

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**Efectos de la restricción proteínica materna durante el
embarazo y la lactancia en la función reproductiva de
las crías hembras de rata**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

QFB. Carolina Guzmán Arriaga

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELENA ZAMBRANO GONZALEZ**

México, D.F.

Junio, 2007



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.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría de la Dra. Elena Zambrano González. Mis estudios de Doctorado fueron apoyados por las becas de CONACyT (No. de Registro 169728) y DGEP, Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en particular al Departamento de Biología de la Reproducción y al Departamento de Investigación Experimental y Bioterio por todas las facilidades prestadas para la realización de mis estudios de Doctorado.

A la Dra. Elena Zambrano González, por su apoyo, por ser un ejemplo y un aliciente.

A mi comité tutorial, Dr. Horacio Merchant Larios y Dr. Armando Tovar Palacio, por su paciencia, su acertada visión científica, sus aportaciones y su apoyo durante mi formación como doctora.

Al Dr. Fernando Larrea por permitirme formar parte del Departamento de Biología de la Reproducción a su cargo, por su apoyo y su valiosa visión científica.

Al todo el personal del Departamento de Biología de la Reproducción por su colaboración, su apoyo, y su paciencia.

A mis amigos y compañeros del laboratorio sin quienes no hubiera sobrevivido, gracias por su apoyo y por formar parte de la terapia grupal.

A la Dra. Norma Moreno, Biol. Valeria Quintanar y M. en C. Elizabeth Morales, por su asesoría y su amistad.

Al CONACyT y a la DGEP (UNAM) por auspiciarme en mis estudios.

Agradezco de manera especial a los integrantes del jurado de grado por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por valiosas aportaciones.

Dr. Manuel Sala Alvarado

Dra. Elena Zambrano González

Dr. Roberto Domínguez Casala

Dr. Enrique Pedernera Asteguiano

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dr. Vicente Díaz Sánchez

DEDICATORIAS

A mi padre (QEPD),

Porque nunca estuve tan segura de mi como lo estuviste tú. Porque te fuiste pero aún estás aquí. Te extraño y se que estarías orgulloso.

A Vanny, Raquel y Mariana,

Por ser mí apoyo en todo momento.

A mis queridos amigos,

A los que no estuvieron todo el tiempo conmigo, pero me escucharon. A los que me amaron y ahora ya no. A los que han sido un gran apoyo en mis debacles existenciales. A los nuevos y también a los viejos. Pero especialmente a los verdaderos amigos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México,

Por esta nueva aventura y por ser el paradigma de la universalidad, la investigación científica y la educación en México.

I would tell you about the things they put me through

*The pain I've been subjected to
But the Lord himself would blush
The countless feasts laid at my feet
Forbidden fruits for me to eat
But I think your pulse would start to rush
Now I'm not looking for absolution
Forgiveness for the things I do
But before you come to any conclusions
Try walking in my shoes
You'll stumble in my footsteps
Keep the same appointments I kept
If you try walking in my shoes*

*Morality would frown upon
Decency look down upon
The scapegoat fate's made of me
But I promise now, my judge and jurors
My intentions couldn't have been purer
My case is easy to see
I'm not looking for a clearer conscience
Peace of mind after what I've been through
And before we talk of any repentance
Try walking in my shoes
You'll stumble in my footsteps
Keep the same appointments I kept
If you try walking in my shoes*

ML Gore.

ÍNDICE	i
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ANTECEDENTES	5
GENERALIDADES DEL EJE REPRODUCTIVO FEMENINO	5
PROGRAMACIÓN DURANTE EL DESARROLLO	8
Estudios clínicos y epidemiológicos	10
Modelos experimentales	13
1. Exposición a compuestos con actividad hormonal	14
a) Sobre-exposición temprana a glucocorticoides	14
b) Exposición fetal o neonatal a andrógenos	16
c) Exposición fetal o neonatal a compuestos disruptores endócrinos	16
2. Manipulación nutricional	17
3. Exposición temprana a otras condiciones adversas	18
PROGRAMACIÓN DEL EJE REPRODUCTIVO FEMENINO	19
Sobre-exposición temprana a glucocorticoides	20
Exposición fetal o neonatal a andrógenos	21
Exposición fetal o neonatal a compuestos disruptores endócrinos estrogénicos	21
Exposición fetal o neonatal a otros compuestos disruptores endócrinos	23
Manipulación nutricional	25
Exposición temprana a otras condiciones adversas	25
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	31
Objetivo general	31

Objetivos particulares	31
MATERIAL Y MÉTODOS	33
I. Modelo experimental	33
Establecimiento del modelo experimental	33
Animales y alojamiento	33
Alimentación	34
Grupos experimentales	35
Manejo de las madres durante el embarazo y la lactancia	37
Análisis de la ingesta alimenticia y energética	37
Manejo de las crías hembras hasta la vida adulta	37
Sacrificio	37
II. Estudios maternos y neonatales	38
Concentraciones hormonales maternas y neonatales	38
Manejo de las camadas al nacimiento	38
Parámetros morfométricos	39
Distancia ano-genital al nacimiento	39
III. Estudios fisiológicos del eje reproductivo	40
Inicio de la pubertad	40
Estudio del ciclo estral	40
Tasa de fertilidad	41
IV. Estudios bioquímicos	41
Análisis de las concentraciones de progesterona, estradiol, testosterona y corticosterona por RIA	41
Análisis de la concentración de rFSH por RIA	42
Análisis de la concentración de rLH por RIA	42
Análisis de la concentración de rProlactina por RIA	42
V. Estudios moleculares	43
Obtención de cDNA	43
Síntesis y marcaje de sondas específicas	43
Expresión semicuantitativa de StAR, P450 scc, P450 aromatasa, rLH-R y rFSH-R en ovario	44

	Hibridación y Southern blot	45
VI.	Estudios histológicos	46
	Evaluación de las poblaciones de folículos preantrales y antrales	46
VII.	Análisis estadístico	47
RESULTADOS		48
I.	Efectos de la restricción proteínica en las madres y las camadas durante la gestación y la lactancia	48
	Peso materno durante el embarazo y características de la camada al nacimiento	48
	Ingesta alimenticia materna durante el embarazo y la lactancia	49
	Concentraciones de esteroides maternos durante el embarazo	50
	Parámetros morfométricos y distancia ano-genital de las crías al nacimiento	51
	Concentraciones de corticosterona neonatal	51
II.	Efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos en el eje reproductivo de las crías hembras durante la etapa peri pubertal	52
	Peso de ovarios y úteros al destete	52
	Concentraciones hormonales al destete	52
	Expresión semicuantitativa de StAR, P450 scc, aromatasa, LH-R y FSH-R en el ovario de 21 días	53
	Evaluación de las poblaciones de folículos preantrales y antrales al destete	55
	Inicio de la pubertad	56
	Ciclo estral	57
III.	Efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos en la función reproductiva de las crías hembras durante la etapa adulta	58

Peso de ovarios y úteros a los 70 días	58
Concentraciones hormonales a los 70 días y 12 meses	58
Expresión semicuantitativa de StAR, P450 scc, aromatasa, LH-R y FSH-R en el ovario de 70 días en diestro	59
Ciclo estral a los 140 días y 12 meses	61
Tasa de fertilidad a los 150 días y 12 meses	63
IV. Efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos en el envejecimiento reproductivo de las crías hembras	65
Peso de ovarios y úteros a los 22 meses	65
Concentraciones hormonales a los 22 meses	65
Expresión semicuantitativa de StAR, P450 scc, aromatasa, LH-R y FSH-R en el ovario de 22 meses en diestro	66
Ciclo estral a los 22 meses	68
V. Efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos en el crecimiento, la sobrevida y la mortalidad de las crías hembras	69
Crecimiento postnatal hasta los 22 meses	69
Sobrevida y mortalidad hasta los 22 meses	70
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	88
REFERENCIAS	90
ANEXOS: Producción científica generada	102

RESUMEN

El término “programación durante el desarrollo” define al proceso mediante el cual condiciones –adversas o no– durante las etapas tempranas de la vida, ya sea fetal o post natal, incrementan la susceptibilidad a padecer enfermedades en la edad adulta. Estudios epidemiológicos retrospectivos en diversas poblaciones humanas relacionan el bajo peso al nacimiento con hipertensión, enfermedades coronarias, diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y obesidad, entre otras. Con base en este tipo de investigaciones, así como en la experimentación con animales de laboratorio, se propone que gran parte de las enfermedades metabólicas del adulto se originan en los estadios más tempranos de la vida.

De manera similar a otros ejes neuroendócrinos como el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, el eje reproductivo muestra sensibilidad al ambiente intrauterino y post natal. Los estudios experimentales realizados en este sentido se han encaminado en mayor medida al estudio de los efectos de ambientes hormonalmente alterados sin que la desnutrición materna, condición ampliamente distribuida en todas las poblaciones, reciba suficiente atención.

El objetivo del presente estudio fue determinar los efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo y la lactancia en el desarrollo sexual y en la función y el desempeño reproductivo de sus crías hembras de rata.

Se tuvieron tres grupos experimentales además de un grupo control. La designación de los grupos corresponde a las dietas recibidas por la madre durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. De este modo, el grupo RR fue restringido tanto durante la gestación como en la lactancia, mientras que el grupo CR fue restringido en la lactancia, después de haber experimentado una nutrición adecuada durante la gestación y su contraparte, el grupo RC recibió

alimentación adecuada en la lactancia después de haber sido restringido en la gestación.

El empleo de este modelo permitió identificar una gran variedad de efectos de la restricción alimenticia materna en el eje reproductivo de las crías que dependieron del estadio de desarrollo y del periodo de exposición. Lo anterior pone en evidencia que en los tres grupos experimentales el fenotipo es resultado de diferentes mecanismos de adaptación a la restricción proteínica. Los efectos incluyen retraso en el inicio de la pubertad, alteraciones en los perfiles hormonales que en consecuencia ocasionaron modificaciones en el ciclo estral y la tasa de fertilidad, así como otros efectos asociados con el envejecimiento prematuro de la función reproductiva. Por su parte, la expectativa de vida de estas ratas disminuyó dramáticamente, probablemente por los padecimientos metabólicos asociados con la programación durante el desarrollo. Estos efectos son consecuencia de respuestas adaptativas predictivas adquiridas durante las etapas fetal y neonatal del desarrollo y se manifiestan de acuerdo al estímulo nutricional recibido por cada grupo.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos periodos, programa diversas alteraciones funcionales a diferentes niveles del eje reproductivo femenino. Estos cambios, característicos para cada grupo, disminuyen de manera prematura la capacidad reproductiva de las crías hembras de la rata.

ABSTRACT

Developmental programming refers to the process by which different conditions –adverse or not– during early stages of development, either fetal or neonatal, increase the susceptibility to develop later disease.

Retrospective epidemiological studies in different human populations relate low birth weight to hypertension, coronary heart disease, type 2 diabetes, insulin resistance, glucose intolerance and obesity. On the basis of this kind of research, as well as the animal experimentation, it is proposed that most of the metabolic diseases in the adult are originated in the early stages of life.

Similarly to other neuroendocrine axes, the reproductive axis has shown high sensitivity to the intrauterine and post natal environment. Most of the research on the developmental programming of the reproductive axis have been pointed to the effects of environmental hormones or endocrine disruptors, but maternal undernutrition, a widely spread condition, has not received enough attention.

The objective of this study was to determine the effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on the sexual development, as well as the reproductive function in the rat female offspring.

There were three experimental groups besides the control group. They were designated according to the diet fed to the dam during pregnancy –first letter– or lactation –second letter. RR group was restricted during both pregnancy and lactation. On the other hand, CR group was restricted only during lactation while RC was it only during pregnancy.

This model allowed the identification of the effects of maternal protein restriction on the reproductive axis of the female offspring. The alterations depended on the stage of development and the time of exposure. The effects were associated to intergroup differential adaptive responses to protein restriction. They included delayed sexual development, altered hormone profiles that were followed

by changes in the estrous cycle and fertility rate, as well as effects related to premature reproductive aging. It is interesting that in these offspring lifespan was dramatically shortened. That could be related to the metabolic diseases associated to developmental programming. These effects are the consequence of predictive adaptive responses that were acquired during fetal and neonatal stages of development, and they are according to the nutritional insult received by every group.

In conclusion, the results exposed by this thesis suggest that maternal protein restriction during pregnancy, lactation or both, programs functional alterations at different levels of the female reproductive axis. These changes, characteristic for every group, prematurely diminish the reproductive capacity in the rat female offspring.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES DEL EJE REPRODUCTIVO FEMENINO

En los mamíferos, la preservación de las especies depende de la interacción de una compleja maquinaria reproductiva perfectamente orquestada que incluye diferentes órganos con funciones dependientes entre sí. El eje hipotálamo–hipófisis–ovario (HHO), lleva a cabo una serie de funciones entre las que se encuentran la producción y maduración de ovocitos fertilizables y la secreción de hormonas que regulan la ovulación y la conducta sexual. Además del eje HHO, en la reproducción interviene otros órganos como el útero y la glándula mamaria así como otros ejes neuroendócrinos como el tiroideo y el adrenal.

El eje reproductivo femenino es regulado a nivel central por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), sintetizada por las neuronas GnRHérgicas del área preóptica medial hipotalámica. Estas neuronas proyectan principalmente hacia la eminencia media, de donde la GnRH es transportada mediante la circulación porta hipotálamo-hipofisaria hacia la glándula hipófisis. La porción anterior de la hipófisis posee una población celular llamada gonadotropos que presentan receptores a GnRH. En respuesta al estímulo con esta hormona, los gonadotropos sintetizan y secretan las gonadotropinas: hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH). Las gonadotropinas son transportadas por la circulación periférica y alcanzan su órgano blanco en el ovario^{1, 2}.

El ovario está conformado por una cantidad limitada de folículos; estas estructuras se componen del ovocito rodeado por células foliculares diferentes entre sí por su actividad bioquímica. Las células de la granulosa son las más cercanas y con mayor interacción con el ovocito, presentan receptores para la FSH y de acuerdo al estadio de maduración del folículo, son capaces de aromatizar andrógenos. En tanto, las células de la teca tienen receptores para la

LH, y son productoras de progesterona y andrógenos, estos últimos, aromatizados por las células de la granulosa, dan lugar a estrógenos como el estradiol³. Los estrógenos, mediante su unión a sus receptores ER α y ER β , funcionan como promotores del crecimiento folicular, e inhibidores de la apoptosis de las células foliculares⁴. Tanto la progesterona como el estradiol y la testosterona retroalimentan el eje HHO a nivel central.

La maduración de los folículos ováricos involucra diversas etapas secuenciales, desde la formación de los folículos durante el desarrollo fetal, hasta el crecimiento, selección, ovulación y finalmente la luteinización⁵. El desarrollo folicular va del estadio primordial, primario y secundario antes de la aparición de la cavidad antral, en el estadio antral la mayoría de los folículos sufren de atresia mientras que tan sólo algunos de ellos, por estimulación de las gonadotropinas, alcanzan el estadio preovulatorio. De esta población folicular finita, cada ciclo reproductivo se recluta una cohorte, de los cuales sólo se selecciona una cantidad reducida para ovular⁶. En los estadios pre-antrales del desarrollo folicular, el crecimiento es lento e independiente de gonadotropinas, mientras que en los estadios antrales y posteriores el crecimiento e incluso la ovulación son dependientes en su totalidad de la FSH y la LH. De modo que el crecimiento folicular es controlado por la interacción de dos tipos celulares, las células de la granulosa y las de la teca, con dos gonadotropinas, FSH y LH⁵.

El incremento cíclico en la concentración de estradiol inhibe la secreción de FSH por parte de la hipófisis y en consecuencia los folículos en crecimiento que no han alcanzado el estadio ovulatorio sufren el proceso de atresia⁶. Mientras tanto los folículos que han ovulado comienzan el proceso de luteinización, produciendo cantidades importantes de progesterona. Estos procesos se presentan durante cada ciclo reproductivo, iniciando con la pubertad y continúan durante la vida reproductiva hasta que la reserva folicular ovárica se agota.

La mayoría de los mamíferos presenta ciclos reproductivos de tipo estral, mientras que los primates presentan ciclos menstruales. En el caso de los roedores como la rata, el ciclo está conformado por al menos cuatro estadios fácilmente identificables mediante cambios en la citología vaginal. La etapa de

proestro es preovulatoria y se asocia con la presencia de células epiteliales redondas y nucleadas. Para el final de esta etapa, la hembra exhibe conductas de receptividad sexual. En el estro, la citología vaginal muestra únicamente células epiteliales cornificadas. El metaestro se caracteriza por la infiltración leucocitaria del epitelio vaginal, así que la citología muestra células cornificadas y leucocitos, mientras que en el diestro se observan principalmente leucocitos¹. Por su parte en el ciclo menstrual, además de las variaciones en el epitelio vaginal, se observan cambios en el endometrio uterino, la proliferación endometrial previa a la ovulación permite la implantación en caso de fecundación, y en caso contrario es seguida por el desprendimiento de las capas uterinas superficiales acompañado de hemorragia durante la menstruación².

Con el crecimiento folicular se presentan patrones característicos en las variaciones de las concentraciones de todas las hormonas involucradas en la función del eje HHO. En particular, las concentraciones de esteroides (progesterona y estradiol) regulan la síntesis y secreción de GnRH y de gonadotropinas de manera tanto estimulante como inhibitoria.

Las variaciones en las concentraciones de esteroides dependen de la síntesis y actividad de las enzimas que participan en la vía esteroidogénica, la cual consiste en la síntesis de esteroides a partir de colesterol. El primer paso en la esteroidogénesis es el transporte del colesterol del citoplasma al interior de la mitocondria, proceso regulado por la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR)⁷. Una vez dentro de la mitocondria, la enzima P450_{scc} corta la cadena lateral del colesterol y da lugar a la pregnenolona, paso que se considera limitante en la vía esteroidogénica. A partir de pregnenolona se sintetizan muchos intermediarios. Sin embargo en el ovario se consideran como los pasos más importantes los relacionados con la producción de progesterona y estradiol. La enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3βHSD) cataliza la bioconversión de pregnenolona en progesterona, mientras que la aromatización de andrógenos a estrógenos es catalizada por la P450 aromatasa⁵.

Los estrógenos incrementan la expresión de los receptores para FSH y LH⁴, mientras que la actividad transcripcional de los genes que codifican a las enzimas

esteroidogénicas antes mencionadas es controlada por gonadotropinas. De este modo, la interacción de la FSH y LH con sus receptores específicos en las células de la granulosa y la teca respectivamente, desencadena una cascada de señalización que termina con el incremento en la transcripción de genes regulados por AMPc⁵. Entre los genes regulados por la FSH en las células de la granulosa se encuentran el de la aromatasa y la 3βHSD^{8, 9}, mientras que en las células de la teca, los genes de P450scc y 3βHSD dependen de LH¹⁰. La expresión del gen de StAR también es sensible al incremento de AMPc, sin embargo se ha demostrado que su regulación transcripcional no depende directamente de esta molécula^{11, 12}.

PROGRAMACIÓN DURANTE EL DESARROLLO

El término “programación durante el desarrollo” define al proceso mediante el cual diferentes condiciones (que pueden o no ser adversas) durante los estadios tempranos de la vida, ya sea fetal o post natal, incrementan la susceptibilidad a padecer enfermedades en la edad adulta¹³. Estudios clínicos epidemiológicos retrospectivos en poblaciones humanas demuestran que la calidad de vida en las primeras etapas del desarrollo afecta irreversiblemente la fisiología y metabolismo del individuo adulto^{14, 15}.

En 1986, el Dr. David Barker de la Universidad de Southampton, Inglaterra, inició una serie de estudios epidemiológicos que mostraron correlación entre el bajo peso al nacimiento y el incremento en el riesgo de padecer enfermedades coronarias¹⁶. Diversos estudios epidemiológicos posteriores identificaron la relación que existe entre el peso y el fenotipo al nacimiento con padecimientos propios de la vida adulta. Estos trabajos proporcionan pruebas convincentes de que tanto las enfermedades como la salud se originan durante el desarrollo temprano. Lo anterior dio pie al concepto inicial del Origen Fetal de las Enfermedades del Adulto (Fetal Origins of Adult Disease: FOAD por sus siglas en inglés)^{13, 17}. En el ser humano el bajo peso al nacimiento se correlaciona con el posterior desarrollo en el adulto del síndrome metabólico: hipertensión¹⁸,

enfermedades coronarias¹⁹, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa²⁰, diabetes tipo 2^{21, 22} y obesidad²³.

Los primeros estudios respecto a la programación durante el desarrollo consideraban como periodo susceptible únicamente a la etapa fetal. Sin embargo en la vida neonatal se han identificado diversos eventos que la hacen sensible a las influencias ambientales. Un ejemplo de ello es el estudio clásico de Barraclough y Gorski²⁴ de 1961 que pone en evidencia la sensibilidad del cerebro en los primeros días de la vida post natal a la administración de una dosis única de propionato de testosterona durante la primera semana de vida de la rata hembra, lo que produce esterilidad durante la etapa adulta. Tomando en consideración que tanto el desarrollo fetal como el infantil constituyen los periodos de mayor plasticidad celular, se ha incorporado recientemente la etapa post natal al campo de la programación. El concepto actual es el Origen durante el Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (Developmental Origins of Health and Disease: DOHaD por sus siglas en inglés)^{13, 25}.

El crecimiento durante los estadios tempranos de la vida depende en gran medida del componente genético del individuo. Sin embargo, el ambiente intrauterino y post natal en que se desenvuelve el sujeto influye de manera importante en su fenotipo. Durante la vida intrauterina, el feto retrasa su crecimiento en respuesta a condiciones ambientales adversas²¹, con lo que presenta modificaciones que funcionan como respuestas adaptativas predictivas²⁶, que lo preparan para un ambiente post natal adverso^{21, 26}. Sin embargo tales adaptaciones, indispensables para la supervivencia a corto plazo, son precisamente las que dan lugar a las alteraciones metabólicas observadas en el adulto²⁷. La intensidad de los efectos a nivel metabólico varían de acuerdo al grado de discrepancia entre los ambientes prenatal, neonatal y post natal²⁶. Es decir, el riesgo a presentar estos padecimientos se incrementa considerablemente cuando aunado a condiciones adversas durante el crecimiento intrauterino, se suma la recuperación acelerada de peso durante los primeros estadios de la vida post natal^{21, 28, 29}.

Estudios clínicos y epidemiológicos

Diversos hallazgos epidemiológicos han mostrado que la influencia nutricional durante el embarazo es una causa determinante de la programación durante el desarrollo^{14, 30}. Los estudios más conocidos a este respecto son los del Invierno Hambriento Holandés. Durante la Segunda Guerra Mundial, entre septiembre de 1944 y mayo de 1945, el ejército nazi mantuvo una ocupación en diferentes zonas de Holanda. Esta ocupación coincidió con un invierno crudo y precoz, conocido como el “Invierno Hambriento Holandés”. Aunado al frío invierno, y en represalia por el intento fallido de los aliados de tomar un puente en Arnhem; la población civil fue mantenida a dietas de hambre por aproximadamente 8 meses. Las dietas cayeron de aproximadamente 1400 Kcal/día antes de la ocupación a 800 – 580 Kcal/día durante el invierno²³. La hambruna tuvo efectos permanentes en la salud de los niños nacidos de mujeres embarazadas en este periodo. Las alteraciones en la salud dependieron de manera específica del estadio del embarazo en que la madre fue afectada por la alimentación pobre^{31, 32}.

En el periodo de ocupación se encontraron mujeres que ya estaban embarazadas cuando se impuso la restricción y otras que se embarazaron durante el invierno. Se pueden identificar tres grupos diferentes de mujeres embarazadas en ese tiempo: las restringidas durante todo el embarazo, las que fueron afectadas sólo en la primera mitad y las que lo fueron sólo en la segunda³³. Los efectos en la salud de la descendencia se relacionan directamente con el periodo de desnutrición, con lo que se identifican ventanas críticas en el desarrollo asociadas con las alteraciones encontradas³¹. Los efectos más severos se observaron en las mujeres afectadas durante todo el embarazo; algunas llegaron a ganar únicamente 2.25 Kg de peso en comparación con los 10 a 12 kilos que normalmente gana una mujer embarazada. El peso de los recién nacidos también fue afectado llegando a ser de alrededor de 2.5 Kg al nacimiento (incluso más que el peso ganado por la madre)³³.

El siguiente grupo afectado fue el de la segunda mitad del embarazo pues durante esta etapa se presenta el mayor crecimiento fetal y la mayoría de los órganos se están diferenciando y creciendo, por lo cual son más susceptibles a las

influencias ambientales^{31, 32, 34}. Por su parte los afectados en la primera mitad de la gestación en general presentaron mayor tamaño y peso, incluso que los bebés nacidos antes o después de la guerra. Esto se explica por un crecimiento placentario compensatorio en la etapa de restricción, la cual al ser seguida por una alimentación abundante, produce una actividad placentaria excesiva con lo que el feto es sobre-alimentado ocasionando su mayor crecimiento. En la primera mitad del embarazo la placenta crece más rápido que el feto, de tal forma que la deficiencia de nutrimentos afecta el crecimiento fetal a través del cambio de la interacción entre el feto y la placenta³⁵.

La desnutrición materna severa restringe el crecimiento fetal y placentario, pero la desnutrición moderada genera el crecimiento normal de la placenta, mas no del feto^{14, 36}. La desnutrición al final del embarazo puede ocasionar la desaceleración del crecimiento fetal y alterar la interacción metabólica entre el feto y la placenta. Una vez más, el crecimiento fetal se sacrifica para mantener la función placentaria³⁵. La desnutrición aguda ocasiona un retraso en el crecimiento intrauterino (RCIU) asociado con catabolismo fetal, pero en cuanto se reanuda la ingesta nutritiva adecuada, el crecimiento se reinicia^{37, 38}. En contraste, periodos prolongados de desnutrición pueden detener irreversiblemente el crecimiento fetal, lo que conlleva al desarrollo inadecuado al nacimiento³⁹.

El fenotipo de las personas que nacieron de mujeres holandesas embarazadas durante el periodo de mayor hambruna ha permitido conocer algunos efectos de la desnutrición prenatal en el ser humano; así como identificar ventanas críticas en el desarrollo que se asocian a mayor predisposición a ciertas enfermedades posteriormente. Para el caso específico de la obesidad, la desnutrición materna durante la primera parte del embarazo representa un incremento en la incidencia. Sin embargo, la aparición de obesidad se asocia también al sexo y la edad de los sujetos. En hombres, la proporción de individuos obesos es más alta en la etapa adulta joven²³; mientras que en mujeres la edad preferente es la etapa adulta madura³¹.

Otro hallazgo en esta población fue la alta tasa de mortalidad entre los bebés producto del invierno hambriento durante el primer año de vida. Al igual que

en el estudio de Barker^{14, 16}, la alta mortalidad en los primeros años de vida en esta población predecía el incremento en la incidencia de alteraciones metabólicas en los sobrevivientes al llegar a la etapa adulta^{16, 40}.

Las consecuencias de la hambruna no se limitan a la necesidad inmediata de supervivencia de aquellos expuestos a la misma, sino que la desnutrición tiene implicaciones a largo plazo para las generaciones posteriores, no nacidas aún⁴⁰⁻⁴³. Las secuelas de la guerra se siguen viviendo en nuestros días, a más de 50 años de su final. La restricción de alimento que sufrió la población holandesa durante la segunda guerra mundial ha afectado a las generaciones posteriores. Una vez llegadas a la edad reproductiva las mujeres producto del invierno hambriento dieron a luz hijos con bajo peso al nacimiento y alta tasa de mortalidad perinatal⁴¹, con mayor susceptibilidad de padecer el síndrome metabólico cuando adultos⁴⁴.

