

# Implementación de un modelo de restricción proteico-calórico en ratas para el estudio del síndrome metabólico

Sacnité Albarrán-Bravo<sup>1</sup>, Jaime Acosta-Chávez<sup>1</sup>, Omar Guzmán Quevedo<sup>1</sup>, Madeline Hernández Rebollar<sup>2</sup> y Rosalio Mercado-Camargo\*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. 58240.

\* ros421@hotmail.com

---

## RESUMEN

Está bien establecido en una variedad de especies que las alteraciones producidas por la restricción proteico-calórica (RPC) o restricción alimentaria pueden tener efectos permanentes si ésta ocurre en un periodo crítico durante la etapa del desarrollo fetal. Estudios epidemiológicos en humanos relacionan la incidencia de una variedad de enfermedades en el adulto, tales como la diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y la hipertensión con la pobre nutrición prenatal y el bajo peso al nacer. Este grupo de enfermedades es comúnmente conocido bajo el término de Síndrome Metabólico o Síndrome X. La nutrición materno-fetal comprometida resulta en un retardo en el crecimiento fetal y además, la RCP es uno de los principales factores no genéticos que afectan el desarrollo del cerebro. Los mecanismos que describen estas alteraciones pato-fisiológicas están aun por ser elucidados. Es por esto, importante el poder contar con un modelo de restricción alimenticia para poder realizar estudios concernientes al impacto que tiene el estrés nutricional (restricción proteico-calórica) en el desarrollo del Síndrome Metabólico. Por lo que en el presente trabajo sometimos a un grupo de ratas a RPC y determinamos parámetros como peso, talla e índice de masa corporal. Los resultados muestran que la talla y el peso de los animales con RPC fueron estadísticamente significativo menores que el grupo control, por lo cual con él esquema de restricción alimenticia empleado se podrán realizar estudios concernientes al síndrome metabólico.

**Palabras clave:** Desnutrición, Síndrome Metabólico, Modelo de restricción proteico-calórica.

## ABSTRAC

It is well established that in a variety of species, the protein-caloric restriction (PCR) or alimentary restriction during foetal development, produce alterations that had permanents effects. Human epidemiological studies link the incidence of a number of adult diseases, such as type 2 diabetes, cardiovascular disease (CVD) and hypertension with poor nutrition and low birth weight. This group of diseases is often referred to under the term Metabolic Syndrome or Syndrome X. The compromised maternal-foetal nutrient supply results in foetal growth retardation and also, the PCR is a non-genetic factor that affects brain development. The mechanisms underlying the pathophysiological of these associations, however, have yet to be elucidated. This in turn is linked to altered "programming" of development of fetal organs and of physiological homeostatic control processes. Programming occurs during critical periods of development, changes become permanent and lead to later pathophysiological events. So, it is important to establish animal models of nutritional stress (protein-caloric restriction) in order to explore the molecular mechanisms implicated in the development of de Metabolic Syndrome. The aims of the present study were to determine the impact

of PCR in body weight, length and body mass index. The results showed that animals of the PCR group had significantly decreased in body weight, length and body mass index than controls, whereby, the PCR it's a model useful in Metabolic Syndrome study.

**Key words:** Undernutrition, Metabolic syndrome, Protein-caloric restriction model

## INTRODUCCIÓN

Se conoce que las enfermedades cardiovasculares y metabólicas más comunes en nuestra sociedad –hipertensión, diabetes mellitus (DM) tipo II, dislipidemia y enfermedad coronaria– están causadas por factores de riesgo exógenos específicos, asociados a determinados estilos de vida que actúan sobre un individuo genéticamente susceptible (Moreno y Serra 2001). Datos epidemiológicos recientes sugieren que alteraciones en la nutrición pre y posnatal pueden ser un factor importante en la etiopatogenia de estas enfermedades. Barker y Osmond (1986) proponen la teoría del impacto de las condiciones de vida intrauterina sobre la aparición de enfermedades en la vida adulta (hipótesis de Barker), en la que se postula que la enfermedad cardiovascular y la DM tipo II se originan como mecanismo de adaptación del feto ante la restricción alimentaria intrauterina. El bajo peso o la talla menor al nacimiento se correlacionan firmemente con la aparición de hipertensión, hiperlipidemia, resistencia a la insulina o enfermedad coronaria en la edad adulta (Moreno y Serra 2001, Barker y Osmond 1986).

