



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EDAD MATERNA Y RESTRICCIÓN PROTEINICA DURANTE
LA GESTACION EN RATA Y SUS IMPLICACIONES EN EL
DESARROLLO DE LA CRÍA MACHO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

ROSALINDA CHARCO FLETES



MEXICO D. F

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	PROFR. HOMERO HERNANDEZ MONTES
VOCAL	PROFR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES
SECRETARIO	PROFRA. ELENA ZAMBRANO GONZALEZ
1° SUPLENTE	PROFRA. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS
2° SUPLENTE	PROFR. OSCAR PEREZ MENDEZ

Trabajo realizado en el departamento de Biología de la Reproducción del
Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Asesor del tema:

Dra. Elena Zambrano González

Sustentante:

Rosalinda Charco Fletes

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por darme la oportunidad, salud e inteligencia para culminar uno de mis principales objetivos de vida.
- A mi hijo Jonathan Ramsés por la eterna paciencia y comprensión debido a la falta de tiempo y atención que a él correspondía y que por terminar este proyecto no le dediqué.
- A mis padres Anuar y Ma. Concepción por la infinita paciencia, confianza y amor que en mi depositaron así como por los valores y educación brindados desde la infancia, como pilares importantes para concluir esta meta.
- A mi esposo Pedro por la invaluable comprensión, amor y apoyo que me brindó durante el desarrollo de gran parte de mi educación académica y por ser siempre un ejemplo a seguir y una admirable persona.
- A mis hermanos Felix, Miriam y Lucero, por su inmenso cariño, apoyo y paciencia; y por hacer agradables aun los momentos más difíciles.
- A la señora Eugenia Rosales y familia por el incondicional apoyo brindado.
- A Luis Antonio Reyes Castro, que gracias a su gran amistad, apoyo, exigencia, regaños, y sobre todo paciencia fue posible la culminación de este importante proyecto.
- A la Dra. Elena Zambrano, por brindarme la oportunidad de desarrollar esta tesis, por sus múltiples observaciones y exigencias, así como por su paciencia y valiosos consejos.
- Al M. en C. Roberto Chavira por su importante apoyo experimental y valiosos consejos como persona.
- A Claudia, Lupita, Paola y Magali, por su asesoría experimental, ayuda y compañerismo durante mi estancia en la institución.
- A la gloriosa UNAM y Facultad de Química, donde además de mi desarrollo académico obtuve también verdaderos amigos y buenos compañeros.

DEDICATORIA

- Este trabajo está dedicado principalmente a mi hijo Jonathan Ramsés, ya que es la persona más importante en mi vida y la razón principal para culminar esta fase académica, de quien pretendo ser un ejemplo a seguir.
- A mis padres, debido a que con su cariño y sus invaluable consejos me impulsan a mantener una continúa superación con el fin de convertirme en una mejor persona y profesionalista.
- A mi esposo Pedro, por estar siempre mi lado, creer y confiar en mí y sobre todo por quererme mucho y apoyarme en todo momento, a quien amo y estimo.
- A mis hermanos, a quienes estimo, admiro y quiero mucho; y de quienes pretendo servir como ejemplo e impulsarlos a tener la convicción de poder alcanzar sus metas.
- A Luis Antonio, por el tiempo dedicado como asesor, por su inducción y valiosas anotaciones y comentarios, pero principalmente por ser una excepcional persona y excelente amigo.
- A mis amigos de la Facultad de Química, por los buenos y divertidos momentos que pasamos juntos.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
Edad Materna.....	3
Programación y Desarrollo.....	4
Importancia de la Placenta.....	7
Equilibrio Materno de Nutrientes.....	9
Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.....	11
Estrés Materno: Exceso de glucocorticoides.....	15
Glucocorticoides en materia fecal.....	18
Obesidad y Leptina.....	19
JUSTIFICACION.....	22
HIPOTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	24
MATERIAL Y METODOS.....	25
Cuidado y mantenimiento de los animales.....	25
MADRES.....	25
Determinación del inicio de la gestación.....	25
Modelo de Restricción.....	25
Asignación de grupo y registro de peso.....	27
Colecta de materia fecal y almacenamiento de las muestras.....	27
Extracción y cuantificación de corticosterona.....	27
Fundamento RIA.....	29
Cálculos.....	28
CRIAS.....	29
Mantenimiento postnatal.....	29
Parámetros metabólicos.....	30
Radioinmunoanálisis.....	30
ANALISIS ESTADISTICO.....	31

RESULTADOS.....	32
EFFECTO DE LA EDAD Y RESTRICCIÓN PROTEINICA EN LA MADRE.....	32
Ganancia de peso corporal.....	32
Ingesta de alimento materno.....	33
La concentración de corticosterona en la materia fecal de la madre.....	35
EFFECTO DE LA EDAD MATERNA Y RESTRICCIÓN PROTEINICA EN LAS CRIAS.....	36
Medidas morfométricas al nacimiento de las crías.....	36
Crecimiento a los 21 días de la vida postnatal.....	37
Crecimiento a los 220 días de la vida postnatal.....	38
Concentración de leptina, triglicéridos, colesterol y corticosterona en suero de las crías a los 220 días edad.....	39
Crecimiento de las crías a los 350 días de edad.....	42
DISCUSION.....	43
RESUMEN DE RESULTADOS.....	50
CONCLUSION.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	51

RESUMEN

Estudios epidemiológicos y en animales de experimentación han demostrado que un ambiente (intrauterino y durante la vida postnatal temprana) subóptimo altera el crecimiento y predispone al individuo a problemas de salud a lo largo de la vida. Efectos de malnutrición durante la gestación y/o lactancia han sido estudiados en diferentes modelos animales, que intentan dirigir los mecanismos por los cuales la memoria de eventos adversos de nutrición en la vida temprana son almacenados y subsecuentemente expresados en la vida adulta.

Este estudio se enfocó en evaluar el efecto de la dieta baja en proteína y la edad materna durante la gestación en la rata sobre el grado de estrés materno, así como en las alteraciones generadas en el desarrollo y metabolismo de las crías. Se utilizaron ratas preñadas de la cepa Wistar de 70 (M70d) y 150 (M150d) días de edad. Se establecieron dos grupos experimentales: uno alimentado con dieta control (C) y otro con dieta restringida en proteínas (R) para cada edad materna. La restricción proteínica fue sólo durante el periodo de gestación. Las dietas son isocalóricas (≈ 4 Kcal/g) y varían en el contenido de caseína: 20 % de caseína en la dieta control y 10% de caseína en la dieta restringida. La ganancia de peso e ingesta de alimento materno fue monitoreado diariamente durante la gestación y la lactancia (21 días de la vida postnatal). A los días 10 y 19 de gestación se determinó la concentración de corticosterona materna en materia fecal. Al nacimiento, las camadas fueron ajustadas a 10 crías por madre, y se determinaron las medidas morfométricas: peso, talla, diámetro cefálico, diámetro abdominal y distancia ano-genital. La ganancia de peso de las crías macho fue registrada desde el nacimiento y hasta los 21 días de la vida postnatal, y posteriormente hasta los 350 días de edad. A los 220 días de la vida postnatal, se determinaron parámetros metabólicos de las crías como: la concentración de leptina, triglicéridos, colesterol y corticosterona en el suero.

Los resultados señalan que la concentración de corticosterona al día 10 de gestación en la restricción proteínica no genera alteración alguna en la madre entre grupos experimentales, sin embargo la edad materna aparece como un factor importante ya que la concentración de corticosterona es mayor en madres de 150 días de edad que en las de 70d tanto para el grupo control como para el restringido. Al día 19 de gestación el efecto de la dieta se ve reflejado entre grupos experimentales de madres de 70 días donde la concentración de corticosterona en el grupo restringido es menor. Al comparar entre edades, el grupo control de M70d presenta mayor concentración de corticosterona con respecto al control de M150d.

