

00524
19.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN PROTEÍNICA
INTRAUTERINA EN EL DESARROLLO DE LA
RATA Y EN LA CONCENTRACIÓN DE
CORTICOSTERONA NEONATAL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ROBERTO CABRERA EUGENIO



MÉXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES OCTUBRE 2003
FACULTAD DE QUÍMICA

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Irma Ofelia Bernal Lugo
Vocal	Prof. Gloria Gutiérrez Venegas
Secretario	Prof. Elena Zambrano González
1 ^{er} . Suplente	Prof. Martha Leticia Jiménez Pardo
2 ^o . Suplente	Prof. Nora Andrea Gutiérrez Najera

Sitio de realización de la tesis:

Departamento de Biología de la reproducción del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ)

Asesor



Dra. Elena Zambrano González



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

Sustentante



Roberto Cabrera Eugenio

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Elena Zambrano González en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de proyecto: 138259M

A la Dra. Elena Zambrano González por su asesoría y enseñanzas durante la elaboración del presente trabajo de tesis, en especial por su paciencia y confianza.

Al Dr. Fernando Larrea, jefe del departamento de Biología de la reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y nutrición "Salvador Zubirán", por la facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio quienes, de alguna u otra manera, participaron junto conmigo en este trabajo y estimularon mi superación personal y profesional alentándome siempre a salir adelante, por su alegría, apoyo y amistad.

A mi querida Facultad de Química ya que me brindo su espacio y su calidez durante el tiempo que estuve en ella.

Y a la Universidad Nacional Autónoma de México que me brindo un lugar y la oportunidad de egresar como profesionista.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

A mis queridos padres Don Enrique y Doña Julia por todo el apoyo, confianza y cariño que siempre me han demostrado, para que sepan que son bien correspondidos y como fruto del esfuerzo que realizaron para que terminara mi carrera, los quiero mucho y espero no defraudarlos nunca.

A mis hermanos Patricia, Miguel y Jacqueline como ejemplo de que en la vida sí se cumplen los sueños si se trabaja por conseguirlos, para que nunca pierdan de vista lo que desean para ellos y siempre luchen por lograr las metas que se propongan "siempre podrán contar conmigo".

A mis amigos, Luis y Jesús porque siempre me alientan a seguir adelante a pesar de las adversidades que se puedan presentar en la vida, por el tiempo que ellos y yo sacrificamos para que este proyecto de mi vida concluyera satisfactoriamente y sobretodo por su amistad incondicional que siempre me han demostrado y que se que nunca me faltara.

A todos mis amigos de las donas y aquellos que hicieron más agradable la vida en la Facultad.

Resumen	1
1) Antecedentes	4
1.1 Hipotálamo	4
1.2 Funciones endocrinas del hipotálamo	4
1.3 Hipófisis	5
1.4 Lóbulo anterior	5
1.5 Glándula suprarrenal	6
1.6 Biosíntesis de esteroides suprarrenales	9
1.7 Funcionamiento del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA)	12
1.8 Programación fetal	14
1.9 Programación fetal y eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA)	18
2) Planteamiento del problema	22
3) Objetivo	24
4) Hipótesis	26
5) Materiales y Método	28
5.1 Animales	28
5.2 Tratamiento experimental	28
5.3 Elaboración de las dietas	29
5.4 Parámetros a observar relacionados con el desarrollo de las crías	30
5.5 Obtención de muestras en suero	31
5.6 Cuantificación de corticosterona en suero por radioinmunoanálisis	31

5.7 Análisis estadístico	33
6) Resultados	35
6.1 Efecto de la dieta sobre el peso corporal, la ingesta de alimento y la concentración de corticosterona materna.	35
6.2 Efecto de la dieta sobre el peso corporal, la concentración de corticosterona y otros parámetros en las crías al nacimiento.	37
7) Discusión	45
8) Conclusiones	50
9) Bibliografía	52

RESUMEN

#

EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN PROTEÍNICIA INTRAUTERINA EN EL DESARROLLO DE LA RATA Y EN LA CONCENTRACIÓN DE CORTICOSTERONA NEONATAL

La programación fetal se define como el proceso por el cual condiciones anormales durante la vida fetal incrementan la susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades en el adulto, siendo la desnutrición una de las principales causas^{1,2}.

Se sabe que el estrés materno y como consecuencia la elevación en circulación de glucocorticoides, afectan adversamente el medio ambiente intrauterino, lo que predispone a las crías a problemas de salud tales como hipertensión, diabetes y disfunción reproductiva en la vida adulta³. El cortisol es un glucocorticoide sintetizado por la corteza de la glándula suprarrenal y entre sus funciones está la de controlar el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos. Las ratas secretan casi exclusivamente corticosterona (el equivalente al cortisol en el humano)⁴.

Los cambios hormonales que una madre usa para responder a una deficiencia de proteínas durante el embarazo son similares a aquellos que ocurren en situaciones de estrés no nutricional en humanos³.

Por eso, el motivo de este trabajo fue el de determinar cómo afecta la dieta baja en proteínas durante la gestación de la rata en la concentración de corticosterona en las crías al nacimiento; así como la comparación de algunos parámetros del desarrollo como es el peso corporal, la talla, la distancia anogenital, diámetro abdominal y cefálico al nacimiento.

Para el desarrollo de este trabajo se empleó un modelo de desnutrición en el que a las ratas se les alimentó con dietas isocalóricas, las cuales tuvieron diferente contenido en proteína (dieta control al 20% de caseína y dieta restringida al 10% en caseína).

Como resultado, observamos que las ratas madre del grupo restringido tuvieron mayor concentración de corticosterona circulante en suero al día 19 de gestación, producto del estrés ocasionado por la restricción proteínica. Por otro lado, la concentración de corticosterona en las crías al día 2 de vida fue menor en el grupo restringido que en el control, sugiriendo que han ocurrido alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal fetal. Tal disminución, es probable que se deba al efecto de retroalimentación negativa a nivel de hipotálamo e hipófisis fetal causada por la alta concentración de corticosterona proveniente de la madre a la que estuvieron expuestas las crías durante la gestación.

Observamos que al nacimiento las crías del grupo restringido resultaron afectadas por la restricción proteínica en su desarrollo intrauterino. El peso corporal tendió a ser menor en el grupo restringido, tanto en hembras como en machos, aunque sólo en las hembras la diferencia fue estadísticamente significativa; mientras que la distancia ano-genital fue significativamente mayor en ambos sexos del grupo restringido respecto al control, aunque el efecto es más notable en las hembras que en los machos, quizás debida a la posible androgenización fetal.

En conclusión, la dieta baja en proteína causó estrés materno en la rata durante la gestación, el cual se reflejó en la alta concentración de corticosterona materna. El efecto de la sobreexposición de glucocorticoides maternos durante la gestación en las crías al nacimiento fue diferente entre sexos.

ANTECEDENTES

1.1 HIPOTÁLAMO

El hipotálamo, es la parte del cerebro que cumple la función de la regulación de la homeostasis (funciones vitales que mantienen constante el medio corporal interno), el comportamiento sexual y las emociones. Aunque el hipotálamo constituye menos del uno por ciento del volumen total del cerebro humano, ejerce efectos importantes sobre el sistema endocrino (centros productores de hormonas), sobre el sistema nervioso autónomo (que controla las acciones involuntarias) y sobre un sistema neuronal que se denomina sistema límbico (relacionado con la motivación y los instintos)⁵. Experimentos realizados con ratas han demostrado de forma clara que el hipotálamo cumple una función importante en la regulación del comportamiento relacionado con la alimentación. Si el hipotálamo sufre algún daño en la región medial, la rata come en exceso y se vuelve obesa; sin embargo, si lo que se daña es la zona ventral del hipotálamo, la rata rehúsa la comida y muere por inanición^{4,5}.

1.2 FUNCIONES ENDOCRINAS DEL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es responsable del control de las hormonas liberadas por los lóbulos anterior y posterior de la hipófisis. Las hormonas segregadas por el hipotálamo que afectan al lóbulo anterior de la hipófisis son: 1) hormona liberadora de corticotropina, que estimula la secreción de hormona adrenocorticotrófica; 2) hormona liberadora de tirotrópina, que estimula la secreción de hormona estimulante de la tiroides; 3) hormona liberadora de la hormona del crecimiento y somatostatina, que estimula e inhibe la secreción de hormona del crecimiento, respectivamente; 4) hormona liberadora de gonadotropina, que controla la secreción de hormona estimulante del folículo y de hormona luteinizante; 5) factor inhibidor de la liberación de prolactina y factor liberador de prolactina, que controlan la secreción de esta hormona^{4,5}.

El núcleo supraquiasmático es una zona del hipotálamo implicada en la regulación de los ritmos corporales circadianos. Estos ritmos son fluctuaciones de las concentraciones de algunas hormonas en el torrente circulatorio por ciclos de 24 horas (por lo general se correlacionan con periodos de luz y periodos de oscuridad). Esto asegura que las concentraciones de las distintas hormonas sean más elevadas según sean las necesidades del cuerpo. Por ejemplo, el cortisol aumenta todas las mañanas justo antes del despertar, esto hace que se

incrementen las concentraciones de glucosa en la sangre para contrarrestar el efecto producido por el ayuno nocturno^{4,6}.

1.3 HIPÓFISIS

La hipófisis, es una de las principales glándulas endócrinas de los vertebrados. Las hormonas que produce controlan el funcionamiento de casi todas las demás glándulas endócrinas del organismo. Las hormonas hipofisarias también estimulan el crecimiento y controlan el equilibrio del agua del organismo.

La hipófisis es una pequeña glándula con forma de riñón, de color rojizo-grisáceo. Se localiza cerca del hipotálamo en la silla turca, en el suelo de la cavidad craneal (en el hueso esfenoides), y está unida a la base del cerebro por un tallo. La hipófisis tiene dos lóbulos: el anterior o adenohipófisis y el posterior o neurohipófisis, que difieren en estructura y función. El lóbulo anterior deriva desde el punto de vista embriológico del techo de la faringe; está compuesto por grupos de células glandulares separadas por conductos sanguíneos y cubierta por una cápsula de colágeno. El lóbulo posterior deriva de la base del cerebro y está compuesto por tejido nervioso y células neurosecretoras.