Otra ciudad que sufrió la ocupación alemana fue Leningrado. Durante el sitio, la ración de alimento administrada a la población disminuyó drásticamente. Los niños sobrevivientes al llegar a la vida adulta presentaron mayor susceptibilidad a enfermedades coronarias y a diferencia de los holandeses no fueron más propensos a la obesidad⁴⁵. Por su parte, en una cohorte de personas sobrevivientes a la guerra civil española se observa un incremento en el riesgo de muerte por cardiopatía isquémica en las personas nacidas durante los años de mayor escasez de alimentos⁴⁶.

Se han encontrado discrepancias entre los resultados obtenidos en estas y otras poblaciones humanas. Además existen muchas otras variables que podrían influir o enmascarar los efectos. Estas razones han llevado a la necesidad de establecer modelos experimentales controlados en especies de laboratorio que permitan determinar con certeza los efectos atribuibles a la desnutrición (y otras fuentes de estrés materno) y estudiar los mecanismos involucrados en la aparición de tales alteraciones.

Modelos experimentales

El estudio de la programación durante el desarrollo ha aprovechado diversos eventos desafortunados en la historia de la humanidad como modelos epidemiológicos. Estos modelos se han tratado de implementar en especies de laboratorio para explicar o aproximar los efectos observados en el ser humano. La investigación con animales de experimentación ha confirmado los hallazgos clínicos y epidemiológicos. Por ejemplo, las crías de ratas sujetas a dietas isocalóricas bajas en proteínas durante diferentes periodos o la totalidad del embarazo, han desarrollado hipertensión, así como intolerancia a la glucosa en la vida adulta⁴⁷⁻⁴⁹.

Para establecer estos modelos en animales se han empleado diferentes fuentes de estrés como origen de la programación durante el desarrollo. Diversos factores pueden modificar el ambiente intrauterino y post natal. Entre ellos, la nutrición materna y del individuo durante las primeras etapas de la vida representa un punto crítico de gran importancia. Otro factor importante en la programación es la sobre-exposición a diferentes hormonas, ya sea en el ambiente intrauterino como en el post natal. Entre las hormonas más estudiadas se encuentran los glucocorticoides, que pueden ser producidos por la propia madre o bien pueden ser administrados durante el embarazo, como sucede cuando hay amenaza de parto prematuro⁵⁰. Sin embargo, los glucocorticoides no son la única influencia hormonal que se puede encontrar durante el desarrollo temprano. La existencia de contaminantes ambientales de origen industrial que funcionan como compuestos disruptores endócrinos (CDE), discutidos más adelante, también pueden ejercer acción hormonal en el feto o el neonato. Incluso la respuesta fisiológica materna a ciertos tipos de estrés produce sobre-exposición a hormonas esteroides de origen materno (glucocorticoides, estradiol y testosterona)⁵¹.

Además de las diferentes fuentes de estrés materno, la utilización de diversas especies animales (rata, ratón, oveja, mono) ha mostrado resultados similares a las observaciones epidemiológicas y clínicas en el ser humano.

El uso de diferentes fuentes de estrés como origen de alteraciones en la programación durante el desarrollo ha permitido la implementación de una amplia

variedad de modelos biológicos. En general podríamos dividir estos modelos en 3 clasificaciones:

1. Exposición a compuestos con actividad hormonal.
2. Manipulación nutricional.
3. Exposición materna a otras condiciones adversas.

1. Exposición a compuestos con actividad hormonal

Sin duda uno de los recursos más empleados entre los modelos experimentales de programación durante el desarrollo es la administración de compuestos con actividad hormonal. El uso de estos compuestos se puede dividir a su vez en:

- a) Sobre-exposición temprana a glucocorticoides,
- b) exposición fetal o neonatal a compuestos androgénicos,
- c) exposición fetal o neonatal a otros compuestos disruptores endócrinos.

a) Sobre-exposición temprana a glucocorticoides

El empleo de los glucocorticoides pretende simular, con dosis farmacológicas, la actividad excesiva del eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) materno o del producto. Como respuesta fisiológica al estrés, el eje HHA produce glucocorticoides (cortisol en el ser humano, corticosterona en la rata).

Los glucocorticoides tienen funciones a diferentes niveles, por ejemplo, a nivel vascular modifican la respuesta a vasoconstrictores, en el hígado regulan la gluconeogénesis^{52, 53}, en hipocampo modulan la expresión de los receptores para mineralocorticoides y glucocorticoides, los cuales participan en la inhibición del eje HHA⁵⁴.

En el embarazo, los glucocorticoides maternos se incrementan considerablemente⁵⁵ y participan en dos funciones fundamentales. Por un lado, en la madre inician las señales de parto cuando el producto está a término^{50, 56, 57}. Por otro lado, durante el desarrollo fetal, intervienen en la maduración de órganos vitales para la supervivencia post natal, como es el caso del pulmón y tracto gastrointestinal. Durante los últimos meses de la gestación, el pulmón fetal

comienza a producir surfactante, encargado de mantener la interfase líquido–aire entre la sangre y el oxígeno inhalado. Los glucocorticoides producidos por el feto, son indispensables para la producción pulmonar del surfactante³³. En el ser humano, ante la amenaza de parto prematuro, situación en que el producto no ha madurado su pulmón, el tratamiento de elección es la administración materna de glucocorticoides para asegurar el correcto funcionamiento pulmonar^{50, 58, 59}. En el caso del tracto gastrointestinal, al nacimiento debe ser capaz de pasar de la alimentación parenteral a la enteral⁶⁰. Los glucocorticoides participan en la maduración de los sistemas enzimáticos encargados de la digestión y la absorción de nutrientes⁶¹, además de participar en la diferenciación morfológica y funcional del epitelio gastrointestinal⁶⁰.

Durante el desarrollo fetal, la placenta posee un mecanismo mediante el cual protege al feto de la exposición excesiva a glucocorticoides maternos. El sistema enzimático de la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β HSD), está compuesto por dos isoformas de la enzima. La 11 β HSD tipo 2 es la más importante en la protección fetal a la sobre-exposición a glucocorticoides, su actividad es convertirlos en metabolitos inocuos para el feto (ejemplo: el cortisol es biotransformado a cortisona). Mientras que la isoforma 11 β HSD tipo 1 tiene la función opuesta a la tipo 2, pero en la placenta su abundancia relativa es baja^{62, 63}. En la placenta de bebés pretérmino, la baja actividad de la 11 β HSD tipo 2 se asocia con baja conversión de cortisol a cortisona, lo cual se asocia con RCIU⁶⁴. El ratón *null* para esta enzima presenta RCIU aún a concentraciones fisiológicas maternas de corticosteroides⁶⁵.

Para lograr la sobre-exposición fetal a glucocorticoides se han utilizado diversas estrategias experimentales. Entre ellas se incluyen la administración materna de corticosteroides sintéticos (dexametasona, betametasona), así como la de ACTH y la inhibición de la 11 β HSD tipo 2. En la oveja y la rata, se ha observado disminución de la actividad de 11 β HSD tipo 2⁶⁶, RCIU^{66, 67}, alta tasa de mortalidad perinatal de las crías y se asocia con alteraciones en el eje HHA²⁷ que conducen a hipertensión^{66, 68}, enfermedad cardiovascular⁶⁸ y alteraciones en el metabolismo de la glucosa en la descendencia^{63, 69-72}.

b) Exposición fetal o neonatal a andrógenos

La administración de compuestos androgénicos en periodos susceptibles del desarrollo afecta de manera considerable a las hembras. A diferencia del macho, durante el desarrollo fetal y neonatal, las hembras no sintetizan andrógenos, por lo cual la exposición a este tipo de hormonas se traduce en alteraciones a nivel reproductivo principalmente. Sin embargo, las alteraciones generadas por la exposición prenatal a los andrógenos no son exclusivas de este eje neuroendócrino, En la oveja, la administración de propionato de testosterona se asocia a RCIU, bajo peso al nacimiento⁷³, crecimiento fetal asimétrico y aumento en el peso relativo de las glándulas adrenales⁷⁴, así como hiperinsulinemia y resistencia a la insulina⁷⁵. En el caso del ser humano, algunas patologías maternas como los tumores productores de andrógenos, así como el síndrome de ovario poliquístico, producen la exposición fetal a andrógenos⁷⁶. En estas mujeres, la prevalencia de recién nacidos con bajo peso al nacimiento es más alta que en las mujeres que no padecen el síndrome⁷⁷ y se propone que el posterior desarrollo de hiperinsulinemia y otros signos característicos del síndrome se originan en la etapa fetal por la exposición a los andrógenos maternos inherente a la patología⁷⁸. Las alteraciones reproductivas serán tratadas más adelante.

c) Exposición fetal o neonatal a compuestos disruptores endócrinos

Otro modelo de programación durante el desarrollo es la exposición temprana a compuestos disruptores endócrinos (CDE)⁷⁹. Estos compuestos son sustancias que funcionan como agonistas o antagonistas endócrinos alterando la síntesis, almacenamiento y metabolismo hormonal⁸⁰. Los CDE tienen la capacidad de actuar tanto en los organismos directamente expuestos como en su descendencia⁸¹.

Los CDE pueden tener actividad estrogénica, anti-estrogénica, anti-androgénica, o pueden interactuar con otros ejes neuroendócrinos como el eje tiroideo, así como con el sistema inmune, e incluso pueden tener más de un tipo

de actividad⁸². En general, estos compuestos son altamente lipofílicos, lo que permite su almacenamiento por periodos prolongados en el tejido adiposo⁸⁰. En el embarazo, el feto puede ser expuesto a diferentes CDE por vía transplacentaria⁸³; y durante la lactancia, a través de la leche, debido a la movilización de las reservas lipídicas maternas, necesaria para satisfacer la demanda energética del recién nacido lactante⁸⁴.

Existe una amplia variedad de CDE en el medio ambiente; entre ellos se incluyen contaminantes de origen industrial, compuestos naturales como los fitoestrógenos, plaguicidas como el DDT y fármacos como la flutamida. Estos compuestos producen principalmente cambios a nivel reproductivo que serán discutidos posteriormente.

2. Manipulación nutricional

Entre los factores ambientales que programan la salud y la enfermedad en el adulto destacan, por su amplia distribución en los ecosistemas y en particular en la humanidad, la desnutrición materna y neonatal. En los modelos de programación la manipulación alimenticia se utiliza en tres variantes:

- a) Restricción nutricional hipocalórica, dada por restricción nutricional en términos de la cantidad de alimento y de energía⁸⁵.
- b) Restricción nutricional isocalórica, donde la restricción nutricional es en un grupo específico de nutrientes, generalmente proteína^{48, 86}.
- c) Manipulación nutricional hipercalórica, dada por el incremento en la composición grasa de la dieta⁸⁷.

En las diferentes especies de laboratorio estudiadas, la restricción nutricional hipocalórica e isocalórica ha mostrado efectos similares a la administración de glucocorticoides. Por ejemplo en la rata, la madre gestante incrementa sus concentraciones circulantes de corticosterona⁵¹. De este modo, el paso de corticosteroides a través de la placenta, aunado a la disminución de la 11 β -HSD tipo 2 produce la sobre-exposición fetal a los mismos⁸⁶. En la oveja, la desnutrición materna tiene este mismo efecto⁸⁸. En estos modelos se observa RCIU⁸⁹, alteraciones en el HHA⁸⁵, hipertensión⁹⁰, disminución en la expresión de

la 11 β -HSD tipo 2⁸⁶. Además se han observado enfermedades a nivel cardiovascular^{86, 91}, renal⁹², cerebral⁹³ y reproductivo⁹⁴⁻⁹⁶. Estos últimos serán abordados posteriormente. Muchas de estas modificaciones pueden ser transmitidas a las generaciones siguientes aún cuando estos individuos no sean sometidos a ningún tipo de restricción^{97, 98}. Estudios epidemiológicos en el ser humano, han reportado obesidad²³, alteraciones en el metabolismo de glucosa²⁰, enfermedades cardiovasculares^{16, 19, 30}, cambios conductuales y de personalidad^{32, 99, 100}, entre otras.

3. Exposición temprana a otras condiciones adversas

Además de las condiciones antes mencionadas, como la exposición a compuestos hormonales y la manipulación nutricional, para el estudio de la programación durante el desarrollo se han establecido otros modelos experimentales que simulan condiciones que se presentan en nuestra sociedad. La exposición prenatal a sustancias tóxico-adictivas como alcohol, nicotina, cocaína, o cannabinoides tiene efectos en el fenotipo de la descendencia. La nicotina durante el embarazo se asocia con bajo peso al nacimiento y disminución de las capacidades cognitivas¹⁰¹. Por su parte, la administración de cannabinoides durante el embarazo incrementa la muerte fetal intrauterina y disminuye el peso corporal al nacimiento de los sobrevivientes¹⁰², además de producir alteraciones en el aprendizaje y en la función motora¹⁰³. Mientras que la cocaína durante el embarazo disminuye la ganancia de peso materno y el peso del recién nacido¹⁰¹.

Uno de los modelos más controversiales en el estudio de la programación durante el desarrollo es el del embarazo en la oveja adolescente. Curiosamente, en este modelo, si la madre gestante se alimenta normalmente no se observan alteraciones, mientras que si la madre es alimentada en exceso, el crecimiento materno se mantiene a expensas del crecimiento fetal y se produce RCIU¹⁰⁴; además de disminución del crecimiento placentario¹⁰⁵, hipoxia e hipoglucemia fetal¹⁰⁶. Sin embargo, los autores no ofrecen ninguna explicación metabólica al fenómeno que documentan.

Existen otros modelos que no representan semejanza con condiciones comunes al ser humano, pero que al ser una perturbación extrema aseguran la producción de efectos adversos en el producto. Entre ellos figuran la inmovilización materna aunada a exposición por periodos cortos a una fuente de calor de 150 W, lo cual produce alteraciones hipotalámicas, hormonales y conductuales principalmente en la cría macho¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, la ligación de la arteria uterina seguida de aumento del número de crías por camada durante la lactancia, donde se ha observado RCIU, bajo contenido graso de las crías y disminución de las concentraciones de leptina en la etapa peri pubertal^{110, 111}.

PROGRAMACIÓN DEL EJE REPRODUCTIVO FEMENINO

Durante décadas se han reconocido los efectos de diversas fuentes de estrés en cuanto al desempeño reproductivo. Sin embargo, estos datos sólo han considerado el ambiente actual o reciente a que ha sido expuesto el individuo¹¹². Los efectos del medio ambiente durante el periodo fetal y neonatal como una posible influencia para el posterior desarrollo de la función reproductiva no han sido estudiados en su totalidad⁹⁵. En particular, el aspecto nutricional ha cobrado especial interés dada su posible aplicación en el ámbito agropecuario. En el ganado, la restricción nutricional al inicio de la gestación permite obtener crías que alcanzan un mayor peso a edades tempranas por lo que se invierte menos al momento de venderlas^{95, 113}.

En los últimos años, con el establecimiento de los modelos de programación, se ha avanzado en el conocimiento de los efectos del ambiente intrauterino adverso sobre la capacidad reproductiva. En el ser humano, los estudios epidemiológicos del invierno hambriento holandés muestran que las niñas gestadas durante ese periodo presentaban bajo peso al nacimiento. Aún cuando estas mujeres no mostraron problemas de fertilidad en la vida adulta, fueron más propensas a tener hijos con bajo peso al nacimiento y alta tasa de mortalidad perinatal, principalmente cuando la restricción coincidió con el tercer trimestre de gestación de la propia madre^{31, 41, 42}.

En cuanto a estudios experimentales, los trabajos de Gunn^{114, 115} y Alden¹¹⁶ durante la década de los 70's, fueron los primeros en reportar los efectos del estrés intrauterino en la función reproductiva de las crías. A partir de ahí en pocos estudios se ha continuado con esta línea de investigación, probablemente debido a que se requiere de un tiempo prolongado para llevarse a cabo^{95, 117}. A continuación se describen los efectos a nivel del eje reproductivo femenino en los diferentes modelos experimentales empleados.

Sobre-exposición temprana a glucocorticoides

A pesar de ser uno de los modelos más ampliamente utilizados en el estudio de la programación durante el desarrollo, no existen muchos trabajos que describan los efectos en el eje reproductivo por la sobre-exposición a glucocorticoides en la vida temprana (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos de la sobre-exposición temprana a glucocorticoides en el eje reproductivo femenino.

Compuesto	Periodo de exposición	Especie	Efectos	Ref.
Administración de glucocorticoides				
Dexametasona	F	Rata	Retraso en el inicio de la pubertad (apertura vaginal)	118
Corticosterona	NN	Ratón	Disminución en la tasa de fertilidad	119
Inhibición de la 11β-HSD tipo 2				
Carbenoxolona	F	Rata	Retraso en el inicio de la pubertad (apertura vaginal)	118
Sobre activación del eje HHA				
ACTH	F	Rata	Incremento en la distancia A-G al nacimiento	120
	F	Ratón	Retraso generalizado en el desarrollo, retraso en el inicio de la pubertad (apertura vaginal)	121
	NN	Ratón	Incremento en la duración del ciclo estrol, disminución del tamaño de camada de las hijas	119

F: fetal; NN: neonatal; 11 β -HSD: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; HHA: hipotálamo-hipófisis-adrenal; A-G: ano-genital.

La evidencia experimental presentada en la Tabla 1 muestra en general retraso en el desarrollo sexual y disminución de la tasa de fertilidad en roedores.

En seres humanos, estudios clínicos muestran que el tratamiento prenatal con glucocorticoides resulta en el retraso de la menarca en niñas¹²², pero no influye en el desarrollo psicosexual ni en la preferencia sexual¹²³.

Exposición fetal o neonatal a andrógenos

En los modelos animales, como la oveja, la rata y el ratón, la androgenización prenatal produce la masculinización fenotípica de la hembra¹²⁴ (Tabla 2). Los principales efectos de la masculinización prenatal están dados por el incremento en la distancia ano-genital, claro rasgo de androgenización, así como por otras alteraciones que incluyen anovulación y alteraciones en los ciclos reproductivos. En el ser humano, las hijas de mujeres con ovarios poliquísticos presentan incremento en las concentraciones de hormona anti-mulleriana durante la infancia y previo a la pubertad,¹²⁵. Estas mujeres androgenizadas *in utero* además presentan hirsutismo e hiperinsulinemia, lo que las hace más susceptibles de desarrollar el síndrome ellas mismas⁷⁸.

Exposición fetal o neonatal a compuestos disruptores endócrinos estrogénicos

Sin duda el compuesto estrogénico más ampliamente documentado es el Dietilestilbestrol (DES). El DES fue empleado durante las décadas de los 50 y 60's para prevenir abortos espontáneos y otras complicaciones del embarazo. En los 70's el DES fue retirado del mercado por su implicación en la creciente incidencia de anomalías urogenitales en las niñas y niños expuestos *in utero*¹²⁶. Las denominadas "hijas del DES" son mujeres con alta incidencia de displasia cervical¹²⁷ hipoplasia vaginal, adenoma vaginal de células claras y malformaciones uterinas^{126, 128}, irregularidades menstruales, disminución de fertilidad¹²⁶ así como embarazo ectópico, aborto espontáneo y parto prematuro¹²⁹. La administración de DES durante el desarrollo temprano muestra efectos similares en diversas especies animales como la oveja y el ratón (Tabla 3A). Los CDE con actividad estrogénica también incluyen contaminantes de origen industrial como octilfenol, bisfenol A y fitoestrógenos como la genisteína y la daidzeína.

Tabla 2. Efectos de la exposición temprana a andrógenos en el eje reproductivo femenino.

Compuesto	Periodo de exposición	Especie	Efectos	
Propionato de testosterona	F	Rata	Hipogonadismo	130
			Disminución en la expresión de receptor a progesterona en el hipotálamo	131
			Alteraciones en el ciclo estral, baja receptividad al macho	132
	NN	Rata	Bajo peso al nacimiento. Incremento en la distancia A-G. Menor número de pezones. Masculinización de genitales interno y externos	133
			Masculinización hipotalámica	24, 134
			Anovulación y esterilidad	24
			Masculinización conductual, baja tasa de fertilidad, alteraciones en el ciclo estral	135
	F	Ratón	Incremento en la distancia A-G. Incremento en la sensibilidad conductual a la testosterona	136
	F	Oveja	Masculinización de genitales. Incremento en la distancia A-G	73, 124, 137
			Adelanto de la maduración sexual neuroendócrina	124, 138
			Masculinización sináptica del área preóptica rostral	139
			Aumento en el peso ovárico y número total de folículos. Aumento en la expresión ovárica de folistatinas y disminución en la de inhibina β B	140, 141
			Disminución en el número de folículos primordiales	74
			Alteraciones en la retroalimentación positiva del eje HHO	142, 143
			Incremento en la frecuencia de pulsos de LH	144
			Pérdida progresiva de la ciclicidad	138
			Alteraciones en el ciclo estral, incremento en la incidencia de ciclos anovulatorios	145, 146
Hipergonadotropismo			147	
F	Mono	Retraso de la menarca	148	
		Hiperadrogenismo, anovulación	149-151	
		Hipersecreción de insulina y LH	149, 150, 152	
DHEA	F	Ratón	Incremento en la distancia A-G	136
		Mono	Hipersecreción suprarrenal de andrógenos	153

F: fetal; NN: neonatal; A-G: ano-genital; HHO: Hipotálamo-hipófisis-ovario; DHEA: dehidroepiandrosterona.

Tabla 3A. Efectos de la exposición temprana a compuestos disruptores endócrinos estrogénicos en el eje reproductivo femenino.

Compuesto	Periodo de exposición	Especie	Efectos
Benzoato de estradiol	F	Rata	Disminución en la receptividad al macho
Valerato de estradiol	Pre pubertal	Rata	Adelanto de la apertura vaginal, supresión de la secreción de LH y FSH, disrupción de la dinámica ovárica, anovulación
DES	F	Rata	Liomas uterinos
			Incremento de FSH y LH circulantes
			Maculinización hipotalámica
	F	Ratón	Liomas uterinos
			Infertilidad
Genisteina (Fitoestrógeno)	TG	Ratón	Adenocarcinoma vaginal
	NN	Rata	Mayor peso uterino, adelanto del inicio de pubertad, estro persistente y bajas concentraciones de progesterona circulante, masculinización hipotalámica
Octilfenol (Detergente)	NN	Rata	Estro persistente, disminución en la conducta sexual, masculinización hipotalámica
	F/NN	Oveja	Adelanto de pubertad e incremento de las concentraciones de FSH
Bisfenol A (Plásticos)	NN	Ratón	Cambios en la citología vaginal independientes del ovario

F: fetal; NN: neonatal; TG: transgeneracional; A-G: ano-genital; DES: dietilestilbestrol; PCB: bifenilos policlorados.

Exposición fetal o neonatal a otros compuestos disruptores endócrinos

El contacto con CDE anti-estrogénicos, como los derivados de dioxinas y bifenilos policlorados, previo a la pubertad aparentemente no tiene impacto en la edad de la menarca. Sin embargo a pesar de no ser significativo, las niñas expuestas a este compuesto antes de los 8 años tienden a mostrar retraso en el inicio de la pubertad^{164, 165}. La exposición temprana a este tipo de compuestos se relaciona con el alargamiento de los ciclos menstruales¹⁶⁶. Estos CDE (dioxinas y bifenilos policlorados) también producen alteraciones en el eje tiroideo, lo cual puede repercutir negativamente en el eje reproductivo^{167, 168} (Tabla 3B). Las hormonas tiroideas son indispensables para el desarrollo y crecimiento folicular.

En el estadio preantral los folículos presentan numerosos sitios de unión a hormonas tiroideas¹⁶⁹, por lo que en general, la administración de CDE que afectan al eje tiroideo produce alteraciones reproductivas (Tabla 3B).

La existencia de ventanas críticas durante el desarrollo y la maduración del eje reproductivo produce variaciones en los efectos del CDE, por lo cual el periodo de exposición, así como la dosis juegan un papel crucial en la programación de alteraciones reproductivas.

Tabla 3B. Efectos de la exposición temprana a compuestos disruptores endócrinos en el eje reproductivo femenino.

Compuesto	Periodo de exposición	Especie	Efectos	
ANTI-ESTROGÉNICOS				
Dioxinas	F	Rata	Alteraciones en el ciclo estral, anovulación, bajas concentraciones circulantes de estradiol	170
	F/TG	Rata Criceto	Bajo peso uterino y ovárico, retraso en apertura vaginal, disminución en la fecundidad, alteraciones en el ciclo estral, filamentos de tejido persistentes en el orificio vaginal	171
PCB	F/NN	Rata	Disminución de la inmunoreactividad a ERβ en los núcleos periventriculares anteroventrales hipotalámicos	172
	F	Criceto	Retraso del inicio de pubertad, disminución de la fecundidad, y alta tasa de muerte materna y fetal en el periodo perinatal	171
ANTI-ANDROGÉNICOS				
Flutamida	F	Rata	Disminución de la distancia A-G	173
			Alteraciones en la conducta sexual	174
ACCIÓN INDIRECTA				
Dioxinas /PCB	F	Rata	Alteraciones en la dinámica ovárica	175
Sales perclóricas	F	Rata	Disminución del número de folículos preantrales y antrales con mayor atresia en los preantrales	176

F: fetal; NN: neonatal; TG: transgeneracional; A-G: ano-genital; DES: dietilestilbestrol; PCB: bifenilos policlorados.

Manipulación nutricional

La manipulación nutricional materna, en particular la hipocalórica, ha mostrado algunas alteraciones en el eje HHO. En general, en la rata se ha mostrado el retraso en el inicio de la pubertad¹⁷⁷ y en la oveja, la disminución de la tasa de fertilidad de las crías^{114, 117, 178} (Tabla 4). En el caso de la restricción proteínica (isocalórica), hasta el momento no se han realizado estudios que identifiquen las posibles alteraciones en la función del eje reproductivo femenino.

Por su parte, diversos estudios epidemiológicos han asociado el estrés nutricional intrauterino con el incremento en el riesgo en la incidencia del síndrome de ovarios poliquísticos^{36, 94, 179}, cáncer de ovario¹⁸⁰ y de mama^{94, 181}.

Tabla 4. Efectos de la restricción nutricional materna en el eje reproductivo de las crías hembras.

Especie	Periodo de exposición	Efecto	
Restricción nutricional hipocalórica			
Rata	F	Retraso en el inicio de pubertad, alteración en las poblaciones foliculares, hipersecreción prepubertal de FSH, reducción del peso uterino	177
Oveja	F	Retraso en el desarrollo ovárico fetal	182, 183
		Alteración en las poblaciones foliculares fetales	183
		Daño al DNA por estrés oxidativo en ovocitos fetales	184
	F/NN	Disminución de la tasa de fertilidad	114, 117, 178

F: fetal; NN: neonatal.

Exposición temprana a otras condiciones adversas

En el ser humano y los diferentes modelos animales existentes, los efectos observados por la exposición temprana a diversas fuentes de estrés varían según el tipo de condición adversa a que es expuesta la cría. En el ser humano, el embarazo adolescente es considerado un problema de salud pública que representa aproximadamente la quinta parte de los nacimientos^{185, 186}. Se asocia con anemia, disminución de la ganancia de peso materno, parto prematuro¹⁸⁷, alta tasa de mortalidad materna y del producto¹⁸⁵. Sin embargo, hasta ahora no se han reportado alteraciones reproductivas en las hijas producto de embarazos

adolescentes. En el modelo de la oveja adolescente gestante, las crías hembras presentan modificaciones en la regulación de LH^{188, 189} (Tabla 5).

Tabla 5. Efectos de la exposición temprana a diversas condiciones adversas en la programación del eje reproductivo de las crías hembras.