Al nacimiento se evaluaron las medidas morfométricas de las crías macho, encontrándose que las crías provenientes de M150d de ambos grupos experimentales tuvieron mayor peso y distancia ano-genital en comparación con las crías provenientes de M70d. En cuanto a la ganancia de peso corporal y parámetros metabólicos, durante la lactancia los grupos provenientes de M150d tuvieron mayor ganancia de peso con respecto a los de M70d; a los 220 días de edad, el grupo restringido de M70d presentó mayor ganancia de peso con respecto al control, mientras que en crías de M150d se observó lo contrario. La concentración de leptina fue mayor en el grupo restringido tanto de M70d como de M150d. Al comparar entre edades maternas, las crías de madres de 70d presentan mayor concentración de leptina tanto en el grupo control como en el restringido con respecto a los grupos de M150d. La dieta no afectó los triglicéridos y el colesterol entre grupos experimentales a la misma edad, sin embargo entre edades maternas, los grupos provenientes de M70d tuvieron mayor concentración tanto de triglicéridos como de colesterol en comparación con los grupos de M150d.

En conclusión, la falta de proteínas en la madre gestante impacta directamente en el desarrollo de las crías. Sin embargo es evidente un doble impacto generado tanto por la edad como por la restricción de la madre en gestación, es decir, una madre en crecimiento se ve en la necesidad de metabolizar nutrientes para favorecer su propio desarrollo al de sus crías, esto se hace evidente en la concentración de corticosterona al día 19 de gestación, en el que el estrés de la madre en crecimiento es elevado; lo cual tiene repercusiones en la vida postnatal de la cría; mientras que a una edad óptima de reproducción, la cría se ve afectada únicamente por la restricción proteínica materna.

INTRODUCCION

Edad Materna

El embarazo en la adolescencia se caracteriza por crecimiento intrauterino retardado, aborto espontaneo, bajo peso al nacimiento ([1, 2]) o pre-término [3] debido a que la madre aun está en crecimiento y los nutrientes no pueden ser utilizados adecuadamente por el feto ya que además son empleados por la madre para satisfacer sus necesidades fisiológicas [4]. Además, los adolescentes presentan altos índices de mortalidad dentro del primer año de vida debido a las alteraciones ocasionadas durante la etapa del desarrollo ([5-7]).

Estudios epidemiológicos y en animales de experimentación han demostrado que un ambiente (intrauterino y durante la vida postnatal temprana) subóptimo altera el crecimiento y predispone al individuo a problemas de salud a lo largo de la vida. Entre los factores ambientales que actúan directa o indirectamente sobre el crecimiento o desarrollo intrauterino están: la edad materna [8] edad gestacional, nutrición pre-gestacional, gestacional y/o lactancia, anormalidades placentarias [9].

Estudios, donde se analizó la relación de la edad materna y el bajo peso de los hijos al nacer, se encontró que el mayor índice de mortalidad debido al bajo peso se presenta en adolescentes menores de 15 años y madres mayores de 40 años, con respecto a las de 25 y 29 años [10]. Una explicación propuesta para este hecho indica que debido a que la madre esta aun en crecimiento durante la concepción existe competencia de nutrientes con el feto, lo cual indica que el estado nutricional durante el embarazo más que por inmadurez biológica predispone a tener hijos de bajo peso, existen estudios que demuestran que las medidas antropométricas maternas y su estado nutricional tienen una posible relación con el peso al nacer [11].

La relación entre las madres adolescentes y su progenie se estudio en términos de desarrollo fetal y el crecimiento de las crías. Los animales utilizados en dicho estudio habían alcanzado la pubertad y continuaban su crecimiento, su peso corporal fue aproximadamente la mitad que el de un animal de crecimiento pleno. Fueron capaces de concebir y mantener la gestación, pero el crecimiento esquelético y el desarrollo de sus fetos fue significativamente retrasado [12].

Estudios en humanos han demostrado que la edad materna es un factor que influye en el aumento de riesgo de bajo peso al nacimiento, el cual se atribuye también a factores socioeconómicos y de aprendizaje asociados a la adolescencia [13].

Programación y Desarrollo

Existen estudios epidemiológicos en humanos y con animales de experimentación que han mostrado que la salud está programada desde etapas tempranas del desarrollo como resultado de la experiencia pre y postnatal, afectando profunda e irreversiblemente las características fisiológicas y metabólicas del adulto, este conocimiento genera la hipótesis de la programación del desarrollo [14], ahora conocida como orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD por sus siglas en inglés the developmental origins of health and disease).

El concepto de programación del desarrollo, propone que los cambios durante la gestación y la vida neonatal, generan respuesta fisiológicas persistentes en la crías, y asocia a las enfermedades en el adulto como el síndrome metabólico: dislipidemias, diabetes, hipertensión y obesidad con condiciones adversas intrauterinas, lo que genera retardo en el crecimiento intrauterino o desproporción en el crecimiento fetal [15].

Durante el desarrollo existen ventanas críticas donde los órganos son más vulnerables a los retos ambientales como la disminución del aporte nutritivo y oxigenación. El periodo de vulnerabilidad es diferente entre órgano y órgano, para muchos órganos y sistemas el periodo crítico ocurre en la vida intrauterina. Las células que se dividen más rápidamente tienen mayor riesgo. Abundancia o escasez de sustancias normales (como hormonas, nutrientes o vitaminas), compuestos químicos anormales (drogas, alcohol o nicotina) y factores físicos anormales (presión elevada) son ejemplos de factores que modifican el desarrollo normal [16]. Por lo que el fenotipo de un individuo no está determinado exclusivamente por sus genes, existe además una fuerte influencia ambiental, teniendo mayor impacto en etapas tempranas del desarrollo. El ambiente subóptimo intrauterino y durante la lactancia modifica el crecimiento y predispone al individuo al desarrollo de enfermedades en la vida adulta. El desarrollo de la plasticidad es definido como el fenómeno por el cual el genotipo puede dar lugar a una serie de diferentes estados fisiológicos o morfológicos en respuesta a diferentes condiciones ambientales durante el desarrollo. El recién nacido

responde a estas señales adaptativas con reducción de tamaño y peso al nacimiento y alteraciones en el metabolismo [17].



Programación, se conoce como el proceso en el cual un estímulo o un reto durante periodos críticos del desarrollo tiene efectos secundarios a lo largo de la vida, refleja la acción de factores durante un periodo sensible o “ventana”, que afecta la organización de tejidos específicos que son vulnerables, produciendo efectos persistentes a lo largo de la vida [18]. El crecimiento fetal es un proceso complejo y dinámico, que depende del continuo suministro de nutrientes de la madre, el cual puede ser alterado por cambios en la nutrición y/o función de la placenta [19]. El peso al nacimiento es un indicativo del grado de compromiso nutricional desde el desarrollo, el cual en circunstancias adversas en mamíferos puede rechazar mecanismos adaptativos para proteger el crecimiento, especialmente de órganos vitales durante el desarrollo, como el cerebro por ejemplo. Una variedad de fenotipos de crecimiento, endocrino y cardiovascular resultan de la restricción de nutrientes en distintas ventanas del desarrollo [20]. Actualmente se entiende como un proceso mediante el cual distintas condiciones durante periodos críticos determinan el estado de salud y enfermedad en la vida adulta del individuo [21].

Epigenética, es un concepto interpretado como cambios en las funciones de los genes que suceden sin cambios en la secuencia del DNA. Las modificaciones epigenéticas son responsables de los diferentes patrones de la expresión de un gen en los distintos tipos celulares. De tal forma que epigenética es la diversidad o las múltiples formas en que un gen puede ser expresado, la cual puede ser modificada por factores ambientales, lo que puede contribuir al desarrollo de fenotipos anormales.

Dentro de los factores principales que afectan la programación del desarrollo se encuentran: la exposición fetal a alta concentración de glucocorticoides que son inapropiadamente altos para la etapa actual del

desarrollo [22], restricción global de nutrientes [23] exposición global a una dieta isocalórica baja en proteínas [24], restricción del flujo sanguíneo a nivel uterino [25], y diabetes materna gestacional [26]. Muchos de estos factores provocan reducción del flujo sanguíneo hacia el útero, lo cual reduce el suministro de nutrientes y oxígeno que llegará a la placenta y al feto, lo que provocará disminución del crecimiento fetal [4]. El individuo desnutrido se adapta a estas condiciones mediante el lento aumento de peso corporal sobre todo en periodos tempranos del desarrollo, además de ajustar su metabolismo a la deficiente disponibilidad de nutrimentos [27].