1.4 LÓBULO ANTERIOR

El lóbulo anterior de la hipófisis es la porción de mayor tamaño, contiene grandes cantidades de sustancias químicas u hormonas que controlan de diez a doce funciones del cuerpo. Ocho hormonas han sido aisladas, purificadas e identificadas. Todas ellas son péptidos compuestos por aminoácidos. La hormona del crecimiento (GH) o somatotropina es esencial para el desarrollo del esqueleto durante el crecimiento. La hormona estimulante de la tiroides (TSH) controla la función normal de la glándula tiroides, y la hormona adrenocorticotrópica o adrenocorticotropina (ACTH) controla la actividad de la corteza suprarrenal y participa en las reacciones de estrés. La prolactina (LTH), también llamada hormona lactopénica o luteotropina, inicia la secreción mamaria durante la lactancia después de que la mamá se prepara durante el embarazo por la secreción de otra hormona hipofisaria (la oxitocina) y de hormonas sexuales. Las dos hormonas gonadotrópicas son la foliculoestimulante (FSH) y la luteinizante (LH). En 1975, los científicos identificaron una sustancia llamada β -endorfina que actúa en animales de experimentación controlando el dolor en situaciones de estrés. La β -endorfina y la ACTH se forman a partir de una

proteína de cadena larga que, más tarde, se rompe. Este puede ser el mecanismo para controlar las funciones fisiológicas de dos hormonas inducidas en situaciones de estrés. La misma prohormona que contiene la ACTH y la endorfina también contiene péptidos cortos como la hormona estimulante del melanocito. Esta sustancia es análoga a la hormona que regula la pigmentación en peces y anfibios, en los seres humanos estimula la síntesis de melanina en las células pigmentadas o melanocitos^{4,7}.

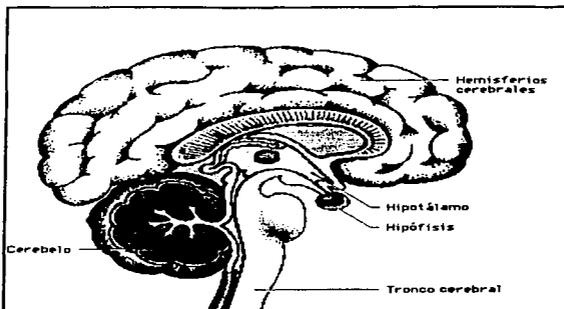


Figura 1 Localización del Hipotálamo y la Hipófisis en el cerebro⁷.

1.5 GLÁNDULA SUPRARRENAL

La glándula suprarrenal, es un órgano vital situado por encima del extremo superior de cada riñón en los seres humanos. Las dos partes de la glándula: la porción interna o médula y la externa o corteza son componentes endocrinos independientes entre sí, están compuestas por tipos de tejidos diferentes y realizan funciones distintas. La médula, que contiene gránulos cromafines, secreta la hormona adrenalina como respuesta a la estimulación por el sistema nervioso simpático en momentos de estrés. También secreta la hormona

noradrenalina, que desempeña su papel manteniendo normal la circulación de la sangre. A diferencia de la corteza, la médula de la glándula suprarrenal puede extraerse sin poner en peligro la vida del individuo^{4,6}.

La corteza suprarrenal es esencial para la vida, ésta secreta un gran número de hormonas esteroideas, aunque sólo unas pocas en cantidades significativas. Una de las más importantes es la aldosterona, perteneciente al grupo de los mineralocorticoides (llamados así por su influencia en la regulación de líquidos y electrolitos), que regula el balance de agua y sales en el cuerpo. El cortisol y la corticosterona son ejemplos de glucocorticoides, nombrados así por la influencia que tienen en el metabolismo principalmente de la glucosa, también son vitales, ya que regulan el metabolismo de las proteínas, los hidratos de carbono y las grasas; preservación de la función normal de los sistemas cardiovascular e inmunitario, riñones, músculo estriado, así como los sistemas endocrino y nervioso. Las ratas secretan casi exclusivamente corticosterona; y los seres humanos secretan cortisol de manera predominante⁴. Además, esta glándula secreta esteroideas sexuales que no influyen decisivamente en el sistema reproductor en las concentraciones en las que se secretan normalmente. Actualmente se producen glucocorticoides de forma artificial, los cuales son más efectivos que los naturales en el tratamiento de la enfermedad de Addison y otros trastornos.

En mamíferos adultos, la corteza suprarrenal se deriva del mesodermo, es rodeada o envuelta por una cápsula fibrosa, ésta presenta, en microscopía óptica y electrónica, tres zonas claramente distintas y variables: La zona glomerular que constituye el 15% de la masa de la glándula suprarrenal, la zona fasciculada el 50% y la zona reticulada el 7%^{4,6}.

Durante la vida fetal, la suprarrenal humana es grande y está bajo el control de la hipófisis, pero las tres zonas de la corteza permanente sólo representan 20% de la glándula. El 80% restante es la gran corteza suprarrenal fetal la cual sufre una rápida degeneración en el momento del nacimiento⁴.

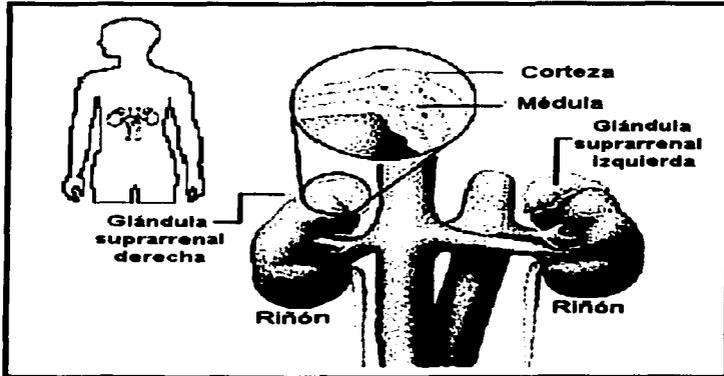


Figura 2 Localización de la glándula suprarrenal⁸.

Además, por mecanismos que aún no se han dilucidado por completo, los corticosteroides permiten al organismo resistir circunstancias que generan estrés, como estímulos nocivos y cambios ambientales⁹.

Estas acciones de los glucocorticoides en el metabolismo intermedio de carbohidratos, proteínas y grasas incluyen aumento de la gluconeogénesis hepática. Aumenta la actividad de la glucosa-6-fosfatasa y la concentración de glucosa plasmática aumenta⁴.

En la periferia, los glucocorticoides disminuyen la utilización de glucosa, aumentan la desintegración de proteínas y activan la lipólisis, con lo que se proporcionan aminoácidos y glicerol para la gluconeogénesis⁹.

Durante la vida fetal, los glucocorticoides aceleran la maduración del factor tensoactivo en pulmones⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El cortisol se metaboliza en el hígado, que es el sitio principal de catabolismo de glucocorticoides mediante la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo II (11 β -HSD-2). La mayor parte del cortisol se reduce a dihidrocortisol y de éste a tetrahidrocortisol, el cual se conjuga con el ácido glucurónico^{4,9}.

El metabolismo de la corticosterona es similar al del cortisol, excepto que no forma derivados 17 cetoesteroides⁴.

En ratas, durante las dos primeras semanas de vida, la secreción basal de corticosterona y ACTH es marcadamente disminuida^{10,11}. A este tiempo la respuesta al estrés es pobre y por lo tanto a este periodo se le ha llamado periodo hiporresponsivo al estrés¹², se ha propuesto que bajas concentraciones de glucocorticoides circulantes durante las dos primeras semanas de vida son esenciales para el desarrollo normal del cerebro¹³.

1.6 BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES SUPRARRENALES

Las hormonas de la corteza suprarrenal son derivados del colesterol y al igual que la vitamina D, los esteroides ováricos y testiculares y el mismo colesterol, contienen un núcleo llamado ciclopentanoperhidrofenantreno⁴.

La ACTH se une a receptores de gran afinidad en la membrana plásmática de las células suprarrenocorticales. Esto activa la adenilatociclase por medio de G_s y el aumento resultante en el AMP cíclico intracelular activa la proteína cinasa A. La proteína cinasa A fosforila la hidrolasa de ésteres de colesterol provocando el aumento de su actividad, la cual es la conversión de ésteres de colesterol a colesterol libre, por lo tanto la concentración de colesterol libre se incrementa⁴.

Parte del colesterol se sintetiza a partir del acetato, aunque la mayor parte de éste se toma de las LDL que están en circulación, los receptores de LDL son especialmente abundantes en las células suprarrenocorticales. El colesterol se esterifica y se almacena en forma de gotas de grasa. El colesterol se transporta a la mitocondria por una proteína acarreadora de colesterol. En la mitocondria, se convierte a pregnenolona en una reacción catalizada por la enzima mitocondrial P450_{scc}^{4,9}.

La pregnenolona se mueve al retículo endoplásmico liso, donde parte de ella se deshidrogena a la forma progesterona en una reacción catalizada por la enzima 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3 β -HSD). Esta enzima tiene peso molecular de 46,000 KDa y no es una enzima P450. En la zona fasciculada y en la zona reticular, algunas de las pregnenolonas y algunas de las progesteronas se hidroxilan en el retículo endoplásmico liso a 17 alfa hidroxipregnenolona. La enzima que cataliza esta reacción, 17 alfa hidroxilasa, es otro P450, P450c17,

parte de la 17 alfa hidroxipregnenolona se convierte a 17 alfa hidroxiprogesterona. El citocromo P450c17 es también la 17,20 liasa que cataliza la división de la unión 17,20 para convertir 17 alfa hidroxipregnenolona y 17 alfa hidroxiprogesterona a dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenodiona, respectivamente. La hidroxilación de la progesterona y 17 alfa hidroxiprogesterona también ocurre en el retículo endoplásmico liso, donde es catalizada por la enzima P450c21. los productos finales, 11 desoxicorticosterona y 11 desoxicortisol, regresan a la mitocondria donde son 11 hidroxilados para formar corticosterona y cortisol, respectivamente. La enzima que cataliza estas reacciones, P450c11 β , es también un citocromo. De tal manera que existen cuatro citocromos P450 involucrados en la producción de glucocorticoides y hormonas sexuales de la corteza adrenal. Dos de éstas, P450c11 β y P450c17, se localizan en la mitocondria, y dos, P450c11 α y P450c21, se localizan en el retículo endoplásmico liso^{4,9}.

Los esteroides gonadales y suprarrenocorticales son de tres tipos: esteroides C₂₁, los cuales tienen una cadena lateral de dos carbonos en la posición 17; esteroides C₁₉, que tienen un grupo ceto o hidroxil en la posición 17; y esteroides C₁₈, que además de un grupo 17 ceto o hidroxil, no tienen un grupo metil angular unido en la posición 10. La corteza suprarrenal secreta de manera principal esteroides C₂₁ y C₁₉. La mayor parte de los esteroides C₁₉ tienen un grupo ceto en la posición 17 y por tanto se llaman 17 cetoesteroides. Los esteroides C₂₁ que tienen un grupo hidroxil en la posición 17, además de una cadena lateral, se llaman 17 hidroxicorticoides⁴.

Los esteroides C₂₁ secretados por la glándula suprarrenal tienen una configuración Δ^4 -3-ceto en el anillo A. En la mayor parte de los esteroides suprarrenales naturales, grupos 17-hidroxi están en la configuración alfa, mientras que los grupos 3-, 11- y 21-hidroxi tienen la configuración beta⁹.

