vigorosamente, posteriormente se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 20 min. Ambos sobrenadantes obtenidos se mezclaron y se almacenaron a -70 °C hasta el día de su análisis.

5.5.1. Cuantificación de la actividad enzimática

Fundamento

La cuantificación se basa en una reacción de óxido-reducción como se muestra a continuación:



El NADPH tiene un máximo de absorción a 340nm, el cual se mide en un espectrofotómetro.

Procedimiento

Las muestras se descongelaron en agua con hielo.

En tubos de vidrio se colocaron las siguientes cantidades de los reactivos señalados en el orden como se muestra en la Tabla No.3 posteriormente se agitaron vigorosamente.

Tabla No.3 Reactivos utilizados para la cuantificación de la enzima málica

Reactivo	Muestra (mL)	Blanco (mL)
A(Tris HCl pH 7,4)	2.00	2.00
B (Ácido málico)	0.10	0.10
C (NADP ⁺)	0.05	0.05
D (MnCl ₂)	0.75	0.75

Es importante mencionar que la muestra se colocó inmediatamente antes de la lectura.

Las muestras se leyeron junto con el blanco a 340 nm durante 5 minutos con intervalos de 5 segundos a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Beckman DU® 650.

Cálculos:

$$\text{Unidades/mL enzima} = \frac{(\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min muestra} - \Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}) 4,823}{(6,22)(0,1)}$$

3 = Volumen total del ensayo (en mL)

4,823 = Factor de dilución

6,22 = Coeficiente de extinción molar (moles/L)

0.1 = El volumen de muestra que se utilizó (en mL)

$$\text{*Unidades/mg de tejido} = \frac{\text{Unidades de actividad de la enzima málica}}{\text{mg de hígado}}$$

$$\text{*Unidades/mg de proteína} = \frac{\text{Unidades de actividad de la enzima málica}}{\text{mg de proteína}}$$

5.5.2. Determinación de proteínas por el método de Bradford

Fundamento

El azul de Coomassie se adhiere a la proteína, el colorante se torna de rojizo a azulado y el máximo de absorción del colorante cambia de 465 a 595nm. El cambio en la absorbancia 595 nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

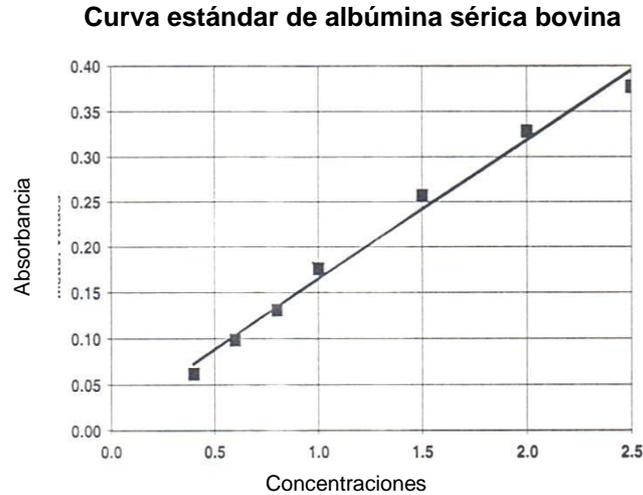
Procedimiento.

Se utilizó este método con la finalidad de expresar la actividad enzimática en referencia a la cantidad de proteína.

1) Se elaboró una curva estándar de albúmina sérica Bovina partiendo de una solución base con una concentración de 1 mg/mL, haciendo una dilución de 1:5 para obtener una concentración final de 200 µg/mL.

*Definición de Unidad: Es la cantidad de enzima que convertirá 1µmol de malato y NADP a piruvato, CO₂ y NADPH por minuto.

Las concentraciones utilizadas para la curva fueron las siguientes: 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2 y 2,5 $\mu\text{g/mL}$, se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0.98$, como se muestra a continuación:



2) Las muestras obtenidas del ensayo enzimático se descongelan en agua con hielo.

3) Se hace una dilución 1:5 del reactivo de Bradford.

4) Por último la curva y las muestras se leyeron en placas de Elisa de 96 pozos por duplicado a una absorbancia de 545 nm con el aparato Multiskan 352[®] obteniendo los resultados con un programa llamado Ascent Software Versión 2.6.

Nota: En cada pozo se colocó 5 μL de muestra con 200 μL de reactivo de Bradford.

Cálculos:

$$\text{mg}/\mu\text{L del homogeneizado} = \frac{\text{Concentración de la proteína (mg)}}{\mu\text{L colocados en cada pozo}} \times \text{factor de dilución}$$

5.6. Determinación de lípidos en el hígado por el método de Soxhlet

Fundamento

Se basa en que la extracción de grasa de la muestra se realiza mediante el tratamiento con un solvente no polar a reflujo.

Procedimiento

El hígado se molió en una mortero, y se pesó 1 gramo de muestra en un matraz bola de 250 mL, se adicionaron 20 mL de HCl 2:1 y posteriormente 3 mL de etanol para poder poner las muestras a reflujo durante 45 minutos para llevar a cabo su hidrólisis. Posteriormente el contenido se filtró y lavó con agua caliente hasta obtener una solución clara. En este caso lo que se utilizó fue el papel filtro el cual se colocó entre dos cartuchos de celulosa (diámetro de 26 mm Foss-Tecator®) ambos se colocaron en la unidad de extracción (Soxtec System HT 1043) con condensadores de Liebing, también se utilizaron vasos de aluminio puestos previamente a peso constante, a estos se les adicionaron 50 mL de éter etílico anhidro para después instalarlos en el equipo. Los lípidos fueron extraídos durante 3 hrs por reflujo constante. Una vez efectuada la extracción, el solvente fue evaporado, se retiraron los vasos de aluminio los cuales contenían el extracto etéreo; para eliminar los restos de éter, las muestras se introdujeron en la estufa de secado de 1 a 2 minutos, y posteriormente se pesaron. Por diferencia en peso se calculó la cantidad de grasa contenida en la muestra.

Cálculos:

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{c-a}{b} \times 100$$

Donde: a = peso constante del vaso

b = peso de la muestra

c = peso constante del vaso con grasa

Los resultados se expresaron como el % del extracto etéreo.

5.7. Determinación de proteínas en el hígado total por el método de Kjeldhal

Fundamento

Este método se basa en la digestión de materia orgánica en medio ácido, el cual se fija como sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se alcaliniza el medio con hidróxido de sodio al 40% lo que permite la formación de amoníaco (NH_3) en forma de gas, éste se fija en ácido bórico H_3BO_3 al 1% obteniéndose borato de amonio. Este se titula con H_2SO_4 al 0,1 N con un titulador automático Kjeltec auto sampler, tecator 1035.