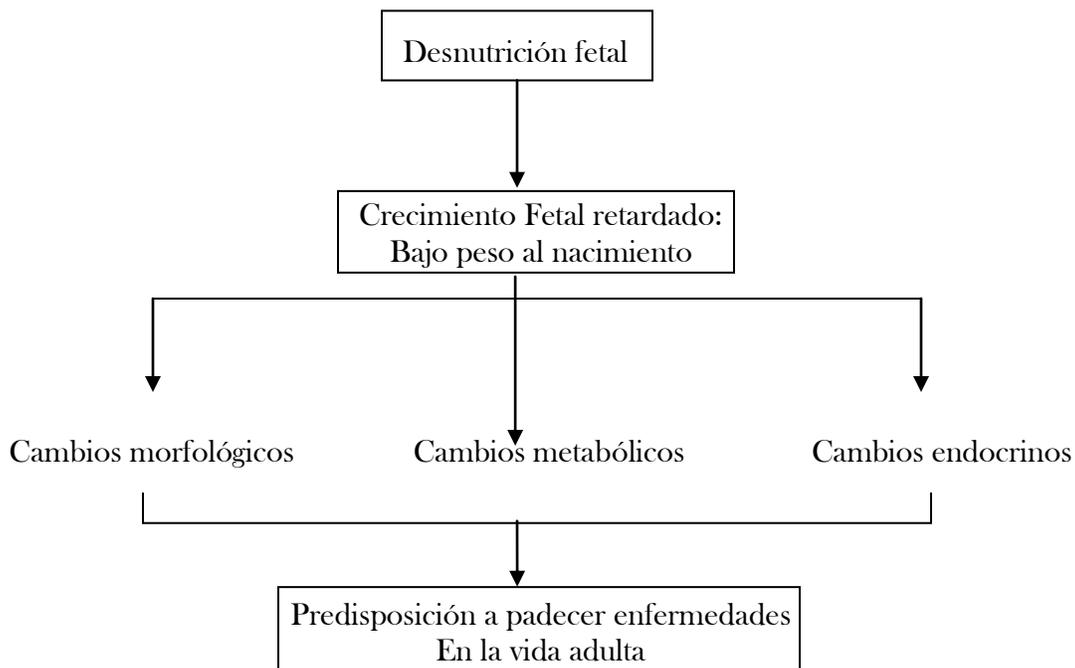


Figura 1. Mecanismos de adaptación fetal a la desnutrición intrauterina.

Para explicar la relación entre el bajo peso al nacimiento y el desarrollo de patologías como diabetes tipo 2, Hales y Barker (1992) propusieron la hipótesis del fenotipo ahorrador. El cual explica que cuando la nutrición en el útero es subóptima el feto realiza adaptaciones predictivas y desarrolla una fisiología que le permite maximizar y conservar los nutrientes. Estos cambios en el desarrollo confieren ventaja para sobrevivir en caso de que continúe la restricción nutricional durante la vida postnatal, sin embargo, si el alimento es abundante después del nacimiento y sobrepasa el rango de la adaptación predictiva, la cría con el fenotipo ahorrador puede acumular recursos en forma de grasa incrementando la predisposición al

desarrollo de obesidad, diabetes y otras enfermedades metabólicas que son el resultado de la alteración del metabolismo de carbohidratos [28].



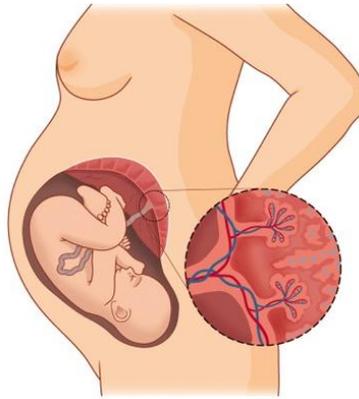
Importancia de la Placenta

Durante la gestación la placenta presenta múltiples funciones importantes. Provee una interfaz inmune entre la madre y el feto, facilita el transporte de nutrientes y residuos de productos entre madre y feto, es una fuente de varios péptidos y hormonas esteroides importantes para el desarrollo y metabolismo materno y fetal. La integridad funcional de la placenta requiere la producción de energía adicional ya que el metabolismo placentario puede ser igual al del feto. Este gran requerimiento energético es esencial para mantener la función de estimular el crecimiento, que incluye transporte activo de aminoácidos [29], síntesis de proteínas [30], hormonas esteroides y apoyo en la maduración del crecimiento [31].

Estudios demuestran que cuando existe disminución en el flujo sanguíneo utero-placentario, se altera el metabolismo y transporte de nutrientes placentarios que limitan el crecimiento fetal, lo cual repercutirá en la vida adulta del descendiente [4].

Es claro que la placenta no es sólo un participante pasivo en el abastecimiento de nutrientes al feto, de hecho participa en su adaptación al ambiente materno y genera cambios tanto en estructura y función cuando el resultado es un cambio en la oferta de sustrato y ambiente hormonal. Por lo anterior, la placenta tiene una posición clave y directa en la programación fetal, por ejemplo, cambios en el patrón de señales

hormonales de desarrollo o de cantidades de sustrato transportados hacia el feto tal que el desarrollo fetal se ve alterado, lo que finalmente resulta en desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la vida adulta [32].



Los glucocorticoides son reguladores clave en el desarrollo y maduración de los órganos. La exposición del feto de roedores a excesiva cantidad de glucocorticoides maternos o exógenos causa restricción de crecimiento, hipertensión, incremento en la actividad del eje HPA, así como ansiedad en el comportamiento en situaciones adversas ([33],[34]). La 11 β -hidroxiesteroide dihidrogenasa (11 β HSD) regula la expresión del feto a glucocorticoides, convierte el cortisol en cortisona inactiva lo que puede proteger al feto contra altas concentraciones de cortisol materno [35]. La expresión y actividad de la 11 β HSD placentaria, es regulada en forma específica de la edad gestacional, tanto en humanos como en primates no humanos [36]. En humanos, las mutaciones en el gen 11 β HSD2 han sido asociadas con bajo peso al nacimiento y reducción de la actividad de la 11 β HSD2, además, el incremento de la concentración de cortisol fetal ha sido asociado con restricción de crecimiento intrauterino [37].

En ovejas, la restricción materna de nutrientes por más de 45 días disminuye significativamente la 11 β HSD2 además de causar restricción de crecimiento intrauterino [38]. La baja tensión de oxígeno es fisiológico para la organogénesis y es regulador clave de eventos celulares en la diferenciación trofoblástica temprana [39]. Por ello la alteración total del metabolismo de glucocorticoides maternos es asociado con restricción de nutrientes e hipoxia, lo que conlleva a restricción de crecimiento intrauterino y programación fetal [32].

Aun no es claro cómo el exceso de glucocorticoides regula a la baja las funciones de la placenta y reduce el crecimiento fetal, sin embargo un estudio con ratas ha sugerido que la reducción del peso de la placenta

y transporte de glucosa en respuesta a dieta baja en proteína precede a cualquier reducción significativa en el peso del feto, lo que sugiere que la reducción del transporte de nutrientes es causa de la reducción del crecimiento intrauterino [30].

Actualmente se sabe que aproximadamente el 10 por ciento de los niños cuyas madres presentaron restricción de crecimiento intrauterino siguen siendo pequeños, y las causas se atribuyen a mutaciones en el gen del factor de crecimiento insulino de (IGF-IR) que conducen a las anomalías en la función o el número de receptores para IGF-I, los cuales no sólo retardan el crecimiento a nivel intrauterino, sino también en la vida postnatal de los seres humanos [40].

