



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

LICENCIATURA EN NUTRICIÓN

**TESIS**

**EFECTO A LARGO PLAZO DE LA  
SUPLEMENTACIÓN EN GESTACIÓN CON ILE,  
PRO Y GLY EN INDICADORES METABÓLICOS Y  
ADIPOSIDAD DE CRÍAS DE RATAS WISTAR CON  
RESTRICCIÓN PROTEICA**

Para obtener el título de

**Licenciada en Nutrición**

**PRESENTA**

Azucena González Moreno

**Directora**

Dra. Guadalupe López Rodríguez

**Codirector**

Dr. Teodoro Suárez Diéguez

**Comité tutorial**

Dra. Diana Patricia Olivo Ramírez

Dr. Luis Delgado Olivares

San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo., México., febrero, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

De acuerdo con el artículo 40 y 43 del Reglamento de Titulación vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión el trabajo de la Tesis titulada:

**"EFECTO A LARGO PLAZO DE LA SUPLEMENTACIÓN EN GESTACIÓN CON ILE, PRO Y GLY EN INDICADORES METABÓLICOS Y ADIPOSIDAD DE CRÍAS DE RATAS WISTAR CON RESTRICCIÓN PROTEICA"**

Que para obtener el Título de Licenciada de Nutrición en la modalidad "Elaboración de tesis mediante examen recepcional" sustenta la Pasante

**C. Azucena González Moreno**

**ATENTAMENTE**  
Pachuca de Soto, Hidalgo, 14 de febrero de 2023  
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE:	DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ
SECRETARÍO:	DRA. DIANA PATRICIA OLIVO RAMÍREZ
PRIMER VOCAL:	DR. TEODORO SUÁREZ DIÉGEZ
SUPLENTE	DR. LUIS DELGADO OLIVARES



Handwritten signatures in blue ink corresponding to the names in the table above, placed over horizontal lines.

## **Dedicatoria**

A mis padres por su apoyo y amor incondicional, por creer en mí e impulsar mis logros.

A mi madre por su amor infinito, sus palabras correctas en los peores momentos y sus brazos reconfortantes.

A mi padre por el esfuerzo y trabajo que ha realizado día a día soñando un futuro mejor para sus hijos.

A mis hermanos por su cariño, apoyo y fe en mí.

A mí por saber afrontar ciertos obstáculos y tratar de ser mejor cada día.

## **Agradecimientos**

A las personas que contribuyeron al desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Guadalupe por su tiempo, dedicación, enseñanza y sobre todo paciencia para la revisión y realización de esta tesis. Por brindar un ambiente agradable y respetuoso durante mí servicio social. Es un ejemplo de admiración, de trabajo, responsabilidad y amor por la Nutrición, le agradezco este gran aporte a mi persona y formación académica.

Al Dr. Teodoro por ser pieza importante en el comité de esta tesis, por sus observaciones y aportaciones congruentes.

A la Dra. Diana Olivo y el Dr. Luis Delgado quienes aportaron importantes y acertadas observaciones durante la revisión de este trabajo.

A cada uno de los profesores que durante la Licenciatura me aportaron enseñanza, conocimiento y amor por mi carrera.

A Vianey, Yeini y Kari con quienes compartí momentos agradables, divertidos y de apoyo durante el servicio.

A mi novio que siempre me escucha, me acompaña y tiene las palabras correctas en los momentos que no confiaba en mí y a cada uno de mis amigos que confían en mí y me brindan su cariño sincero.

De este periodo aprendí mucho sobre mí, me llevo grandes recuerdos y enseñanzas y espero que sea el inicio de mejores cosas en mi camino.

## Índice general

Dedicatoria .....	1
Agradecimientos.....	4
Índice de tablas .....	7
Índice de figuras.....	8
Lista de abreviaturas .....	8
1. Resumen .....	10
2. Marco Teórico.....	12
2.1 Restricción proteica.....	12
2.2 Tipos de restricción proteica .....	12
2.2.1 Dieta baja en proteína.....	13
2.3 Efectos de la restricción de nutrientes durante la gestación .....	13
2.3.1 Efectos a corto plazo de la restricción proteica en gestación .....	15
2.3.2 Efectos a largo plazo de la restricción proteica en gestación .....	16
2.4 Indicadores de síndrome metabólico y de adiposidad en restricción proteica 17	
2.5 Intervenciones nutricionales durante la gestación.....	18
2.5.1 Suplementación proteica en gestación .....	18
2.6 Requerimiento de proteínas o aminoácidos en gestación.....	19
2.9 Isoleucina.....	21
2.9.1. Función de la Isoleucina en procesos fisiológicos .....	21
2.10 Prolina.....	22
2.10.1 Funciones de la Prolina en procesos fisiológicos.....	23
2.11 Glicina .....	23
2.11.1 Funciones de la Glicina en procesos fisiológicos.....	23
3. Problema de Investigación.....	24
4. Justificación .....	25
5. Hipótesis .....	26
6. Objetivos.....	26
6.1 Objetivo general.....	26

6.2	Objetivos específicos .....	26
7.	Material y métodos .....	27
7.1	Esquemas de suplementación para las ratas Wistar madre .....	27
7.2	Condiciones de alojamiento de las crías .....	29
7.3	Registro de peso e ingesta calórica en las crías .....	29
7.4	Sacrificio y extracción de sangre.....	31
7.5	Medición de indicadores bioquímicos .....	31
7.6	Disección y medición de tejido adiposo .....	33
7.7	Análisis estadístico.....	34
7.8	Aspectos éticos .....	34
8.	Resultados.....	35
8.1	Características generales del estudio .....	35
8.2	Promedio de peso de ratas Wistar por edad y sexo.....	35
8.3	Ingesta semanal de energía por edad y sexo .....	36
8.4	Cantidad de tejido adiposo almacenado .....	38
8.5	Indicadores bioquímicos .....	39
9.	Discusión.....	41
10.	Conclusión .....	46
11.	Bibliografía.....	47
	Anexo 1. Dictamen comité de ética .....	57

## Índice de tablas

Tabla 1. Recomendaciones de ingesta de aminoácidos en mujeres y ratas durante la gestación.....	19
Tabla 2. Composición de nutrientes en la dieta AIN-93G y AIN-93M para roedores..	27
Tabla 3. Formulaciones de las dietas para el periodo de mantenimiento (AIN-93M), gestación y lactancia (AIN-93G) de ratas hembra Wistar .....	28
Tabla 4. Composición nutricional y aporte calórico del alimento formula Lab Diet 5008 para roedores.....	29
Tabla 5. Cambio del peso corporal de ratas Wistar hembra suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia.....	34
Tabla 6. Cambio de peso corporal de ratas Wistar macho suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia.....	35
Tabla 7. Cambios de ingesta por semana de vida de ratas Wistar hembras suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia.....	36
Tabla 8. Cambios de ingesta por semana de vida de ratas Wistar machos suplementados con aminoácidos durante su gestación y lactancia.....	37
Tabla 9. Tejido adiposo de ratas Wistar hembras nacidas de madres suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia.....	37
Tabla 10. Tejido adiposo de ratas Wistar macho nacidos de madres suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia.....	38
Tabla 11. Indicadores bioquímicos de ratas Wistar hembra suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia.....	39
Tabla 12. Indicadores bioquímicos de ratas Wistar macho nacidos de madres suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia.....	39

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura Isoleucina.....	20
Figura 2. Estructura Prolina.....	21
Figura 3. Estructura Glicina.....	22

## Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
ALB	Albúmina
BCAA	Aminoácidos de cadena ramificada
BPN	Bajo peso al nacer
cHDL	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
Cont	Grupo control
CT	Colesterol total
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMO	Densidad mineral ósea
DNMT1	ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1
EAA	Aminoácidos esenciales
FGF21	Factor de crecimiento de fibroblastos
GBP	Grupo bajo en proteínas
GCR	Receptor de glucocorticoides o NR3C1
GCR	Receptor de glucocorticoides o NR3C1
Glu	Glucosa
Gly	Glicina
HA	Hipertensión arterial
IDR	Ingesta diaria recomendada

IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGFBP3	Proteína transportadora 3 del factor de crecimiento similar a la insulina
Ile	Isoleucina
IP	Grupo isoleucina y prolina
IPG	Grupo isoleucina, prolina y glicina
LDL	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
NEAA	Aminoácidos no esenciales
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico (NMDA).
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PPAR	Receptor activado por proliferador de peroxisomas
Pro	Prolina
PT	Proteínas totales
RI	Resistencia a la insulina
RP	Restricción proteica
SM	Síndrome metabólico
TA	Tejido adiposo
TAG	Tejido adiposo gonadal
TAM	Tejido adiposo mesentérico
TAR	Tejido adiposo retroperitoneal
TAT	Tejido adiposo total
TG	Triglicéridos
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral

## 1. Resumen

**Introducción:** La restricción del crecimiento *in útero* es un problema asociado a la insuficiente ingesta de energía y proteínas en las madres gestantes, y que por programación fetal tiene efectos a corto y largo plazo en la salud de sujetos que se desarrollaron bajo estas condiciones. **Objetivos:** Evaluar el efecto a largo plazo de la suplementación con Isoleucina, Prolina y Glicina en indicadores metabólicos y adiposidad de crías de ratas Wistar con restricción proteica durante su gestación y lactancia. **Material y métodos:** Se realizó un estudio experimental longitudinal con 45 crías de ratas Wistar distribuidas en los siguientes grupos de intervención de acuerdo con el tratamiento de gestación y lactancia de sus ratas madre: 1) grupo control (Cont), 2) grupo bajo en proteínas (GPB), 3) grupo isoleucina-prolina (IP) y, 5) grupo isoleucina, prolina, glicina (IPG). En las crías durante 5 meses se registró el consumo de alimento y peso corporal de manera semanal y mensual respectivamente, al finalizar el estudio se obtuvieron los tejidos adiposos: mesentérico (TAM), gonadal (TAG) y retroperitoneal (TAR); y se cuantificó en suero: glucosa (Glu), triglicéridos (TG), colesterol total (CT), colesterol HDL (cHDL), proteínas totales (PT) y albúmina (Alb). Los datos se procesaron con el paquete estadístico SPSS© versión 21.0 para Windows. **Resultados:** Los datos obtenidos de peso corporal e ingesta energética no mostraron cambios en los grupos suplementados, sin embargo, sí hubo un menor peso e ingesta de alimento en el GBP ( $p < 0.05$ ). El grupo IPG y el GBP presentaron menor cantidad de TAG y tejido adiposo total, respectivamente. Se presentaron bajas concentraciones de cHDL (hembras IP), Glu (machos IP) y TG (hembras IPG, machos todos) en comparación con el grupo control. **Conclusiones:** Las crías del grupo GBP son las más pequeñas en la edad adulta, este efecto se revierte cuando sus madres se suplementan con los aminoácidos Iso, Pro y Gly. En la edad adulta se presenta una menor acumulación de tejido adiposo en las crías macho de los grupos GBP e IPG, se obtuvieron efectos en el metabolismo lipídico de TG y cHDL, además de una elevación de glucosa sérica en el grupo IP de hembras.

**Palabras clave:** Restricción proteica, suplementación, aminoácidos, gestación, tejido adiposo, indicadores metabólicos.

## **Abstract**

**Introduction:** In utero growth restriction is a problem associated with insufficient energy and protein intake in pregnant mothers, and which, due to fetal programming, has short- and long-term effects on the health of subjects who developed under these conditions. **Objectives:** To evaluate the long-term effect of supplementation with Isoleucine, Proline and Glycine on metabolic indicators and adiposity of Wistar rat pups with protein restriction during pregnancy and lactation. **Material and methods:** A longitudinal experimental study was carried out with 45 Wistar rat pups distributed in the following intervention groups according to the gestation and lactation treatment of their mother rats: 1) control group (Cont), 2) group low in proteins (GPB), 3) isoleucine-proline group (IP) and, 5) isoleucine, proline, glycine group (IPG). In the offspring, the consumption of food and weight was recorded weekly and monthly, respectively, for 5 months. At the end of the study, the adipose tissues were obtained: mesenteric (TAM), gonadal (TAG) and retroperitoneal (TAR); and serum glucose (Glu), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), HDL cholesterol (HDLc), total protein (PT) and albumin (Alb) were quantified. The data was processed with the statistical package SPSS© version 21.0 for Windows. **Results:** The data obtained from body weight and energy intake did not show changes in the supplemented groups, however, there was a lower weight and food intake in the GBP ( $p < 0.05$ ). The IPG and GBP groups presented a lower amount of TAG and total adipose tissue, respectively. Low concentrations of cHDL (IP females), Glu (IP males) and TG (IPG females, all males) were present compared to the control group. **Conclusions:** The offspring of the (GBP) group are the smallest in adulthood, this effect is reversed when their mothers are supplemented with the amino acids Iso, Pro and Gly. In adulthood there is a lower accumulation of adipose tissue in the male offspring of the GBP and IPG groups, effects were obtained on the lipid metabolism of TG and HDLc, in addition to an increase in serum glucose in the IP group of females.