Procedimiento

Se pesó de 0.1-0.2g de hígado en una balanza analítica Sartorius® de 0,001g de sensibilidad y se colocó dentro de los tubos de digestión, posteriormente se adicionaron 12mL de ácido sulfúrico y una tableta catalizadora Kjeltabs (que esta compuesta de 0,50g de un catalizador de selenio y sulfato de potasio). Los tubos se colocaron en el digestor Kjeltec aproximadamente durante 3hrs. Concluido este tiempo se retiraron los tubos y se dejaron enfriar dentro de una campana. Posteriormente se adicionó a cada tubo 75 mL de agua destilada y se colocó en el equipo Kjeltec para su titulación.

Todas las muestras se determinaron por duplicado.

Cálculos:

$$\% \text{de nitrógeno} = \frac{(\text{mL del problema} - \text{mL del blanco})(\text{mEqN})(\text{N H}_2\text{SO}_4) \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

$$\% \text{ de proteína} = \% \text{de nitrógeno} \times \text{factor (6,25)}$$

Expresión de resultados: g proteína/ 100g de muestra.

5.8. Análisis estadísticos

Para los resultados de peso corporal, alimento consumido, peso del hígado, contenido de grasa, cantidad de proteína total y actividad enzimática se empleó una prueba *t* de Student considerando el valor de 0.05 como el nivel mínimo de significancia, utilizando el programa Sigma Stat (v,3.1).

6.RESULTADOS

6.1.CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MADRES

6.1.1.Peso corporal materno.

El tratamiento durante la gestación con la dieta restringida (10% de caseína) alteró el peso corporal de las madres. Como se aprecia en la *Figura 11*, los dos grupos experimentales aumentaron de peso de modo paralelo, pero las madres del grupo control mostraron pesos mayores a partir del día 7 hasta el día 19 de la gestación.

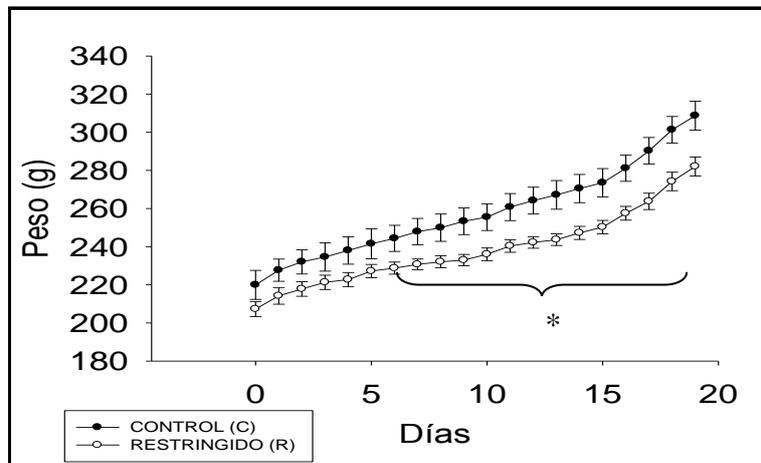


Figura 11. Peso corporal materno durante la gestación. Los datos son expresados como la media \pm EE, $n=7$ y analizados por t de student * vs C $p<0.05$.

6.1.2. Consumo de alimento materno

El tipo de dieta no influyó de manera significativa en el consumo de alimento materno ya que éste fue similar en los dos grupos experimentales durante el periodo de la gestación (Figura 2).

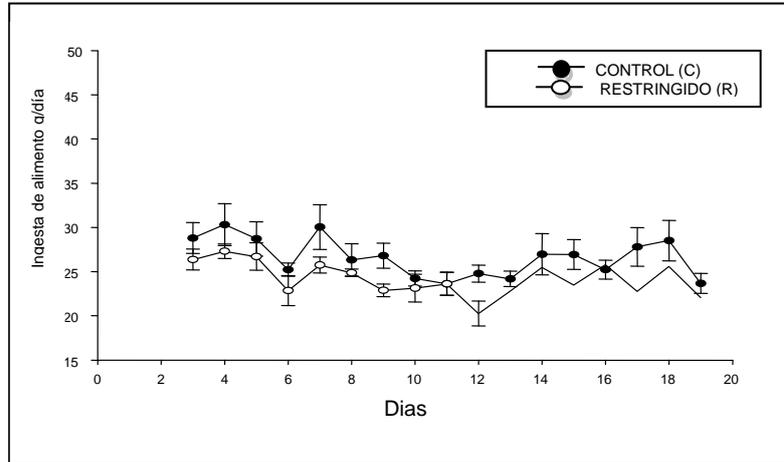


Figura 12. Consumo de alimento de las madres durante la gestación. Los datos son expresados como la media \pm EE, $n=7$ y analizados por t de student. No se encontraron diferencias significativas.

Al parecer, la reducción del contenido de proteína en la dieta restringida no fue suficiente como para influir en el consumo de alimento en el grupo restringido.

6.2. PARÁMETROS MATERNOS AL DÍA 19 DE LA GESTACIÓN.

6.2.1. Peso corporal materno

El peso materno al día 19 de la gestación del grupo restringido fue significativamente menor con respecto al grupo control.

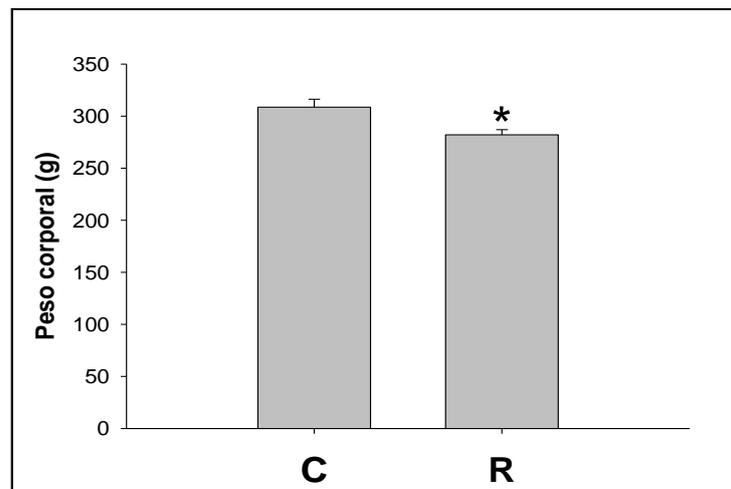


Figura 13. Peso corporal materno al día 19 de la gestación. Los datos son expresados como la media \pm EE, $n=7$ y analizados por t de student *vs C $p=0.013$.

6.2.2. Peso absoluto y relativo del hígado materno.

Se registraron los pesos de los hígados de las madres al día 19 de la gestación, en donde se observó una clara disminución en el peso absoluto del grupo restringido. Por su parte el peso relativo del hígado [(peso del hígado/peso corporal) x 100] también fue significativamente menor y se expresa en porcentaje debido a que se expresan en función del peso corporal, esto se realizó con la finalidad de corroborar si la proporción del peso materno coincide con el peso del hígado.