La restricción proteico-calórica (RPC) o restricción alimentaria intrauterina ocurre cuando los requerimientos corporales de proteínas, sustratos de energía o ambos no pueden satisfacerse por medio de la dieta. Este tipo de restricción incluye un gran espectro de manifestaciones clínicas cuya presentación depende de la intensidad relativa de la deficiencia de proteínas y/o calorías, de la gravedad, de las etapas donde esta ocurre, la duración de la deficiencia y su relación con otras afecciones nutricionales o infecciones. Su gravedad varía desde la pérdida de peso o el retraso del crecimiento hasta síndromes clínicos específicos que con frecuencia se relacionan con deficiencias de minerales y vitaminas (WHO 1980, Fowden *et al.*, 2006). Los efectos adversos de la restricción proteico-calórica ma-

terna durante el embarazo en las madres y sus descendientes constituyen un gran problema de la salud pública, especialmente entre los países en desarrollo, con variado resultado en el crecimiento fetal, morbilidad, mortalidad y en el desarrollo inmediato y a largo plazo de los niños. Estudiando la restricción inducida en ratas durante el periodo prenatal se reportan disminuciones en el peso corporal y en la talla de las crías al nacer. Confirmando la posibilidad de que estas crías en la vida adulta puedan desarrollar enfermedades relacionadas con el Síndrome Metabólico (Valiente *et al.*, 1999).

### *Teoría del desarrollo fetal de la enfermedad*

Esta teoría más comúnmente conocida como la hipótesis de Barker, establece que una alteración *in útero* sería capaz de producir una programación anormal de diversos sistemas relacionados entre sí que se manifestaría en una etapa adulta y bajo condiciones específicas de crecimiento (Moreno y Serra 2001, Sallout y Walker 2003). El bajo peso al nacimiento se asocia a un incremento en el riesgo de tener complicaciones en el periodo neonatal y aumento en la mortalidad perinatal, además, se asocia a mayor riesgo de enfermedad en la vida adulta, ya que el papel que juega la nutrición materna, es un punto clave para el desarrollo normal del feto, alteraciones (desnutrición materna) durante la gestación y/o la lactación conllevan a cambios metabólicos en la edad adulta (programación fetal) de la cría (Gosby *et al.*, 2003). (FIGURA 1).

Los estudios epidemiológicos de Barker, muestran que aquellos individuos con un bajo peso al nacimiento tienen un riesgo aumentado de padecer enfermedad cardiovascular y otras alteraciones asociadas (accidente cerebrovascular, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial y síndrome metabólico) en la edad adulta. Estos resultados dieron lugar a plantear la hipótesis del origen fetal de la enfermedad o de la programa-

