



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MICRONUTRIMENTOS Y OMEGA 3 (n-3) LC PUFA SOBRE EL CRECIMIENTO, PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y EXPRESIÓN GÉNICA DE LA PROGENIE DE RATAS WISTAR SOMETIDAS A UNA RESTRICCIÓN DIETARIA DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTANCIA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

JÉSICA FABIOLA RELLO RIVERA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: M. En C. Lucía Cornejo Barrera

VOCAL: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

SECRETARIO: Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

1er. SUPLENTE: Dr. Euclides Ávila Cávez

2do. SUPLENTE: M. en C. María de los Ángeles Granados Silvestre

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento De Biología, Edificio F, Laboratorio 202, Facultad De Química, Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

ASESOR TÉCNICO:

M. en C. María de los Ángeles Granados Silvestre

SUSTENTANTE

Jésica Fabiola Rello Rivera

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo proporcionado a través del PAIP 5000-9110, F.Q. de la Dra. Marta Menjívar, para la realización de este proyecto.

Índice

Página

Índice de Tablas

Índice de Gráficos

Índice de Figuras

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|---|-----------|
| 1.RESUMEN | 11 |
| 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO | 13 |
| 2.1 Desnutrición | 13 |
| 2.1.1 Definición | 13 |
| 2.1.2 Clasificación | 14 |
| 2.1.3 Diagnóstico | 17 |
| 2.1.4 Epidemiología | 19 |
| 2.2 Programación en el desarrollo fetal y sus efectos sobre la progenie | 21 |
| 2.2.1 Nutrición Materna durante el embarazo y la lactancia | 21 |
| 2.2.2 Programación fetal | 25 |
| 2.2.3 Efecto transgeneracional de la restricción dietaria | 28 |
| 2.3 Genes relacionados con el metabolismo energético | 31 |
| 2.3.1 AMPK | 32 |
| 2.3.2 mTOR | 34 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 36 |
| 4. HIPÓTESIS | 37 |
| 5. OBJETIVOS | 37 |
| 6. METODOLOGÍA | 38 |
| 6.1 Grupos de Estudio | 38 |
| 6.2 Diseño de la dieta | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 6.3 | Diseño del suplemento | 39 |
| 6.4 | Eutanasia de madres y crías | 40 |
| 6.5 | Análisis de composición corporal y densitometría ósea | 40 |
| 6.6 | Pesado de órganos | 41 |
| 6.7 | Parámetros bioquímicos, hormonales y capacidad antioxidante | 41 |
| 6.8 | Extracción de RNA | 42 |
| 6.9 | qPCR | 42 |
| 6.10 | Análisis Estadístico | 43 |
| 7. | RESULTADOS | 45 |
| 7.1 | Ratas madres | 45 |
| 7.1.1 | Peso | 45 |
| 7.1.2 | Análisis Bioquímico | 46 |
| 7.2 | Progenie | 47 |
| 7.2.1 | Peso | 47 |
| 7.2.2 | Composición Corporal | 50 |
| 7.2.3 | Talla | 51 |
| 7.2.4 | Órganos | 52 |
| 7.2.5 | Análisis bioquímico | 53 |
| 7.2.6 | Expresión génica | 54 |
| 8. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 56 |
| 8.1 | Efecto de la suplementación durante la gestación y la lactancia en ratas | 56 |
| 8.2 | Efecto suplementación de la progenie en el día 28 postnatal | 59 |
| 9. | CONCLUSIONES | 64 |
| 10. | PERSPECTIVAS | 65 |
| 11. | ANEXOS | 66 |
| 12. | REFERENCIAS | 70 |

Índice de Tablas

| # | Tema | Página |
|----|--|--------|
| 1 | Sistema de clasificación del estado de nutrición infantil de acuerdo a la OMS. | 16 |
| 2 | Comparación de los métodos para el diagnóstico de un estado de desnutrición en adultos. | 18 |
| 3 | Técnicas de valoración de la composición corporal. | 19 |
| 4 | Proteínas blanco de AMPK en hígado. | 34 |
| 5 | Alimentación de las ratas durante los periodos de gestación y lactancia de acuerdo al grupo de dieta asignado. | 39 |
| 6 | Formulación utilizada para la suplementación de ratas en gestación y lactancia. | 40 |
| 7 | Pruebas bioquímicas en el día 21 de lactancia en ratas Wistar sometidas a diferentes dietas. | 46 |
| 8 | Composición corporal al día 28 postnatal de las crías macho y hembra provenientes de madres sometidas a diferentes dietas. | 50 |
| 9 | Porcentaje del peso de los órganos al día 28 postnatal de las crías hembra provenientes de madres sometidas a diferentes dietas. | 52 |
| 10 | Porcentaje del peso de los órganos al día 28 postnatal de las crías macho provenientes de madres sometidas a diferentes dietas. | 52 |
| 11 | Pruebas bioquímicas en el día 28 postnatal de las crías macho provenientes de madres sometidas a diferentes dietas. | 53 |
| 12 | Pruebas bioquímicas en el día 28 postnatal de las crías hembra provenientes de madres sometidas a diferentes dietas. | 54 |
| 13 | Estudios relacionados con la restricción dietaria durante la gestación y/o lactancia en modelos animales. | 68 |
| 14 | Pérdida o ganancia de peso corporal (%) de crías macho en el día 28 postnatal comparada con el grupo control C. | 69 |
| 15 | Efecto de la dieta sobre el peso de los órganos. | 69 |

Índice de Gráficos

| # | Tema | Página |
|----|---|--------|
| 1 | Curva de crecimiento de Ratas Wistar sometidas a diversas dietas durante la gestación y lactancia. | 45 |
| 2 | Curva de crecimiento en peso hasta el día 28 postnatal de las crías hembra provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 48 |
| 3 | Curva de crecimiento en peso hasta el día 28 postnatal de las crías macho provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 48 |
| 4 | Peso de las crías hembra en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 49 |
| 5 | Peso de las crías macho en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 49 |
| 6 | Talla de las crías hembra en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 51 |
| 7 | Talla de las crías macho en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 51 |
| 8 | Expresión génica de AMPK en hígado de las crías hembra en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 55 |
| 9 | Expresión génica de AMPK en hígado de las crías macho en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 55 |
| 10 | Expresión génica de mTOR en hígado de las crías hembra en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 55 |
| 11 | Expresión génica de mTOR en hígado de las crías macho en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas. | 55 |

Índice de Figuras

| # | Tema | Página |
|-----------|--|-----------|
| 1 | Alteraciones metabólicas, antropométricas y fisiológicas a lo largo del tiempo en un estado de desnutrición. | 14 |
| 2 | Evaluación del desarrollo de un niño a partir del sistema de puntuación Z de peso para la edad en niños de 6 meses a 2 años de edad. | 16 |
| 3 | Vías de señalización celular de AMPK y mTOR en respuesta al estado de los nutrimentos. | 31 |
| 4 | Mecanismo de regulación de AMPK. | 32 |
| 5 | Dieta de ratas durante los periodos de gestación y lactancia. | 39 |
| 6 | Esquema general del trabajo experimental. | 44 |
| 7 | A) Frotis vaginal en rata, B) Presencia de esperamas en prueba positiva de rata preñada. | 66 |
| 8 | Análisis de densidad ósea y composición corporal en crías. | 66 |
| 9 | Cuantificación de Insulina por método espectrofotométrico. | 67 |
| 10 | Proceso de Extracción de RNA | 67 |
| 11 | Cuantificación de la expresión génica por qPCR. | 68 |

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| C | Dieta Control |
| C+S | Dieta control con suplementación |
| 50%R | Restricción dietaria al 50% |
| 50%R+S | Restricción dietaria al 50% con suplementación |
| ACC | Acetil-CoA Carboxilasa |
| AMP | Adenosín Monofosfato |
| AMPK | AMP- activated protein kinase |
| ATP | Adenosín Trifosfato |
| CAMKK2 | Cinasa dependiente de Ca ²⁺ |
| cDNA | Ácido Desoxirribonucleico complementario |
| ChREBP | Proteína de unión al elementos de unión a hidratos de carbon |
| CMO | Contenido de Masa ósea |
| CONEVAL | Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social |
| CPT1 | Carnitina Palmitoiltransferasa 1 |
| CT | Cycle Threshold |
| DHA | Ácido Docosaheptaenoico |
| DMO | Densidad de Masa ósea |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DTN | Defectos del Tubo Neural |
| DXA | Dual-energy X-ray absorptiometry |
| D₂O | Óxido de deuterio |
| eEf2 | Factor de elongación-2 |

| | |
|---------------------------------|--|
| ENSANUT | Encuesta Nacional de Salud y Nutrición |
| FAS | Sintasa de Ácidos Grasos |
| GPAT | Glicerol Fosfato Acetiltransferasa |
| HMGCoAr | β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A reductasa |
| HIF-1α | Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia |
| HOMA-IR | Modelo Homeostático para evaluar la Resistencia a la Insulina |
| hPRT | Hipoxantina fosforribosil transferasa |
| IMC | Índice de Masa Corporal |
| IDR | Ingesta Diaria Recomendada |
| IMGL | Índice de Masa Libre de Grasa |
| LC-PUFA | Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids |
| LKB1 | Cinasa hepática B1 |
| MCD | malonil-CoA descarboxilasa |
| mRNA | Ácido Ribonucleico mensajero |
| mTOR | mammalian Target of Rapamycin |
| NcOR1 | Correpresor 1 De Receptor Nuclear |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PEPCK | Fosfoenolpiruvato carboxicinasa |
| PFK-2/FBPase-2 | Enzima Bifuncional Fosofructoquinasa 2 / Fructosa-Bisfosfatasa 2 |
| PGC-1α | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha |
| PI(3)K/Akt | Vía Fosfatidilinositol 3 Cinasa |
| PPAR-α | Peroxisome Proliferator-Activated Receptors |
| qPCR | Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR |
| RNA | Ácido Ribonucleico |

| | |
|-------------------------------------|--|
| Ser | Serina |
| SREBP-1c | Proteína de union a los elementos de respuesta a esteroides |
| S6K | Proteína Ribosomal S6 Cinasa |
| Thr | Treonina |
| TSC2 | Tuberina |
| $\Delta\Delta CT$ | Método Delta Delta CT empleado para la evaluación de la expresión génica relativa en una muestra problema. |

| | |
|-----------------------------|-------------------|
| g | gramo |
| μg | microgramo |
| N | número de camadas |
| mg | miligramo |
| DL | decilitro |
| U | unidades |
| l | litro |
| ng | nanogramo |
| mL | mililitro |
| μmol | micromol |
| Eq | equivalentes |

1. RESUMEN

En la actualidad México enfrenta una transición epidemiológica (ENSANUT, 2012), en la que convergen simultáneamente la desnutrición, el sobrepeso y la obesidad. La situación nutricional actual es fruto de la deficiente alimentación que ha prevalecido por muchas generaciones en nuestro país. La desnutrición crónica afecta a 1.5 millones de niños menores de cinco años y de acuerdo con la ENSANUT 2012, en todo México 2.8% de los menores de cinco años de edad presentan bajo peso, 13.6% muestran baja talla y 1.6% desnutrición aguda (emaciación). Las consecuencias de la desnutrición son anemia, un aumento en alergias, una disminución en las capacidades de aprendizaje y a largo plazo mayor susceptibilidad a padecer enfermedades metabólicas.

Las causas inmediatas de la desnutrición son la inadecuada ingesta alimentaria y las enfermedades, las cuales están determinadas por factores tales como insuficientes servicios de salud o ambientes no saludables, acceso limitado a los alimentos en el hogar y cuidados deficientes de los niños y sus madres. En general, estos factores se encuentran relacionados con la inequidad en la distribución de los recursos en la sociedad.

En este estudio se diseñó y se analizó el efecto de una suplementación, basada en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (n-3) LC-PUFA, ácido fólico, zinc, hierro y selenio sobre la progenie de ratas Wistar en restricción dietaria al 50%, que representa un estado de desnutrición crónico como el que viven las personas de bajos recursos.

Para ello se evaluó el efecto de la suplementación en el día 28 postnatal en la progenie de ratas Wistar comparando a los cuatro diferentes grupos estudiados: Dieta Control (C, N=4), Dieta Control con Suplementación (C+S, N=4), Restricción dietaria al 50% (50%R, N=4) y Restricción dietaria al 50%R con Suplementación (50%R+S, N=4). En el día 28 postnatal de las crías se pesaron los órganos, se midió la concentración de glucosa, colesterol, triglicéridos, proteínas totales,

albúmina, insulina y capacidad antioxidante, y se cuantificó la expresión de AMPK y mTOR en hígado y músculo.

En el día 21 de lactancia, las madres sometidas a una dieta de restricción y que fueron suplementadas, tuvieron una menor concentración de insulina y una mayor capacidad antioxidante que evita la respuesta inflamatoria en el organismo como consecuencia del estrés oxidativo y que permitió que la concentración de albúmina se mantuviera elevada a pesar del estado de desnutrición.

Por otro lado, los efectos de la suplementación sobre las crías del grupo 50%R+S en el día 28 postnatal fueron una menor concentración de insulina y una menor expresión de mTOR en el hígado, esto último, sugiere una priorización de vías catabólicas para la generación de energía. Estos primeros resultados podrían ser clave para la disminución de la probabilidad del desarrollo de enfermedades crónicas metabólicas en la vida adulta como consecuencia de la programación fetal derivado de la desnutrición de la madre.

El diseño del suplemento propuesto en este trabajo es un primer acercamiento ante una posible solución de bajo costo y fácil acceso para las mujeres en situación de vulnerabilidad, durante el embarazo y la lactancia, para reducir el mayor número de efectos negativos sobre la prole, desarrollados en un ambiente intrauterino carente nutricionalmente.

2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 Desnutrición

2.1.1 Definición

La desnutrición se define como una situación de desbalance entre el aporte de energía y/o nutrimentos y los requerimientos metabólicos del organismo para asegurar su crecimiento, mantenimiento y funcionamiento (de Onis & Blössner, 2003). Cuando un individuo se encuentra en estado de desnutrición, sus capacidades fisiológicas como el crecimiento, la recuperación de una enfermedad, el aprendizaje, el trabajo físico, el embarazo y lactancia en mujeres, entre otras, ya no se pueden mantener (UNICEF, 2006). Lo anterior se traduce en la alteración progresiva de las diversas funciones a nivel celular. Esto comienza afectando el depósito de nutrimentos y posteriormente la reproducción, el crecimiento, la capacidad de respuesta al estrés, el metabolismo energético y los mecanismos de comunicación y regulación intra e intercelular (Calzada, 1998).

Bajo condiciones normales de nutrición, la glucosa, un monosacárido proveniente de los hidratos de carbono presentes en la dieta, es degradada a la molécula energética de ATP para realizar las funciones celulares del organismo. Durante las primeras horas de una restricción dietaria en un individuo, la energía es producida por el metabolismo a partir del glucógeno almacenado en el hígado. Cuando estas reservas se han agotado, la oxidación de lípidos otorga energía a los tejidos vitales (cerebro y corazón). Una vez que el tejido adiposo se ha sacrificado para mantener la energía, el siguiente proceso de producción energética es a través de las reservas proteínicas. La alanina es un aminoácido que circula libremente; no obstante, una vez que se ha utilizado por completo, ahora este debe ser obtenido del músculo estriado por reacciones de catabolismo para su liberación. Durante este proceso la masa muscular disminuye y los niveles de urea (secundarios a la liberación de otros aminoácidos) incrementan hasta que se agota por completo la reserva corporal de aminoácidos (Emery, 2005). Para este momento, el individuo también ha manifestado cambios antropométricos como la pérdida inicial de peso

y estancamiento de la talla (en el caso de los niños). Con lo que respecta a las alteraciones fisiológicas, hay pérdida de la capacidad de lenguaje, capacidad motora y finalmente funcional, a expensas de la falla cardiaca y neurológica, que conllevan finalmente a la muerte (Márquez-González et al., 2012) (ver Figura 1).

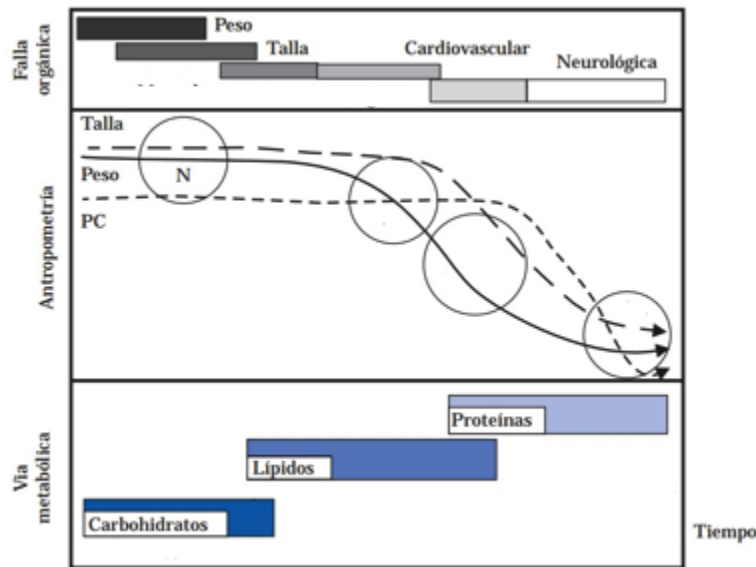


Figura 1 Alteraciones metabólicas, antropométricas y fisiológicas a lo largo del tiempo en un estado de desnutrición. Modificado de (Márquez-González et al., 2012)

2.1.2 Clasificación

En la actualidad existen diversas clasificaciones que permiten describir el grado de desnutrición que presenta un individuo. Es común encontrar que la mayoría de ellas han sido diseñadas para designar el estado nutricional en las etapas tempranas de la vida, como la infancia. Esto se debe a que la identificación de la desnutrición durante este periodo es crítico para el desarrollo humano, al producir consecuencias graves a largo plazo y en algunos casos, de forma permanente.

El Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) clasifica a la desnutrición de la siguiente manera:

- a) *Desnutrición aguda*: Se presenta cuando hay una deficiencia de peso respecto a la talla (P/T), conocida como emaciación. Se observa como una delgadez extrema que resulta de una pérdida de peso asociada con

periodos recientes de hambruna o enfermedad, que se desarrolla muy rápidamente y es limitada en el tiempo.

- b) *Desnutrición crónica*: Se presenta cuando la talla es baja respecto a la edad (T/E), conocido como desmedro. Se asocia normalmente a situaciones de pobreza, con consecuencias para el aprendizaje y desempeño.
- c) *Desnutrición global*: Se presenta como una deficiencia de peso respecto a la edad, conocida como insuficiencia ponderal. El índice está compuesto de los anteriores ($P/T \times T/E = P/E$).