Tabla No4. Peso absoluto y relativo de hígado de madres de 19 días de gestación

	Control	Restringido
Peso absoluto del hígado (g)	11.2±0.43	9.3±0.16* p=0.002
Peso relativo del hígado (%)	3.6±0.13	3.3±0.06* p=0.043

Tabla 4. Peso absoluto y relativo de hígado de madres de 19 días de gestación. Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Los datos son expresados como la media ± EE, n=7 y analizados por *t* de student * vs C p<0.05.

6.2.3. Peso y diámetro de la placenta.

Debido a que la placenta desempeña un papel de suma importancia durante el embarazo, se decidió pesarla y medirla el día del sacrificio, y lo que se observó fue que las placentas de las madres restringidas no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control, sin embargo se observó una tendencia a ser más pequeñas las placentas de madres restringidas, como se muestra en la *Tabla No.5*.

Tabla No5. Peso y diámetro de la placenta de madres de 19 días de gestación.

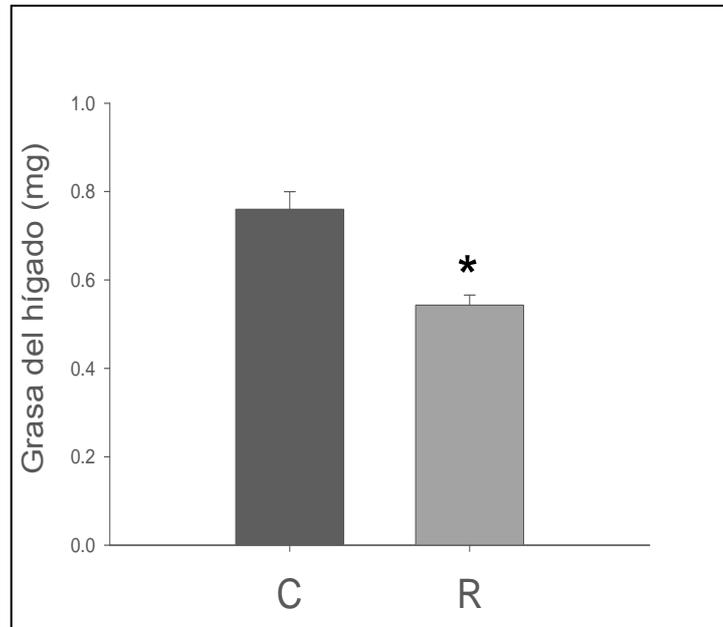
	Control	Restringido
Peso de la placenta (g)	0.42±0.018	0.40±0.019
Diámetro de la placenta (mm)	0.99±0.014	0.96±0.019

Tabla 5. Peso y diámetro de la placenta de madres de 19 días de gestación. Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Los datos son expresados como la media ± EE, n=7 y analizados por *t* de student. No se encontraron diferencias significativas.

6.2.4. Grasa absoluta y grasa relativa en el hígado.

La grasa absoluta en el hígado materno a los 19 días de gestación en las madres restringidas fue significativamente menor con respecto al grupo control (*Figura 14A*), y la cantidad de grasa en el hígado también fue menor en la madres restringidas como se muestra en la *Figura 14B*.

A)



B)

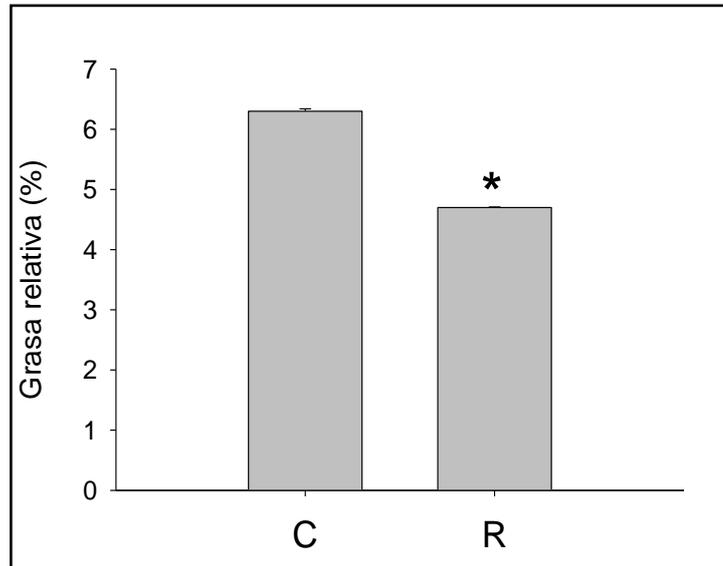


Figura 14. Grasa absoluta y grasa relativa del hígado de madres de 19 días de gestación. Panel **A**, grasa absoluta, panel **B**, grasa relativa. Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Los datos son expresados como la media \pm EE, $n=7$ y analizados por t de student * vs C $p<0.05$.

6.2.5. Química sanguínea

Al determinar la química sanguínea en el suero de las madres al día 19 de gestación se encontró que las concentraciones de colesterol fueron significativamente menores en el grupo restringido comparado con el grupo control, sin embargo las concentraciones tanto de glucosa y triglicéridos mostraron tendencia a ser menor en el grupo restringido sin llegar a la significancia.

Tabla 6. Concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol en suero materno a los 19 días de gestación.

Concentración	Control	Restringido
Glucosa (mg/dL)	78.1±3.2	70.3±2.2
Triglicéridos (mg/dL)	190±48	158±17
Colesterol (mg/dL)	42±1.8	36±0.9* p=0.008

Tabla 6. Concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol en suero materno a los 19 días de gestación. Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Media ± EE, n=7, * vs C, p=0.008. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de Glucosa y Triglicéridos.

6.2.6. Proteína en suero.

Al día 19 de la gestación las proteínas cuantificadas en suero por el método de Bradford fueron menores en las madres alimentada con dieta restringida (10% de caseína) como se aprecia en la *Figura 15*, aunque esta disminución no fue significativa.