**Keywords:** Protein restriction, supplementation, amino acids, pregnancy, adipose tissue, metabolic indicators.

## **2. Marco Teórico**

### **2.1 Restricción proteica**

La restricción de proteínas (RP) o de los tres aminoácidos de cadena ramificada; leucina, isoleucina y valina, es suficiente para promover la pérdida de peso (1) y mejorar la regulación de la glucosa en sangre, la restricción proteica se entiende como una baja ingesta de proteínas o de cierto tipo de aminoácidos, otros estudios indican que se requiere la restricción de isoleucina, pero no de leucina o valina, para observar todos los efectos beneficiosos de una dieta baja en proteínas (2, 3). Cuando existe una deficiencia de proteínas o de algún aminoácido esencial se afecta el anabolismo proteico o el recambio de proteínas, en donde, el equilibrio de la degradación y resíntesis tiene como resultado un estado catabólico que afecta los tejidos magros (4).

La deficiencia de proteínas en el periodo gestacional puede comprometer el sano desarrollo y crecimiento fetal, así como condicionar el riesgo de enfermedades en la vida adulta, en la actualidad se dispone de evidencia científica que comprueba que el uso de suplementos mejora los resultados perinatales (5); durante el embarazo, una etapa de la vida definida por un rápido crecimiento y desarrollo, la ingesta adecuada de proteína dietética es crucial para garantizar un resultado saludable, el depósito de proteínas en los tejidos maternos y fetales aumenta durante el embarazo, y la mayoría ocurre durante el tercer trimestre (6). Varias semanas después de la concepción, se producen ajustes en el metabolismo de las proteínas para apoyar el crecimiento y desarrollo fetal, mientras se mantiene la homeostasis materna y el organismo se prepara para la lactancia (7).

### **2.2 Tipos de restricción proteica**

Una ingesta persistentemente alta o baja de proteínas conduce a un aumento o disminución general en la tasa de catabolismo proteico que es parcialmente independiente de las concentraciones de aminoácidos circulantes (4). Las dietas bajas en proteínas (<90% del requerimiento) son un tipo de restricción proteica.

### **2.2.1 Dieta baja en proteína**

En edad adulta sin gestación o lactancia una dieta baja en proteína aporta entre el 4% y el 8% del aporte proteico, lo que es notablemente menor al requerimiento normal adecuado (15%) (8), los efectos de una alimentación prolongadamente expuesta a este tipo de dieta provocan una caída en el nivel plasmático de la mayoría de los aminoácidos esenciales y conlleva a una desnutrición proteica, la cual tiene consecuencias más graves durante el desarrollo; una de estas consecuencias es la inhibición del crecimiento, el cual está controlado por una compleja interacción de factores genéticos, hormonales y nutricionales y gran parte de este control se debe a la hormona del crecimiento y a los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) (9), también se reduce la generación de desechos nitrogenados e iones inorgánicos que pueden ser responsables de diversas alteraciones clínicas y metabólicas; como la hiperfosfatemia, acidosis metabólica, hiperpotasemia y otros trastornos electrolíticos (10).

En modelos animales otras condiciones que generan una restricción energético-proteica son el aumento de camada: al aumentarse o duplicarse el número de crías lactantes de una madre aumenta también la disponibilidad de nutrientes específicos como las proteínas, por lo que una gestación con mayores crías incrementa el requerimiento proteico (11). Las dietas hipo-proteicas se aplican en periodo de gestación o lactancia según se requiera (12), estas dietas generalmente aportan el 10% del valor calórico total.

### **2.3 Efectos de la restricción de nutrientes durante la gestación**

En México, en el 2020 se registraron 22,637 muertes fetales, las cuales corresponden a una tasa nacional de 6.7 por cada 10,000 mujeres (13). La prevalencia de bajo peso al nacer (BPN) es de 10.9% en países desarrollados, mientras que en países subdesarrollados aumenta entre un 35 y 40% (14, 15). En el 2019 la prevalencia de BPN en México fue de 7.1% (16).

Muchas de estas muertes y BPN se asocian a la deficiencia de nutrimentos durante la gestación (17). Por la importancia de la gestación en el crecimiento y desarrollo del ser vivo; se han desarrollado diversas investigaciones enfocadas a los efectos de la

nutrición utilizando distintos modelos en animales de investigación para evaluar respuestas a distintos estímulos durante su etapa gestante y los efectos en su futura descendencia (17-19).

La restricción o mayor disponibilidad de nutrientes (micronutrientes y macronutrientes) durante la gestación ha demostrado efectos adversos sobre el crecimiento fetal, desarrollo postnatal, reproductivo y vida adulta, a corto y largo plazo en un estudio realizado en ovinos (17).

Los diversos estímulos recibidos durante la gestación son un factor determinante para el desarrollo *in útero* y a largo plazo de la descendencia; los cambios metabólicos establecidos en el desarrollo embrionario establecerán patrones fisiológicos y estructurales específicos a largo plazo que de cierta forma “programarán” la salud durante la vida adulta (20). La restricción proteica (RP) materna durante la gestación es uno de los principales determinantes que afectan el desarrollo fetal. Estudios epidemiológicos en humanos y en animales han demostrado que la mala nutrición materna tiene consecuencias adversas en la descendencia y que conduce a cambios permanentes con consecuencias en la salud (17).

Se ha demostrado que la restricción durante la gestación afecta irreversiblemente la estructura, metabolismo y función de diversos órganos, programando en ellos patologías futuras e individuos expuestos a esta presentan niveles menores de insulina y de factores de crecimiento similares a la insulina como IGF-1 (Factor de crecimiento insulínico tipo 1) e IGFBP3 (Proteína transportadora 3 del factor de crecimiento similar a la insulina), estas alteraciones son consecuencia de la restricción proteico-calórica y pueden tener efectos permanentes si ésta ocurre en un periodo crítico durante la etapa del desarrollo fetal (20).

El desarrollo embrionario está determinado por tres factores importantes: a) el estado nutricional materno, b) la función placentaria y, c) la capacidad fetal de utilización de nutrimentos. Las alteraciones en la alimentación materna y en la función de la placenta, pueden producir alteraciones del crecimiento fetal (21). Los estímulos

durante periodos críticos de la vida intrauterina causan efectos a lo largo de la vida posterior, está establecido en biología del desarrollo y ha sido denominado “programación fetal” (22). Esta programación es un proceso de adaptación en el que la nutrición u otros factores ambientales alteran las vías de desarrollo durante el período de crecimiento prenatal, induciendo con ello cambios en el metabolismo postnatal y la susceptibilidad de los adultos a la enfermedad crónica (23).

En cuanto a la nutrición materna existen dos condiciones importantes que determinan la programación metabólica fetal y el origen del desarrollo de salud-enfermedad en la descendencia adulta (24). Los primeros estudios epidemiológicos que relacionaron la nutrición materna y sus efectos sobre la salud en su descendencia se realizaron mediante la observación en sujetos expuestos a un medio ambiente de carencia. A finales de la segunda guerra mundial los hombres holandeses que padecieron hambruna en etapa postnatal temprana presentaron una menor tasa de obesidad en la adultez en comparación con aquellos expuestos en el primer y segundo trimestre de su gestación (25). Por otro lado, individuos expuestos a la hambruna durante el 2do semestre de gestación aumentaron el riesgo de padecer hipertensión arterial (26).

Dichas observaciones se han corroborado por medio de estudios en modelos animales, en los cuales se ha encontrado que la restricción de energía y la deficiencia de nutrientes específicos como vitaminas y minerales durante diversas etapas gestacionales inducen al desarrollo de enfermedades no transmisibles en las crías durante la adultez (27). Se han determinado también cambios en la expresión de genes dados por diversos estímulos y que generan una predisposición a padecer enfermedades en edad adulta (28, 29).

### **2.3.1 Efectos a corto plazo de la restricción proteica en gestación**

Cuando el feto está expuesto a un ambiente de carencia y bajo aporte de nutrientes vitales para su desarrollo se desencadena una serie de respuestas adaptativas que generarán una importante pérdida celular en diferentes órganos y sistemas en desarrollo con la finalidad de evitar un daño grave en órganos de suma importancia como el cerebro, esta descompensación tendrá sus efectos en el retraso del

crecimiento uterino, BPN y programación fetal de enfermedades (30, 31) que se manifestarán en la edad adulta.

Se han encontrado diferentes efectos en el peso al nacer de crías con madres en RP incluyendo; bajo peso, un peso normal o incremento de peso por lo cual se atribuye al nivel de RP al que fueron expuestos (17). La desnutrición y baja cantidad de proteínas durante la última etapa de la gestación provocan un retraso del crecimiento fetal de forma asimétrica, mientras que la restricción de proteínas durante todo el periodo fetal conduce a un desarrollo inadecuado del páncreas, provocando niveles séricos inferiores de IGF-1, afectando así el metabolismo glucémico durante las primeras etapas de la vida de crías de ternero (17). Otra alteración provocada en la descendencia de crías con RP durante el embarazo es en el sistema de renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (32).

### **2.3.2 Efectos a largo plazo de la restricción proteica en gestación**

Estudios en animales concluyen que el nivel de proteína disponible durante la gestación compromete la regulación de la glucosa en los primeros años de vida de las crías (17). Cuando la restricción o deficiencia calórica se presenta en etapa tardía de la gestación las alteraciones cardiovasculares se hacen presentes, sin embargo, no se desarrolla hipertensión arterial (HA) (24). Es bien sabido que varios órganos y tejidos están asociados al control de la presión arterial, pero el riñón en particular es mayormente afectado durante la desnutrición fetal, ya que se reduce el número de nefronas y aumenta el estrés oxidativo, se presenta activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y hay cambios en el transporte de sodio (33).

Los efectos de la RP a largo plazo están altamente relacionados con sus efectos a corto plazo, pues según estudios de programación fetal, se ha encontrado un alto índice de asociación entre el BPN y el riesgo de desarrollar enfermedades no transmisibles en la vida adulta (34). O bien un retraso en el crecimiento fetal conduce a un estado de la resistencia a la insulina en la etapa adulta, el peso al nacimiento está inversamente relacionado con el riesgo de padecer HA y diabetes tipo 2 (DM2), lo que quiere decir que mientras menor sea el peso al nacer mayor es el riesgo (20).

El tejido adiposo (TA) se reduce notablemente en recién nacidos con BPN debido a la limitada acumulación de grasa en los adipocitos. Sin embargo, individuos con BPN que durante su desarrollo y vida adulta compensan esta deficiencia con una mayor ingesta de alimentos tienden a manifestar obesidad acompañada de síndrome metabólico (35).

#### **2.4 Indicadores de síndrome metabólico y de adiposidad en restricción proteica**

Los indicadores del síndrome metabólico (SM) son un conjunto de factores anormales del metabolismo que se consideran de riesgo para el desarrollo de enfermedades no transmisibles, entre estos factores, la resistencia a la insulina (RI) se considera la base de dicho síndrome, siendo un punto importante como diagnóstico de prediabetes. Entre algunos determinantes del SM se encuentra la obesidad y sobrepeso, sedentarismo y, un estilo de vida acompañado de malos hábitos alimenticios (36).

El pilar de la RI es antecesor al desarrollo de más alteraciones que conforman al síndrome metabólico, como; aumento de la presión arterial, elevación de glucosa en ayunas, aumento de triacilglicéridos, disminución de cHDL y obesidad abdominal (grasa visceral) (37). Estas enfermedades metabólicas que conforman el SM se caracterizan por un deterioro progresivo en el organismo, provocando que un individuo enfermo sea menos productivo (38).

**Glucosa:** La RI seguida de un fracaso de la célula beta pancreática, originan consecuencias como, el hiperinsulinismo, lo que deteriora la función del receptor de insulina y la célula beta pancreática ocasionando así la hiperglucemia (38).

**Lípidos séricos:** La presencia de cHDL bajo e hipertrigliceridemia se asocian fuertemente con el aumento de partículas LDL pequeñas y densas y la acumulación posprandial de lipoproteínas remanentes ricas en triglicéridos, hechos que se han relacionado con incremento en el riesgo cardiovascular (39).

**Presión arterial:** Es un factor de riesgo metabólico ya que existe una alta prevalencia de resistencia a la insulina en pacientes hipertensos; el daño a los epitelios vasculares por estrés oxidativo produce hipertensión (39).

**Adiposidad (grasa corporal):** El tejido adiposo está clasificado en blanco, marrón, a su vez el tejido blanco se clasifica de acuerdo con su ubicación en subcutáneo, y visceral, este tejido es importante para el mantenimiento de la homeostasis de los lípidos y la glucosa en el cuerpo pues es fuente varios tipos de células con funciones complejas (40).

## **2.5 Intervenciones nutricionales durante la gestación**

### **2.5.1 Suplementación proteica en gestación**

La suplementación deviene una fuente nutricional apropiada que complementa a la dieta de manera efectiva, ya que ayuda al aumento de aporte calórico, proteico o de vitaminas y minerales sin causar desplazamiento de ingesta (41), el medio para la suplementación es el uso de suplementos los cuales son fuentes concentradas de nutrientes o sustancias que tienen un efecto nutricional/fisiológico (42).

Respecto a la suplementación con aminoácidos esenciales específicos durante la gestación no existen reportes en ratas o humanos, esto limita la interpretación e identificación de riesgos en casos de ingesta insuficientes de alimentos proteicos de alto valor biológico o los efectos de las dietas veganas durante la gestación. Sin embargo, existe evidencia sobre los efectos de la suplementación con los 9 aminoácidos esenciales (EAA) los cuales aumentan la resistencia ósea por medio de modificaciones de densidad mineral ósea (DMO), la arquitectura trabecular y el grosor cortical, posiblemente por un proceso mediado por IGF-I (43). Todos los aminoácidos esenciales son requeridos durante la gestación, sin embargo, existen algunos como la isoleucina, prolina y glicina involucrados en el crecimiento de tejido óseo (44, 45) y muscular (46), es importante mencionar que la falta de Glicina en la ingesta de proteínas tiene efectos negativos en el crecimiento, pérdida de masa muscular y daño a los órganos (47).