Sin embargo, la OMS ha establecido un sistema de clasificación que utiliza curvas de crecimiento. En ellas se evalúa el desarrollo del niño, considerando los siguientes indicadores en conjunto:

- longitud ó talla para la edad
- peso para la edad
- peso para la longitud ó talla
- IMC (índice de masa corporal) para la edad

La desnutrición puede clasificarse por este método, al comparar la talla o peso a una edad y sexo específicos contra la distribución de peso o talla de una población de referencia sana de la misma edad y sexo. Dentro de la distribución de la población de referencia, se obtiene la mediana y se calculan las puntuaciones Z; éstas últimas se definen como la diferencia en el peso o talla de un niño con la mediana a esa edad y sexo de la población de referencia dividida entre la desviación estándar de la población de referencia (Caulfield, 2006) (ver Tabla 1). Por lo tanto, la desnutrición en niños puede clasificarse de la siguiente manera:

- a) *Desnutrición moderada*: Se presenta cuando el peso para la edad se encuentra entre 2 y 3 puntuaciones Z por debajo de la mediana (rango normal) de los patrones de crecimiento infantil (ver Tabla 1).
- b) *Desnutrición grave*: Se presenta cuando el peso es muy bajo para la talla por lo que se encuentra inferior a -3 puntuaciones Z de la mediana (rango normal) (ver Tabla 1).

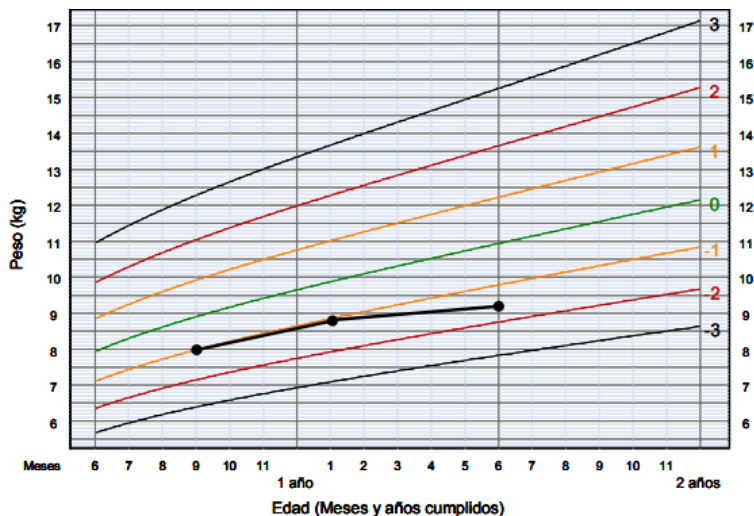


Figura 2 Evaluación del desarrollo de un niño a partir del sistema de puntuación Z de peso para la edad en niños de 6 meses a 2 años de edad.

Tabla 1. Sistema de clasificación del estado de nutrición infantil de acuerdo a la OMS.

| Puntuaciones Z | Indicadores de crecimiento | | | |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------|--|--|
| | Longitud ó talla para la edad | Peso para la edad | Peso para la longitud ó talla | IMC para la edad |
| Por encima de 3 | ver Nota 1 | ver Nota 2 | Obeso | Obeso |
| Por encima de 2 | | | Sobrepeso | Sobrepeso |
| Por encima de 1 | | | Posible riesgo de sobrepeso (ver Nota 3) | Posible riesgo de sobrepeso (ver Nota 3) |
| 0 (mediana) | | | | |
| Por debajo de -1 | | | | |
| Por debajo de -2 | Baja talla (ver Nota 4) | Bajo peso | Emaciado | Emaciado |
| Por debajo de -3 | Baja talla severa (ver Nota 4) | Bajo peso severo | Severamente Emaciado | Severamente Emaciado |

*Los espacios sombreados se encuentran en el rango normal.

Notas:

1. Un niño en este rango es muy alto. Una estatura alta en raras ocasiones es un problema, a menos que sea un caso extremo que indique la presencia de desórdenes endócrinos como un tumor productor de hormona de crecimiento.

2. Un niño cuyo peso para la edad cae en este rango, puede tener un problema de crecimiento, pero esto puede evaluarse mejor con peso para la longitud/talla o IMC para la edad.
3. Un punto marcado por encima de 1 muestra un posible riesgo. Una tendencia hacia la línea de puntuación Z 2 muestra un riesgo definitivo.
4. Es posible que un niño con baja talla o baja talla severa desarrolle sobrepeso.

(OMS, 2009)

2.1.3 Diagnóstico

El estado nutricional de un individuo puede ser evaluado mediante el uso de uno o más de los siguientes métodos directos:

- *Evaluación dietética*: emplea un diario de alimentación y/o entrevista para conocer la cantidad de alimentos consumidos habitualmente (Zacarías, 2007).
- *Evaluación antropométrica*: emplea la medición de las dimensiones físicas. Las mediciones antropométricas que se han validado para el estudio del estado nutricional son: peso, talla o estatura, perímetro cefálico, circunferencia de la parte media del brazo, grosor de los pliegues cutáneos tricótipal, bicótipal, subescapular y suprailíaco. Si se cuenta con los datos de peso, edad, sexo y talla se puede conocer el estado de nutrición en los niños por medio del uso de indicadores como el de peso para la talla P/T, talla para la edad T/E y peso para la edad P/E (OMS, 1995). En México se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA2-1993. Control de la Nutrición, crecimiento y Desarrollo del niño y del adolescente, que cuenta con criterios de valoración del estado de nutrición para estas etapas de la vida. Respecto al diagnóstico de la desnutrición en adultos, éste resulta más sencillo al no tener que considerar el crecimiento. Por ello, la OMS sugiere el uso del índice de masa corporal (IMC). Sin embargo, un estudio reciente realizado por la Sociedad Europea de Nutrición Clínica y Metabolismo (ESPEN) sugiere hacer uso de la combinación de los siguientes criterios en una persona adulta (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de los métodos para el diagnóstico de un estado de desnutrición en adultos.

| Método | Índice | Cálculo |
|-----------------------------------|--|--|
| Método de diagnóstico tradicional | Índice de Masa Corporal (IMC) IMC < 18.5 kg/m ² | $IMC = \frac{Peso \left[\frac{kg}{m^2} \right]}{Talla^2}$ |
| Método de diagnóstico ESPEN | Peso Pérdida de peso (no intencional) > 10% durante un periodo indefinido o >5% durante los últimos 3 meses | - |
| | Índice de Masa Corporal (IMC) IMC < 20 kg/m ² si tiene una edad < 70 años IMC < 22 kg/m ² si tiene una edad > 70 años | $IMC = \frac{Peso \left[\frac{kg}{m^2} \right]}{Talla^2}$ |
| | Índice de Masa Libre de Grasa (IMLG) IMLG < 15 kg/m ² en mujeres IMLG < 17 kg/m ² en hombres | $IMLG = \frac{masa\ libre\ de\ grasa}{talla^2}$ |

- *Evaluación de la composición corporal:* emplea métodos que varían en precisión y que son capaces de describir la composición corporal a diversos niveles estructurales: atómico, molecular, celular y los tejidos (ver Tabla 3). Los métodos más utilizados son:
 - i. Métodos indirectos: emplea medidas antropométricas para describir la masa corporal y grado de obesidad. Algunos ejemplos son el Índice de Masa Corporal (IMC), la medición de la circunferencia abdominal, pliegues cutáneos e impedancia bioeléctrica (BIA).
 - ii. Métodos directos: emplea el análisis de la composición corporal a nivel atómico (porcentajes de calcio, sodio, potasio, nitrógeno, etc.). Algunos ejemplos son el Análisis por Activación de Neutrones (AAN), la Dilución Isotópica con D₂O y Conteo Corporal Total.
 - iii. Métodos de referencia: emplea la medición y análisis de una propiedad del cuerpo, como la densidad, o describe la cantidad y distribución de hueso, músculo y tejido adiposo. Algunos ejemplos son la Absorciometría Dual fotónica de rayos X (DXA), Imágenes de Resonancia Magnética (MRI) o tomografía computarizada de rayos X.

(Duren et al., 2008)

Tabla 3. Técnicas de valoración de la composición corporal.

| Grasa y masa libre de grasa | Grasa, masa libre de grasa, agua corporal | Grasa, masa libre de grasa, masa ósea | Agua corporal, grasa, proteína y mineral óseo |
|---|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Antropometría • Metabolitos musculares • Densitometría • Potasio corporal total • Ultrasonido | <ul style="list-style-type: none"> • Dilución isotópica con D₂O • Impedancia bioeléctrica | <ul style="list-style-type: none"> • Absorciometría Dual fotónica de rayos X (DXA) • Tomografía computarizada de Rayos X. • Imágenes de Resonancia Magnética (MRI) | <ul style="list-style-type: none"> • Análisis por Activación de Neutrones (AAN) |

- *Evaluación bioquímica:* emplea el análisis de los niveles del sustrato o metabolito en sangre, su excreción urinaria o las alteraciones en actividades enzimáticas para ofrecer un diagnóstico nutricional. Los indicadores bioquímicos más utilizados para el análisis nutricional son: albúmina, prealbúmina, recuento de linfocitos y neutrófilos, entre otros (Figueroa, 2015).
- *Evaluación clínica:* se basa en el historial clínico, la exploración física y el interrogatorio asociado a las alteraciones en la nutrición. Durante la exploración física para la determinación del estado nutrimental es importante observar el cabello, boca, uñas, ojos, piel, glándula tiroide y crecimiento epifisario del paciente (Cederholm et al., 2017).

2.1.4 Epidemiología

En México 1.5 millones (13.6%) de niños menores de 5 años padecen desnutrición crónica (baja talla para la edad) y es más prevalente en las regiones rurales del sur (ENSANUT 2012) (Gutierrez et al., 2012). En este sentido, de acuerdo a las estimaciones del CONEVAL en 2012, una cuarta parte de la población (23.3%) sufría carencia por acceso a la alimentación debido a que en la mayoría de los

casos la selección de los alimentos se ve condicionada por las circunstancias económicas y el costo de los alimentos. Así mismo, en el año 2014, dio a conocer que hubieron 2 millones más de pobres que en 2012. Si bien, en general se redujeron las carencias por calidad de vivienda, rezago educativo, acceso a servicios de salud y acceso a la seguridad social, la carencia por acceso a la alimentación aumentó: para el 2014 habían en México 600 mil personas más en estado de carencia alimentaria. Sorprendentemente, no sólo son los mexicanos más pobres los que se vieron afectados por carencia alimentaria, sino los hogares de clase media baja. El indicador de carencia alimentaria considera a hogares valorados en los últimos tres meses, condicionados por circunstancias de dinero y recursos que:

- Tuvieron una alimentación basada en muy poca variedad de alimentos.
- Dejaron de desayunar, comer o cenar.
- Comieron menos de lo que piensa debía comer.
- Se quedaron sin comida.
- Sintieron hambre pero no comieron.
- Comieron una vez al día o dejaron de comer todo un día.

Por otro lado, en ese mismo año, el INEGI a través de su Encuesta de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH) encontró que la ingestión promedio diaria de calorías y proteínas por unidad de consumo, en los diferentes grupos de hogares, tiene una relación directa con el ingreso de estos. Es así que en los hogares de menor ingreso, que constituyen el 10% de la población, se cubre sólo el 66% de las calorías y el 60% de las proteínas diarias que se requieren, a pesar de que el 56% de sus ingresos son destinados a la alimentación.

Pese a esto, en la actualidad México enfrenta una transición epidemiológica (ENSANUT, 2012), en la que convergen simultáneamente la desnutrición, el sobrepeso y la obesidad. En el pasado, se pensaba que la obesidad sólo era un problema en poblaciones con ingresos elevados y abundante ingesta de energía, sin embargo, ahora es frecuentemente asociada con países de bajo ingreso per cápita e inseguridad alimentaria que sufren desmedro (Velásquez-Melendez et al.,

2011). La coexistencia entre un bajo peso al nacer/desmedro y la obesidad en poblaciones pobres se ha descrito en estudios realizados en Asia, China, África, y sobretodo, Latinoamérica (Kalhan & Prentice, 2009). La situación nutrimental actual es fruto de la deficiente alimentación que ha prevalecido por muchas generaciones en nuestro país. Un rápido incremento de la prevalencia de sobrepeso y obesidad trajo como consecuencia que nuestro país ocupe el primer lugar a nivel mundial en obesidad infantil, y el segundo en obesidad en adultos, precedido sólo por los Estados Unidos. Datos de la Encuesta Nacional de Nutrición (ENSANUT) 2012 indican que uno de cada tres adolescentes de entre 12 y 19 años presenta sobrepeso u obesidad a nivel nacional. Para los escolares (5 a 11 años), la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad ascendió en un promedio del 34.4%. A largo plazo, la obesidad favorece la aparición de enfermedades tales como diabetes, infartos, altas concentraciones de colesterol o insuficiencia renal, entre otros. A su vez, la diabetes trae como consecuencia la aparición de complicaciones, que representan gastos de inversión muy elevados para el sector salud.

2.2 Programación en el desarrollo fetal y sus efectos sobre la progenie

2.2.1 Nutrición Materna durante el embarazo y la lactancia

El embarazo representa un reto para el organismo. Es un estado dinámico y anabólico en el que se presentan ajustes continuos que afectan el metabolismo de los nutrimentos. Estos ajustes metabólicos, además de los cambios fisiológicos y anatómicos progresivos que sufre la madre, ayudan al crecimiento y desarrollo fetal mientras se mantiene la homeostasis de la madre y la preparan para la lactancia. Los cambios fisiológicos durante las etapas de embarazo y lactancia que se han estudiado hasta ahora son:

- El incremento en el volumen de la sangre y plasma, la masa de las glóbulos rojos, el conteo de glóbulos blancos y la producción de plaquetas durante el embarazo.

- El aumento en el tamaño y peso de los riñones debido al incremento en su vasculatura y el volumen intersticial.
- Las adaptaciones fisiológicas y anatómicas en el sistema respiratorio para asegurar un adecuado suministro de oxígeno al feto.
- El incremento en los niveles de progesterona que provocan una reducción en el tono intestinal y su motilidad. La disminución de la motilidad intestinal permite un incremento en la absorción de nutrimentos.
- El aumento en los requerimientos de energía. En promedio se deben consumir 200 y 500 kcal/día adicionales durante el embarazo y la lactancia, respectivamente. El gasto energético y la preferencia en el uso de hidratos de carbono se incrementa para ayudar al crecimiento fetal y a la síntesis de leche.
- El aumento del almacenamiento de grasa hasta el término del segundo trimestre. Posteriormente disminuye hasta el término de la gestación como resultado de su movilización para colaborar con el rápido crecimiento del feto. Los niveles de lípidos en el plasma de la sangre y las lipoproteínas también aumentan, sin embargo, tras 8 semanas de haber dado a luz, los niveles de triglicéridos regresan a su estado inicial.

(Moya et al., 2014)

La nutrición materna juega un papel crítico en el crecimiento y desarrollo fetal. Los nutrimentos ayudan a mantener la salud de la madre y del feto en desarrollo a lo largo de la gestación a través de procesos de comunicación entre la madre, la placenta y el feto.

Las vitaminas y nutrimentos inorgánicos, se clasifican como micronutrimentos al requerirse en cantidades traza y no aportar energía al organismo. Sin embargo, su actividad metabólica, que incluye la señalización celular, la proliferación, diferenciación y apoptosis que regulan el crecimiento de los tejidos, su función y homeostasis, son fundamentales desde las etapas tempranas porque permiten al feto desarrollarse y madurar en un neonato sano. Por otro lado, los hidratos de carbono, proteínas, lípidos y agua se clasifican como macronutrimentos al

requerirse en grandes cantidades (en un rango de gramos). Éstos proveen de energía al organismo para el crecimiento, la reparación y desarrollo de nuevos tejidos, la dirección de los impulsos nerviosos y la regulación de los procesos de la vida (OMS, 2006).

Los micronutrientes que se consideran de mayor importancia para un normal desarrollo embrionario, fetal y la primera etapa de la vida durante el embarazo y la lactancia son:

- a) *Vitamina B9 (Ácido fólico)*: participa en la biosíntesis de DNA y RNA, la metilación de homocisteína a metionina y el metabolismo de los aminoácidos. Además, se ha visto que disminuye el riesgo a padecer defectos del tubo neural (DTN) y otros defectos congénitos, que se producen durante la embriogénesis temprana, si se administra durante un periodo anterior a la concepción (Procter & Campbell, 2017). Mediante el análisis de estudios epidemiológicos se pudo asociar este defecto con dietas pobres por parte de las madres, por lo que posteriormente se demostró que la ingesta de un suplemento de 400 µg/día de ácido fólico, disminuía la incidencia de DTN en el producto respecto al grupo sin suplemento (Laurence, James, Miller, Tennant, & Campbell, 1981).
- b) *Zinc*: participa en funciones metabólicas que incluyen la síntesis de proteína, división celular y el metabolismo de los ácidos nucleicos (Shils et al., 2006). Estudios en diversos modelos animales asociaron la deficiencia severa de zinc con un aumento en la muerte del feto debido a abortos espontáneos o anomalías congénitas (King, 2000). También se observó que la deficiencia de zinc durante el embarazo provoca efectos a largo plazo en el crecimiento, inmunidad y estado metabólico de la progenie. Por otro lado, una suplementación de 15 mg/día de zinc durante el embarazo se ha relacionado con un incremento de peso al nacer y una disminución en las complicaciones perinatales (McArdle, Andersen, Jones, & Gambling, 2017).

- c) *Selenio*: participa como cofactor en enzimas antioxidantes, la glutatión peroxidasa, la tiorredoxina reductasa y la selenoproteína-P (Rayman, 2017). Además, se ha visto que el selenio es esencial para la producción de hormonas activas tiroideas y para la función normal de la tiroides (Beckett & Arthur, 2005). Las concentraciones de selenio y de la glutatión peroxidasa caen durante el embarazo por lo que se ha recomendado una ingesta de 60 µg/día (Board, 2002).
- d) *Hierro*: participa en diversos procesos enzimáticos esenciales para la transferencia de oxígeno a los tejidos. La deficiencia de hierro causa anemia, un padecimiento común alrededor de mundo que afecta al 50% de las mujeres en edad fértil en países en vías de desarrollo (Stevens et al., 2013). Su ingesta inadecuada durante el embarazo aunado al incremento en la demanda de éste, expone a las madres a un riesgo mayor de sufrir una deficiencia de hierro. A su vez, esto afecta el crecimiento y desarrollo del feto y puede provocar un parto prematuro y hemorragias post parto en la madre, así como un bajo peso al nacer en el producto (Allen, 2000). Además, de acuerdo a algunos estudios, la ingesta inadecuada de hierro durante el embarazo está asociada con un incremento en la probabilidad de aparición de problemas cardiovasculares de la progenie durante la etapa adulta (Alwan et al., 2015). Por lo anterior, se ha recomendado una ingesta de 27 mg/día de hierro durante el embarazo (Board, 2002).
- e) *Ácido Docosahexaenoico (DHA)*: es un ácido graso poliinsaturado que se encuentra en el cerebro y los bastones de la retina y que por tanto, es esencial para el desarrollo del feto durante el embarazo. El DHA juega un papel importante en el neurodesarrollo psicomotor desde los primeros meses de vida por lo que es suministrado en grandes cantidades a través de la leche materna (no se puede obtener de la leche de vaca) (Innis & Friesen, 2008). Sin embargo, aún y cuando el cuerpo humano cuenta con las enzimas necesarias para la vía de la síntesis de DHA a partir de su precursor metabólico ácido α-linolénico, la cantidad sintetizada se considera insuficiente para mantener los niveles adecuados en los tejidos, ya que es

el ácido graso omega-3 con la cadena de carbono más larga y con mayor grado de insaturaciones. Por lo anterior, se recomienda ingerir 200 mg/día de DHA para un embarazo y lactancia sanos (Board, 2002).