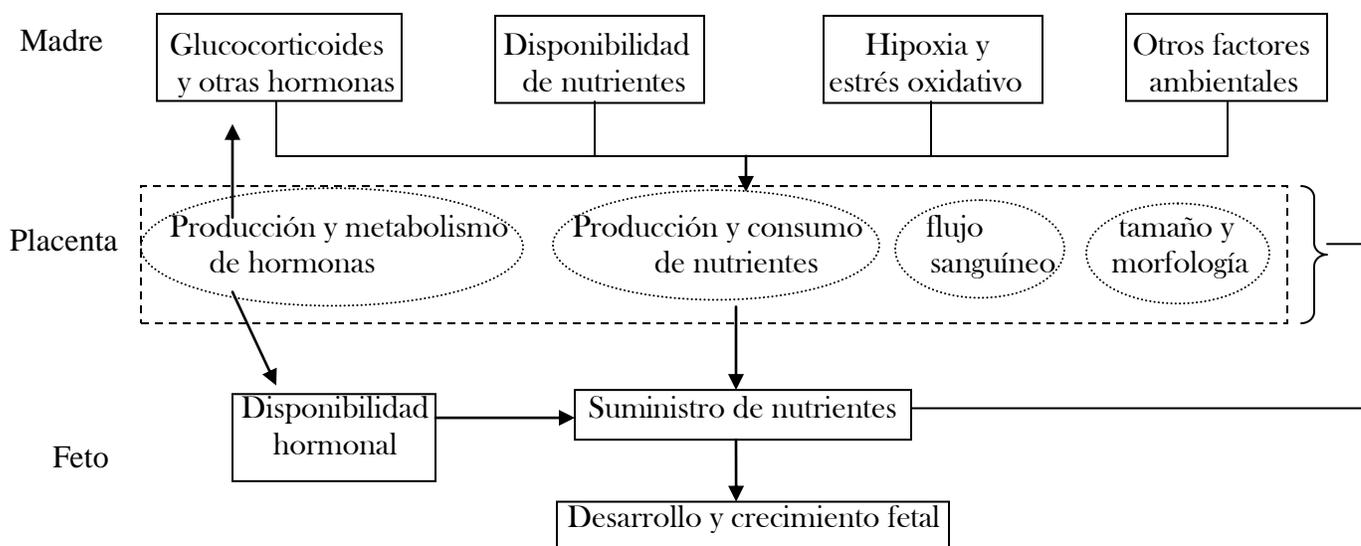


Figura 2. Diagrama de interacción entre madre-placenta-feto durante la programación fetal

Equilibrio materno de nutrientes

El desarrollo del individuo depende de manera directa de las condiciones nutricionales durante la gestación y periodo postnatal ya que la baja o deficiente calidad de la dieta en estas etapas críticas del desarrollo puede provocar alteraciones tanto en la organización del sistema nervioso como en la constitución de diversos órganos, que pueden persistir hasta la edad adulta. Conviene definir cómo una nutrición adecuada, aquella que contiene un balance entre lo que el organismo requiere y lo que gasta por sus actividades. De no cumplirse con esta regla, el organismo desarrolla “ajustes” que le permitan continuar por algún tiempo en un estado de equilibrio tanto funcional, metabólico y conductual.

El ambiente intrauterino en el que se desarrolla el individuo, establece las bases para alcanzar un crecimiento pleno y potencial. El ambiente intrauterino de la madre actúa como una poderosa condicionante del desarrollo durante la vida fetal. El crecimiento normal del feto implica un progreso ordenado y secuencial de divisiones y movimientos de las células, cambios en la adhesión de éstas y finalmente muerte celular, también implica la continua interacción de los reguladores genéticos de los cromosomas y nutrimentos. El potencial del genoma se ve constantemente modificado por los factores del entorno [41].

El suministro de nutrientes al feto es la principal influencia que regula su crecimiento, y depende en gran medida del estado de salud de la madre, de su composición y talla corporal, su alimentación durante el embarazo, un buen funcionamiento del corazón, del estado endocrino y cardiovascular del feto, e incluso de la historia prenatal de la madre [17]. En consecuencia, la nutrición de la madre afecta de manera determinante el crecimiento y maduración del feto [42].

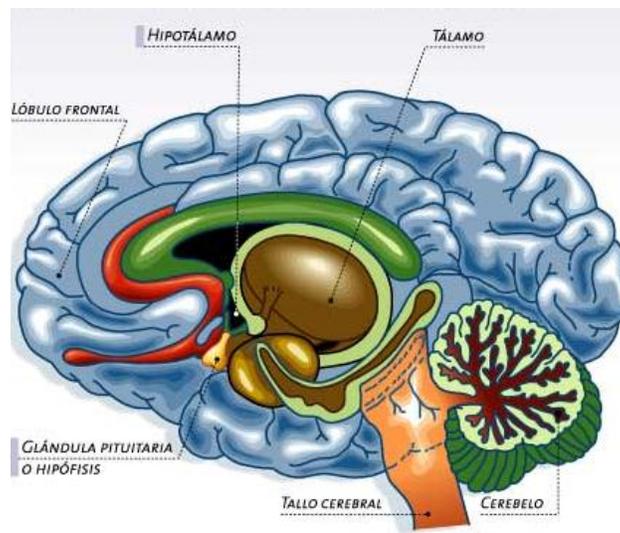
La desnutrición materna severa restringe el crecimiento fetal y placentario, pero la desnutrición moderada genera el crecimiento normal de la placenta más no del feto. La desnutrición al final del embarazo puede ocasionar la desaceleración del crecimiento fetal y alterar la interacción metabólica entre el feto y la placenta. Sacrificando el crecimiento fetal para mantener la función de la placenta [43].

La respuesta metabólica inmediata a la desnutrición es el catabolismo, al consumir sus propios sustratos para obtener energía. En contraste a su incapacidad de almacenar oxígeno, el feto si puede guardar reservas de glucosa, que le servirán como fuente de energía en caso de que la madre no pueda proveerle. Si el suministro de glucosa que debe recibir el feto disminuyera, el glucógeno almacenado pasaría a la sangre para que no pudiera utilizarlo. Sin embargo los depósitos de glucógeno del feto son pequeños y quedaría privado de alimento en aproximadamente un día, lo que llevaría a la destrucción de los tejidos recién formados para abastecer la energía [16].

Los mecanismos reguladores de los tejidos en la madre se aseguran de que el cerebro cuente con los nutrientes necesarios. Seguido del cerebro materno se encuentra el del feto, quien hace todos los ajustes necesarios para garantizar el desarrollo de su cerebro, sin embargo ante la desnutrición fetal se restringe el desarrollo de otros órganos tales como hígado y otras vísceras abdominales [44].

Eje hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA)

El principal eje del cuerpo que responde a estímulos de estrés es el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Una amplia variedad de estímulos sensoriales llegan al cerebro vía ojos, nariz y/o boca. Estos estímulos producen cambios en la actividad endocrina, usando funciones cerebrales vía hipotálamo, que es la parte del cerebro que cumple la función de la regulación de la homeostasis, el comportamiento sexual y las emociones, además se ha demostrado que cumple una importante función en la regulación del comportamiento en la alimentación. Situada justo debajo del hipotálamo en la base del cerebro, está la glándula pituitaria o hipófisis, que es el mayor regulador de las respuestas al estrés y las hormonas que produce controlan el funcionamiento de casi todas las glándulas endocrinas del organismo. La hipófisis es regulador del cortisol y/o corticosterona, y secreta una hormona llamada adrenocorticotropina (ACTH) que estimula a la glándula adrenal para verter la hormona en sangre. Una vez en la sangre, la corticosterona tiene una multitud de funciones, por ejemplo actúa en el hígado para liberar glucosa y grasa. El cerebro controla las cantidades de ACTH secretada por la producción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). A su vez la producción de CRH es controlada por el hipotálamo en respuesta a mensajes de múltiples partes del cerebro. Una de los más importantes centros de regulación de este sistema es el hipocampo.



Cerebro: Localización de hipotálamo e hipófisis

Receptor de Glucocorticoides

Los receptores de glucocorticoides (GR) son esenciales para la supervivencia de las crías, así lo indicó el fenotipo letal de los ratones nulos de GR [45]. El uso de modelos de ratones transgénicos identificó que la variación en el nivel de GR altera las respuestas al estrés y la actividad del eje HPA. Una reducción en GR del 30-50% es asociado con exageradas respuestas a estrés ([46],[47]). La exposición del feto a estrés o altos niveles de glucocorticoides puede afectar permanentemente la expresión de GR, por ejemplo, inhibición o deficiencia de 11 β -HSD2 ha mostrado reducción hipocampal de la expresión de GR [48], pero a la inversa incrementa los niveles de GR mRNA en amígdala. La reducción hipocampal de GR se espera que reduzca la retroalimentación negativa de glucocorticoides y conlleve a una hiperactividad del eje HPA. Por el contrario, incrementar la expresión de GR en la amígdala, una estructura clave del sistema nervioso central involucrada en la mediación de las respuestas del miedo y la ansiedad, se asocia con un fenotipo ansiogénico en roedores [34].

Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH)

Un componente crítico del eje HPA es la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual ha sido propuesta como mediador de los efectos del estrés en la vida temprana sobre los resultados cognitivos y conductuales. En humanos, la CRH es producida por la placenta y liberada dentro de la circulación fetal [49]. En fetos con crecimiento retardado se han encontrado elevadas concentraciones de CRH, y son asociados con incremento en el riesgo de parto prematuro [50]. Por lo tanto, el estrés materno acompañado por elevadas concentraciones de glucocorticoides y CRH afectan tanto la longitud del periodo de gestación como el ambiente hormonal durante el desarrollo del feto [51].

La administración de CRH a ratas gestantes reduce el peso corporal tanto materno en gestación como de las crías durante las primeras dos semanas de la vida postnatal, así como mejora las respuestas conductuales de las crías ante el estrés en el periodo neonatal temprano [52]. Por ello, es sugerido que un último componente de la programación de los efectos del estrés/glucocorticoides puede ser medido a través de acciones de CRH en el desarrollo del cerebro fetal [51].

Bajo condiciones de estrés, la activación del eje HPA resulta en incremento en la producción y liberación de CRH y arginina vasopresina (AVP), del núcleo paraventricular. Esas hormonas hipofisiotrópicas son liberadas en sangre y actúan en células de la hipófisis para estimular la expresión y liberación de la

hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cual a su vez incrementa la producción de glucocorticoides de las adrenales. El incremento de la concentración de glucocorticoides en la circulación inhibe la retroalimentación del eje HPA y previene la excesiva producción de hormonas de estrés. La retroalimentación negativa ocurre a nivel cerebral en la hipófisis, y una inhibición particular de insumos derivados de la expresión hipocampal de GR para inhibir la liberación de neurohormonas del núcleo paraventricular.

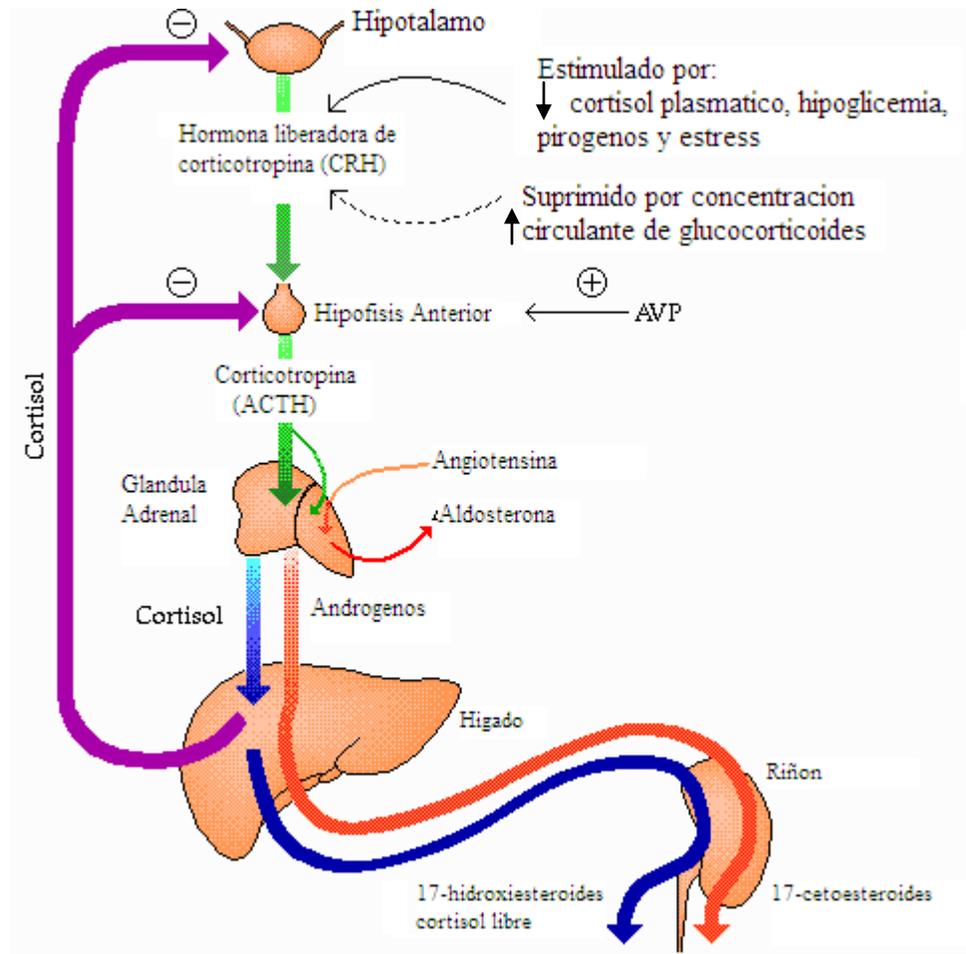


Figura 4. Eje Hipotálamo- Hipófisis-Adrenal: programación por estrés temprano

Bajo condiciones de estrés, la activación sostenida del eje HPA es atenuada vía acciones de la retroalimentación negativa de glucocorticoides. Al final un componente de la atenuación ocurre a través de la activación de GR hipocampales, como se muestra en la figura 4. En modelos de programación la reducción de la retroalimentación negativa del eje HPA se cree que se debe en parte por la reducción en la

señalización de GR del hipocampo. La administración de dexametasona a ratas gestantes programa hipertensión en crías e incremento en la concentración de corticosterona basal, lo que es asociado con reducción en la expresión de GR hipocámpales [48]. La falta relativa de GR en hipocampo predice reducción de la retroalimentación negativa del eje HPA, lo que lleva a una sobreactividad y elevación de glucocorticoides. Tal exceso de glucocorticoides se anticipa a producir efectos metabólicos cardiovasculares y neuropsiquiátricos adversos, como se ha visto en individuos con síndrome de Cushing [51].

Como efectos centrales, la sobreexposición fetal a glucocorticoides es también asociada con alteraciones en la estructura y función de numerosos tejidos. En términos de la regulación sanguínea, la administración prenatal de glucocorticoides o dieta materna baja en proteínas lleva a una reducción permanente en el número de nefronas, hipersensibilidad a los efectos de vasoconstrictores e incremento en la expresión de GR locales en riñón [53].

Los efectos de dieta materna baja en proteínas en el desarrollo de los riñones se ha propuesto que actúa a través de una exposición al incremento de glucocorticoides fetales, secundario de un incremento en el transporte trasplacentario de glucocorticoides maternos [54].

Se ha demostrado que el desarrollo hipotalámico fetal puede ser modificado por nutrición materna, y al destete las crías de madres alimentadas con dieta baja en proteínas durante la gestación presentan malformación del núcleo hipotalámico [55].

Un gran número de estudios indican que los efectos de la exposición intrauterina a diferentes factores ambientales, nutricionales, hormonales, etc.; puede ser transmitido a las siguientes generaciones. Se ha observado que los descendientes de la primera generación (F1) han presentado también bajo peso al nacimiento y disturbios en la homeostasis de la glucosa aun en ausencia de alguna manipulación gestacional [56]. Sin embargo la tercera generación (F3) no presenta ningún efecto.

11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 2.

Durante el periodo de gestación normal, los niveles de glucocorticoides maternos son marcadamente más altos que en la circulación del feto. El feto es protegido de los niveles altos de glucocorticoides maternos, por la conversión de glucocorticoides activos (cortisol en humanos, corticosterona en roedores) en glucocorticoides inactivos (cortisona y 11-dihidroxycorticosterona respectivamente) por la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β -HSD2). Esta enzima actúa como barrera que ayuda a prevenir parto prematuro o respuesta inapropiada de los tejidos a la acción de glucocorticoides durante el desarrollo fetal [51].

