

336427



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO

CAMPUS CHAPULTEPEC

Escuela de Químico Farmacéutico Biólogo

Incorporada a UNAM

RESTRICCIÓN PROTEÍNICAS DE LA RATA GESTANTE  
Y/O LACTANTE Y SUS EFECTOS EN EL  
DESARROLLO SEXUAL DE LAS CRÍAS MACHO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

GUADALUPE LETICIA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

Director de tesis interno: Q.F.B Javier Araiza Santibáñez  
externo: Dra. Elena Zambrano González

MÉXICO, D.F.

2005

m340987



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	Q.F.B Javier Araiza Santibáñez
Vocal	M en C José Antonio Jiménez Sherer
Secretario	M en C Eduardo del Rey Pineda
1er. Suplente	Q.F.B Gerardo García Camacho
2do. Suplente	M en C Víctor Manuel Sánchez Hidalgo

Lugar donde se realizó la tesis: Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Director de tesis interno



---

Q.F.B Javier Araiza Santibáñez

Director de tesis externo



---

Dra. Elena Zambrano González

Sustentante



---

Guadalupe Leticia Rodríguez González

## *Agradecimientos*

---

Al Dr. Fernando Larrea, jefe del departamento de Biología de la Reproducción por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A la Dra. Elena Zambrano, por su asesoría, paciencia y confianza, y por estimular mi superación profesional.

Al Dr. Peter W Nathanielsz, como testimonio de agradecimiento a su apoyo.

A la Q.F.B Lourdes Boeck, por su participación en este trabajo y sobre todo por su disponibilidad para ayudarme a enfrentar un gran reto.

A la M en C Rocío García y a la Dra. Lorenza Díaz, por su guía y enseñanza durante la realización de esta tesis.

A mis amigos y compañeros quienes hicieron mas agradable mi estancia en el laboratorio, en especial a Martha D, Claudia B, Carolina G y Paola M.

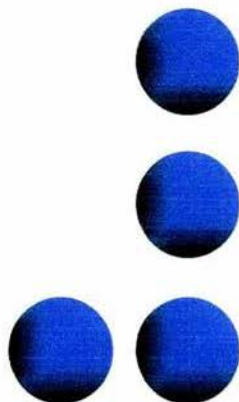
A mis profesores de la UVM, particularmente al Q.F.B Javier Araiza por estimular mi superación a cada momento y por su enseñanza.

A todas y cada una de las personas que han estado brindándome su amistad, cariño y quienes me han animado a seguir siempre adelante, especialmente la familia González Salinas.

## *Dedicatorias*

---

A mis padres que me han brindado su apoyo, amor, comprensión, palabras de aliento, y consejos a lo largo de mi vida, y por ayudarme a alcanzar mi mas grande meta, es por ello que les dedico esta tesis con la cual se ven culminados nuestros esfuerzos. Gracias por impulsarme a prepararme para enfrentarme a la vida.



**INCMNSZ**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", bajo la asesoría de la Dra. Elena Zambrano González. CONACyT – 138259M.

## ÍNDICE

	Página
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	2
<b>I. Antecedentes</b>	
1. Hipotálamo	3
2. Hipófisis	4
3. Testículo	6
4. Espermatogénesis	7
4.1 Papel del epidídimo en la espermatogénesis	8
5. Esteroidogénesis	9
6. Eje hipotálamo – hipófisis – testículo	12
7. Programación fetal	14
8. Programación y el eje hipotálamo – hipófisis – testículo	17
<b>II. Planteamiento del problema</b>	20
<b>III. Hipótesis</b>	21
<b>IV. Objetivos</b>	22
<b>V. Materiales y Métodos</b>	
1. Manejo de animales	23
2. Grupos de estudio	24
3. Elaboración de dietas	24

4. Marcadores de desarrollo sexual	
4.1 Descenso de Testículos	27
4.2 Retracción del prepucio	28
5. Obtención de muestras biológicas	28
6. Marcadores bioquímicos	29
7. Marcadores moleculares	30
8. Marcadores celulares	
8.1 Conteo espermático	31
9. Marcadores fisiológicos	
9.1 Tasa de fertilidad	32
10. Análisis estadístico	33
<b>VI. Resultados</b>	
1. Características de las madres	34
2. Machos	
2.1 Marcadores de desarrollo sexual	36
2.2 Marcadores de bioquímicos	38
2.3 Marcadores moleculares	40
2.4 Marcadores celulares	42
2.5 Marcadores fisiológicos	44
<b>VII. Discusión</b>	46
<b>VIII. Conclusiones</b>	51
<b>IX. Referencias</b>	52



## RESUMEN

La desnutrición *in utero* es una de las principales causas para la predisposición de enfermedades en la vida adulta (**programación fetal**). La ontogenia de las gónadas y su función se pueden ver alterados por la desnutrición. Estudios en ovejas han demostrado que la restricción alimenticia durante periodos críticos del desarrollo tiene consecuencias sobre el desempeño reproductivo. Sin embargo, a la fecha no hay datos suficientes con respecto al estrés nutricional fetal en el eje hipotálamo – hipófisis – gónada. El propósito del presente estudio es evaluar los efectos de la dieta baja en proteína durante el embarazo y/o lactancia sobre el desarrollo sexual de las ratas macho.

Se emplearon ratas Wistar preñadas alimentadas con dietas isocalóricas con contenido normal (C) o restringido (R) de proteína. Los grupos experimentales fueron: control (CC), restringido en el embarazo y la lactancia (RR), control durante el embarazo y restringido durante la lactancia (CR) y restringido únicamente en la gestación (RC). Después del destete las crías consumieron dieta control. Como marcadores de desarrollo sexual se determinaron el descenso testicular y la retracción del prepucio. Se determinaron las concentraciones hormonales de la hormona luteinizante (LH) y testosterona en suero a los 70 días (d), la expresión de la enzima P450scc (21 y 70d), el conteo espermático (130 y 270d) y la tasa de fertilidad en la fase adulta (70 y 270d). Los datos fueron expresados como la Media  $\pm$  EE.

Se encontró retraso en el descenso testicular en los grupos desnutridos en alguna etapa, la misma tendencia se observó en la retracción del prepucio, aunque no hubo diferencias significativas. Las concentraciones de LH y testosterona fueron menores en todos los grupos restringidos en algún momento del desarrollo con respecto al control. La expresión de la P450scc a los 21d, fue menor en ambos grupos restringidos durante la lactancia, la misma tendencia se observó a los 70d, aunque esta no fué estadísticamente significativa. A los 130d el conteo espermático se encontró bajo en el grupo RC y a los 270d fue menor en todos los grupos, sin embargo esta disminución se encontró más marcada en ambos grupos desnutridos durante la gestación. La tasa de fertilidad a los 70d no se vio afectada y a los 270d se observó disminuida en todos los grupos desnutridos. Por lo tanto, la restricción proteínica materna aplicada durante el embarazo y/o lactancia tuvo impacto en las crías a nivel fisiológico, bioquímico, celular y molecular, dichos cambios posiblemente conllevan a la alteración del eje hipotálamo – hipófisis – testículo, afectando la capacidad reproductiva en la vida adulta.

## ABSTRACT

Malnutrition *in utero* is one of the principal causes for the predisposition of adult diseases (**fetal programming**). The normal ontogeny of gonadal development and function can be disrupted by undernutrition. Studies in sheep have been shown that malnutrition during early stages of development, can induce a reduction in the lifetime reproductive capacity. However at this time there are few studies about the effects of fetal nutritional stress on the hypothalamic – pituitary – gonadal axis. The present study evaluated the effects of a low protein diet during pregnancy and/or lactation in male rat sexual development.

To perform the study pregnant Wistar rats were fed with different isocaloric diets, either a control (C) or restricted (R) protein diet. The experimental groups were: control (CC), restricted during pregnancy and lactation (RR), control during pregnancy and restricted during lactation (CR), and restricted just during pregnancy (RC). After weaning male pups were fed with control diet. Testes descent and preputial separation were used as a sexual development markers. LH and testosterone serum levels were determined at 70 days (d). The expression of the P450scc enzyme was analysed by Northern Blot in testes at 21 and 70d. Reproductive capacity was evaluated using sperm count at 130 and 270d, besides fertility rate at 70 and 270d. Data are expressed as Mean  $\pm$  SEM.

Testes descent was delayed significantly in all restricted groups, the same tendency was found in preputial separation but we could not find any statistical difference. LH and testosterone serum levels were lower in all groups restricted during some period. The expression of the P450scc enzyme at 21d was significantly lower in both groups restricted during lactation (RR, CR), the same tendency was found at 70d but it was not significant. At 130d sperm count was diminished in the RC group and at 270d in both groups restricted during pregnancy (RR,RC). Fertility rate was not affected at 70d, but it was affected in all restricted groups at 270d.

We conclude that maternal protein restriction applied during pregnancy and/or lactation had an impact in male pups at physiological, biochemical, cellular and molecular levels, probably those changes imply the alteration of the hypothalamic – pituitary – testicular axis, affecting the reproductive capacity in adult life.

# I. ANTECEDENTES

## 1. HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es el principal centro de coordinación entre los sistemas endocrino y nervioso<sup>1</sup>, regula las funciones cerebrales que incluyen temperatura, apetito, sed, comportamiento sexual, reacciones defensivas como ira y miedo, y ritmos corporales<sup>2</sup>.

Anatómicamente el hipotálamo constituye una pequeña zona del cerebro anterior<sup>1</sup>, localizado debajo del tálamo y subtálamo<sup>3</sup> (figura 1), se encuentra formado por grupos de neuronas, de las cuales las más fácilmente identificables son las de los núcleos supraópticos y los paraventriculares<sup>1</sup>.

El hipotálamo es el responsable del control de las hormonas liberadas por los lóbulos anterior y posterior de la hipófisis. Las hormonas segregadas por el hipotálamo son: 1) hormona liberadora de tirotrina (TRH), que estimula la secreción de la hormona estimulante de la tiroides; 2) hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH); 3) hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que controla la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH); 4) Factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIH) y factor liberador de prolactina (PRH), que controlan la secreción de dicha hormona; 5) hormona liberadora de la hormona del crecimiento y somatostatina, que estimula e inhibe la secreción de la hormona del crecimiento<sup>4</sup>.

El área preóptica y la porción basal del hipotálamo son los lugares en el que las neuronas secretan GnRH (deca péptido que estimula la función de la adenohipófisis<sup>5</sup>), y el núcleo supraquiasmático que es una zona del hipotálamo implicada en la regulación de los ritmos corporales circadianos, los cuales son fluctuaciones de las concentraciones de algunas hormonas en el torrente circulatorio por ciclos de 24 horas<sup>3</sup>.

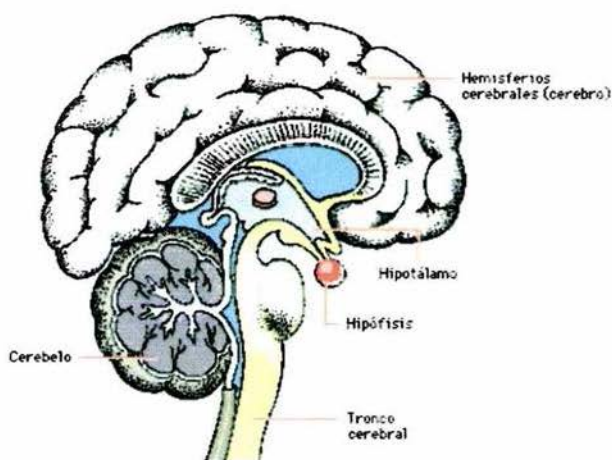


Fig. 1 Esquema del hipotálamo y la hipófisis.

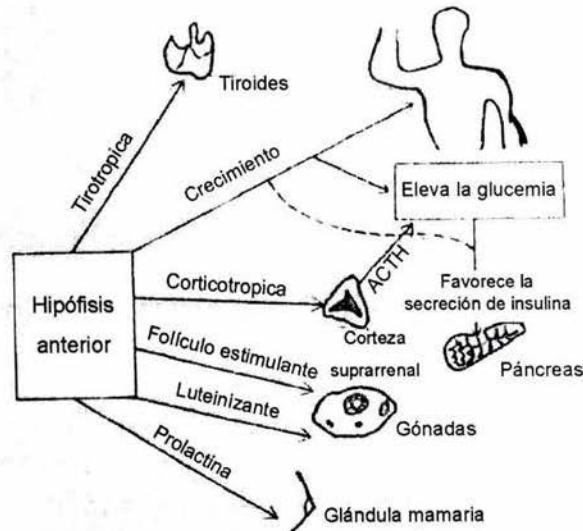
## 2. HIPÓFISIS

La hipófisis llamada también pituitaria, es una pequeña glándula que se encuentra localizada dentro de la silla turca en la base del cerebro y esta unida al hipotálamo por el tallo hipofisiario<sup>6</sup> (figura 1). Desde el punto de vista anatómico y fisiológico se divide en dos partes: **hipófisis anterior** (adenohipófisis) y la **hipófisis posterior** (neurohipófisis)<sup>1</sup>. Entre ambas hay una pequeña zona relativamente avascular denominada parte intermedia, que casi no existe en el hombre pero es mucho mayor y tiene importancia funcional en algunos animales<sup>5</sup>. La hipófisis posterior está constituida en gran parte por las terminales de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo; en tanto la hipófisis anterior tiene una conexión vascular especial con el encéfalo, es decir con los vasos portales hipofisarios<sup>3</sup>.

## 2.1 HIPÓFISIS ANTERIOR

El lóbulo anterior de la hipófisis libera hormonas que regulan una gran cantidad de actividades corporales que van desde el crecimiento hasta la reproducción<sup>7</sup>. Las hormonas que secreta la hipófisis anterior son: hormona estimulante de tiroides (TSH o tirotropina), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH), prolactina (PRL) y hormona del crecimiento (GH)<sup>4</sup>. La secreción de dichas hormonas se puede estimular o inhibir por medio de las secreciones químicas del hipotálamo<sup>7</sup>.

En la figura 2, se representa el papel fundamental que desempeñan las hormonas de la hipófisis anterior en el control de las funciones metabólicas de toda la economía del organismo<sup>5</sup>.

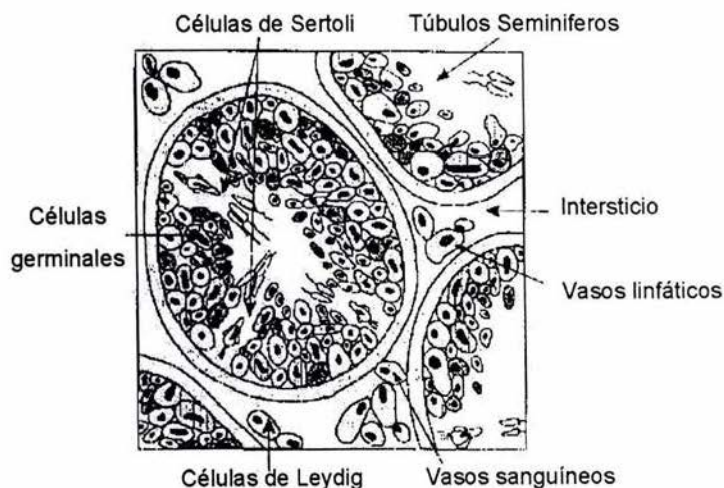


**Fig. 2** Funciones metabólicas de las hormonas de la hipófisis anterior  
(Referencia Guyton, 1996)

### 3. TESTÍCULO

Los testículos (figura 3) son glándulas de forma ovalada (gónadas) que se encuentran dentro del escroto<sup>6</sup>, que tienen como función la secreción de andrógenos y la producción de espermatozoides<sup>8,9</sup>. Los testículos están rodeados por una cápsula densa de tejido conectivo que se conoce como túnica albugínea, que se encuentra cubierta por los remanentes del proceso vaginal, formando la capa visceral y parietal de la túnica vaginal<sup>8</sup> (prolongación del peritoneo en forma de saco que se forma durante el descenso de los testículos<sup>7</sup>).

El tejido de la túnica albugínea se extiende hacia dentro del testículo dividiéndolo en una serie de compartimientos internos que se denominan lóbulos<sup>7,9</sup>, que contienen a su vez conductos enrollados que se llaman túbulos seminíferos<sup>7</sup>, los cuales están formados por las células mioides peritubulares (PMC) que rodean a los túbulos y por las células de Sertoli cuya función es la nutrición, sostén y control endocrino de las células germinales<sup>10,11</sup>, entre los túbulos seminíferos se encuentran los macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos y las células Leydig donde se secretan los andrógenos<sup>10</sup>.



**Fig. 3** Estructura del testículo (Referencia Tresguerres, 1999)

#### **4. ESPERMATOGÉNESIS**

La espermatogénesis (figura 4) es la secuencia de acontecimientos citológicos mediante los cuales las células germinales inmaduras o espermatogonias se transforman en células germinales maduras o espermatozoides<sup>12</sup>. Este proceso está regulado por las hormonas hipofisarias LH y FSH, así como por la testosterona<sup>13</sup>.

La duración del proceso completo de la espermatogénesis varía entre especies por ejemplo: 35 días en el ratón y hamster, aproximadamente 50 días en la rata<sup>13</sup> y 74 días en el humano, realizándose en el testículo (64 días) y el epidídimo (10 días)<sup>12</sup>. La espermatogénesis es un proceso continuo en el que se distinguen tres fases<sup>12</sup>:

##### **1ª Fase**

Las espermatogonias se dividen por mitosis en: tipo A ( $A_1 - A_4$ ), intermedia, tipo B y las de reserva. La espermatogonia tipo B se convierte en espermatocito primario y en cada multiplicación se originan nuevas células de reserva para reemplazar a aquellas que se han transformado en espermatocitos<sup>11</sup>.

##### **2ª Fase**

En el proceso meiótico hay dos divisiones celulares. Mediante la primera división meiótica los espermatocitos primarios dan lugar a dos espermatocitos secundarios<sup>11</sup>. En la segunda división meiótica de cada espermatocito secundario se producen dos espermátidas<sup>11</sup>.

##### **3ª Fase**

También llamada espermiogénesis, que consiste en la transformación de las espermátidas en espermatozoides. Durante este proceso se empezarán a diferenciar las partes que constituyen al espermatozoide: la cabeza formada



exclusivamente por el núcleo, el acrosoma, el cuello y la cola que es la porción motriz del espermatozoide<sup>11</sup>.

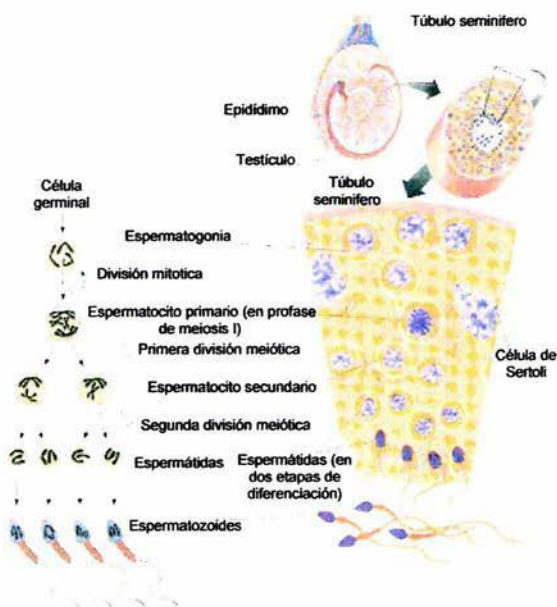


Fig. 4 Espermatogénesis.

#### 4.1 PAPEL DEL EPIDÍDIMO EN LA ESPERMATOGÉNESIS

Las principales funciones del epidídimo son el transporte de los espermatozoides, su maduración (adquisición del potencial de fertilidad) y su almacenamiento<sup>14</sup>. Cuando los espermatozoides llegan a la cabeza del epidídimo, no son móviles, y a medida que migran a través de la cabeza y el cuerpo del epidídimo maduran, de modo que cuando los espermatozoides llegan a la cola son móviles y capaces de reconocer y fertilizar el óvulo<sup>11,12</sup>.

## 5. ESTEROIDOGÉNESIS

Las células Leydig en el testículo sintetizan y secretan varias hormonas esteroideas que se conocen globalmente como andrógenos, los cuales estimulan el crecimiento del tracto reproductor masculino<sup>12</sup>. Todas las hormonas esteroideas para su síntesis utilizan un precursor común llamado colesterol<sup>15</sup>.

Los tejidos esteroideogénicos pueden sintetizar colesterol *de novo* a partir del acetato, aunque la mayor parte de este se toma de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). En la rata los tejidos esteroideogénicos obtienen el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)<sup>16</sup>. El colesterol se esterifica y se almacena en gotas de grasa<sup>4</sup>.

El colesterol es transportado desde los sitios de almacenamiento por medio de la **StAR** (proteína reguladora aguda de esteroides)<sup>15</sup> al interior de la mitocondria donde la **P450<sub>scc</sub>** (enzima divisora de la cadena lateral) convierte el colesterol en **pregnenolona**<sup>15</sup>, paso limitante de esta ruta de biosíntesis<sup>16</sup>.

La pregnenolona se libera de la mitocondria y pasa al retículo endoplásmico liso, donde a partir de ella se deshidrogena a la forma **progesterona** una reacción catalizada por la **3 $\beta$ -HSD** (3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa)<sup>3</sup>.

En el testículo existen dos vías metabólicas que conducen a la síntesis de testosterona<sup>12</sup> (figura 5): la ruta  $\Delta 5$  en la cual se hidroxila algo de la pregnenolona en **17 alfa-hidroxi pregnenolona**; y la ruta  $\Delta 4$  donde la progesterona se hidroxila en **17 alfa-hidroxi progesterona**; la enzima que cataliza estas reacciones es la **P450<sub>c17</sub>** (17 $\alpha$  hidroxilasa). La importancia relativa de estas dos vías varía según la especie; en el testículo humano la más importante es la  $\Delta 5$ , mientras que en los roedores es la  $\Delta 4$ <sup>12</sup>.