El mantener una ingesta adecuada y balanceada en la alimentación continúa siendo la mejor acción para cubrir con los requerimientos diarios en micronutrientes, sin embargo, en la mayoría de los casos representa un reto por lo difícil o costoso que puede llegar a ser. Una estrategia que ha resultado efectiva ante esta situación ha sido el uso de la suplementación dietaria como medida de prevención ante los problemas congénitos.

La desnutrición durante el embarazo eleva la mortalidad y morbilidad materna e infantil. Si una mujer la padece durante el embarazo, el crecimiento en talla y peso del feto disminuye y se incrementa la probabilidad de que nazca con bajo peso, situación que incrementa el riesgo de morbilidad, mortalidad infantil y desnutrición a lo largo de su vida; y entre mujeres eleva la probabilidad de reproducir el fenómeno en la siguiente generación. Por lo tanto, conocer e invertir para proteger el crecimiento fetal y el de los primeros años de vida no sólo mejora el estado nutricional en niños y madres, sino que es central para la prevención de la mala nutrición durante la vida y en futuras generaciones, e indispensable para el desarrollo del capital humano.

2.2.2 Programación fetal

Recientemente, diversas investigaciones científicas tanto en humanos como en modelos animales, han demostrado que el estado de salud de una persona está íntimamente relacionada con la calidad de vida desde las primeras etapas de la vida (Haugen, Schug, Collman, & Heindel, 2015). El fenotipo de un individuo no está determinado exclusivamente por la información genética que ha heredado de sus padres, sino que además es determinado por la interacción gen-ambiente. Un factor crítico para la supervivencia del feto y su salud es el abastecimiento de nutrientes y oxígeno a través de la madre. La habilidad de la madre para proveer de nutrientes al bebé depende de su estado nutricional, tamaño corporal,

composición corporal y metabolismo, que a su vez ya han sido establecidos a lo largo de su vida. Cualquier anomalía en el ambiente intrauterino puede ser perjudicial para el crecimiento fetal. Un déficit en la cantidad de nutrientes que requiere el feto, como en el caso de la malnutrición materna o un defecto en la función de la placenta, puede provocar la desnutrición en el feto (Haram, Søfteland, & Bukowski, 2013).

La nutrición materna podría actuar como una predicción ante el ambiente nutricional al que se enfrentará el feto después de su nacimiento. El feto responde y se adapta a la predicción utilizando estrategias que maximicen la probabilidad de su supervivencia postnatal. La respuesta inmediata ante la desnutrición es el consumo catabólico de los sustratos que proveen de energía (Wu, Bazer, Cudd, Meininger, & Spencer, 2004). Si la desnutrición se prolonga el feto hará cambios en la velocidad del metabolismo y alterará la producción de hormonas y la sensibilidad de los tejidos hacia ellas. Un ejemplo de ello es cuando una madre presenta una restricción dietaria, las concentraciones de insulina, IGF-1 y glucosa disminuyen en el feto provocando una reducción en la transferencia de aminoácidos y glucosa a través de la placenta, que disminuye la velocidad en su crecimiento (Murphy, Smith, Giles, & Clifton, 2006). Se cree que la programación metabólica ocurre también cuando el feto se prepara de forma anticipada para almacenar nutrientes ante un posible ambiente decadente postnatal (Lakshmy, 2013). La redistribución del flujo sanguíneo en el feto también ocurre para proteger a los órganos clave, en especial el cerebro, a expensas de otros tejidos como el músculo, los riñones y el páncreas. La disminución en el requerimiento de sustratos y la velocidad metabólica disminuyen el crecimiento fetal y originan un bajo peso al nacer en el producto.

A su vez, al ser modificado el crecimiento del feto por un ambiente intrauterino subóptimo, se predispone al individuo al desarrollo de enfermedades crónicas en la vida adulta. David Barker (1986) encontró una asociación entre el bajo peso en el nacimiento, como consecuencia de una restricción dietaria, con el riesgo a padecer hipertensión (D. J. Barker, Bull, Osmond, & Simmonds, 1990) y

enfermedades cardiovasculares (D. J. P. Barker et al., 1993) en el adulto. Estos hallazgos fueron el inicio de varios estudios epidemiológicos encaminados a identificar la relación que existe entre el bajo peso del producto en su nacimiento con otros padecimientos en la etapa adulta como enfermedades renales (Vikse, Irgens, Leivestad, Hallan, & Iversen, 2008), Diabetes Tipo 2 (Harder, Rodekamp, Schellong, Dudenhausen, & Plagemann, 2007), enfermedades cerebrovasculares, obesidad, dislipidemias e intolerancia a la glucosa (Armitage, Khan, Taylor, Nathanielsz, & Poston, 2004).

Este fenómeno podría comprenderse a partir de la hipótesis conocida como *the developmental origins of health and disease (los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad)* (Heindel & Vandenberg, 2015) que explica que la salud está programada desde etapas tempranas del desarrollo como resultado de la experiencia pre y postnatal, afectando profunda e irreversiblemente las características fisiológicas y metabólicas del adulto. Durante el desarrollo fetal, existen periodos críticos donde los órganos son más vulnerables a los retos ambientales como la disminución o abundancia del aporte nutricional y la oxigenación.

Posteriormente, se introdujo la hipótesis del fenotipo ahorrador (Hales & Barker, 2013) en la que se explica que en situaciones de nutrición sub óptima en el útero durante el embarazo, el feto realiza adaptaciones predictivas en estructura, metabolismo y fisiología que le permiten economizar los requerimientos nutrimentales. El feto metabólicamente programado presenta modificaciones permanentes en la estructura y fisiología de órganos, y en la expresión de genes involucrados en su propio metabolismo. Así, el fenotipo del adulto sería la suma de los factores genéticos, la influencia del ambiente fetal y postnatal. Tal es el caso de la asociación entre la mala nutrición de la madre durante el embarazo y la presencia de diabetes tipo 2 de su progeie, que refleja un deterioro en el desarrollo del páncreas endocrino durante períodos críticos del desarrollo temprano del feto al desencadenarse una serie de adaptaciones fisiológicas y

metabólicas que priorizan la entrega de energía a órganos vitales como el cerebro a expensas del desarrollo de los demás órganos (Georgieff, 2007).

Como resultado, el feto sufrirá, por ejemplo, una disminución progresiva de la masa de las células beta, anomalías en la vasculatura y una alteración en la función del páncreas (Portha, Chavey, & Movassat, 2011).

Estos cambios en el desarrollo confieren ventaja para sobrevivir en el caso de que continúe la restricción nutrimental durante la vida postnatal. Sin embargo, el conflicto mayor surge si el alimento es abundante (sobrealimentación energética) después del nacimiento y sobrepasa el rango de adaptación predictiva, ya que la cría con el fenotipo ahorrador puede acumular grasa incrementando la predisposición al desarrollo de obesidad, diabetes, y otras enfermedades metabólicas como resultado de la alteración del metabolismo (Gluckman & Hanson, 2017). Es así como se ha probado, por ejemplo, que aún y cuando se controle el Índice de Masa Corporal (IMC) en las etapas posteriores al nacimiento, el riesgo de padecer Diabetes Tipo 2 será elevado entre los adultos, ya que un desarrollo fetal decadente en nutrientes confiere riesgos mayores a largo plazo por arriba de cualquier otra influencia ambiental durante este periodo (Davey, 2002).

Por ello, los países que presentan un alto índice de casos de bajo peso al nacer en niños, experimentan una transición nutrimental a largo plazo, al ser propensos a la doble carga de desnutrición y sobre nutrición, que representan gastos de inversión muy elevados para el sector salud.

2.2.3 Efecto transgeneracional de la restricción dietaria

Una de las características más significativas de la programación del desarrollo fetal es la evidencia de la herencia transgeneracional como consecuencia de las condiciones adversas que un individuo vivió en el ambiente intrauterino. Un efecto transgeneracional es definido como aquel que persiste por lo menos hasta la generación F2, tras un estímulo en la generación F0 (Pembrey, Saffery, Bygren, & Epidemiology, 2014).

Para obtener el fenotipo transgeneracional es necesaria la exposición directa a la condición negativa durante la vida fetal y/o neonatal, de tal forma que el fenotipo fisiológico de alguna enfermedad puede ser transmitido a través de la línea germinal sin que las generaciones subsecuentes hayan estado directamente en contacto con el factor tóxico o adverso (Heard & Martienssen, 2014).

Los efectos de la programación a través de las generaciones han sido comprobados en diversos estudios con modelos animales. La alimentación de ratas con una dieta restringida en proteína durante la gestación, no sólo provoca un incremento en la presión sanguínea y la disfunción endotelial en la generación F1, sino también en la F2 (Torrens, Poston, & Hanson, 2008). Así mismo, puede conducir a la resistencia a la insulina en adultos machos y hembras de la camada F2 (Pinheiro, Salvucci, Aguila, & Mandarim-de-Lacerda, 2008). Además, existe evidencia que sugiere que el metabolismo de la glucosa en la generación F3 también se ve afectado por el estado de desnutrición en el que se encontraba F0 (Benyshek, Johnston, & Martin, 2006). En ratones, se ha visto que la desnutrición de la madre produce un bajo peso al nacer, intolerancia a la glucosa y obesidad en las generaciones F1 y F2 dependientes del sexo de las crías (Josep C Jimenez-Chillaron et al., 2009).

Los efectos transgeneracionales también se han visto en humanos. Tal es el caso de lo que sucedió antes de la liberación definitiva de Holanda, al término de la Segunda Guerra mundial, cuando el ejército alemán cercó el oeste del país impidiendo el libre tránsito de víveres y combustible durante el periodo conocido como *el invierno hambriento holandés*. En consecuencia, la población civil que habitaba las principales ciudades sufrió hambruna aguda durante ocho meses, desde septiembre de 1944 hasta mayo de 1945. El consumo de calorías disminuyó en más de un 50 por ciento con respecto al usual, y se estima que más de 19 mil personas fallecieron directa o indirectamente a causa de la escasez de alimentos. Años más tarde se observó además que los efectos de la desnutrición se extendieron para los hijos de las mujeres que se encontraban embarazadas durante ese episodio histórico. Entre las consecuencias se encontraron: un bajo

peso al nacer y alteraciones en la tolerancia a la glucosa que los hacía propensos a desarrollar Diabetes Tipo 2 y obesidad en la edad adulta en comparación con aquellos que habían sido gestados después del periodo de hambruna (Wang et al., 2017).

Mientras que múltiples mecanismos relacionan el desequilibrio nutricional en etapas tempranas de la vida con la transmisión transgeneracional de los fenotipos metabólicos, los mecanismos epigenéticos han comenzado a ganar atención. La epigenética incluye cualquier proceso que altera la actividad de los genes sin alterar la secuencia del ADN, y que induce a modificaciones que pueden ser transmitidas a las células hijas (Wu & Morris, 2001). Las alteraciones en la nutrición durante el desarrollo, pueden alterar los marcadores epigenéticos, como la metilación del DNA o las modificaciones de histonas (Burdge et al., 2007; Ke et al., 2006). A su vez, los marcadores epigenéticos son estables y pueden ser heredados a través de las células somáticas durante la mitosis o en las células germinales durante la meiosis (Chong et al., 2007). Por tanto, la herencia nutricional podría inducirse a través de modificaciones epigenéticas en la meiosis contribuyendo así a los efectos transgeracionales.

Desde el punto de vista económico, este fenómeno podría estar impidiendo el progreso en los países en vías de desarrollo al disminuir la habilidad intelectual y la productividad de los individuos provenientes de un ambiente fetal decadente en nutrientes. Esta decadencia, conduce a una mala preparación escolar y bajo rendimiento, que resulta en menos años de escolaridad, productividad reducida y en algunos casos, la procreación temprana. Por tanto, los estragos de la desnutrición se vuelven a presentar en la siguiente generación.

2.3 Genes relacionados con el metabolismo energético

Un problema fundamental en la biología celular es el comprender cómo las células coordinan su crecimiento de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes. Las células han desarrollado mecanismos muy eficientes para sentir el estado de los nutrientes y ajustar su funcionamiento de tal forma que puedan mantener su crecimiento o enfrentarse al estrés. Estudios extensos han revelado que la proteína cinasa AMP-activated Kinase (AMPK) actúa como un sensor de la energía celular para promover las vías catabólicas que producen ATP, mientras inhibe las vías anabólicas que lo consumen. En contraste, el complejo 1 de la proteína mammalian Target Of Rapamycin (mTORC1) estimula los procesos anabólicos, como la síntesis de proteínas y lípidos. Es así como AMPK y mTORC1 regulan el metabolismo y crecimiento celular a través de la fosforilación de un amplio espectro de proteínas blanco, particularmente aquellas involucradas en el proceso de síntesis de proteínas, biogénesis mitocondrial, metabolismo de glucosa y lípidos y autofagia (ver Figura 2).

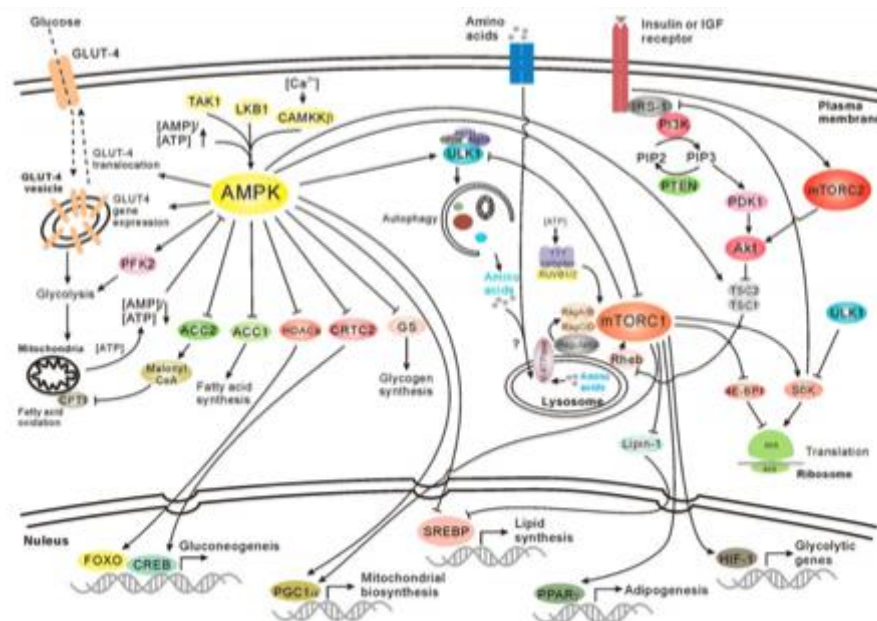


Figura 3 Vías de señalización celular de AMPK y mTOR en respuesta al estado de los nutrientes (Yuan, Xiong, & Guan, 2013).

2.3.1 AMPK

La proteína cinasa AMPK (AMP-activated protein kinase), es un complejo activado por el incremento en la relación AMP/ATP durante periodos de alta demanda de energía que promueven el consumo de ATP (B. B. Kahn, Alquier, Carling, & Hardie, 2017). La enzima AMPK es activada con la finalidad de iniciar rutas metabólicas, que permitan reponer el ATP consumido. Por un lado, estimula la oxidación de ácidos grasos y la internalización de glucosa, mientras que inhibe la síntesis de proteína, ácidos grasos, glucógeno y colesterol (Viollet, Athea, et al., 2009) (ver Figura 3).

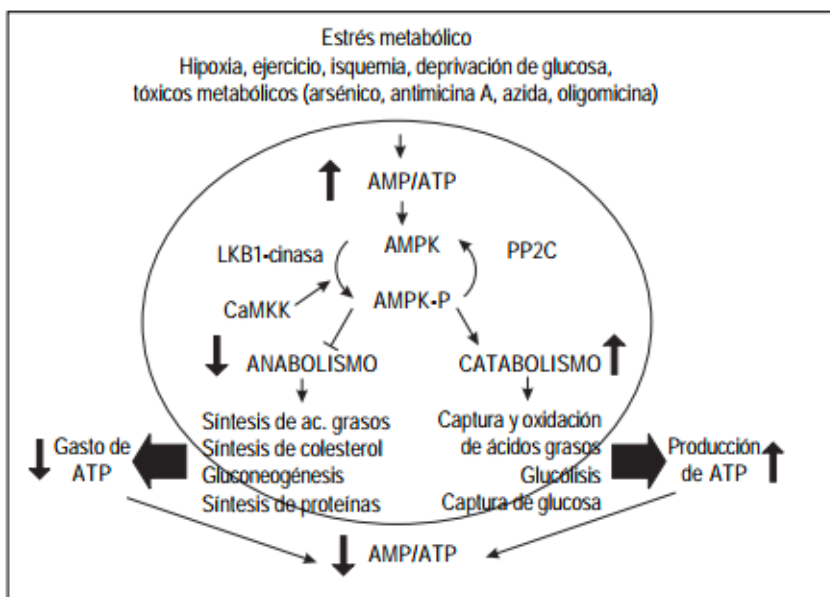


Figura 4 Mecanismo de regulación de AMPK. Modificado de (Frederich, O'Rourke, Furey, & Jost, 2009)

En la mayoría de las especies, AMPK se encuentra como un heterotrímero constituido por las subunidades catalíticas (α) y las subunidades reguladoras (β y γ) (Hardie, Carling, & Gamblin, 2017).

En condiciones de baja energía, AMP puede interactuar directamente con la subunidad reguladora y de AMPK, provocando en ella un cambio conformacional para promover su fosforilación y protegerla de una defosforilación, que asegura su activación. Posteriormente, AMPK es activada por medio de la fosforilación del

residuo Thr¹⁷² de la subunidad α a través de la cinasa LKB1 (Hawley et al., 2003; Woods et al., 2017) o la cinasa dependiente de Ca²⁺, CAMKK2 (Hawley et al., 2017).

Función de AMPK en el hígado

El hígado es un órgano metabólicamente activo donde se sintetizan: proteínas, lípidos y colesterol y se almacena la glucosa en forma de glucógeno. Además es capaz de aportar glucosa a la circulación a través de la glucogenólisis o gluconeogénesis para mantener una concentración adecuada de glucosa en sangre. Estos procesos dependen del estado de ayuno o posprandio del organismo.

Durante el ayuno, ocurren modificaciones metabólicas para mantener la homeostasis de energía y de glucosa sanguínea. Al disminuir los niveles de ATP en el ayuno, la enzima AMPK se activa como consecuencia de la demanda de energía. Al activarse AMPK en el hígado, se inactivan vías anabólicas por medio de la fosforilación de algunas enzimas clave. La HMG-CoA reductasa (HMGCoAr) es fosforilada en el residuo de Ser⁸⁷² para inhibir la síntesis de colesterol (Viollet, Guigas, et al., 2009), mientras que la fosforilación en el residuo de Ser⁷⁹ de la Acetil-CoA carboxilasa (ACC), inhibe la síntesis de ácidos grasos, por medio de una disminución en la concentración de malonil-CoA. De manera indirecta, al inactivar la ACC se activa la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT1) que promueve la oxidación de ácidos grasos (Carlson & Winder, 1999) (ver Tabla 4).