Condición	Periodo de exposición	Especie	Efecto		
Embarazo adolescente	F	Oveja	Alta concentración de LH	188	
			Incremento en la expresión hipofisaria de LH β ,	189	
Exposición a compuesto tóxico-adictivos					
Alcohol	F	Rata	Retraso en el inicio de pubertad, aumento en el número de neuronas GnRH inmunopositivas en el área preóptica medial	190, 191	
			Disminución en la concentración plasmática de LH	192	
			Disminución en el contenido hipotalámico de GnRH	191, 192	
	Nicotina	F	Ratón	Retraso en el inicio de pubertad	193
		F	Rata	Retraso en el inicio de pubertad	194
				Disminución en la secreción pre pubertal de LH	194
		NN	Rata	Retraso en el inicio de pubertad	194
F/NN	Incremento en la concentración de LH en el periodo peri pubertal	194			
Cocaína	F	Rata	Incremento en la distancia A-G	101	
Condiciones extremas					
Inmovilización materna y calor	F	Rata	Alargamiento del ciclo estral	195	
			Baja tasa de concepción, aborto espontáneo, embarazo largo y alta tasa de mortalidad de las crías de la F2 al nacimiento	196	
		Ratón	Retraso en el inicio de pubertad, ciclos estrales largos y baja tasa de fertilidad	197	
Insuficiencia placentaria	F	Rata	Retraso en el inicio de pubertad	110	
	NN	Rata	Retraso en el inicio de pubertad (apertura vaginal y primer estro)	110 198	

F: fetal; NN: neonatal, A-G: ano-genital, F2: Segunda generación.

Probablemente los modelos de mayor interés por su aplicación en el ser humano son los que incorporan la exposición a sustancias adictivas. En la mujer, el antecedente de tabaquismo materno durante el embarazo se asocia con la disminución de la fecundidad comparado con mujeres no expuestas¹⁹⁹, mientras que el alcoholismo durante el embarazo incrementa la tasa de mortalidad perinatal²⁰⁰. La exposición a este tipo de sustancias se asocia con retraso en el desarrollo sexual y alteraciones en los perfiles hormonales en animales de laboratorio (Tabla 5).

Además de los anteriores, los modelos que emplean como fuente de estrés estímulos extremos para asegurar la aparición de efectos adversos en la descendencia, también muestran efectos a nivel reproductivo. En roedores, se ha observado el retraso en el inicio de pubertad y el alargamiento del ciclo estral asociados a inmovilización materna con aumento de la temperatura^{195, 196}, así como por la inducción quirúrgica de insuficiencia placentaria y el aumento de crías por camada¹⁹⁸ (Tabla 5).

JUSTIFICACIÓN

El estudio de la programación durante el desarrollo es relativamente nuevo. Los estudios pioneros de Barker¹⁶, no tuvieron un gran impacto al tiempo de su publicación (1986). Sin embargo, a fines de los 90's la aparición de nuevos trabajos clínicos contundentes incrementó el interés en esta área de investigación. Los estudios epidemiológicos y clínicos relativos al Invierno Hambriento Holandés junto con la creciente evidencia experimental en especies de laboratorio han establecido un área sólida en el conocimiento del origen de la salud y la enfermedad. Hasta ahora la mayor parte de los estudios realizados con relación a la programación durante el desarrollo se ha enfocado principalmente a los efectos de la misma sobre el síndrome metabólico en la descendencia. En cuanto al estudio de los ejes neuroendócrinos, el eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal ha cobrado la mayor atención por su implicación en la hipertensión y en cierto grado en el metabolismo de la glucosa. A pesar de que el estudio del eje reproductivo, tanto femenino como masculino, es de gran importancia en términos ecológicos y de salud reproductiva, la programación de este eje ha recibido menos atención. En particular, el estudio de las hembras se hace indispensable debido a que en el ovario, el número de células germinales al nacimiento es limitado y se encuentra en constante descenso durante la etapa reproductiva. Aún cuando en los últimos tres años se ha incrementado considerablemente el número de publicaciones respecto a la programación del eje Hipotálamo-hipófisis-gónada, la mayor parte corresponden a la exposición prenatal y neonatal a exceso de hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) y a compuestos disruptores endócrinos presentes en el medio ambiente, sin que se estudien en detalle los efectos de la desnutrición materna.

Diversos estudios relacionados con la programación de la salud y la enfermedad proponen que la habilidad de una madre gestante para nutrir a su hijo

se establece durante su propia vida fetal, así como su experiencia nutricional durante la niñez. Esto determina su talla, composición corporal y metabolismo, los cuales a su vez influyen en la salud que hereda a sus hijos ^{14, 42}. Así pues, cambios mínimos en la dieta de la mujer durante el embarazo podrían originar alteraciones en la descendencia que a largo plazo han demostrado relación con el desarrollo de enfermedades en el adulto^{41, 42}, por lo que mejorar la nutrición y composición corporal de las niñas y mujeres jóvenes protegería el crecimiento y salud de las futuras generaciones. La evidencia observada en la programación del eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal, sugiere que podría haber un efecto semejante a diferentes niveles del eje reproductivo⁹⁵, mientras que estudios en el modelo del Invierno Hambriento Holandés muestran el paso de los efectos de la desnutrición materna durante la gestación a la generaciones siguientes^{41, 42}.

Empleando el enfoque nutricional, se ha mostrado que la desnutrición materna en ovejas hembras puede retrasar significativamente el desarrollo del ovario fetal^{182, 183}. También se ha observado que la desnutrición durante la vida fetal retrasa el inicio de la pubertad¹⁸⁸ y provoca disminución en la tasa de fertilidad¹¹⁷. Sin embargo, hasta ahora no se han identificado los efectos endócrinos que pudieran estar involucrados en estas alteraciones ni se han realizado estudios a largo plazo que describan el final de la vida reproductiva.

El propósito del presente proyecto es el estudio de los efectos del ambiente intrauterino adverso –empleando el modelo de restricción proteínica– sobre el desarrollo sexual y la función ovárica. Para tal fin, se incluyen algunos parámetros de la función reproductiva que influyen en la fertilidad de la hembra desde antes de la pubertad hasta el final de la etapa reproductiva. Los resultados identifican alteraciones en la función reproductiva cuyo origen se encuentra determinado por la calidad del ambiente intrauterino y neonatal, y que podrían estar implicados en un incremento en el riesgo de trascender a las siguientes generaciones.

HIPÓTESIS.

La restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos programará alteraciones en el desarrollo sexual y la función reproductiva de las crías hembras de rata a diferentes niveles del eje reproductivo femenino. Estas alteraciones se traducirán en el retraso del inicio de la pubertad y la disminución de la tasa de fertilidad.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

- Describir los efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo y la lactancia en el desarrollo sexual, las concentraciones hormonales, la ciclicidad y la capacidad reproductiva de las crías hembras de rata.

Objetivos Particulares:

- Establecer un modelo experimental que permita estudiar los efectos de la restricción proteínica materna durante periodos críticos del desarrollo fetal y neonatal en la función reproductiva de las crías hembras.
- Estudiar los efectos de la restricción proteínica en las madres evaluando la ganancia de peso así como la ingesta alimenticia y energética durante el embarazo y la lactancia.
- Analizar los efectos de la restricción proteínica durante la gestación sobre las características de la camada (número y sexo), y diferentes parámetros morfométricos (peso, talla, diámetro cefálico y abdominal) de las crías hembras al nacimiento.
- Estudiar los efectos de la restricción proteínica materna durante la gestación en la distancia ano-genital de las crías hembras al nacimiento.
- Realizar estudios fisiológicos comparativos del inicio de la pubertad, el ciclo estral y la tasa de fertilidad de las hembras de los diferentes grupos experimentales.
- Realizar estudios comparativos de las concentraciones circulantes de esteroides sexuales (progesterona, estradiol y testosterona) y de

gonadotropinas (LH y FSH) de las crías de madres que padecieron restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos y las crías producto de alimentación normal.

- Realizar estudios comparativos de la expresión ovárica de genes clave en la vía esteroidogénica (StAR, P450scc, P450aromatasa), así como de los receptores a gonadotropinas (FSH-R y LH-R).

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Modelo experimental.

Establecimiento del modelo experimental

Con el fin de establecer un modelo experimental que permitiera la evaluación de los efectos de la restricción proteínica intrauterina y neonatal sobre la función reproductiva de la rata hembra se realizaron experimentos preliminares en los que se emplearon diferentes dietas y condiciones maternas para fijar ciertos parámetros indispensables para continuar con el proceso experimental de una manera óptima, determinando los puntos críticos a ser tomados en cuenta. Tales parámetros fueron el peso y la edad maternos, el uso de dietas isocalóricas con diferente contenido de proteína (20 y 10%), así como los periodos en que se debía aplicar la restricción proteínica a la madre; estableciéndose las condiciones que se plantean a continuación.

Animales y alojamiento

Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12:12 horas), así como de humedad y temperatura (75% Humedad Relativa, y 23°C). Todos lo procedimientos fueron aprobados por el Comité de Investigación en Animales (CINVA) del INCMNSZ y están acordes con la guía para el uso y cuidado de los animales laboratorio del *National Research Council* (EUA)²⁰¹.

Se emplearon 64 ratas hembras albinas nulíparas de la cepa Wistar entre 10 y 12 semanas de edad y con un peso de 240 ± 20 g. Las ratas fueron apareadas con machos de fertilidad probada, se obtuvieron frotis vaginales y el día en el que se encontraron tapón espermático o espermatozoides se designó

como día de la concepción. Las hembras gestantes fueron asignadas aleatoriamente a los diferentes grupos experimentales (Figura 1).

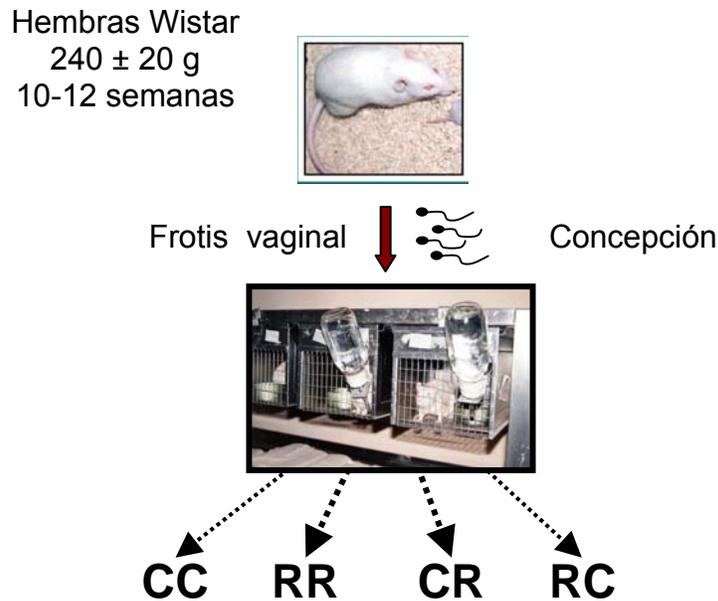


Figura 1. Ratas hembras Wistar de 10 a 12 semanas de edad con peso aproximado de 240 g fueron apareadas con machos de fertilidad probada y sin ningún tipo de tratamiento, la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal indicó el día de la concepción. Las hembras gestantes fueron distribuidas aleatoriamente en los grupos experimentales.

Alimentación

El uso de dietas a base de caseína ha sido reportado previamente^{48, 92}, se emplearon dos dietas isocalóricas con diferente contenido de caseína, la dieta control (**C**) con el 20% de proteína y la restringida (**R**) con únicamente 10% de caseína y suplementadas con celulosa (fibra dietética) y L-cistina de acuerdo a lo reportado por Zambrano et. al. en 2005 (Tabla 6)⁵¹. El alimento fue preparado en forma de galletas duras, con el fin de que las ratas pudieran roerlo. En la dieta **R**, se incrementó el contenido de hidratos de carbono para proporcionar el mismo aporte energético en ambas dietas.

Tabla 6. Composición de las dietas experimentales.

Ingrediente	Dieta C	Dieta R
	Caseína 20% (g/100 g)	Caseína 10% (g/100 g)
Caseína libre de vitaminas	20	10
L-cistina dihidroclorada	0.3	0.15
Mezcla de Vitaminas AIN-93-VX	1	1
Clorhidrato de Colina	0.165	0.165
Mezcla de Minerales Rogers-Harper	3.5	3.5
α -Celulosa –fibra–	5	5
Aceite de maíz –lípidos–	5	5
Dextrosa Anhidra	32.5	37.5
Almidón de maíz	32.5	37.5
Contenido energético	3.85 Kcal/g	3.85 Kcal/g

Se emplearon dos diferentes dietas isocalóricas, **C** (Control, caseína 20%) y **R** (Restringsida, caseína 10%). Todos los componentes fueron grado alimenticio. Los siguientes ingredientes fueron adquiridos de Harlan-Teckland , EUA: caseína libre de vitaminas (Cat. 160090), L-cistina dihidroclorada (Cat. 10360), mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Cat.TD94047), mezcla de minerales Rogers-Harper (Cat. 170760), dextrosa anhidra (Cat. 160195) y almidón de maíz (Cat. 160170). De Sigma-Aldrich, St Louis MO, EUA, se obtuvieron: clorhidrato de colina (Cat. C2004) y α -celulosa –fibra– (Cat. C8002). El aceite de maíz se obtuvo de La Gloria, México.

Grupos experimentales

El diseño experimental contempló diferentes esquemas de alimentación durante la gestación, la lactancia o ambos considerando la existencia de ventanas críticas en el desarrollo del eje reproductivo^{24, 107, 134, 202}. Se tuvieron tres grupos experimentales además de un grupo control, la designación de los grupos corresponde a las dietas recibidas por la madre durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra– (Figura 2).

CC: Las madres fueron alimentadas con la dieta **C** durante el embarazo y la lactancia.

RR: Las madres fueron alimentadas con la dieta **R** durante el embarazo y la lactancia.

CR: Las madres fueron alimentadas con la dieta **R** únicamente durante la lactancia.

RC: Las madres fueron alimentadas con la dieta **R** únicamente durante el embarazo.

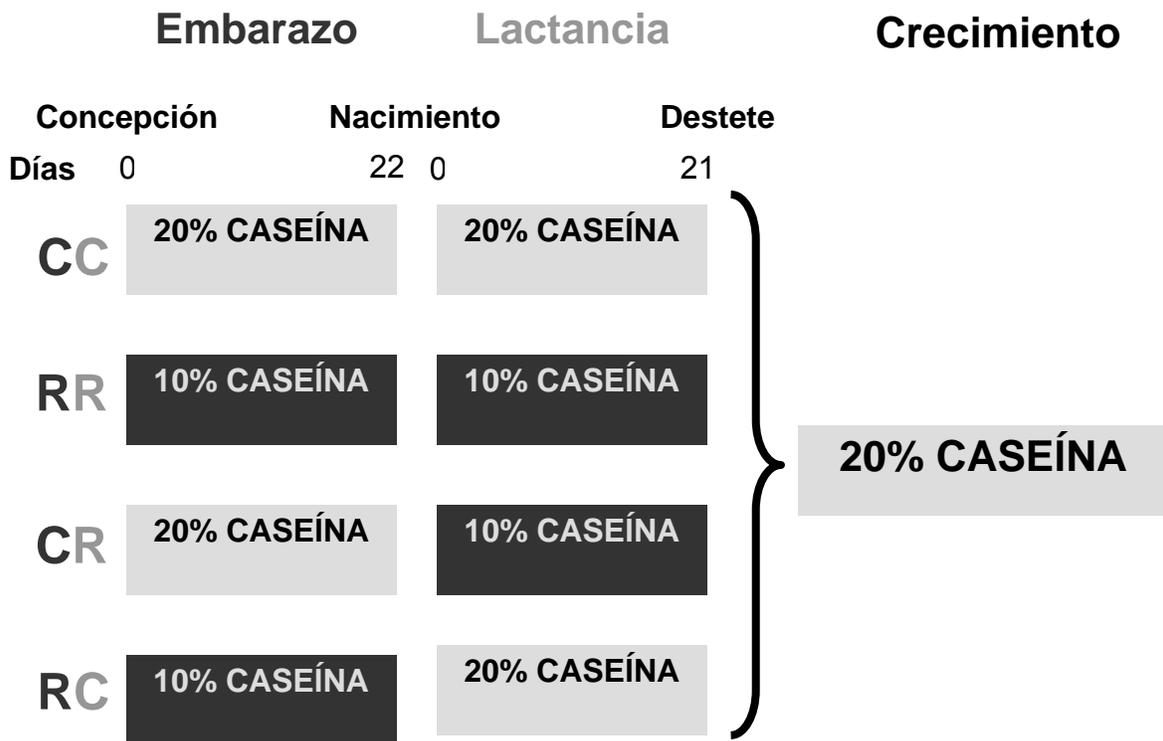


Figura 2. Se tuvieron cuatro grupos experimentales. Las madres fueron alimentadas con la dieta C (caseína 20%) o R (caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y durante la lactancia –segunda letra. Después del destete (día 21 de vida), todas las crías fueron alimentadas con la dieta C por el resto del estudio.

Manejo de las madres durante el embarazo y la lactancia

Durante el embarazo, las ratas gestantes fueron mantenidas en jaulas metabólicas para monitorear el consumo de alimento así como el peso diario. El día 20 de gestación, las madres fueron transferidas a jaulas de acrílico con cama de viruta donde permanecieron durante el parto (día 22 de gestación y día del nacimiento de las crías) y la lactancia. El peso y la ingesta también fueron registrados en la lactancia. Después del destete las madres fueron descartadas del estudio.

Análisis de la ingesta alimenticia y energética

La cantidad de alimento consumido fue determinada por diferencia de pesada entre los gramos de alimento inicial en el comedero y los gramos de alimento en el comedero después de 24 horas. La ingesta de proteína, carbohidratos y lípidos se calculó con base en la composición de cada componente en la dieta (C –caseína 20%– o R –caseína 10%–) y a los gramos de dieta consumidos por día.

Manejo de las crías hembras hasta la vida adulta

El destete se realizó a los 21 días de edad. A partir de ese día todas las crías fueron alimentadas con la dieta **C** hasta el final del experimento (Figura 2). Se llevó un registro semanal del peso de las crías hembras durante el resto del estudio.

Sacrificio

El sacrificio de diferentes grupos de crías se realizó en varias edades durante la vida post natal, 2, 21, 70 días y 22 meses. Las hembras de los diferentes grupos experimentales se colocaron en ayuno durante doce y se sacrificaron por decapitación en la fase de diestro del ciclo estral. Se colectó la sangre del tronco, se obtuvo el suero mediante centrifugación a 2500 x g durante 10 minutos. El suero fue mantenido a –20°C hasta el día del ensayo. Se disecaron los ovarios y el útero y se registraron sus pesos secos. Considerando su posición

en la cavidad abdominal, el ovario izquierdo conserva mejor su integridad morfológica por lo que se colocó en solución de paraformaldehído al 4% en PBS (pH = 7.4) para su posterior inclusión en parafina; el ovario derecho se congeló a -70°C .

II. Estudios maternos y neonatales

Concentraciones hormonales maternas y neonatales

A los 19 días de embarazo, se colectó una muestra de sangre de la vena de la cola de un grupo de 30 hembras gestantes (13 **C** –control– y 17 **R** –restringidas–). El suero se obtuvo como se indica en la sección de sacrificio. Se analizaron las concentraciones maternas circulantes de progesterona, estradiol, testosterona, corticosterona y prolactina por el método de RIA. Estas ratas presentaron parto espontáneo a los 22 días de gestación. Las madres permanecieron con la misma dieta por dos días posterior al parto. Las crías fueron pesadas al nacimiento y se registró el sexo. Para identificar el sexo de las crías se empleó la distancia ano-genital: hembras $< 2.5\text{ mm}$ y machos $> 2.5\text{ mm}$ ²⁰³. A los dos días de nacidas las hembras neonatas fueron sacrificadas. Se colectó la sangre del tronco y se obtuvo el suero. Se determinaron las concentraciones de corticosterona en suero en las neonatas por el método de radioinmunoanálisis (RIA).

Manejo de las camadas al nacimiento

Al nacimiento todas las crías fueron pesadas y clasificadas por sexo, se registraron el número de crías por camada, la talla, el diámetro cefálico y abdominal; estos últimos, como parámetros para evaluar el impacto de la restricción proteínica materna durante la gestación. Se ajustaron las camadas a un total de 10 a 12 crías por madre conservando una relación de machos y hembras de aproximadamente 1:1 y descartando aquellas camadas en que hubieran nacido menos de 10 o más de 14 crías.

Parámetros morfométricos

Mediante el uso de un vernier se determinó la talla de las crías hembras al nacimiento, se midió de la punta de la nariz a la base de la cola. Se midió el diámetro cefálico tomando como base la altura de las orejas y se determinó el diámetro abdominal midiendo en la base de las costillas (Figura 3).

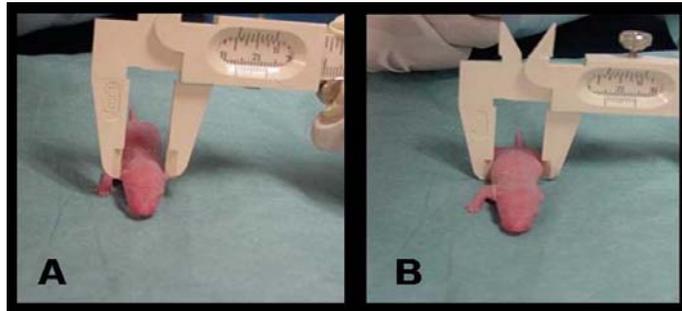


Figura 3. Parámetros morfométricos como el diámetro cefálico (A) y abdominal (B), se determinaron mediante el uso de un vernier como se indica en la figura.

Distancia ano-genital al nacimiento

La distancia ano-genital se midió como un parámetro para determinar los efectos del estrés nutricional materno en el desarrollo sexual de las crías hembras al nacimiento. Mediante el uso de un vernier se determinó la distancia entre el ano y el poro genital (Figura 4).



Figura 4. Mediante el uso de un vernier se midió la distancia ano-genital en las crías al nacimiento como se muestra en la figura.

III. Estudios fisiológicos del eje reproductivo

Inicio de la pubertad

A partir del día 30 de vida, las hembras de los diferentes grupos fueron revisadas diariamente para determinar la edad de inicio de la pubertad la cual se determinó tanto por la apertura vaginal como por el primer estro. A partir de la apertura vaginal se tomaron frotis vaginales para determinar la edad del primer estro (Figura 5).



Figura 5. La figura muestra la sujeción de la rata para la toma del frotis vaginal. El asa debe esterilizarse y dejarse enfriar al aire previo a tomar la muestra.

Estudio del ciclo estral

El ciclo estral de las hembras de los diferentes grupos experimentales se evaluó a diferentes edades: inicio de la pubertad (edad de la apertura vaginal aproximadamente 37 días) y posteriormente a los 140 días, 12 y 22 meses. A estas edades, se tomaron frotis vaginales diariamente durante periodos de 10 días para determinar la longitud del ciclo y sus etapas (Figura 6).

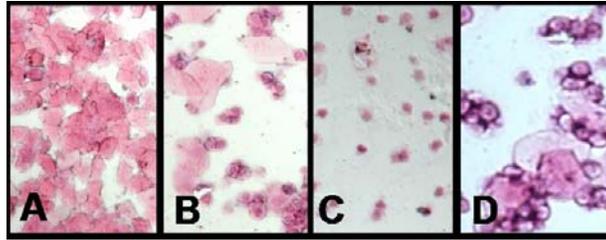


Figura 6. La figura muestra la citología vaginal de la rata correspondiente a las etapas del ciclo estral: (A) estro, (B) metaestro, (C) diestro y (D) proestro.

Tasa de fertilidad

A los 150 días de vida se evaluó la tasa de fertilidad colocando dos hembras con un macho de fertilidad probada durante un periodo de cinco días para así asegurar que se presentara al menos un proestro durante el tiempo de apareamiento. Se determinó la proporción de hembras que quedaron preñadas por grupo. Este mismo procedimiento se realizó a los 12 meses de edad, en esta ocasión el periodo de apareamiento fue de siete días debido a que los ciclos a esta edad son más largos.

IV. Estudios bioquímicos

Análisis de las concentraciones de progesterona, estradiol, testosterona y corticosterona por RIA

Las concentraciones circulantes de progesterona, estradiol, testosterona y corticosterona se determinaron por RIA's específicos DPC Coat-A-Count (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EUA; Cat. TKPG2, TKE22, TKTT2 y TKRC1 respectivamente). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Los coeficientes de variación intraensayo fueron 2%, 2%, 3% y 2%; interensayo 4%, 3%, 5% y 4%; y la sensibilidad: 0.02 ng/mL, 0.8 pg/mL, 0.04 ng/mL y 5.7 ng/mL; para progesterona estradiol, testosterona y corticosterona respectivamente.

Análisis de la concentración de rFSH por RIA

La concentración de rFSH en suero se determinó por el método de RIA de doble anticuerpo, empleando los reactivos donados por el NIDDK (National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, EUA) y usando como referencia el estándar NIDKK-rFSH-RP2. FSH de rata fue radiomarcada con ^{125}I mediante la técnica de Cloramina T (Sigma-Aldrich, Cat. C9887), con posterior separación de la proteína marcada y el ^{125}I por columnas de Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, Cat. S6147). Se emplearon 100 μl de suero por tubo. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Los coeficientes de variación intraensayo, interensayo y la sensibilidad fueron: < 9%, <14% y 0.035 ng/mL respectivamente.

Análisis de la concentración de rLH por RIA

La rLH presente en las muestras fue determinada mediante RIA específico, utilizando los reactivos donados por el NIDDK, y usando como referencia el estándar NIDKK-rLH-RP3. LH de rata fue radiomarcada con ^{125}I mediante la técnica de cloramina T, con posterior separación de la proteína marcada y el ^{125}I por columnas de Sephadex G-100. Se emplearon 100 μl de suero por tubo. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Los coeficientes de variación intraensayo, interensayo y sensibilidad fueron: < 7%, < 12% y 0.02 ng/mL respectivamente.

Análisis de la concentración de rProlactina por RIA

La Prolactina de rata fue determinada mediante el uso de un estuche comercial específico (Biocode-Hycel, Bélgica; Cat. AH R011). Sólo se realizó un ensayo y el coeficiente de variación intraensayo y sensibilidad fueron: < 6% y 1.07 ng/mL respectivamente.

V. *Estudios moleculares*

Obtención de cDNA

Los ovarios derechos se descongelaron en hielo. Se realizó la extracción del RNA total mediante el uso del *TRIzol* (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA, Cat. 1559-026). Una vez extraído el RNA fue cuantificado mediante absorción ultravioleta y mantenido a -70°C . Para sintetizar la primera hebra de cDNA se utilizaron 5 μg del RNA extraído previamente y el estuche *SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Cat. 11904-018).

Síntesis y marcaje de sondas específicas

Se colectaron ovarios de ratas hembras albinas de la cepa Wistar de aproximadamente 70 días de edad sin ningún tipo de tratamiento experimental. Los tejidos fueron conservados a -70°C . Se extrajo el RNA y se obtuvo el cDNA. Se amplificó cada uno de los genes de interés mediante PCR empleando los oligonucleótidos específicos descritos en la Tabla 7. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa. Los fragmentos correspondientes a los pesos moleculares esperados para cada una de las diferentes sondas fueron purificados mediante el estuche *Freeze 'n Squeeze Gel Extraction Spin Columns* (BioRad, CA, EUA, Cat. 732-6165). Las sondas obtenidas fueron marcadas mediante una reacción de PCR que incluye dUTP marcado con digoxigenina además de nucleótidos no marcados con el estuche *PCR Dig Probe Synthesis Kit* (Roche, Penzberg, AI, Cat. 11636090910). Se confirmó el marcaje de la sonda mediante corrimiento electroforético en geles de agarosa, en donde la sonda marcada mostraba mayor peso molecular con respecto a la sonda no marcada. La sonda marcada fue entonces purificada y posteriormente desnaturalizada a 95°C por 10 minutos y disuelta en 25 mL de solución estándar de hibridación (12.5 mL de SCC 20X, 500 μL de N-Laurilsarcosina 10%, 50 μL de SDS 20%, 5 mL de solución de bloqueo 1X (Roche, Cat. 1096176)). Esta solución fue empleada posteriormente en la hibridación de las membranas.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti-sentido	Peso
StAR	5'-ccagcaaggagaggaagctat-3'	5'agcacacaggtggaacctct3'	370 pb
P450scc	5'-atgctggcaaaaggtcttt-3'	5'-cctgtaaattggggccata-3'	310 pb
P450arom	5'-cctggcaagcactccttattc-3'	5'-taccgcaggatattcgtaaat-3'	430 pb
rLH-R	5'-gaatgctttccaaggatga-3'	5'-cctcaaagatggcggaataa-3'	470 pb
rFSH-R	5'-gagtcattcccgaaggatca-3'	5'-taaaatgactggcccagagg-3'	494 pb
Ciclofilina	5'-ccccaccgtgttcttcgacat-3'	5'-gctggcttggcattcctgga-3'	451 pb

Los oligonucleótidos mostrados se construyeron para el estudio de la expresión de los genes StAR, P450 scc, P450 aromatasa, rLH-R y rFSH-R.