Numerosos estudios han mostrado que la inhibición de la 11 β -HSD2 durante la gestación lleva a la reducción del peso al nacimiento y desarrollo de hipertensión en la vida adulta, así como intolerancia a la glucosa ([57], [33]), así como incremento en la actividad del eje HHA y conducta de tipo ansiedad [34]. La expresión y/o actividad de la 11 β -HSD2 de la placenta puede ser disminuida debido a desnutrición o dieta materna baja en proteína así como al estrés materno ([54]; [58]; [59]; [60]).

Estrés Materno: Exceso de Glucocorticoides

La exposición prenatal del feto a estrés o exceso de glucocorticoides en una variedad de modelos animales puede programar negativamente la fisiología de las crías, resultando en una reducción del peso al nacimiento e incremento subsecuente de la probabilidad de padecer desordenes de la función cardiovascular, homeostasis de glucosa, actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y conducta de tipo ansiedad en la vida adulta [51].

En términos de la programación del desarrollo metabólico, numerosos estudios tanto en modelos humanos como animales, han mostrado que un ambiente intrauterino pobre seguido de sobrenutrición en la vida postnatal promueve el desarrollo de enfermedades, incluyendo hipertensión, resistencia a la insulina, obesidad y diabetes tipo 2 [15]. Estrés materno durante la gestación es también asociado con restricción de crecimiento intrauterino e incremento en el riesgo de parto prematuro [61].

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas producidas predominantemente por la glándula adrenal y son mediadores clave de las respuestas de estrés. Son cruciales durante el desarrollo fetal para la maduración de tejidos y órganos, promueven la diferenciación celular y actúan más notablemente al final

de la gestación para estimular la producción de metabolito surfactante por los pulmones, acción crítica que prepara al feto para la vida extrauterina [51].

Las hormonas esteroides que regulan el desarrollo y maduración de los órganos fetales, han sido utilizadas como tratamiento durante la gestación para prevención en casos de parto prematuro y rápida maduración pulmonar. La exposición fetal a niveles inapropiadamente altos de glucocorticoides reduce el peso al nacimiento [62] y es asociado con efectos tales como hipertensión ([63]; [64]), elevación de enzimas hepáticas gluconeogénicas e intolerancia a la glucosa en crías adultas [65].

El efecto del estrés prenatal y exceso de glucocorticoides en la gestación en subsecuentes resultados fisiológicos y psicológicos difiere no sólo por el tiempo en la exposición sino también por el sexo de las crías. En humanos, la placenta de fetos femeninos puede dar protección relativa del exceso de glucocorticoides debido al incremento de glucocorticoides inactivos comparado con las placentas de fetos masculinos [66]. Mientras que recientes datos en rata macho expuestos a estrés durante etapas tempranas de la gestación presentan incremento en la conducta de tipo ansiedad en la vida adulta [67].

Fue reportado que la desnutrición materna durante la gestación y/o la lactancia incrementa el nivel de glucocorticoides en ratas al destete [68].

El estrés prenatal incrementa la concentración de corticosterona fetal tanto en fetos macho como hembra, y disminuye la testosterona y la actividad de la aromatasa en el hipotálamo y amígdala de machos pero no de hembras al día 18 y 19 de gestación [69].

Se ha encontrado también, que la disminución en la concentración de glucocorticoides durante la segunda y tercer semana de gestación alter al peso corporal adulto, respuestas al estrés y ansiedad selectiva, así como medidas de ansiedad ligada a conducta en crías [70]. El peso al nacimiento también es bajo en crías de madres con adrenalectomía y falta de glucocorticoides [71].

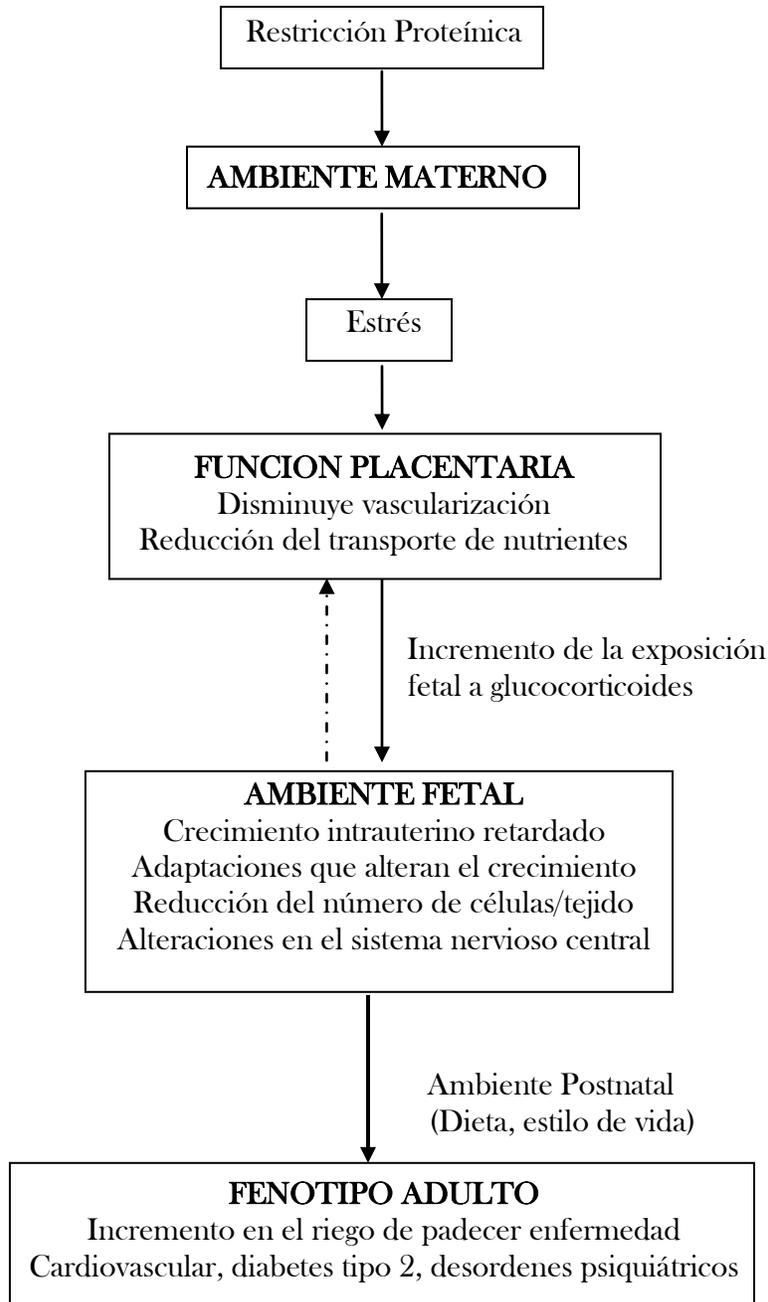


Figura 3. Desarrollo total de la programación [51].

Glucocorticoides en materia fecal

Las hormonas esteroides regulan múltiples facetas de la homeostasis de un organismo, incluyendo las respuestas a cuestiones ambientales. En adición a la regulación del almacenamiento de energía y regulación del ritmo circadiano, los glucocorticoides adrenales protegen al cuerpo durante y después de las respuestas al estrés [72].

La concentración plasmática de glucocorticoides es ampliamente utilizada para diagnóstico de estrés en varias especies animales ([73], [74]). Sin embargo, las dificultades para la obtención de las muestras sanguíneas producen serias limitaciones a este enfoque, particularmente para animales pequeños como roedores, ya que la manipulación y sangrado es por sí sólo un evento estresante para el animal, que influye marcadamente en la concentración de glucocorticoides en plasma [75].

Ensayos con hormonas en materia fecal proveen de una herramienta poderosa para monitorear de forma no invasiva el estado endocrino de los animales. En general, los glucocorticoides son excretados en orina y heces principalmente como metabolitos conjugados y no conjugados de polaridad variable ([76], [77], [78]). El análisis de metabolitos de corticosterona excretados por orina o heces se establece como técnica no invasiva para la evaluación de la función adrenocortical. Se ha demostrado que los metabolitos de corticosterona se excretan en mayor cantidad en materia fecal que en orina [75]. Las hormonas excretadas representan una acumulación de varias horas de las hormonas en la circulación, así las concentraciones de hormonas en la materia fecal no siempre reflejan correlación exacta con las concentraciones en suero. Sin embargo, para anticuerpos de cortisol y corticosterona, se encontró que el metabolito fecal correlaciona positivamente con la concentración en suero [72].