Asimismo, AMPK inactiva la cinasa del factor de elongación-2 (eEF2) por medio de una fosforilación en el residuo de Thr⁵⁶, que resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas (Browne, Finn, & Proud, 2004). También se disminuye la expresión de genes de enzimas involucradas en la gluconeogénesis (fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK), glucosa-6-fosfatasa) y la lipogénesis (sintasa de ácidos grasos, FAS) (Marsin et al., 2017). Entre los factores de transcripción que se ven disminuidos en el hígado se encuentran la proteína de unión a los elementos de respuesta a esteroides (SREBP-1c), la proteína de unión

al elemento de unión a hidratos de carbono (ChREBP) (Kawaguchi, Osatomi, Yamashita, Kabashima, & Uyeda, 2002) y el factor hepático nuclear (HNF4- α) (Hong, Varanasi, Yang, & Leff, 2003). En la etapa postprandial, la entrada de glucosa a las células permite que las reservas de glucógeno hepático sean reestablecidas y que el exceso de hidratos de carbono de la dieta sea convertido a triglicéridos, teniendo así un almacén de energía a largo plazo. Durante este proceso, AMPK se inactiva y los procesos de las vías anabólicas se reestablecen. Se incrementa la síntesis de ácidos grasos a través de la activación de la ACC e inactivación de la malonil-CoA descarboxilasa (MCD) y aumenta la síntesis de colesterol y de proteínas (Assifi et al., 2005).

Tabla 4. Proteínas blanco de AMPK en hígado (Cantó & Auwerx, 2010).

| Proteína blanco | Propiedades enzimáticas | Efecto biológico |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| ACC1 | ↓ actividad | ↓ Lipogénesis |
| ACC2 | ↓ actividad | ↑ Oxidación |
| eEF2 cinasa | ↑ actividad | ↓ Síntesis de proteínas |
| GPAT | ↓ actividad | ↓ Síntesis de triglicéridos |
| HMG-CoAr | ↓ actividad | ↓ Síntesis de colesterol |
| MCD | ↑ actividad | ↓ Malonil-CoA |
| PFK-2/FBPase-2 | Efectos cinéticos disminuidos | - |
| mTOR | ↓ actividad | ↓ Síntesis de proteínas |
| TSC2 | ↑ actividad | ↓ Síntesis de proteínas |

2.3.2 mTOR

mTOR es una proteína cinasa que funciona como un regulador clave en el crecimiento celular y metabolismo en respuesta a un estímulo hormonal o nutricional (Stanfel, Shamieh, Kaeberlein, & Kennedy, 2009). En contraste con AMPK, mTOR depende de la presencia de nutrientes como proteínas y glucosa y factores de crecimiento, para su activación. mTOR se encuentra en dos complejos multiproteicos funcional y estructuralmente diferentes: mTORC1 y mTORC2. El complejo mTORC1, que es sensible a la rapamicina, se constituye por G β L y raptor, mientras que mTORC2 por G β L, mSin y rictor.

En comparación con mTORC2, la regulación arriba y abajo de mTORC1 es mejor conocida. mTORC1 es activado por la insulina y otros factores de crecimiento a través de la vía de señalización PI(3)K/Akt (Laplante & Sabatini, 2012). También puede ser activado por los nutrientes del medio, como los aminoácidos; e inhibida por AMPK, a través de la fosforilación de TSC2 y raptor. En respuesta a las señales de crecimiento, se cree que mTORC1 promueve la traducción de RNA mensajero (mRNA) y la síntesis de proteína a través de su interacción con las proteínas cinasas S6K y el factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E-BP1. mTORC1 también promueve la síntesis de lípidos, reprime la degradación por la vía de la autofagia y regula el metabolismo de la glucosa y la función mitocondrial por el factor de transcripción HIF-1 α y el coactivador transcripcional PGC-1 α (Johnson, Rabinovitch, & Kaeberlein, 2013). Por lo anterior, mTORC1 funge como un nexo regulador clave, modulando los procesos anabólicos frente a los procesos catabólicos en respuesta a los nutrientes, señales de crecimiento y estado de energía celular.

Función de mTOR en hígado

El hígado juega un papel central en el control de la homeostasis de la glucosa y lípidos en respuesta al ayuno y el postpandrio. mTORC1 controla la producción hepática de los cuerpos cetónicos que los tejidos periféricos utilizan como fuente de energía durante el ayuno (Sengupta, Peterson, Laplante, Oh, & Sabatini, 2010). mTORC1 controla la actividad de PPAR- α , un regulador transcripcional clave de los genes que codifican para la cetogénesis, a través de la acumulación de la proteína NcoR1. Además de su función en el control hepático en respuesta al ayuno, mTORC1 también promueve el anabolismo durante el periodo postpandrial, a través de la lipogénesis hepática por medio de la regulación de la proteína SREBP1c (Li, Brown, & Goldstein, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Las etapas de gestación y lactancia son fundamentales para el desarrollo físico y cognitivo en todas las especies animales.

La deficiencia alimentaria en etapas de gestación y lactancia programan a los individuos y los hacen más susceptibles al desarrollo de enfermedades complejas en la vida adulta.

No se conocen los efectos de una suplementación compuesta por micronutrientes indispensables para las etapas de gestación y lactancia, administrada a un modelo animal con restricción alimentaria al 50%.

4. HIPÓTESIS

La suplementación con micronutrientes y omega 3 (n-3) LC PUFA administrada a las ratas Wistar, durante la gestación y lactancia tiene un impacto positivo en su progenie sobre los cambios bioquímicos, hormonales y de expresión génica de AMPK y mTOR en hígado provocados por una restricción dietaria materna.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de una suplementación con micronutrientes y omega 3 (n-3) LC PUFA en la progenie de ratas Wistar sometidas a una restricción dietaria materna al 50% durante la gestación y lactancia.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la suplementación con micronutrientes y omega 3 (n-3) LC PUFA sobre los parámetros somatométricos, bioquímicos y hormonales en el día 28 postnatal en ratas gestadas en condiciones de restricción dietaria materna.
- Determinar en el día 28 postnatal, el efecto de la suplementación con micronutrientes y omega 3 (n-3) LC PUFA sobre la expresión de los genes AMPK y mTOR asociados al metabolismo energético en ratas gestadas en condiciones de restricción dietaria materna.
- Analizar si los cambios en el patrón de crecimiento, bioquímicos, hormonales y de expresión génica son debidos al efecto de la suplementación y son indicativos de una mejora en el desarrollo de la progenie.

6. METODOLOGÍA

6.1 Grupos de estudio

Ratas Wistar machos y hembras (200 a 230 gr) (Envigo) fueron acondicionadas en jaulas de policarbonato bajo condiciones de temperatura controlada (22 a 24°C), ciclos de luz-oscuridad (12 h:12 h) y libre acceso a alimento (dieta Chow) y agua por 2 semanas. Ratas hembra con un peso de 236 ± 8 g fueron puestas a monta con una rata macho en proporción 3:1. El día 1 de gestación fue determinado por la presencia de espermias en el frotis vaginal (Ver Figura 5, ANEXOS). Dieciséis ratas hembra fueron alojadas individualmente y asignadas aleatoriamente según las dietas correspondientes: Dieta Control (C,N=4), Dieta Control con Suplementación (C+S,N=4), Restricción dietaria al 50% (50%R,N=4) y Restricción dietaria al 50% con Suplementación (50%R+S,N=4).

En el día del nacimiento de las crías, las camadas se ajustaron a 8 (4 hembras y 4 machos) dando un total de 16 crías por grupo de dieta por sexo. Se registró el peso de las ratas y crías diariamente y la talla de las crías cada tercer día durante 28 días.

6.2 Diseño de la dieta

La Restricción dietaria al 50% se define como la limitación en la ingesta energética al 50% respecto a la ingesta del grupo C, procedente de la dieta Chow. La dieta Chow es una dieta de mantenimiento o Control para animales de laboratorio, que provee de una nutrición adecuada y completa.

La cantidad de alimento proporcionado a los grupos 50%R y 50%R+S fue determinada a partir del cálculo diario del alimento consumido por las ratas C, durante las etapas de gestación y lactancia (ver Tabla 5).

Tabla 5. Alimentación de las ratas durante los periodos de gestación y lactancia de acuerdo al grupo de dieta asignado.

| Dieta/Etapa | Gestación (g alimento) | Lactancia (g alimento) | | |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|------------|
| | | Día 1 y 2 | Día 3 a 5 | Día 6 a 21 |
| C N=4 | 20 | 25 | 30 | 50 |
| C+S N=4 | 20 | 25 | 30 | 50 |
| 50%R N=4 | 10 | 12.5 | 15 | 25 |
| 50%R+S N=4 | 10 | 12.5 | 15 | 25 |

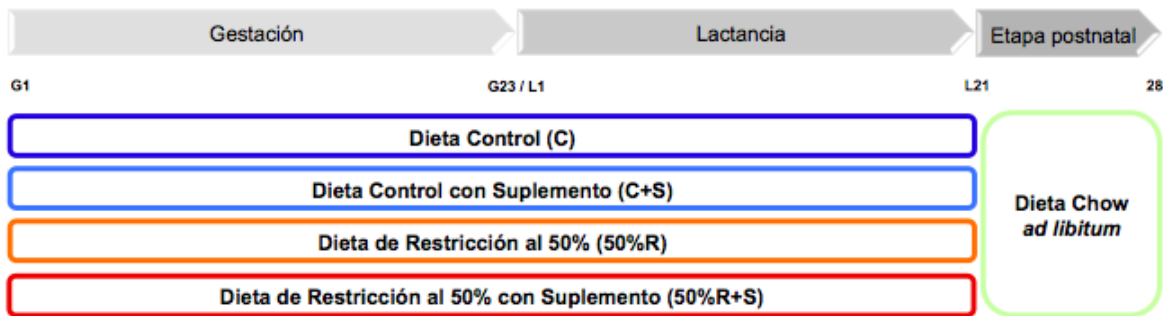


Figura 5 Dieta de ratas durante los periodos de gestación y lactancia.

Se pesó y se dio diariamente el alimento de acuerdo a la dieta asignada durante la gestación y lactancia de las madres. Del día 21 al 28 postnatal las crías fueron alimentadas con libre acceso de dieta Chow (ver Figura 4).

6.3 Diseño de la Suplementación

Para este estudio se diseñó un suplemento compuesto por ácido fólico, hierro, selenio, zinc y ácidos grasos omega 3 (n-3) (ver Tabla 6), de acuerdo a las tablas de Ingesta Diaria Recomendada (IDR) para mujeres embarazadas publicadas por el Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (2000) y el Food and Nutrition Board de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (2002).

Tabla 6. Formulación utilizada para la suplementación de ratas en gestación y lactancia.

| Nutrimento | Ingesta Diaria Recomendada en una mujer (mg) | Fórmula de la suplementación en ratas Wistar (µg) |
|-------------------|---|--|
| Ácido Fólico | 0.4 | 1.5 |
| Zinc | 15 | 57.5 |
| Hierro | 27 | 103.5 |
| Selenio | 0.06 | 0.23 |
| DHA | 200 | 766.7 |

Se administró la suplementación por vía oral diariamente a las madres durante la gestación y lactancia hasta el día 21 postnatal.

6.4 Eutanasia de madres y crías

En el día 21 postnatal la madre fue separada de las crías, puesta en ayuno de 12 horas y anestesiada con pentobarbital sódico para su posterior sacrificio, recolección de sangre por punción cardiaca y disección de órganos (hígado, páncreas, riñones y cerebro) (ver Figura 6). En el día 28 postnatal las crías fueron puestas en ayuno de 8 horas y anestesiadas con pentobarbital sódico.

6.5 Análisis de composición corporal y densitometría ósea

Se realizó un análisis de densidad ósea y composición corporal (*Densitómetro óseo de rayos X basado en enCORE, Lunar, GE Healthcare, UK*) a las crías (ver Figura 6, ANEXOS). A partir de este estudio se evaluaron los siguientes parámetros:

- *Densidad de Masa Ósea (DMO) (g/cm²)*: es el CMO corregido utilizada como medio de estandarización para disminuir el efecto de diferencias en el tamaño óseo entre individuos y facilitar la comparación de un individuo con una población de referencia.
- *Tejido (%)*: Grasa (%) + Magro (%)
- *Grasa (%)*: es la cantidad de grasa visceral, perivisceral y subcutánea.

- *Magro (%)*: es la cantidad de tejido que constituye órganos y músculo.
- *Cantidad de Masa Ósea (CMO) (%)*: es la cantidad total de mineral expresada en gramos en un segmento óseo determinado.
- *Grasa Libre (%)*: Magro (%) + CMO (%)

6.6 Pesado de órganos

Posterior al sacrificio, se hizo la disección de hígado, riñones, páncreas y cerebro de las crías. Se pesaron y fueron congelados con nitrógeno líquido para ser posteriormente almacenados a - 70°C.

6.7 Parámetros bioquímicos, hormonales y capacidad antioxidante

Se recolectó la sangre por punción cardiaca de las ratas. El suero se separó de la sangre total por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos (*Sorvall ST16R Centrifuge, Thermo Scientific, EE.UU.*). Los sueros de las madres fueron analizados en el Hospital Juárez de México para el análisis de glucosa, colesterol, triglicéridos, VLDL colesterol, proteínas totales y albúmina. El análisis bioquímico para el suero de las crías fue realizado en el laboratorio de Diabetes 202 (ver Figura 6). Se determinó la concentración de colesterol después de una hidrólisis enzimática y oxidación, utilizando un kit comercial Colestat enzimático (*Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina*). La determinación de triglicéridos se midió a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas empleando el kit comercial TG Color GPO/PAP AA (*Wiener Laboratorios S.A.I.C, Rosario, Argentina*). La albúmina se midió por método colorimétrico a partir de su reacción con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (BCG) empleando el kit comercial de Albúmina AA (*Wiener Laboratorios S.A.I.C, Rosario Argentina*). La glucosa se midió por el método de la glucosa oxidasa con el kit de Glicemia enzimática AA (*Wiener Laboratorios S.A.I.C, Rosario Argentina*) mientras que la concentración de insulina en madres y crías se determinó por ELISA (*Alpco, Windham, NH*) (ver Figura 7, ANEXOS). A partir de los parámetros de glucosa e insulina se calculó el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) como se muestra a continuación:

$$HOMA\ IR = \frac{Insulina \left(\frac{mg}{dL}\right) \times Glucosa \left(\frac{uUI}{mL}\right)}{405}$$

Por último, se determinó la capacidad antioxidante tanto en el suero de las madres como en el de las crías por el método de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), en el que los antioxidantes presentes donan un electrón a los radicales peroxilo que a su vez reaccionan con fluoresceína como sustrato.

6.8 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de hígado primero se maceraron 100 mg de tejido con politrón (ver Figura 8, ANEXOS). Posteriormente se extrajo el RNA por el método con Trizol (Rio DC *et al.*, 2010).

Se cuantificó el RNA de cada muestra con *Nanodrop 1000* (Thermofisher Scientific, EE. UU.). Se juntaron en cantidades equimolares las muestras de RNA pertenecientes a una misma camada, a un mismo sexo y al tejido correspondiente (pool). Por último, se evaluó la integridad del RNA de cada pool por electroforesis en gel. Se realizó la lectura del gel a través de luz UV (ver Figura 8, ANEXOS).

6.9 qPCR

Para la síntesis de cDNA, a partir del RNA extraído de hígado, se utilizó el Kit SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis (Thermofisher Scientific, EE.UU.). Posteriormente se cuantificó la expresión, a partir del método qPCR con LightCycler 2.0 (ROCHE, Suiza) (ver Figura 9, ANEXOS), de los genes AMPK y mTOR en el cDNA de hígado, utilizando como gen de referencia al gen hPRT. La expresión de mTOR en músculo, no alcanzó la sensibilidad del equipo.

Para el cálculo de la expresión génica relativa se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Rao, Huang, Zhou, & Lin, 2013). Este método hace uso del valor CT (Cycle Threshold), definido como el ciclo en el que los niveles de fluorescencia alcanzan un límite, generado por el sistema del equipo de qPCR. A partir del valor CT la expresión génica relativa es calculada en la Muestra Blanco (C+S, 50%R y 50%R+S) y en la

de Referencia (C), utilizando un gen de referencia (hPRT) y el gen blanco que se desea evaluar (AMPK y mTOR), como se muestra a continuación:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{muestra blanco}) - \Delta CT(\text{muestra de referencia}) \\ = (CT_D - CT_B) - (CT_C - CT_A)$$

Donde:

| | Muestra de Referencia (C) | Muestra blanco (c+s, 50%R, 50%R+S) |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Gen de referencia (hPRT) | A | B |
| Gen Blanco (AMPK, mTOR) | C | D |

6.10 Análisis Estadístico

Los datos se presentan como la media ± error estándar (EE). El valor de N indica el número de madres (camadas evaluadas) ó el número de crías por camada en cada medición. Se utilizó el valor de la media de los datos de las crías de cada camada para el análisis de los resultados.

Los efectos de la dieta entre los grupos, al día 21 postnatal en las madres y al 28 postnatal en las crías, fueron determinados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunns. Las diferencias se consideraron significativas con un valor $p \leq 0.05$.

El programa estadístico empleado fue GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software, Inc., California, SD, EE.UU.*).

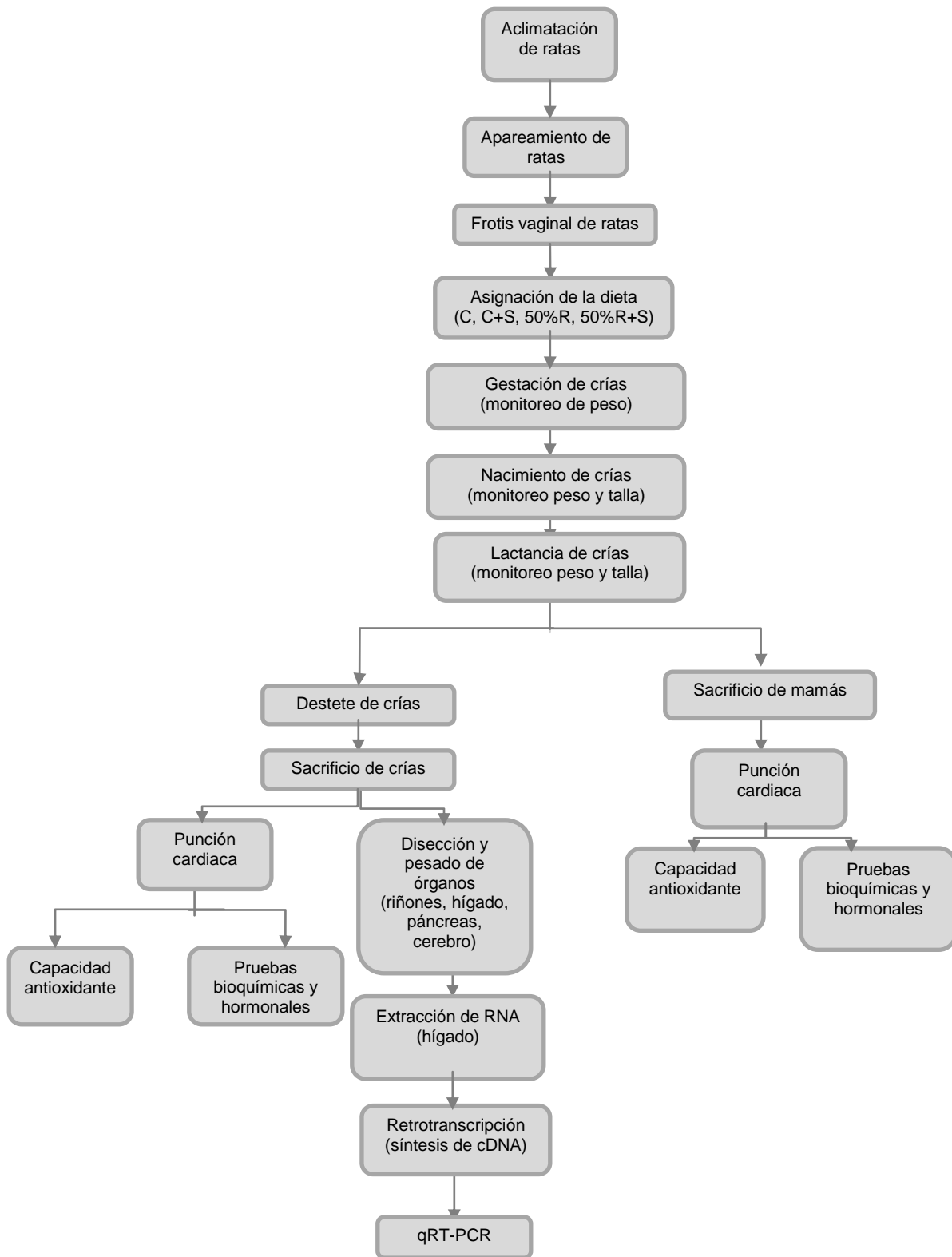


Figura 6 Esquema general del trabajo experimental.