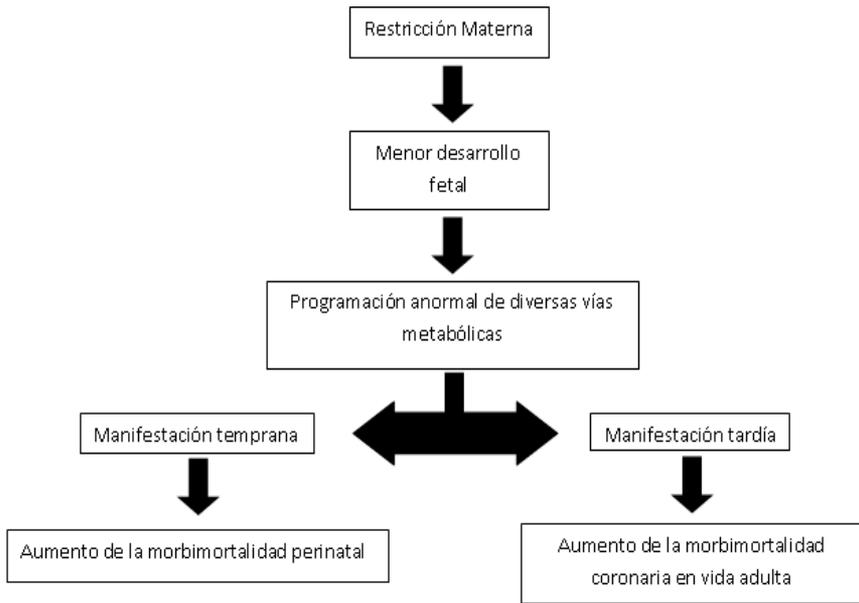


FIGURA 1. Teoría de la programación: la malnutrición materna durante la gestación produce una agresión *in útero* que altera la nutrición normal y el desarrollo fetal. Figura tomada y modificada de Moreno y Serra (2001).

ción fetal, que establece que la enfermedad cardiovascular y la diabetes mellitus tipo 2 se originan por la adaptación del feto (un crecimiento intrauterino pobre, manifestado como un bajo peso al nacimiento) debido a la malnutrición intrauterina (De Boo y Harding, 2006).

### Hipótesis del fenotipo “Ahorrador” (“Thrifty”)

Hales y Barker en 1992 propusieron la hipótesis del fenotipo “ahorrador” (“thrifty phenotype”) (Hales y Barker 2001, Hales y Ozanne 2003). Esta hipótesis sugiere que la restricción fetal puede inducir adaptaciones fisiológicas y/o metabólicas en el feto para asegurar su adecuada alimentación y obtención de nutrientes para los órganos vitales (ej. cerebro) a expensas de otros órganos menos vitales (ej. páncreas). Se propone que si un feto en crecimiento es malnutrido o restringido, adoptará varias estrategias para maximizar sus oportunidades de supervivencia postnatal. Primero distribuye selectivamente los

nutrientes a fin de alterar el crecimiento de los diferentes órganos. Segundo, ocurre la programación metabólica conduciendo a cambios metabólicos en la progenie lo que incrementa sus oportunidades de condiciones de supervivencia durante una situación de pobre nutrición postnatal. Sin embargo, estas adaptaciones generan alteraciones al estado de salud si el organismo sufre de alteraciones nutricionales durante el desarrollo intrauterino, o experimenta una buena nutrición en la etapa postnatal (lactación), incrementándose el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el Síndrome Metabólico como obesidad, diabetes tipo II, hipertensión, resistencia a la insulina o enfermedades cardiovasculares, en etapas posteriores de la vida. Esto explicaría porqué la diabetes es menor en el Sahara donde una pobre nutrición fetal continúa con otra pobre alimentación postnatal y también porqué es mayor en los países occidentales donde la pobre nutrición fetal sigue con una sobrenutrición en la etapa adulta y posteriormente obesidad (De Boo y Harding 2006, Ozanne y

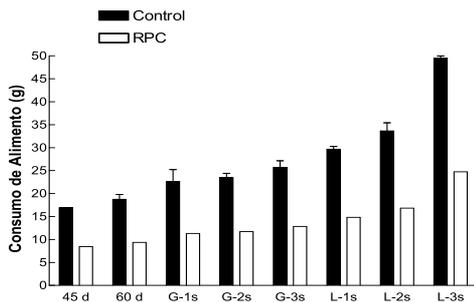
Hales 2002). Las adaptaciones durante periodos críticos del desarrollo pueden de manera permanente “reajustar” o “programar” al sistema metabólico, que incrementa la posibilidad de sobrevivencia del feto al enfrentarse a un ambiente pobre de nutrientes, pero esto resulta en una dificultad para “reaccionar” adecuadamente a una abundancia de nutrición en la vida posterior (“discordancia”) con consecuencias deletéreas a largo plazo (Wu *et al.*, 2004). La hipótesis también sugiere que la mala nutrición en la infancia puede contribuir reduciendo la capacidad funcional de las células  $\beta$  del páncreas, dando como resultado una resistencia a la insulina. La hipótesis hace énfasis en el rol etiológico de la pobre nutrición fetal. Manipulaciones en la restricción alimentaria fetal (ej. restricción proteico-calórica) en varios modelos animales han demostrado algunos cambios “programados” en islotes pancreáticos, hígado y músculo, y el establecimiento en la etapa adulta del síndrome metabólico en las crías. Esta hipótesis parece ser ampliamente aceptada, para explicar los orígenes del desarrollo de la enfermedad, sugiriendo que la nutrición fetal y postnatal temprana juegan un papel muy importante en determinar la susceptibilidad de un individuo a padecer enfermedades relacionadas con el Síndrome Metabólico (Hales y Ozanne 2003, Luo *et al.*, 2006).