La **17, 20 liasa** (P450c17) cataliza la conversión de 17 alfa-hidroxipregnenolona y la 17 alfa-hidroxiprogesterona en **dehidroepiandrosterona** y **androstendiona** respectivamente<sup>4</sup>, la conversión respectiva de estos productos en **androstendiol** y **testosterona** se lleva a cabo por medio de la **17 cetorreductasa**<sup>13</sup>.

La conversión de testosterona a **dihidrotestosterona** y **estradiol** es catalizada por la **5 alfa-reductasa** y **P450aro** (aromatasa) respectivamente, esta última enzima cataliza la conversión de androstendiol a **estrona** y el cambio de este último a estradiol se lleva a cabo por medio de la 17 cetorreductasa<sup>16</sup>.

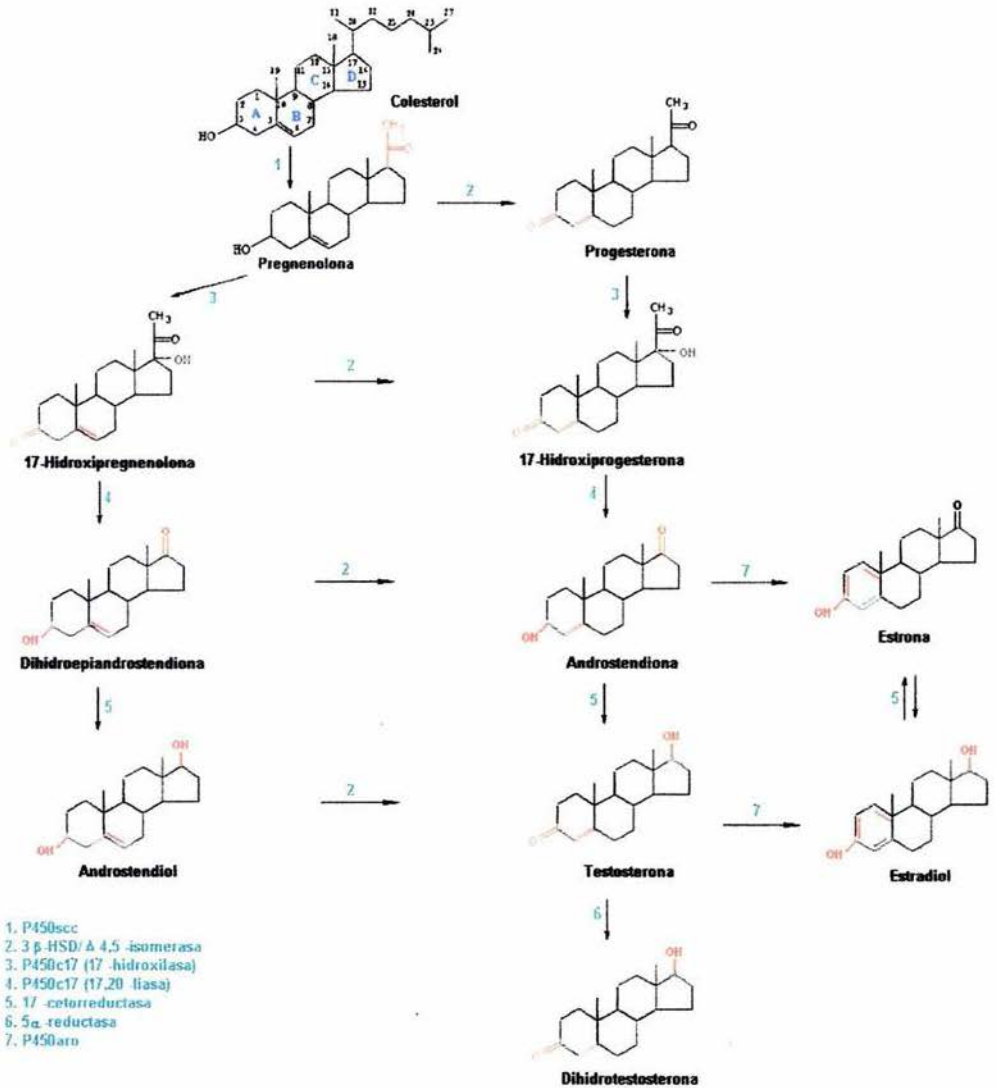


Fig. 5 Biosíntesis de andrógenos gonadales.

## 6. EJE HIPOTÁLAMO – HIPÓFISIS – TESTÍCULO

El eje hipotálamo – hipófisis – gónada tiene gran importancia en la regulación de las funciones reproductoras, en el sexo masculino tiene un papel importante en :

- El desarrollo del fenotipo en el embrión
- La maduración sexual en la pubertad
- La función endocrina del testículo (producción de testosterona)
- La función exocrina del testículo (producción de espermatozoides)

Dicha regulación comienza fundamentalmente por la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. Esta hormona estimula a la hipófisis anterior, induciendo la secreción de otras dos hormonas: 1) la hormona luteinizante (LH) y 2) la folículo estimulante (FSH)<sup>5</sup>.

La LH secretada incrementa la esteroidogénesis en las células de Leydig, y la espermatogénesis requiere la presencia de FSH y altas concentraciones intracelulares de testosterona en las células de Sertoli<sup>12</sup> (figura 6).

La testosterona secretada por los testículos tiene la propiedad de inhibir a su vez la secreción de la LH, como consecuencia de un efecto directo de la testosterona en el hipotálamo disminuyendo la formación de GnRH, lo que conduce a la disminución de LH y FSH por la hipófisis anterior<sup>5</sup>, así pues, cuando la secreción de testosterona aumenta, este mecanismo de retroalimentación negativa reduce la secreción de GnRH<sup>17</sup>.

Las células de Sertoli aparte de dar soporte al desarrollo de los espermatozoides, también son responsables de la síntesis de una proteína fijadora de andrógenos (ABP) y de la inhibina<sup>18</sup>, esta última ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa sobre los centros hipotalámicos que controlan la producción de GnRH, por lo tanto disminuye la secreción FSH por la adenohipófisis<sup>12,17</sup>.

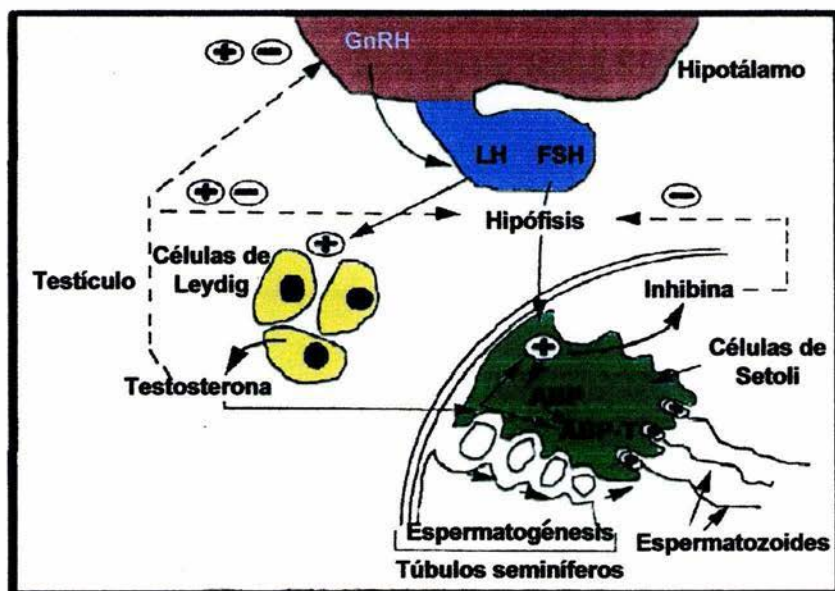


Fig. 6 Eje Hipotálamo – Hipófisis – Testículo.

## 7. PROGRAMACIÓN FETAL

El desarrollo de los mamíferos necesita establecer un grado de autonomía durante la vida fetal para conseguir independizarse y sobrevivir después del nacimiento, sin embargo este pasa a través de periodos críticos durante los cuales puede ser influenciado por aspectos del ambiente intrauterino dependiendo de la nutrición y metabolismo materno. Por lo tanto el desarrollo de los mecanismos homeostáticos es necesario para garantizar su existencia.<sup>19</sup>

Es por ello que el desarrollo fetal y la programación de la calidad de nuestras vidas desde etapas tempranas del desarrollo, se convierten en una historia fascinante. En principio, el mapa genético que nosotros obtenemos de nuestros padres determina nuestras habilidades tanto físicas como mentales; y la integración de la actividad de todos nuestros genes en los diferentes tipos de células regularán como funcionaremos como individuos<sup>20</sup>.

Sin embargo, existen otros factores que afectan el desarrollo fetal como son: el estado nutricional de la madre antes del embarazo, su metabolismo y fisiología, su dieta durante la gestación, el resultante hormonal y el medio circulatorio que mantiene el desarrollo fetal<sup>19</sup>.

Por lo tanto no sólo somos producto de nuestros genes sino también de la naturaleza del ambiente intrauterino en el cual nos desarrollamos<sup>20</sup>.

Los hallazgos realizados en 1986 por el Dr. David Barker, enfocados en realizar una correlación entre el bajo peso al nacimiento y el riesgo a enfermedades coronarias en la vida adulta<sup>21</sup>, fueron el inicio de varios estudios epidemiológicos encaminados a identificar la relación que existe entre la talla, peso y fenotipo del neonato con enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, dislipidemias, hipertensión arterial e intolerancia a la glucosa<sup>22</sup>.

Actualmente se sabe, gracias a los estudios realizados en animales de experimentación y a la epidemiología clínica, que la calidad de la vida fetal puede

afectar en gran medida y de forma irreversible las características fisiológicas y metabólicas en la vida adulta<sup>22</sup>.

Un determinante dominante del crecimiento fetal es el medio nutricional y hormonal en el que el feto se desarrolla y en particular, el suplemento de nutrimentos y oxígeno<sup>23</sup>.

La hipótesis del origen fetal de las enfermedades en el adulto propone que alteraciones en la nutrición fetal y el estado endocrino, cambiará permanentemente la estructura, fisiología y metabolismo, predisponiendo a los individuos a enfermedades cardiovasculares, metabólicas y endocrinas en la etapa adulta<sup>23,24</sup>.

La **programación fetal** describe el proceso mediante el cual las condiciones intrauterinas anormales incrementan la susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades en la vida adulta, como sucede en la desnutrición o en la exposición anormal a glucocorticoides<sup>21,25,26</sup>.

La programación va a ocurrir durante ventanas críticas del desarrollo, en las cuales existen periodos de máxima demanda de nutrimentos como sucede en la última etapa del embarazo o en el inicio de la lactancia<sup>27</sup>.

Por lo tanto, las influencias nutricionales pueden ser causa dominante de programación. Por ejemplo, la desnutrición a diferentes etapas del embarazo, conduce a fenotipos característicos, como puede ser el bajo peso y menor talla al nacimiento, cada uno de estos asociado con un determinado patrón de anomalías metabólicas en el adulto<sup>28</sup>.



Algunos ejemplos de programación durante el desarrollo son los siguientes<sup>20</sup>:

- Enfermedades del corazón
- Estructura hepática y colesterol sérico
- Diabetes y desarrollo pancreático
- Obesidad
- Forma de las huellas digitales
- Cerebro y conducta
- Defensa inmunológica
- Actividad reproductiva y fertilidad.

Es por ello que la salud de una persona está íntimamente relacionada a las condiciones que tuvo en las primeras etapas de su vida; condiciones que pueden programar al hígado, corazón, riñones y especialmente a la función cerebral<sup>20</sup>.

## **8. PROGRAMACIÓN FETAL Y EL EJE HIPOTÁLAMO – HIPÓFISIS – TESTÍCULO**

La clave del suceso evolutivo de todas las especies es la capacidad de producir generaciones consecutivas del mismo organismo. Esto envuelve la coordinación funcional de los órganos que comprometen al eje reproductivo y la habilidad de estos para adaptar sus funciones al ambiente interno y externo del individuo<sup>29</sup>.

El medio endocrino, nutricional y metabólico programa la anatomía y fisiología del individuo, cuyos cambios persistirán en la vida postnatal<sup>30</sup>, influenciando desfavorablemente la fisiología y la salud de los individuos en la vida adulta<sup>31</sup>.

Por ejemplo, en organismos con un rápido desarrollo, la malnutrición en la vida temprana es un serio desafío en el cual su sistema se tratará de adaptar para sobrevivir. La cantidad o calidad de la nutrición en estos periodos críticos tiene consecuencias permanentes en la vida tardía<sup>32</sup>. Uno de los mecanismos para adaptarse al inadecuado abastecimiento de nutrientes es retardando la velocidad de la división celular de los tejidos y órganos, los cuales pueden alterar la programación de la estructura y función de su sistema<sup>32,33</sup>.

El Dr. Peter W. Nathanielsz en su libro "Life in the Womb: The Origin of Health and Disease", menciona diez principios de la programación y uno de ellos es que los efectos son diferentes en los machos que en las hembras, debido a que en todas las etapas del desarrollo los fetos varones y los infantes crecen mucho más rápido que las niñas y este rápido desarrollo de las células es generalmente más vulnerable a los efectos de un inadecuado abastecimiento de nutrientes<sup>20</sup>.

Debido a que la desnutrición induce los cambios mas drásticos cuando esta se aplica durante etapas críticas del desarrollo como son la gestación y la lactancia, cualquier efecto de la desnutrición en el proceso de diferenciación de un tejido, la formación de las gónadas o el establecimiento de sistemas asociados de enzimas, puede tener efectos fundamentales en la subsecuente función de dichos órganos<sup>27,34</sup>.

El desarrollo del eje hipotálamo – hipófisis y la síntesis de gonadotropinas en los fetos, son potencialmente sensibles a la nutrición<sup>35</sup>. Las etapas del desarrollo fetal en el cual cada uno de los órganos es susceptible a las influencias ambientales o nutricionales no son necesariamente las mismas<sup>27</sup>.

Los periodos fisiológicos relevantes del desarrollo fetal son: después de la diferenciación sexual, es decir durante la fase temprana a la respuesta de andrógenos; la fase media de la respuesta de andrógenos del sistema nervioso central (SNC), esto es, antes de la función hipofisiaria y después de la entrada de la secreción de gonadotropinas<sup>31</sup>.

Se sabe que el eje neuroendocrino reproductivo de varias especies de mamíferos se diferencia sexualmente por la exposición de los fetos a las hormonas esteroides masculinas<sup>36</sup>.

Se ha propuesto que las alteraciones neuroendocrinas provocadas por el estrés podrían afectar directa o indirectamente la conducta sexual masculina, ya que ésta depende principalmente de la testosterona, cuya secreción se suprime durante el estrés<sup>37</sup>. Durante la vida fetal la testosterona regula la diferenciación del sistema reproductor masculino y el estradiol regula la actividad de la testosterona, conduciendo a diferencias en la estructura y funcionamiento de los órganos sexuales masculinos. Las desorganizaciones endocrinas alteran los niveles hormonales de la sangre, incluyendo la producción de hormonas, liberación, transporte y metabolismo<sup>35</sup>.

Por lo tanto, la etapa del desarrollo, el tiempo de exposición a los esteroides y la cantidad de testosterona *in utero* son determinantes importantes de la masculinización postnatal<sup>38</sup>.

La desnutrición materna afecta el desarrollo de los testículos<sup>33</sup>, retrasa la entrada a la pubertad en los machos<sup>27,32</sup> y en algunas circunstancias puede tener efectos permanentes en su futura capacidad para producir espermatozoides<sup>33</sup>. En los machos adultos de varias especies de mamíferos, la nutrición tiene profundos efectos en el libido y función testicular<sup>31</sup>.

Lo descrito anteriormente demuestra que el desempeño reproductivo de los animales en la vida adulta esta determinado en parte por factores prenatales y postnatales, dichos cambios están probablemente mediados a través de modificaciones a todo nivel del eje hipotálamo – hipófisis – gónada.

Sin embargo, se requiere identificar la relación entre las anomalías del desarrollo y la función reproductiva, para poder elucidar mas adelante los mecanismos por los cuales los factores ambientales afectan los órganos reproductivos de las crías en desarrollo<sup>27</sup>.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desempeño reproductivo en la vida adulta esta determinado en parte por una gran variedad de factores ya sea durante el desarrollo o después del nacimiento. Estudios en ovejas han demostrado que la desnutrición durante etapas tempranas del desarrollo, ya sea antes o después del nacimiento reduce la capacidad reproductiva en las hembras.

Sin embargo, a la fecha existen pocos estudios relacionados con los efectos de la desnutrición materna durante etapas tempranas del desarrollo en la capacidad reproductiva del macho en la vida adulta.

Es por ello que, por medio de este proyecto de investigación buscamos incrementar la información de los estudios relacionados con este tema y tratar de elucidar cómo la restricción proteínica materna altera el desarrollo del eje hipotálamo – hipófisis – testículo , de las crías macho provenientes de madres desnutridas durante la gestación y/o lactancia.

### III. HIPÓTESIS

- La desnutrición durante periodos críticos del desarrollo como la gestación y lactancia, promoverá cambios en la función del eje reproductivo, posiblemente afectando durante la vida postnatal los marcadores del desarrollo sexual, la regulación hormonal, la expresión de enzimas clave en la esteroidogénesis y la fertilidad en la vida adulta.



## IV. OBJETIVOS

#### **OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar los efectos de la restricción proteínica de la rata gestante y/o lactante en el desarrollo sexual de las crías macho.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar los marcadores de desarrollo sexual por medio del descenso testicular y la retracción del prepucio en las ratas macho provenientes de madres restringidas proteínicamente durante alguna etapa.
- Cuantificar las concentraciones hormonales de LH y testosterona a los 70 días de edad, en las crías macho de los diferentes grupos de estudio.
- Determinar la expresión del RNA mensajero de la enzima P450scc, en testículos de 21 y 70 días de ratas expuestas a la restricción proteínica materna.
- Estudiar los efectos del estrés nutricional durante el embarazo y/o lactancia sobre la capacidad reproductiva de las ratas macho, empleando como parámetros la tasa de fertilidad y el conteo espermático.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

## **1. MANEJO DE ANIMALES**

Los procedimientos involucrados con los animales fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ).

Para este trabajo se emplearon ratas hembra de la estirpe Wistar de 10 a 12 semanas de edad y con un peso de  $240 \pm 20$ g. Las hembras fueron colocadas en cajas de acrílico en un cuarto del bioterio perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), bajo condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y ciclo de luz /oscuridad (12 h de luz y 12 de oscuridad). El alimento y agua fueron *ad libitum*. Las hembras fueron colocadas con un macho de la misma cepa para el apareamiento. A la mañana siguiente fueron realizados frotis vaginales con el fin de observar espermatozoides e indicar así el día de la concepción.

Las ratas preñadas fueron retiradas de la caja de acrílico y colocadas en cajas metabólicas para seguir diariamente la evolución del peso y alimento (dieta experimental asignada). En el día 20 de gestación las hembras fueron trasladadas en cajas de acrílico.

El día del parto (día 22), fue designado como inicio de la lactancia, registrando el peso corporal, talla y número de crías. Al día 2 de nacimiento, las camadas fueron ajustadas a doce crías (en una proporción 1:1 hembra y macho). Las madres con menos de doce o mas de 15 crías fueron excluidas del estudio.

## **2. GRUPOS DE ESTUDIO**

A las hembras preñadas les fueron asignadas en forma aleatoria una de las dos dietas experimentales:

Grupo Control (C): dieta a base de caseína al 20% (dieta control)

Grupo Restringido (R): dieta isocalórica a base de caseína al 10% (dieta restringida).

Para la lactancia se formaron cuatro grupos experimentales, partiendo de los antes mencionados:

Grupo CC: dieta control durante el embarazo y la lactancia.

Grupo RR: dieta restringida durante el embarazo y la lactancia.

Grupo CR: dieta control durante el embarazo y restringida durante la lactancia.

Grupo RC: dieta restringida durante el embarazo y control durante la lactancia.

Al término de la lactancia (21 días de edad) las crías fueron separadas de la madre y colocadas de acuerdo al sexo en cajas de acrílico y a partir de ese momento alimentadas con la dieta control.

## **3. ELABORACIÓN DE LAS DIETAS**

Las dietas empleadas fueron preparadas en la planta piloto de la Unidad de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ. Utilizando los siguientes equipos:

Mezcladora Hobart®: Modelo A200 The Hobart MFG. C.O.

Báscula EURA®: Peso total 100 Kg. Modelo 2000/100, Basculas ESHER.

Balanza Sartorius®: Sensibilidad 0.001g

La composición de las dietas se muestra en el **Cuadro 1**. La dieta control corresponde a las últimas recomendaciones de la NRC de 1993, para roedores en periodo de gestación y lactancia<sup>39</sup>.

Los componentes de la dieta fueron pesados en la balanza o báscula según la cantidad requerida y fueron introducidos en el tazón de la mezcladora Hobart®. La dieta fue revuelta durante 15 minutos; transcurrido este tiempo se le adicionó agua (2½ L / 7Kg de dieta), dejándola incorporarse durante 5 minutos más, hasta obtener una pasta moldeable.

Con la masa obtenida fueron formadas galletas, dejándolas secar durante 2 ó 3 días a temperatura ambiente. Las galletas obtenidas fueron guardadas en refrigeración para su conservación.

**Cuadro 1**

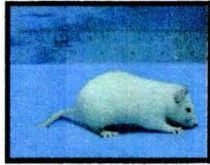
Composición de las dietas experimentales.

**DIETAS ISOCALÓRICAS (4Kcal/g de dieta)**

<b>I. DIETA CONTROL</b>		<b>II. DIETA RESTRINGIDA</b>	
Caseína	20%	Caseína	10%
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 minerales*, *vitaminas* y *colina* fueron obtenidos de Harlan Teklad, Madison Wisconsin; *almidón* y *dextrosa* de Droguería Cosmopolita, México; *cistina* y *celulosa* de Sigma – Aldrich Química S.A de C.V, México; *aceite de maíz* de Arrancia Corn productos S.A de C.V, México.