7. RESULTADOS

7.1 Ratas madres

7.1.1 Peso (madres)

Durante los 23 días de gestación y los 21 días posteriores al alumbramiento, que corresponden al periodo de lactancia en las ratas, éstas mostraron un patrón similar en el cambio de peso. Sin embargo, las ratas con restricción tuvieron un menor peso que las ratas Control. El peso de todos los grupos incrementó gradualmente del día 1 hasta el día 16 de la gestación; a partir de este punto y hasta el día 23, que corresponde al fin de la gestación, se observó un rápido aumento. A pesar de que todas las ratas Wistar fueron preñadas presentando un peso inicial de 236 ± 8 g, la ganancia de éste a lo largo de la gestación entre los grupos evaluados no es el mismo, siendo los grupos 50%R y 50%R+S los de menor ganancia respecto a C y C+S, aunque no de manera significativa.

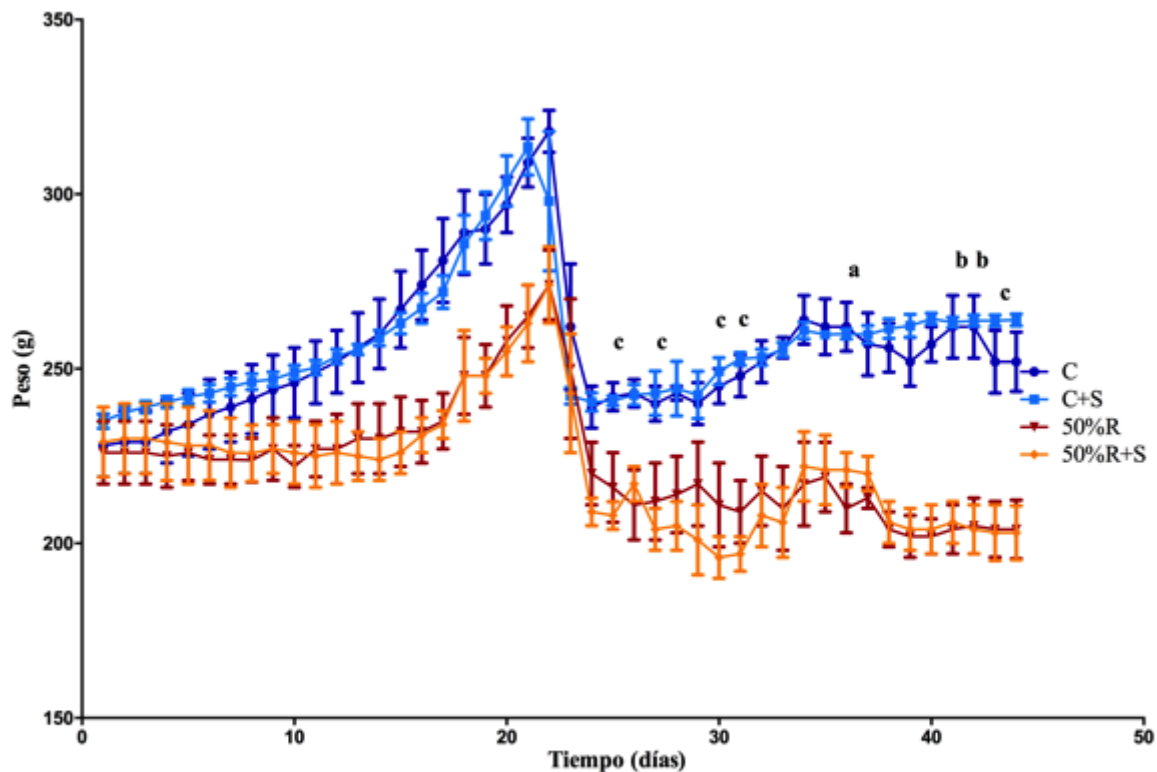


Gráfico 1. Curva de crecimiento de Ratas Wistar sometidas a diversas dietas durante la gestación y lactancia.

a : Diferencia significativa ($p=0.05$) entre C y 50%R, **b :** Diferencia significativa ($p=0.05$) entre C y 50%R+S, **c :** Diferencia significativa ($p=0.05$) entre C+S y 50%R+S

Cuando las crías nacieron, las madres de los grupos C y C+S comenzaron a restablecer su peso en la lactancia, que finalmente llegó a ser mayor al del día 1 de la gestación. Las madres de los grupos de restricción no lograron restablecer su peso al final de la gestación, lo que provocó que a partir de la lactancia se observara un bajo peso con diferencia significativa frente a los grupos C y C+S (ver Gráfico 1).

7.1.2 Análisis Bioquímico (madres)

En el perfil bioquímico (ver Tabla 7), aunque no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos de dietas, existe una tendencia en la que los grupos suplementados, C+S y 50%R+S, presentan concentraciones más bajas de glucosa (126 ± 13 y 159 ± 21 respectivamente) e insulina (0.3 ± 0.1 y 1.5 ± 0.8 respectivamente), que aquellos que no lo fueron C y 50%R (glucosa: 256 ± 63 y 232 ± 20 ; insulina: 1.3 ± 0.9 y 2.9 ± 2.1 respectivamente), además tuvieron un menor índice HOMA-IR los grupos suplementados C+S y 50%R+S (0.27 ± 0.11 y 0.80 ± 0.28 respectivamente) que los grupos C y 50%R (0.43 ± 0.24 y 1.38 ± 0.09 respectivamente).

Tabla 7. Pruebas bioquímicas en el día 21 de lactancia en ratas Wistar madres sometidas a diferentes dietas.

| Parámetro bioquímico | C N=4 | C+S N=4 | 50%R N=4 | 50%R+S N=4 |
|---|-----------|------------|-------------|---------------|
| Colesterol (mg/dL) | 63± 15 | 81± 5 | 92± 24 | 89± 8 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 127± 31 | 267± 121 | 166± 40 | 197± 34 |
| Proteínas totales (g/dL) | 5.8± 0.3 | 5.6± 0.2 | 5.4± 0.3 | 5.6± 0.4 |
| Albúmina (g/dL) | 3.2± 0.5 | 3.6± 0.2 | 2.6± 0.5 | 3.1± 0.6 |
| Glucosa (mg/dL) | 256± 63 | 126 ± 13 | 232± 20 | 159± 21 |
| Insulina (ng/mL) | 1.3± 0.9 | 0.3± 0.1 | 2.9± 2.1 | 1.5± 0.8 |
| HOMA-IR | 0.43±0.24 | 0.27±0.11 | 1.38±0.09 | 0.80±0.28 |
| Capacidad Antioxidante (μmol eq Trolox/mL suero) | 2849± 230 | 3173± 210 | 2744± 383 | 3168± 230 |

Se observa también que la capacidad antioxidante tiende a ser mayor en los grupos suplementados, C+S y 50%R+S.

El grupo de restricción 50%R muestra una tendencia a disminuir los niveles de albúmina y proteínas totales al compararlo con los demás grupos.

7.2 Progenie

7.2.1 Peso

En el día 1 de nacimiento, todas las crías de los 4 grupos tuvieron un peso semejante. Sin embargo, a partir del día 5 postnatal el efecto de las dietas de restricción 50%R y 50%R+S de la madre, comenzó a ser visible a través de la tardía ganancia de peso de las crías respecto a los grupos control C y C+S. El crecimiento en peso en las dietas control C y C+S se traduce en una mayor ganancia de peso con el paso del tiempo comparado con los grupos en restricción.

En hembras, las crías de los grupos control C y C+S prácticamente tienen la misma curva de crecimiento en peso a lo largo de los 28 días (ver Gráfico 2). En cambio, en las dietas de restricción, se observa que la curva de crecimiento en peso del grupo 50%R+S es ligeramente menor que la de 50%R durante los 28 días, sin embargo es sólo en el día 11 postnatal donde se observa una diferencia significativa entre ellas ($p=0.05$).

En contraste, las crías macho del grupo control C+S muestran una curva de crecimiento en peso ligeramente mayor a la de C a lo largo de los 28 días (ver Gráfico 3). Además, al igual que en el caso de las hembras, en las dietas de restricción se observa que la curva de crecimiento del grupo 50%R+S tiende a ser menor que la de 50%R durante los 28 días.

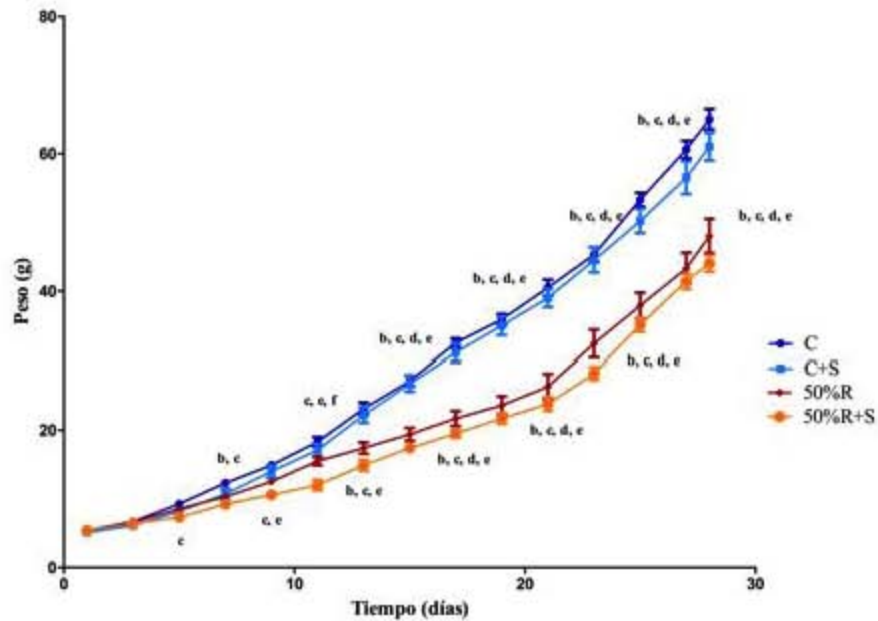


Gráfico 2. Curva de crecimiento en peso hasta el día 28 postnatal de las crías hembra provenientes de madres sometidas a diversas dietas

b: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C y 50%R, e: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C y 50%R+S, d: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C+S y 50%R, e: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C+S y 50%R+S, f: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre 50%R y 50%R+S

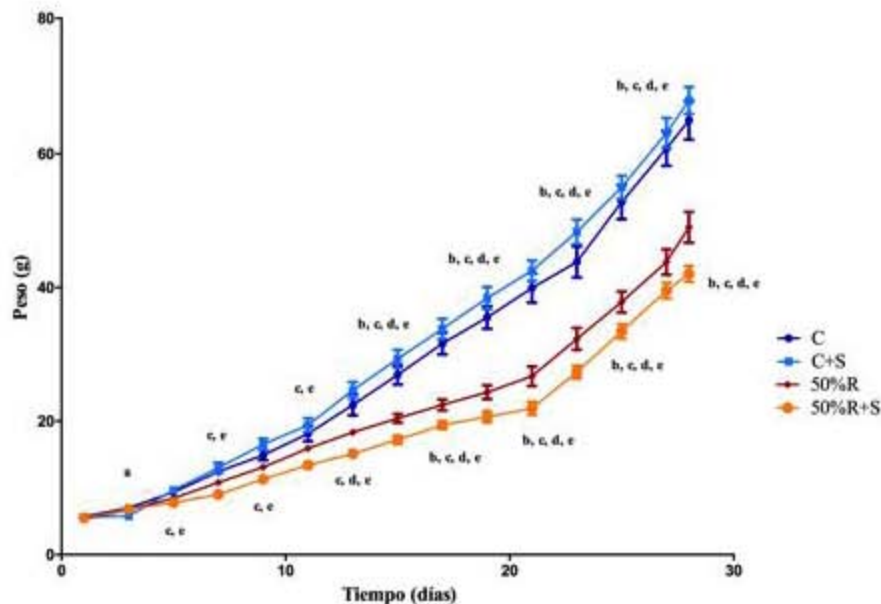


Gráfico 3. Curva de crecimiento en peso hasta el día 28 postnatal de las crías macho provenientes de madres sometidas a diversas dietas

a: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C y C+S, b: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C y 50%R, c: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C y 50%R+S, d: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C+S y 50%R, e: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C+S y 50%R+S, e: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre C+S y 50%R+S, f: Diferencia significativa ($p = 0.05$) entre 50%R y 50%R+S.

En el día 28 postnatal, las crías macho y hembra de los grupos C y C+S tuvieron un crecimiento significativamente mayor en peso en comparación con los grupos 50%R y 50%R+S (ver Gráficos 4 y 5). No se encontró diferencia significativa en peso entre los grupos 50%R y 50%R+S.

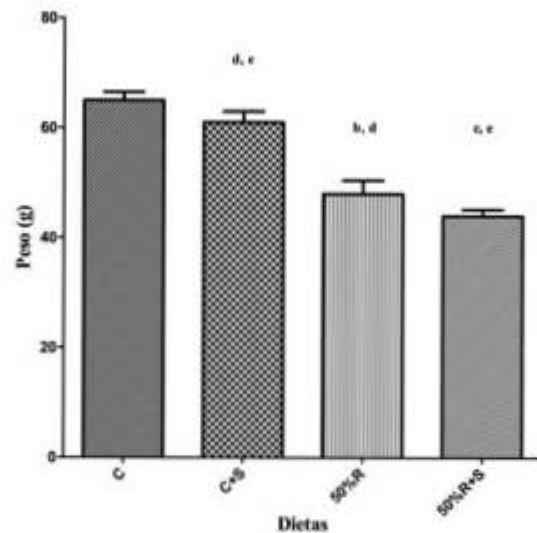


Gráfico 4. Peso de las crías hembra en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas

b: Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre C y 50%R, e: Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre C y 50%R+S, d: Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre C+S y 50%R, e: Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre C+S y 50%R+S

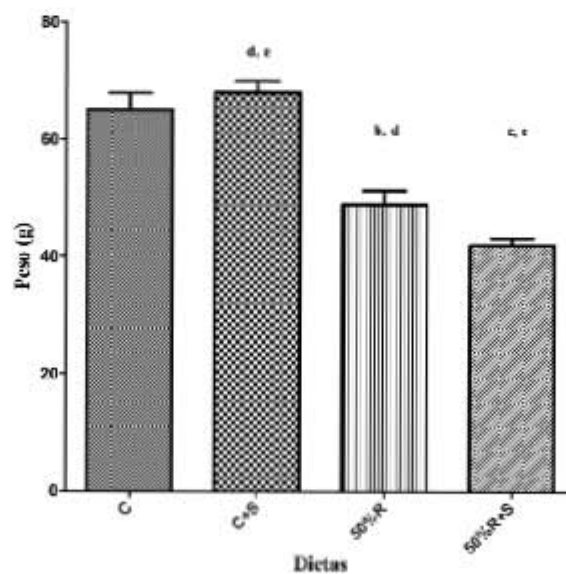


Gráfico 5. Peso de las crías macho en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas

b: Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre C y 50%R, e: Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre C y 50%R+S, d: Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre C+S y 50%R, e: Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre C+S y 50%R+S.

7.2.2 Composición Corporal

De acuerdo al estudio de absorciometría con rayos X (DXA), en el día 28 postnatal se observa que entre los grupos restringidos su composición (masa magra y grasa) es diferente aunque no de manera significativa (ver Tabla 8). El grupo 50%R tiende a presentar una mayor cantidad de masa magra en machos y hembras ($60\pm 2.4\%$ y $57\pm 1.2\%$ respectivamente) en comparación con las del grupo 50%R+S ($55\pm 2.5\%$ y $51\pm 2.1\%$ respectivamente). Por el contrario, el grupo 50%R+S mostró una mayor cantidad de grasa en crías macho y hembra ($43\pm 1.0\%$ y $46\pm 2.3\%$ respectivamente) que el grupo 50%R ($37\pm 2.2\%$ y $42\pm 1.2\%$ respectivamente).

Además, los grupos pertenecientes a las dietas de restricción 50%R y 50%R+S, tienden a presentar una menor cantidad de DMO que las del grupos control C.

Tabla 8. Composición corporal al día 28 postnatal de las crías macho y hembra provenientes de madres sometidas a diferentes dietas.

| Sexo | Machos | | | Hembras | | |
|-----------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|---------------|
| | C N=3 | 50%R N=3 | 50%R+S N=3 | C N=3 | 50%R N=3 | 50%R+S N=3 |
| DMO (g/cm ²) | 0.080±0.003 | 0.062±0.001 | 0.060±0.006 | 0.068±0.002 | 0.064±0.003 | 0.058±0.004 |
| Tejido (%) | 98±0.70 | 98±0.14 | 98±0.55 | 98±0.10 | 98±0.53 | 97±0.15 |
| Grasa (%) | 40±0.10 | 37±2.2 | 43±1.0 | 41±2.8 | 42±1.2 | 46±2.3 |
| Magro (%) | 58±0.60 | 60±2.4 | 55±2.5 | 56±3.9 | 57±1.2 | 51±2.1 |
| CMO (%) | 2.2±0.05 | 2.0±0.07 | 2.0±0.15 | 2.2±0.0 | 2.3±0.07 | 2.4±0.25 |
| Grasa libre (%) | 60±0.10 | 62±2.30 | 58±1.80 | 58±3.9 | 59±1.2 | 54±2.3 |

7.2.3 Talla

El patrón de crecimiento en talla que las crías presentaron en los diversos grupos fue muy similar. En el día 28 postnatal, las diferencias en talla se encontraron entre los grupos C y 50%R en hembras y C+S y 50%R en machos ($p=0.05$) (ver Gráficos 6 y 7).