### ***Hipótesis del desarrollo acelerado***

Esta hipótesis fue propuesta por Singhal y Lucas (Singhal y Lucas 2004) para explicar las asociaciones entre un crecimiento postnatal acelerado temprano en infantes en pre-termino y el elevado riesgo de padecer síndrome metabólico o alteraciones en los indicadores de esta enfermedad (resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión, obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares) en edad adulta (Singhal y Lucas 2004). Un crecimiento postnatal acelerado temprano es común entre los bebés nacidos en pre-termino. Este crecimiento acelerado postnatal podría programar a los componentes principales del síndrome metabólico y como consecuencia la susceptibilidad a padecer diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. La hipótesis enfatiza el papel que juega la nutri-

ción postnatal en la programación fetal adversa y se cuestiona los efectos causales de la desnutrición o restricción fetal *per se*. Esta hipótesis parece encontrar además en algunos apoyos de modelos animales de crecimiento postnatal acelerado, un daño en la tolerancia a la glucosa y en el tiempo de vida del animal (Bertram y Hanson 2001). Una hipótesis similar, la cual fue nombrada como “catch-up growth” o hipótesis del crecimiento “recuperacional”, propuesta por Cianfarani (Cianfarani *et al.*, 1999), basado en la razón fundamental de que los recién nacidos comprometidos en el desarrollo con frecuencia tienen bajos niveles en suero de insulina, IGF-1, IGF plasmática unida a proteína 3 (IGFBP-3), pero altas concentraciones de la hormona de crecimiento (GH), de IGFBP-1 y IGFBP-2 en comparación con los recién nacidos con crecimiento normal, y sabiendo que la normalización de los niveles de insulina y el factor de crecimiento IGF ocurre usualmente durante los primeros 3 meses de la vida postnatal lo cual coincide con el rápido crecimiento “recuperacional” que comúnmente ocurre en los niños comprometidos en su desarrollo. Es de esperarse que tejidos con disminución crónica en los niveles de insulina y de IGF durante la etapa fetal que sean expuestos a altas concentraciones de estas dos hormonas, puedan actuar de manera que se desarrolle una resistencia a la insulina como respuesta metabólica de supervivencia para la defensa en contra de la hipoglucemia, que pudiera ser el fundamento de la asociación entre el crecimiento “recuperacional” y el elevado riesgo de la resistencia a la insulina y otros desordenes asociados. Esto implica que aumentar el crecimiento del recién nacido mediante una dieta enriquecida en nutrientes puede realmente hacer más daño que bien en etapas futuras (Hales y Ozanne 2003, Cianfarani *et al.*, 1999).

Con los antecedentes mencionados resulta importante el contar con un modelo de restricción proteico calórico confiable y reproducible para abordar aspectos relacionados con alteraciones en la nutrición por lo que el objetivo del presente trabajo fue implementar un modelo de restricción proteico-calórica en ratas de la cepa Wistar y estudiar el efecto de la restricción en la



**FIGURA 2.** Consumo de alimento. A los 45 días (45d), 60 días (60 d), primera, segunda y tercera semana de gestación (G-1s, G-2s, G-3s) y durante las tres semanas de lactación (L-1s, L-2s, L-3s).  $X \pm D.E.$  de 20 ratas de cada grupo.

rata gestante sobre el crecimiento corporal de las crías durante la gestación y la lactación.