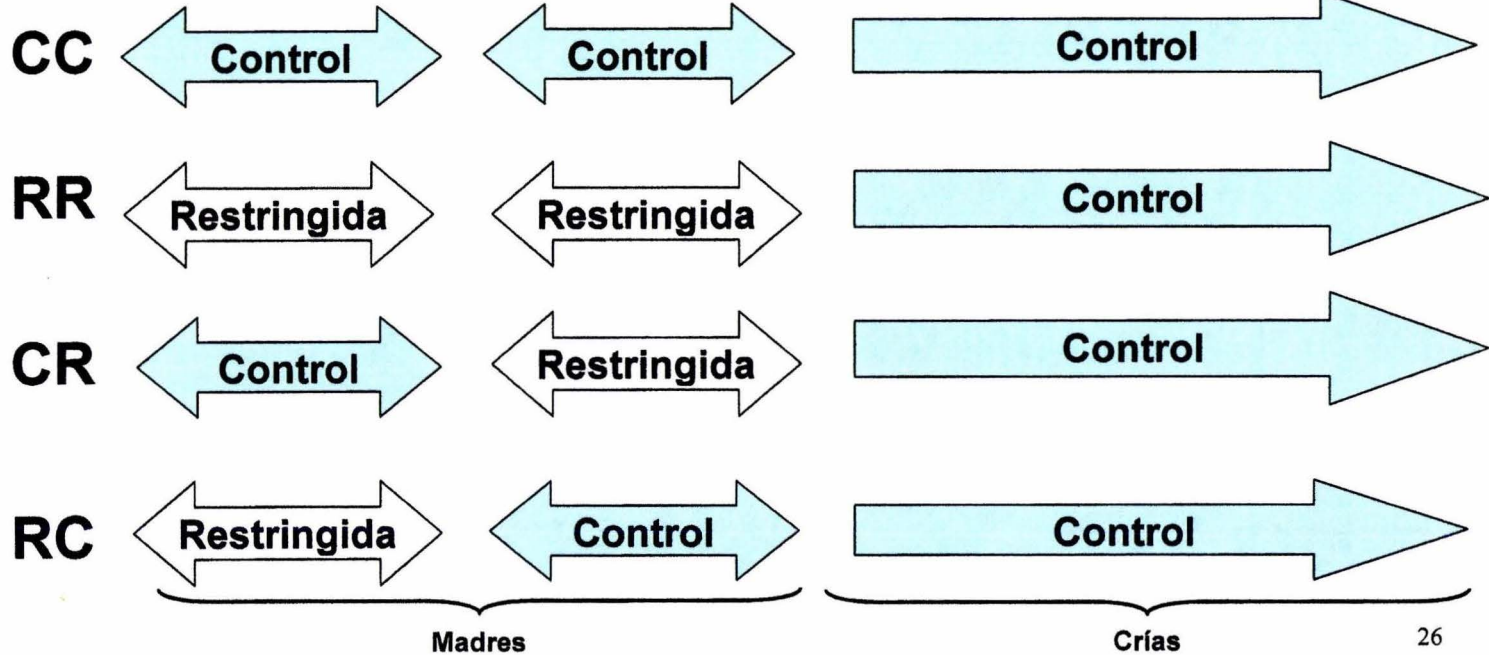
# LÍNEA DE TIEMPO



Machos (crías)

Destete

Pubertad

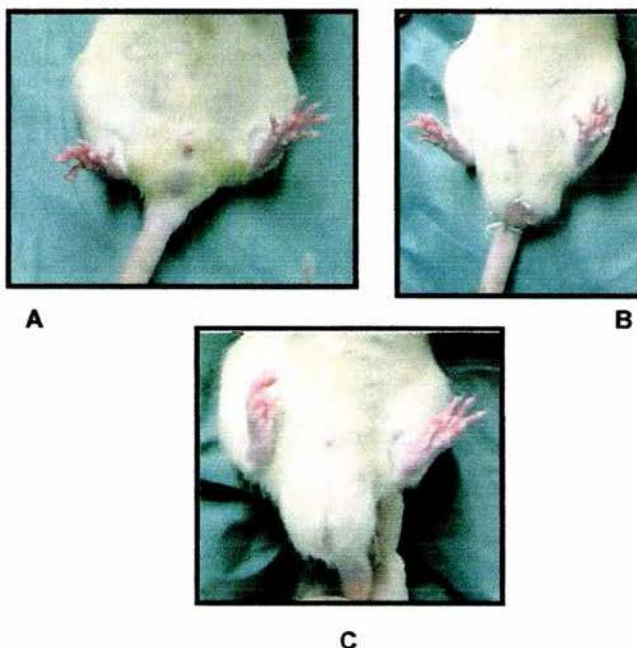


Los machos fueron evaluados en diferentes etapas, cerca de la pubertad y en diferentes periodos de la vida adulta a nivel Fisiológico, Bioquímico, Celular y Molecular.

#### **4. MARCADORES DE DESARROLLO SEXUAL**

##### **4.1 DESCENSO DE TESTÍCULOS**

Las ratas macho de los cuatro grupos de experimentación fueron revisados diariamente a partir del día 15 de edad, para poder determinar el día que finalizaba el descenso de los testículos de la región inguinal a la base del escroto<sup>40</sup>.

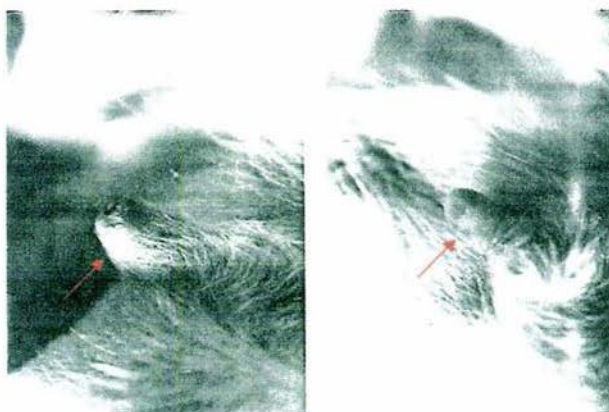


Diferentes etapas del descenso de testículos: fase de inicio (A), intermedia (B) y final (C).



## 4.2 RETRACCIÓN BALANO PREPUCIAL

La retracción del prepucio fue determinada en los machos de los diferentes grupos de estudio por examinación diaria a partir del día 30 de edad, intentando manualmente la separación del prepucio aplicando una presión suave, dicha inspección finalizaba el día que se lograba la retracción total.



**Fig. 7** Pene de la rata antes (izquierda) y después (derecha) de la separación<sup>41</sup>. En la rata macho la separación del prepucio es el resultado de la cornificación del epitelio balano – prepucial (Referencia Korenbrot CC et al, 1977).

## 5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Los animales fueron sacrificados a diferentes edades por medio de decapitación. La sangre fue recolectada en tubos de vidrio. Los testículos fueron disecados y pesados (Balanza Sartorius®), el testículo derecho fue congelado y almacenado en el REVCO a  $-75^{\circ}\text{C}$ . El epidídimo completo fue retirado del testículo derecho, para ser empleado posteriormente en el conteo espermático.

## **6. MARCADORES BIOQUÍMICOS**

Las concentraciones séricas de LH y testosterona fueron determinadas en machos de 70 días de edad por radioinmunoanálisis (RIA).

La LH fue determinada por RIA de doble anticuerpo, empleando la hormona estándar y los anticuerpos específicos anti LH de rata, proporcionado por NIDDK (National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Baltimore, MD). La LH fue yodada por el método de cloramina – T, siguiendo la separación de proteínas libres y unidas [<sup>125</sup>I], por Sephadex G – 100. Los resultados fueron expresados en términos de NIDDK – rata – LH – RP3. La sensibilidad del RIA fue de 0.035 ng/ensayo/tubo; los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron <7% y 9% respectivamente.

Las concentraciones de testosterona fueron determinadas utilizando un kit comercial para rata de DPC Coat – a – Count (TKTT1), adquirido de Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, es un RIA de fase sólida el cual emplea un anticuerpo específico y testosterona marcada radioactivamente con <sup>125</sup>I. Las variabilidades intra- e interensayo fueron de <5 y <9%.

## **7. MARCADORES MOLECULARES**

El RNA total fue extraído del testículo derecho de cada animal de los grupos experimentales en estudio por homogenización en el reactivo de Trizol™ (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y cuantificado por espectrofotometría a la longitud de onda de 260nm. 20µg de las muestras del RNA total fueron sometidas a electroforesis en un gel al 1.2% (p/v) de agarosa-formaldehído, el cual fue transferido durante toda la noche a una membrana de nylon Z-Probe (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y fue fijado a la membrana por irradiación UV (Gene Cross – Linker; Bio – Rad). La carga igual y la integridad del RNA fue monitoreado por la tinción con bromuro de etidio de la subunidad 28S del rRNA.

El cDNA de la sonda para la P450ssc de rata usada en este estudio fue generada como producto de RT-PCR (310 bp) obtenida usando dos cartillas de oligonucleótidos: sentido 5'–ATGCTGGCAAAGGTCTTTGC–3' y antisentido 5'–CCTGTAAATGGGGCCATACTT–3' flanqueando el exon 1 del gen de la P450ssc. La numeración de la posición de la base de los nucleótidos fue tomada del banco de genes número de acceso J05156 (rata mRNA P450ssc).

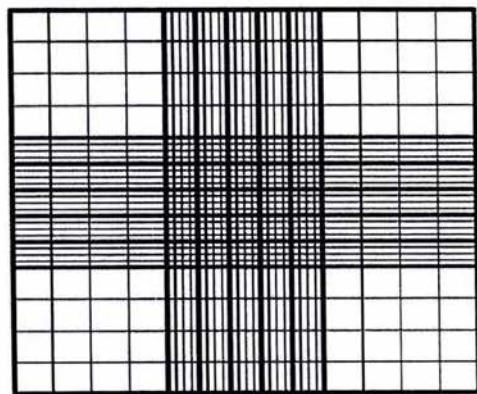
Las membranas fueron prehibridizadas por 2 horas a 68°C en la solución Quikhyb Stratagen (Stratagen, La Jolla, CA, USA) y después fue hibridizada con la sonda marcada con [<sup>32</sup>P], empleando un kit de clasificación al azar de la cartilla de oligonucleótidos (RadPrime DNA labeling System Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Después de 24 horas de hibridación, la membrana fue lavada dos veces por 20 minutos en 2x SSC con 0.1% SDS y posteriormente una vez con 0.1x SSC con 0.1% SDS por 20 minutos a 59°C. Las membranas fueron expuestas en placas Kodak X-AR (Rochester, NY, USA). El escaneo de las densitometrías de las placas de rayos X fue llevado a cabo con Software Bioimaging Systems (LabWork versión 4.5, uvp, Inc. Upland CA). La expresión de la P450ssc fue calculada empleando las densitometrías de los transcritos del mRNA y de la subunidad 28S del rRNA.

## 8. MARCADORES CELULARES

### 8.1 CONTEO ESPERMÁTICO

El epidídimo completo se dejó libre de tejido adiposo circundante y fue pesado. Posteriormente la cola del epidídimo fue cortada, pesada y colocada en una caja Petri para ser disgregada en 1mL de HAM'S y se realizó una dilución 1:20 (determinada durante la estandarización de la técnica).

Para el conteo de los espermatozoides fue utilizada la cámara de Neubauer, y el microscopio de luz a 400x, contando 5 cuadros de la parte inferior y superior, realizándolo por duplicado.



©LO Laboroptik

El procedimiento fue el siguiente: la cámara contiene 25 cuadrados grandes, cada uno de los cuales contiene 16 cuadrados más pequeños. Si un espermatozoide se encontraba en la línea que divide a dos cuadros adyacentes, solo se contaba el que estaba en el lado superior o izquierdo del cuadro.

Para la determinación de la concentración de espermatozoides de la muestra el promedio obtenido fue dividido entre el factor apropiado para la dilución utilizada<sup>42</sup>, el cual se indica en el siguiente cuadro:

**Cuadro 2**

Espermatozoides por campo de 400x	Dilución	Factores de conversión Número de cuadrados grandes contados		
		25	10	5
< 15	1:5 (1 + 4)	20	8	4
15 –40	1:10 (1 + 9)	10	4	2
40 – 200	1:20 (1 + 19)	5	2	1
> 200	1:50 (1 + 49)	2	0.8	0.4

## 9. MARCADORES FISIOLÓGICOS

### 9.1 TASA DE FERTILIDAD

Para determinar la fertilidad en los machos, se utilizaron ratas hembra vírgenes de la estirpe Wistar de 10 a 12 semanas de edad, a las cuales se les realizó diariamente, a la misma hora y durante una semana frotis vaginal, para elegir a las hembras ciclantes. Los machos para este estudio fueron seleccionados aleatoriamente de los diferentes grupos de estudio.

Los animales para el apareamiento fueron colocados uno a uno durante 5 días. Al término los machos fueron separados y regresados a sus respectivas cajas. Las hembras fueron mantenidas individualmente hasta el día 15 de la gestación para obtener el porcentaje de fertilidad.

## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

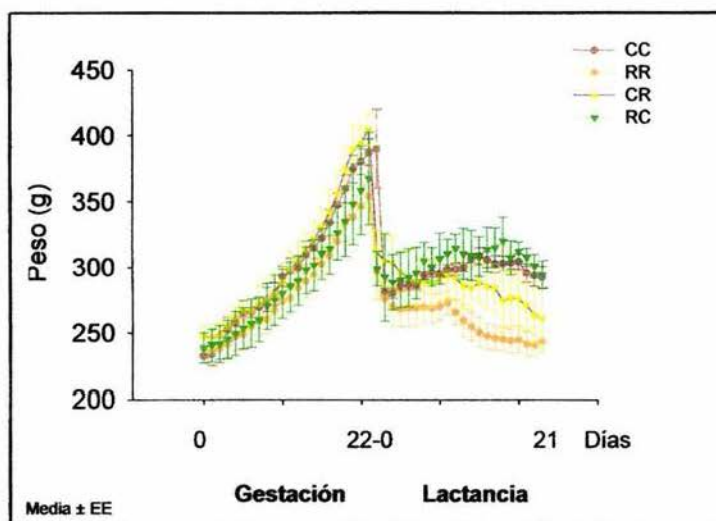
Para los resultados de peso corporal de las madres fue utilizada la prueba t student, en los machos para los marcadores de desarrollo sexual, bioquímico, molecular y celular fue utilizada la ANOVA de 1 vía y en los marcadores fisiológicos  $\chi^2$ , considerando como nivel mínimo de significancia el valor de 0.05. En todos los casos el análisis estadístico fue realizado empleando la versión 5.0 de Sigma Stat.

La n= de los resultados del descenso de testículos y retracción del prepucio es por camada y los demás resultados por crías provenientes de diferentes camadas.

## VI. RESULTADOS

## 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MADRES

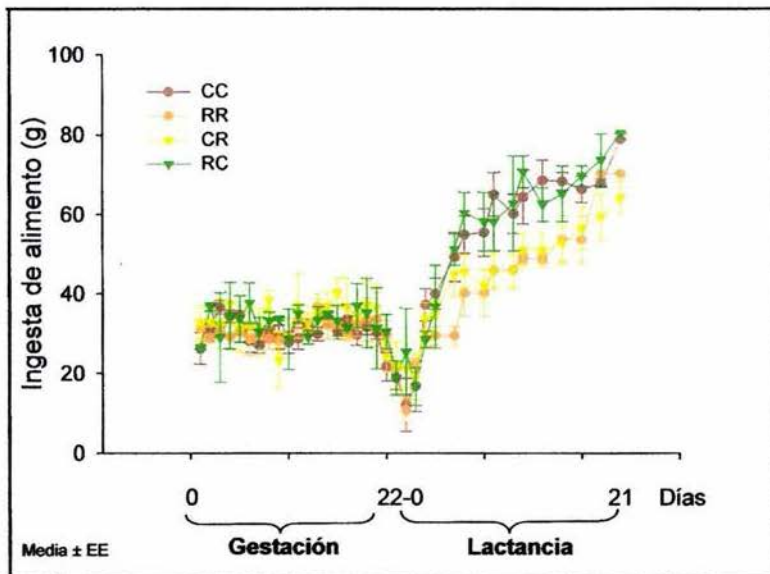
Tal como se puede observar en la Figura 8, los resultados demuestran que el consumo de la dieta durante la gestación no alteró el peso corporal de las madres, sin embargo al final de este periodo los grupos restringidos presentaron una ligera disminución en el peso, lo cual no fué significativo. Después del parto, las madres del grupo RR mostraron siempre menor peso con respecto al resto de los grupos, por otra parte la dieta provocó la recuperación de las madres restringidas durante el embarazo (RC), lo que no sucedió con el grupo restringido en la lactancia (CR) ya que como consecuencia del consumo de la dieta restringida, perdió peso durante este periodo, pero esta reducción no fué estadísticamente significativa.



**Fig. 8** Peso corporal de las madres durante la gestación y lactancia. CC (control-control) n=10; RR (restringido-restringido) n=10; CR (control-restringido) n=10; RC (restringido-control) n=10. Los datos están expresados como la Media  $\pm$  EE.



En la Figura 9, podemos observar que durante la gestación el tipo de dieta no influyó en la ingesta de alimento de las madres. Al término de la gestación se puede ver que las madres de los grupos restringidos durante la lactancia (RR y CR) presentaron menor ingesta a pesar de no ser significativo.

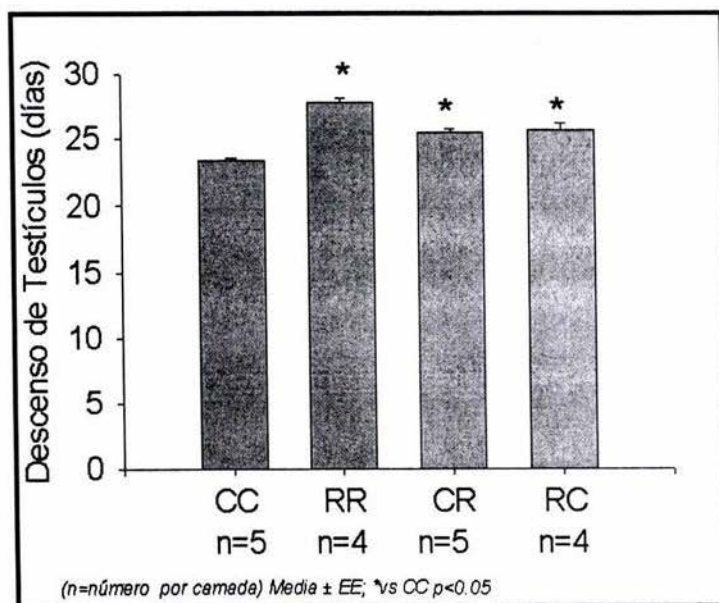


**Fig. 9** Ingesta de alimento de las madres durante la gestación y lactancia. CC (control-control) n=10; RR (restringido-restringido) n=10; CR (control-restringido) n=10; RC (restringido-control) n=10. Los datos están expresados como la Media  $\pm$  EE.

## 2. MACHOS

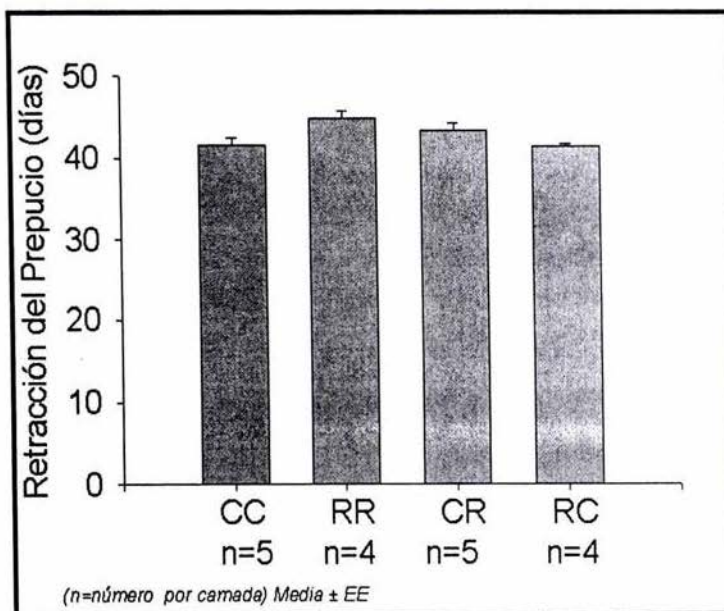
### 2.1 MARCADORES DE DESARROLLO SEXUAL

Como se puede observar en la Figura 10, se encontró retraso en el descenso testicular de las crías macho provenientes de madres desnutridas durante la gestación y/o lactancia, siendo este retraso estadísticamente significativo (CC =  $23.4 \pm 0.190$ , RR =  $27.8 \pm 0.294$ , CR =  $25.5 \pm 0.224$ , RC =  $25.6 \pm 0.544$  días;  $p < 0.05$ ).



**Fig. 10** Descenso de los testículos (días) en ratas macho expuestas a diferentes dietas durante la gestación y/o lactancia. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control). Media  $\pm$  EE; \* $p < 0.05$  vs CC.

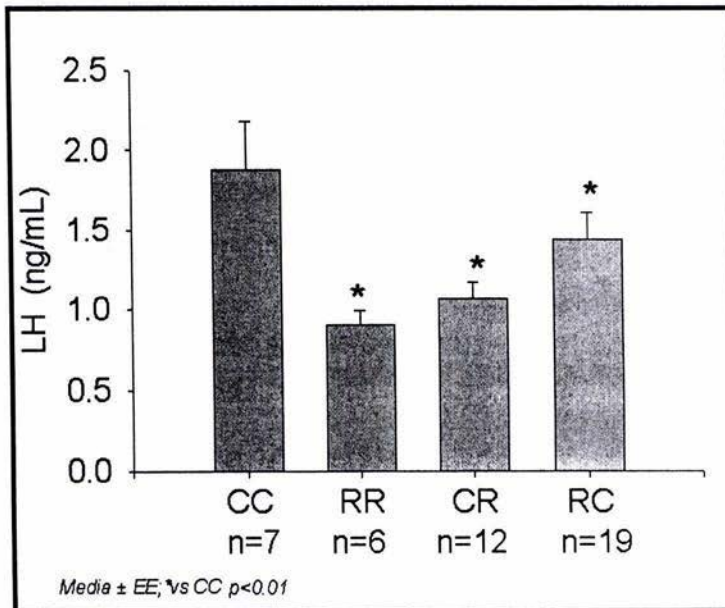
Por otra parte el día en el cual finalizó la retracción del prepucio no se vió afectado; sin embargo, como se puede notar en la Figura 11, se observó una tendencia al retraso en los grupos desnutridos durante la lactancia RR y CR aunque no fue estadísticamente diferente (CC =  $41.5 \pm 0.889$ , RR =  $44.8 \pm 0.886$ , CR =  $43.4 \pm 0.818$ , RC =  $41.5 \pm 0.204$  días).