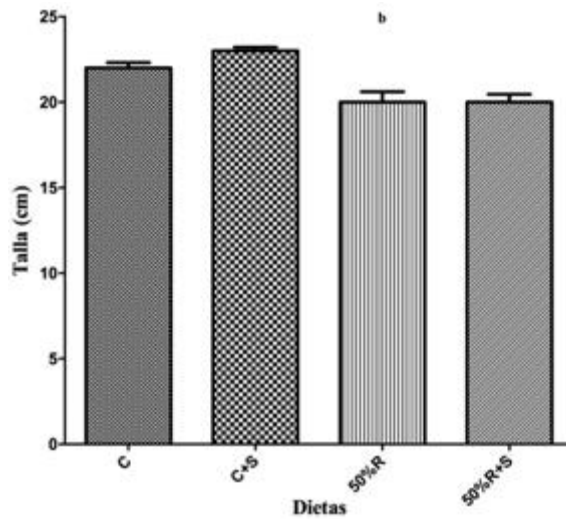


Gráfico 6. Talla de las crías hembra en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas

b: Diferencia significativa ($p=0.05$) entre C y 50%R

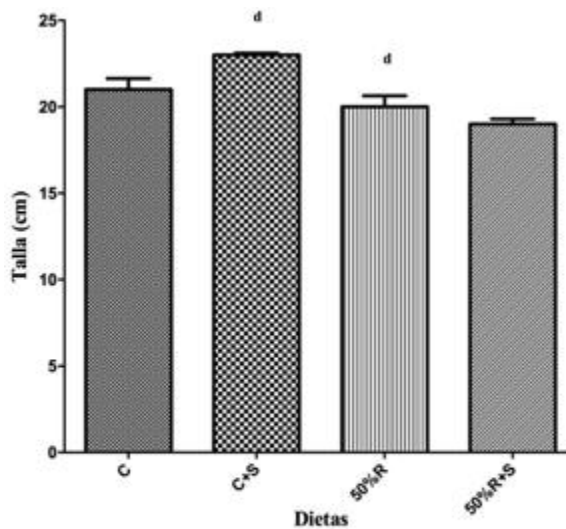


Gráfico 7. Talla de las crías macho en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas

d: Diferencia significativa ($p=0.05$) entre C+S y 50%R

7.2.4 Órganos

Para la evaluación del efecto de la dieta y el suplemento sobre el tamaño de algunos órganos clave (hígado, riñones, páncreas y cerebro), se calculó su proporción en peso (%) en relación con el peso corporal de la cría. Es interesante notar que el grupo 50%R+S la proporción del cerebro de las crías hembra fue significativamente mayor en comparación con el grupo C+S (ver Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje del peso de los órganos al día 28 postnatal de las crías hembra provenientes de madres sometidas a diferentes dietas.

| Relación órgano-peso corporal | C N=4 | C+S N=4 | 50%R N=4 | 50%R+S N=4 |
|-------------------------------|-----------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| Hígado (%) | 3.77±0.34 | 3.37±0.05 | 3.79±0.07 | 3.83±0.19 |
| Riñón (%) | 0.95±0.05 | 0.82±0.07 | 1.06±0.07 | 1.07±0.02 |
| Páncreas (%) | 0.48±0.06 | 0.47±0.03 | 0.54±0.03 | 0.45±0.03 |
| Cerebro (%) | 2.05±0.12 | 1.84±0.06 ^e | 2.67±0.31 | 2.90±0.13 ^e |

e. Diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) de peso entre las crías de los grupos de dietas: C+S y 50%R+S.

Tabla 10. Porcentaje del peso de los órganos al día 28 postnatal de las crías macho provenientes de madres sometidas a diferentes dietas.

| Relación órgano-peso/Dieta | C N=4 | C+S N=4 | 50%R N=4 | 50%R+S N=4 |
|----------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|----------------------|
| Hígado (%) | 3.85±0.28 | 3.46±0.04 | 3.71±0.11 | 3.89±0.27 |
| Riñón (%) | 0.96±0.06 | 0.89±0.02 | 1.00±0.08 | 1.08±0.036 |
| Páncreas (%) | 0.49±0.05 | 0.44±0.01 | 0.49±0.07 | 0.43±0.02 |
| Cerebro (%) | 2.12±0.12 | 1.93±0.06 | 2.57±0.44 | 2.77±0.24 |

7.2.5 Análisis bioquímico

En el perfil bioquímico de las crías (ver Tabla 11 y 12) se observaron tendencias en los parámetros de glucosa e insulina.

La concentración de insulina en machos y hembras es menor para los grupos suplementados C+S y 50%R+S. A su vez, los grupos en restricción dietaria 50%R y 50%R+S, presentaron una menor concentración de insulina que los grupos control C y C+S. Es importante destacar que en los machos, el HOMA-IR tiende a ser mayor y que cuando se suplementa hay una disminución del 52.5%. Respecto a la capacidad antioxidante, ésta no se vio modificada en los grupos con suplemento, lo cual sí se observó en las madres.

Tabla 11. Pruebas bioquímicas en el día 28 postnatal de las crías macho provenientes de madres sometidas a diferentes dietas.

| Parámetro bioquímico/Dieta | C N=4 | C+S N=4 | 50%R N=4 | 50%R+S N=4 |
|---|-------------|--------------|--------------|---------------|
| Glucosa (mg/dL) | 160±34.6 | 176±27.7 | 145±36.6 | 161±33.3 |
| Colesterol (mg/dL) | 86.1±7.91 | 89.1±10.4 | 83.3±7.86 | 78.8±6.21 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 201±48.2 | 192±22.8 | 219±66.8 | 295±103 |
| Albúmina (g/dL) | 3.13± 0.128 | 3.25± 0.248 | 3.04± 0.142 | 2.87± 0.141 |
| Insulina (ng/mL) | 1.23± 0.891 | 0.935± 0.649 | 0.793± 0.317 | 0.349± 0.168 |
| HOMA-IR | 0.40±0.28 | 0.74±0.09 | 1.01±0.54 | 0.48±0.32 |
| Capacidad Antioxidante (μ mol eq Trolox/mL suero) | 3117± 66.8 | 2663± 431 | 3108± 121 | 2236± 100 |

Tabla 12. Pruebas bioquímicas en el día 28 postnatal de las crías hembra provenientes de madres sometidas a diferentes dietas.

| Parámetro bioquímico/Dieta | C N=4 | C+S N=4 | 50%R N=4 | 50%R+S N=4 |
|--|-----------------|-------------------|--------------------|----------------------|
| Glucosa (mg/dL) | 190±49.2 | 130±21.3 | 121±28.7 | 154±53.2 |
| Colesterol (mg/dL) | 72.2±2.42 | 74.6±6.36 | 80.8±7.00 | 75.5±3.69 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 191±32.7 | 190±26.3 | 277±76.6 | 316±71.7 |
| Albúmina (g/dL) | 3.20±0.147 | 3.24±0.147 | 3.14±0.140 | 2.86±0.147 |
| Insulina (ng/mL) | 1.23±0.492 | 1.09±0.374 | 0.431±0.127 | 0.383±0.174 |
| HOMA-IR | 1.04±0.52 | 1.02±0.33 | 0.42±0.22 | 0.59±0.45 |
| Capacidad Antioxidante (μmol eq Trolox/mL suero) | 2883±126 | 3291±139 | 2642±203 | 2444±200 |

7.2.6 Expresión génica

En la evaluación de la expresión génica en hígado, los grupos suplementados C+S y 50%R+S en crías macho y hembra, tienden a presentar una menor expresión de AMPK comparado con el grupo C, aunque no de manera significativa (ver Gráficos 8 y 9). Es sólo en el caso del grupo 50%R en hembras donde se observa una expresión de AMPK significativamente mayor comparado con 50%R+S (2.81 ± 0.74 y 0.66 ± 1.12 , respectivamente).

Por otro lado, la expresión relativa de mTOR en hígado de los grupos C+S y 50%R+S en las crías hembra, tendió a ser cercana a 1, mientras que el grupo 50%R se sobreexpresó con un valor de 3.33 ± 0.55 (Ver Gráfico 10). En contraste, la expresión de mTOR en el hígado de las crías macho de los grupos C+S, 50%R y 50%R+S (0.31 ± 0.04 , 0.83 ± 0.19 y 0.52 ± 0.13 , respectivamente) fue menor que el del grupo C.

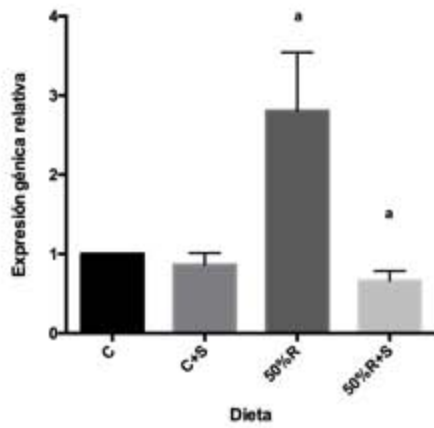


Gráfico 8. Expresión génica de AMPK en hígado de las crías hembra en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas.

a: Diferencia significativa ($p=0.05$) entre 50%R y 50%R+S

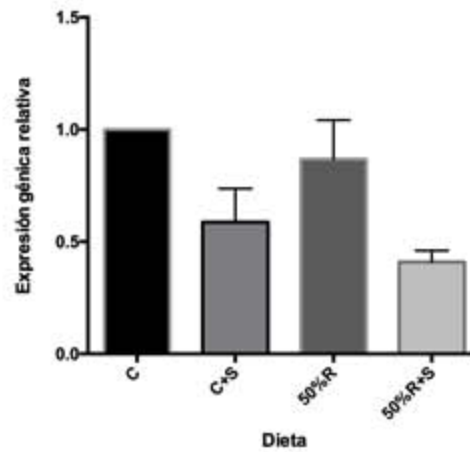


Gráfico 9. Expresión génica de AMPK en hígado de las crías macho en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas.

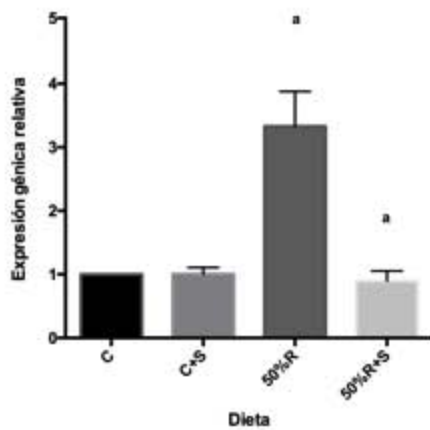


Gráfico 10. Expresión génica de mTOR en hígado de las crías hembra en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas.

a: Diferencia significativa ($p=0.05$) entre 50%R y 50%R+S

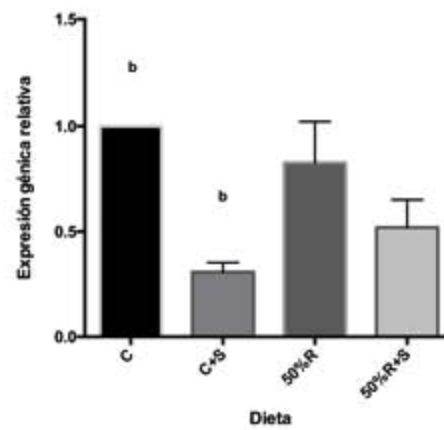


Gráfico 11. Expresión génica de mTOR en hígado de las crías macho en el día 28 postnatal provenientes de madres sometidas a diversas dietas.

b: Diferencia significativa ($p=0.05$) entre C y C+S

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La desnutrición es un problema de salud que prevalece a nivel mundial. Hasta ahora, se ha demostrado que los individuos gestados en un estado de desnutrición sufren alteraciones a nivel fisiológico y metabólico para adaptarse a las carencias, mismas que pueden conservarse por generaciones y que aumentan la susceptibilidad a desarrollar enfermedades crónicas a largo plazo (Aiken & Ozanne, 2014; Goodspeed et al., 2015).

En este estudio se diseñó y se analizó el efecto de una suplementación sobre la progeñe de ratas Wistar en restricción dietaria al 50%. Este modelo de restricción representa un estado de desnutrición crónico como el que viven las personas en situación vulnerable, como los grupos indígenas, quienes por sus carencias derivadas de la inequidad social, tienen una prevalencia tres veces mayor a la desnutrición que la población no indígena en México (González et al., 2008).

Sabemos que la mejor solución ante el problema de la desnutrición es una alimentación completa, equilibrada, inocua, suficiente, variada y adecuada (NOM 043-SSA2-2012, 2013). No obstante, la creación del suplemento propuesto es un primer acercamiento ante una posible solución de bajo costo y fácil acceso para las mujeres en situación de vulnerabilidad, durante el embarazo y la lactancia, para reducir el mayor número de efectos negativos, a nivel metabólico, bioquímico y genético, de un ambiente intrauterino carente nutricionalmente.

8.1 Efecto de la suplementación durante la gestación y la lactancia en ratas

La lactancia es la etapa que requiere un mayor consumo energético. De hecho, la FAO recomienda que para mantener un buen estado nutricional, la mujer que lacta debe elevar el consumo de alimentos a aproximadamente 500 kcal más (FAO, 2002). Las ratas que representan al modelo de restricción dietario (50%R y 50%R+S), tuvieron un menor peso sólo durante la lactancia comparadas con los grupos control (C y C+S), quienes cubrieron totalmente la demanda nutricional y energética (ver Gráfico 1). En condiciones normales, las ratas gestantes comienzan a almacenar tejido adiposo que utilizarán para la producción de

calostro y leche (Stuebe & Rich-Edwards, 2009), sin embargo, las ratas restringidas no lograron almacenar el tejido adiposo suficiente, produciendo leche a expensas del mantenimiento de su peso. Nuestro modelo representa un estado de desnutrición crónico, mismo que ocasiona una pérdida de peso más pronunciada en la lactancia que en el periodo de gestación (Brigham, Sakanashi, & Rasmussen, 1992). Como se esperaba, el suplemento no produjo diferencia en el peso entre grupos ya que no proporciona masa al estar compuesto por micronutrientes (Zinc, Selenio, DHA, Hierro y Ácido Fólico). Sin embargo, sus componentes fueron elegidos ya que son fundamentales a nivel bioquímico, metabólico y genético para el funcionamiento del organismo (López *et al.*, 2010)..

En relación al perfil bioquímico de la madres, se encontró que en los grupos suplementados 50%R+S y C+S, la concentración de glucosa e insulina en sangre tendió a ser menor que en los grupos no suplementados 50%R y C, respectivamente; efecto que podría atribuirse al suplemento (ver Tabla 7). La concentración más alta de insulina fue la del grupo 50%R, que al mismo tiempo mostró altos niveles de glucosa y un mayor HOMA-IR aunque no de manera significativa, lo cual sugiere que la restricción dietara aún en animales adultos puede ocasionar un malfuncionamiento metabólico.

En este contexto, las mujeres lactantes que viven en situación de vulnerabilidad, podrían presentar una resistencia a la insulina provocando a largo plazo una disfunción de las células beta, que finalmente lleva al organismo al desarrollo de DT2 (S. E. Kahn, 2003). Con respecto a lo observado en el grupo 50%R+S en el que hubo una menor concentración de insulina y un menor valor en el índice HOMA-IR que el grupo 50%R, Barman y Srinivasan (2016) proporcionaron por primera vez evidencia de que el Zn, uno de los nutrientes que componen la suplementación propuesta en el presente estudio, puede disminuir parcialmente la hiperinsulinemia asociada a complicaciones metabólicas. Aunque el mecanismo aún no ha sido dilucidado, se ha comprobado que el Zn es un oligoelemento esencial para la formación de los cristales de insulina que se almacenan en los gránulos maduros (Karamali *et al.*, 2017).

Respecto al parámetro de albúmina, éste es utilizado como un indicador del estado de nutrición de un individuo. Una menor concentración de albúmina en el grupo de restricción 50%R, refleja el bajo aporte proteínico en el que la madre se encontraba, ya que el tiempo de vida media en sangre de esta proteína es de aproximadamente 14 a 20 días, por lo que se deduce que al menos 21 días con una pobre ingesta deberían ser necesarios para una disminución significativa de sus niveles (White et al., 2012). En el caso de nuestro modelo de restricción, fueron 44 días y aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, sí hubo una disminución del 18.8% respecto al grupo C.

Por otro lado, los grupos suplementados 50%R+S y C+S, tendieron a presentar una mayor concentración de albúmina, comparados con 50%R y C, respectivamente. En relación con este resultado, Don y Kaysen (2004) explican que la hipoalbuminemia es el resultado de los efectos combinados de una inadecuada ingesta calórico-proteínico y una respuesta inflamatoria, esta última, originada por estrés oxidante, que podría estar previniendo el suplemento.

Un estado de desnutrición disminuye la defensa antioxidante e incrementa la producción de especies oxidantes. Esto, conduce a un desequilibrio en el estado redox del sistema, que resulta en estrés oxidante (Khare et al., 2014). Una elevada capacidad antioxidante por parte de los grupos suplementados C+S y 50%R+S, podría estar disminuyendo los radicales libres peroxilo en plasma, generados por el estrés oxidante asociado al estado de desnutrición en que se encontraban. En relación con este resultado, Ukperoro et al. (2010) reportaron que una suplementación con Zn y Se previno el estrés oxidante y la peroxidación lipídica en ratas. El Se es un elemento con un importante rol en las selenoproteínas antioxidantes para la protección en contra del estrés oxidante inducido por el exceso de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Especies reactivas de nitrógeno (NOS) (Tinggi, 2008). Por otro lado, el Zn es un elemento antioxidante por su acción en conjunto con la enzima antioxidante superoxidodismutasa (Powell, 2000).

En este sentido, los componentes de nuestro suplemento podrían tener un efecto protector sobre la aparición de enfermedades metabólicas, al disminuir la respuesta inflamatoria, que causa entre otras condiciones, un daño en el endotelio vascular por la alteración del mecanismo de producción de óxido nítrico, que está estrechamente relacionado con el padecimiento de enfermedades cardiovasculares y DT2 (Hartge, Unger, & Kintscher, 2007)(Widmer & Lerman, 2014). Para observar estos efectos tal vez fuera necesario dar suplementación por más tiempo.

En los parámetros de colesterol y triglicéridos no encontramos cambios en los grupos C+S y 50%R+S, aunque algunos ácidos grasos como DHA tienden a mejorar el perfil de lípidos a partir de un mecanismo en el cual, por un lado, la lipogénesis en hígado es disminuida, mientras que la beta oxidación de los ácidos grasos y la actividad de la apolipoproteína B100 (apoB100), que transporta colesterol endógeno a las células, aumentan (Harris, Miller, Tighe, Davidson, & Schaefer, 2017).

8.2 Efecto de la suplementación sobre la progenie en el día 28 postnatal

La restricción dietaria de la madre no tuvo efecto sobre el peso de las crías al momento del alumbramiento entre grupos. Diversos estudios han reportado que una de las consecuencias de la restricción dietaria en la gestación es el bajo peso al nacer (Khan et al., 2017)(Christian et al., 2013)(Maleta, 2006). En nuestro estudio no observamos ese comportamiento, aunque debemos considerar las diferentes condiciones involucradas, como el lapso de tiempo y porcentaje de la restricción así como los efectos asociados al suplemento administrado, que hasta donde sabemos, es la primera vez que se emplea en modelos animales. Así, la conjunción de estos factores pueden estar provocando que no observemos la disminución en el peso de las crías al nacimiento (ver Tabla 14, ANEXOS).