En cuanto al metabolismo de la corticosterona, que es el principal glucocorticoide presente en sangre [79], en ensayos comparativos con otros glucocorticoides excretados, fue virtualmente ausente en heces, lo que es un indicativo del intenso metabolismo del esteroide en hígado y en intestino (por la flora microbiana) [75].

Obesidad y Leptina

Obesidad, es una enfermedad crónica que involucra a millones de personas adultas alrededor del mundo. El tejido adiposo es la más grande reserva de energía en el organismo. La principal función del tejido adiposo es la síntesis y almacenamiento de triglicéridos durante el periodo de balance de energía positivo. Es involucrado en la movilización de energía almacenada durante el periodo de balance de energía negativo.

Sin embargo, el tejido adiposo es la localización de síntesis de numerosas, metabólicamente activas proteínas, las llamadas adipocinas. Esas proteínas juegan un importante papel en la regulación del metabolismo local y sistémico, mostrando una típica actividad endocrina, es decir, el tejido adiposo es un elemento significativo del sistema endocrino en humanos.

Adipocinas son responsables de interacción entre tejido adiposo, muscular, corteza adrenal y el sistema nervioso central y sistema simpático. Participan en el mantenimiento del balance energético, y tienen influencia en la sensibilidad a la insulina, regulación de la presión sanguínea, procesos inmunológicos, angiogénesis, metabolismo de grasas y homeostasis.

La leptina, es una hormona producida y secretada por una variedad de tejidos, predominantemente por adipocitos, los cuales regulan la ingesta de comida y energía gastada a niveles hipotalámicos en animales adultos. La leptina es producto del gen de la obesidad, expresado en tejido adiposo y está involucrada en la regulación de adiposidad en mamíferos y puede actuar como un factor de señalización endocrina que une el estado nutricional al eje reproductivo [80]. Puede también influenciar la proliferación de las células B del páncreas que ocurre en el periodo neonatal. Adicionalmente la leptina provee un enlace funcional con insulina para formar el eje adipo-insular [81], y juega un papel importante en el control de la función de las células B en vivo vía inhibición de la secreción de insulina y reducción de los niveles de transcripción de insulina [82]. El ambiente prenatal adverso, puede inducir consecuencias metabólicas a largo término, particularmente obesidad y resistencia a la insulina. Las crías adultas de ratas sujetas a desnutrición durante la gestación, desarrollan obesidad, hiperinsulinemia e hiperleptinemia especialmente en presencia de dieta alta en grasa [83].

Una postura inicial sobre la leptina, es que se trata de una hormona anti-obesidad, que previene el exceso en el almacenamiento de tejido adiposo por retroalimentación del hipotálamo para reducir la ingesta de comida e incremento en el gasto de energía [84]. Aunque la elevación crónica de ingesta de comida no previene la ganancia de peso, su repentina disminución coordina adaptaciones dirigidas a proteger el peso corporal durante el ayuno [83].

Recientes datos sugieren que la leptina puede tener un amplio rango de acciones, particularmente durante el crecimiento y desarrollo [85]. Los niveles en suero de leptina varían dramáticamente durante el desarrollo intrauterino y la vida temprana postnatal con un incremento del 5 a 10 veces entre el día 4 y 10 de la vida posnatal de ratones hembra [86].

La leche materna contiene también significantes cantidades de leptina [87], y puede contribuir con los niveles que circulan en el neonato. Aunque los niveles de leptina del cordón sanguíneo tienden a reflejar la masa grasa neonatal, bajo nivel de leptina es asociado con rápida ganancia de peso postnatal en infantes pequeños para la edad gestacional [88].

Se ha demostrado que todas las consecuencias y adaptaciones metabólicas de la desnutrición pueden invertirse por el tratamiento con leptina durante el periodo neonatal en ratas. Independientemente del mecanismo que el feto utiliza para interpretar la señal nutricional, altos niveles de leptina en el neonato pueden ser interpretados como un alto estado nutricional, ya que los niveles de leptina y grasa generalmente correlacionan en el neonato. La leptina neonatal causa muy diferentes respuestas en las crías de madres desnutridas. Por lo que se sugiere que la sensibilidad a la leptina es afectada por la desnutrición prenatal y puede interferir en el papel central de la hormona en la programación metabólica [83].

La concentración de leptina se relaciona positivamente con la cantidad de grasa almacenada. Durante los primeros días de la vida postnatal la concentración de leptina es mayor que la observada en etapas posteriores del desarrollo. Varios estudios han demostrado aumento de leptina alrededor de los 12-14 días de la vida postnatal, este aumento ha sido relacionado con la maduración de los mecanismos centrales de regulación del apetito. La leptina también parece tener un papel clave en la programación del desarrollo de la estructura y función de los centros hipotalámicos orixigenicos y anorexigenicos en el temprano periodo postnatal [20]. Se ha demostrado que la restricción proteínica en gestación o lactancia altera la concentración de leptina a los 110 días de la vida postnatal y que además retrasa el aumento normal de la concentración de leptina en animales malnutridos prenatalmente [28].



JUSTIFICACION

Aunque la mala nutrición produce estragos entre la población en general, sus efectos resultan más nocivos cuando se padece en los primeros años de vida. Una infancia desnutrida repercute más adelante en múltiples incapacidades tanto físicas como emocionales y aumenta la predisposición a enfermedades crónicas. Así, el desarrollo de las capacidades del individuo requiere de una condición nutricional adecuada desde la infancia temprana.

La escasa información acerca del impacto de la restricción proteínica durante la gestación a diferentes edades maternas sobre los descendientes nos llevó a la realización del presente trabajo de investigación.

Estudios epidemiológicos y en animales de experimentación han mostrado que la subóptima nutrición materna durante gestación y/o lactancia puede programar el desarrollo de enfermedades en las crías a lo largo de su vida. Particularmente la falta de proteínas en la dieta materna tiende a presentar un fenotipo de alteraciones en la vida adulta, tales como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, obesidad, diabetes y resistencia a la insulina.

Se ha encontrado que la edad adecuada para la reproducción en ratas es alrededor de los 150 días de edad, etapa a partir de la cual la madre presenta un patrón constante de crecimiento. Al igual que la madre de 150 días de edad, la madre joven de 70 días de edad tiene la capacidad de concebir y mantener la gestación, sin embargo, no puede evitar alteraciones en el peso al nacimiento y metabolismo de las crías, debido a que utiliza nutrimentos para completar su desarrollo y al mismo tiempo tratar de optimizar el crecimiento del feto. Se ha observado que la deficiencia proteínica durante la gestación no sólo tiene efectos en las crías sino también en la madre, quien se ve en la necesidad de desarrollar mecanismos adaptativos para satisfacer las necesidades del feto.

Con base en lo anterior, este estudio se enfocó principalmente en evaluar el efecto de la restricción proteínica de la dieta durante la gestación en rata a dos diferentes edades maternas, sobre el grado de estrés materno y el impacto en el desarrollo y metabolismo de las crías en la vida postnatal.

HIPOTESIS

Si la rata gestante aun en crecimiento (M70d) es sometida a restricción proteínica, tendrá mayor grado de estrés e incrementa la probabilidad de presentar un fenotipo de alteraciones en el desarrollo y metabolismo de las crías en la vida adulta.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la edad materna y la restricción proteínica durante la gestación en ratas de 70 y 150 días de edad sobre el grado de estrés, y su impacto en el desarrollo y metabolismo de las crías en la vida adulta.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de la dieta restringida en la ganancia de peso y en la ingesta de alimento diario de las madres durante la gestación.
- Evaluar el impacto de la restricción proteínica en la concentración de corticosterona en materia fecal al día 10 y 19 de gestación en ratas de 70 y 150 días de edad.
- Analizar el efecto de la edad y restricción proteínica materna sobre parámetros morfométricos al nacimiento de las crías.
- Establecer el impacto de la edad y restricción proteínica materna sobre la ganancia de peso corporal de las crías a lo largo de su vida.
- Cuantificar la concentración de leptina, triglicéridos, colesterol y corticosterona en crías a los 220 días de la vida postnatal, para evaluar el efecto provocado por la restricción proteínica y la edad materna sobre estos parámetros metabólicos.