**Fig. 11** Retracción del prepucio (días) en ratas macho expuestas a diferentes dietas durante la gestación y/o lactancia. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control). Media  $\pm$  EE.

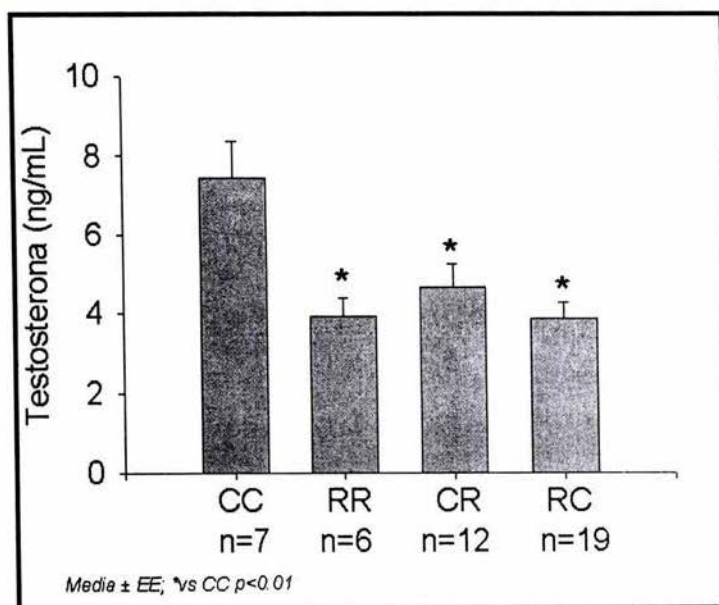
## 2.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS

Como se puede observar en la Figura 12, las concentraciones séricas de LH en los machos de 70 días de edad fueron estadísticamente menores en todos los grupos desnutridos durante alguna etapa del desarrollo (CC =  $7.452 \pm 0.907$ , RR =  $3.922 \pm 0.458$ , CR =  $4.668 \pm 0.585$ , RC =  $3.849 \pm 0.437$  ng/mL;  $p < 0.01$ ).



**Fig. 12** Concentraciones de LH (ng/mL) en ratos macho expuestas a diferentes dietas durante la gestación y/o lactancia. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control). Media ± EE; \* $p < 0.01$  vs CC.

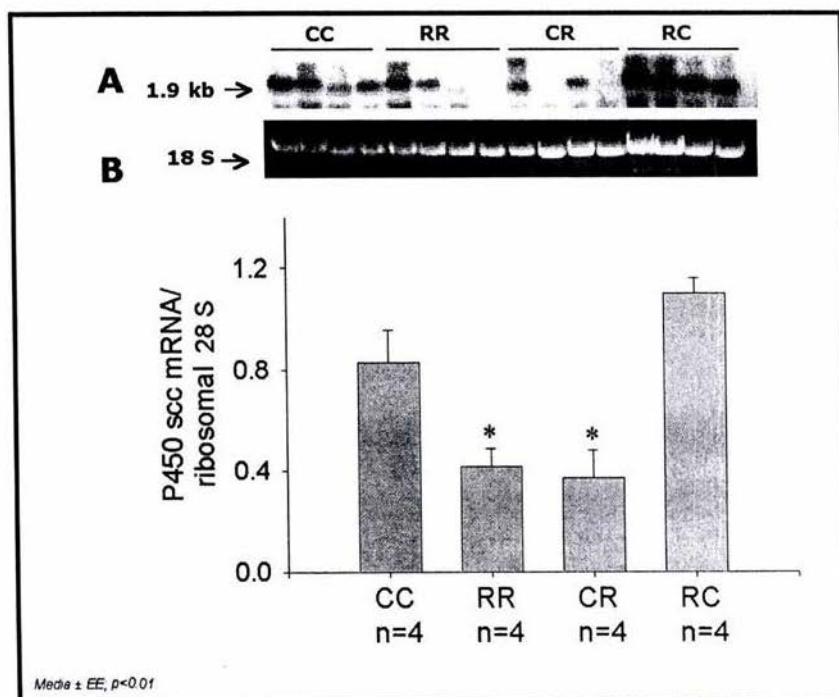
Al igual que las concentraciones de LH, se encontró una tendencia similar en los niveles de testosterona determinados en suero de ratas macho a los 70 días de edad, siendo esta disminución comparada con el grupo control estadísticamente significativa. Figura 13, (CC =  $1.879 \pm 0.3$ , RR =  $0.90 \pm 0.09$ , CR =  $1.067 \pm 0.1$ , RC =  $1.44 \pm 0.17$  ng/mL;  $p < 0.01$ ).



**Fig. 13** Concentraciones de testosterona (ng/mL) en ratas macho expuestas a diferentes dietas durante la gestación y/o lactancia. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control). Media  $\pm$  EE; \* $p < 0.01$  vs CC.

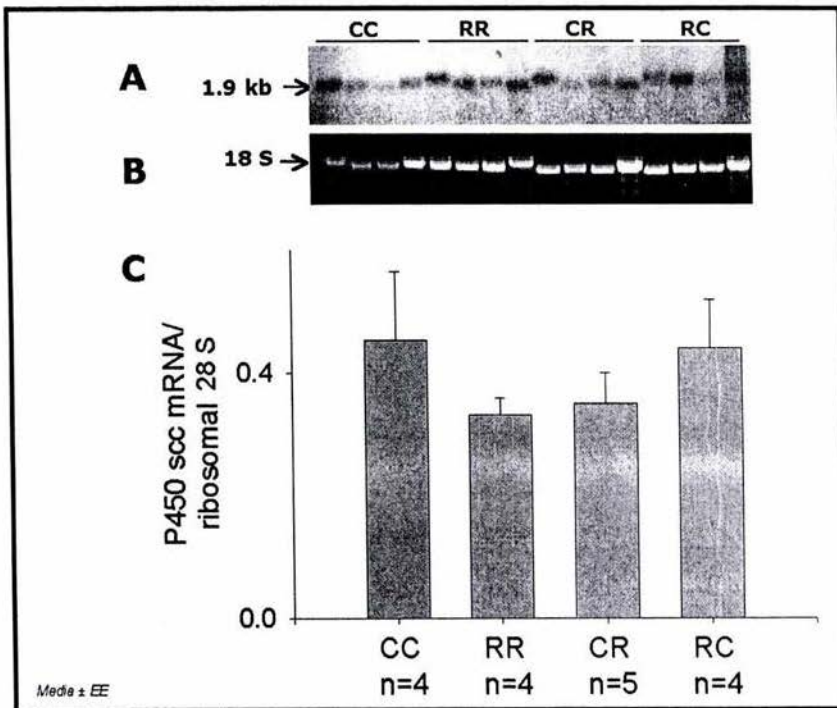
## 2.3 MARCADORES MOLECULARES

Refiriéndonos al nivel molecular encontramos que la expresión de la P450<sub>scc</sub> (enzima clave de la esteroidogénesis), la cual fue determinada en testículos de 21 días de edad fué, en comparación con el grupo control estadísticamente menor en ambos grupos desnutridos durante la lactancia RR y CR; tal como se observa en la Figura 14, (CC =  $0.830 \pm 0.130$ , RR =  $0.417 \pm 0.071$ , CR =  $0.370 \pm 0.110$ , RC =  $1.103 \pm 0.0601$ ,  $p < 0.01$ ).



**Fig. 14** A: Northern blot de RNA de testículos de ratas de 21 días. Fue utilizada una sonda para P450<sub>scc</sub> marcada con <sup>32</sup>P, B: Ribosomal 28 S teñido con bromuro de etidio, C: gráfica que muestra la abundancia relativa del mRNA del citocromo P450<sub>scc</sub> vs ribosomal 28 S. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control). Media ± EE; \* $p < 0.01$  vs CC.

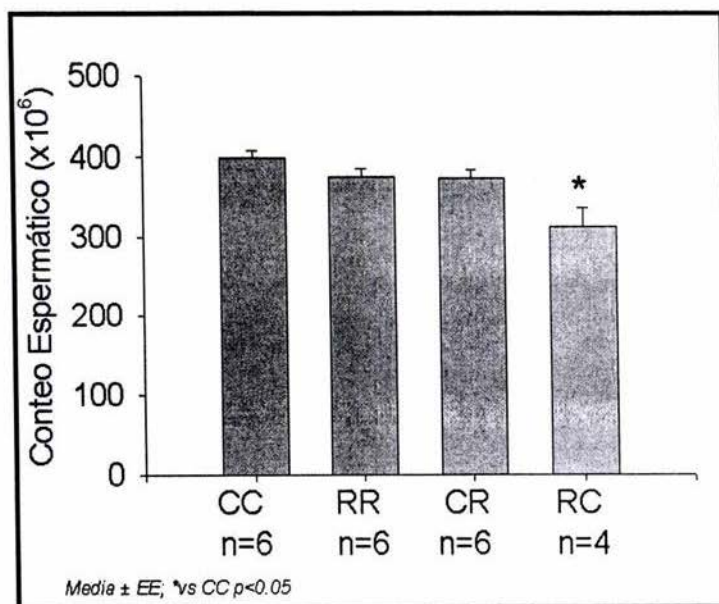
Además, se observó que la expresión de la misma enzima (P450<sub>scc</sub>), ahora determinada en testículos de 70 días, tiende a ser nuevamente menor en los grupos desnutridos durante la lactancia RR y CR, aunque dicha tendencia no fué estadísticamente significativa entre grupos los grupos de estudio. Figura 15, (CC =  $0.452 \pm 0.112$ , RR =  $0.331 \pm 0.027$ , CR =  $0.350 \pm 0.051$ , RC =  $0.440 \pm 0.078$ ).



**Fig. 15 A:** Northern blot de RNA de testículos de ratas de 70 días. Se utilizó una sonda para P450<sub>scc</sub> marcada con <sup>32</sup>P, B: Ribosomal 28 S teñido con bromuro de etidio, C: gráfica que muestra la abundancia relativa del RNAm del citocromo P450<sub>scc</sub> vs ribosomal 28 S. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control). Media ± EE.

## 2.4 MARCADORES CELULARES

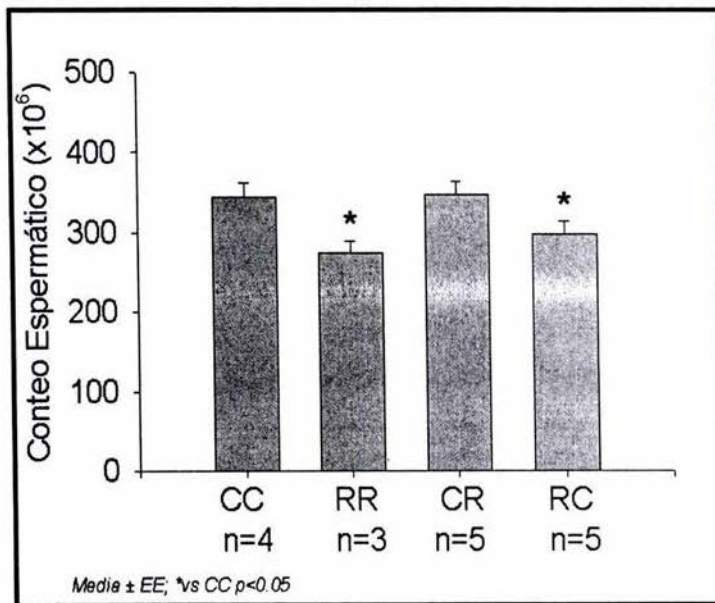
A nivel celular pudimos observar que en comparación con el grupo control, la cuenta espermática a los 130 días de edad se encontró disminuida solamente en el grupo desnutrido durante la gestación RC. Figura 16, (CC =  $398.5 \pm 9.208$ , RR =  $375.0 \pm 11.36$ , CR =  $374.5 \pm 9.35$ , RC =  $313.5 \pm 23.89 \times 10^6$ ;  $p < 0.05$ ).



**Fig. 16** Conteo espermático ( $\times 10^6$ ) a los 130 días en ratas macho expuestas a diferentes dietas durante la gestación y/o lactancia. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control). Media  $\pm$  EE; \* $p < 0.05$  vs CC.



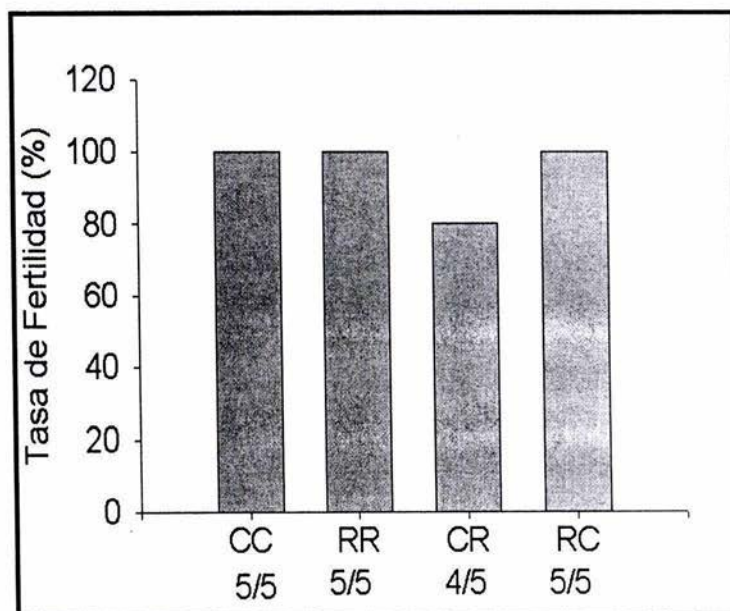
A los 270 días de edad, cuando los machos son un poco más viejos, se encontró que el conteo espermático disminuyó en todos los grupos; sin embargo, esta reducción fue más remarcada en ambos grupos desnutridos durante la gestación RR y RC. Figura 17, (CC =  $344.25 \pm 17.63$ , RR =  $274.25 \pm 10.82$ , CR =  $341.0 \pm 19.09$ , RC =  $287.5 \pm 14.38 \times 10^6$ ;  $p < 0.05$ ).



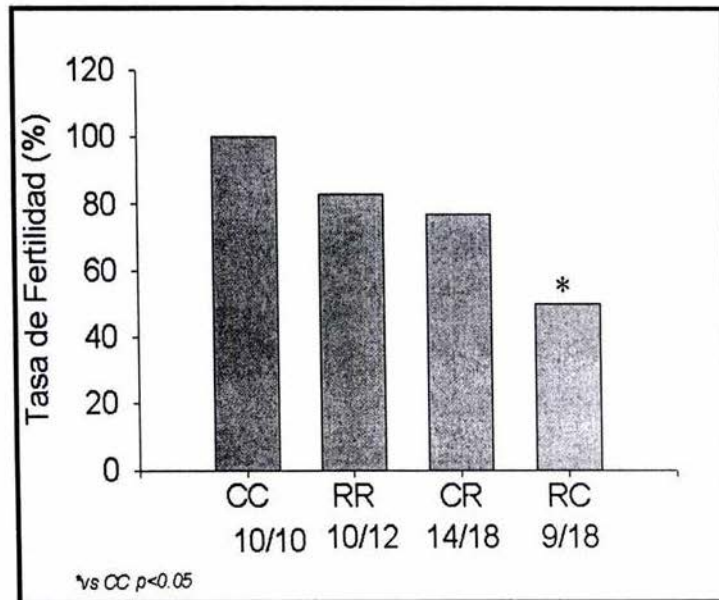
**Fig. 17** Conteo espermático ( $\times 10^6$ ) a los 270 días en ratas macho expuestas a diferentes dietas durante la gestación y/o lactancia. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control). Media  $\pm$  EE; \* $p < 0.05$  vs CC.

## 2.5 MARCADORES FISIOLÓGICOS

Desde etapas tempranas del desarrollo, observamos cambios a nivel fisiológico, bioquímico, celular y molecular, pero a pesar de estas modificaciones la tasa de fertilidad no se vió afectada en los adultos jóvenes (70 días de edad). Figura 18, (CC =100, RR = 100, CR = 80, RC = 100%), pero sí tuvieron un impacto en la capacidad reproductiva en los adultos mas viejos (270 días de edad) de todos los grupos desnutridos RR, CR y RC; sin embargo, el impacto fué mucho mayor en el grupo desnutrido durante la gestación, siendo esta disminución estadísticamente significativa. Figura 19, (CC =100, RR = 83.3, CR = 77, RC = 50%).



**Fig. 18** Tasa de Fertilidad (%) en ratas macho de los diferentes grupos de estudio a los 70 días de edad. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control).



**Fig. 19** Tasa de Fertilidad (%) en ratas macho de los diferentes grupos de estudio a los 270 días de edad. CC (control-control); RR (restringido-restringido); CR (control-restringido); RC (restringido-control).  $\chi^2$ ; \* $p < 0.05$  vs CC.

## VII. DISCUSIÓN

Hay evidencias que indican que la alteración del ambiente fetal puede tener consecuencias a largo plazo, lo cual es definido como programación del desarrollo<sup>43</sup>.

En el presente trabajo por medio del modelo de restricción proteínica utilizado, se demostró que la desnutrición materna aplicada a lo largo del embarazo y/o lactancia conduce a cambios fisiológicos, bioquímicos, celulares y moleculares en las crías macho desde etapas tempranas de la vida.

La evaluación de la entrada a la pubertad en la rata macho es difícil debido a la falta de un signo externo fácilmente identificable<sup>41</sup>, con base en la bibliografía nosotros definimos como signos de desarrollo sexual el descenso testicular y la separación del prepucio, los cuales se han visto que son eventos dependientes de andrógenos<sup>41</sup>.

El descenso testicular no es un proceso simple y parece estar conducido por etapas en las que influyen factores anatómicos, así como influencias hormonales<sup>44</sup>. Basados en estudios experimentales y material de revisión clínica, se ha determinado que el descenso testicular es un evento directamente mediado por los andrógenos, bajo la regulación de las gonadotropinas hipofisarias<sup>45</sup>.

Ha sido reportado que el estrés materno en las ratas macho inhibe el crecimiento del proceso *vaginalis*<sup>40</sup>, que tiene efectos adversos en la organización del sistema genital<sup>46</sup> y causa mal descenso testicular<sup>40</sup>.

Nuestros datos claramente demuestran que la restricción proteínica materna afectó los marcadores de desarrollo sexual, ya que los machos provenientes de los diferentes grupos experimentales presentaron retraso en el descenso testicular, dichos resultados sugieren que la inhibición del eje hipófisis – testículo puede ser uno de los factores importantes que influyeron en dicho retraso, ya que el funcionamiento adecuado del eje es esencial para el descenso testicular<sup>46,47</sup>.

De igual forma se ha visto que el estado de nutrición es un factor importante, y que la malnutrición durante la gestación o el periodo perinatal puede inducir un cambio, programando el desarrollo de la entrada a la pubertad<sup>32,34</sup>. Estudios en ratas macho han demostrado que la restricción alimenticia postnatal resulta en el retraso de la separación del prepucio<sup>48</sup>.

Nuestros resultados tienen una tendencia similar, ya que los machos provenientes de las madres desnutridas durante la lactancia presentaron retraso en la retracción del prepucio, aunque no haya sido estadísticamente significativo.

Por lo tanto la desnutrición temprana puede cambiar la programación endocrina y con ello el tiempo de entrada y el desarrollo de la pubertad<sup>32</sup>, la cual es una etapa muy importante pues es la transición de un estado sexual inmaduro a otro en el cual ya existe la actividad reproductiva completa y está determinada por señales que actúan en el cerebro para incrementar la actividad del eje hipotálamo – hipófisis, el cual estimula la producción de gametos maduros<sup>38</sup>, el incremento en la secreción de gonadotropinas, especialmente la LH conduce dicha transición<sup>49</sup>.

Ha sido reportado que la secreción de gonadotropinas está reducida tanto en animales como en humanos nutricionalmente restringidos<sup>50</sup>.

En nuestro estudio las concentraciones de LH y testosterona fueron significativamente menores en los machos provenientes de madres desnutridas, sugiriendo que esto podría estar relacionado con la supresión del eje hipotálamo – hipófisis – gónada, con la disminución de las gonadotropinas o con la falla en la secreción de GnRH<sup>51</sup>.

Debido a que la frecuencia pulsátil de LH, va a reflejar la respuesta hipotalámica<sup>52</sup>, y la secreción de testosterona a su vez la señal de la LH, ya que cada pulso de LH induce uno de testosterona<sup>53</sup>.

Se sabe que una de las funciones más importantes de las células de Leydig del testículo es la biosíntesis de testosterona<sup>54</sup>, y estas son dependientes de la estimulación aguda y crónica de la hormona hipofisiaria LH<sup>55</sup>.

El primer punto del control de la esteroidogénesis es el transporte del colesterol a los sitios de almacenamiento intracelular del interior de la membrana mitocondrial y su subsecuente conversión a pregnenolona, por la P450scc<sup>56</sup>, el cual es el paso limitante de la esteroidogénesis<sup>16</sup>. Además de la P450scc, la biosíntesis de la testosterona requiere de la actividad de tres enzimas más: 3 $\beta$ HSD (3 $\beta$  - hidroxisteroide deshidrogenasa/  $\Delta$ 5 -  $\Delta$ 4 isomerasa), P45017a (17 $\alpha$ -hidroxilasa / 17 - 20 liasa) y la 17 - cetoesteroide reductasa<sup>57</sup>. La reducción en la actividad de cualquiera de estas enzimas puede causar la reducción de la función esteroidogénica de las células de Leydig<sup>56</sup>.