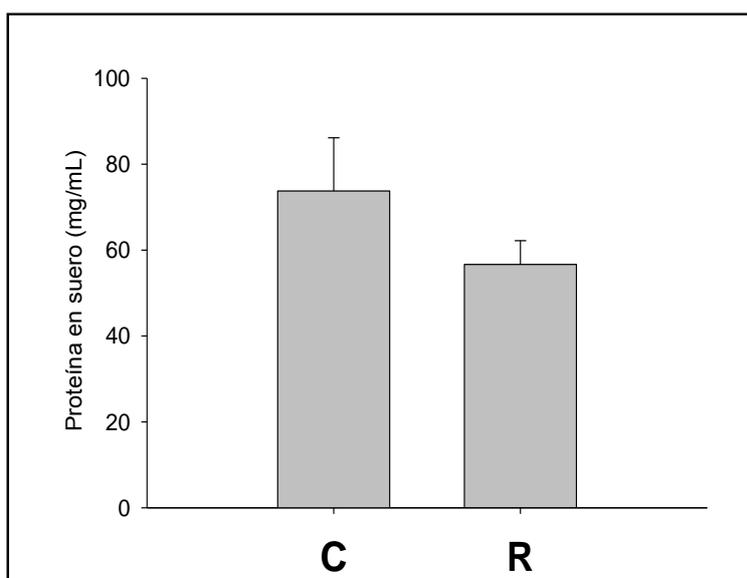


Figura 15. Proteína en suero de madres de 19 días de gestación. Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Los datos son expresados como la media ± EE, n=7 y analizados por *t* de student. No se encontraron diferencias significativas.

6.2.7. Proteína total en el hígado.

En la *Figura 16* se muestra que la cantidad de proteína contenida en el hígado de las madres de 19 días de la gestación fue significativamente mayor en el grupo control con respecto al grupo restringido.

Es importante mencionar que esta determinación se hizo a través del método de Kjeldahl con la finalidad de obtener las proteínas totales que se encuentran en el órgano.

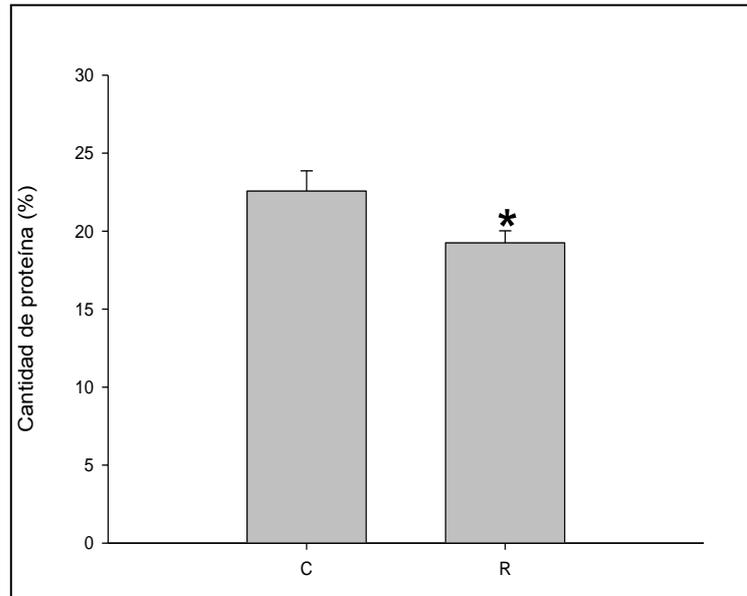


Figura 16. Proteína en hígado de madres de 19 días de gestación obtenida por el método de Kjeldahl. Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Los datos son expresados como la media \pm EE, $n=7$ y analizados por t de student, $p=0,020$.

6.3. Actividad de la enzima málica en el hígado.

En las gráficas siguientes se puede apreciar que la actividad de la enzima málica en el hígado de la rata al día 19 de la gestación fue afectada por el grado de desnutrición, siendo significativamente menor en el grupo restringido en ambos casos. En la *Figura 17A* se muestra la concentración de la actividad enzimática, mientras que en la *Figura 17B* se expresa la actividad enzimática específica.

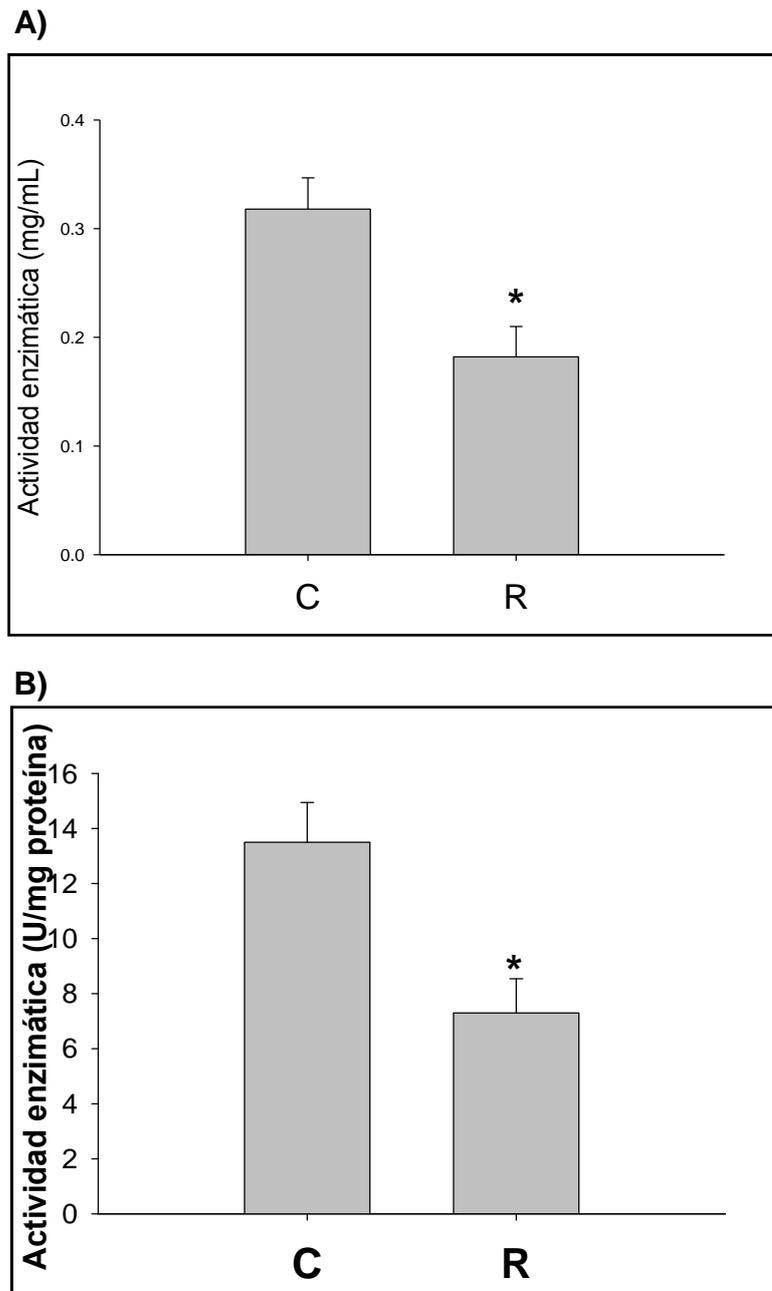


Figura 17. Actividad de la enzima málica en hígado de madres de 19 días de gestación. Panel **A**, concentración de la actividad de la enzima málica, panel **B**, actividad específica de la enzima málica. Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Los datos son expresados como la media \pm EE, n=7 y analizados por *t* de student * vs C $p < 0.01$

6.3.1. Actividad de la enzima málica con respecto a un gramo y al peso total del hígado.

En las siguientes gráficas se muestra la actividad de la enzima málica en el hígado de las madres al día 19 de la gestación viéndose disminuida estadísticamente en el grupo restringido en ambos paneles. En la *Figura 18A* la actividad enzimática se expresa con respecto a un gramo de hígado que fue el utilizado para esta determinación, mientras que en la *Figura 18B* es expresada con respecto al peso total del hígado.