Expresión semicuantitativa de StAR, P450 scc, P450 aromatasa, rLH-R y rFSH-R en ovario

La expresión relativa de los genes de interés se analizó mediante *Southern Blot*. Se obtuvo el cDNA y fue amplificado mediante programas de PCR específicos para cada uno de los genes en estudio y usando los oligonucleótidos descritos anteriormente. Los programas se describen en la Tabla 8. Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X, empleando un voltaje constante de 90V. Posterior a un lavado de 30 minutos en solución alcalina (pH = 11) y otro de 30 minutos en solución neutra (pH = 7.4), los geles fueron transferidos por capilaridad a membranas de nylon *Zeta Probe* cargadas positivamente (Bio-Rad, Cat.162-0159). Una vez transferidos los fragmentos de DNA a las membranas, fueron fijados mediante tratamiento con luz UV (*crosslink*).

Tabla 8. Programas de PCR.

	StAR	P450scc	P450arom	rLH-R	rFSH-R
Número de Ciclos	30	30	30	35	35
Desnaturalización	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
	30 seg.	30 seg.	30 seg.	30 seg.	30 seg.
Alineamiento	60°C	65°C	60°C	60°C	62°C
	30 seg.	30 seg.	30 seg.	30 seg.	30 seg.
Elongación	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
	30 seg.	30 seg.	30 seg.	30 seg.	30 seg.

Se emplearon programas específicos para el estudio de la expresión semicuantitativa de los genes de StAR, P450 scc, P450 aromatasa, rLH-R y rFSH-R en el ovario de la rata.

Hibridación y Southern Blot

Las membranas fueron prehibridadas en solución estándar de hibridación, durante 24 horas a 68°C. Posteriormente, se hibridó durante 24 horas con la sonda marcada con digoxigenina en solución estándar de hibridación en una dilución de 1:2 para la sonda específica de cada gen y 1:6 para la sonda marcada de Ciclofilina. Las temperaturas de hibridación fueron: 60°C para StAR, 62°C para P450 aromatasa y 65°C para P450 scc, rLH-R y rFSH-R. Se realizaron lavados: dos veces con solución de lavado 1 (SSC 2X, SDS 0.2%) por 15 minutos con agitación, dos lavados con solución de lavado 2 (SCC 0.2X, SDS 0.2%) por 15 minutos con agitación, cada uno a temperatura ambiente, un tercer lavado con solución de lavado 2 por 15 minutos con agitación a 68°C y finalmente con solución de lavado 3 (Tween 20 al 3% en solución de ácido maléico 0.1 M y NaCl 0.15 M a pH 7.5) por 5 minutos con agitación. La membrana se incubó por 45 minutos en solución de bloqueo 1X, seguido de una incubación con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche, Cat. 1 093 274) a una dilución de 1:10000 en solución de bloqueo durante 45 minutos. Finalmente, se eliminó el exceso con solución de lavado 3 por 15 minutos con agitación, la membrana se colocó en 50 mL de solución de detección (TRIS-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, de MgCl₂ 50 mM, a pH 9.5) durante 10 minutos. La membrana fue colocada en un folder de plástico en donde

se le agregó 1 mL de sustrato para fosfatasa alcalina, *CSPD* (Roche, Cat. 1 655 884) en una dilución de 1:250 en solución de detección, se incubó 5 minutos y se eliminó el exceso de sustrato. La membrana se incubó durante 30 minutos a 37°C. y se colocó dentro de un casete para exponer una placa fotográfica específica para quimioluminiscencia (*Lumi Film Chemiluminescent Detección Film*, Roche, Cat. 11 666 65700) durante 10 a 30 minutos. Se reveló la placa previamente expuesta. La expresión relativa respecto al gen constitutivo de la ciclofilina se determinó mediante densitometría. Se utilizó el analizador de imágenes *EagleEye-System* (Stratagene, EUA).

VI. Estudios histológicos

Evaluación de las poblaciones de folículos preantrales y antrales

Los ovarios izquierdos obtenidos al sacrificio, se limpiaron eliminando el exceso de grasa, se pesaron y fijaron en solución de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos a pH 7.4. Después de 12-18 horas de fijación los ovarios fueron sometidos a deshidratación gradual pasando por concentraciones crecientes de etanol en tiempos de 30 minutos cada uno. Posterior a este tratamiento, los ovarios fueron preparados para su inclusión en parafina colocándolos en xileno en tiempos de 1 hora seguido de parafina líquida a 60°C; los ovarios se incluyeron en bloques.

Se obtuvieron cortes seriados de 10 μm , los cuales fueron teñidos con Hematoxilina (Sigma-Aldrich, Cat. H3136) y Eosina Y (Sigma-Aldrich, Cat. HT110-2-32) para identificación de los folículos. Las poblaciones foliculares se clasificaron de acuerdo al número de capas de células foliculares, a la morfología de las mismas y a la presencia de la cavidad antral en: folículos preantrales si presentaban más de 2 capas de células foliculares cuboidales y carecían de cavidad antral (Figura 7A) y folículos antrales cuando presentaban más de 2 capas de células foliculares y el ovocito se mostraba claramente rodeado por su corona radiada en la cavidad antral (Figura 7B). La cuantificación se realizó tomando en

cuenta estas poblaciones y únicamente se consideraron los folículos en que se apreciaba claramente el ovocito con su nucléolo.

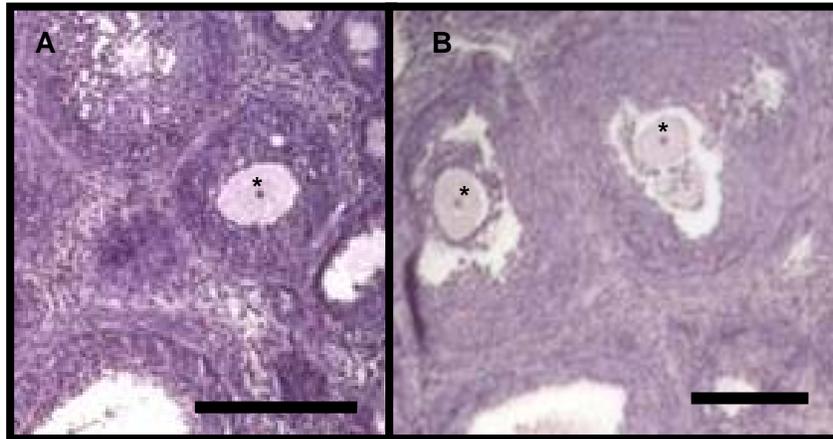


Figura 7. La figura muestra cortes de ovario de rata. A: folículo preantral. B: folículos antrales. El asterisco muestra el nucleolo de los ovocitos en cada folículo. La barra de calibración representa 100 μm .

VII. Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar, a excepción de los casos de fertilidad y sobrevivencia que se expresaron como proporciones. La n corresponde al número de camadas analizadas, se utilizaron de 1-2 crías por camada. En los casos en que se tomó más de un individuo por camada, los datos fueron promediados y empleados como una camada. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguida por la prueba Post Hoc de Tukey. También se emplearon las pruebas de t de student y χ^2 en los casos que fue conveniente. Se consideró significativo a $p < 0.05$.

RESULTADOS

I. Efectos de la restricción proteínica en las madres y las camadas durante la gestación y la lactancia.

Peso materno durante el embarazo y características de la camada al nacimiento

A pesar de que no se observaron diferencias significativas en el peso materno durante el embarazo, la ganancia de peso fue significativamente menor en las madres restringidas en proteína ($p < 0.05$, Tabla 9). No se encontraron diferencias estadísticas en el tamaño de las camadas ni en la proporción machos:hembras.

Tabla 9. Peso materno durante la gestación y características de la camada al nacimiento.

	C	R
Peso materno (g) al inicio de la gestación	243.2 ± 2.93	246.3 ± 7.72
Peso materno (g) a 20 dG	381.1 ± 6.29	370.0 ± 12.56
Ganancia de peso materno (g) a 20 dG	137.9 ± 1.80	123.7 ± 2.56*
% ganancia de peso a 20 dG	57.9 ± 1.18	50.2 ± 1.75*
Tamaño de la camada (crías)	14.3 ± 0.37	13.7 ± 0.37
% crías hembras	50.88	52.19
% crías machos	49.12	47.81

Las ratas fueron alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (restringida, caseína 10%) durante el embarazo. dG: días de gestación. t de Student, media ± error estándar; n: C = 11, R = 12 madres o camadas; * $p < 0.05$ vs C.

Ingesta alimenticia materna durante el embarazo y la lactancia

La ingesta de alimento no fue significativamente diferente entre las madres control y las restringidas en proteína durante el embarazo (Figura 8). Durante los primeros diez días de la lactancia, la ingesta materna no presentó modificaciones entre los grupos, sin embargo para la segunda mitad de la lactancia se observó menor ingesta en los grupos restringidos en proteína (RR y CR).

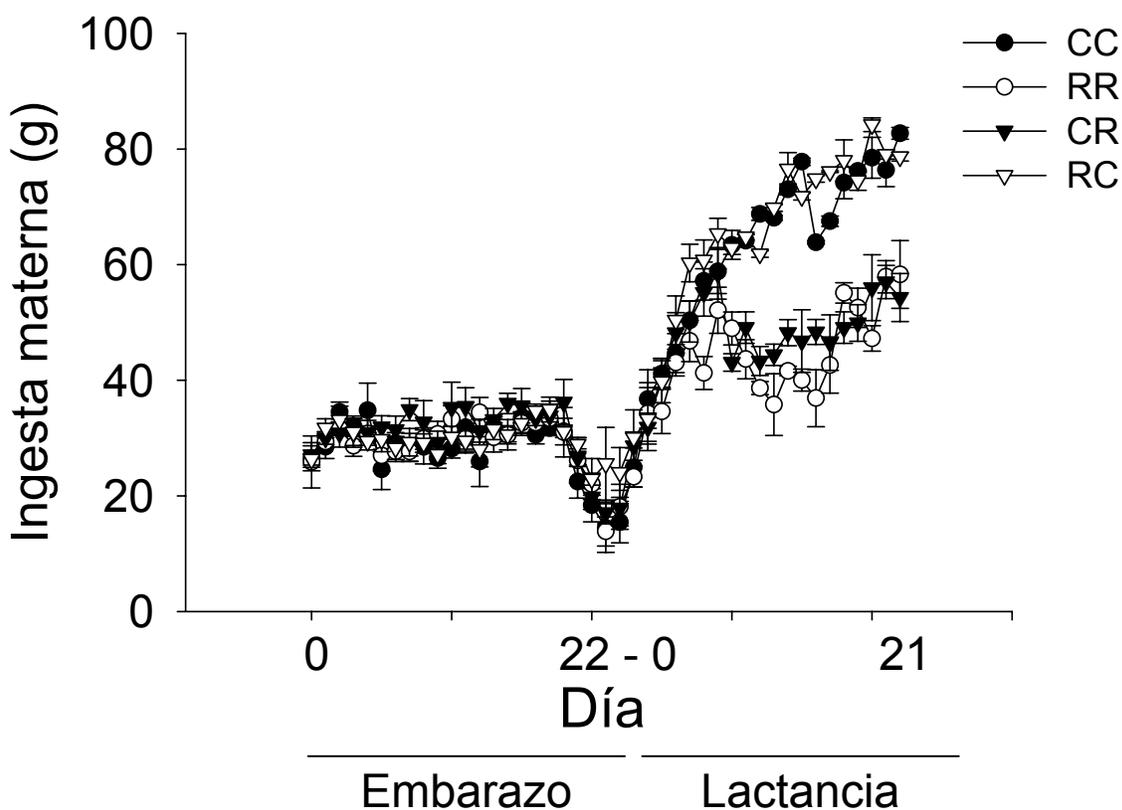


Figura 8. Ingesta materna de alimento y proteína durante el embarazo y la lactancia. Las ratas fueron alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restricta, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. Media \pm error estándar; n: CC = 5, RR = 5, CR = 6, RC = 7 madres.

Concentraciones de esteroides maternos durante el embarazo

A los 19 dG, se observó un incremento en las concentraciones maternas de progesterona, estradiol, testosterona y corticosterona en el suero materno del grupo restringido ($p < 0.05$, Figura 9). La prolactina por su parte no mostró diferencias estadísticas ($C = 24.9 \pm 1.3$; $R = 20.3 \pm 1.4$ ng/mL).

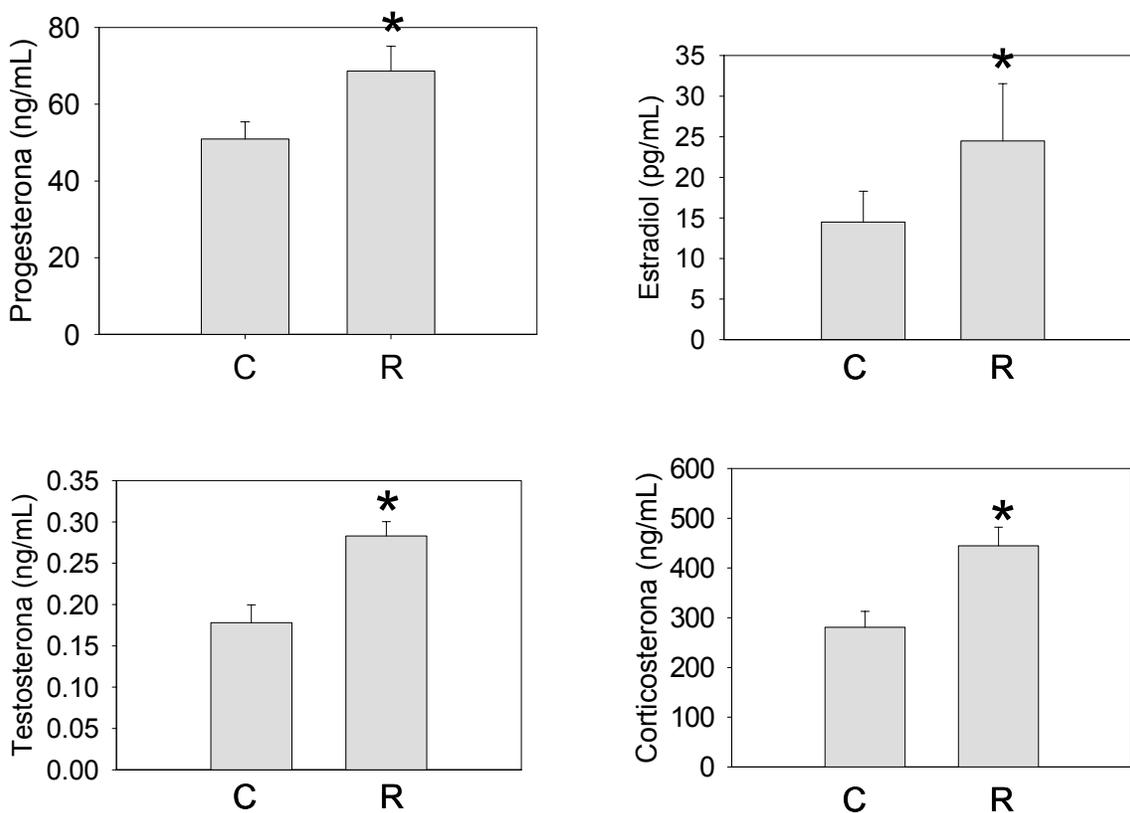


Figura 9. Concentraciones maternas de progesterona, estradiol, testosterona y corticosterona, a los 19 días de gestación (dG) en madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo. t de Student, media \pm error estándar; $n = 8 - 10$ madres; * $p < 0.05$ vs C.

Parámetros morfométricos y distancia ano-genital de las crías al nacimiento

El peso corporal y el diámetro abdominal de las crías hembras de madres R durante el embarazo fue menor comparado con el de crías hembras de madres C. La relación diámetro cefálico:abdominal se vio incrementada en las hembras del grupo R. Por su parte la distancia ano-genital fue mayor, tanto en valor absoluto como en el relativo al peso corporal, en las crías hembras de ratas R durante el embarazo (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros morfométricos de las crías hembras al nacimiento.

	C	R
Peso corporal (g)	6.1 ± 0.08	5.7 ± 0.10**
Talla (mm)	48.3 ± 0.03	47.8 ± 0.02
Distancia Ano-genital (mm)	1.4 ± 0.04	1.8 ± 0.05**
Distancia Ano-genital (mm/g)	0.23 ± 0.01	0.32 ± 0.01**
Diámetro cefálico (mm)	10.7 ± 0.07	10.6 ± 0.08
Diámetro abdominal (mm)	13.3 ± 0.18	12.6 ± 0.13*
Relación Cefálico : Abdominal	0.80 ± 0.01	0.84 ± 0.008*

Peso corporal y parámetros morfométricos al nacimiento de las crías hembras de ratas alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo. t de Student, media ± error estándar; n: C = 11, R = 12 camadas; * p < 0.01, ** p < 0.001 vs. C.

Concentraciones de corticosterona neonatal

A los dos días de edad, la concentración de corticosterona en suero de las crías hembras de madres C fue significativamente mayor (132.4 ± 6.95 ng/mL) respecto a las crías de madres R (97.6 ± 5.29 ng/mL; p < 0.001).

II. Efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos en el eje reproductivo de las crías hembras durante la etapa peri pubertal.

Peso de ovarios y úteros al destete

No se encontraron diferencias estadísticas entre los pesos de los ovarios derecho e izquierdo, por lo que los dos ovarios se muestran en conjunto. A los 21 días de edad, el peso de los ovarios fue mayor en las hembras RC respecto a las de los grupos RR y CR (Tabla 11, $p < 0.05$). El peso uterino fue más bajo en el grupo RR respecto a los grupos CC y RC (Tabla 11, $p < 0.05$).

Tabla 11. Peso de ovarios y úteros al destete.

	CC	RR	CR	RC
Peso corporal (g)	46.7 ± 0.66a	28.2 ± 0.56b	27.6 ± 1.74b	49.6 ± 1.90a
Peso ovárico (mg)	9.2 ± 0.48a,b	8.0 ± 0.52a	7.0 ± 0.23a	10.8 ± 0.32b
Peso ovárico (%)	0.020 ± 0.001a	0.028 ± 0.002b	0.025 ± 0.002b	0.022 ± 0.002a,b
Peso uterino (mg)	20.1 ± 1.15a	12.3 ± 0.67b	16.0 ± 0.58a,b	19.4 ± 1.70a
Peso uterino (%)	0.043 ± 0.003a	0.043 ± 0.003a,b	0.059 ± 0.005b	0.039 ± 0.002a

Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. Peso relativo respecto al peso corporal. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media ± error estándar; n: CC = 5, RR = 5, CR = 6, RC = 7 camadas. $p < 0.05$ para datos con letras diferentes.

Concentraciones hormonales al destete

Al destete (21 días de edad) la concentración de estradiol fue más baja en los grupos RR y CR comparados con los grupos CC y RC. La concentración de progesterona fue significativamente menor en el grupo RR, aunque el grupo CR muestra una tendencia a ser más bajo que los grupos CC y RC (Figura 10). No se observaron diferencias en las concentraciones circulantes de testosterona.

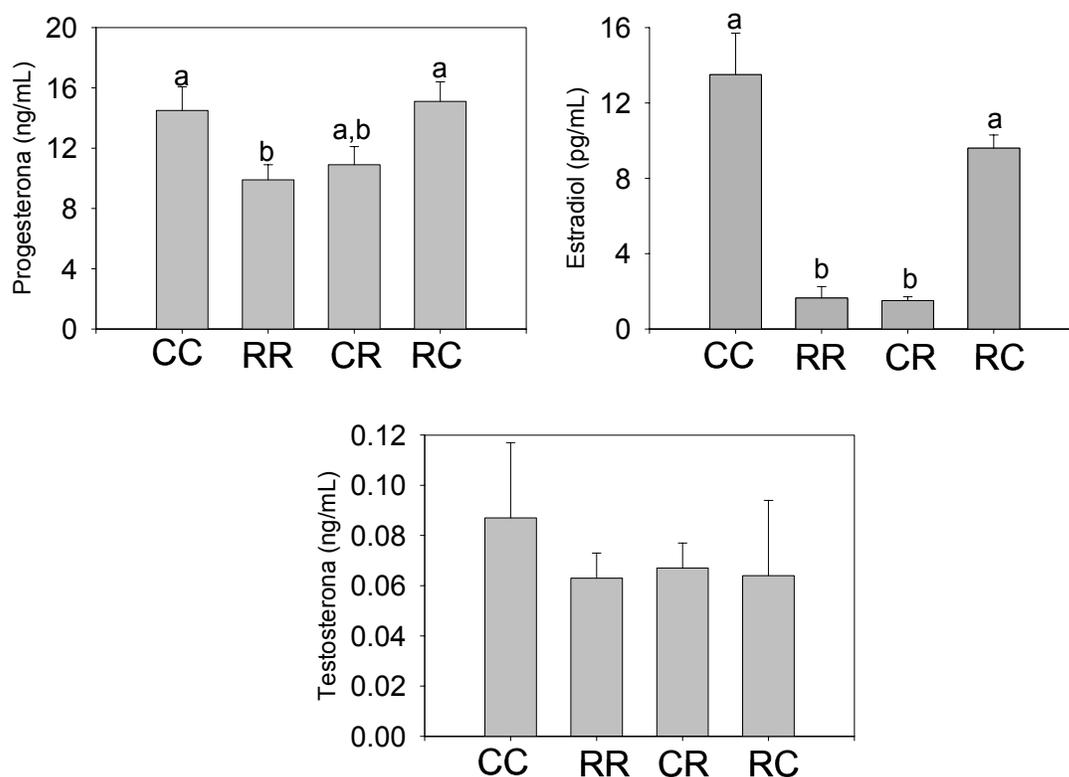


Figura 10. Concentraciones de progesterona, estradiol y testosterona al destete (21 días). Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media \pm error estándar; n: CC = 5, RR = 5, CR = 6, RC = 6 camadas. $p < 0.05$ para datos con letras diferentes.

Expresión semicuantitativa de StAR, P450 scc, aromatasa, LH-R y FSH-R en el ovario de 21 días

La expresión relativa de StAR fue mayor en los ovarios de hembras restringidas en uno o ambos periodos (RR, CR y RC, $p < 0.001$) respecto al grupo CC. Por su parte, la expresión de aromatasa fue más baja en los grupos restringidos durante la lactancia (RR y CR, $p < 0.05$). No se observaron diferencias en la expresión de los genes de P450 scc, ni de los receptores a LH y FSH (Figura 11).

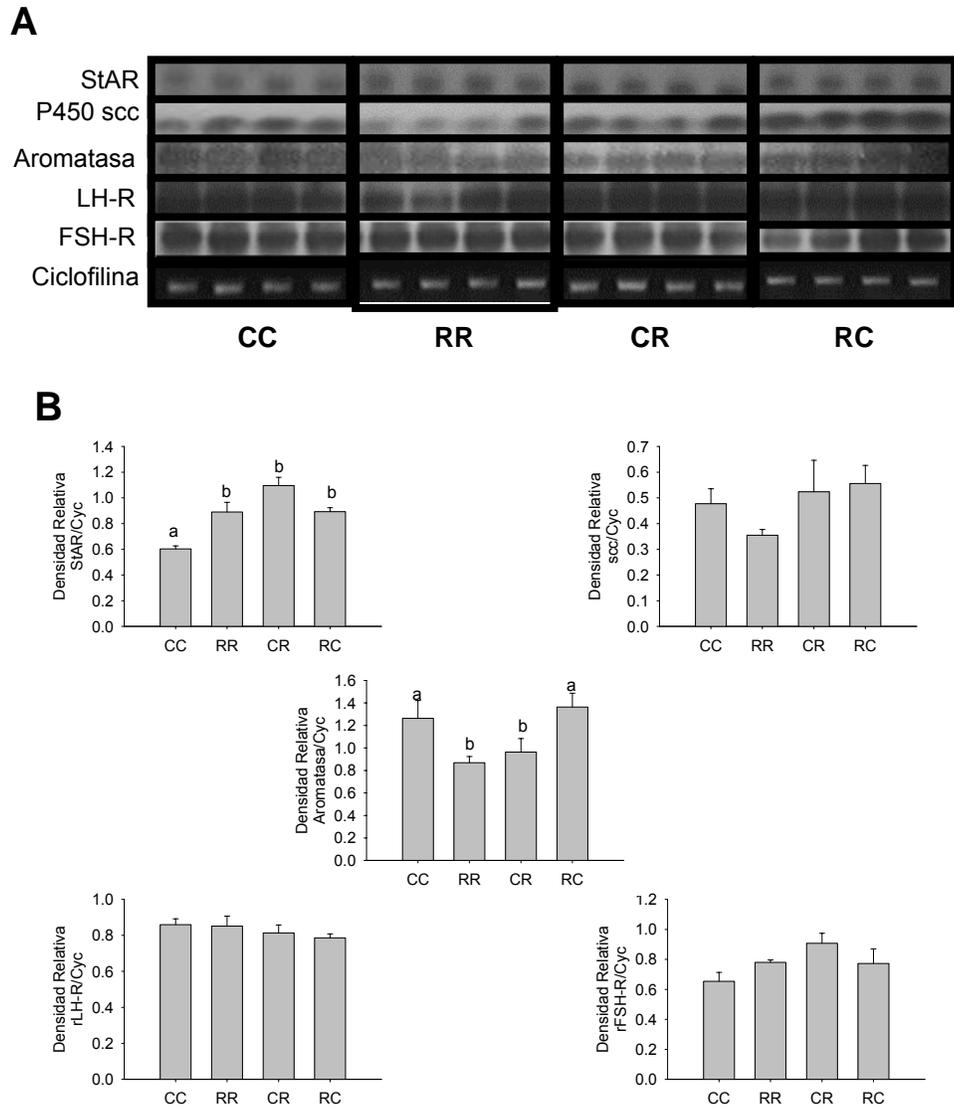


Figura 11. Expresión de StAR, P450 scc, P450 aromataasa, LH-R y FSH-R en ovarios de 21 días. A. *Southern blots* correspondientes a los genes StAR, P450 scc, aromataasa, LH-R y FSH-R y cicofilina respectivamente. B. Densitometrías de cada uno de los genes respecto al gen constitutivo de la cicofilina. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo – primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media \pm error estándar; n = 4 camadas. $p < 0.05$ para datos con letras diferentes.

Evaluación de las poblaciones de folículos preantrales y antrales al destete

En conjunto, la cantidad de folículos en estadios preantral y antral fue significativamente más baja en los grupos CR y RC respecto al RR (Figura 12A, $p < 0.001$). El mismo comportamiento se observó en cuanto al número de folículos preantrales y antrales por separado (Figura 12A, $p < 0.05$). Al hacer la relación con el peso ovárico, esta tendencia se conservó. En estos últimos datos, se observó una clara disminución de folículos preantrales, antrales y la suma de ambos en el grupo RC respecto al RR (Figura 12B, $p < 0.05$).