En humanos y animales se han señalado que diversos efectos de la suplementación proteica dependen de las condiciones en que se encuentre la hembra gestante; los beneficios de la suplementación se observan en hembras con desnutrición teniendo como efectos: disminución de la incidencia de peso bajo al nacimiento de las crías y de enfermedades neonatales (48).

Una revisión sistemática concluye que aumentar la ingesta calórico-proteica en la población obstétrica resulta eficaz para reducir efectos como parto prematuro y bajo peso al nacer (BPN) con un aumento de peso al nacer; el uso de administración equilibrada de suplementos proteicos parece mejorar el crecimiento fetal y reduce la tasa de mortalidad fetal y postnatal (49). Sin embargo, también se concluye que este tipo de suplementaciones no parecen otorgar efectos beneficiosos a largo plazo en la descendencia en cuanto a crecimiento, adiposidad e HA (49).

## **2.6 Requerimiento de proteínas o aminoácidos en gestación**

Existe similitud en las necesidades nutrimentales de humanos y modelos animales como la rata, por lo que durante la etapa gestacional estas similitudes persisten; la recomendación de proteína durante la gestación de la rata es de 15.9% (50, 51) a 19% (52), muy similar a la recomendación para mujeres gestantes la cuál es de 15 a 20% (53).

En humanos el requerimiento normal de proteína es de 14-20% (52) que es igual a consumir 0.88 g/Kg de peso al día de proteína, cuando las mujeres se encuentran gestando a este requerimiento se le adicionan 21g/día de proteína (54) o bien se consumen de 1.1 a 1,3 g/kg/día.

Las primeras formulaciones de dieta para roedores creadas por el Instituto Americano de Nutrición fueron la principal referencia de alimentación en el mundo durante varios años, sin embargo se realizaron modificaciones que mejoraron el contenido y balance nutricional de estas, derivando en: AIN-93G para periodos de crecimiento, gestación y lactancia y AIN-93M para el mantenimiento de roedores adultos.(55) Un consumo óptimo de proteínas es necesario ya que, las proteínas y

lípidos almacenados en periodos tempranos de la gestación subsidian el alto costo de las demandas energéticas en el último periodo (56) (57).

La ingesta diaria recomendada (IDR) de los EAA pueden producir un balance de nitrógeno neutro incluso cuando los 11 aminoácidos no esenciales (NEAA) están ausentes de las dietas (58). La RDA de aminoácidos en mujeres y ratas gestantes se muestran en la tabla 1, para ambas especies los aminoácidos esenciales son los mismos, solo se registran variaciones en la cantidad por Kg de peso (52, 54). En comparación con los humanos, las ratas requieren ~20 veces más aminoácidos esenciales y no esenciales cuando se ajusta por Kg de peso.

**Tabla 1.** Recomendaciones de ingesta de aminoácidos en mujeres y ratas durante la gestación

Aminoácidos	Humano mg/kg de peso/d	Rata <sup>1</sup>	Humano <sup>2</sup>	Rata <sup>2</sup> mg/d <sup>2</sup>
<b>Aminoácidos esenciales</b>				
Histidina	18	312.1	1080	82.8
Isoleucina	25	576.8	1500	153.0
Leucina	56	1045	3360	277.2
Lisina	51	882.1	3060	234.0
Metionina+ Cisteína	25	562	1500	82.8
Fenilalanina + Tirosina	44	1987	2640	325.8
Treonina	26	454.6	1560	120.6
Triptófano	7	142.5	420	37.8
Valina	31	678.6	1860	180.0
<b>Aminoácidos no esenciales</b>				
		g/d		mg/d <sup>2</sup>
Prolina	5.81	0.369	5810	369
Arginina	4.31	0.115	4310	115
Acido aspártico	6.81	0.219	6810	219
Acido glutámico	16.65	0.653	16650	653
Alanina	3.76	0.083	3760	83
Cisteína	1.06	-	1060	-
Glicina	3.28	0.058	3280	58
Glutamina (59)	4.5	-	4500	-
Serina	3.77	0.175	3770	175
Tirosina	2.97	0.167	2970	167

1. Cálculo en base a una ingesta de alimento de 18 g/d AIN 93G (52) y un peso promedio durante la gestación de 265 g.

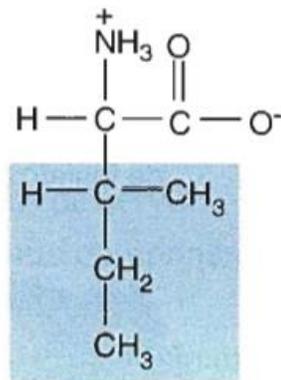
2. Ingesta calculada de mujeres gestantes con un peso de 60 Kg y ratas de 265g

Referencias: Instituto Americano de Medicina, (59).

A continuación, se describen los aminoácidos utilizados en la suplementación de este proyecto.

## 2.9 Isoleucina

La isoleucina (Ile) es un aminoácido alifático y esencial de cadena ramificada que es un componente esencial de la dieta que se encuentra en muchas proteínas, es un isómero de Leucina y es importante en la síntesis de hemoglobina y la regulación del azúcar en la sangre y los niveles de energía (60). Es parte de los aminoácidos ramificados junto con la valina y la leucina, gran parte de estos aminoácidos se catabolizan en el hígado, sin embargo, la mayor parte se metaboliza inicialmente en el músculo esquelético mediante la acción de la aminotransferasa de cadena ramificada para obtener cetoácidos de cadena ramificada los cuales se descarboxilan a nivel hepático y junto a otras reacciones para obtener acetil CoA y Succinil CoA los cuales ingresaran al Ciclo de Krebs (61).



**Figura 1.** Estructura Isoleucina (62)

### 2.9.1. Función de la Isoleucina en procesos fisiológicos

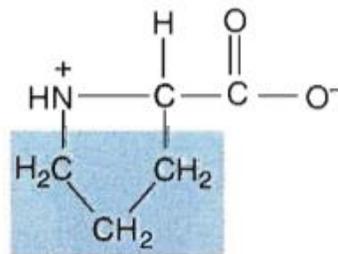
Sus funciones fisiológicas son: mejorar la cicatrización de heridas, desintoxicar desechos nitrogenados, estimular la función inmunológica y promover la secreción de varias hormonas, es necesaria para la formación de hemoglobina y la regulación de los niveles de energía y azúcar en la sangre; la Isoleucina se concentra en los tejidos musculares de los seres humanos mientras que en alimentos se encuentra especialmente en carnes, pescados, quesos, huevos y la mayoría de las semillas y nueces (63). En el sistema inmune se utiliza como fuente de energía y como

precursora de formación, diferenciación y activación de nuevas células o moléculas de protección como las  $\beta$ -defensinas (64). Está involucrada en la señalización fisiológica mediante la regulación de la diana de rapamicina (mTOR) que a su vez tiene un rol en la detección cerebral de la biodisponibilidad de nutrientes y en la regulación del balance energético (65). Cuando hay niveles bajos de Isoleucina en el cuerpo se puede reducir el consumo de alimento, de igual forma está relacionada con la utilización y captación de glucosa a nivel de transportadores musculares e intestinales (61). Además ha demostrado tener un papel importante en la regulación de peso y la síntesis de proteínas musculares a través de la miogénesis y deposición de lípidos (66).

### 2.10 Prolina

La prolina (Pro) contiene un grupo amino secundario, llamado imina, en lugar de un grupo amino primario. Por esta razón, la prolina se denomina iminoácido, dado que el grupo R de tres carbonos de la prolina está fusionado con el grupo de nitrógeno  $\alpha$ , este compuesto tiene una estructura de anillo rígido restringida rotacionalmente (67).

Su fórmula molecular es  $C_5H_9NO_2$  y su nomenclatura IUPAC es ácido pirrolidin-2-carboxílico, es un aminoácido cíclico no esencial que en humanos es sintetizado a partir del ácido glutámico y otros aminoácidos; la Pro constituye a otras muchas proteínas y es encontrada en altas concentraciones en el colágeno, siendo este la principal proteína de apoyo de la piel, los tendones, los huesos y el tejido conectivo además de promover su salud y recuperación (68).



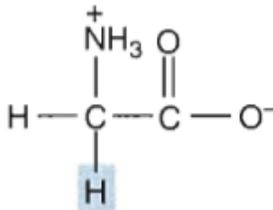
**Figura 2.** Estructura Prolina (62)

### 2.10.1 Funciones de la Prolina en procesos fisiológicos

La prolina está involucrada en la producción del colágeno. Las fibras de colágeno se componen de hélices triples de polipéptidos repetidos que a su vez están compuestos de varios residuos de prolina y glicina. En su forma natural la prolina forma parte del procolágeno, siendo este un precursor de los polipéptidos de colágeno y de otras proteínas de tejido conjuntivo. La enzima procolágeno prolina hidroxilasa se encarga de hidroxilar los residuos de prolina para originar la hidroxiprolina y así el procolágeno se sintetiza a colágeno y está también relacionada con la reparación y mantenimiento de los músculos y los huesos (69).

### 2.11 Glicina

La glicina (Gly) es un aminoácido glucogénico no esencial y no polar; su fórmula molecular es  $C_2H_5NO_2$ , es un componente importante y precursor de muchas macromoléculas en las células (70).



**Figura 3.** Estructura Glicina (62)

#### 2.11.1 Funciones de la Glicina en procesos fisiológicos

La glicina como producto obtenido de la dieta protege al organismo frente a *shock* de pérdidas por endotoxinas y bloquea la apoptosis (71). Es un neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central, desencadena la entrada de iones de cloruro a través de receptores ionotrópicos, creando así un potencial postsináptico inhibitorio. Por el contrario, este agente también actúa como agonista, junto con el glutamato, facilitando un potencial excitatorio en los receptores glutamérgicos del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (70). Es el principal aminoácido de la fracción proteica del tejido óseo, representa en humanos 31.9% (72) y en ratas el 33.3% (73)

del total de aminoácidos que forman las proteínas óseas, por lo que tiene influencia directa en el crecimiento óseo.

### **3. Problema de Investigación**

Los trastornos de crecimiento en la vida fetal conducen en humanos a condiciones como el BPN el cual, es un problema de salud clínica heterogénea y multicausal de grandes proporciones a nivel mundial que impactan en las cifras de mortalidad perinatal e infantil. En México, en el año 2019 la prevalencia de BPN fue de 7.1% (16), esta prevalencia en países desarrollados es de 10.9%, mientras que en países subdesarrollados esta aumenta entre un 35 y 40% (14, 15). Estas cifras estiman el 60% de la mortalidad neonatal y el 4% de mortalidad infantil en el mundo (74), entre 2001 y 2002 se registró una tasa de mortalidad de 25.3% en recién nacidos con bajo peso según el instituto nacional de perinatología de México (75), mientras que en el 2020 la cifra de mortalidad perinatal fue de 22,637 muertes resultando en una tasa nacional de 6.7 de estas muertes por cada 10,000 mujeres (13).

Diversos estudios demuestran que una insuficiente ingesta de nutrientes en particular las proteínas se relacionan con esta restricción del crecimiento fetal, con efectos adversos que se manifiestan a lo largo de la vida y desencadenan un conjunto de trastornos metabólicos que fueron programados desde la etapa embrionaria. El ambiente al que una madre gestante se enfrenta durante el embarazo y lactancia impacta sobre el feto, de forma negativa cuando hay restricción, pero también positiva cuando el feto crece en condiciones de suficiencia de nutrientes que la madre obtiene con el consumo de alimentos o mediante la suplementación.

La carencia de estudios sobre el efecto a largo plazo de la deficiencia de proteínas en el crecimiento, adiposidad e intervenciones con suplementos durante la gestación se hacen necesarios, con el fin de dimensionar el efecto de esta en los factores de riesgo que puedan ser útiles en la comprensión y manejo del fenómeno, más allá del conocimiento incompleto de la relación entre la desnutrición fetal y complicaciones en la vida adulta.

Con base a estos datos surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto a largo plazo de la suplementación con Ile, Pro y Gly durante la gestación en indicadores metabólicos y adiposidad de la descendencia de ratas con restricción proteica durante su gestación y lactancia?

#### **4. Justificación**

La restricción del crecimiento fetal genera diversas consecuencias socioeconómicas y de salud desde el nacimiento hasta la vida adulta, teniendo su mayor impacto en la vida intrauterina y en los primeros años de vida. Estudios realizados por la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) y el Programa Mundial de Alimentos (PMA) concluyen que los efectos de desnutrición medida como BPN, genera costos en salud, educación y especialmente en productividad como consecuencia de muerte prematura. Se estimó que su costo es de 6.600 millones de dólares en Centroamérica, lo que es alrededor del 6.4% del PIB agregado (76).

De esta forma surge la necesidad de implementar distintas intervenciones de suplementación, para que, en conjunto con un buen ambiente de nutrición en otras etapas del desarrollo, contrarresten las condiciones de carencia energético-proteica durante el embarazo para prevenir o en su caso mejorar la programación metabólica *in útero* buscando disminuir los riesgos para enfermedades crónicas a largo plazo, en el caso de la diabetes insulino dependiente el riesgo es 6.6 veces mayor en individuos con BPN en comparación con individuos con peso normal (29).