El doble enlace 4,5 y el grupo 3-ceto en el anillo A son esenciales tanto para la actividad glucocorticoide como mineralocorticoide; se requiere un grupo 11 β -hidroxil en el anillo C para la actividad glucocorticoide, pero no para la mineralocorticoide; en todos los corticosteroides naturales y casi todos los análogos sintéticos activos, hay un grupo hidroxil C₂₁ en el anillo D. El grupo 17 α -hidroxil proporciona potencia óptima^{4,9}.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

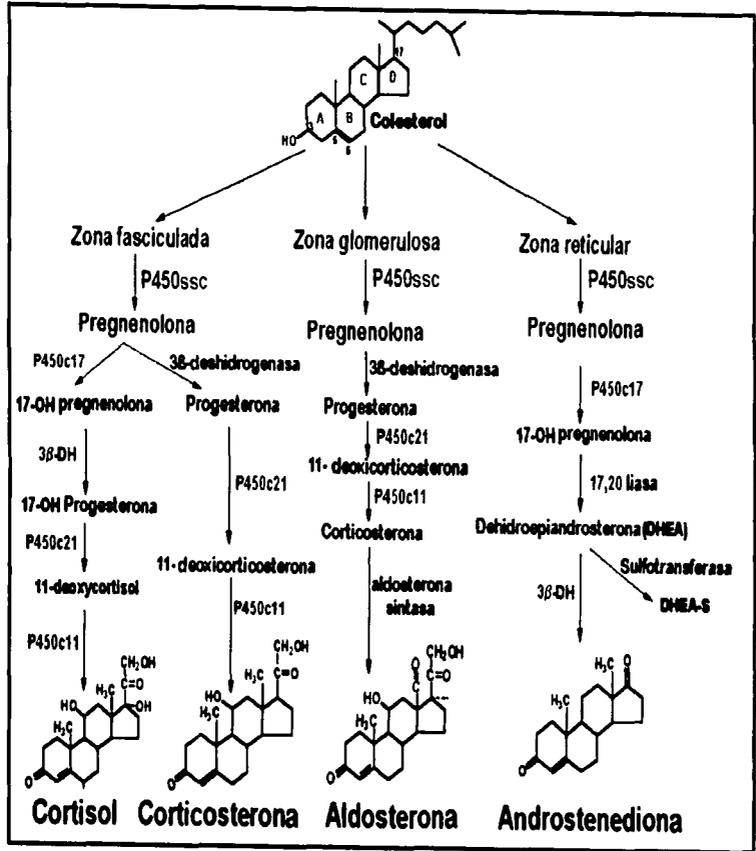


Figura 3 Rutas de la esteroidogénesis suprarrenal¹⁴.

1.7 FUNCIONAMIENTO DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL (HHA)

La secreción de cortisol en el hombre y de corticosterona en la rata por la glándula adrenal es estimulada por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) sintetizada en la hipófisis anterior. La ACTH es originada de una larga molécula precursora llamada pro-opiomelanocortina (POMC), la cual es también precursora de β -endorfina que reduce la percepción del dolor. La regulación de la síntesis de ACTH y su secreción es un proceso complejo. La hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP) son los más importantes factores hipotalámicos que estimulan su secreción. Ambos son sintetizados en la porción parvocelular del núcleo paraventricular (PVN) y son secretados de sus axones a la eminencia media alcanzando la hipófisis por el sistema sanguíneo hipofisario-portal, por lo tanto la hormona CRH estimula la síntesis y secreción de ACTH. Está bien establecido que la acción de la AVP en esta región es la de potenciar la acción de la CRH⁶.

La actividad adrenocortical varía durante todo el día en un ritmo circadiano. En humanos los glucocorticoides plasmáticos logran un nivel alto durante la mañana y un nivel bajo durante la tarde-noche. En ratas, las cuales son activas por la noche, ocurre lo inverso^{4,6}.

Hay tres niveles característicos de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal: ritmo diurno de la esteroidogénesis basal, regulación por retroalimentación negativa por glucocorticoides adrenales e incrementos notorios de la esteroidogénesis en respuesta al estrés. El ritmo diurno depende de centros neurales superiores que reaccionan a ciclos de sueño-vigilia, de modo que las cifras de hormona ACTH son máximas durante las primeras horas de la mañana, lo cual hace que las concentraciones circulantes de glucocorticoides alcancen un máximo alrededor de las 8 A.M.⁹. El ritmo circadiano y la actividad del eje HHA inducida por estrés son inhibidos por retroalimentación negativa por glucocorticoides¹⁵⁻¹⁷.

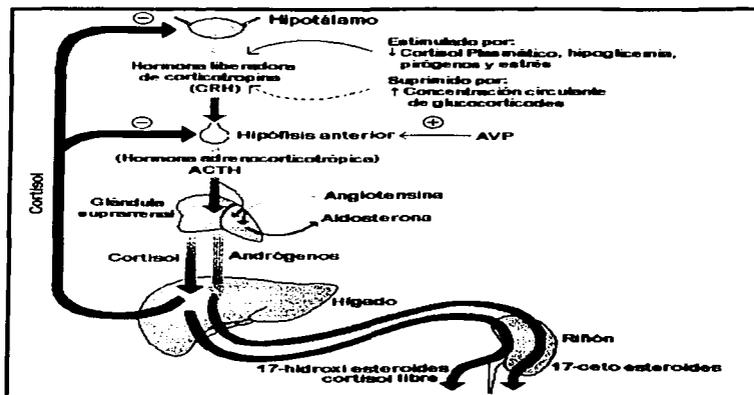


Figura 4 Esquema de la regulación del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal¹⁰.

En el cerebro hay receptores que perciben la cantidad de hormonas esteroideas circulantes en la sangre y encienden o apagan su producción como es apropiado².

En un elegante sistema organizado de retroalimentación, receptores en varios sitios en el cerebro, monitorean la cantidad de cortisol (corticosterona en rata) circulante en la sangre. En cualquier momento, la intensidad en la retroalimentación depende de dos factores: la cantidad de cortisol en la sangre y el número de receptores sobre las células monitor que estén disponibles para enlazar cortisol³. Cuando la cantidad de cortisol en la sangre se eleva arriba del nivel que el cuerpo requiere, la retroalimentación negativa incrementa y la producción de cortisol es lenta hasta dejar el nivel sanguíneo correcto para la situación presente. Las células monitor críticas están en el hipocampo,

hipotálamo e hipófisis. Cuando ellas enlazan cortisol, los receptores de glucocorticoides (GR) actúan para detener el sistema. Ellos actúan como si improvisaran la sensibilidad de un termostato. Cualquier cosa que cause la disminución en la cantidad o el número de receptores hace más difícil esta tarea para el cortisol circulante para detener el sistema completo. Si la cantidad de receptores disminuye, más CRH es secretada por el hipotálamo. La CRH estimula más secreción de ACTH por la hipófisis. Como resultado directo, más cortisol es secretado por la adrenal hasta que finalmente se alcance un alto nivel de cortisol en la sangre para enlazarse a los receptores para detener la producción de CRH y ACTH. Pero el sistema se habrá detenido a altas concentraciones circulantes de cortisol³.

Los glucocorticoides libres inhiben la secreción de ACTH y el grado de inhibición hipofisaria es proporcional a la concentración de glucocorticoides circulantes. El efecto inhibitorio se ejerce tanto a nivel hipofisario como hipotalámico⁴.

Numerosos estudios han demostrado que los receptores de glucocorticoides están íntegramente involucrados en la regulación por retroalimentación negativa en la respuesta al estrés^{19,20}.

Los estímulos que generan estrés pueden anular esos mecanismos normales de control por retroalimentación negativa, lo cual da pie a incrementos notorios de las concentraciones plasmáticas de esteroides adrenales⁹.

Tanto la secreción basal de los glucocorticoides como el aumento en la secreción por el estrés dependen de la ACTH que se sintetiza en el lóbulo anterior de la hipófisis⁴.

La ACTH no solamente produce un rápido aumento en la secreción de glucocorticoides, sino que también aumenta la sensibilidad de las suprarrenales a dosis subsecuentes de ACTH⁴.

1.8 PROGRAMACIÓN FETAL

Una gran cantidad de estudios epidemiológicos sugieren que los factores que operan en la vida temprana son determinantes en el riesgo de trastornos cardiovasculares y metabólicos en la vida adulta. Haciendo uso de registros obstétricos detallados en algunos hospitales en Inglaterra, el Dr. Barker y sus colaboradores en Sauthampton, descubrieron una correlación entre enfermedades cardiovasculares y el bajo peso al nacimiento y crecimiento postnatal^{3,21}. Algunos estudios subsecuentes en poblaciones distintas en el Reino Unido, Europa, Asia, Australia, África, el Caribe y Estados Unidos, han confirmado los hallazgos

iniciales y han extendido las observaciones que muestran que el bajo peso al nacimiento o la complexión delgada al nacimiento predicen fuertemente la subsecuente ocurrencia de hipertensión, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, y muerte por enfermedades cardiovasculares en la vida adulta. Los bebés prematuros y pequeños pueden también mostrar esta correlación implicando la complexión delgada. Sin embargo la recuperación postnatal del crecimiento es también un factor de riesgo para subsecuente hipertensión y resistencia a la insulina, sugiriendo que la complexión delgada al nacimiento debida a una restricción del crecimiento intrauterino por influencia ambiental es de particular importancia, más que la complexión delgada por si misma²².

Para explicar estos hallazgos se ha propuesto la idea de una "programación" o "marca" fisiológica en la vida temprana. Tal programación ocurre en una variedad de sistemas y refleja la acción de un factor durante periodos sensibles o "ventanas" del desarrollo. Se puede notar que la influencia ambiental no es la única explicación posible a los hallazgos epidemiológicos, sino que estarían involucrados tanto factores genéticos como epigenéticos (alteración en la expresión genética de una manera heredable durante divisiones celulares, pero que no es una mutación y por lo tanto fundamentalmente reversible), los cuales restringen el crecimiento fetal y producen enfermedades posteriores, pero estos han sido poco citados y realizados. No obstante, algunos loci genéticos ligados al peso al nacimiento y desordenes en la salud en la vida adulta como por ejemplo la región VNTR del gen de la insulina y el gen de la glucoasa cinasa si han sido reportados²².

Dos principales procesos han sido defendidos para el efecto intrauterino y la producción de alteraciones en el crecimiento fetal y la fisiología del adulto: la desnutrición materno/fetal y la programación hormonal²².

Hay muchos factores que afectan el desarrollo fetal. El suplemento nutricional y el crecimiento fetal están directamente ligados y son consecuencia de la nutrición y salud materna, así como del flujo sanguíneo uterino, incluyendo la función placentaria y el estado del sistema endocrinológico²³.

La influencia nutricional durante el embarazo está considerada como causa dominante de la programación fetal^{24,25}. Estas conclusiones derivan de estudios epidemiológicos en los que lamentablemente una población ha padecido condiciones adversas y se correlaciona el factor de estrés intrauterino a las patologías producidas en la vida adulta. Un ejemplo de este tipo de estudios es el realizado durante el bloqueo Nazi a Holanda Occidental en septiembre de 1944, y que coincidió con un invierno crudo y precoz que provocó una hambruna de ocho meses³. Las características de las personas que nacieron de mujeres que

estaban embarazadas cuando inició el "invierno hambriento holandés" permitieron conocer algunos efectos de la desnutrición prenatal en el humano. Las estadísticas demostraron que tuvieron una mayor predisposición a la diabetes tipo 2 y a la esquizofrenia que otros grupos de personas. Así mismo, las mujeres nacidas bajo estas condiciones fueron más propensas a tener bebés con retraso en el crecimiento cuando llegaron a la edad reproductiva, con lo que se observa que los efectos de las condiciones adversas durante la gestación pueden transmitirse a través de las generaciones².