Fue a partir del día 5 postnatal cuando se comenzó a notar el efecto del estado de desnutrición de la madre sobre las crías, con una disminución de la velocidad en la ganancia de peso respecto a las control (ver Gráficos 2 y 3). De acuerdo a

Brighman et al. (1992), comparado con las ratas control que cubren la demanda energética y nutrimental, un estado de desnutrición crónico durante la lactancia causa un 37% en la reducción de la masa de la glándula mamaria y un 50% en la reducción del volumen de leche que provocan una reducción de 32% en el peso de la cría (Rasmussen, 1998). Aún cuando entre los días 21 al 28 postnatal, las crías terminaron de lactar y comenzaron a alimentarse por sí mismas de la dieta Chow *ad libitum*, los grupos 50%R y 50%R+S continuaron mostrando una reducción en peso en comparación con el grupo C (ver Tabla 15, ANEXOS).

A partir del día 23 postnatal hubo un mayor incremento en peso (6 g/día aproximadamente) en todos los grupos. Hardikar (2017) encontró que las crías de las madres con restricción calórica al 50%, comienzan a ganar mayor peso durante la lactancia que las control, y es hasta la semana 38 cuando llegan a pesar más y acumular mayor tejido graso que los grupos control. De acuerdo a ese resultado, valdría la pena analizar en futuros experimentos, si el suplemento está influyendo en la tendencia del grupo 50%R+S a permanecer con un menor peso que el grupo 50%R a lo largo del tiempo, sobretodo en machos; y de ser así, si su efecto se prolonga hasta la semana 38 o más. Este punto es de gran relevancia ya que se ha asociado un bajo peso al nacer o un pobre crecimiento durante las primeras etapas de la vida con el efecto *catchup growth*. Éste, es un proceso dinámico en el organismo, que se da con (Branca, 1999) o sin intervención nutricional (Adair, 1999), caracterizado por la recuperación rápida y desproporcionada en el crecimiento, tras un periodo de déficit intrauterino como lo observado por Hardikar (2017) en las ratas con restricción en la semana 38. Además, el efecto *catchup growth* ha sido asociado con una mayor deposición de grasa en relación con el tejido magro, que a largo plazo, aumenta la susceptibilidad a padecer obesidad, resistencia a la insulina, DT2 o enfermedades cardiovasculares en humanos (Dulloo, 2009). El estudio de absorciometría dual de rayos X (DXA) que nos permite visualizar la composición corporal del animal, nos indica que no hay diferencias en cuanto al porcentaje de grasa y masa magra en el día 28 postnatal en las crías de los grupos 50%R y 50%R+S (ver Tabla 8), por

lo que también sería interesante evaluar la acción de la suplementación sobre la composición corporal a largo plazo.

Por otro lado, los resultados de la densidad de masa ósea en el estudio de composición corporal (DXA) concuerda con el reportado por Hardikar (2017), en el que tiende a ser menor en los grupos restringidos 50%R y 50%R+S que en los control C y C+S. En futuros estudios, podría proponerse la adición de calcio a la suplementación para analizar si la densidad de masa ósea mejora en el grupo 50%R+S a pesar de la dieta (White, 2009).

Como era de esperarse, hubo diferencias significativas en el crecimiento en talla en el día 28 posnatal entre las crías de los grupos control y los restringidos sin efecto de la suplementación. Sin embargo, las diferencias entre los grupos no son tan exacerbadas como en el crecimiento en peso. Un bajo peso al nacer y un bajo peso para la talla (emaciación) son signos de una desnutrición moderada, no obstante, si no se hace un cambio adecuado en la alimentación, el estado puede progresar a una desnutrición grave caracterizada por una baja talla para la edad (desmedro) (OMS, 2017). Una diferencia más pronunciada en el crecimiento en peso que en talla, podría estar vinculada con que las crías no fueron sometidas directamente a una restricción dietaria y después de la lactancia tuvieron acceso *ad libitum* a una dieta Chow. De esta forma, la mayoría de crías de los grupos 50%R y 50%R+S pudieron experimentar un estado de desnutrición moderada que se vio reflejado en su bajo peso, sin llegar al grado de desnutrición tal, que una baja talla fuera tan notoria.

Bajo las condiciones de este estudio, el hígado, riñones, cerebro y páncreas alcanzaron una proporción normal acorde al peso corporal de ambos grupos de restricción. Otras investigaciones han reportado una menor proporción en el peso de algunos órganos respecto al peso corporal (ver Tabla 16, ANEXOS) cuando las crías se encuentran en un ambiente fetal carente de nutrientes en diferentes periodos de la gestación. Lo que podría estar sucediendo en este caso es que, al tener estos cuatro órganos funciones vitales en el organismo, el metabolismo

podría estar favoreciendo el uso de los nutrientes disponibles en ellos a costa de su función, o de la fisiología de otros órganos durante la programación fetal.

Particularmente el páncreas, ha desarrollado mecanismos de adaptación a las oscilaciones de abundancia y escasez de nutrientes (plasticidad celular) (Alarcon et al., 2016). A pesar de que la programación fetal lleva a una disminución en la masa de las células β pancreáticas, este es capaz de producir y responder con suficiente insulina ante un estímulo de glucosa. En este sentido, el grupo suplementado de crías macho 50%R+S tuvo una concentración menor de insulina y un menor índice HOMA-IR en el día 28 posnatal, lo que sugiere un efecto positivo del Zn (Karamali et al., 2017). Sería interesante evaluar en un estudio posterior si el suplemento contribuyó en el neurodesarrollo y el desarrollo psicomotor durante la gestación y la lactancia, respectivamente (Coletta, Bell, & Roman, 2010).

En el análisis de expresión génica de AMPK en hígado de las crías hembra, fue el grupo restringido 50%R el único que mostró una mayor expresión en relación al grupo C. Numerosos procesos fisiológicos estimulan la expresión de AMPK bajo diversas condiciones, como hipoxia, privación de glucosa, entre otras, que alteran la relación AMP/ATP intracelular. La forma activada de esta enzima es responsable de los cambios metabólicos a través de una cascada de fosforilación. El efecto neto es el cambio de un estado de consumo a uno de producción de energía a nivel local o a nivel sistémico para restaurar el balance de energía (Viollet & Andreelli, 2011). Los resultados del grupo suplementado 50%R+S, nos muestran que el suplemento evitó la activación de AMPK, teniendo ésta una expresión semejante al grupo C, tanto en crías hembra como macho.

En relación a mTOR, a través de diversas investigaciones se ha comprobado que con la activación de AMPK, su expresión disminuye por su papel en la estimulación de la síntesis de proteínas que consume energía (Kim, Kundu, Viollet, & Guan, 2011)(Alers, Löffler, Wesselborg, & Stork, 2011)(Sharma, Castorena, & Cartee, 2012). Este mismo escenario se presentó en el hígado de las crías macho

y hembra, donde se observó una disminución en la expresión de mTOR de todos los grupos respecto al C. De hecho, la disminución de la expresión fue aún más evidente en los grupos suplementados C+S y 50%R+S para ambos sexos. Sin embargo, en las crías hembra del grupo 50%R, observamos un incremento de la expresión de mTOR y deberá ser estudiado en un futuro las causas de ello. Los resultados en los machos de todos los grupos y en las hembras de los grupos C+S y 50%R+S, sugieren que el suplemento podría promover la disminución de la expresión de mTOR en hígado, dando así prioridad a las vías catabólicas para la recuperación del ATP consumido.

Los resultados obtenidos muestran como una suplementación, con nutrientes inorgánicos y vitaminas, modifica los parámetros bioquímicos tanto de las madres como de las crías así como la expresión de genes clave en el metabolismo energético. Sería conveniente que en un futuro se analizara al modelo de estudio en el día del destete, para observar los efectos inmediatos del suplemento, así como en la vida adulta, para conocer cómo influyó el suplemento en la programación fetal y su efecto en esta etapa.

9. CONCLUSIONES

Los efectos de la suplementación en el día 21 de lactancia en las madres sometidas a una dieta de restricción del 50% fueron:

- Una mejora en la sensibilidad a la insulina.
- Una mayor capacidad antioxidante que evita la respuesta inflamatoria en el organismo como consecuencia del estrés oxidativo y que permitió que la concentración de albúmina se mantuviera elevado a pesar del estado de desnutrición.

Los efectos de la suplementación en ratas sometidas a una restricción dietaria del 50% sobre sus crías en el día 28 postnatal fueron:

- Una menor concentración de insulina en las crías macho.
- Una menor expresión de mTOR en hígado, que permitiría la priorización de vías catabólicas para la generación de energía.

Por lo anterior, la suplementación diseñada representa un primer acercamiento a una posible estrategia que podría reducir los efectos negativos a nivel metabólico y genético que produce un ambiente intrauterino carente de nutrientes.

10. PERSPECTIVAS

Para futuras investigaciones sería útil evaluar el efecto de cada uno de los nutrientes que conforman la suplementación para analizar su efecto de manera individual. De esta forma, se podrían elegir aquellos micronutrientes que tienen un efecto significativo a nivel metabólico y genético sobre la progenie proveniente de madres sometidas a una restricción dietaria, como medida de reducción de costos. Además, podría evaluarse el efecto de otros micronutrientes esenciales durante la gestación y lactancia.

Una vez reformulada la suplementación, podrían evaluarse el efecto de la suplementación en F1 a nivel epigenético por medio del uso de técnicas como ChIP-seq, que ayudarían a dilucidar el mecanismo a nivel genético.

11. ANEXOS

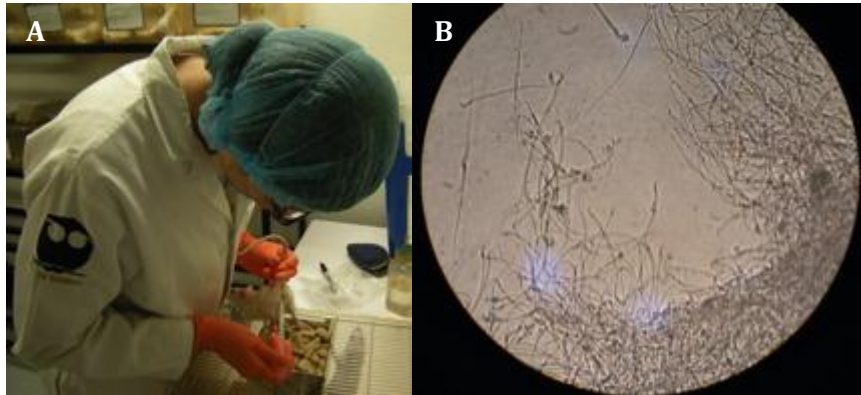


Figura 7 A) Frotis vaginal en rata, B) Presencia de espermias en prueba positiva de rata preñada.



Figura 8 Análisis de densidad ósea y composición corporal en crías (Densitómetro óseo por rayos X basado en enCORE, Lunar, GE Healthcare, UK).



Figura 9 Cuantificación de Insulina por método espectrofotométrico.

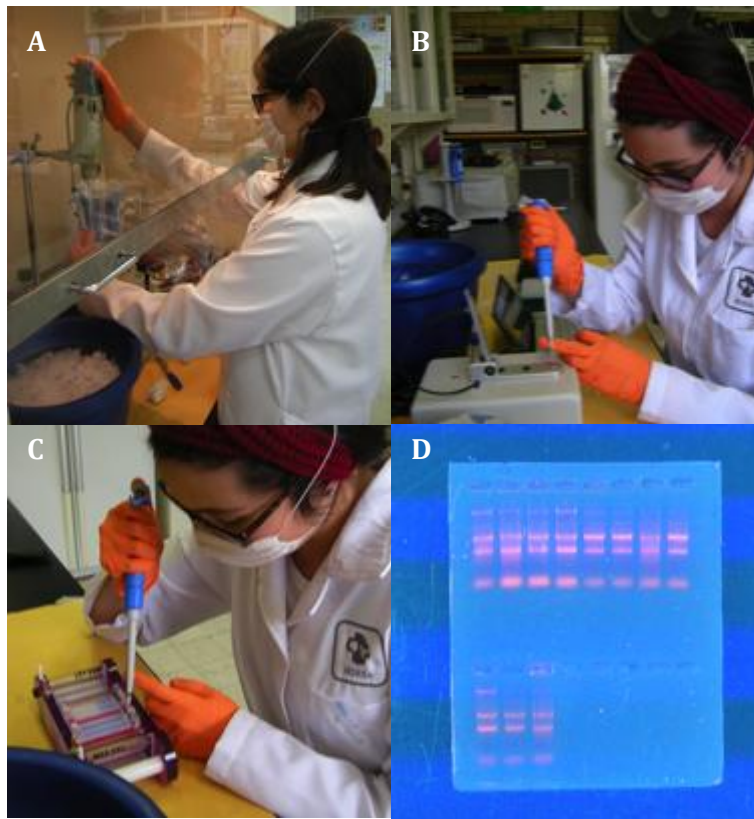


Figura 10 Proceso de extracción de RNA: A)Macerado de tejido con Politrón, B)Cuantificación de RNA con Nanodrop 1000, C)Carga de RNA de muestras en gel para electroforesis, D)Lectura de gel de electroforesis en el que se comprueba la integridad del RNA de las muestras.



Figura 11 Cuantificación de la expresión génica por qRT-PCR.

Tabla 13. Estudios relacionados con la restricción dietaria durante la gestación y/o lactancia en modelos animales.

| Autor y año | Modelo animal | Dieta | Periodo de la dieta | Efecto sobre la progenie |
|--|----------------------|--------------------------|---|--|
| Cunha <i>et al.</i> , (2015) | Rata | 50% restricción dietaria | A partir del día 10 de gestación hasta el alumbramiento | Bajo peso al nacer |
| Beauchamp <i>et al.</i> , (2015) | Ratón | 50% restricción dietaria | Del día 12 al 18 de gestación | Bajo peso al nacer (27% menos que control) |
| Jimenez-Chillaron <i>et al.</i> , (2006) | Ratón | 50% restricción dietaria | Del día 12 al 18 de gestación | Bajo peso al nacer (25% menos que control) |

Tabla 14. Pérdida o ganancia de peso corporal (%) de crías macho en el día 28 postnatal comparada con el grupo control C.

| Grupo | Machos (%) | Hembras (%) |
|-----------------------|------------|-------------|
| C+S N=16 | +4.6 | -6.2 |
| 50%R N=16 | -24.6 | -26.2 |
| 50%R+S N=16 | -35.4 | -32.3 |

Tabla 15. Efecto de la dieta sobre el peso de los órganos.

| Autor y año | Modelo animal | Dieta | Periodo de la dieta | Efecto sobre la progenie |
|------------------------------|---------------|--------------------------|-------------------------------|--|
| Desai <i>et al.</i> , (1996) | Rata | Baja en proteína | Gestación y lactancia | En el día 21 postnatal: -Pulmones y cerebro apenas mostraron un mínimo decremento en peso -Corazón, riñones y timo disminuyeron su peso en proporción al peso total -Páncreas, bazo e hígado disminuyeron su peso de manera significativa |
| Brawley <i>et al.</i> (2003) | Rata | 50% restricción protéica | Del día 10 al 23 de gestación | En el día 87 postnatal: No hubo diferencias significativas en peso en páncreas, hígado, riñón, corazón y pulmones. |
| Chen <i>et al.</i> (2009) | Ratón | 8% proteína | Gestación y lactancia | En el día 21 postnatal: Páncreas, bazo, riñones e hígado fueron significativamente más ligeros |
| Ozaki <i>et al.</i> (2001) | Rata | 30% restricción dietaria | Del día 0 al 18 de gestación | En el día 1 postnatal: -Pulmones significativamente más pequeños -El hígado significativamente más pesado En el día 100 postnatal: -Riñones significativamente menores en machos |

12. REFERENCIAS

- Adair, L. S. (1999). Filipino Children Exhibit Catch-Up Growth from Age 2 to 12 Years. *The Journal of Nutrition* , 129(6), 1140–1148. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/129/6/1140.abstract>
- Aiken, C. E., & Ozanne, S. E. (2014). Transgenerational developmental programming. *Human Reproduction Update*, 20(1), 63–75. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmt043>
- Alarcon, C., Boland, B. B., Uchizono, Y., Moore, P. C., Peterson, B., Rajan, S., ... Rhodes, C. J. (2016). Pancreatic β -Cell Adaptive Plasticity in Obesity Increases Insulin Production but Adversely Affects Secretory Function. *Diabetes*, 65(2), 438 LP-450. Retrieved from <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/65/2/438.abstract>
- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Molecular and Cellular Biology* , 32(1), 2–11. Retrieved from <http://mcb.asm.org/content/32/1/2.abstract>
- Allen, L. H. (2000). Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *The American Journal of Clinical Nutrition* , 71(5), 1280s–1284s. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/71/5/1280s.abstract>
- Alwan, N. A., Cade, J. E., McArdle, H. J., Greenwood, D. C., Hayes, H. E., & Simpson, N. A. B. (2015). Maternal iron status in early pregnancy and birth outcomes: insights from the Baby's Vascular health and Iron in Pregnancy study. *The British Journal of Nutrition*, 113(12), 1985–1992. <https://doi.org/10.1017/S0007114515001166>
- Armitage, J. A., Khan, I. Y., Taylor, P. D., Nathanielsz, P. W., & Poston, L. (2004). Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *The Journal of Physiology*, 561(Pt 2), 355–377. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072009>
- Assifi, M. M., Suchankova, G., Constant, S., Prentki, M., Saha, A. K., & Ruderman, N. B. (2005). AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 289(5), E794 LP-E800. Retrieved from <http://ajpendo.physiology.org/content/289/5/E794.abstract>
- Barker, D. J., Bull, A. R., Osmond, C., & Simmonds, S. J. (1990). Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ: British Medical Journal*, 301(6746), 259–262. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1663477/>

- Barker, D. J. P., Godfrey, K. M., Gluckman, P. D., Harding, J. E., Owens, J. A., & Robinson, J. S. (1993). Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *The Lancet*, *341*(8850), 938–941. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91224-A](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91224-A)
- Barker, D. J. P., & Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet*, *327*(8489), 1077–1081. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91340-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91340-1)
- Barman, S., & Srinivasan, K. (2016). Zinc supplementation alleviates hyperglycemia and associated metabolic abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *94*(12), 1356–1365. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0084>
- Beauchamp, B., Ghosh, S., Dysart, M., Kanaan, G. N., Chu, A., Blais, A., ... Harper, M.-E. (2015). Low birth weight is associated with adiposity, impaired skeletal muscle energetics, and weight loss resistance in mice. *International Journal of Obesity* (2005), *39*(4), 702–711. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.120>
- Beckett, G. J., & Arthur, J. R. (2005). Selenium and endocrine systems. *Journal of Endocrinology*, *184*(3), 455–465. <https://doi.org/10.1677/joe.1.05971>
- Benyshek, D. C., Johnston, C. S., & Martin, J. F. (2006). Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. *Diabetologia*, *49*(5), 1117–1119. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0196-5>
- Brawley, L., Itoh, S., Torrens, C., Barker, A., Bertram, C., Poston, L., & Hanson, M. (2003). Dietary Protein Restriction in Pregnancy Induces Hypertension and Vascular Defects in Rat Male Offspring. *Pediatr Res*, *54*(1), 83–90. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1203/01.PDR.0000065731.00639.02>
- Brigham, H. E., Sakanashi, T. M., & Rasmussen, K. M. (1992). The effect of food restriction during the reproductive cycle on organ growth and milk yield and composition in the rat. *Nutrition Research*, *12*(7), 845–856. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(05\)80642-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0271-5317(05)80642-6)
- Browne, G. J., Finn, S. G., & Proud, C. G. (2004). Stimulation of the AMP-activated Protein Kinase Leads to Activation of Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase and to Its Phosphorylation at a Novel Site, Serine 398. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 12220–12231. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309773200>
- Burdge, G. C., Slater-Jefferies, J., Torrens, C., Phillips, E. S., Hanson, M. A., & Lillycrop, K. A. (2007). Dietary protein restriction of pregnant rats in the F(0) generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F(1) and F(2) generations. *The British Journal of Nutrition*, *97*(3), 435–439. <https://doi.org/10.1017/S0007114507352392>