Es necesario contribuir en la intervención y solución de este problema que además de disminuir las cifras de BPN, disminuiría también a largo plazo el número de comorbilidades asociadas a los efectos de malnutrición *in útero*, ahorrando millones en costos de salud.

Ante la imposibilidad ética de realizar intervenciones en humanos, este estudio tiene como objetivo evaluar los efectos de la suplementación con 3 aminoácidos a largo plazo en distintos grupos de prueba (ratas Wistar) y así comprobar el nivel de impacto de una intervención durante la gestación en indicadores metabólicos y

adiposidad de las crías que se desarrollaron condiciones maternas de restricción proteica.

## **5. Hipótesis**

El uso de suplementación con Ile, Pro y Gly durante la gestación para contrarrestar los efectos de restricción proteica materna genera en las crías resultados positivos a largo plazo en indicadores metabólicos y adiposidad.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto a largo plazo de la suplementación con Isoleucina, Prolina y Glicina en indicadores metabólicos y adiposidad de crías de ratas Wistar con restricción proteica durante su gestación y lactancia.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar los cambios de peso e ingesta de energía durante 5 meses en crías de rata Wistar suplementadas con los aminoácidos Isoleucina, Prolina o Glicina durante su gestación y lactancia.
2. Determinar a los 5 meses de vida la adiposidad mediante la cantidad de tejido adiposo mesentérico, gonadal y retroperitoneal de crías de rata Wistar suplementadas con los aminoácidos Isoleucina, Prolina o Glicina durante su gestación y lactancia.
3. Evaluar el estado metabólico a través de la concentración sérica de glucosa, colesterol total, cHDL y triglicéridos en crías de rata Wistar suplementadas con Isoleucina, Prolina o Glicina durante su gestación y lactancia.
4. Analizar en ratas Wistar adultas la relación entre los indicadores metabólicos y de adiposidad con el tipo de aminoácido suplementado a sus madres durante su gestación y lactancia.

## **7. Material y métodos**

### **7.1 Esquemas de suplementación para las ratas Wistar madre**

Los animales fueron obtenidos del Bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Se solicitaron 5 ratas Wistar machos para apareamiento y 20 hembras para los grupos experimentales. Los animales se alimentaron con las siguientes dietas: AIN-93M (para mantenimiento) y AIN-93G (para periodos de gestación y lactancia) para roedores (52), las cuales son descritas en la tabla 2. Para fines de este experimento se realizaron algunas modificaciones por cada grupo de estudio en las dietas mencionadas, con el fin de adicionar los aminoácidos Ile, Pro y Gly; la composición de nutrientes de cada dieta se muestra en la tabla 3.

Previo al apareamiento y gestación, las hembras de 6 semanas de vida fueron sometidas a restricción proteica durante 3 semanas con una dieta AIN-93M al 10% de proteína, lo que representa el 71% de su requerimiento diario, con el fin de inducir un estado de depleción proteica. Por otro lado, las hembras del grupo control consumieron una dieta al 14% de su requerimiento.

Al finalizar el periodo de depleción proteica se inició el periodo de apareamiento, para esto se alojaron en grupos de 2 animales, hembra y macho durante 7 días continuos, confirmando el apareamiento con la presencia de tapón espermático en la vagina de la hembra. En el periodo de gestación (~21 días) y lactancia (21 días) se asignaron 4 hembras a cada uno de los grupos de experimentación, las cuales fueron alimentadas de acuerdo con el grupo experimental asignado, tabla 3.

- Grupo control (Cont): Dieta estándar AIN-93G al 19% de proteína.
- Grupo bajo en proteína (GBP): AIN-93G modificada al 13.5% de proteína total.
- Grupo IP: AIN-93G modificada al 13.5% de proteína total y 2 veces el requerimiento diario de Isoleucina y Prolina.
- Grupo IPG: AIN-93G modificada al 13.5% de proteína total y 2 veces el requerimiento diario de Isoleucina, Prolina y Glicina.

**Tabla 2.** Composición de nutrientes en la dieta AIN-93G y AIN-93M para roedores

Nutriente	Dieta g/kg	
	AING-93G	AIN-93M
Energía total, Kcal	3766	3601
% de proteína	19.3	14.1
% de HCO	64	75.9
% de grasas	16.7	10
Humedad, g	66	68
Grasa total, g	70	40
Saturadas, g	10.8	6.2
Monoinsaturadas, g	16.3	9.3
Poliinsaturadas, g	40.5	23.1
Ácido Linoleico, g	35.7	10.4
Ácido Linolénico, g	4.8	2.7
Carbohidratos totales, g	643.7	727.3
Carbohidratos complejos, g	360.1	421.9
Azúcares simples, g	236.1	257.9
Celulosa, g	47.5	47.5
Proteína, g	178.6	125.8
Alanina, g	4.6	3.3
Arginina, g	6.4	4.5
Ácido aspártico, g	12.2	8
Cisteína, g	3.7	2.4
Ácido glutámico, g	36.3	25.5
Glicina, g	3.2	2.3
Histidina, g	4.6	3.3
Isoleucina, g	8.5	5.9
Leucina, g	15.4	10.9
Lisina, g	13	9.2
Metionina, g	4.6	3.3
Fenilalanina, g	8.8	6.2
Prolina, g	20.5	14.3
Serina, g	9.7	6.7
Teronina, g	6.7	4.7
Triptófano, g	2.1	1.6
Tirosina, g	9.3	6.6
Valina, g	10	7
Ceniza total, g	41.7	38.9

Datos tomados del artículo de Reeves, P.G. y colaboradores (52)

**Tabla 3.** Formulaciones de las dietas para el periodo de mantenimiento (AIN-93M), gestación y lactancia (AIN-93G) de ratas hembra Wistar

Ingredientes	Control		GBP		ISO	IP	IPG
	PAG	PGL	PAG	PGL		PGL	
	g/kg dieta						
Almidón de maíz	465.7	407.5	505.7	462.5	462.5	462.5	462.5
Caseína	140	190	100	135	135	135	135
Dextrina	155	132	155	132	132	132	132
Sacarosa	100	100	100	100	100	100	100
Aceite de soja	40	70	40	70	70	70	70
Fibra	50	50	50	50	50	50	50
Mix de minerales	35	35	35	35	35	35	35
Mix de vitaminas	10	10	10	10	10	10	10
L-cistina	1.8	3	1.8	3	3	3	3
Bitartrato de colina	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Isoleucina	-	-	-	-	11	11	11
Prolina	-	-	-	-	-	26.5	26.5
Glicina	-	-	-	-	-	-	4.1

PAG= periodo pregestacional, PGL= periodo de gestación y lactancia, Control= grupo control, GBP= grupo bajo en proteína, GBP-IIs= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina, GBP-IP= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina/prolina, GBP-IPG= grupo bajo en proteína suplementado con isoleucina/prolina/glicina. Tabla adaptada del artículo: Reeves, P.G. y colaboradores (52).

## 7.2 Condiciones de alojamiento de las crías

Se incluyeron en el estudio 6 crías de rata Wistar hembras y machos por grupo experimental con 21 días de vida. Una vez que las crías se destetaron fueron separadas de sus madres para alojarse en grupos de 2 o 3 ratas por sexo y grupo de intervención en cajas de acrílico bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Desde el destete y hasta el fin del periodo experimental (5 meses de vida), los animales fueron alimentados con la dieta LabDiet 5008 ® y agua *ad libitum*.

## 7.3 Registro de peso e ingesta calórica en las crías

El peso se midió y registró a partir del día 21 de vida, cada 30 días, con el fin de observar cambios de peso corporal, para esta actividad se utilizó una balanza Triple Beam 700/800 series OHAUS®, con una precisión de 0.1 g.

La ingesta de alimentos se registró semanalmente a partir del día 60 de vida, la cantidad de alimento restante fue pesado con una báscula TANITA KD-160®, a partir de este peso se calculó la ingesta (alimento dejado al animal (g) – alimento sobrante (g)) y la cantidad de Kilocalorías consumidas, de acuerdo con la declaración nutrimental del alimento utilizando la Formula *Lab Diet* 5008 para roedores de la marca *Lab Diet*® (tabla 4) que declara 3.31 kcal por gramo.

**Tabla 4.** Composición nutricional y aporte calórico del alimento formula *Lab Diet* 5008 para roedores

<b>Nutrientes</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Nutrientes</b>	<b>Cantidad</b>
Proteína %	23.5	Fibra cruda %	3.8
Arginina, %	1.44	Fibra DN %	11.3
Cisteína, %	0.35	Fibra DA %	4.0
Glicina %	1.23	ELN %	49.4
Histidina, %	0.58	Almidón %	34.9
Isoleucina, %	1.20	Glucosa %	0.22
Leucina %	1.87	Fructosa %	0.24
Lisina %	1.40	Sacarosa %	2.57
Metionina %	0.43	Lactosa %	0.39
Fenilalanina, %	1.08	Nutrientes Dig %	81.2
Tirosina %	0.66	Energía bruta, kcal/g	4.15
Treonina %	0.90	VFC, kcal/g	3.50
Triptófano %	0.28	Energía Met, kcal/g	3.31
Valina %	1.19	Minerales	
Serina %	1.20	Ceniza %	6.8
Ácido aspártico %	2.60	Calcio %	1.00
Ácido glutámico %	4.77	Fósforo %	0.65
Alanina %	1.39	Fósforo, %	0.42
Prolina %	1.63	Potasio, %	1.10
Taurina, %	0.02	Magnesio %	0.20
Grasa (EE) %	6.5	Sulfuro %	0.24
Grasas (HA) %	7.5	Sodio %	0.28
Colesterol ppm	280	Cloro %	0.48
Linoleico %	1.37	Flúor ppm	19
linolénico %	0.09	Hierro ppm	230
Áraquidónico %	0.01	Zinc ppm	73
Omega 3 %	0.29	Manganeso ppm	71
Grasas saturadas	2.51	Cobre ppm	13
Ácidos grasos	2.32	Cobalto ppm	0.4
Monoinsaturados %		Yodo ppm	0.8
		Cromo ppm	1.4
		Selenio ppm	0.23

FormuLab Diet®, Irradiada 5008\*,5008C33\*. EE= extracto en éter, HA= hidrólisis ácida. DN= detergente neutro, DN = detergente ácido. ELN = extracto libre de nitrógeno. Dig = digeribles, VFC = valor fisiológico de combustión. Met = metabolizable.

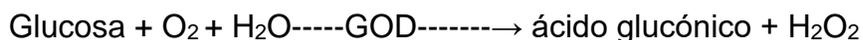
#### 7.4 Sacrificio y extracción de sangre

A los 150 días de vida (5 meses) los animales fueron sacrificados. Previo al sacrificio se retiró el alimento y bebida a los animales. Las ratas se anestesiaron con ISOFLURAN marca Vedco® y se sacrificaron por decapitación en condiciones de ayuno de 8 horas, el cual se verificó con la ausencia de residuos en estomago e intestino delgado. Las muestras de sangre fueron obtenidas por la vena cava caudal y aorta. La sangre se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos en una centrifugadora marca DRAGONLAB® DM0412 para obtener el suero, el cual se congeló a -30°C hasta su análisis (dentro de los 15 días posteriores a la recolección).

#### 7.5 Medición de indicadores bioquímicos

En muestras de suero se realizó la cuantificación de indicadores metabólicos (glucosa, colesterol total, cHDL y triglicéridos) e indicadores bioquímicos del estado proteico (proteínas totales y albúmina), utilizando kits enzimáticos marca Wiener Lab® siguiendo los protocolos que marca el fabricante.

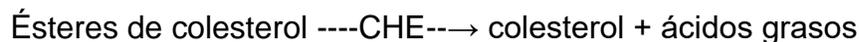
La glucosa se determinó por medio de la prueba enzimática de Wiener Lab AA® la cual está fundamentada en el método con la siguiente reacción:

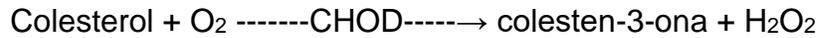


Se incubó la muestra durante 25 minutos a temperatura ambiente y se leyó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro Biotek PowerWave XS a 505 nm llevando el aparato a 0 con el blanco. El cálculo de resultados se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{100\text{mg/dL}}{\text{OD del estándar}} \times \text{DO del desconocido}$$

El colesterol total se determinó por medio de la prueba enzimática de Wiener Lab AA® la cual está fundamentada en el método de la siguiente reacción:



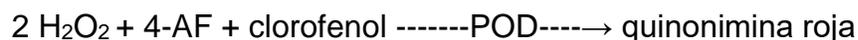
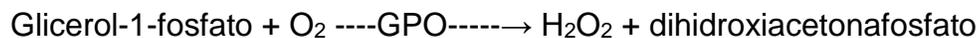


Se incubó la muestra durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se tomó lectura con espectrofotómetro Biotek PowerWave XS a 505nm, llevando el aparato a 0 con el blanco. El cálculo de resultados se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{2.00 \text{ g/L}}{\text{OD del estándar}} \times \text{OD del desconocido}$$

El cHDL se determinó mediante la reacción del método colorimétrico homogéneo del kit HDL Colesterol monofase AA v.2 de Wiener lab. <sup>®</sup> que emplea dos reactivos, en la primera etapa de reacción se solubiliza y consume el colesterol libre o unidos a proteínas distintas de la HDL es una reacción que involucra a colesterol oxidasa, peroxidasa y N-etil-N(2-hidroxi-3-sul-fopropil)-3-toluidina disódica dando lugar a un producto no coloreado. En la segunda etapa un detergente solubilizó específicamente las HDL el cual fue liberado para su reacción obteniendo un producto coloreado, se incubó durante 5 minutos a 37°C y el resultado se leyó en el espectrofotómetro Biotek PowerWave XS a 600/700 nm.