También se observa que las anomalías provocadas por la influencia nutricional, dependen del periodo en el que la madre es privada de la adecuada nutrición. Siguiendo el ejemplo del "invierno hambriento holandés", se vió que las mujeres que estuvieron expuestas a la desnutrición desde el inicio del embarazo, tuvieron hijos varones con tendencia a la obesidad, contrario a cuando la madre fue desnutrida en etapas más avanzadas del embarazo²⁶.

Durante el sitio de Leningrado, también hubo condiciones extremas de restricción alimenticia. Aproximadamente dos millones de personas murieron. Los bebés nacidos después del sitio tienen una mayor susceptibilidad a enfermedades coronarias³.

Los bebés de mujeres que durante la gestación se encuentran con una situación estresante como el fumar, ingerir bebidas alcohólicas o desnutrición, producen una cantidad anormal de cortisol el cual afecta adversamente al feto, y cuando estos bebés nacieron mostraron retraso en el crecimiento intrauterino (IUGR)²².

Los bebés que se desarrollan en un ambiente subóptimo en el útero usan un muy ingenioso truco para proteger el desarrollo de su cerebro. Si la placenta no funciona apropiadamente o si la madre es pobremente alimentada, es probable que la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes esenciales en la sangre del bebé sea poco óptima. En este evento, el bebé preferentemente enviará sangre a su cerebro, restringiendo la cantidad de sangre hacia sus órganos en crecimiento tales como los intestinos y el hígado. Como resultado, un bebé con retardo en el crecimiento puede tener un diámetro cefálico relativamente normal pero un reducido diámetro abdominal. El abdomen de bebés con retraso en el crecimiento es pequeño porque su hígado, así como otros órganos abdominales son pequeños, además se ha encontrado que los bebés que nacieron con un diámetro abdominal pequeño tienen altas concentraciones de colesterol en sangre en la vida adulta³.

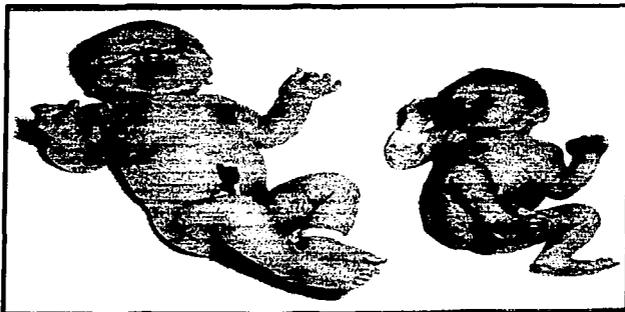


Figura 5 Retraso en el crecimiento intrauterino (IUGR)³

Aun cuando los glucocorticoides sean exógenos, es decir, que sean administrados y no secretados, como sucede en la práctica obstétrica con los partos prematuros, éstos retardan el crecimiento fetal y producen bajo peso al nacimiento si no se administran en las dosis adecuadas^{22,27}.

Los estudios realizados en animales de experimentación confirman los hallazgos clínicos y epidemiológicos. Las crías de ratas sujetas a dietas isocalóricas bajas en proteínas durante todo el embarazo, o en diferentes periodos de la gestación, han desarrollado hipertensión, así como intolerancia a la glucosa, en la vida adulta^{2,28,29}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.9 PROGRAMACIÓN FETAL Y EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL

La vida después del nacimiento esta llena de retos y situaciones estresantes. Similamente, la vida antes del nacimiento está provista de retos para el desarrollo del feto. Afortunadamente, estamos equipados con un mecanismo para responder a condiciones estresantes en el ambiente antes y después del nacimiento. Esa respuesta al estrés es capaz de mantener nuestra integridad biológica³.

A menudo, el estrés externo que impacta nuestro cuerpo es normalmente de influencia ambiental. Todos reaccionamos de manera diferente a mucho calor, a demasiado alimento, a mucho ruido. Para entender cómo el estrés impacta nuestra vida, nosotros necesitamos distinguir claramente el evento externo que nos sucede (el cual llamaremos estímulo estresante) de la respuesta que ocurre dentro de nuestro cuerpo (el cual llamaremos respuesta al estrés). La respuesta al estrés puede ser un incremento en la presión sanguínea, nerviosismo, cambios de humor, comportamiento anormal al comer o falta de sueño. Esta respuesta al estrés o reacción, no el estímulo original aún siendo corto, pueden dañar nuestra vida³.

Es muy necesaria esta distinción, dado que el cuerpo de diferentes individuos claramente tienen diferentes respuestas al estrés para el mismo estímulo estresante. Hay evidencia de que esta respuesta al estrés es programada en gran parte por eventos prenatales³.

El principal sistema que en el cuerpo responde al estímulo estresante es el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal³. Los factores estresantes inician una serie de eventos neuroendocrinos los cuales resultan en un incremento en la secreción de glucocorticoides por la corteza adrenal⁶.

Una amplia variedad de entradas sensoriales al cerebro, tales como el acecho de un depredador, ruido del ambiente o el olor de un incendio forestal entran al cerebro vía los ojos, el oído y la nariz. Esos estímulos sensoriales producen cambio en la actividad endócrina, uso de energía y función cerebral vía una antigua parte del cerebro, el hipotálamo. La glándula hipófisis, situada apenas debajo del hipotálamo en la base del cerebro, es la principal reguladora de nuestra respuesta al estrés. Como resultado de su proximidad al cerebro, la hipófisis puede recibir instrucciones directa y rápidamente. La hipófisis regula la secreción de cortisol de la glándula adrenal porque ella secreta la hormona (ACTH) que viaja a través del torrente sanguíneo hasta llegar a la glándula

adrenal. Esta hormona (ACTH) estimula a la glándula adrenal para producir cortisol y liberarlo en la sangre^{4,7,9}.

Los cambios hormonales que una madre usa para responder a una deficiencia de proteínas durante el embarazo son similares a aquellos que ocurren en situaciones de estrés no nutricionales³.

En el desarrollo de un bebé, los glucocorticoides juegan un rol esencial en la maduración de los pulmones, hígado, riñones, sistema inmune y muchos otros sistemas corporales que serán críticos para la vida independiente en el mundo fuera del útero^{3,22,30}.

Las concentraciones de glucocorticoides fetales son más bajas que las concentraciones maternas^{22,31}. Esto es asegurado por la enzima placentaria (11 β -HSD2) la cual cataliza el rápido metabolismo de cortisol y corticosterona a 11-ceto esteroideos inertes, cortisona y 11-dehidrocorticosterona respectivamente³². Por lo que sutiles cambios en la actividad de la 11 β -HSD2 pueden tener profundos efectos sobre la exposición fetal a glucocorticoides²².

Las placentas de ratas gestantes expuestas a restricción alimenticia muestran disminución del RNA mensajero de la enzima 11 β -HSD2 y por lo tanto también en la actividad de la enzima 11 β -HSD2²⁷. Además de que la desnutrición por sí misma puede regular a la baja a la enzima 11 β -HSD2 y de este modo exponer a los fetos a altas concentraciones de glucocorticoides maternos, suficientes como para inducir retraso en el crecimiento fetal y mostrar bajo peso al nacimiento^{22,33,27}.

Los fetos necesitan glucocorticoides para su maduración normal y producen más, si lo necesitan, de sus propias glándulas adrenales. El feto es protegido de un rápido incremento en la concentración de cortisol materno cuando ella responde a estímulos estresantes a su alrededor³.

Desafortunadamente, la protección conferida por la placenta no es del todo completa. Si una rata preñada es expuesta a una cantidad excesiva de estímulos estresantes, sus glándulas adrenales secretarán más y más corticosterona. En esta situación, una buena cantidad de corticosterona puede cruzar la placenta para producir un efecto permanente en el feto³.

El cortisol afecta el tamaño de la placenta y tal efecto es dependiente de la dosis y el tiempo de exposición²².

Un grupo de investigadores franceses de la universidad de Burdeaux condujeron un estudio clave que muestra claramente que la respuesta al estrés en la madre puede programar la posterior respuesta al estrés en sus crías por el resto de sus vidas. Cuando las ratas preñadas recibían un estímulo estresante, sus glándulas adrenales producían más corticosterona. Parte de la corticosterona

producida cruzaba la placenta hacia el feto y reducía permanentemente el número de receptores que enlazan corticosterona en lugares clave del cerebro fetal. Las crías de aquellas madres que habían sido estresadas durante su embarazo tuvieron una secreción anormalmente alta de esteroides del estrés en respuesta a estímulos estresantes. En un estudio por separado, los investigadores mostraron que el efecto de la programación sobre el desarrollo cerebral fue debido a la corticosterona materna. Los investigadores removieron las glándulas adrenales de las ratas preñadas antes de que fueran estresadas. Como resultado, las concentraciones de esteroides maternos no se elevaron y las consecuencias a largo plazo en las crías no ocurrieron. En un estudio para afianzar los resultados, ellos mostraron que si grandes cantidades de esteroides adrenales eran dadas a ratas preñadas a las que se les habían removido sus adrenales, las crías eran afectadas en su vida posterior³. Esta prueba final muestra que el estrés de la madre ejerce su efecto sobre el feto por el paso de hormonas adrenales del estrés que cruzan por la placenta hacia el feto¹.

Por lo tanto la mayor parte de los estudios experimentales sobre la programación fetal han sido desarrollados utilizando el eje hipotálamo-hipófisis adrenal (HHA).

Muchos estudios experimentales con ratas preñadas muestran que el feto puede pagar un precio a largo plazo por la exposición a cantidades excesivas de corticosterona durante periodos críticos del desarrollo en el útero³.

Los efectos a largo plazo son típicamente encontrados con hormonas, particularmente con esteroides. Por ejemplo, la exposición prenatal a andrógenos programa la expresión de enzimas metabolizantes de esteroides en el hígado, el desarrollo de estructuras sexualmente dimórficas en el hipotálamo así como el comportamiento sexual. Ese efecto puede ser ejercido únicamente durante un periodo específico perinatal, pero que persiste durante toda la vida, en gran parte independiente de alguna subsecuente manipulación de esteroides sexuales. Muchas características de la sobreexposición a glucocorticoides sugieren un rol en la programación fetal, en la vida temprana, de desordenes cardiovasculares y metabólicos en la vida adulta²².