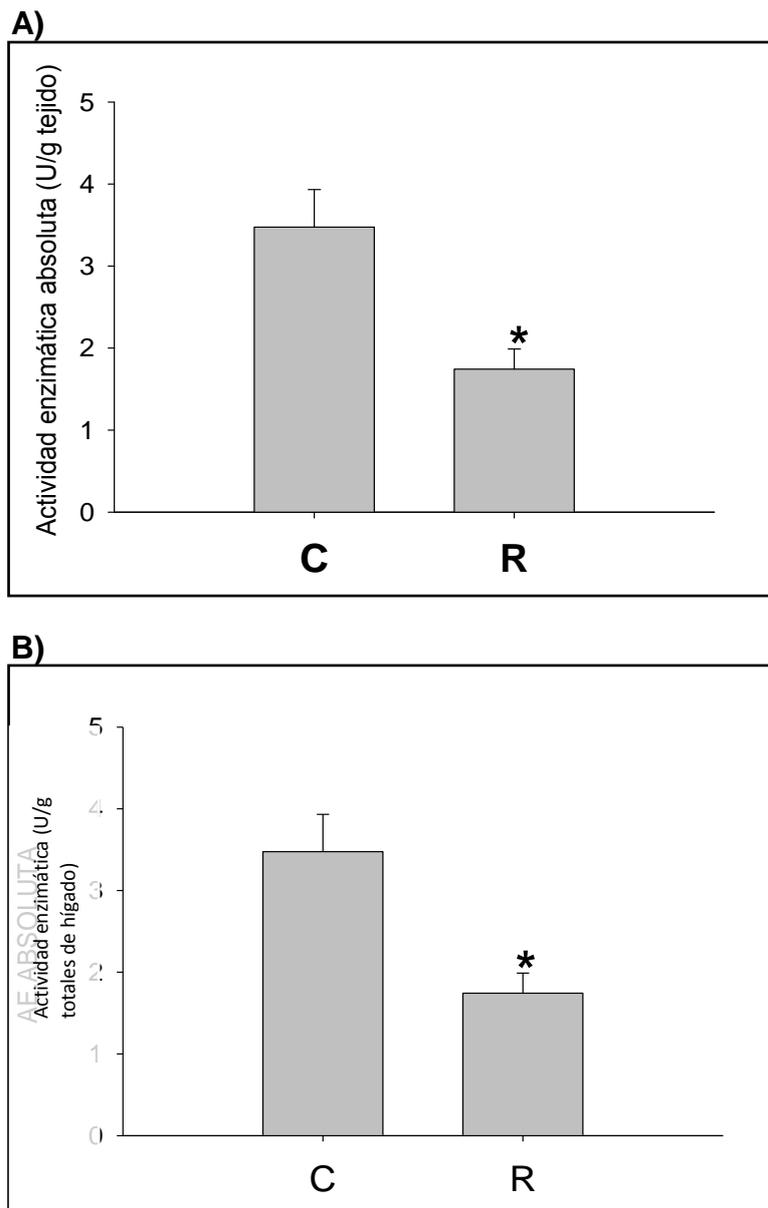


Figura 18. Actividad de la enzima málica en hígado de madres de 19 días de gestación. Panel **A**, actividad de la enzima málica (U/1 g de hígado) panel **B**, actividad de la enzima málica (U/g totales de hígado). Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Los datos son expresados como la media \pm EE, $n=7$ y analizados por t de student * vs C $p<0.05$.

6.3.2. Relación entre la cantidad de grasa contenida en el hígado y la actividad de la enzima málica.

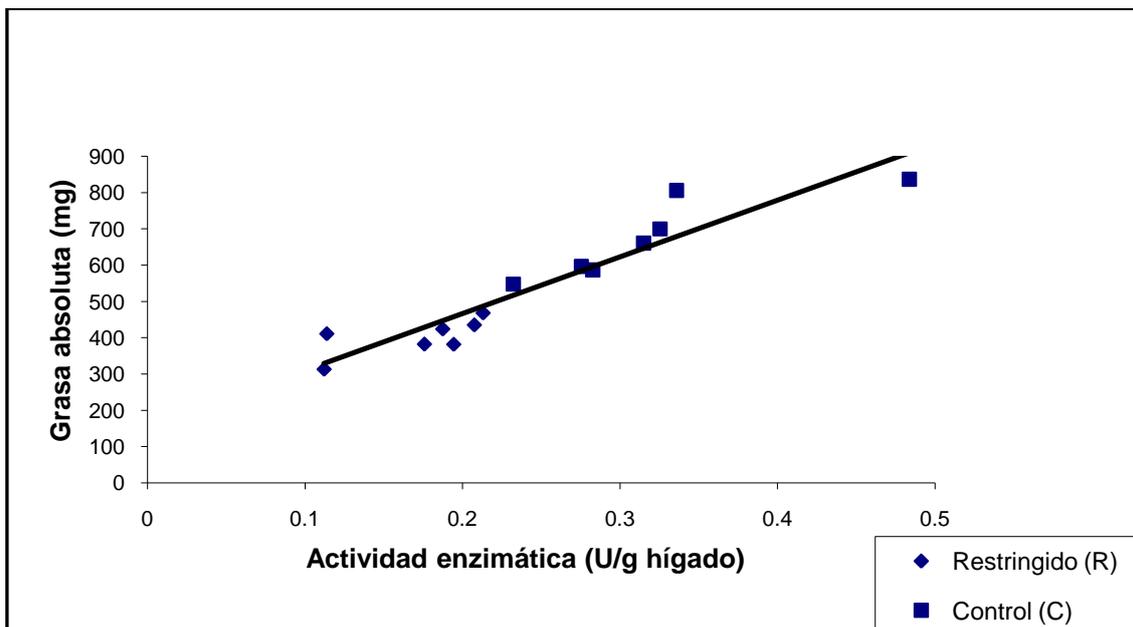


Figura 19. Actividad de la enzima málica en hígado de madres de 19 días de gestación. Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Los datos son expresados como la media \pm EE, $n=7$, $r=0.930$, $p=0.001$.