Los triglicéridos (TG) se cuantificaron por medio del kit enzimático de Wiener Lab. <sup>®</sup> TG color GPO/PAP AA en el cual los TG son hidrolizados enzimáticamente por una lipasa específica, produciendo glicerol y ácidos grasos y posteriormente se generan las siguientes reacciones:



Se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y se leyeron en espectrofotómetro Biotek PowerWave XS a 505 nm, llevando a 0 con agua destilada. Para el cálculo de resultados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{2 \text{ g/L}}{OD \text{ del estándar}} \times OD \text{ del desconocido}$$

La albúmina se determinó con el kit de Albúmina AA de Wiener lab.<sup>®</sup> mediante el método colorimétrico en donde la albúmina reacciona específicamente con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleina (BCF), el aumento de absorbancia a 625 nm respecto al blanco de reactivo es proporcional a la cantidad de albumina presente en la muestra. Para el cálculo de la concentración se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{3.5 \text{ g/dL}}{OD \text{ del estándar}} \times OD \text{ del desconocido}$$

Las proteínas totales (PT) se determinaron utilizando el método de Biuret (77), los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ion cúprico en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra. Posteriormente se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{3.5 \text{ g/dL}}{OD \text{ del estándar}} \times OD \text{ del desconocido}$$

## **7.6 Disección y medición de tejido adiposo**

Posterior al sacrificio y extracción de sangre, los animales se abrieron de la parte media abdominal para obtener el tejido adiposo mesentérico, gonadal y retroperitoneal. El tejido adiposo mesentérico se diseccionó desde el mesenterio (yeyuno e íleon), meso colón transverso, sigmoide y meso gástrico; así como el que se encuentra alrededor de estómago, hígado y páncreas. El tejido adiposo gonadal se ubica en la parte baja del animal, en hembras sobre sus órganos reproductores (ovarios y cuernos uterinos) y en machos sobre la superficie de los testículos y el epidídimo. Y por último, el tejido adiposo retroperitoneal se diseccionó en la cavidad abdominal donde se encuentra el peritoneo parietal sobre la pared abdominopélvica.

Cada tejido se pesó por separado en una báscula analítica marca OHAUS modelo Adventurer Pro® con precisión de 0.01 g. \*\*\*\*\*

### **7.7 Análisis estadístico**

Para el análisis de resultados se utilizó el programa estadístico SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) versión 21.0 para Windows. Se describieron las variables cuantitativas en promedios  $\pm$  desviación estándar, se probó la homogeneidad de las variancias para decidir la prueba estadística que se aplicaría. Para comparar dos grupos se utilizó una prueba de t-Student o U de Mann-Whitney y las comparaciones entre los grupos en tratamiento y control se determinaron mediante ANOVA de una vía (post test Bonferroni) o Kruskal-Wallis. Para todas las pruebas las diferencias con valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativas.

### **7.8 Aspectos éticos**

Este proyecto de investigación tiene resultados secundarios de un proyecto sometido a evaluación y aprobado por el CICUAL (Comité Interno de Ética, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la UAEH) con número de aprobación: CICUAL/001/2021, Anexo 1. El cual se rige por la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999.

## 8. Resultados

### 8.1 Características generales del estudio

Se evaluaron un total de 46 crías de ratas Wistar durante 5 meses de vida, del total de crías 26 fueron hembras y 20 machos. En el análisis no se incluyen datos de las crías nacidas de ratas suplementadas con Ile, debido al número reducido de la camada y al canibalismo frecuente, lo que limitó contar con animales para el seguimiento a largo plazo.

### 8.2 Promedio de peso de ratas Wistar por edad y sexo

Como se observa en la tabla 5, entre los grupos de crías hembra nacidas de madres suplementadas, el promedio de peso presentó diferencias en los grupos IP e IPG para el día 21 de vida, los cuales presentaron un mayor peso en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ). Mientras que, para los días 60, 90 y 150 de vida solo el GBP registró un menor peso corporal en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 5.** Cambio del peso corporal de ratas Wistar hembra suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia

Grupo	Días de vida				
	21	60	90	120	150
	Promedio (g) $\pm$ DE				
Cont	35.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	182.5 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>	210.9 $\pm$ 7.6 <sup>a</sup>	225.7 $\pm$ 7.6	241.3 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>
GBP	34.0 $\pm$ 0.7	163.4 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	202.1 $\pm$ 6.0 <sup>b</sup>	219.1 $\pm$ 6.4	227.5 $\pm$ 8.3 <sup>b</sup>
IP	39.7 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>	181.6 $\pm$ 5.0	211.9 $\pm$ 3.4	226.4 $\pm$ 5.3	232.1 $\pm$ 4.4
IPG	39.5 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	178.8 $\pm$ 4.2	205.4 $\pm$ 3.0	218.9 $\pm$ 8.6	230.2 $\pm$ 8.7

Cont= Grupo control, GBP= grupo bajo en proteínas, IP= grupo suplementado con isoleucina y prolina, IPG= grupo suplementado con isoleucina, prolina y glicina durante su gestación y lactancia. DE= desviación estándar. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni o Kruskal-Wallis según su resultado de normalidad. La suplementación administrada fue de 2 veces el requerimiento diario de aminoácidos.

En las crías machos (Tabla 6) se registraron diferencias de peso corporal entre el grupo control y los grupos IP e IPG en el día 21 de vida, obteniendo estos últimos un mayor peso corporal en comparación con el grupo control ( $P > 0.05$ ); a los días 60 (202.5  $\pm$  4.2 vs 267.6  $\pm$  10.2;  $P < 0.05$ ), 90 (266.3  $\pm$  15.0 vs 353.9  $\pm$  14.5;  $P < 0.05$ ), 120 (308.8  $\pm$  16.3 vs 393.5  $\pm$  19.0;  $P < 0.05$ ) y 150 (316.8  $\pm$  19.0 vs 426.1  $\pm$  14.9;  $P > 0.05$ ) de vida, el GBP presentó un peso menor en comparación con el grupo control y por

último para el día 150 de vida el grupo IPG también registró un menor peso corporal en comparación con el grupo control ( $P>0.05$ ).

**Tabla 6.** Cambio de peso corporal de ratas Wistar macho suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia

Grupo	Días de vida				
	21	60	90	120	150
	Promedio (g) $\pm$ DE				
Cont	34.9 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	267.6 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>	353.9 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup>	393.5 $\pm$ 19.0 <sup>a</sup>	426.1 $\pm$ 14.9 <sup>a</sup>
GBP	36.0 $\pm$ 2.6	202.5 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	266.3 $\pm$ 15.0 <sup>b</sup>	308.8 $\pm$ 16.3 <sup>b</sup>	316.8 $\pm$ 19.9 <sup>b</sup>
IP	43.5 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	271.6 $\pm$ 18.5	369.6 $\pm$ 17.7	412.6 $\pm$ 16.3	442.5 $\pm$ 17.6
IPG	40.0 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	263.3 $\pm$ 17.3	346.3 $\pm$ 17.1	384.0 $\pm$ 19.0	392.9 $\pm$ 18.2 <sup>b</sup>

Cont= Grupo control, GBP= grupo bajo en proteínas, IP= grupo suplementado con isoleucina y prolina, IPG= grupo suplementado con isoleucina, prolina y glicina durante su gestación y lactancia. DE= desviación estándar. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni o Kruskal-Wallis según su resultado de normalidad. La suplementación administrada fue de 2 veces el requerimiento diario de aminoácidos.

### 8.3 Ingesta semanal de energía por edad y sexo

En los grupos de estudio de hembras (Tabla 7) las diferencias registradas de ingesta en los 3 grupos en tratamiento indican un comportamiento semejante; el grupo GBP registró una menor ingesta energética en comparación con el grupo control durante las primeras semanas de monitoreo ( $P<0.05$ ), y posteriormente registró una mayor ingesta de energía en comparación con el grupo control durante 6 semanas de las 11 de monitoreo ( $P<0.05$ ), el grupo IP registró de igual manera un mayor consumo energético en comparación con el grupo control durante 6 semanas de las 11 de monitoreo ( $P<0.05$ ), por último el grupo IPG presentó una menor ingesta de energía en comparación al grupo control, ( $P<0.05$ ) únicamente durante la semana de inicio del monitoreo, sin embargo, posteriormente registró un mayor consumo energético por 6 semanas de las 11 de monitoreo en comparación con el grupo control, ( $P<0.05$ ). En el resultado ajustado por consumo de consumo de gramo de alimento por kilogramo de peso de la rata, se observa que los 3 grupos de estudio mantuvieron una mayor ingesta de energía en comparación con el grupo control.

**Tabla 7.** Cambios de ingesta por semana de vida de ratas Wistar hembras suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia

Semana		Control	GBP	IP	IPG
Ingesta semanal (kcal)	S10	388.4 ± 4.8 <sup>a</sup>	356.9 ± 16.8 <sup>b</sup>	384.6 ± 12.6	347.5 ± 5.4 <sup>b</sup>
	S11	374.5 ± 9.5	360.7 ± 6.7	389.9 ± 19.0	373.5 ± 11.9
	S12	379.9 ± 6.1 <sup>a</sup>	353.0 ± 10.9 <sup>b</sup>	359.3 ± 18.3	375.9 ± 4.6
	S13	325.7 ± 11.4 <sup>a</sup>	353.0 ± 12.9 <sup>b</sup>	361.3 ± 14.1 <sup>b</sup>	358.8 ± 5.9 <sup>b</sup>
	S14	326.7 ± 14.0 <sup>a</sup>	354.1 ± 9.0 <sup>b</sup>	381.9 ± 19.9 <sup>b</sup>	376.8 ± 7.2 <sup>b</sup>
	S15	334.3 ± 10.8 <sup>a</sup>	341.4 ± 20.2	409.7 ± 14.5 <sup>b</sup>	371.6 ± 7.5 <sup>b</sup>
	S16	328.1 ± 11.3 <sup>a</sup>	351.9 ± 12.3 <sup>b</sup>	358.0 ± 14.1 <sup>b</sup>	371.6 ± 4.1 <sup>b</sup>
	S17	329.5 ± 13.0 <sup>a</sup>	352.5 ± 3.9 <sup>b</sup>	349.5 ± 19.9	373.0 ± 12.0 <sup>b</sup>
	S18	348.4 ± 5.6	341.4 ± 10.5	370.0 ± 19.0	338.0 ± 9.2
	S19	331.9 ± 10.8 <sup>a</sup>	357.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	362.7 ± 12.3 <sup>b</sup>	345.1 ± 5.9
	S20	315.8 ± 14.2 <sup>a</sup>	344.7 ± 6.8 <sup>b</sup>	351.4 ± 14.1 <sup>b</sup>	357.9 ± 10.3 <sup>b</sup>
Total (kcal)		343.9 ± 9.1 <sup>a</sup>	351.5 ± 8.0	370.8 ± 12.6 <sup>b</sup>	362.8 ± 3.9 <sup>b</sup>
Kcal/g peso		1.42 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.59 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.57 ± 0.04 <sup>b</sup>

Cont= Grupo control, GBP= grupo bajo en proteínas, IP= grupo suplementado con isoleucina y prolina, IPG= grupo suplementado con isoleucina, prolina y glicina durante su gestación y lactancia. DE= desviación estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni o Kruscal-Wallis según su resultado de normalidad.