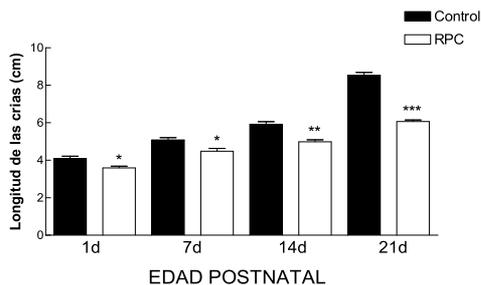
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa Wistar de 200-220 gr de peso corporal, obtenidas del bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la U.M.S.N.H. las cuales se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas de ciclos de luz-oscuridad de 12hr cada uno, humedad relativa del 80% y temperatura de 20-24 °C.

### Esquema de la restricción proteico-calórica

Se seleccionó un grupo de 20 ratas hembra nulíparas de 45 días de edad postnatal a las cuales se les midió el consumo de alimento Purina Chow durante dos semanas, al término de las mismas se determinó el consumo de alimento promedio del cual a otro grupo de ratas hembra de la misma edad se les proporcionó el 50% durante dos semanas. A las dos semanas de restricción alimenticia, las ratas fueron sometidas a cruce, tanto el grupo experimental como el grupo control, una vez corroborada la gestación mediante revisión de la aparición del tapón vaginal o mediante frotis vaginal, las ratas continuaron con el 50% del consumo de las ratas controles también gestantes. Al nacimiento, se contó el número de crías y se determinó el sexo,



**FIGURA 3.** Longitud céfalo-sacra de las crías del grupo control y del grupo con restricción alimenticia (RPC). Al nacimiento (1d), a los 7d, 14d y 21d.  $X \pm D.E.$  de 30 crías por grupo.\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ .

durante la lactación las ratas continuaron con el 50% del consumo de alimento de las ratas control. Se realizó un seguimiento de generaciones en cuanto al consumo de alimento y peso de las ratas controles y con restricción alimenticia. En el primer día, posterior al parto, fue registrado el número de crías, el peso corporal y la longitud céfalo sacra (talla).

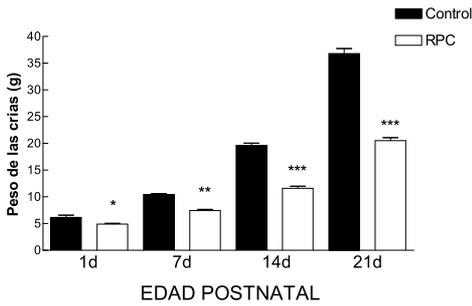
### Análisis Estadístico

Se obtuvo la media aritmética y la desviación estándar de los datos experimentales. Se aplicó el análisis de la "t" de student para comparar el grupo control contra el grupo experimental. Para los gráficos se empleó el programa Graph Pad Prism ver 3.0.

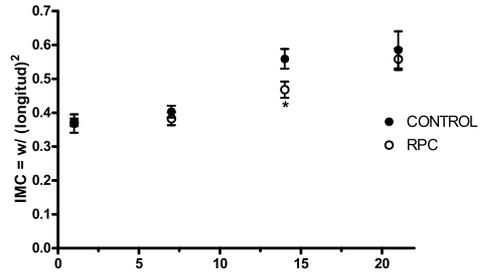
## RESULTADOS

En la FIGURA 2 se muestran los resultados del consumo de alimento de las ratas del grupo control, observándose un incremento constante de consumo de alimento desde los 45 días de edad (consumiendo 16 gr), hasta la última semana del periodo de lactación (consumiendo 50 gr), las ratas del grupo con RPC recibieron el 50% del alimento consumido por el grupo control.

Con respecto a la longitud de las crías en la FIGURA 3 se muestra la longitud céfalo-sacra (talla) de las crías de ambos grupos. Se observó un crecimiento casi lineal de la longitud en ambos grupos desde el nacimiento hasta los 21 días,



**FIGURA 4.** Peso de las crías del grupo control y del grupo sometido a restricción alimenticia. Al nacimiento (1d), 7d, 14d y 21d. X ± D.E. de 30 crías por grupo. \*P<0.05, \*\*P<0.01 y \*\*\*P<0.001.