Se sabe que el estrés afecta la producción de testosterona<sup>55</sup>, estudios realizados empleando dexametasona en útero han demostrado que la biosíntesis de andrógenos se inhibe, sus efectos persisten en el desarrollo postnatal<sup>58</sup> y presentan disminución en el RNAm de la P450scc<sup>55</sup>.

Nuestros resultados sugieren que la disminución en la actividad de la P450scc en los testículos de los machos provenientes de madres desnutridas durante la lactancia posiblemente sea consecuencia de los bajos valores hormonales de LH, con esto podemos demostrar que la exposición al estrés perturba la función testicular.

Se ha demostrado que los cambios en la nutrición ejercen profundos efectos en la producción de espermatozoides<sup>59</sup>.

La nutrición durante la vida fetal puede afectar el desarrollo de los testículos y en algunas circunstancias tener efectos permanentes en su futura capacidad para producir espermatozoides<sup>33</sup>.

En nuestro estudio observamos que la desnutrición materna redujo el número de espermatozoides en los machos del grupo RC a los 70 días de edad, lo mismo ocurrió a los 270 días en este grupo y en el que fue restringido durante la gestación y la lactancia (RR).

Lo cual sugiere una disminución en la actividad del eje hipotálamo – hipófisis – gónada<sup>33</sup>, debido a las bajas concentraciones de LH y testosterona. Pues se ha demostrado que los andrógenos son esenciales en la producción y maduración de los espermatozoides<sup>60</sup>, y el mantenimiento de las actividades del epidídimo son absolutamente dependientes de testosterona<sup>61</sup>.

También existe la posibilidad que dicha reducción en el contenido espermático del epidídimo, sea el resultado de la baja producción de espermatozoides por el testículo<sup>61</sup>, posiblemente debido a la disminución de las células de Sertoli ya que éstas se pueden ver afectadas durante la programación fetal<sup>33</sup>.

Con base en lo anterior se puede decir que la desnutrición materna puede limitar el desarrollo testicular, la producción de espermatozoides y la fertilidad de las crías.

Para ser fértil el macho debe tener los órganos reproductivos correctos tanto internos como externos, los testículos deben haber descendido al escroto y la fertilidad también requiere la masculinización del cerebro y de las neuronas que controlan la producción de las hormonas reproductivas asegurando que el macho muestre un carácter sexual adecuado; la mayoría de esto es establecido durante la vida fetal<sup>62</sup>.



Es bien establecido que el estrés prenatal tiene efectos desmasculinizantes en el carácter sexual de la rata macho, observaciones experimentales han demostrado que el estrés materno durante el tercer trimestre de gestación reduce severamente el carácter copulatorio en las crías macho adultas<sup>63</sup>.

Ward y cols, postularon que el estrés prenatal rompe el medio hormonal materno, lo cual resulta en la ausencia de la oleada de testosterona fetal en los días 18 y 19 de gestación, periodo crítico de la diferenciación sexual en el cerebro de la rata<sup>64</sup>.

Por otra parte, estudios realizados en ovejas han demostrado que la desnutrición durante etapas tempranas del desarrollo, ya sea antes o después del nacimiento puede inducir una reducción en la vida de la capacidad reproductiva en las crías hembra<sup>28</sup>.

Por lo tanto la habilidad reproductiva en el adulto esta determinada por desarrollo adecuado del eje reproductivo durante la vida fetal<sup>65</sup>.

Nuestros resultados muestran evidencias claras de los efectos de la programación prenatal y/o postnatal en la capacidad reproductiva de las crías macho a los 270 días de edad, siendo la disminución de esta más notoria en el grupo RC; posiblemente debido a que la restricción alimenticia indujo cambios a varios niveles del eje hipotálamo – hipófisis – gónada<sup>66</sup>.

Por lo que se puede sugerir que la alteración del carácter sexual del grupo RC, fue el resultado de una inadecuada sincronización de la maduración del Sistema Nervioso Central y la secreción de testosterona por el testículo fetal<sup>64</sup>.

## VIII. CONCLUSIONES

- La desnutrición en etapas tempranas del desarrollo tiene una repercusión negativa en la programación sexual de la rata macho.
  
- La restricción proteínica materna aplicada durante el embarazo y/o lactancia tuvo impacto en las crías a nivel fisiológico, bioquímico, celular y molecular, dichos cambios conllevan a la posible alteración del eje hipotálamo – hipófisis – testículo, ya que se observó:
  1. Retraso en el descenso testicular en todos los grupos desnutridos.
  2. Bajas concentraciones de LH y testosterona en los machos de 70d provenientes de madres desnutridas durante algún periodo.
  3. Disminución en la expresión de la enzima P450scs en ambos grupos desnutridos durante la lactancia (RR y CR)
  4. Decremento en el conteo espermático a los 130 y 270d en los machos del grupo desnutrido únicamente durante la gestación (RC).
  5. Reducción en la tasa de fertilidad a los 270d en los machos del grupo RC.
  
- Con base en los resultados obtenidos se propone que uno de los periodos críticos para la subsecuente capacidad reproductiva en la vida adulta es el periodo perinatal.
  
- Los efectos de la restricción materna en los machos del grupo RC sugieren cambios en la estructura o fisiología del eje reproductivo, por lo cual es necesario realizar estudios a este nivel con el fin de verificar lo anterior.

## IX. REFERENCIAS

1. Montgomery D.D.D, Welbourn R.B, Endocrinología médica y quirúrgica, Salvat Editores, Barcelona 1979, pp 15-19.
2. Greenspan F.S, Baxter J.D, Endocrinología básica y clínica, Ed. Manual Moderno , 3ª edición, México 1995, pp 7-10.
3. Felig P, Baxter J.D, Forman L.A, Endocrinology and metabolism, McGraw-Hill, 3<sup>rd</sup> edition, USA 1995, pp 226-230.
4. Ganong W.F, Fisiología médica, Ed. Manual Moderno, 16ª edición, México 1998, pp 276-278, 404-408, 443-445, 474-477.
5. Guyton A.C, Hall J.E, Textbook of medical physiology, W.B Saunders Company, 9<sup>th</sup> edition, Philadelphia 1996, pp 855-857, 925-927.
6. Greenspan F.S, Stewler G.J, Basic and clinical endocrinology, Appleton & Lange, 5<sup>th</sup> edition, USA 1997, pp 95-100.
7. Tortora G.J, Anagnostakos N.P, Principios de anatomía y fisiología, Ed. Harla, 6ª edición, México 1993, pp 462-464, 611-612, 1109-1111.
8. Williams R.H, Tratado de endocrinología, Interamericana, 5ª edición, España 1984, pp 308-315.
9. E. Knobil and J.D. Neill, The physiology of reproduction, 2<sup>nd</sup> edition, Raven Press, Ltd., New York 1994, pp 1365-1368, 1178, 1184.

10. Gnessi L, Fabbri A, Spera G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 1997;18(4):541-609.
11. Galina H.C, Saltiel C.A, Valencia M.J, Reproducción de los animales domésticos, Ed. Limusa, México 1988, pp 36-44.
12. Tresguerres J.A.F, Fisiología humana, McGraw-Hill Interamericana, 2ª edición, Madrid 1999, pp 1034-1039
13. DeGroot L.J, Endocrinology, W.B Saunders Company, 3<sup>rd</sup> edition, USA 1995, pp 2307-2310, 2314-2316, 2352.
14. Robaire B, Viger RS. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 1995;52(2):226-36.
15. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 2000;164(3):247-53.
16. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 1988;9(3):295-318.
17. Wilson J.D, Foster D.W, Textbook of endocrinology, W.B. Saunders Company, 8<sup>th</sup> edition, USA 1992, pp 801-805
18. Randall D, Burggren W, French K, Fisiología animal, McGraw-Hill Interamericana, 4ª edición, Madrid 1998, pp 507-509

19. Hoet JJ, Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol* 1999;514 (Pt 3):617-27.
20. Nathanielsz P.W, *Life in the womb: The origin of health and disease*, Ithaca N.Y Promethean Press, 1999. pp 1-10, 20-21, 30-31.
21. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986;1:1077-1081.
22. Barker DJP. *Mothers, Babies and Health in Later Life*. 1998; London: Churchill Livingstone.
23. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71(5 Suppl):1344S-52S.
24. Gluckman PD. Editorial: nutrition, glucocorticoids, birth size, and adult disease. *Endocrinology* 2001;142(5):1689-91.
25. Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M et al. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci* 1996;16:3943-49.
26. Hoet JJ, Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol (Lond)* 1999;514 (Pt 3):617-27.
27. Rhind SM, Rae MT, Brooks AN. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 2001;122(2):205-14.

28. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341(8850):938-41.
29. Robinson JE, Birch RA, Taylor JA, Foster DL, Padmanabhan V. In utero programming of sexually differentiated gonadotrophin releasing hormone (GnRH) secretion. *Domest Anim Endocrinol* 2002;23(1-2):43-52.
30. Manikkam M, Crespi EJ, Doop DD, Herkimer C, Lee JS, Yu S, Brown MB, Foster DL, Padmanabhan V. Fetal programming: prenatal testosterone excess leads to fetal growth retardation and postnatal catch-up growth in sheep. *Endocrinology* 2004;145(2):790-8. Epub 2003 Oct 23.
31. Rae MT, Rhind SM, Fowler PA, Miller DW, Kyle CE, Brooks AN. Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* 2002;124(1):33-9.
32. Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr Res* 2000;48(6):803-7.
33. Alejandro B, Perez R, Pedrana G, Milton JT, Lopez A, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H, Martin GB. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fertil Dev* 2002;14(5-6):333-7.
34. Leonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC, Dupouy JP., Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod.* 2003;68(2):390-400.



35. Davies MJ, Norman RJ. Programming and reproductive functioning. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13(9):386-92.
36. Birch RA, Padmanabhan V, Foster DL, Unsworth WP, Robinson JE. Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: fetal androgen exposure produces progressive disruption of reproductive cycles in sheep. *Endocrinology* 2003;144(4):1426-34.
37. *Biología de la reproducción*, Universidad Autónoma Metropolitana, México 2001, pp 93-98
38. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123(11):1939-51.
39. Wood RI, Foster DL. Sexual differentiation of reproductive neuroendocrine function in sheep. *Rev Reprod* 1998;3(2):130-40.
40. Shono T, Imajima T, Zakaria O, Suita S Does maternal stress induce abnormal descent of the testis in prepubertal rats? *BJU Int* 1999;84(3):353-6.
41. Korenbrot CC, Huhtaniemi IT, Weiner RI. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol Reprod* 1977;17(2):298-303.
42. OMS *Manual de Laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*, Ed. Médica panamericana, 4ª edición, Madrid 2001, pp 10-19.

43. Vickers MH, Ikenasio BA, Breier BH. IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. *Endocrinology* 2001;142(9):3964-73.
44. Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns CF. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* 1997;18(2):259-80.
45. Rajfer J, Walsh PC. Hormonal regulation of testicular descent: experimental and clinical observations. *J Urol* 1977;118(6):985-90.
46. Shono T, Suita S Disturbed pituitary-testicular axis inhibits testicular descent in the prenatal rat. *BJU Int* 2003;92(6):641-3.
47. Hutson JM. A biphasic model for the hormonal control of testicular descent. *Lancet* 1985;2(8452):419-21.
48. Engelbregt MJ, van Weissenbruch MM, Popp-Snijders C, Lips P, Delemarre-van de Waal HA. Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction. *Pediatr Res* 2001;50(4):474-8.
49. Kosut SS, Wood RI, Herbosa-Encarnacion C, Foster DL Prenatal androgens time neuroendocrine puberty in the sheep: effect of testosterone dose *Endocrinology* 1997;138(3):1072-7.
50. Clarke IJ, Henry BA., Leptin and reproduction. *Rev Reprod* 1999;4(1): 48-55.
51. Ortiz G, Vilchis F, Cardenas M, Cruz C, Pedraza-Chaverri J, Menjivar M. Reproductive function in male rats with chronic nephrosis. *J Reprod Fertil* 1999;117(2):223-8.

52. Martin GB, Tjondronegoro S, Blackberry MA. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. *J Reprod Fertil* 1994;101(1):121-8.
53. Katongole CB, Naftolin F, Short RV. Seasonal variations in blood luteinizing hormone and testosterone levels in rams. *J Endocrinol* 1974;60(1):101-6.
54. Payne AH, Youngblood GL. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod* 1995;52(2):217-25.
55. Payne AH. Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biol Reprod* 1990;42(3):399-404.
56. Luo L, Chen H, Zirkin BR. Leydig cell aging: steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol side-chain cleavage enzyme. *J Androl* 2001;22(1):149-56.
57. Luo L, Chen H, Zirkin BR. Are Leydig cell steroidogenic enzymes differentially regulated with aging? *J Androl* 1996;17(5):509-15.
58. Page KC, Sottas CM, Hardy MP. Prenatal exposure to dexamethasone alters Leydig cell steroidogenic capacity in immature and adult rats. *J Androl* 2001;22(6):973-80.
59. Martin GB, Walkden-Brown SW. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. *J Reprod Fertil Suppl* 1995;49:437-49.

60. Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K., Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biol Reprod* 2003;68(6):2081-91. Epub 2003 Jan 08.
61. Goyal HO, Braden TD, Mansour M, Williams CS, Kamaleldin A, Srivastava KK., Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biol Reprod* 2001;64(3):927-34.
62. Sharpe RM, Franks S. Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue. *Nat Cell Biol* 2002;4 Suppl:s33-40.
63. Anderson RH, Fleming DE, Rhees RW, Kinghorn E., Relationships between sexual activity, plasma testosterone, and the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats. *Brain Res* 1986;370(1):1-10.
64. Ward IL, Weisz J. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science* 1980;207(4428):328-9.
65. Brooks AN, McNeilly AS, Thomas GB. Role of GnRH in the ontogeny and regulation of the fetal hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 1995;49:163-75.
66. Temple JL, Rissman EF. Acute re-feeding reverses food restriction-induced hypothalamic-pituitary-gonadal axis deficits. *Biol Reprod* 2000;63(6):1721-6.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

# Endocrinología

Memorias del XLIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C.

del 1° al 6 de Diciembre 2003

# y Nutrición



## Índice

Carta de la Mesa Directiva	4
Mesa Directiva 2002 -2003	6
Comisiones	7
Consejo Consultivo	9
Patrocinadores	10
Información General	11
Programa Académico y Salones	12
Programa Precongreso	13
Programa Congreso Resumido	16
Martes 2	16
Miércoles 3	17
Jueves 4	21
Viernes 5	24
Sábado 6	27
Esquema Programa Académico	28
Eventos Sociales	29
Desglose de Eventos por Día	31
Martes 2	31
Miércoles 3	32
Jueves 4	43
Viernes 5	54
Sábado 6	64
Profesores Nacionales	65
Profesores Extranjeros	70
Socios de Nuevo Ingreso y Cambios de Categoría	71
Índice de Autores	72
Hoteles y Agencia de Viajes	83
Agradecimientos	84
Mapa Área Académica	85
Plano de Exhibición Comercial y Distribución	86

**CRECIMIENTO EN SUPERVIVIENTES DE LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA.** Valdemora Almaguer, Rosas Almaz, Angeles Ma Carrero, Sánchez Arce, López Herrera, Paredes Rojas, Ruiz de Luz, Yolanda Carlos, Catalina León Rodríguez, Altamirano Halty, Servicios de Endocrinología, Nematología, Tipos de Especialidades Médicas, IMIP, México, D. F.

**INTRODUCCIÓN:** La detección del crecimiento está directamente relacionada con el tratamiento en los niños y adolescentes con LAL y es la secuela más frecuente.

**OBJETIVO:** Determinar las alteraciones en el crecimiento en pacientes supervivientes de Leucemia Aguda Linfoblástica comparados con sus hermanos.

**SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS:** Evaluamos del Servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría pacientes supervivientes de LAL, miembros de familias integradas mayores de 8 años de edad cronológica, en fase de vigiliencia, que solicitaron participar en el estudio. Se compararon con hermanos, con el diagnóstico crónico. Comparamos edad, sexo, edad al diagnóstico, talla al diagnóstico, sexo al diagnóstico, tiempo de vigiliencia, tipo de quimioterapia empleada y dosis y tipo de radioterapia. Realizamos somatometría completa (peso, talla, talla en decúbito, segmentos inferior y superior, brazailes). Analizamos las frecuencias de cada variable para los pacientes (Grupo de estudio) y para sus hermanos (Grupo control). De acuerdo con la distribución de los datos calculamos medidas de tendencia central. Comparamos las diferencias entre los pacientes y los hermanos por análisis binomial por prueba de 1 parámetro y Wilcoxon. Realizamos correlaciones de Spearman para determinar la asociación entre las parámetros clínicos y bioquímicos y las variables somatométricas. Utilizamos el programa de cómputo SPSS-PC. Consideramos estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS:** Evaluamos 50 pacientes (22 hombres y 28 mujeres) con diagnóstico de LAL, 1- 29 de mayo y 25 pacientes de alto riesgo que recibieron vinorelbina, prednisona, oncovina, etc. Los hermanos, 4 superagrupa, 8 metagrupa, A6 subgrupos. Recibieron radioterapia 21 pacientes (1800- 2700 Cy). El tiempo de vigiliencia promedio fue de 55.5 meses (10 a 180 meses). Las características de los pacientes se muestran en la siguiente tabla y los resultados se expresan en mediana (rango-máximo).

EDAD (años)	NIÑAS	HERMANOS	HERMANAS	PZT-FAM	P
Talla (cm)	141 ± 12	130 (42-139)	124 (42-135)	143 (71-226)	0.00
Índice de masa	18.1 ± 1.6	15.1 ± 2.2	14.2 ± 2.2	18.5 ± 8	0.00
Peso (Kg)	48 (20-87)	42.8 (7-80)	54.8 (15-106)	58.7 (15-178)	0.00
IMC	21.9	20.8	20.3 (14.9-30)	23.3 (14.1-37.1)	0.00
Pc	85 (70-95)	50 (25-85)	50 (45-65)	85 (70-95)	0.08
Brazaile	3.5 (1.8-11)	1.7	0.5 (1.4-4.5)	3.6 (2-18)	0.4
Índice	0.85	0.87	0.88 (0.73-0.98)	0.85 (0.76-0.94)	0.02
Segmentos	0.78 (1.16)	0.75 (1.13)			

Encontramos talla baja ( $p < 0.05$ ) en 7 pacientes (14%), sea habían recibido radioterapia (5 niños y 1 niño menor), ninguno de los hermanos tenía talla baja a pesar de que tenían talla baja familiar 7 pacientes. No encontramos diferencias en el peso tallo al diagnóstico en los pacientes por sexo. La PC tenía ordenamiento negativamente con tratamiento con radioterapia ( $p < 0.01$ ). Tiempo de vigiliencia ( $p < 0.05$ ) tratamiento con radioterapia fue el factor principal asociado con talla baja ( $p < 0.01$ ). Encontramos mayor frecuencia de obesidad en los pacientes (niños 45% y 17% en las niñas), comparados con los hermanos (24% femenina) ( $p < 0.02$ ).

**CONCLUSIONES:** Los pacientes con supervivientes de LAL. El 17% de los pacientes tiene talla baja proporcional. Los pacientes tienen alterado su potencial de crecimiento ya que la PC de talla se encuentra en la percentil 3 familiar, en tanto que los hermanos crecen en la percentil 50 familiar. El tratamiento con radioterapia fue el factor principal asociado con talla baja, ya que el 85% de los pacientes con talla baja lo recibieron. El 30% de los pacientes tiene obesidad.

**CONDUCTAS ALIMENTARIAS DE RIESGO EN ESTUDIANTES SIN DIAGNÓSTICO DE TRASTORNOS DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA, PROVENIENTES DE PREPARATORIAS PÚBLICAS Y PRIVADAS DE MÉRIDA, YUCATÁN.** Hernández-Escalante Víctor, Lavada-Molina Hugo. Depto de Nutrición Humana y Trastornos del Metabolismo. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Yucatán. Fundación Mexicana para la Salud. Cap Península.

**Introducción:** Se tiene como antecedente un trabajo previo en el que se encontraron un total de 1006 alumnas de preparatorias públicas y privadas de Mérida, encontrando prevalencias de bulimia similares a los países desarrollados.

**Objetivos:** Conocer la frecuencia de presencia de conductas alimentarias que representen riesgos para presentar trastornos de la conducta alimentaria (TCA) en alumnas de preparatorias públicas y privadas de la ciudad de Mérida.

**Metodología:** Se aplicó el Cuestionario sobre Patrones Alimentarios, versión traducida y adaptada del QEWP-R (Questionnaire on Eating and Weight Patterns - Revised) a alumnas femeninas de preparatorias públicas y privadas de Mérida, Yucatán. Se analizaron los datos de 862 alumnas sin diagnóstico de algún TCA de acuerdo al instrumento antes mencionado.

**Resultados:** Se incluyeron en este estudio un total de 862 alumnas sin diagnóstico de bulimia nervosa (BN), trastorno de alimentación compulsiva (BED) o alimentación compulsiva con pérdida de control (BE), siendo 410 de ellas (47.6%) provenientes de cinco escuelas privadas y 452 (52.6%) de dos escuelas públicas. La edad promedio fue de 16.5 años (SD 1.08), sin diferencias de edad entre las escuelas públicas y privadas (16.56 y 16.45). El 5.9% de las encuestadas refirieron que el peso y la figura eran los factores más importantes que determinaban cómo se sentían consigo mismas como se sentían, encontrando esta respuesta ligeramente más frecuentemente en las escuelas públicas en comparación a las privadas (6.2 y 5.6%). Además, otro 22.5% (194) refirieron que el peso y la figura eran algunos de los factores principales que determinaban cómo se sentían consigo mismas como personas, correspondiendo un 22.7% en escuelas privadas y 22.4% en públicas. Se encontró que un 4.3% (37) de las alumnas refirieron autoinducirse el vómito cuando menos una vez por semana en los últimos tres meses, encontrándose cuatro casos (tres en privadas y una en pública) en donde se provocaban el vómito más de tres veces por semana. La autoinducción del vómito fue ligeramente más frecuente en las públicas que en las privadas (4.7 y 4.1 %). Se encontró que un 9.6% (83) de las alumnas refirieron ayuno de 24 hrs o más, cuando menos una vez por semana en los últimos tres meses, encontrando tres casos en donde esta práctica se llevaba a cabo más de tres veces por semana. Se encontró una mayor frecuencia de ayuno en las escuelas públicas en relación a las privadas (11.7 y 7.8%,  $p < 0.000$ ). El 10.4% de las encuestadas refirió encontrarse a dieta más de la mitad de sus vidas, excluyendo su etapa de niñez.