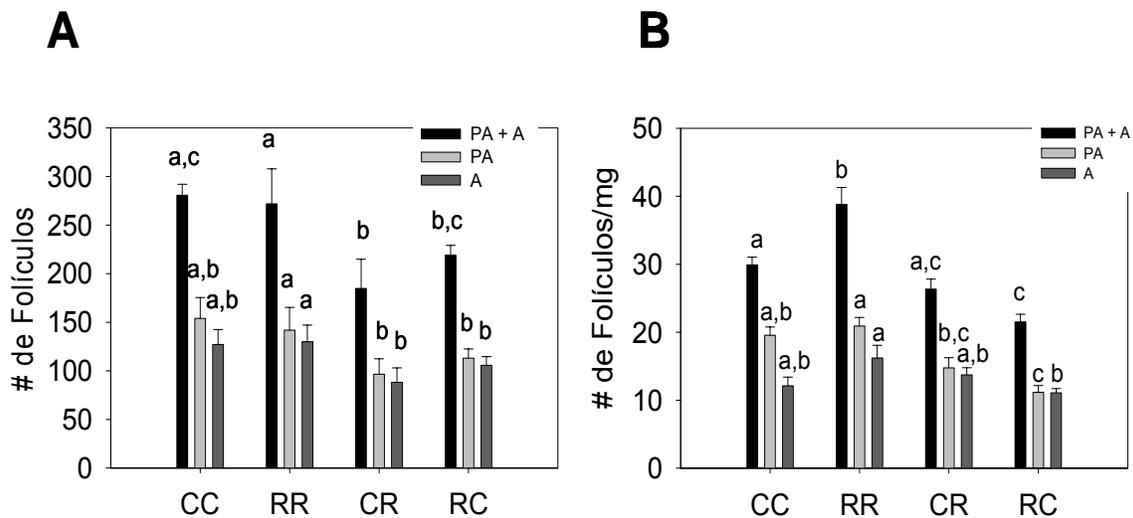


Figura 12. Cuantificación de folículos A: preantrales + antrales (PA+A), preantrales (PA) y antrales (A) en el ovario de 21 días. B: relación del número de folículos preantrales + antrales (PA+A), preantrales (PA) y antrales (A) por mg de ovario. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media \pm error estándar; n: CC = 5, RR = 5, CR = 6, RC = 7 camadas. $p < 0.05$ para datos con letras diferentes.

Inicio de la pubertad

El inicio de la pubertad se determinó mediante la apertura vaginal. Posteriormente a esta se determinó el primer estro. La edad de la apertura vaginal se retrasó en los grupos RR y CR respecto a CC y RC (Figura 13, $p < 0.001$). La edad a la que se presentó el primer estro presentó un comportamiento similar a la de la apertura vaginal (Figura 13, $p < 0.001$). En contraste, a pesar de su mayor edad, el peso corporal al inicio de la pubertad fue significativamente más bajo en RR y CR respecto a CC y RC (Figura 13, $p < 0.001$).

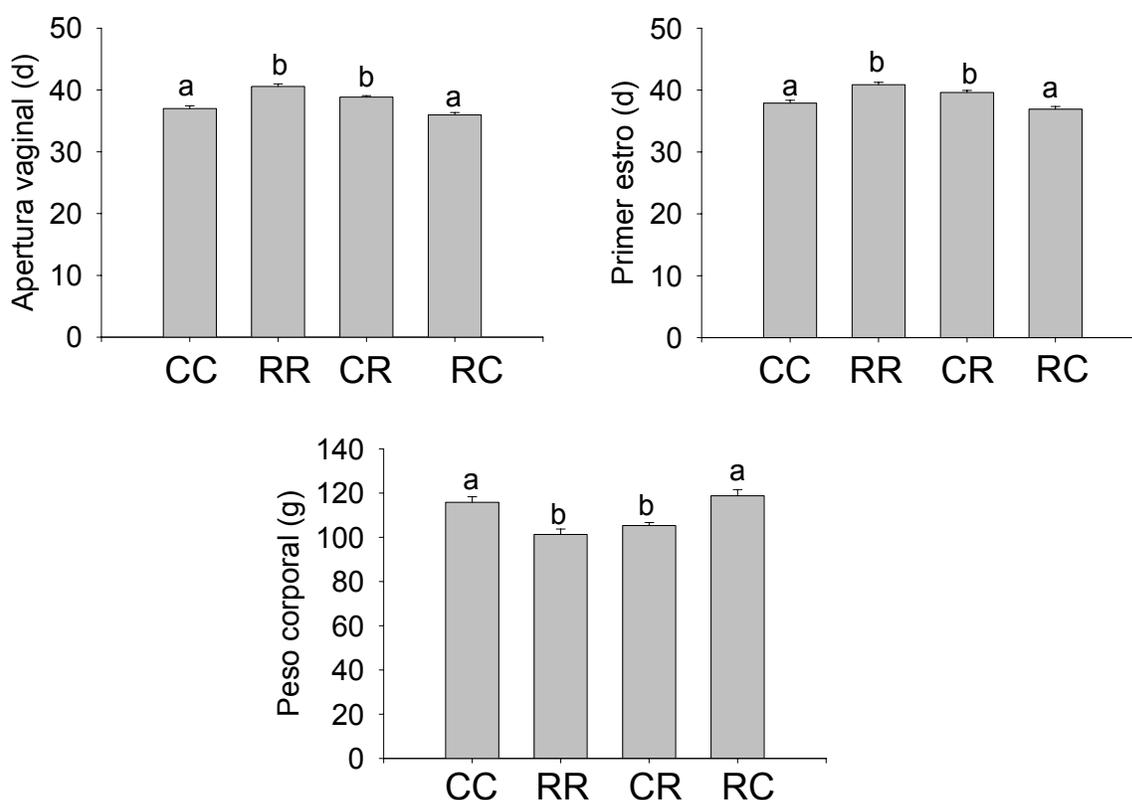


Figura 13. Inicio de pubertad dado por la apertura vaginal y el primer estro. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media \pm error estándar; n: CC = 5, RR = 5, CR = 6, RC = 7 camadas. $p < 0.001$ para datos con letras diferentes.

Ciclo estral

Inmediatamente después del inicio de la pubertad los ciclos fueron irregulares en todas las hembras y no mostraron diferencias estadísticas en duración entre los grupos (Figura 14).

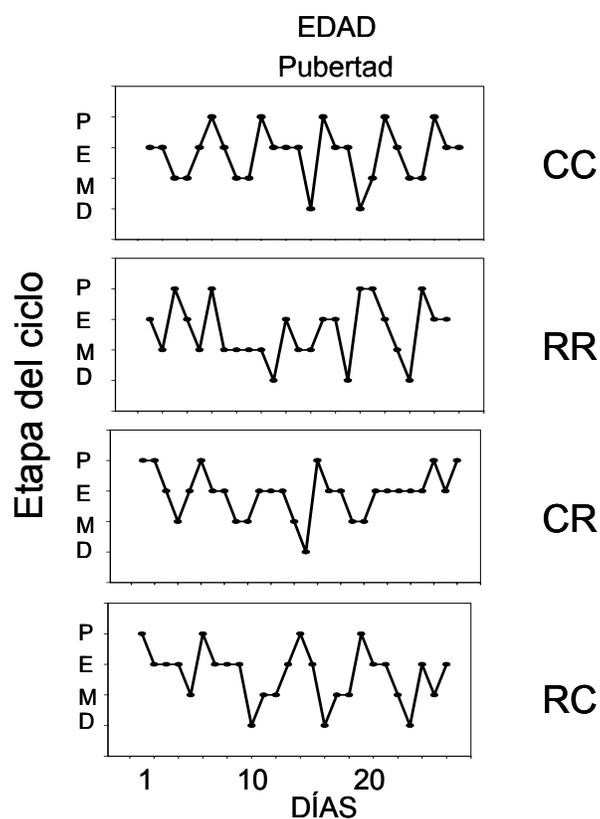


Figura 14. Ciclos representativos de las hembras a partir del primer estro y hasta los 70 días. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. P: proestro, E: estro, M: metaestro, D: diestro.

III. Efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos en la función reproductiva de las crías hembras durante la etapa adulta.

Peso de ovarios y úteros a los 70 días

A los 70 días de edad se observó una tendencia a presentar menor peso ovárico en los grupos RR y CR, siendo significativo únicamente en RR (Tabla 12, $p < 0.05$). No se encontraron diferencias en el peso uterino entre los diferentes grupos.

Tabla 12. Peso de ovarios y úteros a los 70 días.

	CC	RR	CR	RC
Peso corporal (g)	242.0 ± 8.88a	206.9 ± 3.51b	205.9 ± 3.37b	251.5 ± 7.98a
Peso ovárico (mg)	62.1 ± 6.81a	43.1 ± 3.90b	50.0 ± 2.63a,b	55.6 ± 2.92a
Peso ovárico (%)	0.026 ± 0.003	0.021 ± 0.002	0.025 ± 0.002	0.022 ± 0.001
Peso uterino (mg)	286.0 ± 8.70	320.1 ± 36.01	295.7 ± 14.03	346.0 ± 23.00
Peso uterino (%)	0.119 ± 0.005	0.156 ± 0.017	0.143 ± 0.007	0.139 ± 0.011

Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media ± error estándar; n = 5 camadas. $p < 0.05$ para datos con letras diferentes.

Concentraciones hormonales a los 70 días y 12 meses

A la edad de 70 días de vida, se observaron alteraciones en las concentraciones de estradiol y testosterona durante el estro (Figura 15). La concentración de LH mostró una disminución en los grupos restringidos (RR, CR y RC, $p < 0.05$) durante el diestro, mientras que no se encontraron cambios en la FSH. A los 12 meses, los grupos RR y CR mostraron mayores concentraciones de estradiol y testosterona durante el estro (Figura 15, $p < 0.05$). No se muestran las concentraciones de progesterona en estas edades debido al historial de embarazos de las hembras en estudio.

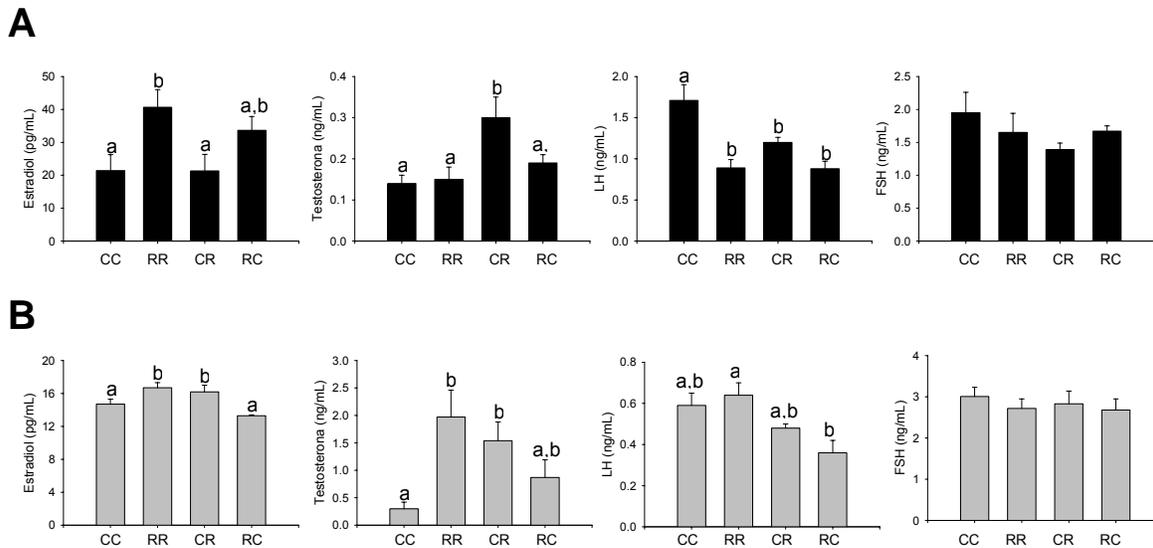


Figura 15. Concentraciones hormonales A: a los 70 días y B: a los 12 meses. Las concentraciones de estradiol y testosterona se muestran en estro y las gonadotropinas en diestro. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restrictiva, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media \pm error estándar; n = 4 – 5 camadas. $p < 0.05$ para datos con letras diferentes.

Expresión semicuantitativa de StAR, P450 scc, aromatasa, LH-R y FSH-R en ovarios de 70 días en diestro

La expresión relativa de aromatasa fue menor en los ovarios de hembras restringidas durante el embarazo (RR y RC vs. CR, $p < 0.01$). La expresión del receptor para LH fue más baja en los grupos restringidos durante la lactancia (RR y CR vs. RC, $p < 0.05$). Por su parte, el receptor de FSH mostró un comportamiento opuesto al de LH. La expresión de FSH-R fue mayor en los grupos RR y CR respecto a CC ($p < 0.01$). No se observaron diferencias en la expresión de los genes de StAR ni de P450 scc (Figura 16).

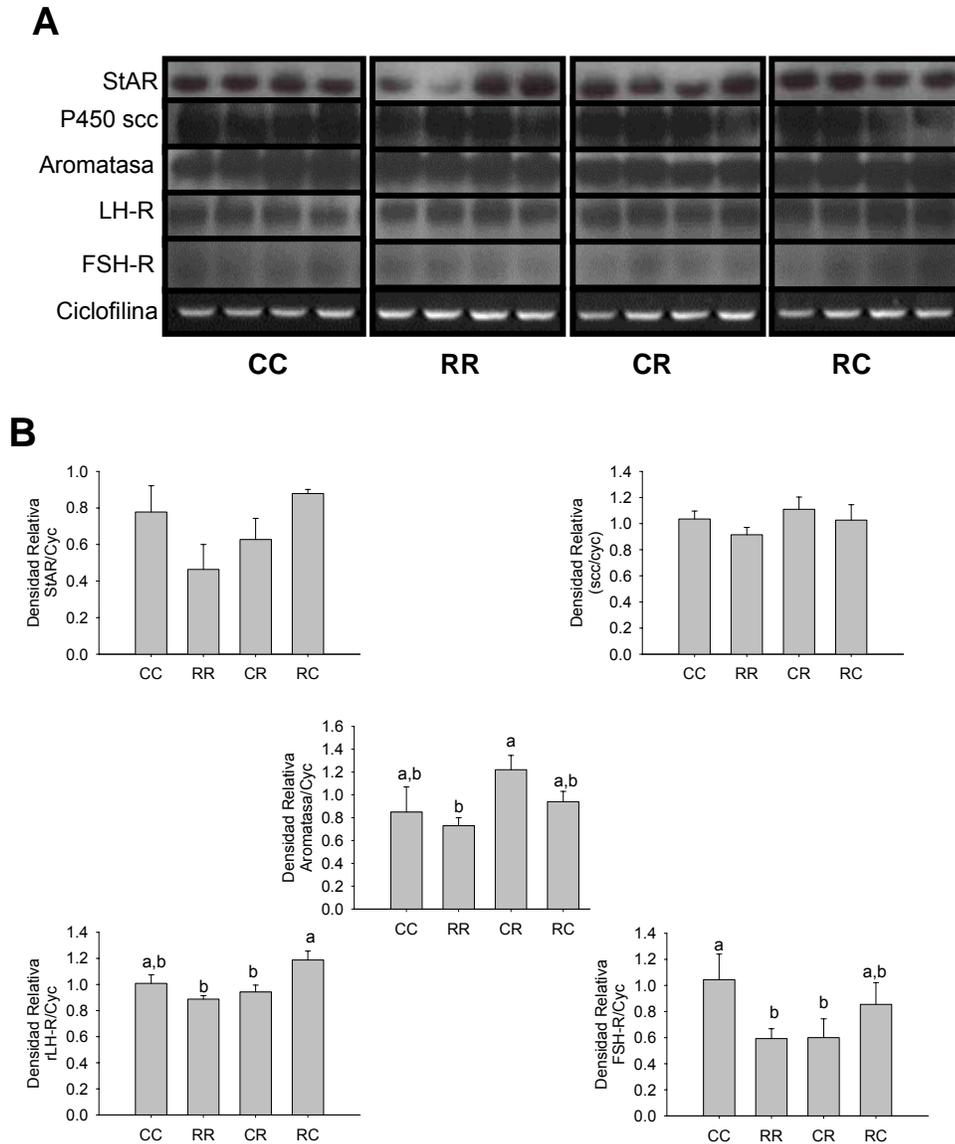


Figura 16. Expresión de StAR, P450 scc, aromatasa, LH-R y FSH-R en ovarios de 70 días en diestro. A. *Southern blots* correspondientes a los genes StAR, P450 scc, aromatasa, LH-R y FSH-R y ciclofilina respectivamente. B. Densitometrías de cada uno de los genes respecto al gen constitutivo de la ciclofilina. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media \pm error estándar; n = 4 camadas. $p < 0.05$ para datos con letras diferentes.

Ciclo estral a los 140 días y 12 meses

A los 140 días de vida, los ciclos fueron fácilmente identificables en las hembras de todos los grupos. Las hembras del grupo RC mostraron ciclos significativamente más largos respecto a los otros grupos (Tabla 13, $p < 0.05$). A los 12 meses, la duración del ciclo se había incrementado en las hembras restringidas en la lactancia, RR y CR, respecto a si mismas a los 140 días (Tabla 13, $p < 0.05$, Figura 17). Aun cuando no fue significativo, el número de crías que presentaron ciclos en un periodo de 10 días a esta edad, fue menor en todos los grupos restringidos en comparación con las controles.

Tabla 13. Duración del ciclo estral.

	CC	RR	CR	RC
Duración del ciclo (d) a 140 días	4.6 ± 0.16a	4.9 ± 0.14a	4.9 ± 0.33a	6.3 ± 0.46b
% animales con al menos 1 ciclo a 140 días	100.0	100.0	100.0	100.0
Duración del ciclo (d) a 12 meses	6.7 ± 0.91	9.7 ± 0.98*	7.5 ± 0.69*	7.4 ± 1.70
% animales con al menos 1 ciclo a 12 meses	100.0	90.0	81.0	75.0

Duración del ciclo estral a 140 días y 12 meses de vida. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta control (C – caseína 20%) o restringida (R – caseína 10%) durante la gestación (primera letra) y la lactancia (segunda letra). ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey para duración del ciclo entre grupos a la misma edad. t de Student para duración del ciclo entre edades. χ^2 para % de animales entre grupos y edades. Media ± Error estándar; n = 4 – 7 camadas; $p < 0.05$ para datos con letras diferentes a la misma edad; * $p < 0.01$ vs el mismo grupo a los 140 días.

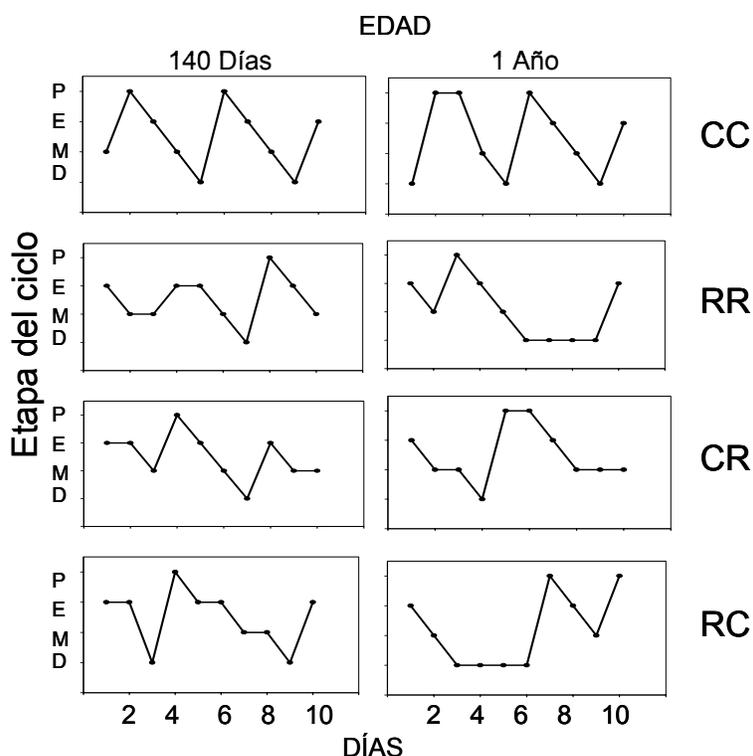


Figura 17. Ciclos representativos de las hembras a los 140 días y 12 meses de vida. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. P: proestro, E: estro, M: metaestro, D: diestro.

Tabla 14. Tasa de fertilidad.

	CC	RR	CR	RC
Tasa de fertilidad (%) a 150 días	77.7	100.0	86.4	100.0
Tasa de fertilidad (%) a 12 meses	66.6a	60.0a*	50.0b*	25.0b*

Fertilidad de las crías hembras a los 150 días y al año de vida. Grupos: Madres alimentadas con dieta control (C – caseína 20%) o restringida (R – caseína 10%) durante la gestación (primera letra) y la lactancia (segunda letra). χ^2 . Media \pm Error estándar; n = 4 – 5 camadas; p < 0.001 para datos con letras diferentes a la misma edad; * p < 0.01 vs el mismo grupo a los 140 días.

Tasa de fertilidad a los 150 días y 12 meses

De manera similar a lo observado con el ciclo estral, la tasa de fertilidad a los 150 días fue máxima en todos los grupos. Sin embargo, a los 12 meses de edad la fertilidad fue significativamente menor en las hembras restringidas (RR, CR y RC), respecto a si mismas a los 150 días, pero no respecto a CC a la misma edad (Tabla 14, $p < 0.05$). No se observaron diferencias en el tamaño de las camadas o la proporción de machos:hembras entre los grupos a ninguna de las edades (Tablas 15 y 16). Sin embargo, el tamaño de las camadas fue significativamente más bajo en todos los grupos a los 12 meses respecto a los 150 días (Tabla 16, $p < 0.05$).

Tabla 15. Características del embarazo a 150 días.

	EMBARAZO 150 DÍAS			
	CC	RR	CR	RC
Peso corporal (g) al inicio del embarazo	293.1 ± 2.5a	263.0 ± 2.7b	258.0 ± 3.4b	337.2 ± 16.1a
Peso corporal (g) a 20 dG	383.9 ± 4.0a,c	334.7 ± 4.3b	367.1 ± 6.1a,b	402.0 ± 18.2c
Peso corporal ganado (g) a 20 dG	90.9 ± 1.3a	71.7 ± 2.1b	109.1 ± 2.5c	65.0 ± 3.0b
% ganancia de peso a 20 dG	31.0 ± 1.8a	27.3 ± 1.7a,c	42.3 ± 2.3b	19.3 ± 1.2c
Tamaño de la camada (crías)	14.1 ± 0.9	13.4 ± 1.1	12.2 ± 0.6	11.8 ± 1.9
% crías hembras	50.6 ± 4.5	48.3 ± 5.1	57.6 ± 2.9	51.4 ± 4.6
% crías machos	49.4 ± 4.5	51.7 ± 5.1	42.4 ± 2.9	48.6 ± 4.6

Peso corporal (g) al inicio de la gestación y a los 20 días de gestación (dG), tamaño de las camadas y proporción de hembras y machos a 150 días. Grupos: Madres alimentadas con dieta control (C – caseína 20%) o restringida (R – caseína 10%) durante la gestación (primera letra) y la lactancia (segunda letra). ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media ± Error estándar; n = 4 – 5 camadas; $p < 0.001$ para datos con letras diferentes a la misma edad.

Tabla 16. Embarazo a 12 meses

	EMBARAZO 12 MESES			
	CC	RR	CR	RC
Peso corporal (g) al inicio del embarazo	394.2 ± 17.2	364.0 ± 23.1	333.8 ± 19.6	247.3
Peso corporal (g) a 20 dG	481.7 ± 13.5a	439.1 ± 26.5a,b	401.0 ± 15.6b	361.3
Peso corporal ganado (g) a 20 dG	87.4 ± 20.9	75.1 ± 39.4	67.3 ± 16.7	114.0
% ganancia de peso a 20 dG	23.9 ± 7.0	24.0 ± 14.0	24.1 ± 9.8	46.1
Tamaño de la camada (crías)	5.5 ± 1.3*	4.5 ± 2.1*	4.5 ± 1.1*	8.0
% crías hembras	48.6 ± 7.6	48.6 ± 17.7	51.8 ± 6.2	50.0
% crías machos	51.4 ± 7.6	51.4 ± 17.7	48.2 ± 6.2	50.0

Peso corporal (g) al inicio de la gestación y a los 20 días de gestación (dG), tamaño de las camadas y proporción de hembras y machos a 12 meses de vida. Grupos: Madres alimentadas con dieta control (C – caseína 20%) o restringida (R – caseína 10%) durante la gestación (primera letra) y la lactancia (segunda letra). ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media ± Error estándar; n = 3 – 4 camadas, excepto para RC donde n = 1 camada. p < 0.001 para datos con letras diferentes a la misma edad; * p < 0.05 vs el mismo grupo a los 150 días.

IV. Efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos en el envejecimiento reproductivo de las crías hembras.

Peso de ovarios y úteros a los 22 meses

No se encontraron diferencias en los pesos de los ovarios ni los úteros entre las hembras de los diferentes grupos a los 22 meses de edad (Tabla 17).

Tabla 17. Peso de ovarios y úteros a los 22 meses.

	CC	RR	CR	RC
Peso corporal (g)	420.4 ± 26.88	402.7 ± 20.70	400.2 ± 20.92	766.0
Peso ovárico (mg)	56.2 ± 2.95	59.8 ± 7.45	66.7 ± 7.43	69.0
Peso ovárico (%)	0.014 ± 0.006	0.015 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.009
Peso uterino (mg)	629.9 ± 45.63	614.2 ± 91.04	499.6 ± 30.33	495.0
Peso uterino (%)	0.154 ± 0.014	0.155 ± 0.299	0.128 ± 0.009	0.065

Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media ± error estándar; n = 4 – 5 camadas excepto en RC donde sólo una rata sobrevivió hasta esta edad.

Concentraciones hormonales a los 22 meses

No se observaron diferencias en las concentraciones de progesterona, estradiol, testosterona, LH y FSH entre los grupos CC, RR y CR en la fase de diestro del ciclo estral. Las concentraciones de progesterona y gonadotropinas fueron mayores en RC respecto al resto de los grupos, sin embargo no son valores representativos pues hasta esta edad sólo sobrevivió un rata de este grupo (Figura 18).

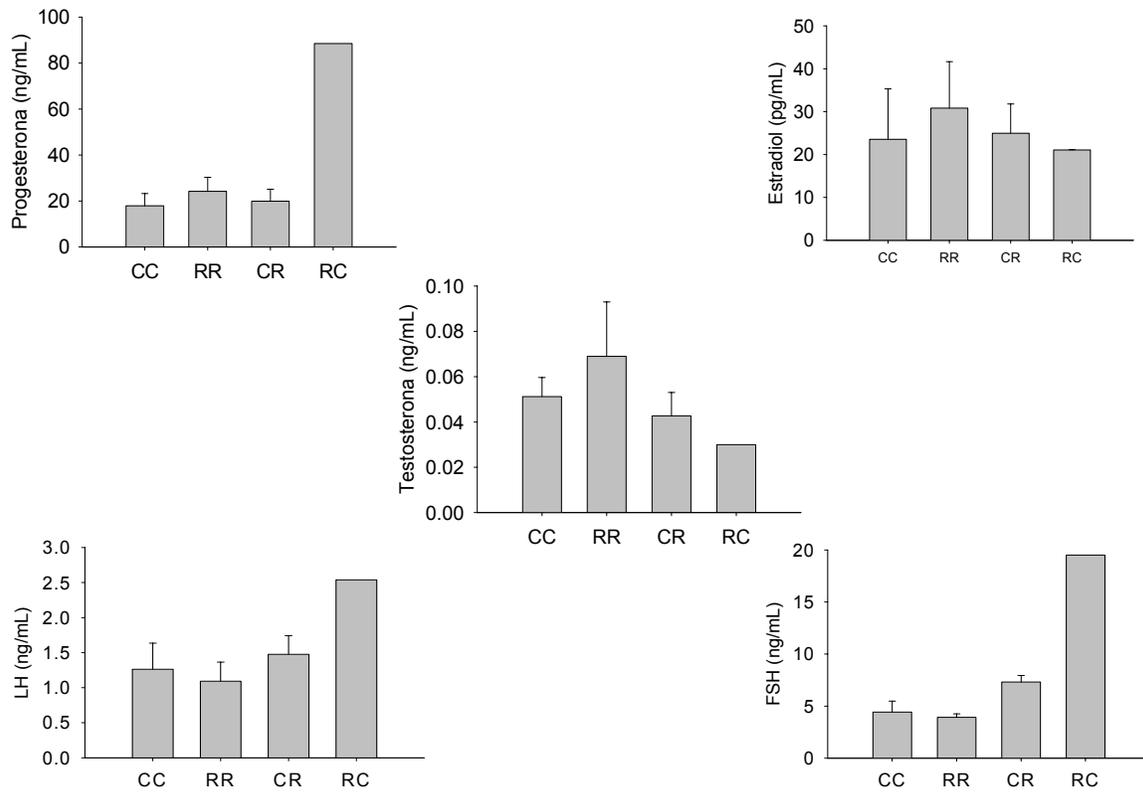


Figura 18. Concentraciones hormonales en diestro a los 22 meses. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restrictiva, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media \pm error estándar; n = 4 – 5 camadas, excepto RC, donde n = 1.