**FIGURA 5.** Índice de masa corporal de las crías del grupo control y del grupo RPC a las diferentes edades (1d, 7d, 14d y 21d). X ± D.E. de 30 crías por grupo.

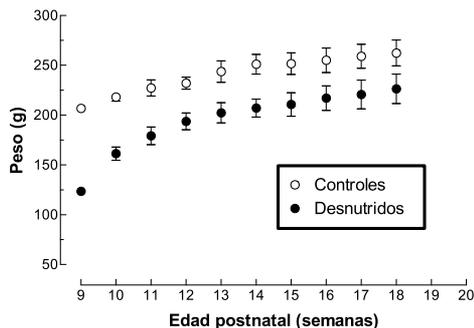
pero con disminución de la talla estadísticamente significativa en el grupo con RCP con respecto al grupo control en todas las edades postnatales.

En la **FIGURA 4** se muestra el peso corporal de las crías de los grupos control y con RPC, se observó un crecimiento casi lineal del peso desde el nacimiento hasta los 21 días de edad existiendo una disminución estadísticamente significativa del peso corporal de las crías con RPC comparadas con las del grupo control.

Se realizó la determinación del índice de masa corporal de las crías del grupo control y del grupo RPC a las diferentes edades (1d, 7d, 14d y 21d), este parámetro nos permite corroborar los efectos adversos de una desnutrición protéico-calórica durante la etapa de gestación. En la **FIGURA 5** se muestra la gráfica de los valo-

res del índice de masa corporal de ambos grupos, observándose un patrón similar del índice de masa corporal en ambos grupos en las diferentes etapas de determinación y una disminución estadísticamente significativa (\*P<0.05) a los 14 días de edad de los animales sometidos a RPC con respecto a su control.

En la **FIGURA 6** se observa la evolución del peso corporal en animales sometidos a una dieta con RPC durante las etapas de gestación y lactación que posteriormente fueron sometidos a una dieta normal a partir de los 21 días de edad (recuperación alimenticia) y un grupo de animales control. El peso de los animales con restricción fue estadísticamente significativo (\*P<0.05) observándose una menor ganancia de peso del grupo en RPC con respecto al grupo control durante las 10 semanas en las que se realizó el seguimiento de la recuperación nutricional.



**FIGURA 6.** Evolución del peso de animales del grupo RPC y grupo control sometidos a dieta normal. X ± D.E. de 3 ratas de cada grupo.

## DISCUSIÓN

El concepto de que la nutrición maternal puede programar enfermedades en adultos fue establecido en experimentos en animales. Winick y Noble (Winick y Noble 1966) mostraron que una nutrición pobre durante la gestación deja una reducción irreversible del número de células en tejidos tales como el páncreas. Mediante dos diferentes estrategias dietarias: restricción global nutricional, y manipulación isocalórica baja en proteína, en la baja proteína maternal se han estudiado los mecanismos que

relacionan la nutrición maternal con cambios en el crecimiento fetal y enfermedades cardiovasculares tardías y diabetes, nuestros resultados con el modelo de restricción proteico-calórica muestran que efectivamente existe una reducción tanto en el peso y la talla de animales desnutridos tanto en la gestación como en el período de lactación.

Langley-Evans y otros autores (De Boo y Harding 2006, Wu *et al*, 2004, Langley-Evans 2000, Langley-Evans y Sculley 2006, Langley-Evans *et al*, 2005) concluyen que diferentes manipulaciones en una dieta baja en proteína (de 8-9%) durante el embarazo en ratas provoca diferentes efectos de programación, y que el balance de proteína con otros nutrientes puede ser una determinante crítica en los efectos a largo plazo en la salud de la desnutrición maternal durante el embarazo, sin embargo, no está claro como la restricción proteica maternal perturba el crecimiento fetal.