6.4. PARÁMETROS FETALES AL DÍA 19 DE LA GESTACIÓN.

Al día 19 de la gestación, las crías del grupo restringido pesaron menos. Esta misma tendencia se observó en el peso absoluto y relativo del hígado y cerebro. Sin embargo donde la diferencia se acentuó más fue en el peso relativo del hígado de crías de madres restringidas, como se observa en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Parámetros fetales al día 19 de la gestación.

	Control	Restringido
Peso fetal corporal (g)	2.08 \pm 0.181	1.93 \pm 0.156
Peso absoluto del hígado (mg)	167 \pm 0.02	140 \pm 0.01
Peso relativo del hígado (%)	8.1 \pm 0.20	7.3 \pm 0.15* $p=0.006$
Peso absoluto del cerebro (mg)	128 \pm 0.004	120 \pm 0.003
Peso relativo del cerebro (%)	6.4 \pm 0.28	6.3 \pm 0.12

Tabla 7. Parámetros fetales al día 19 de la gestación. Ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R). Los datos son expresados como la media \pm EE, $n=7$ y analizados por t de student * vs C $p=0.006$.

7.DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Características de las madres durante la gestación.

Durante el embarazo la madre incrementa su peso corporal y sus depósitos de grasa, en este trabajo encontramos aumento corporal a lo largo de la gestación en ambos grupos, sin embargo las madres restringidas aumentaron menos de peso a partir del día 7 hasta el día 19 de la gestación comparadas con el grupo control, es posible que esto se deba a un intento de las madres restringidas por compensar la restricción proteínica a la que estuvieron sometidas a lo largo de la gestación, aún cuando comieron cantidades similares de alimento.

Las dietas empleadas para este estudio fueron isocalóricas, la dieta restringida en proteínas fue compensada en calorías con carbohidratos, por esta razón ambas proporcionaron la misma cantidad de calorías, aunque la ingesta diaria de alimento de ambos grupos fue similar, las madres restringidas consumieron menor cantidad de proteína, esta restricción se reflejó en varios aspectos que conciernen a la madre que se discutirán a continuación.

La razón por la cual decidimos incluir el peso y diámetro de la placenta es que además de ser un órgano multifuncional y de suma importancia durante la gestación, existen trabajos donde se ha reportado que ante la mal nutrición la placenta llega a competir con el feto por los nutrientes e interferir de alguna forma en el crecimiento del feto, esto se debe a que la velocidad con que se desarrolla el feto está determinada no sólo por la disponibilidad de nutrientes en la circulación materna, sino también por la velocidad de transferencia de éstos a través de la placenta ^{20,38,56}, sin embargo en nuestro estudio, el peso y diámetro de la placenta no se vieron afectados significativamente por la restricción de proteína, estos resultados concuerdan con otro trabajo reportado, donde tampoco observaron efecto en el peso de la placenta aún cuando las ratas fuesen alimentadas con dieta que contenía 7,5% de caseína⁵⁷.

Se sabe que la proteína en la dieta representa un papel muy importante en el metabolismo del organismo, ya que los aminoácidos se utilizan tanto para

sintetizar aproximadamente el 40% de la glucosa⁵⁸ como para la construcción de nuevos tejidos.

Además se sabe que el feto tiene la capacidad de elegir en no llevar a cabo la oxidación de glucosa si éste obtiene un adecuado suplemento de aminoácidos. Sin embargo en este trabajo encontramos que al alimentar ratas preñadas con deficiencia proteínica, la concentración de glucosa en suero de madres restringidas con respecto a las madres control tuvieron tendencia a ser menor sin ser significativamente diferente, probablemente porque las madres restringidas realizaron adaptaciones del metabolismo de la glucosa para proveer de ésta y posiblemente de otros nutrientes al feto^{59,60,61}.

Se ha reportado que en mamíferos como los humanos y los roedores existe aumento en las concentraciones de colesterol lo cual coincidió con lo obtenido en este trabajo.

Durante la fase catabólica de la gestación existe aumento de VLDL y LDL en la circulación^{51,62,63}, lo cual se ha relacionado con la disminución de síntesis de lípidos en el tejido adiposo, considerando que la lipólisis es mucho más frecuente durante esta etapa del embarazo⁶⁴ resultado que lleva al aumento en las concentraciones de ácidos grasos libres en suero.

Debido a que el hígado desempeña un papel relevante en la regulación del metabolismo de lípidos en el organismo materno durante la gestación decidimos realizar varias determinaciones en dicho órgano las cuales se discutirán a continuación.

El peso del hígado de madres restringidas fue significativamente menor con respecto al grupo control, lo mismo se obtuvo en el peso del órgano en relación al peso corporal. Se ha sugerido que la disminución en el peso del hígado durante la gestación se debe a que sufre hipertrofia ocasionada por la deficiencia en la cantidad de proteínas en la dieta, en otros trabajos se han observado que en las primeras dos semanas de la gestación la restricción no muestra ningún efecto en el peso del órgano pero si muestra disminución del peso en la última semana de la gestación⁵⁸. Estos datos son similares a los encontrados por otros autores^{65,66,67} y coinciden con los de este trabajo aclarando que en esta investigación sólo se obtuvieron resultados al día 19 de la gestación.

Por otra parte pudimos obtener la grasa contenida en el hígado al día 19 del embarazo la cual fue menor en el grupo de madres restringidas, resultado de que ante la restricción, éste órgano no lleva a cabo de forma óptima procesos comunes durante esta etapa, lo que podría deberse a una disminución de la producción de VLDL hepática que es lo que contribuye a la grasa acumulada en el hígado durante el embarazo⁶⁸.

Nosotros cuantificamos la actividad de la enzima málica la cual es la encargada de donar los cofactores necesarios para que se lleve a cabo la síntesis de ácidos grasos. Encontramos que tanto la concentración, como la actividad específica de la enzima málica fue menor en el hígado de madres restringidas con respecto al grupo control, lo mismo se encontró cuando cuantificamos la enzima y la expresamos con respecto al peso total del hígado.

Lo anterior apoya que la restricción proteínica afectó a la madre al día 19 de la gestación y ha órganos como el hígado ya que éste mostró ser más pequeño, contener menos cantidad de grasa y también menor actividad la enzima málica.

Sabemos que la actividad enzimática está regulada por la expresión de genes, donde la enzima málica no es la excepción, aunque nosotros no cuantificamos dicha expresión coincidimos con otros trabajos en donde la disminución de la actividad de la enzima málica en el hígado durante el último periodo de la gestación es menor^{69,70,71,72}, resultado de que la deficiencia proteínica ocasiona alteraciones puntuales.

Encontramos que la actividad de la enzima málica está relacionada directamente con la cantidad de grasa formada en el hígado o bien con la movilización de grasa destinada para el feto, esto nos lleva a suponer que las madres restringidas forman menos cantidad de grasa para poder compensar el crecimiento fetal con respecto a las madres control que fueron las que tuvieron mayor cantidad de grasa. Sin embargo los resultados con respecto a los fetos se discutirán a continuación.