**Conclusiones:** En forma conjunta con el aumento de las prevalencias de trastornos de la conducta alimentaria (TCA), se reportan cifras preocupantes de frecuencia de conductas de riesgo tales como conductas compensatorias recurrentes (vómito autoinducido y ayuno), la sobrevaloración de la importancia del peso y la figura como satisfactores personales, y el recurrir a dietas restrictivas en forma desordenada. Contrario a lo reportado en otras comunidades, encontramos una mayor frecuencia, no significativa, de estas conductas en escuelas públicas. La detección oportuna de estas conductas son fundamentales para la prevención de bulimia y anorexia nervosa.



**TRASTORNOS DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN RATAS MACHO DESNUTRIDAS DURANTE EL EMBARAZO Y/O LACTANCIA.** Dás M, Guellé L, Bautista C, Larrea F, Zambrano E. Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, SZ, México, D.F. México

**INTRODUCCIÓN:** La calidad de vida en las primeras etapas del desarrollo puede afectar las características fisiológicas del individuo. La desnutrición fetal desencadena adaptaciones endocrinas que cambian permanentemente el metabolismo incrementando la susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas en el adulto como la diabetes mellitus y las dislipidemias, entre otras.

**OBJETIVO:** Estudiar el efecto de la desnutrición proteínica materna durante la gestación y/o la lactancia sobre las concentraciones en suero de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos de las ratas crías machos.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Se emplearon ratas Wistar preñadas alimentadas con dietas isocalóricas con contenido normal (C) o restringido (R) de proteína. Los grupos experimentales fueron: control (CC), restringido durante el embarazo y la lactancia (RR), restringido únicamente en el embarazo (RC) o durante la lactancia (CR). Después del destete (día 21), las crías consumieron dieta normal. Al día 110 de edad, se realizó a todos los grupos prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal administrándose, previo ayuno de 14 horas, 1 µg/g de peso de D-Glucosa. La sangre se obtuvo del seno venoso retroorbital a los 0, 30, 60 y 120 minutos. La cuantificación de glucosa e insulina se realizó por el método de la glucosa oxidada y radioinmunoanálisis, respectivamente. El colesterol y los triglicéridos fueron cuantificados por métodos enzimáticos en e tiempo 0. Los resultados son expresados como la media ± EE.

**RESULTADOS.** La curva de tolerancia a la glucosa se comportó igual en todos los grupos sin embargo, el grupo RC tuvo concentraciones en suero más altas de glucosa (115 ± 5.5 mg/dL vs 80 ± 8 mg/dL) e insulina (32.7 ± 4.1 µU/mL vs 18.2 ± 2.0 µU/mL) con respecto al control (p < 0.01). Por el contrario, las concentraciones de insulina fueron significativamente menores en todos los tiempos en los grupos restringidos durante la lactancia (RR y CR) con respecto al grupo Control (p < 0.05). Los triglicéridos y colesterol circulan en el ayuno fueron también más elevados en el grupo RC con respecto al grupo CC (p < 0.05).

**CONCLUSIONES.** La desnutrición materna ocasiona cambios metabólicos los que dependiendo de la calidad de la lactancia, se acompañan de alteraciones en las concentraciones de lípidos y carbohidratos en suero. Estos resultados sugieren la participación de mecanismos de adaptación como respuesta a estrés nutricional en las etapas tempranas del desarrollo y que inciden sobre el metabolismo en la vida postnatal.

Apoyado por: CONACYT - 138259M

**RESTRICCIÓN PROTEÍNICAS DE LA RATA DURANTE EL EMBARAZO Y/O LA LACTANCIA EN LA ACTIVIDAD SEXUAL DE LAS CRÍAS MACHO.** Rodríguez-González GL, Boeck L, Larrea F, Zambrano E. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran", Depto. Biología de la Reproducción, México, D.F., México.

**INTRODUCCIÓN.** La desnutrición en útero es una de las principales causas para la predisposición del desarrollo de enfermedades en la vida adulta. La ontogenia de las gónadas y su función se pueden ver alterados por la desnutrición. Estudios en ovejas han demostrado que la restricción alimenticia durante períodos críticos del desarrollo tiene consecuencias sobre el desempeño reproductivo. Sin embargo a la fecha no hay datos suficientes con respecto al efecto del estrés nutricional fetal en el eje hipotálamo-hipofisis-gonada.

**OBJETIVO.** Evaluar los efectos de la restricción proteínica durante etapas tempranas del crecimiento en el desarrollo sexual y capacidad reproductiva de la rata macho.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Se emplearon ratas Wistar preñadas alimentadas con dietas isocalóricas con contenido normal (C) o restringido (R) de proteína. Los grupos experimentales fueron: control (CC), restringido en el embarazo y la lactancia (RR), restringido únicamente durante el embarazo (RC) o en la lactancia (CR). Después del destete las crías consumieron dieta control. Como marcador de desarrollo sexual se determinó el descenso testicular transanguinal y la retracción prepucial. Se obtuvo el peso de los testículos, las concentraciones de testosterona en suero, la tasa de fertilidad de los machos y el cortejo espermático en la fase adulta (270 días de edad). Los datos fueron expresados como la Media ± EE.

**RESULTADOS.** Se encontró retraso en el descenso testicular en los grupos desnutridos en alguna etapa (CC = 23.4 ± 0.2, RR = 27.8 ± 0.3, CR = 25.5 ± 0.2 y RC = 25.5 ± 0.5 d,  $p < 0.05$ ). La misma tendencia se observó en la retracción del prepucio y la cuenta espermática, aunque no hubo diferencias significativas. El peso de los testículos fue menor en los grupos RR y CR con respecto a CC y RC ( $p < 0.001$ ). Las concentraciones de testosterona fueron menores en todos los grupos restringidos en algún momento del desarrollo con respecto al control (CC = 7.45 ± 0.9, RR = 3.91 ± 0.4, CR = 4.66 ± 0.6 y RC = 3.85 ± 0.4 ng/ml,  $p < 0.001$ ). La tasa de fertilidad fue de CC = 100%, RR = 83%, CR = 84.62% y RC = 53.85%.

**CONCLUSIONES.** La restricción proteínica en la madre gestante y/o lactante afecta tanto el desarrollo sexual como la tasa de fertilidad de las crías macho. La desnutrición en etapas tempranas del desarrollo tiene un impacto negativo en la programación sexual de la rata macho. (CONACYT - 138259M)

REVISTA CUBANA DE  
**SALUD PUBLICA**

**XVIII Reunión Bienal de la  
Asociación Latinoamericana  
de Investigadores en  
Reproducción Humana**

**ALIRH 2003**

**RESUMENES**

**Volumen 29  
Suplemento No. 1**



ISSN 0864-3466



R-70

**EFFECTOS DE LA RESTRICCIÓN NUTRICIONAL DURANTE EL EMBARAZO Y/O LACTANCIA EN LA RATA SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL DE LAS CRIAS HEMBRAS.**

**González M.**, Bautista CJ, Larrea F, Zambrano E.

Depto. Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.

**Objetivo:** Estudiar los efectos de la desnutrición materna durante el embarazo y/o lactancia sobre el peso y composición corporal de las crías hembras. **Métodos:** Se emplearon ratas Wistar preñadas alimentadas con dietas isocalóricas con contenido normal (C) o restringido (R) de proteína. Los grupos experimentales fueron: control (CC), restringido durante el embarazo y la lactancia (RR), restringido únicamente en el embarazo (RC) o durante la lactancia (CR). Después del destete (día 21), las crías consumieron dieta normal. Se evaluó el peso del animal y la ingesta de alimento diario. El contenido de proteína corporal y de lípidos en la rata se realizó por los métodos de Kjeldahl y Soxhlet, respectivamente. **Resultados:** El peso al nacer de las crías de madres restringidas durante el embarazo fue significativamente menor que el observado en las crías de madres control. Al destete, el peso del grupo RR y CR fue menor que CC y RC. Estas diferencias se mantuvieron en las ratas adultas a excepción del grupo RC que mostró un aumento en el peso y grasa corporal y una disminución en el contenido de proteínas con respecto a los demás grupos. El consumo diario per capita en las crías de los grupos RC y CC fue similar, pero significativamente mayor que aquellas de RR y CR. **Conclusiones:** La desnutrición materna durante el embarazo condiciona en las crías adultas el incremento en los depósitos de grasa y peso corporal dependiendo de la calidad nutricional en la lactancia. Estos resultados sugieren la participación de mecanismos de adaptación como respuesta al estrés nutricional en la vida intrauterina y que inciden sobre el metabolismo, crecimiento y desarrollo en la vida posnatal.

Ayudado por CONACyT - 138259M.

R-71

**DISMINUCIÓN EN LA ACTIVIDAD SEXUAL DE LA RATA MACHO COMO CONSECUENCIA DE LA RESTRICCIÓN PROTEÍNIC PERINATAL.**

**Guzmán C.**, Rodríguez GL, Chavira R, Larrea F, Zambrano E.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Depto. Biología de la Reproducción, México, D.F., México.

**Objetivo:** Evaluar los efectos de la restricción proteínica perinatal materna en la capacidad reproductiva de la rata macho. **Métodos:** Se emplearon ratas Wistar preñadas alimentadas con dietas isocalóricas con contenido normal (C) o restringido (R) de proteína. Los grupos experimentales fueron: control (CC), restringido en el embarazo y la lactancia (RR), restringido únicamente durante el embarazo (RC) o en la lactancia (CR). Después del destete las crías consumieron dieta control. Como marcador de desarrollo sexual se determinó el descenso testicular transanguinal. Se obtuvo el peso de los testículos, las concentraciones de testosterona en suero y la tasa de fertilidad de los machos en la fase adulta. Los datos fueron expresados como media  $\pm$  EE. **Resultados:** El día que se completó el descenso testicular de los grupos fue: CC (21.71  $\pm$  0.18d) < RC (24.53  $\pm$  0.21d) < RR (25.89  $\pm$  0.26d) = CR (26.22  $\pm$  0.24d),  $p < 0.001$ . El peso de los testículos fue menor en los grupos RR y CR con respecto a CC y RC ( $p < 0.001$ ). Las concentraciones de testosterona fueron menores en todos los grupos restringidos con respecto al control (CC = 7.45  $\pm$  0.9, RR = 3.91  $\pm$  0.4, CR = 4.66  $\pm$  0.6 y RC = 3.85  $\pm$  0.4 ng/ml;  $p < 0.001$ ). La tasa de fertilidad fue de CC = 100%, RR = 50 %, CR = 84.62% y RC = 53.85%. **Conclusiones:** La restricción proteínica en la madre gestante y/o lactante afecta tanto el desarrollo sexual como la tasa de fertilidad de las crías macho. La desnutrición en etapas tempranas del desarrollo tiene un impacto negativo en la programación sexual de la rata macho.

(CONACyT - 138259M).

R-72

**EFFECTO IN VIVO DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH) EN FOLÍCULOS DE OVARIO DE RATA.**

**Parborelli E.**, Irusta G<sup>1</sup>, Gonzalez O<sup>2</sup>, Vitale A<sup>1</sup>, Tesone M<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET, <sup>2</sup>Facultad de Agronomía y Veterinaria; <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de análogos de GnRH (agonista: acetato de leuprolide, LA; y antagonista: Antide, Ant), sobre el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. Previamente, hemos reportado una acción inhibitoria de LA sobre el desarrollo folicular, mediado por un aumento de la apoptosis. **Métodos:** Ratas hembra prepúberes superovuladas con PMSG (grupo Control) se trataron con LA (1µg/rata/día durante 48 hs) (grupo LA) y/o Ant (10 µg/rata/día durante 48 hs) (Grupo LA+Ant; Grupo Ant, respectivamente). **Resultados:** Se realizó un recuento de folículos en cortes histológicos. El LA aumentó el número de folículos preantrales (FP) y atrésicos (FAT); (FP=C: 3,41 $\pm$ 0,35, LA: 8,08 $\pm$ 0,97; FAT=C: 1 $\pm$ 0,2; LA: 4,7 $\pm$ 0,35;  $p < 0,05$ ). En cambio, el número de folículos antrales (Fant.T) y folículos preovulatorios (FPO) disminuyó (Fant.T=C: 17,25 $\pm$ 1,29, LA 8,16 $\pm$ 1,43; FPO=C: 6,58 $\pm$ 0,63, LA: 2,91 $\pm$ 0,39,  $p < 0,05$ ). En el grupo LA+Ant aumentó el número de Fant.T y FPO (Fant.T=LA+Ant: 20,02 $\pm$ 3,28, LA 8,16 $\pm$ 1,43; FPO=LA+Ant: 17,75 $\pm$ 2,36, LA: 2,91 $\pm$ 0,39,  $p < 0,05$ ) y disminuyó el número de FP y FAT comparado al grupo LA solo (FP=LA+Ant: 4,83 $\pm$ 0,53, LA 8,08 $\pm$ 0,97; FAT=LA+Ant: 0,66 $\pm$ 0,2, LA: 2,91 $\pm$ 0,39,  $p < 0,05$ ). LA causó un aumento en el % de células apoptóticas medidas en cortes de ovario en FP, Fant.T y FPO. En cambio, el tratamiento con ambos análogos disminuyó el % de células apoptóticas en todos los estadios estudiados comparado al grupo LA (FP=LA+Ant: 5,54 $\pm$ 0,66, LA 44,8 $\pm$ 3,1; Fant.T=LA+Ant: 6,72 $\pm$ 1,19, LA: 31 $\pm$ 2,5; FPO=LA+Ant: 7,09 $\pm$ 1,3, LA 31 $\pm$ 3,3,  $p < 0,05$ ). El LA aumentó la fragmentación apoptótica de ADN luego de cultivar folículos preovulatorios durante 24 hs (Control: 659 $\pm$ 25 ; LA: 1706 $\pm$ 94,  $p < 0,05$ ) y en el grupo LA+Ant, el ADN apoptótico disminuyó (LA: 1706 $\pm$ 94, Ant+LA: 841 $\pm$ 241,  $p < 0,05$ ). Estos resultados corroboran los datos obtenidos en los estudios morfológicos. **Conclusión:** se sugiere una acción directa de LA sobre el ovario, interfiriendo en el desarrollo folicular estimulado por las gonadotropinas. El Ant bloquearía la acción del agonista, confirmando que el efecto de LA sobre el ovario sería a través de los receptores de GnRH presentes en este órgano.





*Supplement to*

Journal of the

Society for  
Gynecologic  
Investigation

305

**MATERNAL LOW PROTEIN DIET DURING PREGNANCY OR LACTATION DELAYS TESTICULAR DESCENT AND REDUCES FERTILITY IN MALE OFFSPRING.** G L Rodriguez-Gonzalez,<sup>1</sup> P M Martinez-Samaya,<sup>1</sup> P W Nathanielsz,<sup>2</sup> E Zambrano.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, SZ, Mexico, DF, Mexico; <sup>2</sup>Center for Women's Health Research, Dept. Ob/Gyn, NYU School of Medicine, New York, NY.

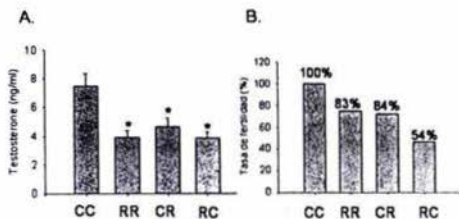
**INTRODUCTION:** Studies in sheep show that undernutrition during development can reduce lifetime reproductive capacity of progeny. However little is known about effects of a suboptimal intrauterine environment on specific components of sexual development.

**OBJECTIVE:** The present study evaluated effects of a low protein isocaloric diet during pregnancy (P) and/or lactation (L) on sexual development and reproductive capacity in male progeny.

**METHODS:** Pregnant rats were assigned to control (CC) (C=20% casein) or restricted (RR) (R=10% casein); isocaloric diet in P and L. Other groups were assigned C and R diet in P and L respectively (CR) or R in P and C in L (RC) - 5 - 7 litters per group. After weaning (d21 postnatal - dPN), all pups ate C diet. Testis descent was recorded as a sexual development marker. Testosterone (T) levels were obtained at 90 dPN. Fertility rate was determined as percentage of pregnancies by placing males with females for 5 d at 90dPN and 270dPN. Data mean±SEM, Analysis by ANOVA; significance set p<0.05.

**RESULTS:** Testes descent was delayed in all restricted groups (CC = 23.4±0.2, RR = 27.8±0.3, CR = 27.5 ±0.2 and RC = 25.5±0.5; p<0.05). Fertility rate was unaffected at 90 dPN but was reduced at 270 dPN in all R groups vs. C.T was lower (p<0.05) in RR, CR and RC (Fig 1).

**CONCLUSIONS:** Maternal undernutrition at early stage of development impairs reproductive function in male progeny.



**Figure 1.** Testosterone at 90 dPN (A) and fertility rate at 270 dPN (B) in male progeny of undernourished rats exposed to different diets as described in text. Mean±SEM. \* = different from CC, p< 0.05.

306

**EFFECTS OF HORMONAL CONTRACEPTION ON BONE MINERAL DENSITY AFTER 24 MONTHS OF USE.** Abbey B Berenson,<sup>1</sup> Carmen R Breitkopf,<sup>1</sup> James J Grady,<sup>2</sup> Vaughn I Rickert,<sup>1</sup> Angelyn Thomas.<sup>3</sup> <sup>1</sup>Obstetrics and Gynecology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX; <sup>2</sup>Preventive Medicine and Community Health, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX; <sup>3</sup>Obstetrics and Gynecology, Wilford Hall Medical Center, San Antonio, TX.

**Objective:** To measure the effect of 24 months of depo-medroxyprogesterone acetate (DMPA) use on bone mineral density (BMD) compared with oral contraception (pills) and nonhormonal contraception.

**Methods:** Women 18-33 years of age self-selected oral contraception, DMPA, or nonhormonal contraception (controls). Those selecting pills were randomized to formulations containing either 35 µg ethinyl estradiol and norethindrone or 30 µg ethinyl estradiol and desogestrel. Controls were frequency matched on age and race/ethnicity to hormonal contraception users. Dual-energy x-ray absorptiometry of the lumbar spine (L1-L4) was performed at baseline, 12, and 24 months. Percent change in BMD was analyzed using analysis of covariance, adjusting for age, race/ethnicity, weight-bearing exercise, calcium intake, smoking status, and BMI.

**Results:** Of the 191 women comprising the final sample, 86 used pills, 47 used DMPA, and 58 used non-hormonal contraception. Women using

DMPA for 24 months experienced, on average, a 5.7% loss in BMD, with a 3.2% loss occurring between months 12 and 24. On average, users of desogestrel pills experienced a 2.6% loss in BMD after 24 months. Bonferroni-adjusted pairwise comparisons demonstrated that BMD changes from baseline to 24 months among DMPA users differed significantly from changes experienced by either of the pill groups or the control group. Changes in BMD among users of either pill did not significantly differ from each other or from controls.

**Conclusion:** Loss of BMD associated with DMPA use appears to be linear during the first two years of use. Shifts in BMD among pill users were not significant when compared to controls.

Adjusted\* mean percent change BMD and 95% Confidence Intervals (CI) by Method

Interval	Mean % Change BMD	95% CI
<b>Baseline to 12-months</b>		
Norethindrone pill	+2.12	+0.30, +3.93
Desogestrel pill	+0.17	-1.56, +1.90
DMPA	-2.77	-4.50, -1.05
Control	-0.44	-2.06, +1.16
<b>Months 12 to 24</b>		
Norethindrone pill	-1.99	-4.27, +0.28
Desogestrel pill	-2.21	-4.01, -0.41
DMPA	-3.24	-5.37, -1.12
Control	+2.64	+0.75, +4.52
<b>Baseline to 24-months</b>		
Norethindrone pill	-1.53	-3.80, +0.73
Desogestrel pill	-2.57	-4.63, -0.51
DMPA	-5.74	-7.90, -3.57
Control	+1.80	-0.33, +3.92

\*Adjusted for age, race/ethnicity, weight bearing exercise, calcium intake, smoking status, and BMI.

Pairwise Differences in Percent Change BMD from Baseline to 24 Months

Methods Compared	Mean Difference	95% CI
DMPA-Control	-5.94	-7.98, -3.90*
DMPA-Norethindrone pill	-5.27	-7.61, -2.93*
DMPA-Desogestrel pill	-4.43	-6.49, -2.37*
Control-Desogestrel pill	1.51	-0.40, 3.42
Control-Norethindrone pill	0.67	-1.54, 2.88
Norethindrone pill-Desogestrel pill	0.84	-1.39, 3.07

\*Bonferroni adjusted t-test significant at P<0.05

## Thursday, March 25, 2004 - Concurrent Session I

1:45 p.m.-3:45 p.m.