Las ratas que sometimos a recuperación nutricional, mostraron una ingesta de comida mayor comparada con el grupo control, se ha observado en ratas en las que las madres han tenido una restricción de alimento durante las 2 primeras semanas de embarazo, se vuelven obesas, pero esto dependiendo de la cepa o del alimento empleado, y ocurre tanto en hembras como en machos (Luo *et al*, 2006).

La restricción proteico-calórica al 50% durante la gestación y lactación es un buen modelo para estudiar el síndrome metabólico ya que existen alteraciones (disminución) en el peso y talla de los animales sometidos a este tratamiento, además los animales sometidos a recuperación nutricional mantienen disminución del peso y la talla. Esto sugiere que los cambios observados pueden deberse en gran medida a los mecanismos de reajustes metabólicos en el feto.

## CONCLUSIONES

La restricción proteico-calórica al 50% durante la gestación y lactación es un buen modelo para estudiar el síndrome metabólico ya que existen alteraciones (disminución) en el peso y talla de los animales sometidos a este tratamien-

to este hecho puede deberse en gran medida a los mecanismos de reajustes metabólicos en el feto, estos resultados coinciden con los reportes de otros autores.

## REFERENCIAS

- Barker, D. J. y Osmond, C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1: 1077-1081.
- Bertram, C. E. y Hanson, M. A. 2001. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br. Med. Bull.* 60: 103-21.
- Cianfarani, S., Germani, D., y Branca, F. 1999. Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 81: F71-3.
- De Boo, H. y Harding, J. 2006. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *J. Obs. Gynaec.* 46: 4-14.
- Fowden, A. L., Giussani, D. A., y Forhead, J. A. 2006. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiol.* 21: 29-37.
- Gosby, A. K., Maloney, C. A., Phuyal, J. C., Denyer, G. S., Bryson, J. M. y Caterson, I. D. 2003. Maternal protein restriction increases hepatic glycogen storage in young rats. *Pediatr. Res.* 54(3): 413-418.
- Hales, C. N. y Barker, D. J. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* 60: 5-20.
- Hales, C. N. y Ozanne, S. E. 2003. The dangerous road of catch-up growth. *J. Physiol.* 547: 5-10.
- Langley-Evans, S. C. 2000. Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int. J. Food Sci Nutr.* 51:11-17.
- Langley-Evans, S. C. y Sculley, D. V. 2006. The association between birthweight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life. *FEBS Lett.* 580(17): 4150-4153.
- Langley-Evans, S. C., Bellinger, L., y McMullen, S. 2005. Animal models of programming: early life influences on appetite and

- feeding behaviour. *Matern. Child. Nutr.* 1: 142-148.
- Luo, Z. C., Fraser, W. D., Julien, P., Deal, C. L., Audibert, G. N., Xiong, X. y Walker, M. 2006. Tracing the origins of “fetal origins” of adult diseases: Programing by oxidative stress?. *Medical Hypotesis.* 66: 38-44.
- Moreno, J. M., y Serra, D. 2001. Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿Algo más que una hipótesis? *Acta pediátrica española.* 59: 573-581.
- Ozanne, S. E. y Hales, C. N. 2002. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 368-373.
- Sallout, B. y Walker, M. 2003. The fetal origin of adult diseases. *J. Obs. Gynaec.* 23(5): 555-560.
- Singhal, A., y Lucas, A. 2004. Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? *Lancet.* 363: 1642-5.
- Valiente, D., Alfonso, C., Gilda, M., Molina, J. y González, V. 1999. Crecimiento y composición corporal de las crías de ratas sometidas a restricción alimentaria *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 18: 104-10.
- Winick, M., y Noble, A. 1966. Cellular response in rats during maturation at various ages. *J. Nutr.* 89: 300-306.
- World Health Organization. 1980. The effects of nutrition during pregnancy on the offspring. Draft synopsis of the IPA/WHO workshop, Barcelona.
- Wu, G., Fuller, W., Cudd, T. A., Meininger, C. J. y Spencer, T. E. 2004. Maternal nutrition and fetal development. *J. Nutr.* 134: 2169-2172.