Expresión semicuantitativa de StAR, P450 scc, P450 aromatasa, rLH-R y rFSH-R en el ovario de 22 meses en diestro

No se observaron diferencias en la expresión de los genes en estudio a esta edad (Figura 19).

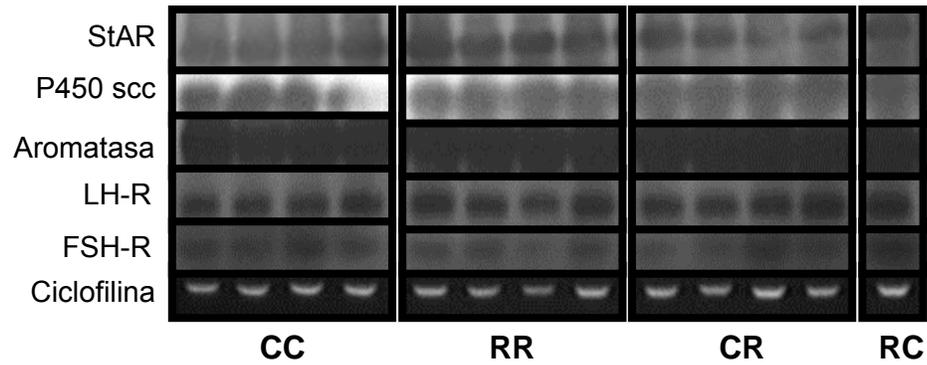
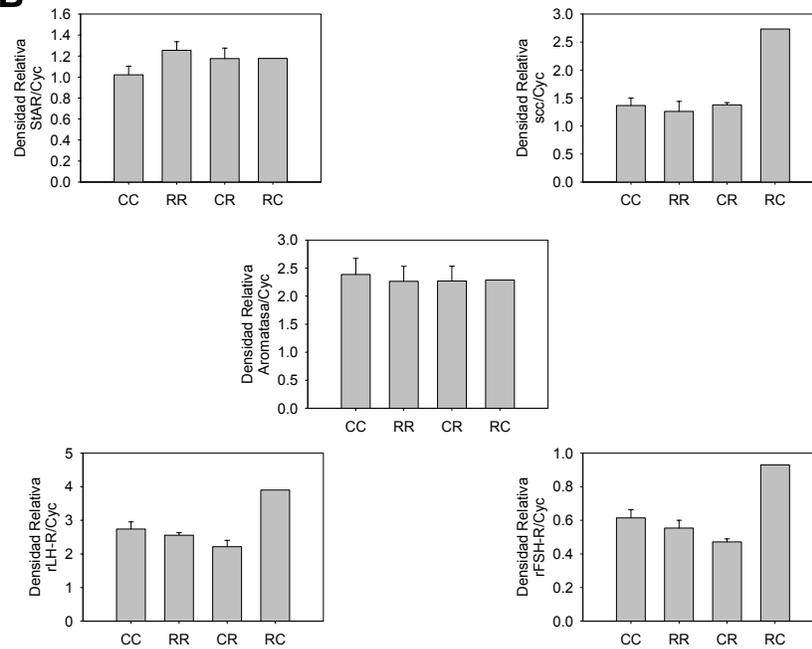
A**B**

Figura 19. Expresión de StAR, P450 scc, P450 aromatasa, LH-R y FSH-R en ovarios de 22 meses en diestro. A. *Southern blots* correspondientes a los genes StAR, P450 scc, P450 aromatasa, LH-R y FSH-R y ciclofilina respectivamente. B. Densitometrías de cada uno de los genes respecto al gen constitutivo de la ciclofilina. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Media \pm error estándar; n = 4 camadas, excepto para RC: n = 1 camada. $p < 0.05$ para datos con letras diferentes.

Ciclo estral a los 22 meses

A los 22 meses de edad se observó que la mayoría de las ratas de todos lo grupos ya no presentaban ciclos (Figura 20)

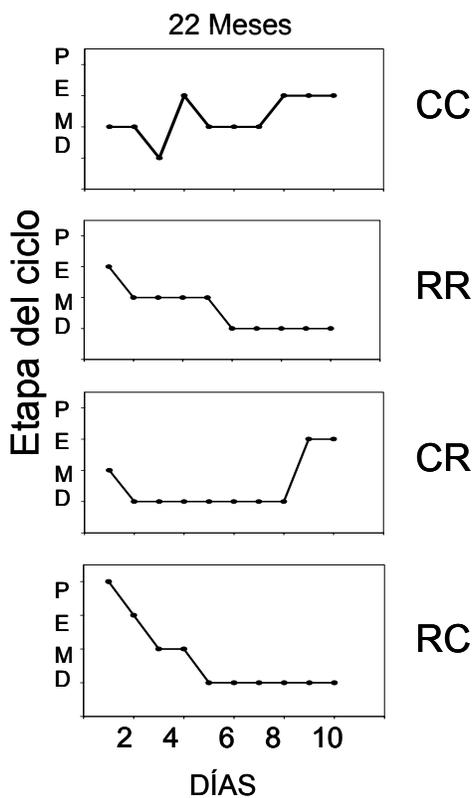


Figura 20. Ciclos representativos de las hembras a partir del primer estro y hasta los 22 meses de edad. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. P: proestro, E: estro, M: metaestro, D: diestro.

V. Efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos en el crecimiento, la sobrevivida y la mortalidad de las crías hembras.

Crecimiento post natal hasta los 22 meses

La figura 21 muestra las curvas de crecimiento, desde el nacimiento hasta los 22 meses de edad, de las crías de los cuatro grupos experimentales. Las crías de los grupos restringidos durante la lactancia –RR y CR– ganaron menos peso entre los 10 y 450 días de edad respecto a CC y RC ($p < 0.05$), para el final del estudio (22 meses) estas hembras alcanzaron el peso de las controles. Por su parte las hembras del grupo RC ganaron mayor peso respecto al resto de los grupos (Figura 22).

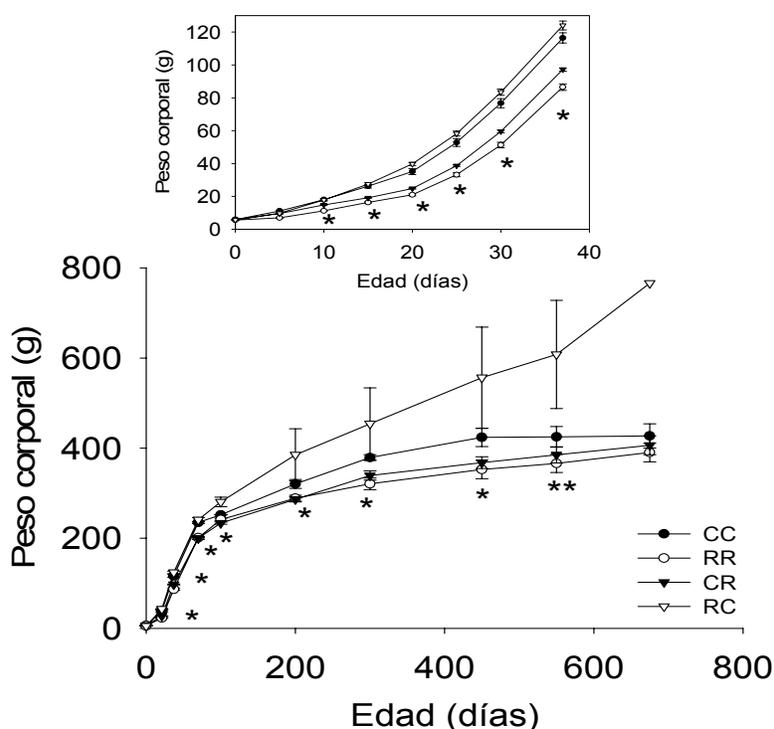


Figura 21. Curva de crecimiento del nacimiento a los 22 meses. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. Media \pm error estándar; n: CC = 5, RR = 5, CR = 6, RC = 7 camadas; * $p < 0.05$ para RR y CR vs CC y RC, ** $p < 0.05$ para CC, RR y CR vs RC.

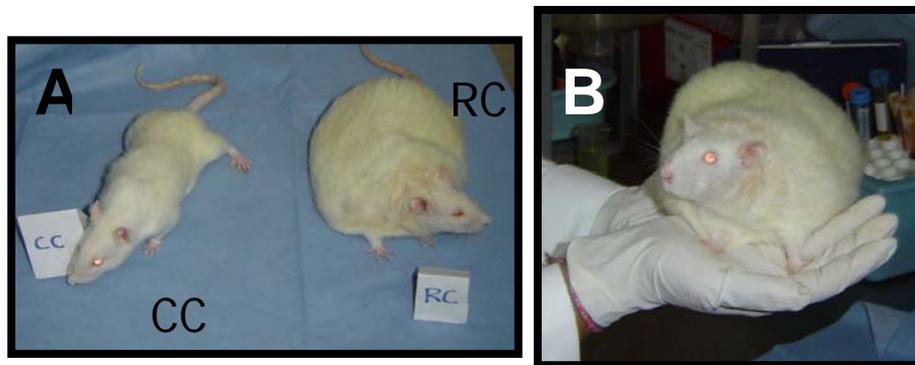


Figura 22. A. La figura muestra una hembra representativa del grupo CC comparada con la hembra RC que sobrevivió hasta los 22 meses. B. Hembra del grupo RC a los 22 meses de vida. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–.

Sobrevida y mortalidad hasta los 22 meses

La tasa de mortalidad de las hembras del grupo RC estuvo directamente relacionada con su peso corporal. Estas hembras obesas mostraron menor probabilidad de sobrevivir hasta los 22 meses de vida (Figuras 23 y 24). Por otra parte el grupo RR presentó la tendencia a sobrevivir más tiempo respecto a CR, aunque esto no fue significativo ($p = 0.07$).

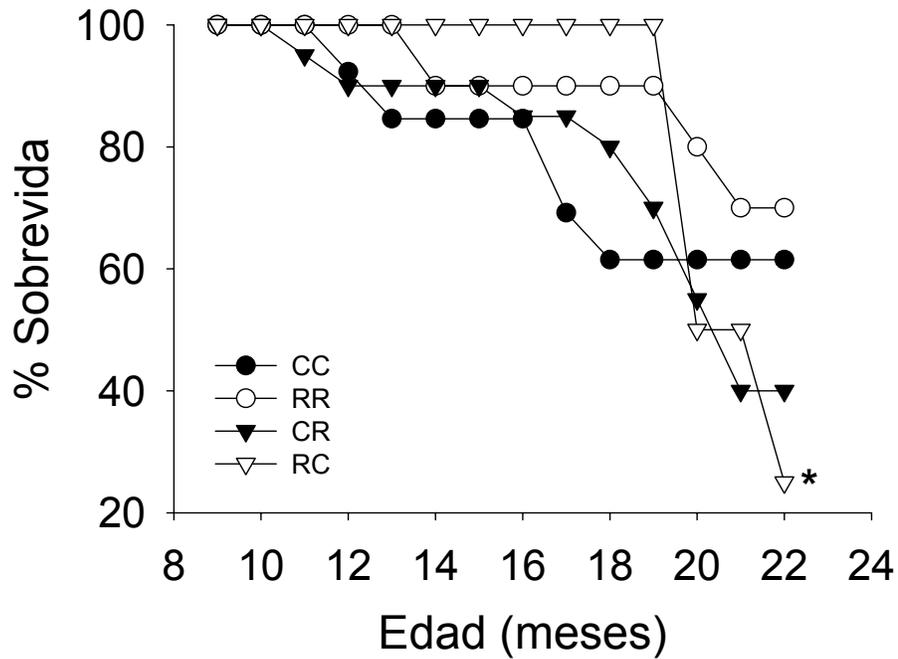


Figura 23. Sobrevivida hasta los 22 meses. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restrictiva, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. Los datos se analizaron mediante χ^2 . * $p < 0.05$ vs. CC y RR. 100% representa el número de hembras vivas en 5 camadas por cada grupo a partir de los 8 meses.

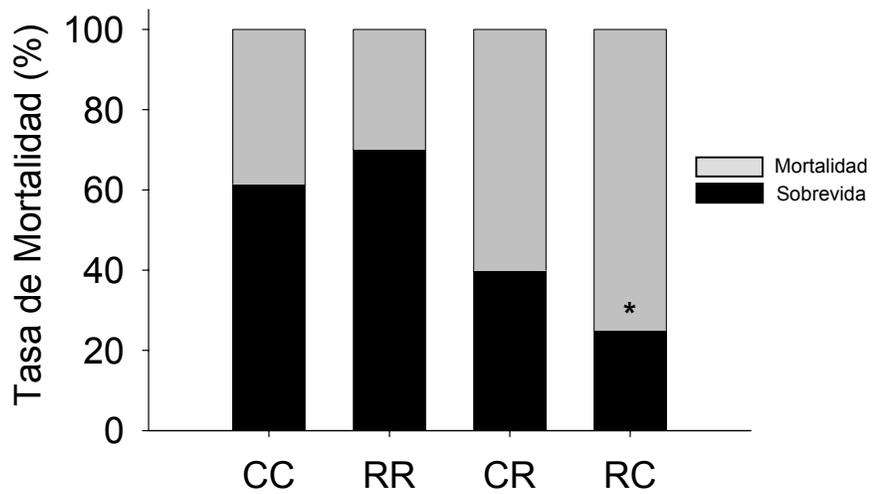


Figura 24. Tasa de mortalidad hasta los 22 meses. Las ratas proceden de madres alimentadas con dieta C (Control, caseína 20%) o R (Restringida, caseína 10%) durante el embarazo –primera letra– y la lactancia –segunda letra–. Los datos se analizaron mediante X^2 . * $p < 0.05$ vs. CC y RR. 100% representa el número de hembras vivas en 5 camadas por cada grupo a partir de los 8 meses.

DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis fue estudiar los efectos de la restricción proteínica materna sobre el desarrollo sexual, la función y el desempeño reproductivo de las crías hembras de ratas tratadas durante el embarazo, la lactancia o en ambos periodos. Los resultados obtenidos indican que la restricción proteínica se asocia con el retraso en el desarrollo sexual, alteraciones en las concentraciones hormonales, alargamiento del ciclo estral, disminución de la tasa de fertilidad y envejecimiento reproductivo prematuro.

Diversos estudios en el área de la programación durante el desarrollo ponen en evidencia la susceptibilidad de los ejes neuroendócrinos, incluido el eje reproductivo, a condiciones adversas en las etapas más tempranas de la vida principalmente el desarrollo fetal y neonatal^{54, 72, 78}. En la rata, gran parte de los eventos cruciales en el desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-ovario se presentan durante la gestación²⁰², por lo que esta etapa representa un periodo crítico y susceptible para la programación de alteraciones reproductivas. A principio de los años 60's Barraclough y Gorski^{24, 134} mostraron que la rata hembra neonata, en particular su hipotálamo, es sensible al ambiente hormonal en que crece, con lo cual se pone en evidencia que las primeras semanas de vida post natal son otro periodo crítico para el eje reproductivo femenino.

El uso de dietas isocalóricas permitió identificar los efectos debidos únicamente a la restricción de un nutriente: proteína, sin que el aporte energético de la dieta se viera modificado⁵¹. A diferencia de la restricción proteínica, en la restricción nutricional hipocalórica la madre recibe menor cantidad de alimento, lo que significa menor aporte en todos los nutrientes (disminución de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, energía, minerales, vitaminas y fibra)^{85, 95}. Si bien no se han descrito diferencias entre los efectos producidos por ambos tipos de dietas

maternas^{177, 198}, la restricción nutricional hipocalórica resulta ser multifactorial, respecto a la restricción proteínica empleada aquí.

Gluckman y Hanson²⁶, proponen que la discrepancia entre el ambiente intrauterino y el post natal ocasiona fenotipos mal adaptados, debido a respuestas adaptativas predictivas, generadas durante el desarrollo fetal, que no coinciden con el ambiente post natal esperado. De acuerdo con esta hipótesis, en nuestro estudio era de esperarse que cada grupo presentara alteraciones fenotípicas y funcionales diferentes, dado que cada uno recibió un estímulo específico. De este modo, el grupo CR, no se “preparó” intrauterinamente para un ambiente post natal pobre en proteína, por lo que al encontrarse en este ambiente tuvo que hacer ajustes que lo ayudaran a sobrevivir. Estos ajustes afectaron directamente a los órganos que aún mantenían plasticidad celular. Por el contrario, el grupo RC se preparó para un medio adverso, adquirió adaptaciones en la vida fetal para ese medio, y creció en un medio con disponibilidad de nutrientes mayor a la esperada. Las respuestas adaptativas predictivas que desarrolló no fueron adecuadas y mostró mala adaptación siendo un grupo predominantemente obeso y con diversas alteraciones metabólicas que pudieron influir en su desempeño reproductivo^{98, 204} (Figura 25). Entre los grupos experimentales el que tendría un mejor pronóstico en este aspecto, es el grupo RR pues se “adaptó” a un medio restringido en proteína y creció en el medio para el cual se preparó. Por lo que sus respuestas predictivas corresponden al medio en que creció.

Cada uno de los grupos mostró alteraciones en varios de los parámetros estudiados y respecto a la susceptibilidad del eje reproductivo de las crías a la restricción proteínica materna. Los efectos observados se consideran como el resultado de la conjunción de los periodos de restricción proteínica materna con los de nutrición adecuada, es decir como estímulos distintos.

Considerando las respuestas adaptativas predictivas, es importante hacer la diferencia entre la restricción nutricional aguda y la crónica. Según esta hipótesis, en la restricción crónica los individuos deberían estar mejor adaptados al medio pobre en alimento en comparación con los que no han sido habituados a él.

La ganancia de peso materno durante el embarazo depende de la calidad de la nutrición materna^{33, 92, 205, 206}. Los estudios epidemiológicos realizados en poblaciones de Holanda y Leningrado, muestran una clara asociación entre la ganancia de peso materno y el peso del recién nacido^{33, 205}. En el modelo de restricción proteínica utilizado en este estudio, el bajo peso ganado por las hembras gestantes se asemeja con los datos observados en los modelos de restricción nutricional hipocalórica⁴⁷ y con los estudios epidemiológicos^{33, 205}.

El peso al nacimiento ha sido considerado como un buen indicador predictivo de la salud en la etapa adulta¹⁴. Sin embargo, la alimentación materna también tiene un papel importante durante la lactancia^{51, 98}. Algunos órganos permanecen sensibles a las influencias ambientales y nutricionales en este periodo^{24, 134}.

En este estudio, el efecto de la conjunción entre la restricción proteínica durante el embarazo, la lactancia o ambos periodos se puso de manifiesto a partir de la segunda mitad de la lactancia. La ingesta materna se incrementó en los grupos que consumieron la dieta control en esta etapa (CC y RC). Estas crías mostraron un crecimiento significativamente mayor en la segunda mitad de la lactancia respecto a las restringidas en este periodo. La demanda energética necesaria para satisfacer este crecimiento pudo incrementar la ingesta materna para el final de la lactancia respecto a lo observado en los grupos RR y CR. El mayor grado de maduración de las crías CC y RC, les permitió comenzar a consumir la dieta sólida a una edad más temprana que sus contrapartes RR y CR, por lo que hubo una pequeña contribución de las crías en la ingesta registrada al final de la lactancia (observaciones no mostradas).

Además de las alteraciones en el crecimiento fetal atribuibles a la restricción proteínica *per se*, las alteraciones en la endocrinología materna pudieron tener un papel en el desarrollo fetal y en la programación del eje HHO.

Al igual que en la manipulación nutricional hipocalórica⁸⁸, la restricción proteínica materna estimuló el incremento en la concentración sérica materna de glucocorticoides⁵¹. El aumento en corticosterona materna en circulación produce la sobre-exposición fetal a corticosteroides, la cual se asocia a bajo peso al

nacimiento y otras afecciones en las crías adultas^{66, 89}. El aumento en la concentración sérica de glucocorticoides maternos durante el embarazo produce una baja actividad de la 11 β -HSD tipo 2 placentaria⁸⁶. Lo que resulta en la sobre-exposición fetal a corticosterona, lo cual se asocia al bajo peso al nacimiento^{86, 118} (Figura 26). Esta actividad excesiva del eje HHA materno influye en el eje adrenal fetal⁵⁴. Hasta ahora, el efecto de la sobre-exposición fetal en el neonato únicamente se había documentado en la rata macho⁵¹. Los resultados muestran que en la rata hembra neonata, al igual que en el macho, se produce un decremento en la secreción de corticosterona, probablemente como respuesta inhibitoria al exceso de glucocorticoides maternos en la etapa fetal, la cual se mantiene en los primeros días de vida.

Datos como el anterior ponen en evidencia la susceptibilidad de los ejes neuroendócrinos, fetales y neonatales, a los ambiente hormonales alterados. Existe una buena cantidad de reportes experimentales tanto en seres humanos como en animales de laboratorio y fauna silvestre, que muestran los efectos de la exposición a disruptores endócrinos durante periodos sensibles, como el desarrollo temprano^{79, 80, 83, 157, 159, 167, 172}.

En 2003, Fernandez-Twinn²⁰⁷ mostró la asociación entre la restricción proteínica durante el embarazo y el incremento en las concentraciones de estradiol y progesterona en el suero materno, sin que se analizaran las concentraciones de andrógenos. Posteriormente, Zambrano⁵¹ confirmó los hallazgos de Fernandez-Twinn y mostró el incremento en la concentración de testosterona materna secundario a la restricción proteínica. Esta última hormona es la base de los modelos de programación por exposición temprana a andrógenos^{73, 74, 78, 124, 131, 133, 139, 146, 147}, los cuales en su totalidad muestran anomalías reproductivas en las crías hembras que incluyen masculinización genital^{133, 136} y el alargamiento de los ciclos reproductivos¹³².

Los estrógenos desempeñan un papel importante en la programación del eje HHO. La exposición temprana a compuestos estrogénicos como el DES provoca alteraciones a nivel reproductivo entre las que se encuentran, alta incidencia de displasia cervical¹²⁷ hipoplasia vaginal, adenoma vaginal de células

claras y malformaciones uterinas^{126, 128}, irregularidades menstruales, disminución de fertilidad¹²⁶ así como embarazo ectópico, aborto espontáneo y parto prematuro¹²⁹. Según nuestro conocimiento, no se cuenta con datos que muestren una clara asociación entre la sobre-exposición temprana a progesterona y sus efectos en el eje reproductivo. Sin embargo, no se debe dejar de lado su posible participación en programación del eje HHO y en otros órganos sensibles.

Las alteraciones en el ambiente endócrino fetal descritas, aunadas a la restricción proteínica se pueden asociar a otros efectos observados al nacimiento, como los parámetros morfométricos observados en el presente estudio.

La relación cefálico:abdominal es un parámetro que refleja la calidad del ambiente intrauterino. El crecimiento fetal asimétrico, en el que el crecimiento de la cabeza es proporcionalmente mayor respecto al del abdomen, es un indicador de desnutrición intrauterina moderada, en la cual el flujo de nutrientes y oxígeno favorece al cerebro a costa de los órganos abdominales³³. Por otra parte el RCIU, aunado al crecimiento fetal simétrico, tiene un pronóstico peor al fenotipo anterior, pues se asocia a desnutrición severa, donde el flujo de nutrientes es equitativo para el cerebro y el abdomen, pero pobre para ambos, con lo que se sacrifica el crecimiento generalizado^{14, 33}. La restricción proteínica utilizada en este trabajo representó una desnutrición materna moderada, en la cual el crecimiento fetal fue asimétrico, pero sin producir RCIU.

Otro parámetro que se modificó al nacimiento fue la distancia ano-genital. En diversas especies de mamíferos, la distancia ano-genital es un indicador de masculinización, los machos presentan la mayor distancia entre el ano y el poro genital en comparación con las hembras¹²⁴. Las hembras restringidas *in utero* mostraron mayor distancia ano-genital que las controles. Este incremento fue indudablemente debido a la acción de la alta concentración de testosterona en el ambiente intrauterino de este grupo. Por su parte, la sobre exposición a glucocorticoides también se asocia con el incremento en la distancia ano-genital, como demuestran los trabajos de Stylianopoulou de los 80's¹²⁰. Por lo tanto, es posible pensar que el aumento en la distancia ano-genital es la conjunción del

aumento de andrógenos y corticoides. La participación de los estrógenos sería discutible.

Al igual que otros modelos de manipulación nutricional en roedores, en el presente estudio no se observaron alteraciones en el tamaño de las camadas ni en la proporción entre sexos^{48, 92}.

Diversos modelos de programación durante el desarrollo han mostrado efectos en el desarrollo sexual, principalmente en el inicio de la pubertad. De estos modelos, tanto la sobre-exposición a glucocorticoides¹¹⁸, como la manipulación nutricional hipocalórica¹⁷⁷ se asocian al retraso en la edad de la apertura vaginal en la rata. En el presente modelo, la restricción proteínica materna, en que además se presenta la sobre-exposición fetal a corticosteroides, también se presentó el retraso en el desarrollo sexual, tanto en términos de la apertura vaginal, como en el primer estro.

El inicio de la pubertad es un evento neuroendócrino que depende de la interacción de muchos factores²⁰⁸. Por un lado, depende de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario^{3, 208}, pero también de los hábitos alimenticios y de actividad física²⁰⁹ e incluso del peso y la composición corporal²¹⁰ han sido asociados con la edad de la pubertad²⁰⁸. Sin embargo hasta ahora no se tiene claro cuales son los mecanismos que originan el retraso en el desarrollo sexual observado en los modelos de programación durante el desarrollo.

Frisch²¹⁰, propone que el peso y la composición corporal son claves en el inicio de la pubertad. A los 21 días de vida, edad del destete, las hembras de los grupos RR y CR mostraron menor peso corporal respecto a CC y RC. Este comportamiento se mantuvo para la edad del inicio de la pubertad e incluso hasta la vida adulta temprana. El peso bajo al inicio de la pubertad ha sido descrito por otros autores con diferentes modelos experimentales, incluyendo la sobre-exposición a glucocorticoides¹¹⁸, la restricción nutricional hipocalórica¹⁷⁷, así como por deficiencia placentaria y aumento de crías por camada^{110, 111, 198}.