Concurrent Session I

## BASIC PARTURITION I

Galleria III

*R. Ann Word and Phil Bennett*

- 1:45  
#293 **LABOUR ASSOCIATED CHANGES IN TREM (TRIGGERING RECEPTOR EXPRESSED ON MYELOID CELLS) EXPRESSION IN THE HUMAN CERVIX AND MYOMETRIUM.**  
Marie Anne Ledingham, Fiona Jordan, Anne Young, Andrew J Thomson and Jane E Norman. Glasgow, Scotland, United Kingdom and Paisley, Scotland, United Kingdom.
- 2:00  
#294 **RECIPROCAL CHANGES IN PROGESTERONE RECEPTOR AND ACTIVATED NUCLEAR FACTOR  $\kappa$  B WITHIN TERM AND PRETERM FETAL MEMBRANES.**  
Jennifer AZ Loudon, Frank A Hills, Mark Sullivan and Phillip R Bennett. London, United Kingdom.
- 2:15  
#295 **DELAY OF PRETERM BIRTH IN SHEEP BY THG113.31, A PROSTAGLANDIN (PG)<sub>F<sub>2a</sub></sub> RECEPTOR (FP) ANTAGONIST: ELECTROMYOGRAPHIC ACTIVITY (EMG), BLOOD GASES, AND PGs.**  
Jonathan J Hirst, I Ross Young, Hannah K Palliser, Krishna G Peri, Dean B Zaragoza and David M Olson. Clayton, VIC, Australia; Montreal, QC, Canada and Edmonton, AB, Canada.
- 2:30  
#296 **IDENTIFICATION OF A NOVEL REPRESSOR OF THE PROGESTERONE RECEPTOR WHICH IS EXPRESSED IN THE MYOMETRIUM DURING LABOUR AND MAY CONTRIBUTE TO A FUNCTIONAL WITHDRAWAL OF PROGESTERONE.**  
Xuesen Dong, Oksana Shynlova, John RG Charlis and Stephen J Lye. Toronto, ON, Canada.
- 2:45  
#297 **SPATIAL REGULATION OF 20 $\alpha$ -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE ACTIVITY AND PROGESTERONE RECEPTOR (PR) EXPRESSION IN THE MYOMETRIUM OF WOMEN IN LABOR.**  
Daniel B Hardy, Jennifer C Condon and Carole R Mendelson. Dallas, TX.
- 3:00  
#298 **COMPARISON OF TWO TYPES OF NON-SELECTIVE CATION CHANNELS IN MYOMETRIAL CELLS FROM PREGNANT RAT AND EFFECTS OF TOCOLYTIC AGENTS.**  
Hiroshi Miyoshi, Robert E Garfield and Koso Ohama. Hiroshima, Hiroshima, Japan and Galveston, TX.
- 3:15  
#299 **PARACRINE REGULATION OF HUMAN UTERINE QUIESCENCE BY FETAL MEMBRANES.**  
Jorge A Carvajal, Rossana X Vidal, Mauricio A Cuello, Jose A Pobleto and Carl P Weiner. Santiago, RM, Chile and Baltimore, MD.

3:30  
#35**EXPRESSION OF cPLA<sub>2</sub>, PGES-1 AND PGES-2 BEFORE AND AFTER MECHANICAL STRETCH OF CULTURED HUMAN UTERINE MYOCYTES.**

Suren R Sobranna, Kang Sun, Phillip R Bennett, Leslie Myatt and Mark R Johnson. London, United Kingdom and Cincinnati, OH, USA.

1:45 p.m.-3:45 p.m.

Concurrent Session I

## CLINICAL REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY AND INFERTILITY I

Galleria IV

*Robert Taylor and Peter McGovern*

- 1:45  
#301 **SILDENAFIL (VIAGRA®) RESTORES ENDOMETRIAL PERFUSION IN WOMEN WITH UNEXPLAINED SUBFERTILITY.**  
Nick J Raine-Fenning, Bruce K Campbell, Jeanette S Clewes, Nigel R Kendall and Ian R Johnson. Nottingham, Nottinghamshire, United Kingdom.
- 2:00  
#302 **METFORMIN DOES NOT ALTER INSULIN ACTION, ANDROGEN PRODUCTION, OR INDUCE OVULATION IN OBESE WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME.**  
Harry Lieman, Mira Aubuchon, Daniel Stein, Hillel Cohen, Barbara Isaac, Maggie Tetrokashvili and Nanette Santoro. Bronx, NY.
- 2:15  
#303 **THE RELATIONSHIP BETWEEN MATERNAL THYROID HORMONE CONCENTRATIONS IN THE ANTENATAL PERIOD AND NEWBORN GROWTH MEASUREMENTS: A COHORT STUDY.**  
Mark D Kilby, Jayne A Franklyn, Penelope Clark, Michael Geary, Charles Rodeck and Peter Hindmarsh. Birmingham, West Midlands, United Kingdom; Dublin, Ireland and London, United Kingdom.
- 2:30  
#304 **THE HERITABILITY OF ENDOMETRIOSIS: INSIGHTS FROM A LARGE POPULATION DATABASE.**  
Kenneth Ward, Pamela F Farrington, Mary Meade, Dale Hull and Lesa Nelson. Honolulu, HI and Salt Lake City, UT.
- 2:45  
#305 **MATERNAL LOW PROTEIN DIET DURING PREGNANCY OR LACTATION DELAYS TESTICULAR DESCENT AND REDUCES FERTILITY IN MALE OFFSPRING.**  
G L Rodriguez-Gonzalez, P M Martinez-Samayoa, P W Nathanielsz and E Zambrano. Mexico, DF, Mexico and New York, NY.

## A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development

E. Zambrano<sup>1</sup>, G. L. Rodríguez-González<sup>1</sup>, C. Guzmán<sup>1</sup>, R. García-Becerra<sup>1</sup>, L. Boeck<sup>1</sup>, L. Díaz<sup>1</sup>, M. Menjivar<sup>2</sup>, F. Larrea<sup>1</sup> and P. W. Nathanielsz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 14000, México, DF México

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, México, DF México

<sup>3</sup>Center for Pregnancy and Newborn Research, University of Texas Health Sciences Center San Antonio, TX 78229, USA

**Nutrient restriction during pregnancy and lactation impairs growth and development.** Recent studies demonstrate long-term programming of function of specific organ systems resulting from suboptimal environments during fetal life and development up to weaning. We determined effects of maternal protein restriction (50% control protein intake) during fetal development and/or lactation in rats on the reproductive system of male progeny. Rats were fed either a control 20% casein diet (C) or a restricted diet (R) of 10% casein during pregnancy. After delivery mothers received either C or R diet until weaning to provide four groups: CC, RR, CR and RC. We report findings in male offspring only. Maternal protein restriction increased maternal serum corticosterone, oestradiol and testosterone (T) concentrations at 19 days gestation. Pup birth weight was unchanged but ano-genital distance was increased by maternal protein restriction ( $P < 0.05$ ). Testicular descent was delayed 4.4 days in RR, 2.1 days in CR and 2.2 days in RC and was not related to body weight. Body weight and testis weight were reduced in RR and CR groups at all ages with the exception of CR testis weight at 270 days postnatal age (PN). At 70 days PN luteinizing hormone and T concentrations were reduced in RR, CR and RC. mRNA for P450<sub>scc</sub> was reduced in RR and CR at 21 days PN but was unchanged at 70 days PN. Fertility rate was reduced at 270 days PN in RC and sperm count in RR and RC. We conclude that maternal protein delays sexual maturation in male rats and that some effects only emerge in later life.

Q1

(Resubmitted 4 November 2004; accepted after revision 14 December 2004; first published online 20 December 2004)

**Corresponding author E. Zambrano:** Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 14000, México, DF México. Email: zamgon@laneta.apc.org

Nutrient restriction during pregnancy and lactation impairs overall fetal growth and development. Investigations in several species of rodent and sheep have demonstrated long-term developmental programming of the function of specific organ systems as a result of fetal and neonatal exposure to a suboptimal environment (Hoet & Hanson, 1999). A variety of nutrient restriction protocols have been evaluated. In the several protein restriction models studied birth weight is usually lowered (Galler & Tonkiss, 1991; Langley & Jackson, 1994; Holemans *et al.* 1999; Vickers *et al.* 2001a,b; Woods *et al.* 2001). However, some studies report an increase in birth weight (Langley-Evans *et al.* 1996) or no effect (Langley & Jackson, 1994) resulting from maternal protein restriction. Birth weight is, however, a crude indicator of the degree of developmental compromise since, when challenged by adverse circumstances, developing mammals will recruit adaptive mechanisms to protect growth, especially

of vital organs, during development (Cohn *et al.* 1974).

The majority of studies of developmental programming by maternal dietary restriction have investigated the cardiovascular system. Adult offspring of dams fed a 50% reduced protein diet showed elevated blood pressure (Sherman & Langley-Evans, 2000), but no elevation of blood pressure was found with a 33% reduction in protein (Langley *et al.* 1994). Protein restriction during development impairs vascular endothelial function in adult offspring (Brawley *et al.* 2003; Torrens *et al.* 2003).

Although a few reports in the sheep and rat clearly indicate impaired male sexual development, most of the data available on the effects of sub-optimal nutrition during development on reproductive function relate to the female (Gunn & Hunter, 1995; Engelbregt *et al.* 2000; Alejandro *et al.* 2002; Rae *et al.* 2002; Leonhardt *et al.*

Q2

Table 1. Composition of the two isocaloric diets

	Control diet (%)	Restricted diet (%)
Casein	20	10
Cystine	0.3	0.15
Choline	0.165	0.165
Vitamin mix	1	1
Mineral mix	5	5
Cellulose	5	5
Corn oil	5	5
Carbohydrates		
Corn starch	31.76	37.34
Dextrose	31.76	31.76

Q3 Both diets were 4 Kcal/g<sup>1</sup>.

2003). We know of no data in rat models of protein restriction or any other challenge that addresses the issue of developmental programming of male fertility. In this study we evaluated effects of a low protein diet fed to rats during pregnancy and/or lactation on the development of the male reproductive system. To evaluate whether some of the consequences of exposure to a sub-optimal diet are not apparent in early postnatal life but take time to emerge, we followed the offspring for 270 days. We demonstrated delayed development of the male reproductive system and decreased fertility that emerged after 70 days of life.

## Methods

### Care and maintenance of animals

Seventy virgin female albino Wistar rats aged 10–12 weeks, weighing  $220 \pm 20$  g (mean  $\pm$  s.e.m.) were obtained from the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Mexico City, Mexico). Rats were maintained under controlled lighting (lights on from 07.00 to 19.00 h) at 22–23°C. Prior to breeding, male and female rats were maintained on Purina Laboratory Chow 5001. All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Mexico City.

Female rats were mated overnight with proven male breeders and the day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as day of conception – day 0. Only rats that were pregnant within 5 days of introduction of the male were retained in the study. Pregnant rats were transferred to individual metabolism cages and allocated at random to one of two groups to be fed either a 20% casein (control diet) or a 10% casein isocaloric (restricted) diet (Table 1). The diets were the same as those used extensively by other investigators except for the substitution of corn oil (Gloria, Corfuerte,

S.A. de C.V., Mexico City) for soy (Reeves *et al.* 1993). In addition, we followed the American Institute of Nutrition's recommendation to supplement low protein diets with L-cystine (Sigma). Supplementation was proportional to the protein in the diet to ensure that the protein restriction was equivalent for all amino acids (Reeves *et al.* 1993). Thus the control diet contained 0.30% cystine and the protein-restricted diet 0.15% cystine (Table 1). Food and water were available *ad libitum* for all animals.

Pregnant and lactating rats were weighed every day throughout pregnancy and until the pups were removed at weaning. Food was provided in the form of large flat biscuits which were retained behind a grill through which the rats nibbled the food. The amount of food provided each day was weighed as was the amount remaining after 24 h. On day 20 post-conception, pregnant rats were transferred to normal rat cages to provide optimal conditions for delivery. Delivery occurred in the early daylight hours between 09.00 and 12.00 h on post-conceptual day 22. Day of delivery was considered as day 0.

**Experiment 1.** A group of 30 pregnant rats (13 controls and 17 protein-restricted mothers assigned at random) were studied for maternal and neonatal hormonal measurements. At 19 days gestation between 09.00 and 10.00 h, pregnant rats were bled from the tail vein while restrained in a small Plexiglass tube. Blood was collected into polyethylene tubes, allowed to clot at 4°C for 1 h, centrifuged at 3500 g for 15 min at 4°C and serum was stored at –30°C until assayed. Rats were then allowed to deliver vaginally. Pup weight was recorded at birth. Ano-genital distance was measured with calipers to enable determination of sex. To ensure homogeneity of study subjects, litters of over 14, or less than 12 pups, were excluded from the study. On day 1, litters of 12–14 pups were adjusted to 12 pups for each dam while maintaining as close to a 1:1 sex ratio as possible. Mothers maintained their pups for 2 days postnatally on the diets they ate during pregnancy. On day 2 of postnatal life pups were rapidly killed by decapitation between 09.00 and 10.00 h. Trunk blood was collected and processed as described above.

**Experiment 2.** Twenty control pregnant rats and 20 protein-restricted pregnant rats underwent spontaneous vaginal delivery. Litter size and sex ratio was as in Experiment 1. After removal of five control litters (2 with less than 12 pups and 3 with more than 14) and six protein-restricted litters (3 with less than 12 pups and 3 with more than 14) from the study, pups from 23 of the remaining 29 mothers were used in the study. Four groups of pups were established: CC ( $n=5$ ) in which dams who received the control diet during pregnancy continued to be fed the control diet during lactation; RR

( $n=5$ ) in which dams who had received the restricted diet during pregnancy continued to receive the restricted diet during lactation; CR ( $n=6$ ) in which dams who received the control diet during pregnancy received the restricted diet during lactation; and RC ( $n=7$ ) in which dams who received the restricted diet during pregnancy were provided with the control diet during lactation. The other six litters were used in a separate study.

#### Postnatal maintenance

After weaning (postnatal day 21) all pups were fed with control diet *ad libitum* and maintained in groups of up to six until puberty. As the pups grew they were separated into groups of three to four. The pups were weighed daily and examined for completed testicular descent and preputial separation.

Between 09.00 and 10.00 h on days on which blood was sampled, rats were rapidly killed by decapitation by experienced personnel trained in the procedure using a rodent guillotine (Thomas Scientific, USA). Trunk blood was collected and processed as above. Testes were dissected and cleaned of fat and weighed.

#### Evaluation of reproductive function

**Fertility of the male offspring.** Female rats with regular cycles were maintained on Purina Laboratory Chow 5001. To ensure that males and females received the same diet during the evaluation of fertility, females were placed on the control diet (Table 1) 1 week before being placed with the males. Females were mated individually for 5 days with adult male offspring at two different ages, 70–90 and 270 days old. Results were expressed as a percentage of female rats per group that became pregnant and reached 15 days gestation. Pregnant rats were then entered in another study.

**Sperm count.** The epididymis was removed and cleaned of tissue and weighed. The tail of the epididymis was cut, weighed and dissociated with scissors in 1 ml of Ham's medium. Sperm count was performed in a Neubauer chamber in duplicate after dilution to 1:20 in Ham's medium.

**RNA isolation.** Total RNA was isolated from the tissues as previously described (Chomczynski & Sacchi, 1987). Briefly, whole testes were homogenized in guanidinium isothiocyanate (Trizol) buffer. The phenol-chloroform-extracted RNA was quantified on a spectrometer at a wavelength of 260 nm. Twenty micrograms of total RNA were electrophoresed on a 1.2%

agarose-formaldehyde gel under denaturing conditions and transferred to nylon membranes.

**Northern blot analysis.** Effects of maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation on P450scc mRNA expression in the offspring testes were analysed by Northern blot. Briefly, denatured RNA samples (20  $\mu$ g) were subjected to 1.2% agarose gel electrophoresis in the presence of formaldehyde and transferred overnight by capillary blotting to a Zeta-Probe membrane (Bio-Rad). The RNA was fixed by UV cross-linking (Gene Cross-Linker; Bio-Rad) to the membrane. The blot was hybridized with a specific P450scc probe labelled with [<sup>32</sup>P]-dCTP, at 65°C for 16 h.

The rat P450scc cDNA probe was generated as an RT-PCR product (310 bp) obtained using two sets of oligonucleotide primers: sense 5'-ATGCTGGCAAAAAGTCTTTGC-3' and antisense 5'-CCTGTAATGGGGCCATACTT-3'. Numbering of the nucleotide base position for the P450scc gene was taken from GenBank profile accession number J05156 (rat P450scc mRNA).

The relative abundance of P450scc mRNA was determined by scanning the optical density of the corresponding signal on the autoradiographic film with the Bioimaging Systems software (LabWork version 4.5, UVP, Inc. Upland, CA, USA). 28S rRNA optical density was determined in the ethidium bromide-stained gel for each RNA sample, the ratio of P450scc mRNA signal to 28S rRNA signal was calculated, and group means were obtained.

#### Radioimmunoassays (RIAs)

Serum follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) concentrations were determined by double-antibody RIA using hormone standards and specific anti-rat LH antibodies from the National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases. Rat FSH and LH were iodinated by the chloramine-T method, following separation of protein-bound and free [<sup>125</sup>I] by Sephadex G-100. Results were expressed in terms of NIDDK-rat-FSH-RP2 and NIDDK-rat-LH-RP3. The intra- and interassay coefficients of variations were < 5 and < 8% for FSH and < 7 and < 9% for LH.

Serum corticosterone, testosterone and oestradiol concentrations were determined by RIA using commercial rat kits, DPC Coat-a-count (TKRC1, TKTT1 and TKE21, respectively) from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). Intra- and interassay variabilities were < 6 and < 7%, < 5 and < 9% and < 6 and < 10% for corticosterone, testosterone and oestradiol, respectively.

Table 2. Details of mothers studied

Mother	Control	Restricted	CC	RR	CR	RC
Maternal body weight (g) at 20 days of gestation	387.77 ± 11.57 <i>n</i> = 14	353.07 ± 24.84 <i>n</i> = 14	380.79 ± 9.63 <i>n</i> = 5	347.02 ± 16.22 <i>n</i> = 5	394.75 ± 13.51 <i>n</i> = 9	359.12 ± 33.46 <i>n</i> = 9
Maternal body weight (g) at 10 days of lactation	— <i>n</i> = 5	— <i>n</i> = 5	297.6 ± 3.286 <i>n</i> = 9	266.24 ± 9.22* <i>n</i> = 9	292.18 ± 16.03	307.7 ± 5.76
Maternal food intake (g) at 20 days of gestation	19.01 ± 2.49 <i>n</i> = 14	22.46 ± 2.73 <i>n</i> = 14	18.377 ± 2.88 <i>n</i> = 5	22.012 ± 1.91 <i>n</i> = 5	19.76 ± 2.11 <i>n</i> = 9	22.9 ± 3.55 <i>n</i> = 9
Maternal food intake (g) at 10 days of lactation	—	—	63.39 ± 2.50 <i>n</i> = 5	48.95 ± 2.84* <i>n</i> = 5	43.06 ± 1.52* <i>n</i> = 9	62.87 ± 1.11 <i>n</i> = 9

\*\*Different from RC, \*different from CC, *P* < 0.05.

### Statistical analysis

When samples or data from more than one offspring from a litter were obtained, the data were averaged. All 'n' numbers refer to litters not individual animals. All data are presented as mean ± s.e.m. Statistical analysis was performed using multiple analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. Unpaired Student's *t* test and  $\chi^2$  test were also used when appropriate; *P* = 0.05 was considered significant.

## Results

### Maternal body weight and food intake

Maternal body weight at 10 days lactation was decreased in RR (*P* < 0.05; Table 2). Maternal food intake was not significantly altered by protein restriction during pregnancy but was lower at 10 days post-delivery in groups restricted in lactation (Table 2).

### Maternal endocrinology

At 19 days of gestation maternal corticosterone, testosterone and oestradiol were elevated in the protein-restricted mothers (Fig. 1).

### Neonatal body weight and ano-genital distance

There was no effect of diet on birth weight of the male pups. Pups of mothers fed the control diet weighed 6.33 ± 0.09 g and of restricted mothers 6.19 ± 0.11 g. However, ano-genital distance was increased by 12% as an absolute measure and 13% relative to body weight (*P* < 0.05; Fig. 2).

### Neonatal endocrinology

At 2 days postnatal age serum corticosterone in male pups of mothers fed the control diet was 167 ± 27.4 ng ml<sup>-1</sup>

and 85 ± 3.1 ng ml<sup>-1</sup> in pups of protein-restricted mothers (*P* < 0.05).

### Postnatal growth, timing of testicular descent, preputial separation and changes in testicular weight

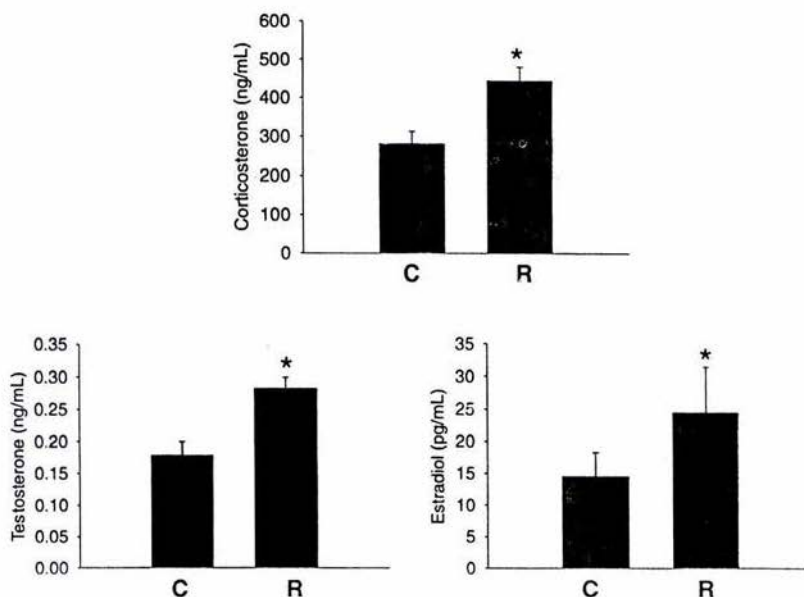
Table 3 shows the body weights of the four groups of offspring at 25, 70 and 270 days PN. The body weight of RR and CR were significantly lower than the CC controls and the RC group at 25 and 70 days. At 270 days RR was 13% and CR 16% less than the CC group (*P* < 0.05).

The testes completed their descent into the scrotal sac 4.4, 2.1 and 2.2 days later than the CC group in RR, CR and RC, respectively (Table 3, *P* < 0.05 for all 3 groups compared with controls). Timing of preputial separation did not differ between groups (Table 3). Pup body weight on the day of testicular descent was decreased by 9% in RR (*P* > 0.05) and 12% in CR (*P* < 0.05). Body weight at time of preputial separation was lower in RR and CR (*P* < 0.05).

At 25 and 70 days of age testicular weight was reduced in the two groups restricted during lactation (Table 4). At 270 days testis weight was reduced by 11% in RR and 6% in CR and RC but only the difference between RR and CC was significant. When expressed relative to body weight the only significant difference from CC was the relative testis weight in the CR group at 70 days (*P* < 0.05).