- Cantó, C., & Auwerx, J. (2010). AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 67(20), 3407–3423. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0454-z>
- Carlson, C. L., & Winder, W. W. (1999). Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. *Journal of Applied Physiology*, 86(2), 669 LP-674. Retrieved from <http://jap.physiology.org/content/86/2/669.abstract>
- Cederholm, T., Bosaeus, I., Barazzoni, R., Bauer, J., Van Gossum, A., Klek, S., ... Singer, P. (2017). Diagnostic criteria for malnutrition 2013; An ESPEN Consensus Statement. *Clinical Nutrition*, 34(3), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.03.001>
- Chen, J.-H., Martin-Gronert, M. S., Tarry-Adkins, J., & Ozanne, S. E. (2009). Maternal Protein Restriction Affects Postnatal Growth and the Expression of Key Proteins Involved in Lifespan Regulation in Mice. *PLoS ONE*, 4(3), e4950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004950>
- Chong, S., Vickaryous, N., Ashe, A., Zamudio, N., Youngson, N., Hemley, S., ... Whitelaw, E. (2007). Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse. *Nature Genetics*, 39(5), 614–622. <https://doi.org/10.1038/ng2031>
- Christian, P., Lee, S. E., Donahue Angel, M., Adair, L. S., Arifeen, S. E., Ashorn, P., ... Black, R. E. (2013). Risk of childhood undernutrition related to small-for-gestational age and preterm birth in low- and middle-income countries. *International Journal of Epidemiology*, 42(5), 1340–1355. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt109>
- Coletta, J. M., Bell, S. J., & Roman, A. S. (2010). Omega-3 Fatty Acids and Pregnancy. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 3(4), 163–171. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3046737/>
- Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL) (2012). Informa de pobreza en México 2012, Recuperado de: https://www.coneval.org.mx/Informes/Pobreza/Informe%20de%20Pobreza%20en%20Mexico%202012/Informe%20de%20pobreza%20en%20M%C3%A9xico%202012_131025.pdf
- Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL) (2014). Informa de pobreza en México 2012, Recuperado de: <https://www.coneval.org.mx/InformesPublicaciones/Documents/Informe-pobreza-Mexico-2014.pdf>

- Cunha, F. da S., Dalle Molle, R., Portella, A. K., Benetti, C. da S., Noschang, C., Goldani, M. Z., & Silveira, P. P. (2015). Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: the “Similarities in the Inequalities” model. *PloS One*, *10*(3), e0118586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118586>
- Davey, R. X. (2002). Birthweight and Risk for Diabetes. *Diabetes Care*, *25*(10), 1886 LP-1886. Retrieved from <http://care.diabetesjournals.org/content/25/10/1886.1.abstract>
- de Onis, M., & Blössner, M. (2003). The World Health Organization Global Database on Child Growth and Malnutrition: methodology and applications. *International Journal of Epidemiology*, *32*(4), 518–526. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyg099>
- Desai, M., Crowther, N. J., Lucas, A., & Nicholas Hales, C. (1996). *Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mother. The British journal of nutrition* (Vol. 76). <https://doi.org/10.1079/BJN19960065>
- Don, B. R., & Kaysen, G. (2004). Poor nutritional status and inflammation: Serum Albumin: Relationship to Inflammation and Nutrition. *Seminars in Dialysis*, *17*(6), 432–437. <https://doi.org/10.1111/j.0894-0959.2004.17603.x>
- Dulloo, A. G. (2009). Adipose Tissue Plasticity in Catch-Up–Growth Trajectories to Metabolic Syndrome: Hyperplastic Versus Hypertrophic Catch-Up Fat. *Diabetes*, *58*(5), 1037–1039. <https://doi.org/10.2337/db09-0290>
- Duren, D. L., Sherwood, R. J., Czerwinski, S. A., Lee, M., Choh, A. C., Siervogel, R. M., & Cameron Chumlea, W. (2008). Body Composition Methods: Comparisons and Interpretation. *Journal of Diabetes Science and Technology (Online)*, *2*(6), 1139–1146. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769821/>
- Emery, P. W. (2005). Metabolic changes in malnutrition. *Eye*, *19*, 1029. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/sj.eye.6701959>
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) (2012). Resultados Nacionales 2012. Recuperado de: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
- Food and Nutrition Board. National Academy of Sciences. National Research Council. Recommended Dietary Allowances. 11th ed. Washington, 2012.
- Frederich, M., O'Rourke, M. R., Furey, N. B., & Jost, J. A. (2009). AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, an early indicator of temperature stress. *Journal of Experimental Biology*, *212*(5), 722 LP-730. Retrieved from <http://jeb.biologists.org/content/212/5/722.abstract>

- Georgieff, M. K. (2007). Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 614S–620S. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/85/2/614S.abstract>
- Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2017). The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(4), 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.03.002>
- Goodspeed, D., Seferovic, M. D., Holland, W., Mcknight, R. A., Summers, S. A., Branch, D. W., ... Agaard, K. M. (2015). Essential nutrient supplementation prevents heritable metabolic disease in multigenerational intrauterine growth-restricted rats. *The FASEB Journal*, 29(3), 807–819. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259614>
- Gutiérrez, C., V. Guajardo y F. Álvarez Del Río, “Costo de la obesidad: Las fallas del mercado y las políticas públicas de prevención y control de la obesidad en México. Capítulo 11”, En: Rivera Dommarco, J.A., et al., *Obesidad en México: recomendaciones para una política de Estado*, México: UNAM, 2012.
- Hales, C. N., & Barker, D. J. P. (2013). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis*,†. *International Journal of Epidemiology*, 42(5), 1215–1222. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyt133>
- Haram, K., Sjøfteland, E., & Bukowski, R. (2013). *Intrauterine Growth Restriction: Effects of Physiological Fetal Growth Determinants on Diagnosis. Obstetrics and gynecology international* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/708126>
- Harder, T., Rodekamp, E., Schellong, K., Dudenhausen, J. W., & Plagemann, A. (2007). Birth Weight and Subsequent Risk of Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *American Journal of Epidemiology*, 165(8), 849–857. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwk071>
- Hardie, D. G., Carling, D., & Gamblin, S. J. (2017). AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP? *Trends in Biochemical Sciences*, 36(9), 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.06.004>
- Hardikar, A. A., Satoor, S. N., Karandikar, M. S., Joglekar, M. V., Puranik, A. S., Wong, W., ... Yajnik, C. S. (2017). Multigenerational Undernutrition Increases Susceptibility to Obesity and Diabetes that Is Not Reversed after Dietary Recuperation. *Cell Metabolism*, 22(2), 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.008>
- Harris, W. S., Miller, M., Tighe, A. P., Davidson, M. H., & Schaefer, E. J. (2017). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*, 197(1), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.008>

- Hartge, M. M., Unger, T., & Kintscher, U. (2007). The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 4(2), 84–88. <https://doi.org/10.3132/dvdr.2007.025>
- Haugen, A. C., Schug, T. T., Collman, G., & Heindel, J. J. (2015). Evolution of DOHaD: the impact of environmental health sciences. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 6(2), 55–64. <https://doi.org/10.1017/S2040174414000580>
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Mäkelä, T. P., ... Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology*, 2(4), 28. <https://doi.org/10.1186/1475-4924-2-28>
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., ... Hardie, D. G. (2017). Calmodulin-dependent protein kinase kinase; is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, 2(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>
- Heard, E., & Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell*, 157(1), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>
- Heindel, J. J., & Vandenberg, L. N. (2015). Developmental Origins of Health and Disease: A Paradigm for Understanding Disease Etiology and Prevention. *Current Opinion in Pediatrics*, 27(2), 248–253. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000191>
- Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W., & Leff, T. (2003). AMP-activated Protein Kinase Regulates HNF4 α Transcriptional Activity by Inhibiting Dimer Formation and Decreasing Protein Stability. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27495–27501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304112200>
- Innis, S. M., & Friesen, R. W. (2008). Essential n-3 fatty acids in pregnant women and early visual acuity maturation in term infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 548–557. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/87/3/548.abstract>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2014). Encuesta nacional de ingresos y gastos de los hogares 2014. Recuperado de: http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/promo/resultados_enigh14.pdf
- Jimenez-Chillaron, J. C., Hernandez-Valencia, M., Lightner, A., Faucette, R. R., Reamer, C., Przybyla, R., ... Patti, M. E. (2006). Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. *Diabetologia*, 49(8), 1974–1984. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0311-7>

- Jimenez-Chillaron, J. C., Isganaitis, E., Charalambous, M., Gesta, S., Pentinat-Pelegrin, T., Faucette, R. R., ... Patti, M.-E. (2009). Intergenerational Transmission of Glucose Intolerance and Obesity by In Utero Undernutrition in Mice. *Diabetes*, *58*(2), 460–468. <https://doi.org/10.2337/db08-0490>
- Johnson, S. C., Rabinovitch, P. S., & Kaeberlein, M. (2013). mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, *493*(7432), 338–345. <https://doi.org/10.1038/nature11861>
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D. G. (2017). AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism*, *1*(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.003>
- Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, *46*(1), 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-1009-0>
- Karamali, M., Heidarzadeh, Z., Seifati, S. M., Samimi, M., Tabassi, Z., Hajjafari, M., ... Esmailzadeh, A. (2017). Zinc supplementation and the effects on metabolic status in gestational diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Diabetes and Its Complications*, *29*(8), 1314–1319. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.07.001>
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., & Uyeda, K. (2002). Mechanism for Fatty Acid “Sparing” Effect on Glucose-induced Transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by amp-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(6), 3829–3835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107895200>
- Ke, X., Lei, Q., James, S. J., Kelleher, S. L., Melnyk, S., Jernigan, S., ... Lane, R. H. (2006). Uteroplacental insufficiency affects epigenetic determinants of chromatin structure in brains of neonatal and juvenile IUGR rats. *Physiological Genomics*, *25*(1), 16 LP-28. Retrieved from <http://physiolgenomics.physiology.org/content/25/1/16.abstract>
- Khan, M. N., Rahman, M. M., Shariff, A. A., Rahman, M. M., Rahman, M. S., & Rahman, M. A. (2017). Maternal undernutrition and excessive body weight and risk of birth and health outcomes. *Archives of Public Health*, *75*, 12. <https://doi.org/10.1186/s13690-017-0181-0>
- Khare, M., Mohanty, C., Das, B. K., Jyoti, A., Mukhopadhyay, B., & Mishra, S. P. (2014). Free radicals and antioxidant status in protein energy malnutrition. *Int J Pediatr*. <https://doi.org/10.1155/2014/254396>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, *13*, 132. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2152>

- King, J. (2000). *Determinants of Maternal Zinc Status during Pregnancy. The American journal of clinical nutrition* (Vol. 71).
- Lakshmy, R. (2013). Metabolic syndrome: Role of maternal undernutrition and fetal programming. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14(3), 229–240. <https://doi.org/10.1007/s11154-013-9266-4>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Laurence, K. M., James, N., Miller, M. H., Tennant, G. B., & Campbell, H. (1981). Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 282(6275), 1509–1511. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1505459/>
- Li, S., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3441–3446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914798107>
- Maleta, K. (2006). Undernutrition. *Malawi Medical Journal: The Journal of Medical Association of Malawi*, 18(4), 189–205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3345626/>
- Marsin, A.-S., Bertrand†, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent‡, M. F., Hue, L. (2017). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology*, 10(20), 1247–1255. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00742-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00742-9)
- McArdle, H. J., Andersen, H. S., Jones, H., & Gambling, L. (2017). Fetal Programming: Causes and Consequences as Revealed by Studies of Dietary Manipulation in Rats – A Review. *Placenta*, 27, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.01.014>
- Moya, J., Phillips, L., Sanford, J., Wooton, M., Gregg, A., & Schuda, L. (2014). A review of physiological and behavioral changes during pregnancy and lactation: Potential exposure factors and data gaps. *Journal Of Exposure Science And Environmental Epidemiology*, 24, 449. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/jes.2013.92>
- Murphy, V. E., Smith, R., Giles, W. B., & Clifton, V. L. (2006). Endocrine Regulation of Human Fetal Growth: The Role of the Mother, Placenta, and Fetus. *Endocrine Reviews*, 27(2), 141–169. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/er.2005-0011>

- NORMA Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. Diario Oficial de la Federación, México, 28 de mayo de 2012
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2009), Curso de Capacitación sobre la Evaluación del Crecimiento del Niño. Patrones de Crecimiento del Niño de la OMS. Interpretando los Indicadores., Recuperado de: http://www.who.int/childgrowth/training/c_interpretando.pdf?ua=1
- Ozaki, T., Nishina, H., Hanson, M. A., & Poston, L. (2001). Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *The Journal of Physiology*, 530(Pt 1), 141–152. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0141m.x>
- Pembrey, M., Saffery, R., Bygren, L. O., & Epidemiology, N. in E. (2014). Human transgenerational responses to early-life experience: potential impact on development, health and biomedical research. *Journal of Medical Genetics*, 51(9), 563–572. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102577>
- Pinheiro, A. R., Salvucci, I. D. M., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2008). Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clinical Science*, 114(5), 381 LP-392. Retrieved from <http://www.clinsci.org/content/114/5/381.abstract>
- Portha, B., Chavey, A., & Movassat, J. (2011). Early-Life Origins of Type 2 Diabetes: Fetal Programming of the Beta-Cell Mass. *Experimental Diabetes Research*, 2011, 105076. <https://doi.org/10.1155/2011/105076>
- Powell, S. R. (2000). The Antioxidant Properties of Zinc. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1447S–1454S. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/130/5/1447S.abstract>
- Procter, S. B., & Campbell, C. G. (2017). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Nutrition and Lifestyle for a Healthy Pregnancy Outcome. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(7), 1099–1103. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.05.005>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4280562/>
- Rasmussen, K. M. (1998). Effects of Under- and Overnutrition on Lactation in Laboratory Rats. *The Journal of Nutrition*, 128(2), 390S–393S. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/128/2/390S.abstract>

- Rayman, M. P. (2017). The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356(9225), 233–241. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02490-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02490-9)
- Sengupta, S., Peterson, T. R., Laplante, M., Oh, S., & Sabatini, D. M. (2010). mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature*, 468(7327), 1100–1104. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature09584>
- Sharma, N., Castorena, C. M., & Cartee, G. D. (2012). Tissue-specific responses of IGF-1/insulin and mTOR signaling in calorie restricted rats. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038835>
- Stanfel, M. N., Shamieh, L. S., Kaerberlein, M., & Kennedy, B. K. (2009). The TOR pathway comes of age. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(10), 1067–1074. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.06.007>
- Stevens, G. A., Finucane, M. M., De-Regil, L. M., Paciorek, C. J., Flaxman, S. R., Branca, F., ... (Anaemia), on behalf of N. I. M. S. G. (2013). Global, regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe anaemia in children and pregnant and non-pregnant women for 1995–2011: a systematic analysis of population-representative data. *The Lancet. Global Health*, 1(1), e16–e25. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70001-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70001-9)
- Stuebe, A. M., & Rich-Edwards, J. W. (2009). The Reset Hypothesis: Lactation and Maternal Metabolism. *American Journal of Perinatology*, 26(1), 81–88. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1103034>
- Tinggi, U. (2008). Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13(2), 102–108. <https://doi.org/10.1007/s12199-007-0019-4>
- Torrens, C., Poston, L., & Hanson, M. A. (2008). Transmission of raised blood pressure and endothelial dysfunction to the F2 generation induced by maternal protein restriction in the F0, in the absence of dietary challenge in the F1 generation. *British Journal of Nutrition*, 100(4), 760–766. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0007114508921747>
- Uyoyo Ukperoro, J., Offiah, N., Idris, T., & Awogoke, D. (2010). Antioxidant effect of zinc, selenium and their combination on the liver and kidney of alloxan-induced diabetes in rats. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 25–30. <https://doi.org/10.1007/s12349-009-0069-9>
- Velásquez-Melendez, G., Schlüssel, M. M., Brito, A. S., Silva, A. A. M., Lopes-Filho, J. D., & Kac, G. (2011). Mild but Not Light or Severe Food Insecurity Is Associated with Obesity among Brazilian Women. *The Journal of Nutrition*, 141(5), 898–902. <https://doi.org/10.3945/jn.110.135046>

- Vikse, B. E., Irgens, L. M., Leivestad, T., Hallan, S., & Iversen, B. M. (2008). Low Birth Weight Increases Risk for End-Stage Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 19(1), 151–157. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007020252>
- Viollet, B., & Andreelli, F. (2011). AMP-activated protein kinase and metabolic control. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (203), 303–330. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17214-4_13
- Viollet, B., Athea, Y., Mounier, R., Guigas, B., Zarrinpashneh, E., Horman, S., ... Bertrand, L. (2009). AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 19–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2666987/>
- Viollet, B., Guigas, B., Leclerc, J., Hébrard, S., Lantier, L., Mounier, R., ... Foretz, M. (2009). AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 196(1), 81–98. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01970.x>
- Wang, N., Wang, X., Li, Q., Han, B., Chen, Y., Zhu, C., ... Lu, Y. (2017). The famine exposure in early life and metabolic syndrome in adulthood. *Clinical Nutrition*, 36(1), 253–259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.11.010>
- White, C. P. (2009). Calcium metabolism in pregnancy and lactation. *Obstetric Medicine*, 2(1), 2–5. <https://doi.org/10.1258/om.2008.080013>
- White, J. V., Guenter, P., Jensen, G., Malone, A., Schofield, M., Group, A. M. W., Directors, and the A. S. P. E. N. B. of. (2012). Consensus Statement: Academy of Nutrition and Dietetics and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: Characteristics Recommended for the Identification and Documentation of Adult Malnutrition (Undernutrition). *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(3), 275–283. <https://doi.org/10.1177/0148607112440285>
- Widmer, R. J., & Lerman, A. (2014). Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Global Cardiology Science & Practice*, 2014(3), 291–308. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.43>
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., ... Carling, D. (2017). LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Current Biology*, 13(22), 2004–2008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.031>
- Wu, C. -t., & Morris, J. R. (2001). Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science*, 293(5532), 1103 LP-1105. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/293/5532/1103.abstract>

- Wu, G., Bazer, F. W., Cudd, T. A., Meininger, C. J., & Spencer, T. E. (2004). Maternal Nutrition and Fetal Development. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2169–2172. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/134/9/2169.abstract>
- Yuan, H.-X., Xiong, Y., & Guan, K.-L. (2013). Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. *Molecular Cell*, 49(3), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.019>