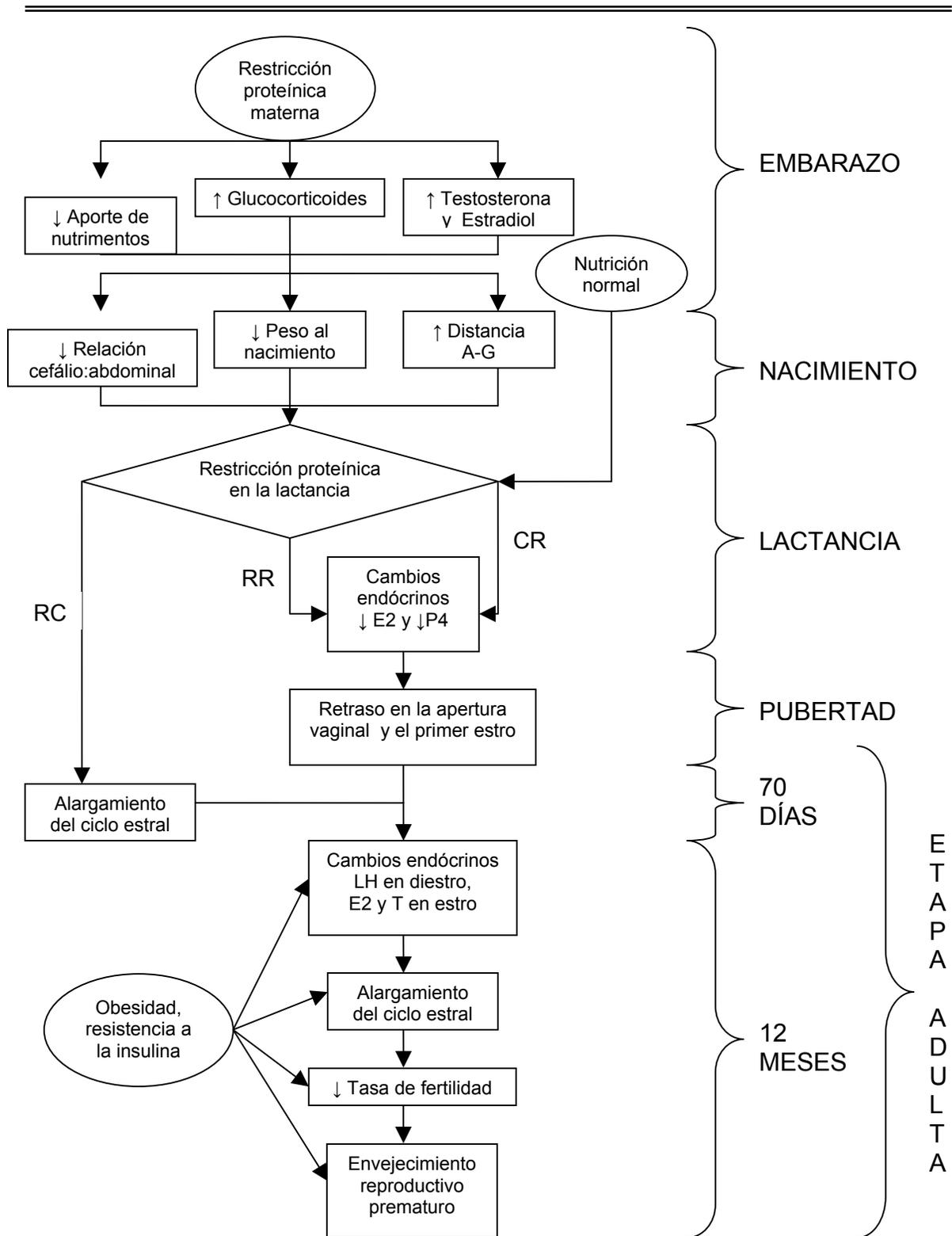


Figura 25. La figura resume los efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo, la lactancia o ambos periodos sobre el eje reproductivo femenino reportados en esta tesis.

De acuerdo con la hipótesis de Frisch, el retraso en la apertura vaginal y en el primer estro podría ser explicado, en cierto modo, por el bajo peso de las crías de los grupos RR y CR. Sin embargo el peso no es el único marcador determinante en este evento²⁰⁸.

En un estudio en ratas pre-pubertales, Leonhardt y colaboradores¹⁷⁷ describieron bajas concentraciones de leptina, hormona señalada como uno de los marcadores importantes para el inicio de la pubertad, en el suero de hembras restringidas hipocalóricamente en la lactancia. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el retraso en el inicio de la pubertad fue debido a algunas alteraciones identificadas en periodo pre-pubertal (Figura 25).

A los 21 días de edad, el peso ovárico y uterino tendió a ser más bajo en estas hembras, lo cuál fue significativo al hacer la relación con el peso corporal. Este peso bajo en ovarios y úteros de algún modo fue predictivo del retraso en el desarrollo sexual observado en estos grupos. A su vez, este efecto se asoció directamente con la menor secreción de las hormonas ováricas progesterona y estradiol presente a esta edad. El estudio de la expresión de genes involucrados en la esteroidogénesis mostró una evidente relación entre la disminución de estradiol y la baja expresión de aromatasa en el ovario. El estudio histológico del ovario mostró que las alteraciones hormonales y en el desarrollo observadas en estos grupos (RR y CR), a pesar de ser idénticas, corresponden a mecanismos diferentes. El grupo RR presentó un número de folículos antrales (los cuales ya tienen la capacidad de aromatizar⁵) similar al control, en contraste con el grupo CR que presentó una disminución significativa en esta población folicular. Sin embargo ambos grupos expresan de manera similar a la aromatasa, con lo que se pone en evidencia una disminución drástica en la expresión de esta enzima por folículo antral en el grupo RR. El grupo RC, a pesar de no haber mostrado retraso en el desarrollo sexual, presentó alteraciones en las poblaciones foliculares estudiadas. Es de llamar la atención el hecho que las poblaciones foliculares estudiadas son consistentemente menores en RC respecto a RR. Los datos

sugieren que la pérdida de folículos del grupo RC ocurre durante la lactancia. Este último grupo expresó en igual proporción a la aromatasa que el control, pero el transcrito fue producido por una cantidad de folículos muy baja. Por lo que se sugiere que los folículos antrales del ovario RC expresan en mucho mayor medida a la aromatasa.

Los folículos antrales también son los que expresan al receptor de FSH. La interacción de la FSH con su receptor a su vez controla la expresión de la aromatasa⁵. En este caso, a pesar de no mostrar diferencias en la expresión del FSH-R es claro que cada grupo presenta alteraciones en la expresión cuando se hace la relación con el número de folículos antrales. Así, los grupos CR y RC con menor cantidad de este tipo de folículos expresan mayor cantidad del receptor.

La disminución en las concentraciones de estradiol debidas a alteraciones en el número de folículos y la expresión de aromatasa y FSH-R al destete, pueden ser la explicación del posterior retraso en el inicio de pubertad. Sin embargo, posterior a la pubertad no se observaron diferencias en términos del ciclo reproductivo entre las hembras de los grupos restringidos y control.

La androgenización prenatal en ovejas se asocia con la disminución en el número de folículos en la etapa fetal, así como exceso en el reclutamiento folicular⁷⁴. Los datos aquí mostrados asocian la disminución en las poblaciones foliculares con el estadio en que se aplicó la restricción proteínica y no con la exposición prenatal a testosterona.

Queda en evidencia que los tres grupos experimentales presentaron alteraciones que no necesariamente se tradujeron en cambios fisiológicos fácilmente perceptibles, o bien, que a pesar de presentar comportamientos similares, el fenotipo es el resultado de diferentes mecanismos de adaptación a la restricción proteínica.

La vida adulta en las hembras podría dividirse en dos grandes periodos, la etapa reproductiva y la etapa posterior al cese de los ciclos reproductivos³. En la primera, la característica principal es la presencia de ciclos reproductivos y la ovulación que brindan la capacidad reproductiva, mientras que en la segunda la dotación de folículos ováricos se ha agotado y no hay más ciclos reproductivos²¹¹,

²¹². En la etapa del desarrollo correspondiente a la vida reproductiva, se complica el estudio de los diversos parámetros considerados para evaluar función reproductiva. Las variaciones cíclicas características de la hembra y sus consecuencias debidas a las etapas del ciclo reproductivo (en concentraciones hormonales, expresión de genes ováricos e incluso en la masa ovárica, uterina y mamaria por la acción de las hormonas involucradas), incrementan la complejidad del estudio en esta etapa, lo cual hace incluso más difícil la interpretación de los datos. Esto se hace más evidente en la rata en la que el ciclo y sus etapas son particularmente cortos ¹. Los estudios presentados en el presente trabajo durante la etapa adulta fueron realizados en su mayoría en la fase de diestro del ciclo estral, por lo que representan tan solo una pequeña visión del problema. Es probable que el fenotipo de estas hembras sea mucho más complejo de lo presentado aquí. Sin embargo en esta sección he tratado de incluir los datos más consistentes asociados a un significado fisiológico claro.

La mayor parte de los trabajos sobre la programación del eje reproductivo femenino han abordado el desarrollo sexual^{110, 111, 118, 177, 188, 198} y la tasa de fertilidad^{114, 117, 197} y en menor medida el ciclo estral¹¹⁹, sin que se hayan analizado los perfiles hormonales y el envejecimiento reproductivo. El único modelo en que se han estudiado algunos de estos indicadores es el de androgenización prenatal. El tratamiento de ovejas gestantes con dosis farmacológicas de propionato de testosterona, muestra alteraciones en algunos aspectos endócrinos. La respuesta hipofisaria en términos de las concentraciones de LH y FSH al estímulo con estradiol es tardía y exagerada¹⁴⁴. Sarma y colaboradores¹⁴⁷ proponen que la androgenización prenatal disminuye la sensibilidad a LH en el ovario y al estímulo inhibitorio de estradiol en hipófisis de estas hembras androgenizadas.

A pesar de que las hembras del presente estudio fueron expuestas a un exceso de testosterona en la etapa fetal, los datos hormonales son opuestos a los datos en oveja¹⁴⁴. Los resultados aquí obtenidos no muestran hipersecreción de LH y FSH. Por el contrario a las edades de 70 días y 12 meses en diestro, estas gonadotropinas se mostraron disminuidas (en el caso de la LH) o sin cambio (la FSH). Por su parte, los esteroides estradiol y testosterona de las ratas de este

estudio fueron modificados en la etapa de estro. La restricción proteínica pareció asociarse con un exceso en la secreción de testosterona que se incrementó aún más con la edad, lo cual es un signo de envejecimiento reproductivo en el eje HHO²¹³.

Se realizó el estudio de la expresión de genes involucrados en la esteroidogénesis en los ovarios de las ratas de 70 días de edad. Los cambios más llamativos se encuentran nuevamente en la expresión de aromatasa y FSH-R. En ambos genes, así como en el receptor de LH se presentó la disminución de su expresión en las hembras de los grupos RR y CR. En esta ocasión, durante el diestro, la disminución en la expresión del receptor de FSH se asoció directamente a la expresión de la aromatasa, la cual también se expresó de manera disminuida, a pesar de tener un estímulo circulante de FSH normal.

El LH-R controla transcripcionalmente al gen de P450 scc. Este último se expresa muy poco en las células de la granulosa de los folículos pequeños y en mayor proporción en folículos preovulatorios²¹⁴. En este trabajo, la disminución en la expresión de LH-R no representó cambios significativos en la expresión de P450 scc, a pesar de las bajas concentraciones circulantes de LH.

En el ser humano, la androgenización prenatal se asocia al síndrome de ovario poliquístico^{76, 150}. Esta entidad clínica se caracteriza por irregularidades menstruales, ovarios multifoliculares, hiperinsulinemia, hiperandrogenismo, y en algunos casos hipersecreción de LH y obesidad¹⁵⁰. El síndrome ha sido reproducido parcialmente en primates androgenizados *in utero*¹⁵³. En la oveja, la androgenización prenatal ha mostrado algunos de los efectos observados en el síndrome humano⁷⁵. Se ha identificado irregularidades en el ciclo estral incremento en la proporción de ciclos anovulatorios y persistencia folicular¹⁴⁶ además de pérdida prematura de la ciclicidad¹³⁸.

El modelo empleado en este estudio mostró un comportamiento del ciclo estral que estuvo claramente relacionado con la tasa de fertilidad y fue característico para cada grupo. A los 140 días, edad a la que la fertilidad fue la más alta en todos los grupos, no se observaron alteraciones más que en el grupo RC cuyo ciclo eran más largos. Para los 12 meses, la fertilidad había caído

drásticamente en todos los grupos restringidos, y el ciclo había incrementado su duración, principalmente en los grupos RR y CR. De manera similar a los modelos de androgenización prenatal, la proporción de hembras que presentaron ciclos a los 12 meses se redujo en comparación con los 140 días. Aunado a la disminución en la tasa de fertilidad, el número de crías por camada disminuyó con la edad, sin embargo esto último es característico en ratas de edad avanzada^{211, 212, 215}.

Estudios epidemiológicos en seres humanos no han identificado la caída en la fertilidad de mujeres sujetas a restricción nutricional⁴¹. En contraste, la investigación en animales la ha confirmado en diversas especies por la sobreexposición fetal a glucocorticoides¹⁹⁷ y la desnutrición materna^{114, 117}. En el modelo de restricción proteínica materna, las hembras estuvieron expuestas tanto a exceso de glucocorticoides como a desnutrición materna, por lo que era de esperarse la disminución en la fertilidad. Si embargo esta caída en la capacidad reproductiva se presentó hasta el año de vida, y no en la etapa adulta joven, donde la fertilidad fue máxima.

Cabe resaltar que los grupos que presentan menor fertilidad, CR y RC, son precisamente los que mostraron menor número de folículos pre antrales y antrales a la edad de 21 días. Es posible que de hecho estos grupos tuvieran una dotación folicular menor respecto a los otros dos grupos, lo cual constituiría una respuesta adaptativa predictiva. Estas adaptaciones predictivas podrían resultar en la disminución de ovocitos en el ovario.

De manera natural, las ratas hembras muestran una disminución progresiva en el mantenimiento de ciclos estrales regulares^{212, 216}. Además de la pérdida de la ciclicidad, otros de los marcadores de envejecimiento reproductivo son el incremento en la secreción de FSH y la disminución de estradiol²¹³, así como la reducción en el número de crías por camada²¹¹.

Previamente Bukovsky y colaboradores²¹⁷ habían identificado el envejecimiento ovárico en ratas androgenizadas neonatalmente, a pesar de que las hembras de esta tesis no fueron expuestas a andrógenos en la etapa neonatal, se observaron algunos marcadores de envejecimiento reproductivo prematuro. Además de la disminución de la fertilidad las hembras del presente trabajo

mostraron algunos de esos marcadores a partir del año de vida. A los 22 meses, edad cercana al final de la etapa reproductiva, las ratas en general no presentaron diferencias estadísticas en los parámetros estudiados. La única peculiaridad de esta edad es que en el grupo CC aún se observaron algunas ratas que presentaron ciclos estrales. A pesar del retraso en el desarrollo sexual que mostraron las hembras restringidas en la lactancia, a esta edad ya no muestran ciclos, lo cual sugiere un acortamiento en la vida reproductiva, con un inicio de pubertad tardío y el fin de la etapa reproductiva al mismo tiempo, sino es que previo respecto a grupo control.

La tasa de mortalidad y sobrevida de las hembras del presente estudio fueron claramente influidas por la alimentación materna durante el embarazo y la lactancia. La ganancia excesiva de peso en las hembras RC fue un factor determinante en su expectativa de vida, pues la obesidad de este grupo se asoció con menor sobrevida lo cual era de esperarse debido a los problemas metabólicos que generalmente acompañan a la obesidad^{218, 219}. Los estudios de programación durante el desarrollo indican que la restricción nutricional materna es determinante en la posterior aparición de enfermedades que incluyen diabetes tipo 2, hipertensión, obesidad y enfermedades coronarias^{14, 19, 20, 23, 30}. Nuestro grupo de trabajo incluso identificó en estas mismas ratas el incremento en resistencia a la insulina en algunos de los grupos experimentales⁹⁸, lo cual sin duda contribuyó a su menor esperanza de vida.

Otro factor que se identificó durante la realización del presente trabajo, aun cuando no está incluido, fue la mayor incidencia de tumores mamarios relacionada con la ventana de exposición a la restricción proteínica materna, en el grupo CR. Las alteraciones en los perfiles hormonales de este grupo podrían estar involucradas en este fenómeno, sin embargo estudios a mayor profundidad y diseñados para tal efecto se deben llevar a cabo para identificar de manera confiable estos efectos. En las ratas de la cepa Wistar, utilizadas en este trabajo, la aparición de diversos tumores espontáneos, entre ellos el de mama, es un indicador de envejecimiento²²⁰⁻²²². El hecho de que la incidencia de tumores mamarios fuera mayor en un grupo, en cierto modo refleja un efecto característico

del la restricción proteínica en la lactancia que no se presenta, por ejemplo, en el caso del grupo RR.

Estos datos, una vez más hacen hincapié en el hecho de cada grupo tiene un comportamiento característico debido a las adaptaciones predictivas, acertadas o erróneas, debidas al reto nutricional materno específico.

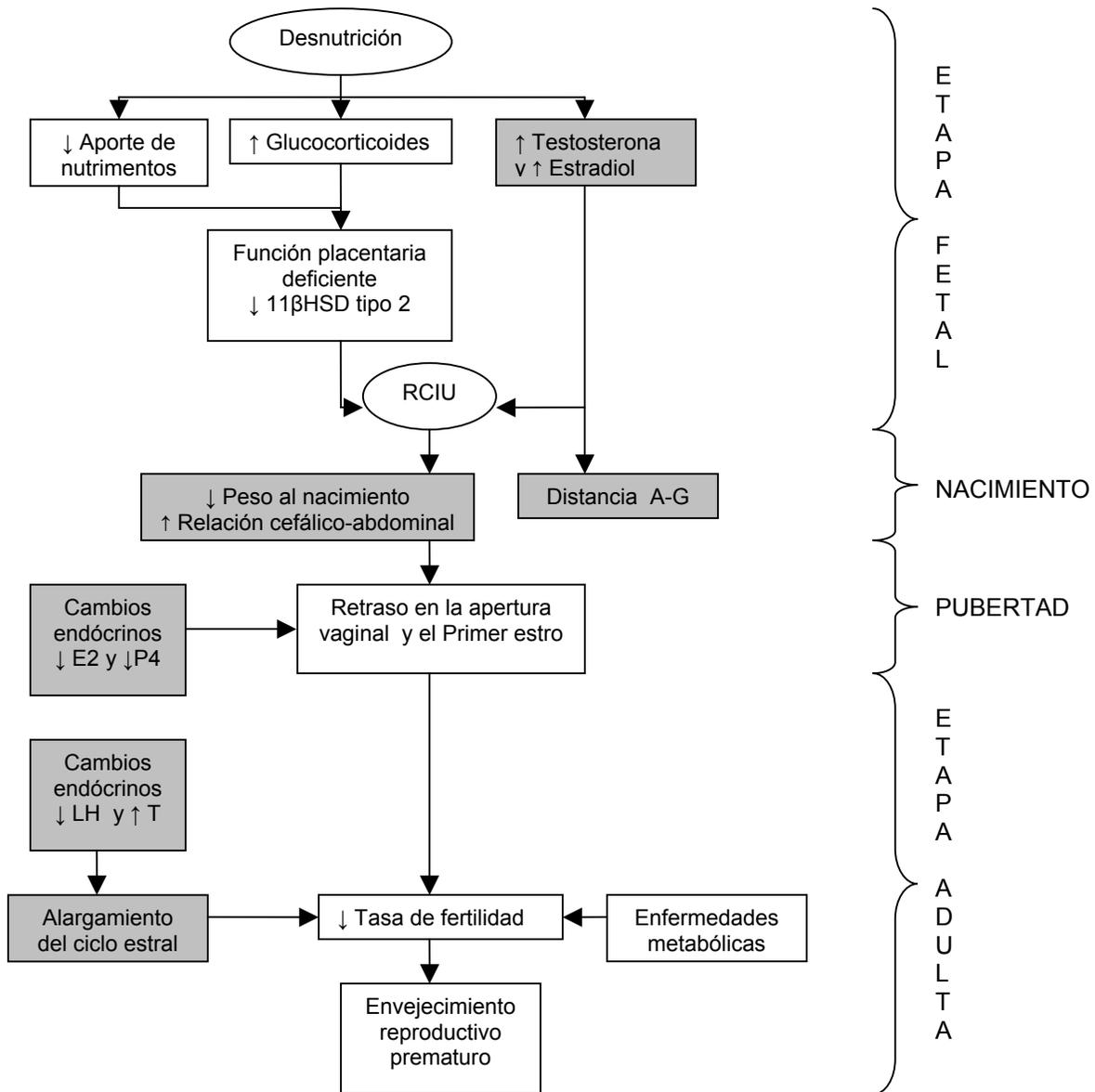


Figura 26. La figura muestra los efectos más representativos de la programación durante el desarrollo sobre el eje reproductivo femenino. Los datos mostrados han sido obtenidos en diferentes modelos experimentales.

Los efectos mostrados en recuadros oscuros son la aportación de la presente tesis a este campo del conocimiento.

CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en el presente trabajo permiten llegar a algunas conclusiones respecto a los efectos de la restricción proteínica materna durante el embarazo y la lactancia en el desarrollo sexual y la función reproductiva de las crías hembras de rata.

Se puede afirmar que la nutrición materna inadecuada, incluso en uno solo de sus componentes, modifica el fenotipo de las crías cuando coincide con periodos críticos del desarrollo de las mismas. La calidad nutricional materna durante el embarazo es un factor determinante en el desarrollo fetal de las crías y en el crecimiento materno.

Por su parte, la restricción proteínica materna durante la lactancia es importante para el crecimiento generalizado de las crías. El desarrollo de las crías es sensible al estado nutricional materno y depende de la conjunción entre las dietas maternas durante el embarazo y la lactancia. La ganancia excesiva de peso, o bien el retraso en el crecimiento programado en estos dos periodos se asocia al posterior desarrollo de enfermedades metabólicas.

Si bien algunos de los efectos de la restricción proteínica son similares entre los grupos, cada efecto es programado por un estímulo diferente, dada la conjunción de los periodos de restricción proteínica materna con los de nutrición adecuada característica de cada grupo.

Finalmente, se puede afirmar que la restricción proteínica materna durante el embarazo y la lactancia afecta el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de las crías. Las alteraciones más evidentes se presentan como el retraso en el desarrollo sexual y la disminución prematura de la tasa de fertilidad. Estos efectos son consecuencia de respuestas adaptativas predictivas adquiridas durante las etapas fetal y neonatal del desarrollo, y se manifiestan de acuerdo al estímulo particular recibido.

PERSPECTIVAS

En términos de salud pública, es de gran relevancia el estudio de la programación durante el desarrollo ya que se ha demostrado su asociación con el origen de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, la obesidad y la hipertensión. Las adaptaciones que sufre un individuo en los estadios más tempranos de su vida, y en respuesta al ambiente intrauterino y postnatal, modifican su organismo a nivel metabólico para asegurar su supervivencia a corto plazo. Sin embargo estas mismas adaptaciones, aunque necesarias, pudieran no ser tan benéficas a largo plazo, y poner en riesgo la salud en la etapa adulta. La alta incidencia de desnutrición materna entre los seres humanos podría ser la responsable de la pandemia de diabetes tipo 2, obesidad y enfermedades cardiovasculares que enfrentamos en nuestros días.

El estudio de la programación del eje reproductivo por desnutrición materna es de gran importancia. Su implicación en la salud reproductiva de la descendencia incluye alteraciones en el desarrollo sexual, infertilidad, y podría asociarse a otros padecimientos como síndrome de ovario poliquístico y la aparición de tumores mamarios. Aun más, la posible adquisición de improntas genómicas en respuesta al ambiente intrauterino y post natal adverso, principalmente las generadas en la línea germinal, asegurarían el paso transgeneracional de tales padecimientos^{81, 223}.

La mayor parte de los efectos de la desnutrición materna en el eje reproductivo han sido detectados mediante estudios experimentales en animales de laboratorio. Hasta ahora, estos trabajos han permitido la identificación de muchos de los efectos de la restricción nutricional en el eje reproductivo femenino, sin embargo los mecanismos mediante los cuales se originan estas alteraciones fenotípicas y funcionales no han sido descritos.

La mayoría de tales mecanismos pudieran presentarse en las etapas fetal y neonatal, como respuesta a la restricción proteínica. Si bien algunos autores han descrito retraso en el desarrollo ovárico fetal y en la foliculogénesis^{182, 183}, no se tiene claro cuales son los eventos que originan estas alteraciones.

Quedan muchas interrogantes en el estudio de la programación del eje HHO, entre ellas el comportamiento de las poblaciones foliculares tanto en etapas fetales como neonatales y en la edad adulta. Estos estudios podría dar nuevos indicios del por qué la fertilidad decae de manera prematura en las hembras mal adaptadas.

En este mismo sentido, uno de los estudios que se mantiene pendiente es la influencia de las enfermedades metabólicas descritas (resistencia a la insulina y obesidad⁹⁸) en la pérdida prematura de la fertilidad, la ciclicidad, las anormalidades hormonales, así como su asociación con otros sistemas endócrinos, incluyendo a la leptina y las hormonas tiroideas y adrenales.

Este estudio únicamente consideró al embarazo y a la lactancia como periodos críticos, pero dentro de estos dos periodos se encuentra un gran número de ventanas críticas. El estudio de ventanas específicas con mayor número de grupos experimentales en los cuales se exploren periodos más pequeños en el desarrollo fetal y neonatal podría identificar con precisión los momentos de susceptibilidad del eje HHO a la restricción proteínica.

En general, el estudio de los efectos de la desnutrición materna y los mecanismos que originan los padecimientos tanto metabólicos como reproductivos de la edad adulta es de una enorme importancia para la investigación biomédica y para el establecimiento de nuevos programas de salud materna que pudieran beneficiar a las generaciones futuras en términos de salud metabólica y reproductiva.

REFERENCIAS

1. Freeman M. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*, Knobil E & Neill JD, Ed. Raven Press LTD, New York. 1994:613-658.
2. Hotchkiss J KE. The menstrual cycle and its neuroendocrine control. En: *The Physiology of Reproduction*, Knobil E & Neill JD, Ed. Raven Press LTD, New York. 1994:711-749.
3. Yeh J AE. The ovarian life cycle. En: *Reproductive Endocrinology*: Yen S & Adashi A, 1994:153-190.
4. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction* 2001; 122:215-26.
5. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 1994; 15:725-51.
6. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21:200-14.
7. Stocco DM. Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol* 2001; 15:1245-54.
8. Hickey GJ, Chen SA, Besman MJ, et al. Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology* 1988; 122:1426-36.
9. Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J. Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Prog Horm Res* 1995; 50:223-54.
10. Gomberg-Malool S, Ziv R, Re'em Y, Posner I, Levitzki A, Orly J. Tyrphostins inhibit follicle-stimulating hormone-mediated functions in cultured rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1993; 132:362-70.
11. Caron KM, Ikeda Y, Soo SC, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ. Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 1997; 11:138-47.
12. Sandhoff TW, Hales DB, Hales KH, McLean MP. Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology* 1998; 139:4820-31.
13. Barker DJ. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 2004; 58:114-5.
14. Barker DPJ. *Mothers, Babies and Health in Later Life*. London: Churchill Livingstone, 1998:1-217.
15. Hoet JJ, Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol* 1999; 514 (Pt 3):617-27.
16. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986; 1:1077-81.
17. Barker DJ, Gluckman PD, Robinson JS. Conference report: fetal origins of adult disease--report of the First International Study Group, Sydney, 29-30 October 1994. *Placenta* 1995; 16:317-20.