### Endocrine-related changes at 21 and 70 days postnatal age

At 21 days PN, testosterone levels were 0.41 ± 0.01 ng ml<sup>-1</sup> (*n* = 5), 0.24 ± 0.06 ng ml<sup>-1</sup> (*n* = 4), 0.34 ± 0.07 ng ml<sup>-1</sup> (*n* = 6) and 0.53 ± 0.07 ng ml<sup>-1</sup> (*n* = 6) in CC, RR, CR and RC groups, respectively. There was a tendency for lower levels in the two groups whose mothers were

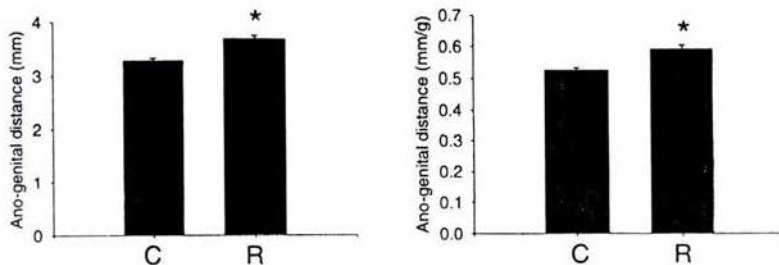


**Figure 1. Maternal serum corticosterone, testosterone and oestradiol in control and nutrient-restricted mothers**

Maternal serum (mean  $\pm$  s.e.m.) corticosterone ( $\text{ng ml}^{-1}$ ), testosterone ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) and oestradiol ( $\text{pg ml}^{-1}$ ) in control mothers fed the 20% casein diet (C;  $n = 10$ ) and nutrient-restricted mothers (R;  $n = 10$ ) fed the 10% casein diet; \* $P < 0.05$ .

restricted in lactation and levels in RR were lower than RC ( $P < 0.05$ ). At 70 days PN serum LH was depressed in all three restricted groups compared with controls (Fig. 3). Testosterone demonstrated a similar pattern (Fig. 3). FSH

levels did not differ between groups at 70 days. At 21 days old P450 sc mRNA was decreased in RR and CR ( $P < 0.05$ ) but this difference did not persist to 70 days (Fig. 4).



**Figure 2. Ano-genital distance of male offspring of rats fed control or restricted diet**

Ano-genital distance (mm), and ano-genital distance as  $\text{mm g}^{-1}$  of body weight at birth of male offspring of rats fed control (C – 20% casein) or restricted (R – 10% casein) diet during pregnancy. Mean  $\pm$  s.e.m.,  $n = 10$ –14 litters; \* $P < 0.01$ .



**Table 3. Detail of male offspring studied**

Male pups	CC	RR	CR	RC
Offspring body weight (g) at 25 days	59.87 ± 2.3 <i>n</i> = 5	43.5 ± 2.14* <i>n</i> = 5	43.75 ± 2.14* <i>n</i> = 5	61.50 ± 2.62 <i>n</i> = 5
Offspring body weight (g) at 70 days	372.1 ± 8.1 <i>n</i> = 5	329.7 ± 9.9* <i>n</i> = 5	294.6 ± 5.6* <i>n</i> = 6	362.4 ± 6.8 <i>n</i> = 7
Offspring body weight (g) at 270 days	485.6 ± 19.1 <i>n</i> = 4	423 ± 13.5* <i>n</i> = 4	407.8 ± 16.9* <i>n</i> = 5	476.9 ± 24.3 <i>n</i> = 5
Testis descent (days)	23.4 ± 0.19 <i>n</i> = 5	27.8 ± 0.29* <i>n</i> = 4	25.5 ± 0.22* <i>n</i> = 5	25.6 ± 0.54* <i>n</i> = 4
Preputial separation (days)	41.6 ± 0.89 <i>n</i> = 5	44.8 ± 0.89 <i>n</i> = 4	43.4 ± 0.82 <i>n</i> = 5	41.5 ± 0.2 <i>n</i> = 4
Pup weight (g) at testicular descent	56.3 ± 1.8 <i>n</i> = 5	51.2 ± 1.1 <i>n</i> = 4	49.5 ± 1.4* <i>n</i> = 5	59.9 ± 1.8 <i>n</i> = 4
Pup weight (g) at preputial separation	173.4 ± 3.9 <i>n</i> = 5	152.4 ± 4.1* <i>n</i> = 4	152.5 ± 5.5* <i>n</i> = 5	174.6 ± 5.1 <i>n</i> = 4

\*Different from CC, *P* < 0.05.**Table 4. Testis weight in grams and relative to body weight (%) in the four groups of male offspring at 25, 70 and 270 days of postnatal life of rats fed with control (C – 20% casein) or restricted (R – 10% casein) diet during pregnancy (first letter) and lactation (second letter)**

Groups	CC	RR	CR	RC
Testis weight (g) at 25 days	0.188 ± 0.02 <i>n</i> = 5	0.12 ± 0.01* <i>n</i> = 5	0.14 ± 0.01* <i>n</i> = 5	0.185 ± 0.01 <i>n</i> = 5
Relative to body wt (%) at 25 days	0.316 ± 0.03 <i>n</i> = 5	0.275 ± 0.02 <i>n</i> = 5	0.310 ± 0.02 <i>n</i> = 5	0.300 ± 0.01 <i>n</i> = 5
Testis weight (g) at 70 days	1.53 ± 0.04 <i>n</i> = 5	1.33 ± 0.09* <i>n</i> = 5	1.37 ± 0.02* <i>n</i> = 6	1.48 ± 0.02 <i>n</i> = 7
Relative to body wt (%) at 70 days	0.412 ± 0.01 <i>n</i> = 5	0.405 ± 0.11 <i>n</i> = 5	0.465 ± 0.007* <i>n</i> = 6	0.410 ± 0.009 <i>n</i> = 7
Testis weight (g) at 270 days	1.67 ± 0.03 <i>n</i> = 4	1.49 ± 0.04* <i>n</i> = 4	1.58 ± 0.02 <i>n</i> = 5	1.56 ± 0.06 <i>n</i> = 5
Relative to body wt (%) at 270 days	0.346 ± 0.01 <i>n</i> = 4	0.353 ± 0.01 <i>n</i> = 4	0.392 ± 0.02 <i>n</i> = 5	0.331 ± 0.02 <i>n</i> = 5

Mean ± s.e.m., *n* refers to litters. \*Different from CC, *P* < 0.001.

### Sperm count and fertility

Fertility rates were not different at 70 days of age but by 270 days, fertility had dropped by 50% in RC (Table 5; *P* < 0.05). Sperm count at this age was decreased in RR and RC (Table 5; *P* < 0.05).

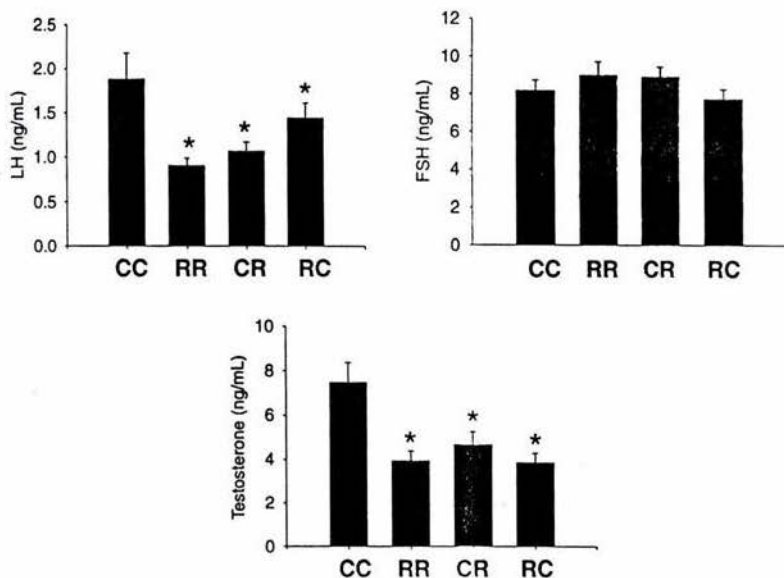
### Discussion

#### Considerations of different protocols used to study programming following challenges in pregnancy and lactation

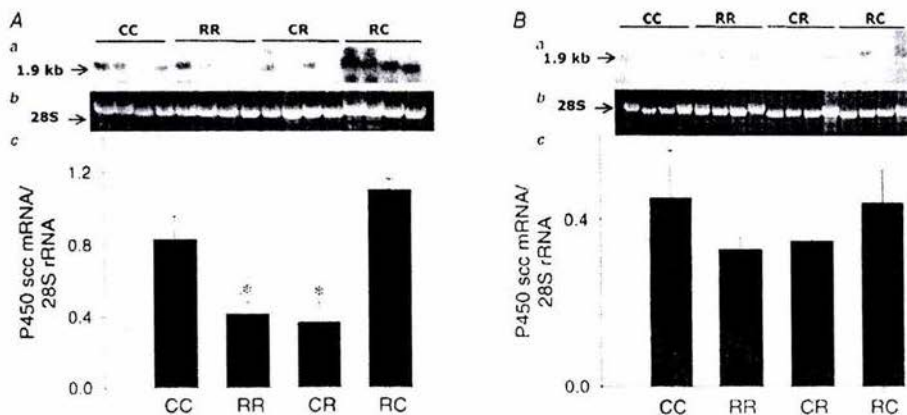
Our study was designed to determine separate and combined effects of protein restriction during the

time windows of pregnancy and lactation. Although cross-fostering to non-biological mothers results in immediate exposure to the challenge under study, interpretation of this procedure must take into account considerations of immune and other differences compared with rearing by the biological mother. Keeping pups with their biological mother answers questions more directly relevant to human situations since future therapies to reverse effects of prenatal exposures will involve maintaining babies with their biological mother.

A major question in relation to protein restriction studies is the extent to which altered phenotypes are due to global protein restriction as distinct from deficiencies in individual micronutrients. We evaluated effects of an isocaloric, 50% protein diet on growth and sexual



**Figure 3.** LH, FSH and testosterone serum concentrations at 70 days postnatal age in male offspring of rats fed with control (C – 20% casein) or restricted (R – 10% casein) diet during pregnancy (first letter) and lactation (second letter). Mean  $\pm$  s.e.m.,  $n = 4$  litters; \*different from CC,  $P < 0.01$ .



**Figure 4.** Northern blot analysis of testis mRNA at 21 days (A) and 70 days (B) postnatal age. Aa, P450scc mRNA, b, 28S ribosomal RNA, c, relative abundance of mRNA P450scc/ribosomal 28S in testes at 21 (A) and 70 (B) days postnatal age in male offspring of rats fed with control (C – 20% casein diet) or restricted (R – 10% casein diet) during pregnancy (first letter) and lactation (second letter). Mean  $\pm$  s.e.m.,  $n = 4$  litters; \*different from CC,  $P < 0.01$ .

Table 5. Sperm count and fertility rates of male offspring studied

Male pups	CC	RR	CR	RC
Fertility rate at 70-90 days (%)	100 (10/10)	90 (9/10)	90 (9/10)	100 (10/10)
Fertility rate at 270 days (%)	100 (10/10)	83 (10/12)	77 (14/18)	50* (9/18)
Sperm count at 270 days (no. of sperm in tail $\times 10^6$ )	342.3 $\pm$ 17.6 <i>n</i> = 4	274.2 $\pm$ 10.8* <i>n</i> = 4	341 $\pm$ 19.1 <i>n</i> = 5	287 $\pm$ 14.4* <i>n</i> = 5

\*Different from CC,  $P < 0.05$ .

development of male rats. In our study, as in others, calories in the deficient diet were made up with carbohydrate. Thus protein-deprived mothers (and their fetuses) were exposed to a greater amount of carbohydrate which may act via effects on insulin and insulin-like growth factor production. We added cystine (as recommended by the American Nutrition Society) to the diets. To attain equivalence in cystine availability in proportion to overall protein, only half the amount of cystine was added to the protein-restricted diet compared with the control diet. The effects of the balance of amino acid availability in pregnancy are still poorly understood. For example, supplementation with glycine normalizes the hypertension seen in offspring exposed to some versions of 50% protein restriction (Jackson *et al.* 2002). Glycine supplementation also reverses the maternal endothelial dysfunction seen with the same diet (Brawley *et al.* 2004). Further studies, particularly of nutrient-dependent altered gene regulation will be necessary to provide a detailed explanation of the mechanisms involved. In this context, investigations need to address the varied diets consumed in different areas of the world. It is for this reason we used corn oil which is a major component of the diet in Mexico, rather than the soy used by other investigators (Reeves *et al.* 1993). Finally the effects of different fatty acid composition, especially different essential fatty acids, both their absolute amounts as well as the ratios, will need to be considered.

#### Effects on growth, sexual development and offspring endocrinology

The observed increase in ano-genital distance, an external marker of sexual differentiation at birth, following protein restriction in pregnancy in the absence of altered birth weight clearly indicates that normal birth weight can mask significant changes in key organ systems. Ano-genital distance is normally regulated by testosterone from the fetal testes and can be used as a marker of fetal exposure to endogenous fetal and transplacentally acquired maternal androgens (Graham & Gandelman, 1986). Since maternal steroids cross the placenta, the

increase in maternal androgen observed at 19 days gestation may contribute to the increased ano-genital distance in pups of restricted mothers. Increased maternal glucocorticoid levels have been related to delay and decreased function in development of the sexual organs of male offspring (Page *et al.* 2001). The elevation of maternal corticosterone in the dams subjected to protein restriction would be anticipated to depress the fetal pituitary adrenal axis. This is a likely explanation for the lowered concentration of corticosterone observed in the 2 day old offspring. Other investigators using maternal decapitation under general anaesthesia did not observe an increase in maternal corticosterone with an isocaloric, 60% protein reduction (Fernandez-Twinn *et al.* 2003). These differences could be due either to a stress-induced increase in maternal pituitary adrenal axis function in our study or suppression by general anaesthesia in the other.

Determining the timing of the onset of puberty by external examination is difficult in the male. Precise definition of puberty requires evaluation of circulating LH changes. Prenatal exposure of fetal sheep to androgens has been shown to have clear effects on the LH changes that accompany puberty (Sharma *et al.* 2002) but there are no studies that report puberty-related endocrine changes in male rats to challenges during fetal life and lactation. Testicular descent and preputial separation are markers of sexual development. In our study, testicular descent was delayed in all three restricted groups and age at descent was not related to body weight. Our data provide no clear mechanism for this delayed testicular descent. However, the tendency to a lower testosterone at 21 days is compatible with the role of testosterone in regulating testicular descent (Shono *et al.* 1999; Shono & Suita, 2003). The delay in preputial separation, approximately 3 days, was not significant. Both intrauterine nutrient restriction produced by uterine artery ligation and during lactation by increasing litter size to 20, delay preputial separation unrelated to body weight (Engelbregt *et al.* 2000). Similarly preputial separation is delayed in offspring of mothers receiving 50% of global intake consumed by control mothers (Leonhardt *et al.* 2003).

In the adult it is well recognized that nutrient restriction will decrease gonadotropin production (Clarke & Henry,

1999). In our study LH and testosterone concentrations were reduced at 70 days postnatal age in offspring exposed to protein restriction at any developmental period, evidence for decreased pituitary–gonadal axis activity. We could not observe any changes in FSH at 70 days. It should be noted that using the same antibody FSH was decreased at weaning in the study of Leonhardt *et al.* (2003).

#### Adult function of the testis, fertility rate and sperm counts

Our findings agree with the view that exposure to high concentrations of maternal corticosterone adversely affect pituitary–gonadal and adrenal function in offspring. Over-exposure to glucocorticoids during development diminishes adult reproductive capacity shown in behaviours such as frequency of copulation and ejaculation (Stylianopoulou, 1983). Male rats exposed to prenatal stress show decreased sexual activity (Anderson *et al.* 1986).

There was a dissociation between inhibitory effects on testicular growth, which occurred following protein restriction during lactation, and sperm count which was impaired only by restriction during pregnancy. Feeding the control diet during the suckling period to mothers restricted during pregnancy normalized testicular growth and testosterone levels at 70 days. However, these pups (RC) were the only group to show both decreased sperm count and fertility. In contrast, the RR group had a lowered sperm count presumably as a result of restriction imposed during fetal life but fertility was unimpaired. These findings indicate the complexity of developmental programming effects on the multiple factors that regulate the entire process of fertility. It is generally considered that sperm are available in numbers greatly in excess of need for fertility. Prenatal restriction coupled with postnatal full nutrition may occur in the real world in the setting of placental insufficiency followed by adequate lactation. Continued protein restriction from fetal life up to weaning does not adversely affect fertility, thereby maintaining the ability of this species to procreate even in the face of shortage of nutrients. We hypothesize that the infertility that accompanies the unnatural switch from restriction before birth to plenty after birth represents an example of responses during fetal life which are maladaptive for the pups' postnatal nutritional status (Gluckman & Hanson, 2004).

Finally we have produced evidence that maternal protein restriction during development alters offspring testicular function at the biochemical level. Interestingly, changes in testosterone and P450scc mRNA did not always align. At 21 days testosterone levels in RR and CR pups tended to be lower while levels in RC were normal in keeping with significantly lower P450scc mRNA only in RR and

RC at this age. However, by 70 days of life P450scc mRNA recovered to control levels in RR and CR despite the low testosterone in these groups. The explanation may lie in differences in regulation of secretion of progesterone or its differential use for synthesis and/or secretion of androgens between the groups.

In conclusion we have presented evidence for developmental programming effects at the pituitary and testicular level of the gonadal axis. We conclude that maternal protein restriction delays sexual maturation in male rats. It is clear that some effects emerge in later life. The finding that the major persistent effects on testicular growth resulted from maternal restriction in lactation agrees with the postnatal timing of the majority of cell division and growth in rats. The demonstration of postnatal effects on sperm numbers but prenatal effects on fertility emphasizes the importance of interactions between different key components of the testis in development.

#### References

- Alejandro B, Perez R, Pedrana G, Milton JT, Lopez A, Blackberry MA *et al.* (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fertil Dev* 14, 333–337.
- Anderson RH, Fleming DE, Rhees RW & Kinghorn E (1986). Relationships between sexual activity, plasma testosterone, and the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats. *Brain Res* 370, 1–10.
- Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker A, Bertram C, Poston L *et al.* (2003). Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatr Res* 54, 83–90.
- Brawley L, Torrens C, Anthony FW, Itoh S, Wheeler T, Jackson AA *et al.* (2004). Glycine rectifies vascular dysfunction induced by dietary protein imbalance during pregnancy. *J Physiol* 554, 497–504.
- Chomczynski P & Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156–159.
- Clarke IJ & Henry BA (1999). Leptin and reproduction. *Rev Reprod* 4, 48–55.
- Cohn HE, Sacks EJ, Heymann MA & Rudolph AM (1974). Cardiovascular responses to hypoxemia and acidemia in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol* 120, 817–824.
- Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C & Delemarre-van de Waal HA (2000). The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr Res* 48, 803–807.
- Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE, Ekizoglou S, Doherty C, James L, Gusterson B *et al.* (2003). The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Br J Nutr* 90, 815–822.
- Galler JR & Tonkiss J (1991). Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 121, 762–769.

- Gluckman PD & Hanson MA (2004). Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305, 1733–1736.
- Graham S & Gandelman R (1986). The expression of anogenital distance data in the mouse. *Physiol Behav* 36, 103–104.
- Gunn RG, Sim D & Hunter EA (1995). Effects of nutrition in utero and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes in two management systems. *Anim Sci* 60, 223–230.
- Hoet JJ & Hanson MA (1999). Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol* 514, 617–627.
- Holemans K, Gerber R, Meurrens K, De Clerck F, Poston L & Van Assche FA (1999). Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring. *Br J Nutr* 81, 73–79.
- Jackson AA, Dunn RL, Marchand MC & Langley-Evans SC (2002). Increased systolic blood pressure in rats induced by a maternal low-protein diet is reversed by dietary supplementation with glycine. *Clin Sci* 103, 633–639.
- Langley SC, Browne RF & Jackson AA (1994). Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol* 109, 223–229.
- Langley SC & Jackson AA (1994). Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci* 86, 217–222.
- Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC & Jackson AA (1996). Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci* 91, 607–615.
- Leonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC & Dupouy JP (2003). Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod* 68, 390–400.
- Page KC, Sottas CM & Hardy MP (2001). Prenatal exposure to dexamethasone alters Leydig cell steroidogenic capacity in immature and adult rats. *J Androl* 22, 973–980.
- Rae MT, Kyle CE, Miller DW, Hammond AJ, Brooks AN & Rhind SM (2002). The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod Sci* 72, 63–71.
- Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC Jr (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123, 1939–1951.
- Sharma TP, Herkimer C, West C, Ye W, Birch R, Robinson JE *et al.* (2002). Fetal programming: prenatal androgen disrupts positive feedback actions of estradiol but does not affect timing of puberty in female sheep. *Biol Reprod* 66, 924–933.
- Sherman RC & Langley-Evans SC (2000). Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci* 98, 269–275.
- Shono T, Imajima T, Zakaria O & Suita S (1999). Does maternal stress induce abnormal descent of the testis in prepubertal rats? *BJU Int* 84, 353–356.
- Shono T & Suita S (2003). Disturbed pituitary-testicular axis inhibits testicular descent in the prenatal rat. *BJU Int* 92, 641–643.
- Stylianopoulou F (1983). Effect of maternal adrenocorticotropin injections on the differentiation of sexual behavior of the offspring. *Horm Behav* 17, 324–331.
- Torrens C, Brawley L, Barker AC, Itoh S, Poston L & Hanson MA (2003). Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring. *J Physiol* 547, 77–84.
- Vickers MH, Ikenasio BA & Breier BH (2001a). IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. *Endocrinology* 142, 3964–3973.
- Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA & Breier BH (2001b). Dysregulation of the adipoinular axis – a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol* 170, 323–332.
- Woods LL, Ingelfinger JR, Nyegaard JR & Rasch R (2001). Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 49, 460–467.

#### Acknowledgements

This work was partially funded by CONACyT-138259 (Mexico) and the NIH HD21350.