Características de las crías al nacimiento.

Si bien es cierto, que el desarrollo del feto tiene determinantes genéticos, el crecimiento fetal muestra fuerte relación con una amplia variedad de factores epigenéticos dependientes del estado nutricional. Lo anterior encuentra apoyo en diversas investigaciones con modelos animales en donde la dieta materna durante la gestación provoca efecto sobre el peso al nacimiento de las crías^{73,10}.

Por estas razones se ha establecido que una forma de evaluar cómo se desarrolló el individuo durante la gestación, es considerar la nutrición materna durante el embarazo y el peso al nacimiento del individuo.

Sin embargo en nuestros resultados nosotros observamos que no se muestran efectos significativos, en el peso del feto por el déficit de proteína, lo cual podría sugerir que desde la adaptación, el organismo materno realizó ajustes en su metabolismo y contrarrestó el efecto de la restricción de la proteína. Esto coincide con otros trabajos donde han utilizado una dieta con 7,5% de caseína y no observaron efecto en el peso de los fetos, sugiriendo que el feto está protegido contra la mal nutrición⁵⁸ probablemente por los mecanismos de defensa que el feto también puede adoptar ante situaciones adversas, en este caso la restricción que sufre en el útero.

La razón por la cual decidimos obtener el peso del hígado y cerebro de las crías, es porque se sabe que ante la restricción proteínica el feto es capaz de sacrificar órganos abdominales como el hígado con tal de salvar o compensar el crecimiento del cerebro, sin embargo nuestros resultados nos dicen que el peso del hígado no fue significativamente diferente entre el grupo control y el grupo restringido, la misma tendencia se encontró en el cerebro, por lo que sugerimos que tanto el feto hizo uso de su mecanismo de adaptación para compensar la restricción como la madre, ya que a pesar de estar restringida durante la gestación pudo proveer al feto de nutrientes que pudieran asegurar su desarrollo y crecimiento^{74,75}.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante este trabajo sugieren que la madre ante la restricción proteínica fue capaz de adaptar su organismo para brindar a su descendencia los nutrientes que requerían para su crecimiento a pesar de que esto conllevó a una disminución en el tamaño y cantidad de grasa en el hígado.

La restricción proteínica durante el periodo de la gestación disminuyó la formación de ácidos grasos en el hígado materno, afectando de forma negativa una enzima que, aunque no es limitante, está relacionada en el proceso de lipogénesis: la enzima málica.

El impacto de la restricción proteínica durante el embarazo impactó de forma crucial a la madre ya que su organismo decidió sacrificar sus propias reservas energéticas y corporales, parte reflejado en la cantidad de grasa acumulada en el hígado con tal de poder compensar las grandes demandas requeridas durante la gestación.

Ante la deficiencia proteínica, la madre fue capaz de proveer los sustratos necesarios para el desarrollo de sus crías lo cual se vió reflejado en el peso corporal, peso del hígado y cerebro de las mismas, que aunque fueron menores con respecto al grupo control no alcanzó una diferencia significativa.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Zambrano, E., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Guzman, C., Garcia-Becerra, R., *et al.*, A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 2005, 563, 275-284.
- [2] Zambrano, E., Martinez-Samayoa, P. M., Bautista, C. J., Deas, M., *et al.*, Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005, 566, 225-236.
- [3] Zambrano, E., Bautista, C. J., Deas, M., Martinez-Samayoa, P. M., *et al.*, A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* 2006, 571, 221-230.
- [4] Guzman, C., Cabrera, R., Cardenas, M., Larrea, F., *et al.*, Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* 2006, 572, 97-108.
- [5] Bautista, C. J., Boeck, L., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., Zambrano, E., Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res* 2008, 63, 358-363.
- [6] Flanagan, D. E., Moore, V. M., Godsland, I. F., Cockington, R. A., *et al.*, Fetal growth and the physiological control of glucose tolerance in adults: a minimal model analysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000, 278, E700-706.
- [7] Phillips, D. I., Birth weight and the future development of diabetes. A review of the evidence. *Diabetes Care* 1998, 21 Suppl 2, B150-155.
- [8] Ravelli, A. C., van der Meulen, J. H., Michels, R. P., Osmond, C., *et al.*, Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998, 351, 173-177.
- [9] Hales, C. N., Desai, M., Ozanne, S. E., The Thrifty Phenotype hypothesis: how does it look after 5 years? *Diabet Med* 1997, 14, 189-195.
- [10] Ozanne, S. E., Hales, C. N., The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc* 1999, 58, 615-619.
- [11] Claeysens, S., Lavoinne, A., Vaillant, C., Rakotomanga, J. A., *et al.*, Metabolic changes during early starvation in rats fed a low-protein diet in the postweaning growth period. *Metabolism* 1992, 41, 722-727.

- [12] Hales, C. N., Desai, M., Ozanne, S. E., Crowther, N. J., Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans* 1996, 24, 341-350.
- [13] Tortora GJ , Grabowski, S., *Principios de Anatomía y Fisiología*, Ed.Panamericana, México, 2002, pp. 1033-1045.
- [14] Smolin L, Grosuenor, M., *Nutrition Science and Applications*, Ed.Saunders College Publishing, United States of America, 1994, pp. 37-41.
- [15] Guyton , A., Hall , J., *Tratado de Fisiología Médica*, Ed Mc Graw Hill, México, 2001, pp. 943-952.
- [16] Botella, L., *Endocrinología de la mujer*, Ed.Científico-Médica, España,1976, pp. 365-385.
- [17] Rosso P, Mardones , F., *Obstetricia*, Ed.Pérez Sánchez Editores, Chile,1999, pp. 233-244.
- [18] Osorio, J. H., Embarazo y metabolismo de las proteínas. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2000, 50, 127-132.
- [19] Catalano, P. M., A. J. Thomas, et al., Effect of maternal metabolism on fetal growth and body composition. *Diabetes Care* 1998, 21 B85-90.
- [20] Naismith, D. J., The foetus as a parasite. *Proc Nutr Soc* 1969, 28, 25-31.
- [21] Naismith, D. J., Morgan, B. L., The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. *Br J Nutr* 1976, 36, 563-566.
- [22] Bacon, W. E., Stanley, W. C., Effect of deprivation level in puppies on performance maintained by a passive person reinforcer. *J Comp Physiol Psychol* 1963, 56, 783-785.
- [23] Higashida H, Yushiko, B., *Ciencias de la salud*, Ed.Mc Graw Hill, México, 2001, pp. 330-331.
- [24] Atalah E, C Castillo, R Castro, Aldea, P., Propuesta de un Nuevo Estándar De Evaluación Nutricional en Embarazadas. *Rev Med* 1997, 125, 1429-1436.
- [25] Escott, S., *Nutrición, diagnóstico y tratamiento*, Ed.Mc Graw-Hill, México, 2005, pp. 605-618.
- [26] Battaglia, F. C., Meschia, G., Foetal and placental metabolisms: their interrelationship and impact upon maternal metabolism. *Proc Nutr Soc* 1981, 40, 99-113.