También, la sobreexposición a glucocorticoides puede ser un factor determinante en el desarrollo reproductivo postnatal ya que la entrada a la pubertad es retrasada en las crías de madres sujetas a estímulos estresantes o tratadas con ACTH durante el embarazo^{34,35}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la influencia nutricional durante el embarazo está considerada como causa dominante de la programación fetal y por lo tanto de la predisposición a enfermedades en la vida adulta como la diabetes, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa y obesidad, por mencionar algunas, es de mi interés participar en este proyecto de investigación en donde además de contar con la información que existe en la clínica y en la epidemiología, también habrá la experimentación en animales, teniendo factores controlados para poder contribuir en el esclarecimiento de las causas de dichas enfermedades y comprobar lo que en la clínica y en la epidemiología se ha encontrado. Se experimentará con dos tipos de dieta isocalóricas, una con el contenido normal recomendado en proteína y la otra con la mitad del contenido para causar desnutrición proteínica y/o estrés nutricional en las ratas gestantes, con el fin de observar el efecto que tiene tal desnutrición en las crías, en especial en la concentración de corticosterona y en el desarrollo que alcanzan al nacimiento.

Es de particular importancia saber cómo influye la desnutrición en la predisposición a enfermedades ya que en nuestro país existen índices muy elevados de desnutrición que alcanzan a la población en general pero en especial a niños y mujeres embarazadas

OBJETIVOS

Objetivo General

- ✓ Observar la influencia que tiene la desnutrición proteínica durante la gestación de la rata en el desarrollo intrauterino y en la concentración de corticosterona circulante de las crías al nacimiento.

Objetivos particulares

- ✓ Cuantificar el consumo de alimento, el aumento en el peso corporal y la concentración de corticosterona en suero en ratas gestantes alimentadas con dietas isocalóricas pero con diferente contenido en proteína (dieta control al 20% de caseína y dieta restringida al 10% de caseína).
- ✓ Medir parámetros fisiológicos relacionados con retraso en el crecimiento intrauterino en las crías de rata expuestas a restricción proteínica, comparándolos con los de crías de rata alimentadas con dieta normal.
- ✓ Cuantificar la concentración de corticosterona en crías, hembras y machos, de ratas expuestas a desnutrición proteínica durante la gestación.

HIPÓTESIS

- ✓ La desnutrición proteínica en la rata gestante ocasionará estrés nutricional, lo que conllevará al incremento en la concentración de corticosterona circulante materna, afectando el desarrollo de las crías, específicamente de la glándula adrenal.

MATERIALES Y MÉTODO

5.1 ANIMALES

Para el siguiente trabajo se usaron ratas hembra de la cepa Wistar adquiridas en el INCMNSZ, de 240 ± 20 g de peso y de 10 a 12 semanas de edad, se mantuvieron en un cuarto en el bioterio del INCMNSZ con un ciclo controlado de luz/oscuridad (12 h de luz y 12 h de oscuridad, la luz iniciaba a las 8:00 h) y temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Fueron hospedadas, por separado, en cajas de acrílico junto con un macho de la misma cepa para el apareamiento teniendo libre acceso a agua y alimento. Por la mañana del día siguiente se les realizó un frotis vaginal a las hembras y se tomaba como el día de la concepción si en la muestra había presencia de espermatozoides.

Las hembras preñadas se transfirieron a jaulas metabólicas individuales con libre acceso a agua y alimento (dieta experimental asignada), en el día 19 de gestación las ratas fueron cambiadas a cajas de acrílico en donde continuaron con el mismo régimen alimenticio. Al nacer las crías, su sexo fue comprobado por examinación de la morfología de los genitales externos. Las madres se pesaron diariamente al igual que su alimento.

Todos los procedimientos involucrados con los animales fueron realizados únicamente después de haber sido aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

5.2 TRATAMIENTO EXPERIMENTAL

Una vez que las ratas estuvieron preñadas se les asignó aleatoriamente una de las dos dietas destinadas al experimento. La primera, dieta control, con contenido de 20% de caseína y la segunda, dieta isocalórica restringida, con contenido de 10% de caseína (tabla 1). La dieta control corresponde a las últimas recomendaciones de la NRC de 1993, para roedores en periodo de gestación y lactancia⁴³. De tal asignación quedaron los siguientes grupos experimentales: Grupo Control al que se le alimentó con dieta control durante la gestación y Grupo Restringido alimentado siempre con dieta restringida durante la gestación.

5.3 ELABORACIÓN DE LAS DIETAS

La dieta se elaboró en la planta piloto de la Unidad de Tecnología de Alimentos de la División de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Una vez que fueron pesadas las cantidades necesarias de los ingredientes para cada dieta en Balanza EURA® Peso total 100 Kg. graduaciones menores 50 gramos Modelo 2000/100 o en Balanza Sartorius® sensibilidad 0.001, se colocaron en una mezcladora (Mezcladora Hobart®, Modelo A200 The Hobart MFG. C.O) y se dejaron mezclar durante 15 minutos, al término de ese tiempo se le agregó agua a la mezcla (aproximadamente 300 mL de agua por cada Kg de dieta) hasta obtener una pasta moldeable.

Con la mezcla obtenida se moldearon galletas y se dejaron secar durante dos a tres días, siendo esta la forma en que se les proporcionó a las ratas. Una vez secas las galletas se guardaron en refrigeración para su conservación hasta su uso.

Tabla 1 Composición de las dietas administradas a los grupos experimentales

DIETAS ISOCALÓRICAS (4Kcal/g de dieta)			
<i>Dieta control</i>		<i>Dieta restringida</i>	
Caseína	20.0%	Caseína	10.0%
Cistina	0.3%	Cistina	0.15%
Mezcla de vitaminas	1.0%	Mezcla de vitaminas	1.0%
Mezcla de minerales	3.5%	Mezcla de minerales	3.5%
Colina	0.165%	Colina	0.165%
Celulosa	5.0%	Celulosa	5.0%
Almidón	32.52%	Almidón	37.59%
Dextrosa	32.52%	Dextrosa	37.59%
Aceite de maíz	5.0%	Aceite de maíz	5.0%

Ingredientes: Caseína, mezcla de vitaminas, mezcla de minerales y colina obtenidos de Hartan Teklad, Madison Wisconsin. Almidón y dextrosa obtenidos de Droguería Cosmopolita, Cistina y celulosa obtenidos de Sigma-Aldrich Química S.A de C.V., México, aceite de maíz obtenido de Arrancia Corn Products S.A de C.V., México.

5.4 PARÁMETROS A OBSERVAR RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE LAS CRÍAS

Cuando nacieron las crías (día 22 de gestación), se les pesó en una Balanza Sartorius ® sensibilidad 0.001 y con la ayuda de un vernier se les midió el diámetro cefálico, diámetro abdominal, talla y distancia ano-genital, cuidando de que no pasaran más de 10 h para el registro de los parámetros. La distancia ano-genital fue definida como la distancia entre el borde anterior del ano y el borde posterior del genital³⁷.



Figura 6 Medición de la distancia ano-genital

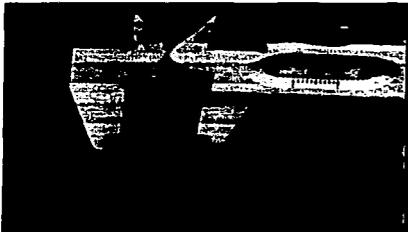


Figura 7 Medición del diámetro abdominal



Figura 8 Medición del diámetro cefálico.

5.5 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO

a) *Ratas madre:*

Las muestras de suero de las ratas madre se tomó al día 19 de gestación, entre las 9:00 y las 11:00h, para la posterior cuantificación de corticosterona. La muestra de sangre fue tomada por corte del extremo de la cola sin anestésiar a la rata, recibiendo en un tubo de vidrio de borosilicato, sin anticoagulante.

Las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm por 15 min a 4°C en una centrífuga SORVALL® modelo RT-7 y el suero recuperado fue guardado a -20°C hasta su análisis.

b) *Crías:*

La muestra de sangre se les tomó a las crías al día 2 de vida, entre las 9:00 y las 11:00h, por punción cardiaca con una jeringa para insulina con aguja calibre 25G, previa anestesia con éter y separándolas de las madres por lo menos dos horas antes de la toma de muestra, las crías que sobrevivieron a la toma de muestra se sacrificaron al final del procedimiento por dislocación cervical.

Se colectó la sangre y se registró el peso de sus órganos. La sangre fue centrifugada a 1000 rpm por 10 min a 4°C en una centrífuga EPPENDORFF® modelo 5417R y el suero recuperado se guardó a -20°C hasta su análisis.

5.6 CUANTIFICACIÓN DE CORTICOSTERONA EN SUERO POR RADIOINMUNOANÁLISIS

Las concentraciones de corticosterona fueron determinadas en muestras de suero, en el caso de las madres al día 19 de gestación y en el de crías al día 2 de vida, usando un "kit" adquirido de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA). En el caso de las crías, el suero de una camada fue mezclado para generar cada muestra para la cuantificación de corticosterona. Las muestras se descongelaron justo unos minutos antes de empezar con el procedimiento de cuantificación.

5.6.1 Procedimiento para la cuantificación de corticosterona de rata en suero.

Material incluido en el "kit":

- ✓ Tubos de polipropileno de 12 x 75 mm, los cuales ya traen adheridos anticuerpos contra corticosterona de rata.
 - ✓ Solución de corticosterona de rata marcada con I^{125} .
 - ✓ Soluciones de corticosterona a diferentes concentraciones (calibradores) preparadas con suero de rata libre de corticosterona.
1. Etiquetar por duplicado tubos de polipropileno de 12 x 75 mm como T (cuentas totales).
 2. Rotular 16 tubos de polipropileno de 12 x 75 mm para la curva de calibración y marcar adicionalmente suficientes tubos para las muestras y controles.

CONCENTRACIÓN DE LOS CALIBRADORES	
<i>Calibrador</i>	<i>Concentración de corticosterona (ng/mL)</i>
A(Máximo enlace)	0
B	20
C	50
D	100
E	200
F	500
G	1000
H	2000

3. Colocar 50 μ L del calibrador A en los tubos etiquetados como A y así mismo poner 50 μ L de cada calibrador, controles y muestras en los tubos correspondientes, colocar las muestras directamente en el fondo del tubo.
4. Adicionar 1.0 mL de corticosterona de rata marcada con I^{125} a cada tubo y agitar.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente

6. Decantar completamente el contenido de cada tubo removiendo la mayor cantidad de líquido posible.
7. Contar durante un minuto en un contador de radiaciones Gamma.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para los resultados de peso corporal, alimento consumido, peso de órganos y concentración hormonal se empleó una prueba de t de student considerando el valor de 0.05 como el nivel mínimo de significancia. En todos los casos el análisis estadístico se realizó empleando la versión 5.0 de Sigma Stat.

RESULTADOS

6.1 EFECTO DE LA DIETA SOBRE EL PESO CORPORAL, LA INGESTA DE ALIMENTO Y LA CONCENTRACIÓN DE CORTICOSTERONA MATERNA.

6.1.1 Peso corporal materno.

El tratamiento durante la gestación con la dieta restringida (10% de caseína) no alteró el peso corporal de las madres. Como se aprecia en la figura 9, los grupos experimentales aumentaron de peso de modo similar durante la gestación, aunque se aprecia que las ratas madre del grupo control tuvieron un ligero aumento de peso, aunque no significativo, hacia el final de la gestación.