Por otro lado, las diferencias en la ingesta de energía en el grupo de los machos (Tabla 8) indican que: el grupo GBP registró una menor ingesta energética en comparación con el grupo control durante las 11 semanas del monitoreo ( $P < 0.05$ ); mientras que el grupo IP registró un menor consumo de energía en comparación con el grupo control solamente durante 2 semanas de las 11 del monitoreo, ( $P < 0.05$ ) y por último el grupo IPG también registró una menor ingesta de energía en comparación con el grupo control durante 5 semanas de las 11 del monitoreo ( $P < 0.05$ ), a excepción de la semana 17 en la que su consumo de energía fue mayor en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 8.** Cambios de ingesta por semana de vida de ratas Wistar machos suplementados con aminoácidos durante su gestación y lactancia

Semanas		Control	GBP	IP	IPG
Ingesta semanal (kcal)	S10	509.9 ± 6.4 <sup>a</sup>	347.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	509.1 ± 14.9	489 ± 8.4 <sup>b</sup>
	S11	491.8 ± 4.4 <sup>a</sup>	404.9 ± 7.6 <sup>b</sup>	488.2 ± 16.8	502.0 ± 11.4
	S12	523.6 ± 6.7 <sup>a</sup>	386.1 ± 3.8 <sup>b</sup>	482.7 ± 14.9 <sup>b</sup>	500.3 ± 9.9 <sup>b</sup>
	S13	495.8 ± 10.0 <sup>a</sup>	396.0 ± 6.6 <sup>b</sup>	481.6 ± 6.45	509.7 ± 14.9
	S14	487.8 ± 11.6 <sup>a</sup>	389.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	488.7 ± 11.2	476.6 ± 8.1
	S15	494.5 ± 10.3 <sup>a</sup>	386.1 ± 12.4 <sup>b</sup>	473.8 ± 13.7	499.2 ± 11.3
	S16	496.5 ± 9.9 <sup>a</sup>	384.5 ± 12.4 <sup>b</sup>	478.8 ± 11.2	471.6 ± 6.5 <sup>b</sup>
	S17	489.2 ± 18.3 <sup>a</sup>	387.7 ± 8.2 <sup>b</sup>	465.6 ± 16.3	522.98 ± 3.6 <sup>b</sup>
	S18	489.8 ± 15.3 <sup>a</sup>	381.7 ± 12.4 <sup>b</sup>	466.7 ± 15.6	463.4 ± 8.1
	S19	495.8 ± 15.0 <sup>a</sup>	396.0 ± 3.8 <sup>b</sup>	461.1 ± 11.9 <sup>b</sup>	463.9 ± 3.8 <sup>b</sup>
	S20	462.7 ± 14.5 <sup>a</sup>	382.8 ± 7.6 <sup>b</sup>	447.9 ± 17.3	482.7 ± 3.8
Total (kcal)		494.3 ± 9.2 <sup>a</sup>	384.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	476.7 ± 12.3	489.2 ± 4.1
Kcal/g peso		1.16 ± 0.03	1.21 ± 0.07	1.07 ± 0.04	1.24 ± 0.06

GBP= grupo bajo en proteínas, IP= grupo suplementado con isoleucina y prolina, IPG= grupo suplementado con isoleucina, prolina y glicina durante su gestación y lactancia. DE= desviación estándar. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni o Kruskal-Wallis según su resultado de normalidad.

#### 8.4 Cantidad de tejido adiposo almacenado

Como se observa en la tabla 9, el grupo IPG registró una menor cantidad de TAG y TAT en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ); mientras que la cantidad de TA (TAM, TAG, TAR y TAT) entre el resto de los grupos de estudio de hembras no presentó diferencias significativas.

**Tabla 9.** Tejido adiposo de ratas Wistar hembras nacidas de madres suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia

Grupo	Tejidos adiposos (mg/g)			
	TAM	TAG	TAR	TAT
	Promedio ± DE			
Control	11.0 ± 3.7	30.2 ± 4.6 <sup>a</sup>	14.1 ± 5.8	53.7 ± 8.5 <sup>a</sup>
GBP	10.2 ± 1.3	23.2 ± 1.1	10.0 ± 2.5	43.2 ± 1.4
IP	10.1 ± 2.1	24.3 ± 5.8	12.4 ± 4.0	45.6 ± 10.5
IPG	9.3 ± 2.3	18.2 ± 4.6 <sup>b</sup>	10.5 ± 2.2	36.6 ± 8.8 <sup>b</sup>

GBP= grupo bajo en proteínas, IP= grupo suplementado con isoleucina y prolina, IPG= grupo suplementado con isoleucina, prolina y glicina durante su gestación y lactancia. TAM= tejido adiposo mesentérico, TAG= tejido adiposo gonadal, TAR= tejido adiposo retroperitoneal, TAT= tejido adiposo total. DE= desviación estándar. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni o Kruskal-Wallis según su resultado de normalidad. La suplementación administrada fue de 2 veces el requerimiento diario de aminoácidos.

En la tabla 10 se muestran los promedios de TA de machos a los 5 meses de vida, en esta se observa que el GBP registró una menor cantidad de TAM, TAG, TAR y TAT en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ). El grupo IPG registró una menor cantidad de TAG y TAT en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ); el resto de los grupos no presentaron diferencias significativas entre sí ( $P > 0.05$ ).

**Tabla 10.** Tejido adiposo de ratas Wistar macho nacidos de madres suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia

Grupo	Tejidos adiposos (mg/g)			
	TAM	TAG	TAR	TAT
	Promedio $\pm$ DE			
Control	18.1 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	56.3 $\pm$ 9.4 <sup>a</sup>	52.3 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	106.1 $\pm$ 11.3 <sup>a</sup>
GBP	6.7 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	24.2 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>	15.0 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	42.7 $\pm$ 7.5 <sup>b</sup>
IP	15.0 $\pm$ 2.9	55.9 $\pm$ 7.1	50.6 $\pm$ 15.3	107.0 $\pm$ 14.2
IPG	12.9 $\pm$ 3.3	37.9 $\pm$ 10.0 <sup>b</sup>	34.4 $\pm$ 12.7	73.5 $\pm$ 19.4 <sup>b</sup>

GBP= grupo bajo en proteínas, IP= grupo suplementado con isoleucina y prolina, IPG= grupo suplementado con isoleucina, prolina y glicina durante su gestación y lactancia. TAG= tejido adiposo gonadal, TAR= tejido adiposo retroperitoneal, TAT= tejido adiposo total DE= desviación estándar. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni o Kruskal-Wallis según su resultado de normalidad. La suplementación administrada fue de 2 veces el requerimiento diario de aminoácidos.

### 8.5 Indicadores bioquímicos

Para los indicadores bioquímicos de Glu, colesterol total (CT), Alb, y PT no se registraron diferencias significativas entre los grupos de estudio y el grupo control de hembras ( $P > 0.05$ ), sin embargo; en el grupo IP se cuantificó una menor concentración sérica de cHDL en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ) y el grupo IPG tuvo una menor cantidad de TG en suero en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 11.** Indicadores bioquímicos de ratas Wistar hembra suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia.

Grupo	Indicadores bioquímicos					
	Glu	cHDL	CT	Alb	PT	TG
	Promedio ± DE					
Control	78.2 ± 5.4	54.6 ± 5.3 <sup>a</sup>	93.8 ± 5.9	3.9 ± 0.4	6.8 ± 0.4	89.3 ± 7.1 <sup>a</sup>
GBP	86.7 ± 6.2	59.0 ± 7.6	104.4 ± 6.3	4.3 ± 0.4	7.2 ± 0.4	108.5 ± 5.8
IP	74.5 ± 4.2	42.9 ± 7.5 <sup>b</sup>	88.0 ± 9.4	3.6 ± 0.3	6.5 ± 0.3	88.0 ± 6.4
IPG	78.3 ± 9.5	53.2 ± 3.5	95.2 ± 8.50	4.0 ± 0.3	6.5 ± 0.3	69.1 ± 7.1 <sup>b</sup>

GBP= grupo bajo en proteínas, IP= grupo suplementado con isoleucina y prolina, IPG= grupo suplementado con isoleucina, prolina y glicina durante su gestación y lactancia. Glu= glucosa, cHDL= colesterol de lipoproteínas de alta densidad, CT=colesterol total, Alb= albúmina, PT= proteínas totales, TG= triglicéridos. DE= desviación estándar. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni o Kruskal-Wallis según su resultado de normalidad. La suplementación administrada fue de 2 veces el requerimiento diario de aminoácidos.

Como se observa en la siguiente tabla (tabla 12) en la concentración sérica de cHDL, CT, Alb y PT no se presentaron diferencias significativas entre los grupos de estudio y el grupo control de machos, ANOVA >0.05; a excepción de los siguientes casos: el grupo IP registró una menor cantidad de glucosa sérica en comparación con el grupo control, ANOVA >0.05. Además, todos los grupos de intervención: GBP, IP e IPG presentaron una menor cantidad de TG en comparación con el grupo control, ANOVA<0.05.

**Tabla 12.** Indicadores bioquímicos de ratas Wistar macho nacidos de madres suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia.

Grupo	Indicadores bioquímicos					
	Glu	cHDL	CT	Alb	PT	TG
	Promedio ± DE					
Control	79.4 ± 9.5 <sup>a</sup>	48.4 ± 6.3	89.5 ± 3.0	4.2 ± 0.3	6.7 ± 0.6	135.4 ± 5.0 <sup>a</sup>
GBP	68.3 ± 7.3	40.3 ± 3.3	86.8 ± 3.8	3.6 ± 0.0	6.3 ± 0.4	78.5 ± 9.2 <sup>b</sup>
IP	99.3 ± 7.2 <sup>b</sup>	47.0 ± 9.0	97.2 ± 8.3	4.1 ± 0.4	6.2 ± 0.6	107.8 ± 6.5 <sup>b</sup>
IPG	76.3 ± 4.0	39.2 ± 7.8	85.1 ± 7.8	3.5 ± 0.5	6.4 ± 0.7	90.6 ± 8.9 <sup>b</sup>

GBP= grupo bajo en proteínas, IP= grupo suplementado con isoleucina y prolina, IPG= grupo suplementado con isoleucina, prolina y glicina durante su gestación y lactancia. Glu= glucosa, cHDL= colesterol de lipoproteínas de alta densidad, CT=colesterol total, Alb= albúmina, PT= proteínas totales, TG= triglicéridos. DE= desviación estándar. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas para la prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni o Kruskal-Wallis según su resultado de normalidad. La suplementación administrada fue de 2 veces el requerimiento diario de aminoácidos.

## 9. Discusión

Se ha descrito que los efectos a largo plazo de la suplementación gestacional disminuyen los factores de riesgo asociados entre el BPN y el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas en la vida adulta (78). Son pocos los estudios donde se evalúa el efecto de suplementación gestacional en restricción proteica o el uso de aminoácidos en específico. En este estudio se evaluó el efecto de la suplementación con Isoleucina, Prolina y Glicina en crías de rata Wistar sometidas a restricción proteica gestacional.

Al día 21 de vida las crías de los grupos suplementados con aminoácidos (Gly, Pro, Ile) presentaron un aumento de peso mayor en comparación con el grupo control, sin embargo, a partir del día 60 y hasta los 5 meses de vida no hubo cambios en estos grupos, únicamente en el GBP el cual se mantuvo con un menor peso durante los 5 meses de monitoreo. En un estudio realizado en ratones que se suplementaron con aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) se registró un aumento del peso corporal en el grupo de ratones alimentados con una dieta baja en proteínas +BCCA en contraste con el grupo con dieta baja en proteínas; esto indica que la suplementación con BCCA contrarresta los efectos de la restricción proteica (79), explicado por los autores como un efecto de interacción de la cantidad de proteínas en la dieta y la suplementación con BCAA en la que la expresión del factor de crecimiento de fibroplastos (FGF21) es inducido por una dieta baja en proteínas (BP). En humanos los niveles circulantes de FGF21 también aumentaron luego de 28 días con una dieta baja en proteínas, este factor de crecimiento actúa regulando el metabolismo y el crecimiento durante los períodos de ingesta reducida de proteínas (80).

En otros resultados de un meta análisis sobre suplementación, reportan que existe evidencia de que la suplementación prenatal con arginina aumenta el peso al nacer en un 8%, esto en embarazos complicados de modelos animales, mientras que en humanos aumenta en un 6% (81), estos efectos podrían estar mediados por la vía arginina-NO reguladora del desarrollo vascular cuya alteración afectaría negativamente al crecimiento y supervivencia fetal (82), o bien por el efecto de la arginina de estimular el transporte de nutrientes placentarios o la síntesis de proteínas (fetales) a través de la vía mTOR (83).

De igual manera, en otro meta análisis de modelos animales sometidos a distintos tipos de suplementación prenatal se reportó que los efectos en el peso al nacer no tienen un efecto claro entre los grupos suplementados con algunos aminoácidos (arginina, glicina, BCCAS, etc) y el grupo sin suplementos en el peso de los animales, y además el efecto de la suplementación en el peso de los animales fue diferente a distintas edades, por ejemplo la suplementación con macronutrientes aumentó significativamente el peso en ratas jóvenes , pero no en otros grupos de edad, esto puede reflejar los datos limitados disponibles y/o la falta de mediciones repetidas en los mismos estudios a diferentes edades. Sin embargo, también es posible que los efectos a corto plazo de los suplementos sobre el peso fueran afectados en edades posteriores por muchos otros factores que influyen en el peso a edades más avanzadas, como la dieta, el gasto energético y la genética (84).

En general la evidencia indica que distintos tipos de suplementación proteica contrarrestan los efectos de la restricción proteica gestacional sobre el peso de las crías al nacer y en su vida adulta mantienen un peso normal, pues únicamente los grupos con dietas BP de este estudio y en los de la evidencia encontrada se mantuvieron por debajo de sus controles.

Los datos obtenidos en este estudio sobre la ingesta de energía en crías de ratas suplementadas con Ile, Pro, Gly durante su gestación y lactancia son que; tanto los grupos de intervención suplementación de aminoácidos, como el GBP presentaron una mayor ingesta energética en crías de rata hembras, mientras que en machos el consumo energético del grupo GBP fue menor.

La diferencia de resultados observados por sexo en estos grupos podría explicarse por medio de un estudio que describe que el impacto metabólico a largo plazo de la alimentación neonatal temprana tiene mayores efectos en machos que en hembras (85), este efecto se explica por medio del papel de los cromosomas sexuales, las diferentes vías reguladoras que subyacen al desarrollo sexual de la mayoría de los órganos y, finalmente por el impacto fluctuante de por vida de las hormonas sexuales (86).