- [27] Mehta, S. H., Nutrition and pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2008, 51, 409-418.
- [28] Beal, V., *Embarazo.*, Ed.Limusa, México, 1994, pp. 135-193.
- [29] Naismith, D. J., The requirement for protein, and the utilization of protein and calcium during pregnancy. *Metabolism* 1966, 15, 582-595.
- [30] Barker, D. J., The malnourished baby and infant. *Br Med Bull* 2001, 60, 69-88.
- [31] Nathanielsz, P., *Tiempo para nacer*, Ed.Galaxia-Gutenberg, España, 1995, pp. 311-320.
- [32] Petry, C. J., Ozanne, S. E., Hales, C. N., Programming of intermediary metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2001, 185, 81-91.
- [33] Nathanielsz, P., *Life in the womb*, Ed.Promethean Press, Unites States of America, 1999, pp. 155-159.
- [34] Barker , D., *Mothers, Babies and health in Later life*, Ed.Churchill Livingstone, London, 1998, pp. 220-252.
- [35] Gluckman, P. D., Editorial: nutrition, glucocorticoids, birth size, and adult disease. *Endocrinology* 2001, 142, 1689-1691.
- [36] Osorio, J., Metabolismo de los lípidos durante el embarazo. *Rev Colomb Obstet y Ginecol* 2000, 51, 169-174.
- [37] Innis, S. M., Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 2005, 26 Suppl A, S70-75.
- [38] Herrera, E., *Bioquímica perinatal*, Ed Fundación Ramón Areces, España, 1986, pp. 9-28.
- [39] Philip, K., Rosenberg, L., *Disease of metabolism*, Ed.Saunders College Publishing United States of America, 1974, pp.191-232.
- [40] Kaplan, A., Pesce, A., *Clinical Chemistry*, Ed.Mosby, United Satates of America, 1996, pp.9-28.
- [41] Nelson, D., Cox , M., *Lehninger Principios de Bioquímica*, Ed.Omega, España, 2001, pp. 363-381.
- [42] Strayer, L., Berg , J., Tymoczko, J., *Bioquímica*, Ed Reverté, México, 1995, pp. 603-605.
- [43] Mc Murry , J., *Química orgánica*, Ed Internacional Thompson, México, 2001, pp. 1118-1119.

- [44] Voet , D., Voet , J., *Bioquímica*, Ed Omega, España, 1990, 518-525,612.
- [45] Campbell , B., Hytten, F., *Clinical physiology in obstetrics*, Ed.Blackwill Science, United States of America, 1998, pp. 168-170.
- [46] Herrera, E., Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review. *Placenta* 2002, 23 Suppl A, S9-19.
- [47] Daum, G., Vance, J. E., Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* 1997, 36, 103-130.
- [48] Hamilton, J. A., Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* 1998, 39, 467-481.
- [49] Persson, B., Hansson, U., Hypoglycaemia in pregnancy. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1993, 7, 731-739.
- [50] Martinez, M., Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 1992, 120, S129-138.
- [51] Herrera, E., Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 2002, 19, 43-55.
- [52] Herrera, E., Amusquivar, E., Lopez-Soldado, I., Ortega, H., Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 2006, 65 Suppl 3, 59-64.
- [53] Martínez , I., Billezca, P., La alimentación en México: estudio a partir de la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los hogares. 2003, 21, 28-32.
- [54] Houssay , B., *Fisiología humana*, Ed El Ateneo, México, 1980, 504.
- [55] Anderson, C., Cockayne, S., *Química Clínica*, Ed. Mc Graw Hill, México, 1995, 171-174.
- [56] Garland, D., Ahokas, R., Preston , V., Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on maternal weight gain and fetal birth weight in the rat. *J.Nutr* 1980, 110, 883-890.
- [57] Zartarian, G. N., Galler, J. R., Munro, H. N., Marginal protein deficiency in pregnant rats. I. Changes in maternal body composition. *J Nutr* 1980, 110, 1291-1297.
- [58] Danfaer, A., Tetens, V., Agergaard, N., Review and an experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1995, 111, 201-210.

- [59] Catalano, P. M., Tyzbir, E. D., Roman, N. M., Amini, S. B., Sims, E. A., Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1991, *165*, 1667-1672.
- [60] Wallace, J. M., Da Silva, P., Aitken, R. P., Cruickshank, M. A., Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescent sheep. *J Endocrinol* 1997, *155*, 359-368.
- [61] Wallace, J. M., Bourke, D. A., Aitken, R. P., Cruickshank, M. A., Switching maternal dietary intake at the end of the first trimester has profound effects on placental development and fetal growth in adolescent ewes carrying singleton fetuses. *Biol Reprod* 1999, *61*, 101-110.
- [62] Herrera, E., Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr* 2000, *54 Suppl 1*, S47-51.
- [63] Salameh, W. A., Mastrogiannis, D. S., Maternal hyperlipidemia in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1994, *37*, 66-77.
- [64] Herrera, E., Lasuncion, M. A., Palacin, M., Zorzano, A., Bonet, B., Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* 1991, *40 Suppl 2*, 83-88.
- [65] Souders, H. J., Morgan, A. F., Weight and composition of organs during the reproductive cycle in the rat. *Am J Physiol* 1957, *191*, 1-7.
- [66] Lederman, S. A., Rosso, P., Effects of food restriction on fetal and placental growth and maternal body composition. *Growth* 1980, *44*, 77-88.
- [67] Millican, P. E., Vernon, R. G., Pain, V. M., Protein metabolism in the mouse during pregnancy and lactation. *Biochem J* 1987, *248*, 251-257.
- [68] Wasfi, I., Weinstein, I., Heimberg, M., Hepatic metabolism of [1-14C]oleate in pregnancy. *Biochim Biophys Acta* 1980, *619*, 471-481.
- [69] Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M., Mangelsdorf, D. J., Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001, *294*, 1866-1870.
- [70] Baxter, J. D., Webb, P., Grover, G., Scanlan, T. S., Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight. *Trends Endocrinol Metab* 2004, *15*, 154-157.
- [71] Mangelsdorf, D. J., Evans, R. M., The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995, *83*, 841-850.
- [72] Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., *et al.*, The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995, *83*, 835-839.

[73] Godfrey, K. M., Barker, D. J., Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000, 71, 1344S-1352S.

[74] Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., *et al.*, A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998, 392, 398-401.

[75] Moor, V., Davies, M., Early life influences on later health: the role of nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 2001, 10, 113-117.