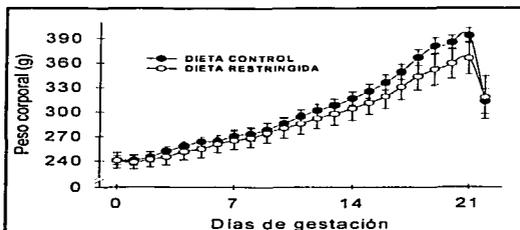


Figura 9 Peso corporal materno durante la gestación. Los datos son expresados como la media \pm EE (n = 6 animales/grupo).

6.1.2 Consumo de alimento materno.

El tipo de dieta no influyó de manera significativa en el consumo de alimento materno ya que éste fue análogo en los dos grupos experimentales durante el tratamiento en el periodo de gestación (figura 10). Al parecer, la reducción del contenido de proteína en la dieta restringida no fue suficiente como para influir en el consumo de alimento en el grupo restringido.

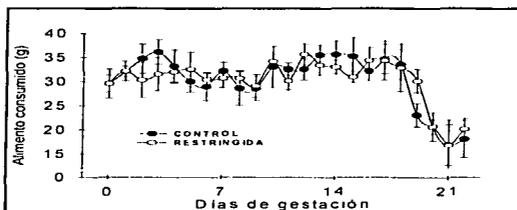


Figura 10 Consumo de alimento de las madres durante la gestación. Los datos son expresados como la media \pm EE (n = 6 animales/grupo).

También es importante mencionar que del total de las madres del grupo restringido sólo el 52.9% tuvieron su parto a los 22 días de gestación, mientras que para el grupo control la cifra fue del 75%. El resto de las madres de ambos grupos tuvieron un retraso de aproximadamente 7 horas en el parto.

6.1.3 Concentración de corticosterona materna.

Sin embargo la concentración de corticosterona materna al día 19 de gestación fue significativamente diferente (figura 11), se observa que las madres que se alimentaron con dieta restringida tuvieron un incremento en la concentración circulante de corticosterona (444.6 ± 91.6 ng/mL) con respecto a las madres alimentadas con dieta control (280.7 ± 31.9 ng/mL).

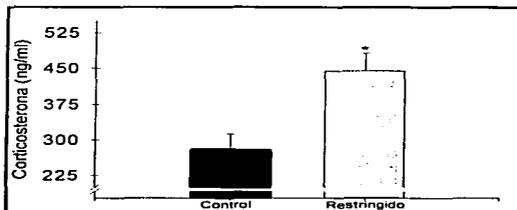


Figura 11 Concentración de corticosterona materna al día 19 de gestación. Los datos son expresados como la media \pm EE (n = 6 animales/grupo). * $p < 0.01$ vs. grupo control.

6.2 EFECTO DE LA DIETA SOBRE EL PESO CORPORAL, LA CONCENTRACIÓN DE CORTICOSTERONA Y OTROS PARÁMETROS EN LAS CRIAS AL NACIMIENTO.

a) Hembras al nacimiento.

6.2.1 Peso corporal y talla

Al nacimiento de las crías, observamos que en su peso corporal había diferencias significativas ($p < 0.01$). Las crías hembra de madres alimentadas con dieta restringida nacieron con menor peso que las crías hembra de madres alimentadas con dieta control (5.695 ± 0.1 g vs. 6.07 ± 0.08 g respectivamente, figura 12).

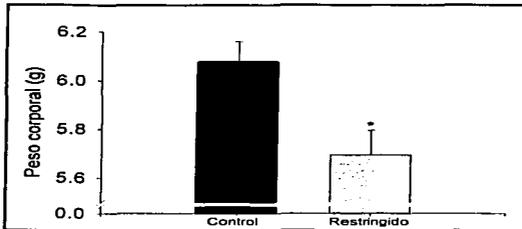


Figura 12 Peso corporal al nacimiento de crías hembra. Los datos son expresados como la media \pm EE (Grupo control n = 53 animales, Grupo restringido n = 66 animales). * $p < 0.01$ vs. grupo control.

La talla al nacimiento no fue estadísticamente diferente entre los tratamientos (49.298 ± 0.27 mm del grupo control vs. 49.274 ± 0.27 mm del grupo restringido),

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.2 Distancia ano-genital.

En lo que respecta a la distancia ano-genital (DAG) si se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$). Las hembras nacidas de madres alimentadas con dieta restringida (caseína al 10%) tuvieron una mayor distancia ano-genital que las hembras que nacieron de madres alimentadas con dieta control (1.52 ± 0.04 mm vs. 1.31 ± 0.02 mm respectivamente; figura 13)

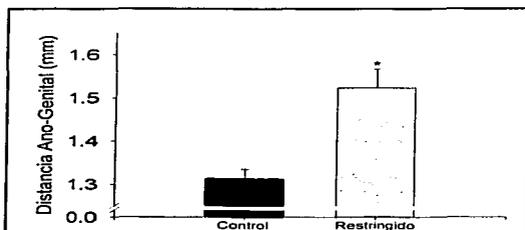


Figura 13 Distancia ano-genital de crías hembra al nacimiento. Los datos son expresados como la media \pm EE (Grupo control n = 53 animales, Grupo restringido n = 66 animales). * $p < 0.001$ vs. grupo control.

La distancia ano-genital (expresada con respecto al peso corporal) también fue diferente ($p < 0.001$), las hembras del grupo restringido tuvieron mayor distancia con respecto al grupo control (0.27 ± 0.009 mm/g vs. 0.22 ± 0.004 mm/g respectivamente; figura 14). La distancia ano-genital puede variar como una función de la exposición prenatal a andrógenos pero también como una función de la talla o longitud corporal por lo que se ha determinado que la distancia ano-genital y el peso corporal están significativamente relacionados y que el cociente entre estos dos últimos parámetros da un dato más real que el de la distancia ano-genital solo, además de que la transformación de esos datos al cociente proporcionan pequeñas variaciones y diferencias numéricas con respecto al dato de la distancia ano-genital sin tratar⁴⁰.

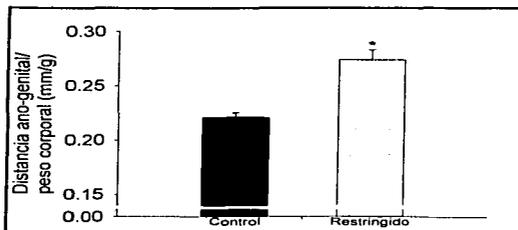


Figura 14 Distancia ano-genital de crías hembra al nacimiento (Expresada con respecto al peso corporal). Los datos son expresados como la media \pm EE (Grupo control n = 53 animales, Grupo restringido n = 66 animales). * $p < 0.001$ vs. grupo control.

6.2.3 Concentración de corticosterona

Por lo que respecta a la concentración de corticosterona entre los grupos experimentales, observamos que en las hembras hubieron diferencias significativas ($p < 0.001$). Las hembras del grupo restringido tuvieron menor concentración de corticosterona al día 2 de vida que las hembras del grupo control (97.6 ± 5.3 ng/mL vs. 132.4 ± 6.9 ng/mL respectivamente; figura 15).

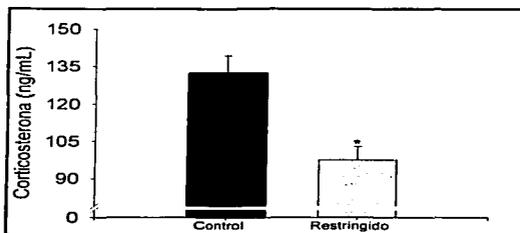


Figura 15 Concentración de corticosterona en crías hembra al nacimiento. Los datos son expresados como la media \pm EE (Grupo control n = 7, grupo restringido n = 10). * $p < 0.05$ vs. grupo control.

La tabla 2 resume los resultados obtenidos de los diferentes parámetros observados, se aprecia que hay diferencia significativa en el diámetro abdominal ($p < 0.01$) pero no en el diámetro cefálico ni en la relación cefálica/abdominal.

Tabla 2 Parámetros del desarrollo de hembras al nacimiento.

PARAMETROS OBSERVADOS		
GRUPO	CONTROL	RESTRINGIDO
Peso corporal (g)	6.078 ± 0.081	5.695 ± 0.100 ^a
Talla (mm)	49.296 ± 0.273	49.274 ± 0.278
Distancia Ano-genital (mm)	1.313 ± 0.022	1.524 ± 0.043 ^b
Distancia Ano-genital (mm/g)	0.221 ± 0.004	0.274 ± 0.009 ^b
Diámetro cefálico (mm)	10.891 ± 0.065	10.678 ± 0.074
Diámetro abdominal (mm)	13.982 ± 0.107	13.579 ± 0.102 ^a
Relación cefálica/abdominal	0.781 ± 0.006	0.788 ± 0.006

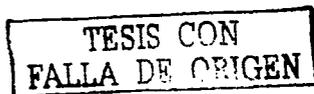
Los datos son expresados como la media ± EE (Grupo control n = 53, grupo restringido n = 66). ^a $p < 0.01$ vs. control, ^b $p < 0.001$ vs. control

En la tabla 3 se observan los pesos de varios órganos de las hembras al nacimiento, además del porcentaje de los mismos expresado con respecto al peso corporal. Notamos que los órganos del área del abdomen en las hembras del grupo restringido tienen menor peso con respecto al grupo control, mientras que en los órganos como el cerebro y el pulmón no hay diferencias significativas en sus pesos entre los tratamientos.

Tabla 3 Peso de órganos de hembras al nacimiento.

GRUPOS	CONTROL		RESTRINGIDO	
	Peso del órgano(g)	% en peso	Peso del órgano(g)	% en peso
Riñón izquierdo	0.0440±0.002	0.581±0.012	0.0389±0.001 ^a	0.594±0.014
Riñón derecho	0.0454±0.002	0.594±0.014	0.0415±0.001	0.637±0.013 ^a
Hígado	0.328±0.007	4.374±0.082	0.251±0.011 ^c	3.793±0.086 ^c
Bazo	0.0271±0.002	0.354±0.017	0.0254±0.002	0.382±0.024
Páncreas	0.0113±0.001	0.151±0.013	0.0133±0.001	0.204±0.014 ^b
Cerebro	0.369±0.012	4.943±0.199	0.327±0.008 ^b	5.080±0.142
Pulmón	0.127±0.003	1.689±0.030	0.117±0.004	1.782±0.042
Corazón	0.0642±0.002	0.855±0.026	0.0581±0.003	0.879±0.039

Los datos son expresados como la media ± EE (Grupo control n = 26, grupo restringido n = 31). ^a $p < 0.05$ vs. control, ^b $p < 0.01$ vs. Control, ^c $p < 0.001$ vs. control.



b) Machos al nacimiento.