En el mismo estudio se obtuvo que las crías de ratas que consumieron una fórmula alta en proteína antes del destete tuvieron una mayor ingesta energética en su etapa adulta en comparación con las que recibieron una dieta normal de proteínas, fenómeno que en nuestro estudio se refleja comparando la ingesta que tuvo el grupo GBP de machos en contraste con los grupos que tuvieron una recompensación proteica por medio de la suplementación de aminoácidos (Pro, Gly e Ile) y que podría deberse a que una suplementación que recompensa o aumenta el contenido proteico durante la vida posnatal temprana puede afectar el desarrollo de las vías neuronales del apetito hipotalámico y uno de sus efectos en la edad adulta es la regulación de la homeostasis energética (87).

Asimismo; diversos autores nos brindan información viable para comprender los distintos mecanismos de ingesta asociados a la restricción proteica y suplementación de aminoácidos durante la gestación, pues, la restricción de proteínas induce diversos cambios metabólicos entre ellos el aumento del gasto de energía y la ingesta de alimentos (79), sin embargo, la evidencia también nos dice que, los roedores tienden a ajustar de manera adecuada su consumo de proteínas de acuerdo a sus necesidades energéticas y/o restricciones a las que se les hayan sometido, esta adaptación es más rápida en ratas jóvenes posiblemente porque los requisitos de proteínas son elevados en las primeras etapas del desarrollo y se potencia la retroalimentación positiva posterior a la ingestión (88).

Por lo tanto, la suplementación utilizada en este estudio no generó alteraciones importantes de ingesta energética entre los grupos intervenidos, sin embargo, el grupo GBP de machos sí mantuvo una ingesta energética baja, que puede estar asociada a un efecto metabólico por efecto de la alimentación neonatal, la cual ha demostrado tener mayor impacto en machos.

En este estudio los grupos IPG de hembras y machos presentaron menor cantidad de TAG y TAT, mientras que el grupo GBP de machos registró una menor cantidad de tejido adiposo total.

Entre los efectos de los cambios inducidos a los que se asocia una restricción proteica se encuentra la disminución de la ganancia de masa grasa, se ha reportado que la baja ingesta de proteínas resulta en una masa grasa más baja en comparación con el grupo bajo en proteínas + BCAA (79), lo cual se observó también en las crías del grupo GBP de este estudio, este fenómeno podría explicarse por el aumento en la expresión del gen termogénico en el tejido adiposo blanco subcutáneo y el ARNm de FGF21 en el hígado (79) cuyos efectos metabólicos y conductuales implican acciones importantes en el tejido adiposo (80), por ejemplo el oscurecimiento del tejido adiposo blanco en ratones.

También se menciona que la sensibilidad a la suplementación con BCAA es variable por distintas causas según la composición de macronutrientes de la dieta y nuevamente las diferencias de sexo mencionadas en el apartado de ingesta como por ejemplo, la suplementación a largo plazo con BCAA en la dieta baja en proteínas condujo a la acumulación de masa magra y grasa, pero no mostró ningún impacto cuando se complementó con la dieta normal de proteínas (79).

Estos datos indican que los ratones macho pueden tener diferentes sensibilidades a los BCAA exógenos según los niveles de proteína en la dieta y que la suplementación con BCAA disminuye el peso corporal y la masa grasa de los mismos en respuesta a las dietas ricas en grasas, pero no a las dietas normales en grasas (77). Por otro lado, entre los efectos de los aminoácidos utilizados para suplementación se ha encontrado que la suplementación con Glicina reduce la masa de tejido adiposo blanco y la producción de citoquinas inflamatorias a través de PPAR's los cuales a su vez regulan el balance energético corporal a través del almacenamiento y combustión de energía, mejorando el fenotipo hipertensivo (89-92). De acuerdo con esta evidencia se deduce que la reducción de masa grasa es resultado de una restricción proteica y que el uso de suplementación de aminoácidos reduce a distintos niveles la generación de este tejido a largo plazo en condiciones de una dieta normal, lo que pudimos verificar en el grupo de IPG.

En cuanto a los datos obtenidos en indicadores bioquímicos en crías de ratas suplementadas con aminoácidos durante su gestación y lactancia las ratas hembra

del grupo IP presentaron una menor cantidad de cHDL sérico y el grupo IPG una menor cantidad de TG, mientras que en los grupos de machos todos excepto el Cont obtuvieron también una cantidad baja de TG.

En un estudio en donde se evaluaron efectos a corto y largo plazo de una dieta con restricción energética durante la gestación y lactancia se obtuvieron datos semejantes, pues en los grupos de estudio con dieta baja en energía 70% (durante gestación y durante gestación y lactancia) mostraron niveles más bajos de TG plasmáticos y cHDL (93) ambos datos son contrarios a lo que se reporta en otros estudio en donde crías de rata con restricción energética al 50% durante la gestación y lactancia mostraron altos niveles de TG y cHDL además de algunas diferencias entre los grupos de hembras y machos (94).

Estas diferencias de datos entre estudios podrían explicarse debido a que una dieta de restricción energética podría inducir plasticidad en el sistema fisiológico y metabolismo lipídico (94, 95), sin embargo, estos resultados tienen cambios importantes de acuerdo con el porcentaje y momento en que se mantenga la restricción (96), además Alheiros-Lira (93) sugiere que la mayoría de efectos nocivos de una restricción energética durante la gestación aumentan cuando dicha dieta se mantiene durante la lactancia.

Por otro lado, los grupos de intervención de machos (IP e IPG) obtuvieron datos distintos de glucosa, siendo el IP el que indicó una mayor cantidad de glucosa en suero mientras que el grupo IPG presentó una cantidad normal, lo que podría explicarse de acuerdo a lo siguiente; la Glicina cumple un efecto en la resistencia a la insulina y las enfermedades inflamatorias asociadas (92), debido a su participación en la activación de PPAR- $\gamma$  que disminuyen la acumulación de grasa en los adipocitos, aumentan la adiponectina y disminuyen la expresión de la resistina y el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  mejorando así la sensibilidad a la insulina (89).

Por otro lado, si comparamos el mismo resultado del grupo IP con el grupo GBP encontramos que también se ha reportado que una dieta baja en proteínas mejoró la tolerancia a la insulina, pero no afectó la tolerancia a la glucosa; la alimentación

prolongada con una dieta baja en proteínas conduce a una mejor tolerancia a la insulina en ratones de edad avanzada (79), son tres factores los que contribuyen a esta mejora en la acción de la insulina por la dieta baja en proteínas; a saber, FGF21 hepático, oscurecimiento del tejido adiposo blanco e IL-5 circulante. FGF21 es una hormona endocrina producida principalmente por el hígado durante la restricción de proteínas que desempeña un papel en la mejora de la homeostasis de la glucosa a través del oscurecimiento del tejido adiposo blanco (79).

## **10. Conclusión**

La suplementación con isoleucina, glicina y prolina durante la gestación contrarresta efectos de hiperfagia y ganancia de peso que resultan después de una restricción proteica gestacional, los distintos grupos de intervención en este estudio se mantuvieron con un peso e ingesta normal y proporcional entre grupos durante el tiempo de estudio, la reducción de masa grasa es otro resultado de una restricción proteica y el uso de suplementación de aminoácidos reduce a distintos niveles la generación de este tejido a largo plazo en condiciones de una dieta normal, estos resultados tienen una diferencia importante y bien marcada con el grupo GBP de este estudio pues al ser el grupo expuesto a una restricción proteica durante su gestación y lactancia y sin ningún tipo de suplementación fue este el que resultó con peso corporal, ingesta y tejido adiposo bajos a pesar de consumir una dieta control toda su vida post destete, además los efectos de una restricción energética o proteica durante la gestación y lactancia obtienen distintos niveles de TG y cHDL que pueden depender de acuerdo al porcentaje y momento en que se mantenga dicha restricción, de acuerdo con los datos analizados se sugiere que la suplementación utilizada en este estudio contrarrestó los efectos de la restricción, sin embargo, los niveles fueron aún más bajos de lo necesario lo que nos demuestra que aún hay que buscar una intervención adecuada para estos parámetros, en cuanto a los datos obtenidos de glucosa se concluye que la glicina podría tener mejores efectos en los niveles séricos a largo plazo.

## 11. Bibliografía

1. Solon-Biet SMM, S. J; Coogan, S. C; Cogger, V. C; Gokarn, R; McMahon, A. C; Raubenheimer, D; de Cabo R; Simpson, S. J; Le Couteur, D. G. Dietary Protein to Carbohydrate Ratio and Caloric Restriction: Comparing Metabolic Outcomes in Mice. *Cell Rep.* 2015;11(10):1529-34.
2. Cummings NE, Williams EM, Kasza I, Konon EN, Schaid MD, Schmidt BA, et al. Restoration of metabolic health by decreased consumption of branched-chain amino acids. *J Physiol.* 2018;596(4):623-45.
3. Fontana L, Cummings NE, Arriola Apelo SI, Neuman JC, Kasza I, Schmidt BA, et al. Decreased Consumption of Branched-Chain Amino Acids Improves Metabolic Health. *Cell Rep.* 2016;16(2):520-30.
4. Bhutta Z, Sadiq, K., & Caballero, B. . Protein deficiency. In: Caballero B, editor. *Encyclopedia of Human Nutrition*. Tercera edición ed. ScienceDirect: Academic Press; 2013. p. 111-5.
5. López-Rodríguez M, Sanchez-Mendez J, Sánchez-Martínez M, Domínguez M. Suplementos en embarazadas: controversias, evidencias y recomendaciones. 2010;34.
6. Elango R, Ball RO. Protein and Amino Acid Requirements during Pregnancy. *Adv Nutr.* 2016;7(4):839S-44S.
7. King JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(5 Suppl):1218S-25S.
8. Kaplan B, & EC Meyers, K. Management of Chronic Renal Failure. In: Kaplan B, & EC Meyers, K, editor. *Pediatric nephrology and urology*: Mosby; 2004. p. 257-64.
9. Mordier S, Bruhat A, Averous J, Fafournoux P. Chapter 13 - Cellular Adaptation to Amino Acid Availability: Mechanisms Involved in the Regulation of Gene Expression and Protein Metabolism. In: Storey KB, Storey JM, editors. *Cell and Molecular Response to Stress*. 3: Elsevier; 2002. p. 189-206.
10. A.WaradyM.D.VimalChadhaM.D. B. The Pediatric Patient with Chronic Kidney Disease. In: Sayegh JHyMH, editor. *Chronic kidney disease, dialysis and transplantation*. Thrid ed: Saunders; 2010. p. 231-50.

11. Yu MA. Ultrastructural Changes in the developing rat cerebellum in the chronic undernutrition. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1977;33:391-401.
12. Angulo-Colmenares AG, Vaughan DW, Hinds JW. Rehabilitation following early malnutrition in the rat: body weight, brain size, and cerebral cortex development. *Brain Res.* 1979;169(1):121-38.
13. INEGI. Características de la defunciones fetales registradas en México durante 2020. . México: INEGI, Prensa; 2021 30/08/2021.
14. Covarrubias MAO, Portales LMQ, Rodríguez JEL, Madrazo MÁG. Prevalencia de la desnutrición fetal en recién nacidos a término. *Pediatría de México.* 2011;13(2):65-70.
15. Metcoff J. Clinical assessment of nutritional status at birth. Fetal malnutrition and SGA are not synonymous. *Pediatr Clin North Am.* 1994;41(5):875-91.
16. Ancira-Moreno M, Monterrubio-Flores E, Hernandez-Cordero S, Omana-Guzman I, Soloaga I, Torres F, et al. Incidence of low birth weight in Mexico: A descriptive retrospective study from 2008-2017. *PLoS One.* 2021;16(9):e0256518.
17. Maresca SLV, S.O.; Rodríguez, A.M.; Long, N. M.; Pavan, E.; Quintans, G. Efecto de la restricción proteica de vacas durante la gestación tardía sobre el crecimiento posnatal, el metabolismo de glucosa - insulina y la concentración de IGF-1 de la descendencia. *Ciencias del Ganado.* 2019:31-43.
18. Welham SJM, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney International.* 2002;61(4):1231-42.
19. Bautista CJ, Bautista RJ, Montañó S, Reyes-Castro LA, Rodriguez-Peña ON, Ibáñez CA, et al. Effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on milk composition and offspring development. *British Journal of Nutrition.* 2019;122(2):141-51.
20. Ramirez-Velez R. Programación Fetal in utero y su impacto en la salud del adulto. *Endocrinología y Nutrición.* 2012:383-93.
21. Aguilera-Méndez A. La nutrición materna y la programación metabólica: el origen fetal de las enfermedades crónicas degenerativas en los adultos. *Revista*

científica multidisciplinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México.  
2020;27:392-400.

22. Ballesteros AS. Medicina Lamarckiana: epigenética y origen intrauterino de las enfermedades del adulto. 2014.
23. Reyes RB, Carrocera LAF. Programación metabólica fetal. Perinatología y Reproducción Humana. 2015;29(3):99-105.
24. Maliqueo M, Echiburú B. Programación fetal de las enfermedades metabólicas. Revista de Farmacología de Chile. 2014;7(1):33-46.
25. Roseboom TJ. Epidemiological evidence for the developmental origins of health and disease: effects of prenatal undernutrition in humans. Journal of Endocrinology. 2019;242(1):T135-T44.
26. Fleming TP, Watkins AJ, Velazquez MA, Mathers JC, Prentice AM, Stephenson J, et al. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. Lancet. 2018;391(10132):1842-52.
27. Velazquez MAF, T. P; Watkins, A. J. Periconceptional environment and the developmental origins of disease. J Endocrinol. 2019;242(1):33-49.
28. Perrone SS, A; Picardi, A; Buonocore, G. Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases. World J Clin Pediatric. 2016;5(2):172-81.
29. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. BMJ. 1990;301(6761):1111.
30. Carpinello OJ, DeCherney AH, Hill MJ. Developmental Origins of Health and Disease: The History of the Barker Hypothesis and Assisted Reproductive Technology. Semin Reprod Med. 2018;36(3-04):177-82.
31. Marciniak A, Patro-Malysza J, Kimber-Trojnar Z, Marciniak B, Oleszczuk J, Leszczynska-Gorzela B. Fetal programming of the metabolic syndrome. Taiwan J Obstet Gynecol. 2017;56(2):133-8.
32. Loria AS, Goulopoulou S, Bourque SL, Davidge ST. Chapter 16 - Sex Differences in Developmental Origins of Cardiovascular Disease. In: LaMarca B, Alexander BT, editors. Sex Differences in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology: Academic Press; 2019. p. 253-89.