-
-
18. Godfrey KM, Barker DJ, Peace J, Cloke J, Osmond C. Relation of fingerprints and shape of the palm to fetal growth and adult blood pressure. *Bmj* 1993; 307:405-9.
 19. Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:364-8.
 20. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998; 351:173-7.
 21. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001; 60:5-20.
 22. Holness MJ, Langdown ML, Sugden MC. Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus. *Biochem J* 2000; 349 Pt 3:657-65.
 23. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 1976; 295:349-53.
 24. Barraclough CA. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 1961; 68:62-7.
 25. Hanson M, Gluckman P, Bier D, et al. Report on the 2nd World Congress on Fetal Origins of Adult Disease, Brighton, U.K., June 7-10, 2003. *Pediatr Res* 2004; 55:894-7.
 26. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004; 305:1733-6.
 27. Phillips DI. Fetal growth and programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28:967-70.
 28. Fall CH. Non-industrialised countries and affluence. *Br Med Bull* 2001; 60:33-50.
 29. Gillman MW. Developmental origins of health and disease. *N Engl J Med* 2005; 353:1848-50.
 30. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993; 341:938-41.
 31. Stein AD, Ravelli AC, Lumey LH. Famine, third-trimester pregnancy weight gain, and intrauterine growth: the Dutch Famine Birth Cohort Study. *Hum Biol* 1995; 67:135-50.
 32. Brown AS, van Os J, Driessens C, Hoek HW, Susser ES. Further evidence of relation between prenatal famine and major affective disorder. *Am J Psychiatry* 2000; 157:190-5.
 33. Nathanielsz PW. *Life in the Womb. The Origin of Health and Disease*. Ithaca, N.Y.: Promethean Press, 1999:1-363.
 34. Stein AD, Zybert PA, van de Bor M, Lumey LH. Intrauterine famine exposure and body proportions at birth: the Dutch Hunger Winter. *Int J Epidemiol* 2004; 33:831-6.
 35. Godfrey KM. The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta* 2002; 23 Suppl A:S20-7.
 36. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1344S-52S.
 37. Liu L, Harding JE, Evans PC, Gluckman PD. Maternal insulin-like growth factor-I infusion alters fetoplacental carbohydrate and protein metabolism in pregnant sheep. *Endocrinology* 1994; 135:895-900.
 38. Harding JE, Liu L, Evans PC, Gluckman PD. Insulin-like growth factor 1 alters fetoplacental protein and carbohydrate metabolism in fetal sheep. *Endocrinology* 1994; 134:1509-14.
 39. Gluckman PD. Editorial: nutrition, glucocorticoids, birth size, and adult disease. *Endocrinology* 2001; 142:1689-91.
 40. Lumey LH, Van Poppel FW. The Dutch famine of 1944-45: mortality and morbidity in past and present generations. *Soc Hist Med* 1994; 7:229-46.

-
-
41. Lumey LH, Stein AD. In utero exposure to famine and subsequent fertility: The Dutch Famine Birth Cohort Study. *Am J Public Health* 1997; 87:1962-6.
 42. Lummaa V. Early developmental conditions and reproductive success in humans: downstream effects of prenatal famine, birthweight, and timing of birth. *Am J Hum Biol* 2003; 15:370-9.
 43. Lummaa V, Tremblay M. Month of birth predicted reproductive success and fitness in pre-modern Canadian women. *Proc Biol Sci* 2003; 270:2355-61.
 44. de Rooij SR, Painter RC, Phillips DI, et al. Impaired insulin secretion after prenatal exposure to the Dutch famine. *Diabetes Care* 2006; 29:1897-901.
 45. Stanner SA, Bulmer K, Andres C, et al. Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *Bmj* 1997; 315:1342-8.
 46. Gonzalez Zapata LI, Alvarez-Dardet Diaz C, Nolasco Bonmati A, Pina Romero JA, Medrano MJ. [Famine in the Spanish civil war and mortality from coronary heart disease: a perspective from Baker's hypothesis.]. *Gac Sanit* 2006; 20:360-7.
 47. Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* 1994; 86:217-22; discussion 121.
 48. Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, et al. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta* 1996; 17:169-72.
 49. Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)* 1996; 91:607-15.
 50. Newnham JP. Is prenatal glucocorticoid administration another origin of adult disease? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28:957-61.
 51. Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 2005; 563:275-84.
 52. Imai E, Miner JN, Mitchell JA, Yamamoto KR, Granner DK. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem* 1993; 268:5353-6.
 53. Jones CG, Hothi SK, Titheradge MA. Effect of dexamethasone on gluconeogenesis, pyruvate kinase, pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase flux in isolated hepatocytes. *Biochem J* 1993; 289 (Pt 3):821-8.
 54. Matthews SG. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:373-80.
 55. Lindsay JR, Nieman LK. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy: challenges in disease detection and treatment. *Endocr Rev* 2005; 26:775-99.
 56. Liggins GC. Premature parturition after infusion of corticotrophin or cortisol into foetal lambs. *J Endocrinol* 1968; 42:323-9.
 57. Liggins GC. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol* 1969; 45:515-23.
 58. Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 1972; 50:515-25.
 59. Foix-L'helias L, Baud O, Lenclen R, Kaminski M, Lacaze-Masmonteil T. Benefit of antenatal glucocorticoids according to the cause of very premature birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005; 90:F46-8.

-
-
60. Trahair JF, Sangild PT. Systemic and luminal influences on the perinatal development of the gut. *Equine Vet J Suppl* 1997;40-50.
 61. Lebenthal A, Lebenthal E. The ontogeny of the small intestinal epithelium. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23:S3-6.
 62. Stewart PM, Whorwood CB, Mason JI. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 55:465-71.
 63. Seckl JR, Benediktsson R, Lindsay RS, Brown RW. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the programming of hypertension. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 55:447-55.
 64. Kajantie E, Dunkel L, Turpeinen U, et al. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 and fetal cortisol/cortisone shuttle in small preterm infants. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:493-500.
 65. Holmes MC, Abrahamsen CT, French KL, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR. The mother or the fetus? 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *J Neurosci* 2006; 26:3840-4.
 66. Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 1993; 341:339-41.
 67. Sugden MC, Langdown ML, Munns MJ, Holness MJ. Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:529-39.
 68. O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287:E863-70.
 69. Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia* 1996; 39:1299-305.
 70. Sloboda DM, Moss TJ, Li S, et al. Hepatic glucose regulation and metabolism in adult sheep: effects of prenatal betamethasone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E721-8.
 71. Seckl JR, Nyirenda MJ, Walker BR, Chapman KE. Glucocorticoids and fetal programming. *Biochem Soc Trans* 1999; 27:74-8.
 72. Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 2004; 151 Suppl 3:U49-62.
 73. Manikkam M, Crespi EJ, Doop DD, et al. Fetal programming: prenatal testosterone excess leads to fetal growth retardation and postnatal catch-up growth in sheep. *Endocrinology* 2004; 145:790-8.
 74. Steckler T, Wang J, Bartol FF, Roy SK, Padmanabhan V. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology* 2005; 146:3185-93.
 75. Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, et al. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E801-6.

-
-
76. Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Perez-Bravo F, Recabarren SE. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod* 2002; 17:2573-9.
 77. Sir-Petermann T, Hitchensfeld C, Maliqueo M, et al. Birth weight in offspring of mothers with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2005; 20:2122-6.
 78. Padmanabhan V, Manikkam M, Recabarren S, Foster D. Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 246:165-74.
 79. Guzman C, Zambrano E. Endocrine disruptor compounds and their role on the developmental programming of the reproductive axis. *Rev Inv Clin* 2007; 59.
 80. Sweeney T. Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23:203-9.
 81. Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 2006; 147:S43-9.
 82. Amaral Mendes JJ. The endocrine disruptors: a major medical challenge. *Food Chem Toxicol* 2002; 40:781-8.
 83. Siddiqi MA, Laessig RH, Reed KD. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants-old diseases. *Clin Med Res* 2003; 1:281-90.
 84. Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, et al. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 2006; 114:270-6.
 85. Hawkins P, Hanson MA, Matthews SG. Maternal undernutrition in early gestation alters molecular regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the ovine fetus. *J Neuroendocrinol* 2001; 13:855-61.
 86. Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, Whorwood CB. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology* 2001; 142:2841-53.
 87. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:E83-7.
 88. Bloomfield FH, Oliver MH, Hawkins P, et al. Periconceptional undernutrition in sheep accelerates maturation of the fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in late gestation. *Endocrinology* 2004; 145:4278-85.
 89. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr* 2004; 134:2169-72.
 90. Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr* 1996; 126:1578-85.
 91. Edwards LJ, Coulter CL, Symonds ME, McMillen IC. Prenatal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28:938-41.
 92. Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* 1999; 64:965-74.
 93. Bennis-Taleb N, Remacle C, Hoet JJ, Reusens B. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J Nutr* 1999; 129:1613-9.

-
-
94. Davies MJ, Norman RJ. Programming and reproductive functioning. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:386-92.
 95. Rhind SM, Rae MT, Brooks AN. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 2001; 122:205-14.
 96. Rhind SM. Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83:169-81.
 97. Stewart RJ, Preece RF, Sheppard HG. Twelve generations of marginal protein deficiency. *Br J Nutr* 1975; 33:233-53.
 98. Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005; 566:225-36.
 99. Hoek HW, Susser E, Buck KA, Lumey LH, Lin SP, Gorman JM. Schizoid personality disorder after prenatal exposure to famine. *Am J Psychiatry* 1996; 153:1637-9.
 100. Hulshoff Pol HE, Hoek HW, Susser E, et al. Prenatal exposure to famine and brain morphology in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000; 157:1170-2.
 101. Cutler AR, Wilkerson AE, Gingras JL, Levin ED. Prenatal cocaine and/or nicotine exposure in rats: preliminary findings on long-term cognitive outcome and genital development at birth. *Neurotoxicol Teratol* 1996; 18:635-43.
 102. Dalterio S, Bartke A. Fetal testosterone in mice: effect of gestational age and cannabinoid exposure. *J Endocrinol* 1981; 91:509-14.
 103. Romano AG, Harvey JA. Prenatal cocaine exposure: long-term deficits in learning and motor performance. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 846:89-108.
 104. Wallace JM, Bourke DA, Aitken RP, Palmer RM, Da Silva P, Cruickshank MA. Relationship between nutritionally-mediated placental growth restriction and fetal growth, body composition and endocrine status during late gestation in adolescent sheep. *Placenta* 2000; 21:100-8.
 105. Wallace JM, Da Silva P, Aitken RP, Cruickshank MA. Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescent sheep. *J Endocrinol* 1997; 155:359-68.
 106. Wallace JM, Bourke DA, Aitken RP, Leitch N, Hay WW, Jr. Blood flows and nutrient uptakes in growth-restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282:R1027-36.
 107. Ward IL. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science* 1972; 175:82-4.
 108. Ward IL, Weisz J. Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science* 1980; 207:328-9.
 109. 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; 370:1-10.
 110. 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; 48:803-7.
 111. 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; 50:474-8.
 112. Cameron JL. Regulation of reproductive hormone secretion in primates by short-term changes in nutrition. *Rev Reprod* 1996; 1:117-26.

-
-
113. Robinson JJ. Nutrition and reproduction. *Anim Reprod Sci* 1996; 42:25-34.
 114. Gunn RG, Doney JM. The effects of nutrition and rainfall at the time of mating on the reproductive performance of ewes. *J Reprod Fertil Suppl* 1973; 19:253-8.
 115. Doney JM, Gunn RG, Griffiths JG. The effect of pre-mating stress on the onset of oestrus and on ovulation rate in Scottish Blackface ewes. *J Reprod Fertil* 1973; 35:381-4.
 116. Allden WG. The effects of nutritional deprivation on the subsequent productivity of sheep and cattle. *Nutr Abstr Rev* 1970; 40:1167-84.
 117. Gunn R. Effects of nutrition in utero and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes in two management systems. *Animal Science* 1995; 60:223-250.
 118. Smith JT, Waddell BJ. Increased fetal glucocorticoid exposure delays puberty onset in postnatal life. *Endocrinology* 2000; 141:2422-8.
 119. Politch JA, Herrenkohl LR. Postnatal ACTH and corticosterone: effects on reproduction in mice. *Physiol Behav* 1984; 32:447-52.
 120. Stylianopoulou F. Effect of maternal adrenocorticotropin injections on the differentiation of sexual behavior of the offspring. *Horm Behav* 1983; 17:324-31.
 121. Harvey PW, Chevins PF. Deleterious effects of adrenocorticotrophic hormone administration during late pregnancy upon offspring somatic, neurological, and sexual development in mice. *Teratology* 1987; 35:229-38.
 122. Marton IS. Prenatal steroid for the prevention of respiratory distress. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:681.
 123. Dessens AB, Haas HS, Koppe JG. Twenty-year follow-up of antenatal corticosteroid treatment. *Pediatrics* 2000; 105:E77.
 124. Kosut SS, Wood RI, Herbosa-Encarnacion C, Foster DL. Prenatal androgens time neuroendocrine puberty in the sheep: effect of testosterone dose. *Endocrinology* 1997; 138:1072-7.
 125. Sir-Petermann T, Codner E, Maliqueo M, et al. Increased anti-Mullerian hormone serum concentrations in prepubertal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3105-9.
 126. Veurink M, Koster M, Berg LT. The history of DES, lessons to be learned. *Pharm World Sci* 2005; 27:139-43.
 127. Blatt J, Van Le L, Weiner T, Sailer S. Ovarian carcinoma in an adolescent with transgenerational exposure to diethylstilbestrol. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25:635-6.
 128. Crews D, McLachlan JA. Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. *Endocrinology* 2006; 147:S4-10.
 129. Kaufman RH, Adam E. Findings in female offspring of women exposed in utero to diethylstilbestrol. *Obstet Gynecol* 2002; 99:197-200.
 130. Swanson HE, Werff ten Bosch JJ. The "early-androgen" syndrome; effects of prenatal testosterone propionate. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1965; 50:379-90.
 131. Foecking EM, Szabo M, Schwartz NB, Levine JE. Neuroendocrine consequences of prenatal androgen exposure in the female rat: absence of luteinizing hormone surges, suppression of progesterone receptor gene expression, and acceleration of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Biol Reprod* 2005; 72:1475-83.
 132. Hoepfner BA, Ward IL. Prenatal and neonatal androgen exposure interact to affect sexual differentiation in female rats. *Behav Neurosci* 1988; 102:61-5.
 133. Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray LE, Jr. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. *Toxicol Sci* 2002; 65:71-86.

-
-
134. Barraclough CA, Gorski RA. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 1961; 68:68-79.
 135. Stylianopoulou F, Fameli M, Brountzos E, Contopoulos AN. Neonatal neural organizing effects of exogenous corticosteroids on sexual differentiation of the brain in the female rat. *Horm Behav* 1983; 17:332-41.
 136. Gandelman R, Simon NG, McDermott NJ. Prenatal exposure to testosterone and its precursors influences morphology and later behavioral responsiveness to testosterone of female mice. *Physiol Behav* 1979; 23:23-6.
 137. Gill JW, Hosking BJ. Acute prenatal androgen treatment increases birth weights and growth rates in lambs. *J Anim Sci* 1995; 73:2600-8.
 138. 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; 144:1426-34.
 139. Kim SJ, Foster DL, Wood RI. Prenatal testosterone masculinizes synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Biol Reprod* 1999; 61:599-605.
 140. West C, Foster DL, Evans NP, Robinson J, Padmanabhan V. Intra-follicular activin availability is altered in prenatally-androgenized lambs. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185:51-9.
 141. 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; 23:43-52.
 142. Sharma TP, Herkimer C, West C, et al. Fetal programming: prenatal androgen disrupts positive feedback actions of estradiol but does not affect timing of puberty in female sheep. *Biol Reprod* 2002; 66:924-33.
 143. Unsworth WP, Taylor JA, Robinson JE. Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: the effect of prenatal androgens on the development of estrogen positive feedback and ovarian cycles in the ewe. *Biol Reprod* 2005; 72:619-27.
 144. Savabieasfahani M, Lee JS, Herkimer C, Sharma TP, Foster DL, Padmanabhan V. Fetal programming: testosterone exposure of the female sheep during midgestation disrupts the dynamics of its adult gonadotropin secretion during the periovulatory period. *Biol Reprod* 2005; 72:221-9.
 145. Clarke IJ, Scaramuzzi RJ, Short RV. Ovulation in prenatally androgenized ewes. *J Endocrinol* 1977; 73:385-9.
 146. Manikkam M, Steckler TL, Welch KB, Inskeep EK, Padmanabhan V. Fetal programming: prenatal testosterone treatment leads to follicular persistence/luteal defects; partial restoration of ovarian function by cyclic progesterone treatment. *Endocrinology* 2006; 147:1997-2007.
 147. Sarma HN, Manikkam M, Herkimer C, et al. Fetal programming: excess prenatal testosterone reduces postnatal luteinizing hormone, but not follicle-stimulating hormone responsiveness, to estradiol negative feedback in the female. *Endocrinology* 2005; 146:4281-91.
 148. Zehr JL, Van Meter PE, Wallen K. Factors regulating the timing of puberty onset in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): role of prenatal androgens, social rank, and adolescent body weight. *Biol Reprod* 2005; 72:1087-94.
 149. Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, Abbott DH. Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1206-10.
 150. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol* 2002; 174:1-5.

-
-
151. Eisner JR, Barnett MA, Dumesic DA, Abbott DH. Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess. *Fertil Steril* 2002; 77:167-72.
 152. Dumesic DA, Abbott DH, Eisner JR, Goy RW. Prenatal exposure of female rhesus monkeys to testosterone propionate increases serum luteinizing hormone levels in adulthood. *Fertil Steril* 1997; 67:155-63.
 153. Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, Abbott DH. Adrenal hyperandrogenism is induced by fetal androgen excess in a rhesus monkey model of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:6630-7.
 154. Parsons B, Rainbow TC, McEwen BS. Organizational effects of testosterone via aromatization on feminine reproductive behavior and neural progesterin receptors in rat brain. *Endocrinology* 1984; 115:1412-7.
 155. Rosa ESA, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 2003; 144:4289-97.
 156. Yamamoto M, Shirai M, Sugita K, et al. Effects of maternal exposure to diethylstilbestrol on the development of the reproductive system and thyroid function in male and female rat offspring. *J Toxicol Sci* 2003; 28:385-94.
 157. Yamamoto M, Shirai M, Tamura A, et al. Effects of maternal exposure to a low dose of diethylstilbestrol on sexual dimorphic nucleus volume and male reproductive system in rat offspring. *J Toxicol Sci* 2005; 30:7-18.
 158. Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, et al. Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol* 2002; 16:107-16.
 159. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology* 2006; 147:S11-7.
 160. Lewis RW, Brooks N, Milburn GM, et al. The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicol Sci* 2003; 71:74-83.
 161. Herath CB, Watanabe G, Katsuda S, Yoshida M, Suzuki AK, Taya K. Exposure of neonatal female rats to p-tert-octylphenol disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adulthood. *Biol Reprod* 2001; 64:1216-24.
 162. Wright C, Evans AC, Evans NP, et al. Effect of maternal exposure to the environmental estrogen, octylphenol, during fetal and/or postnatal life on onset of puberty, endocrine status, and ovarian follicular dynamics in ewe lambs. *Biol Reprod* 2002; 67:1734-40.
 163. Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:7014-9.
 164. Warner M, Samuels S, Mocarelli P, et al. Serum dioxin concentrations and age at menarche. *Environ Health Perspect* 2004; 112:1289-92.
 165. Wolff MS, Britton JA, Russo JC. TCDD and puberty in girls. *Environ Health Perspect* 2005; 113:A17; author reply A18.
 166. Eskenazi B, Warner M, Mocarelli P, et al. Serum dioxin concentrations and menstrual cycle characteristics. *Am J Epidemiol* 2002; 156:383-92.
 167. Takser L, Mergler D, Baldwin M, de Grosbois S, Smargiassi A, Lafond J. Thyroid hormones in pregnancy in relation to environmental exposure to organochlorine compounds and mercury. *Environ Health Perspect* 2005; 113:1039-45.

-
-
168. Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek NE, Main KM. Environmental chemicals and thyroid function. *Eur J Endocrinol* 2006; 154:599-611.
 169. Doufas AG, Mastorakos G. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis and the female reproductive system. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900:65-76.
 170. Salisbury TB, Marcinkiewicz JL. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran reduces growth and disrupts reproductive parameters in female rats. *Biol Reprod* 2002; 66:1621-6.
 171. Wolf CJ, Ostby JS, Gray LE, Jr. Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicol Sci* 1999; 51:259-64.
 172. Salama J, Chakraborty TR, Ng L, Gore AC. Effects of polychlorinated biphenyls on estrogen receptor-beta expression in the anteroventral periventricular nucleus. *Environ Health Perspect* 2003; 111:1278-82.
 173. Clemens LG, Gladue BA, Coniglio LP. Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. *Horm Behav* 1978; 10:40-53.
 174. Gladue BA, Clemens LG. Androgenic influences on feminine sexual behavior in male and female rats: defeminization blocked by prenatal antiandrogen treatment. *Endocrinology* 1978; 103:1702-9.
 175. Baldrige MG, Stahl RL, Gerstenberger SL, Tripoli V, Hutz RJ. Modulation of ovarian follicle maturation in Long-Evans rats exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs) in-utero and lactationally. *Reprod Toxicol* 2003; 17:567-73.
 176. Baldrige MG, Stahl RL, Gerstenberger SL, Tripoli V, Hutz RJ. In utero and lactational exposure of Long-Evans rats to ammonium perchlorate (AP) disrupts ovarian follicle maturation. *Reprod Toxicol* 2004; 19:155-61.
 177. Leonhardt M, Lesage J, Dufourny L, Dickes-Coopman A, Montel V, Dupouy JP. Perinatal maternal food restriction induces alterations in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and in plasma corticosterone-binding globulin capacity of weaning rat pups. *Neuroendocrinology* 2002; 75:45-54.
 178. Williams AH. Long term effects of nutrition of ewe lambs in the neonatal period. En: *Reproduction in Sheep*. Lindsay DR & Pearce DT. 1984:272-73.
 179. Cresswell JL, Barker DJ, Osmond C, Egger P, Phillips DI, Fraser RB. Fetal growth, length of gestation, and polycystic ovaries in adult life. *Lancet* 1997; 350:1131-5.
 180. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Phillips DI, Sultan HY. Weight gain in infancy and cancer of the ovary. *Lancet* 1995; 345:1087-8.
 181. Hilakivi-Clarke L, Forsen T, Eriksson JG, et al. Tallness and overweight during childhood have opposing effects on breast cancer risk. *Br J Cancer* 2001; 85:1680-4.
 182. Borwick SC, Rhind SM, McMillen SR, Racey PA. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9:711-5.
 183. Rae MT, Palassio S, Kyle CE, et al. Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *Reproduction* 2001; 122:915-22.
 184. Murdoch WJ, Van Kirk EA, Vonnahme KA, Ford SP. Ovarian responses to undernutrition in pregnant ewes, USA. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:6.
 185. Luther J, Aitken R, Milne J, et al. Maternal and Fetal Growth, Body Composition, Endocrinology, and Metabolic Status in Undernourished Adolescent Sheep. *Biol Reprod* 2007.
 186. Diaz-Sanchez V. El embarazo de las adolescentes en México. *Gac Med Mex* 2003; 139:S23-S28.

-
-
187. Scholl TO, Decker E, Karp RJ, Greene G, De Sales M. Early adolescent pregnancy: a comparative study of pregnancy outcome in young adolescents and mature women. *J Adolesc Health Care* 1984; 5:167-71.
 188. Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Reproduction* 2001; 122:375-83.
 189. Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted and normally grown late gestation sheep fetuses. *Reproduction* 2002; 123:769-77.
 190. McGivern RF, Yellon SM. Delayed onset of puberty and subtle alterations in GnRH neuronal morphology in female rats exposed prenatally to ethanol. *Alcohol* 1992; 9:335-40.
 191. Esquifino AI, Sanchis R, Guerri C. Effect of prenatal alcohol exposure on sexual maturation of female rat offspring. *Neuroendocrinology* 1986; 44:483-7.
 192. Morris DL, Harms PG, Petersen HD, McArthur NH. LHRH and LH in peripubertal female rats following prenatal and/or postnatal ethanol exposure. *Life Sci* 1989; 44:1165-71.
 193. Boggan WO, Randall CL, Dodds HM. Delayed sexual maturation in female C57BL/6J mice prenatally exposed to alcohol. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979; 23:117-25.
 194. Meyer DC, Carr LA. The effects of perinatal exposure to nicotine on plasma LH levels in prepubertal rats. *Neurotoxicol Teratol* 1987; 9:95-8.
 195. Herrenkohl LR, Politch JA. Effects of prenatal stress on the estrous cycle of female offspring as adults. *Experientia* 1978; 34:1240-1.
 196. Herrenkohl LR. Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. *Science* 1979; 206:1097-9.
 197. Politch JA, Herrenkohl LR. Effects of prenatal stress on reproduction in male and female mice. *Physiol Behav* 1984; 32:95-9.
 198. Engelbregt MJ, van Weissenbruch MM, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Delayed first cycle in intrauterine growth-retarded and postnatally undernourished female rats: follicular growth and ovulation after stimulation with pregnant mare serum gonadotropin at first cycle. *J Endocrinol* 2002; 173:297-304.
 199. Jensen TK, Henriksen TB, Hjollund NH, et al. Adult and prenatal exposures to tobacco smoke as risk indicators of fertility among 430 Danish couples. *Am J Epidemiol* 1998; 148:992-7.
 200. Vorhees CV. Maternal age as a factor in determining the reproductive and behavioral outcome of rats prenatally exposed to ethanol. *Neurotoxicol Teratol* 1988; 10:23-34.
 201. National Research Council. *Guide for the Care and use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.
 202. Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 1986; 66:71-117.
 203. Guzman C, Cabrera R, Cardenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* 2006; 572:97-108.
 204. Nankervis AJ, Conn JJ, Knight RL. Obesity and reproductive health. *Med J Aust* 2006; 184:51.
 205. Rush D. Maternal nutrition and perinatal survival. *Nutr Rev* 2001; 59:315-26.

-
-
206. MacLaughlin SM, Walker SK, Roberts CT, Kleemann DO, McMillen IC. Periconceptual nutrition and the relationship between maternal body weight changes in the periconceptual period and fetoplacental growth in the sheep. *J Physiol* 2005; 565:111-24.
 207. Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE, Ekizoglou S, et al. The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Br J Nutr* 2003; 90:815-22.
 208. Rockett JC, Lynch CD, Buck GM. Biomarkers for assessing reproductive development and health: Part 1--Pubertal development. *Environ Health Perspect* 2004; 112:105-12.
 209. Adair LS. Size at birth predicts age at menarche. *Pediatrics* 2001; 107:E59.
 210. Frisch RE, Hegsted DM, Yoshinaga K. Carcass components at first estrus of rats on high-fat and low-fat diets: body water, protein, and fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74:379-83.
 211. Matt DW, Lee J, Sarver PL, Judd HL, Lu JK. Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in aging rats. *Biol Reprod* 1986; 34:478-87.
 212. Lapolt PS, Matt DW, Judd HL, Lu JK. The relation of ovarian steroid levels in young female rats to subsequent estrous cyclicity and reproductive function during aging. *Biol Reprod* 1986; 35:1131-9.
 213. Meredith S, Butcher RL. Role of decreased numbers of follicles on reproductive performance in young and aged rats. *Biol Reprod* 1985; 32:788-94.
 214. Goldring NB, Durica JM, Lifka J, et al. Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinology* 1987; 120:1942-50.
 215. Anzalone CR, Hong LS, Lu JK, LaPolta PS. Influences of age and ovarian follicular reserve on estrous cycle patterns, ovulation, and hormone secretion in the Long-Evans rat. *Biol Reprod* 2001; 64:1056-62.
 216. Meites J, Huang HH, Riegler GD. Relation of the hypothalamo-pituitary-gonadal system to decline of reproductive functions in aging female rats. *Curr Top Mol Endocrinol* 1976; 3:3-20.
 217. Bukovsky A, Ayala ME, Dominguez R, et al. Postnatal androgenization induces premature aging of rat ovaries. *Steroids* 2000; 65:190-205.
 218. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol* 2004; 561:355-77.
 219. Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol* 2005; 565:3-8.
 220. Bomhard E. Frequency of spontaneous tumors in Wistar rats in 30-months studies. *Exp Toxicol Pathol* 1992; 44:381-92.
 221. Bomhard E, Rinke M. Frequency of spontaneous tumours in Wistar rats in 2-year studies. *Exp Toxicol Pathol* 1994; 46:17-29.
 222. Fukuda S, Iida H. Life span and spontaneous tumors incidence of the Wistar Mishima (WM/MsNrs) rat. *Exp Anim* 2003; 52:173-8.
 223. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005; 308:1466-9.