6.2.4 Peso corporal y talla

Al nacimiento no se presentaron diferencias en el peso corporal (6.33 ± 0.08 g del grupo control vs. 6.19 ± 0.10 g del grupo restringido) ni en la talla entre tratamientos (50.58 ± 0.25 mm grupo control vs. 50.67 ± 0.30 mm grupo restringido).

6.2.5 Distancia ano-genital

Hay diferencia estadísticamente significativa en la distancia ano-genital ($p < 0.001$). Los machos del grupo restringido presentaron una mayor distancia ano-genital que los del grupo control (3.68 ± 0.07 mm vs. 3.28 ± 0.05 mm respectivamente; figura 16). Los machos del grupo restringido tuvieron mayor distancia ano-genital (expresada con respecto al peso corporal) que los machos del grupo control (0.59 ± 0.014 mm/g vs. 0.52 ± 0.009 mm/g respectivamente; figura 17).

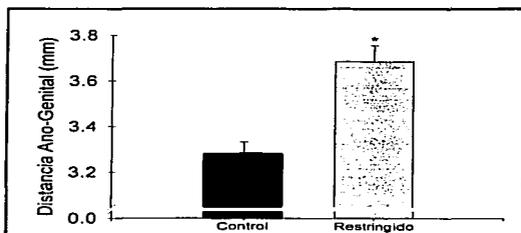


Figura 16 Distancia ano-genital de crías macho al nacimiento. Los datos son expresados como la media \pm EE (Grupo control n = 52 animales, Grupo restringido n = 55 animales). * $p < 0.001$ vs. grupo control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

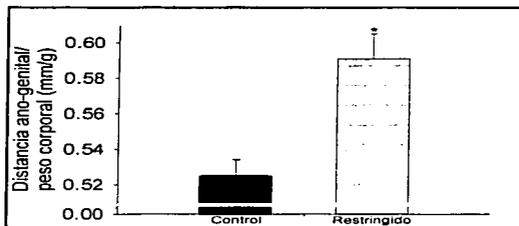


Figura 17 Distancia ano-genital de crías macho al nacimiento (Expresada con respecto al peso corporal). Los datos son expresados como la media \pm EE (Grupo control n = 52 animales, Grupo restrictivo n = 55 animales). * $p < 0.001$ vs. grupo control.

6.2.6 Concentración de corticosterona

Observamos que la concentración de corticosterona en los machos resultó significativamente diferente ($p < 0.001$), los machos del grupo restrictivo tuvieron menor concentración de corticosterona circulante que los del grupo control (84.5 ± 3.14 ng/mL vs. 167.5 ± 27.40 ng/mL respectivamente; figura 18).

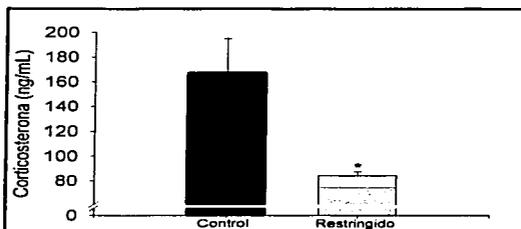


Figura 18 Concentración de corticosterona en crías macho al nacimiento. Los datos son expresados como la media \pm EE (Grupo control n = 5; grupo restrictivo n = 8 animales). * $p < 0.05$ vs. grupo control.

En la tabla 4 se resumen los resultados obtenidos en los diferentes parámetros observados en los machos, destacan las diferencias que hay en el diámetro de la cabeza ($p < 0.01$) y en el diámetro del abdomen ($p < 0.05$) en los cuales, los machos del grupo restringido son más pequeños

Tabla 4 Parámetros del desarrollo de machos al nacimiento.

PARAMETROS OBSERVADOS		
GRUPO	CONTROL	RESTRINGIDO
Peso Corporal (g)	6.331 ± 0.088	6.190 ± 0.105
Talla (mm)	50.578 ± 0.248	50.673 ± 0.298
Distancia Ano-genital (mm)	3.282 ± 0.049	3.685 ± 0.069 ^f
Distancia Ano-genital (mm/g)	0.525 ± 0.009	0.591 ± 0.014 ^f
Diámetro cefálico (mm)	11.002 ± 0.066	10.758 ± 0.066 ^b
Diámetro abdominal (mm)	14.133 ± 0.122	13.827 ± 0.111 ^a
Relación Cefálica/Abdominal	0.780 ± 0.006	0.780 ± 0.005

Los datos son expresados como la media ± EE (Grupo control n = 52, grupo restringido n = 55).

^ap<0.05 vs. control, ^bp<0.01 vs. control, ^fp<0.001 vs. control.

Es de llamar la atención que los órganos del área del abdomen de los machos al nacimiento no tuvieron diferencias significativas en su peso, excepto el hígado; tabla 5, el cual es uno de los órganos que ocupan mayor espacio en esta región. En lo que concierne al cerebro no se observa diferencia en cuanto a su peso, pero si hay diferencia en el porcentaje expresado con respecto al peso corporal debido a que los machos del grupo restringido son más pequeños que los del grupo control.

Tabla 5 Peso de órganos de machos al nacimiento.

PESO DE ÓRGANOS EN MACHOS				
GRUPO	CONTROL		RESTRINGIDO	
	Peso del órgano	% en peso	Peso del órgano	% en peso
Riñón izquierdo	0.0393±0.002	0.529±0.017	0.0416±0.002	0.589±0.026
Riñón derecho	0.046±0.002	0.551±0.016	0.0423±0.002	0.589±0.020
Hígado	0.318±0.008	4.439±0.142	0.274±0.010 ^f	3.825±0.077 ^a
Bazo	0.0267±0.002	0.357±0.023	0.0258±0.001	0.361±0.019
Páncreas	0.0148±0.002	0.205±0.038	0.0108±0.001	0.151±0.009
Cerebro	0.330±0.0105	4.510±0.102	0.346±0.009	4.866±0.085 ^a
Pulmón	0.124±0.004	1.695±0.025	0.123±0.004	1.716±0.027
Corazón	0.0581±0.003	0.791±0.039	0.0595±0.003	0.830±0.039

Los datos son expresados como la media ± EE (Grupo control n = 22, grupo restringido n = 24), ^ap<0.01 vs. control.

DISCUSIÓN

Se ha establecido que la disponibilidad de alimento influye en la ritmicidad del eje HHA. El hambre y la desnutrición aumentan la actividad del eje HHA en humanos y ratas e inducen, en estos últimos, hipertrofia adrenal e incremento en las concentraciones circulantes de corticosterona²⁷.

En ratas adultas, la deficiente alimentación acrecienta la actividad del eje HHA y rompe el ritmo diario normal de la corticosterona circulante, la cual muestra altas concentraciones mantenidas durante el día. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la restricción alimenticia activa el eje HHA no son totalmente conocidos. Ellos pueden implicar mayor síntesis y secreción de ACTH, mejoramiento en la sensibilidad de la glándula adrenal a la ACTH o disminución en el número de receptores para glucocorticoides (GR)²⁷.

También, ha sido bien establecido que los cambios hormonales que una madre usa para responder a una deficiencia de proteína durante el embarazo son similares a aquellos que ocurren en situaciones de estrés no nutricional en humanos³.

En los resultados de este trabajo hemos observado que hay un ligero aumento de peso corporal (aunque no significativo) en las madres del grupo control hacia el final de la gestación, es decir, que éstas últimas conservaron su peso mientras que en las madres del grupo restringido disminuyó ligeramente, y es posible que esto se deba a un intento de las madres del grupo restringido por compensar la restricción proteínica a la que estuvieron sometidas a lo largo de la gestación, aun cuando comieron cantidades similares de alimento pero de diferente tipo de dieta.

Como era de esperarse, la concentración de corticosterona materna al día 19 de gestación fue mayor en las madres del grupo restringido que en las del grupo control, este aumento fue producto del estrés ocasionado por la dieta restringida. Regresando al intento de la madre por compensar la restricción proteínica, ésta debió producir y secretar mayor cantidad de ACTH y como resultado de esto nos encontramos con una mayor cantidad de corticosterona la cual tiene, entre sus múltiples efectos, el de secretar glucosa del hígado, grasa de las reservas de grasa y aminoácidos de las proteínas y de este modo las ratas madre pudieron haber ayudado a la nutrición y desarrollo de sus crías durante la gestación, efecto que quizás se observe también en la lactancia.

En recientes publicaciones se ha reportado la disminución del RNA mensajero de la enzima 11 β HSD2 en la placenta de ratas preñadas sujetas a restricción alimenticia, produciendo una reducción en la concentración de la enzima lo cual tiene el efecto de sobreexponer a los fetos a altas concentraciones

de corticosterona de origen materno, ya que esta enzima se encarga de proteger al feto de algún aumento en la concentración de glucocorticoides maternos²⁷. Cuando se realizó la cuantificación de corticosterona en las crías al día dos de vida se observó que, hembras y machos, del grupo restringido tenían menor concentración de corticosterona que las crías del grupo control, esto pudo ser debido a la disminución en la concentración circulante de ACTH ocasionada por la cantidad tan alta de corticosterona a la que estuvieron expuestas las crías al término de la gestación. La gran concentración de corticosterona materna en el grupo restringido debió actuar a nivel de hipotálamo y/o de hipófisis en las crías causando la disminución en la secreción de CRH y ACTH respectivamente y el efecto de esto es una baja en la producción de esteroides adrenales fetales, entre ellos la corticosterona, ejerciéndose de este modo el efecto de retroalimentación negativa en el eje HHA de las crías.

Además de que la rata nace más inmadura que el ser humano, ambos son susceptibles de alteraciones por la sobreexposición a glucocorticoides en la maduración de sus órganos y sistemas, entre ellos los ejes HHA y HHG (hipotálamo-hipófisis-gónada).

La distancia entre el ano y el genital en recién nacidos en varias especies, incluyendo a la rata y al ratón, es un marcador externo de diferenciación sexual, siendo esta distancia mayor en los machos, esta diferencia es debida a la acción de andrógenos testiculares fetales⁴⁰.

Debido al rol determinativo del sistema endocrino así como a la facilidad con la que se mide la distancia ano-genital, esta última ha sido usada frecuentemente como índice de diferenciación sexual, es decir, como un posible recurso para indagar si concentraciones significantes de andrógenos estuvieron presentes durante la última porción del periodo fetal⁴⁰.

El estrés materno afecta el eje reproductivo, incluyendo el cerebro, la hipófisis y las gónadas, y un significativo incremento en la concentración de glucocorticoides en madres ha sido asociado con retraso o deterioro en el desarrollo de órganos sexuales en crías macho de rata³⁶.

El incremento en la distancia ano-genital en las crías como resultado del tratamiento con la dieta restringida indica algún grado de masculinización. Este proceso pudo ser llevado a cabo por andrógenos adrenales secretados en cantidades significativas por las adrenales maternas debido al estrés causado por el tratamiento con la dieta restringida, éstos debieron cruzar la barrera placentaria, al igual que los glucocorticoides y actuar directamente en los fetos.