33. Tain YLH, C. N; Chan, J. Y. PPARs Link Early Life Nutritional Insults to Later Programmed Hypertension and Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2015;17(1).
34. Abu-Baker S. Review of Biochemistry: Concepts and Connections, First Edition. *Journal of Chemical Education.* 2015;92(12):1977-8.
35. Maldonado-Durán JM, Lartigue T. Fenómenos de la "programación" in utero: efectos del alto nivel de estrés y de la desnutrición durante el embarazo. *Perinatología y Reproducción Humana.* 2008;22:26-35.
36. Hernández JLC, González MJC, Galiana MA, Hernández EYR. Síndrome metabólico, un problema de salud pública con diferentes definiciones y criterios. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana.* 2018;17(2):7-24.
37. Lizarzaburu-Robles J. Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *Anales de la Facultad de Medicina.* 2013;74:315-20.
38. Castillo HJL CG, Almar GM, et al. Síndrome metabólico, un problema de salud pública con diferentes definiciones y criterios. . *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* 2018;17(2):7-24.
39. Reaven G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinology Metab Clin North America.* 2004;33(2):283-303.
40. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:22.
41. Gomez Candela C, Canton Blanco A, Luengo Perez LM, Fuster GO. Efficacy, cost-effectiveness, and effects on quality of life of nutritional supplementation. *Nutr Hosp.* 2010;25(5):781-92.
42. Piccardi NM, P. Nutrition and nutritional supplementation: Impact on skin health and beauty. *Dermatoendocrinology.* 2009;1(5):271-4.
43. P. Ammann M.D. AL, J.-P. Bonjour, J. M. Meyer, P. Rügsegger, R. Rizzoli. Dietary Essential Amino Acid Supplements Increase Bone Strength by Influencing Bone Mass and Bone Microarchitecture in Ovariectomized Adult Rats Fed an Isocaloric Low-Protein Diet *Journal of bone and mineral research* 2009;17(7):1264-72.

44. Huttunen MMP, M; Ahlstrom, M. E; Lamberg-Allardt, C. J. Effects of bioactive peptides isoleucine-proline-proline (IPP), valine-proline-proline (VPP) and leucine-lysine-proline (LKP) on gene expression of osteoblasts differentiated from human mesenchymal stem cells. *Br J Nutr.* 2007;98(4):780-8.
45. Jennings A, MacGregor A, Spector T, Cassidy A. Amino Acid Intakes Are Associated With Bone Mineral Density and Prevalence of Low Bone Mass in Women: Evidence From Discordant Monozygotic Twins. *J Bone Miner Res.* 2016;31(2):326-35.
46. Wolfe RR. Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: myth or reality? *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* 2017;14(1):30.
47. Kohlmeier M. Chapter 8 - Amino Acids and Nitrogen Compounds. In: Kohlmeier M, editor. *Nutrient Metabolism (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 265-477.
48. García J, Castillo J, Nájera MDJ, Cuevas-Reyes V, Lee Rangel H, Rosales-Nieto C. IV Congreso Internacional y XV Congreso Nacional sobre Recursos Bióticos de Zonas Áridas "Innovaciones para mitigar sequía y desertificación" 7 Efecto de la suplementación de metionina durante el último tercio de la gestación sobre el desarrollo postnatal de cabras.2019.
49. Ota E, Hori H, Mori R, Tobe-Gai R, Farrar D. Antenatal dietary education and supplementation to increase energy and protein intake. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015(6):CD000032.
50. Saitoh M. Energy Requirement for Pregnant Rats. *JARQ-JAPAN AGRICULTURAL RESEARCH QUARTERLY.* 1982;16(3):202-6.
51. Tagle MA, Donoso G. Protein Requirements for the Pregnant Rat/Eiweissbedarf schwangerer Ratten/Besoins protéiques de la ratte gestante. *Nutritio et dieta.* 1969:44-52.
52. Reeves PGN, F. H; Fahey, G. C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutrition.* 1993;123(11):1939-51.

53. Medicine Io. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Illustrated ed. Washington, D.C: National Academies Press; 2006 29 Septiembre
54. Medicine. Io. Dietary fats: total fat and fatty acids. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. Washington, DC: The National Academies Press; 2005. p. 422-540.
55. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993;123(11):1939-51.
56. Naismith DJ. The foetus as a parasite. Proceedings of the Nutrition Society. 2007;28(1):25-31.
57. Naismith DJ, Morgan BLG. The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. British Journal of Nutrition. 2007;36(3):563-6.
58. E.Mitcha MSW. Nutritional Management of Patients with Chronic Kidney Disease. In: Kimmel PLR, M., editor. Chronic Renal Disease Second ed. ScienceDirect2020. p. 975-89.
59. Gleeson M. Dosing and Efficacy of Glutamine Supplementation in Human Exercise and Sport Training. The Journal of Nutrition. 2008;138(10):2045S-9S.
60. Sweetman S. The Complete Drug Reference. Londres: Prensa Farmaceutica; 2009.
61. Zhang SZ, Xiangfang; Mao, Xiangbing; Qiao, Shiyan. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: A review. Journal of Animal Science and Biotechnology. 2017;8.
62. McKee TMJR. BIOQUÍMICA Las bases moleculares de la vida. 7ma ed: McGRAW-HILL INTERAMERICANA 2020.
63. Biotecnológica CNdl. Resumen de compuestos de PubChem para CID 6306, I- isoleucina PubChem2022 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/I-Isoleucine>].
64. PC C. Branched-chain amino acids and immunity. J Nutrition. 2006;136(1):288-93.

65. Cota D, Proulx, K., Smith, K. A., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C., & Seeley, R. J. . Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*. 2006;312(5775):927-30.
66. Shuge Liu‡ YS, Rui Zhao , Yingqian Wang , Wanrong Zhang and Weijun Pang. Isoleucine increases muscle mass through promoting myogenesis and intramyocellular fat deposition. *Food & Function*. 2020;12(1):144-53.
67. Bhagavan NV, Ha C-E. Chapter 3 - Amino Acids. In: Bhagavan NV, Ha C-E, editors. *Essentials of Medical Biochemistry (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 21-9.
68. Biotecnológica CNdl. Resumen de compuestos de PubChem para CID 145742, prolina PubChem2022 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Proline>]
69. Szabados LS, A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*. 2010;15(2):89-97.
70. Biotecnológica. CNdl. Resumen de compuestos de PubChem para CID 750, glicina PubChem2022 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycine>].
71. Matilla B, Mauriz J, Culebras J, González-Gallego J, González P. Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient. *Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*. 2002;17:2-9.
72. Eastoe JE. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochem J*. 1955;61(4):589-600.
73. Carvalho AM, Marques AP, Silva TH, Reis RL. Evaluation of the Potential of Collagen from Codfish Skin as a Biomaterial for Biomedical Applications. *Mar Drugs*. 2018;16(12).
74. Aida Teodora Sáez Rosell YMS, Dra. Jannette Espinosa Martínez, MSc. Gladys Sáez Chirino, MSc. Martha Beatriz Rosales Lameira, Dra. Milagros Noemí Soto Benítez. Incidencia y mortalidad del recién nacido bajo peso. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2011;37(4).

75. Murguía-de Sierra Teresa V-SE. El recién nacido de muy bajo peso. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. [revista en la Internet]. Boletín médico del Hospital Infantil de México,. 2006;63(1):4-7.
76. Fernández A. ;Martínez AC, R. ; Palma, I.; Amalia. Efectos y costos de la desnutrición. El costo de la doble carga de malnutrición: impacto social y económico: Síntesis del estudio piloto en Chile, Ecuador y México CEPAL; 2017. p. 34-40.
77. Debiasi S, Cora D, Zagarese R. Determination of proteins with a biuret reaction in ultraviolet spectrophotometry. Prog Med. 1957;13(22):756-9.
78. DelCurto H, Wu G, Satterfield MC. Nutrition and reproduction: links to epigenetics and metabolic syndrome in offspring. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. 2013;16(4):385-91.
79. Mu WC, VanHoosier E, Elks CM, Grant RW. Long-Term Effects of Dietary Protein and Branched-Chain Amino Acids on Metabolism and Inflammation in Mice. Nutrients. 2018;10(7).
80. Laeger T, Henagan TM, Albarado DC, Redman LM, Bray GA, Noland RC, et al. FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. J Clin Invest. 2014;124(9):3913-22.
81. Terstappen F, Tol AJC, Gremmels H, Wever KE, Paauw ND, Joles JA, et al. Prenatal Amino Acid Supplementation to Improve Fetal Growth: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients. 2020;12(9).
82. Weckman AM, McDonald CR, Baxter JB, Fawzi WW, Conroy AL, Kain KC. Perspective: L-arginine and L-citrulline Supplementation in Pregnancy: A Potential Strategy to Improve Birth Outcomes in Low-Resource Settings. Adv Nutr. 2019;10(5):765-77.
83. Yao K, Yin YL, Chu W, Liu Z, Deng D, Li T, et al. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. J Nutr. 2008;138(5):867-72.
84. Amissah E, Lin L, Gamble GD, Crowther CA, Bloomfield FH, Harding JE. Macronutrient Supplements in Preterm and Small-for-Gestational-Age Animals: A Systematic Review and Meta-analysis. Sci Rep. 2019;9(1):14715.

85. Delamaire E, Parnet P, Coupe B, Hoebler C, Blat S, Poupeau G, et al. Long term metabolic impact of high protein neonatal feeding: a preliminary study in male rat pups born with a low birth weight. *Clin Nutr.* 2012;31(5):741-8.
86. Gabory A, Attig L, Junien C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;304(1-2):8-18.
87. Coupe B, Delamaire E, Hoebler C, Grit I, Even P, Fromentin G, et al. Hypothalamus integrity and appetite regulation in low birth weight rats reared artificially on a high-protein milk formula. *J Nutr Biochem.* 2011;22(10):956-63.
88. Murphy M, Peters KZ, Denton BS, Lee KA, Chadchankar H, McCutcheon JE. Restriction of dietary protein leads to conditioned protein preference and elevated palatability of protein-containing food in rats. *Physiol Behav.* 2018;184:235-41.
89. El Hafidi M, Perez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G, Banos G. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(6):R1387-93.
90. El Hafidi M, Perez I, Banos G. Is glycine effective against elevated blood pressure? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9(1):26-31.
91. Almanza-Perez JC, Alarcon-Aguilar FJ, Blancas-Flores G, Campos-Sepulveda AE, Roman-Ramos R, Garcia-Macedo R, et al. Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(8):534-40.
92. Alarcon-Aguilar FJ, Almanza-Perez J, Blancas G, Angeles S, Garcia-Macedo R, Roman R, et al. Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice. *Eur J Pharmacol.* 2008;599(1-3):152-8.
93. Alheiros-Lira MC, Araujo LL, Trindade NG, da Silva EM, Cavalcante TC, de Santana Muniz G, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-energy diet ad libitum during gestation and/or lactation on physiological parameters of mothers and male offspring. *Eur J Nutr.* 2015;54(5):793-802.
94. Lee S, Lee KA, Choi GY, Desai M, Lee SH, Pang M-G, et al. Feed restriction during pregnancy/lactation induces programmed changes in lipid, adiponectin and leptin levels with gender differences in rat offspring. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 2013;26(9):908-14.

95. MJ. W-E. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. *Journal of experimental Zoology* 2005;304B(6):610-8.
96. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007;196(6):555.e1-.e7.

## Anexo 1. Dictamen comité de ética

	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO COORDINACIÓN ACADÉMICA DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS DIRECCIÓN DEL BIOTERIO	
COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO		
		
DICTAMEN DE EVALUACIÓN	10 de febrero de 2021	
<b>ESTIMADA DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ</b>		
Por medio de la presente, me es grato informarle que después de haber revisado su protocolo de investigación, intitulado <b>“Efecto de la suplementación de isoleucina, prolina y glicina en el crecimiento y densidad ósea de huesos largos de crías de ratas Wistar con restricción proteica”</b> , donde participa la LN. María Vianey Abelar Rosas, el CICUAL ha decidido aprobarlo y queda registrado con el <b>Número de Aprobación CICUAL/001/2021</b> .		
Sin más otro particular, aprovechamos la ocasión deseándole el mejor de los éxitos en su proyecto.		
ATENTAMENTE “AMOR, ORDEN y PROGRESO”		
 DR. LUIS DELGADO OLIVARES PRESIDENTE DEL CICUAL	 ING. DANIEL RAMÍREZ RICO DIRECTOR DEL BIOTERIO	