Recientemente se ha encontrado que en el ratón existen dos poblaciones de células de Leydig (la población fetal y la población adulta) que se desarrollan

secuencialmente. La primera aparece poco después de la diferenciación de los testículos *in utero* y desaparece cuando la población adulta se incrementa, alrededor del día 7 de vida en el ratón⁴². Las células de Leydig fetales expresan receptores para melanocortinas de los cuales el receptor Mc2r es de nuestro particular interés, ya que este es el único que responde a ACTH pero no a α -MSH en el testículo fetal en el ratón por lo que se ha demostrado que la producción de andrógenos por el testículo fetal puede ser regulada por la ACTH⁴².

Entonces, si las madres del grupo restringido además de producir gran cantidad de esteroides adrenales también secretan en grandes cantidades la hormona ACTH, ésta debió de estimular la secreción de testosterona por los testículos de las crías a través del receptor Mc2r y de este modo se pudo contribuir a la androgenización de las crías *in utero* encontrándonos con mayor distancia ano-genital en las crías del grupo restringido respecto al control.

El aumento en la distancia ano-genital debió haber sido un efecto combinado entre los andrógenos adrenales de la madre y los producidos por los testículos fetales en los machos.

Cabe señalar que la expresión del receptor Mc2r en las células de Leydig del ratón disminuye significativamente después del nacimiento y que dicha disminución coincide con el aumento de la elevación de la población adulta de células de Leydig. Por lo que la ausencia de sensibilidad a ACTH en las células de Leydig adultas es importante para asegurar que su funcionamiento sea independiente del eje HHA logrando mayor control de su actividad en eventos tales como la pubertad⁴².

Por lo que se ha hallado en los machos, en cuanto a la estimulación en la producción de andrógenos testiculares por la ACTH, nos hemos hecho la hipótesis de que ocurra un efecto similar en las hembras por lo que también haya estimulación en sus gónadas para la producción de andrógenos.

Un efecto más de la sobreexposición a glucocorticoides puede ser la disminución en la capacidad reproductiva debido a cambios en el comportamiento sexual, en el número de copulaciones completas, en el número de eyaculaciones, entre otras cosas⁴¹.

Los datos presentados sostienen la idea de que las crías expuestas a altas concentraciones de glucocorticoides *in utero* exhiben cambios sostenidos en la programación de los ejes HHA y HHG.

En ciertas publicaciones se ha visto que la sobreexposición de los fetos a altas concentraciones de glucocorticoides trae consigo el retraso en el crecimiento intrauterino (IURG)^{3,22} el cual pudo verse con claridad en el peso

corporal de las crías, el cual tendió a ser menor en el grupo restringido, tanto en hembras como en machos, aunque sólo en las hembras la diferencia fue estadísticamente significativa, de este modo vemos que el efecto por la sobreexposición a glucocorticoides es diferente entre sexos.

Las crías de las madres que estuvieron expuestas a la restricción proteínica pagaron el precio de sacrificar su crecimiento a favor de su cerebro ya que parte de las consecuencias de la restricción proteínica es la desaceleración del crecimiento fetal en la porción final de la gestación dando como consecuencia el retraso en el crecimiento intrauterino³.

También se observó que el diámetro del abdomen en las crías, hembras y machos, de las madres del grupo restringido fue menor que el del grupo control, esto pudo deberse a que si durante el desarrollo de los fetos se encuentran ante una situación adversa, en este caso la desnutrición proteínica, el feto reacciona tratando de dirigir hacia su cerebro la mayor cantidad de oxígeno y nutrientes para que este órgano alcance un buen desarrollo, los fetos tratan de compensar las deficiencias encontradas procurando que el cerebro se desarrolle al máximo posible y por esto aunque el desarrollo de sus otros órganos continúa, éste se lleva a cabo de manera inadecuada o deficiente.

Observamos, una vez más, que la restricción proteínica afectó de manera diferente entre sexos, ya que en las hembras del grupo restringido se distinguió mayor tendencia a que los órganos del área del abdomen tuvieran menor peso. Mientras que en los machos solo el hígado fue quien mostró diferencia estadísticamente significativa.

Es posible que un efecto más de la desnutrición haya sido la alteración en la cantidad y/o distribución de receptores de glucocorticoides (GR), mediante los cuales se lleva a cabo la retroalimentación negativa. La sobreexposición a glucocorticoides a la que estuvieron expuestas las crías durante la gestación pudo alterar la cantidad de tales receptores, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en diversos órganos, y debido a esto haya modificaciones en la regulación del eje HHA por lo que ésta no se lleve a cabo adecuadamente.

CONCLUSIONES

- ✓ La dieta baja en proteína, durante la gestación de la rata, causa incremento en la concentración de corticosterona materna lo cual conlleva a la posible alteración en la programación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal fetal.
- ✓ La desnutrición proteínica intrauterina en la rata afecta el desarrollo de las crías en forma diferente entre sexos.
- ✓ El aumento en la producción de corticosterona materna durante la gestación señala hacia el aumento de otros esteroides adrenales como andrógenos y/o sus precursores provocando que la distancia ano-genital en las crías se vea afectada en el grupo restringido.
- ✓ El aumento en la concentración de corticosterona sugiere el aumento en la secreción de ACTH y que ésta a su vez estimule la producción de testosterona en los testículos fetales contribuyendo a la masculinización de las crías.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barbazanges A, Piazza P.V, Le Moal, 1996. Maternal glucocorticoide secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci.* 16:3943-3949.
2. Langley-Evans S.C, Gardner D.C, Jackson A.A, 1996. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr.* 126:1578-1585.
3. Nathanielsz P.W, *Life in the womb: The origin of health and disease.* Ithaca, N.Y. Promethean Press, 1999. pp. 118-124.
4. Ganong W.F, *Fisiología Médica*, Ed. Manual Moderno, 15ª edición, México 1996, pp. 397-424.
5. Greenspan F.S, Baxter J.D, *Endocrinología básica y clínica*, Ed. Manual Moderno, 3ª edición, México 1995, pp. 73-135, 353-382.
6. Pignatelli D, Magalhães M.M, Magalhães M.C, 1998. Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm. Metab. Res* 30: 464-474.
7. *Enciclopedia Encarta 2002.* Microsoft Corporation.
8. phy025.lubb.ttuhsu.edu/pressley/course/AdrenalCortex.htm.
9. Goodman and Gilman, *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Ed. Interamericana McGraw Hill, 9ª edición, México 1996, pp. 1551-1578.
10. Walker C, Perrin M, Vale W, Rivier C, 1986. Ontogeny of the stress response in rat. Rol of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* 118: 1445-1451.
11. Pignatelli D, Pinto P, Almeida H, Magalhães M.C, Ho M.M, Vinson G, 1995. The development of the adrenal cortex in the rat. An immunohistochemical study. *Endocrine res* 21: 129-136.

12. Walker C, Sapolsky R, Meaney M, Vale W, Rivier C, 1986. Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feed-back during the stress nonresponsive period in the neo-natal rat. *Endocrinology* 119: 1816-1821.
13. Sapolsky R, Meaney M, 1986. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev* 11: 65-76.
14. <http://www.indstate.edu/theme/mwking/steroid-hormones.html>
15. Dallman M, Akana S, Cascio C, Darlington D, Jacobson L, Levin L, 1987. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm* 43: 113-167.
16. Walker C, Akana S, Cascio C, Dallman M, 1990. Adrenalectomy in the neonate: adult-like adrenocortical system response to both removal and replacement of corticosterone. *Endocrinology* 127. 832-842.
17. Dallman M, Akana S, Jacobson L, Levin N, Cascio C, Shinsako J, 1987. Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Ann NY Acad Sci* 512: 402-414.
18. www.cushings-help.com/the_body.htm
19. Keller-Wood M, Dallman M, 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine Rev* 5: 1-24.
20. Sapolsky R.M, Meaney M.J, McEwen B.S, 1985. The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. III. Negative feed-back regulation. *Dev Brain Res.* 18:169-173.
21. Barker D.J, Osmond C, 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1:1077-1081.
22. Seckl J.R. 2001. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Molecular Cell Endocrinology* 185: 61-71.

23. Barker D.J, Fall C.H, 1993. Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child.* 68:797-799.
24. Godfrey K.M, Barker D.J, 2000. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr.* 71:1344S-1352S.
25. Barker D.J, 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Colch).* 95:115-128.
26. Ravelli G.P, Stein Z.A, Susser M.W, 1976. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 295:349-353.
27. Lesage J, Blondeau B, Grino M, Bréant B, Dupouy J.P, 2001. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 142: 1692-1702.
28. Langley-Evans S.C, Welham S.J, Sherman R.C, 1996. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Colch)* 91:607-605.
29. Langley-Evans S.C, Jackson A.A, 1994. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Colch)* 86:217-222.
30. Smith J.T, Waddell B.J, 2000. Increased fetal glucocorticoid exposure delays puberty onset in postnatal life. *Endocrinology* 141: 2422-2428.
31. Beitens I.Z, Bayard F, Ances I.G, Kowarski B, 1973. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatric Research* 7:509-519.

32. Benediktsson R, Calder A.A, Edwards C.R.W, Seckl J.R, 1997. Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is the placental barrier to maternal glucocorticoids: ex vivo studies. *Clinical Endocrinology* 42:161-166.
33. Gluckman P.D, 2001. Editorial: Nutrition, glucocorticoids, birth size, and heat disease. *Endocrinology* 142: 1689-1691.
34. Politch J.A, Herrenkohl L.R, 1984. Effects of prenatal stress on reproduction in male and female mice. *Physiol Behav* 32:95-99.
35. Harvey P.W, Chevins P.F, 1987. Deleterious effect of adrenocorticotrophic hormone administration during late pregnancy upon offspring: somatic, neurological and sexual development in mice. *Teratology* 35:229-238.
36. Page K.C, Sottas C.M, Hardy M.P, 2001. Prenatal exposure to dexamethasone alters Leydig cell steroidogenic capacity in immature and adult rats. *J Androl* 22: 973-980.
37. Casanova M, Gaido K.W, Janszen D.B, 1999. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of Genistein and Daidzein with rat estrogen receptors α and β in vitro. *Toxicological sciences* 51: 236-244.
38. Barker D.J.P, 1998. *Babies and health in later life*. London: Churchill Livingstone.
39. Politch J.A, Herrenkohl L.R, 1984. Effects of prenatal stress on reproduction in male and female mice. *Physiol Behav* 32: 95-99.
40. Graham S, Gandelman R, 1986. The expression of ano-genital distance data in the mouse. *Physiol Behav* 36 (1): 103-104.
41. Stylianopoulou F, 1983. Effect of maternal adrenocorticotropin injections on the differentiation of sexual behavior of the offspring. *Horm behav* 17: 324-331.

42. O'shaughnessy P. J, Fleming L. M, Jackson G, Baker P. J, 2003. Adrenocorticotrophic hormone directly stimulates testosterone production by the fetal and neonatal mouse testis. *Endocrinology* 144: 3279-3284.
43. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, 1993. Second report of the ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107:1340-1348

•