MATERIAL Y METODOS

Cuidado y mantenimiento de los animales

Se utilizaron ratas hembras preñadas de la cepa Wistar de 70 y 150 días de edad (tabla 1), proporcionadas por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INNSZ). Los animales fueron mantenidos de manera individual en cajas de acrílico, en condiciones controladas de temperatura de 22° C y ciclos de luz: oscuridad de 12:12 h. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de experimentación animal del INNSZ. El alimento y el agua fueron dispuestos de forma libre según la necesidad del animal en comederos de metal.

Tabla 1. Edad y peso de las ratas experimentales

EDAD	RANGO DE EDAD	PESO INICIAL
70 Días (M70d)	70-75 Días	198.82±1.7
150 Días (M150d)	145-150 Días	225.6± 3.4

MADRES

Determinación del inicio de la gestación

Las hembras fueron colocadas con machos para propiciar la copulación, para determinar inicio de gestación se realizó frotis vaginal y fue analizado al microscopio. Se consideraron positivas las muestras que mostraron presencia de espermatozoides o los animales que presentaron el tapón espermático, este día fue considerado como inicio de gestación (día cero de gestación).

Modelo de Restricción.

La restricción fue únicamente proteínica y sólo durante el periodo de gestación. Las dietas fueron isocalóricas (3.8 Kcal/g) y varían en el contenido de caseína: 20 % de caseína en la dieta control y 10% de caseína en la dieta restringida (tabla 2).

Tabla 2. Composición de las dietas isocalóricas.

	CONTROL caseína 20%	RESTRINGIDA caseína 10%
Caseína	20	10
L-cistina	0.3	0.15
Colina	0.165	0.165
Vitaminas	1	1
Minerales	5	5
Celulosa	5	5
Aceite	5	5
Almidón	31.76	37.34
Dextrosa.	31.76	37.34
Calorías totales	3.85 kcal/g	3.85 kcal/g

La dieta fue elaborada siguiendo la recomendación del American Institute of Nutrition [89]. En este caso el aceite de soya fue sustituido por aceite de maíz (Gloria, cornfuerte, S.A de C.V).

La mezcla de vitaminas (Teklad AIN-93VX TD94047) contiene: ácido nicotínico, pantotenato de calcio, piridoxina, tiamina, rivo flavina, ácido fólico, D-biotina, vitamina B12, DL α -acetato de tocoferol, vitamina A, vitamina D3, vitamina K y sacarosa.

La mezcla de minerales (Teklad AIN-G-MX TD94046) contiene: calcio, potasio, sodio, magnesio, hierro, zinc, manganeso, molibdeno, yodo, fósforo, cloro, azufre, cobre, níquel, vanadio y silicio.

Aceite de maíz fue comprado de la marca La Gloria, México D.F

Caseína libre de vitaminas y colina fue obtenida de Indianapolis, Indiana E.U. NP 160040

Las dietas fueron preparadas en la unidad de tecnología de alimentos del INNSZ, en forma de galletas duras para facilitar la alimentación del animal.

Asignación de grupo y registro de peso

Los animales se seleccionaron al azar para formar dos grupos experimentales:

Grupo Control (C): alimentado con dieta control durante todo el periodo de gestación.

Grupo Restringido (R): Alimentado con dieta restringida durante todo el periodo de gestación.

Ambos grupos recibieron dieta control durante el periodo de lactancia.

La ganancia de peso materno fue registrada diariamente durante la gestación y la lactancia hasta el día 21 de la vida postnatal. La cantidad de alimento ingerido fue monitoreado diariamente.

Colecta de materia fecal y almacenamiento de las muestras.

En Los días 10 y 19 de gestación la materia fecal fue colectada por la mañana entre las 9:00 y las 10:00h directamente de la cama del animal en tubos de ensayo de 12x75. La cama fue aseada diariamente después de la toma de muestra para asegurar que la materia fecal correspondía con el día de la toma. Las muestras fueron almacenadas en congelación 4 °C hasta el día de extracción y análisis. El criterio de selección de muestras consistió en tomar heces firmes y secas de la cama, basado únicamente en que para la preparación del homogenizado de muestra la eliminación digestiva se considera un acumulado real de la hormona durante el día.

Extracción y cuantificación de Corticosterona

Se seleccionaron las muestras de 20 ratas: 10 grupo control y 10 grupo restringido, tanto de las madres de 70 días como de las de 150 días. La materia fecal fue sometida a un proceso de extracción con metanol absoluto. En tubos de centrifuga se colocó aproximadamente 0.6g de materia fecal de consistencia similar. A cada tubo se añadieron 4mL de metanol absoluto y se agitó a 1000 rpm por un periodo de 12 horas. A continuación las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min.

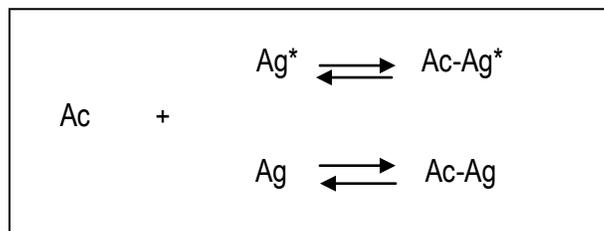
El sobrenadante fue depositado en tubos de 13x100 y se evaporó a sequedad. A continuación, la muestra fue re-suspendida en 3mL de solución amortiguadora de albumina sérica bovina al 0.04% y se realizó radioinmunoanálisis.

Se utilizaron 50µL de muestra re-suspendida en amortiguador de albúmina sérica bovina, por duplicado para la cuantificación de la corticosterona por RIA, utilizando un estuche comercial para corticosterona en rata Coat-a-count (TKRC1) marca SIEMENS de Productos de diagnóstico.

Fundamento RIA

La cuantificación de pequeñas cantidades de antígenos puede lograrse sin inconvenientes si están marcados con átomos radiactivos. Utiliza una marcación radioisotópica para discriminar entre el antígeno unido al anticuerpo y antígeno libre. Se basa en el siguiente principio: una serie de tubos que contienen una mezcla de anticuerpo y antígeno radiactivo en cantidad suficiente para saturar el 50% de los sitios de combinación, se le añaden cantidades crecientes de antígeno sin marca. Habrá competencia por la ocupación de esos sitios. Se producirá una caída secuencial del antígeno marcado combinado a lo largo de la serie. Con los datos obtenidos puede graficarse el antígeno marcado combinado (escala lineal) versus antígeno sin marca (escala logarítmica). Dentro de cierto rango la curva regresiva es lineal, lo que permite por interpolación de los resultados obtenidos en un ensayo similar con un antígeno sin marca de concentración desconocida, hacer su cuantificación.

La base del RIA consiste en la inhibición competitiva de la unión de un antígeno radiactivo (trazador) a su anticuerpo específico por parte del antígeno no marcado. El sistema radioinmunológico descrito puede esquematizarse con una interacción reversible combinada:



Donde Ac representa el anticuerpo específico; Ag* es el anticuerpo marcado (trazador) libre; Ag es al antígeno libre no marcado de las soluciones patrones o de las muestras desconocidas; Ac-Ag* es complejo soluble entre el anticuerpo y el antígeno marcado y Ac-Ag es el complejo soluble con el antígeno no marcado.

El proceso obedece a la ley de acción de masas y, además la distribución del trazador dentro del antígeno total es indiscriminable por medio del anticuerpo de modo que cuanto mayor sea la cantidad de antígeno no marcado presente, menor será la cantidad de trazador que se une al anticuerpo. Bajo este principio se puede determinar la concentración del antígeno en muestras complejas de fluidos biológicos con suficiente sensibilidad y especificidad [90].

Cálculos

El ensayo radioinmunológico produce resultados con unidades de ng/mL; como en este caso se analiza materia fecal, es necesario hacer la conversión correspondiente a unidades de ng/g. Para ello primero se obtiene el factor de dilución de la muestra, por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{mL de amortiguador de albumina sérica bovina}}{(\text{mL de metanol absoluto} / 0.05\text{mL})} = 15.0 \text{ mL}$$

Donde usualmente son 3.0 mL de amortiguador de albúmina sérica bovina y 4.0 mL de metanol. Los siguientes 0.05mL corresponden a los 50 μ L de muestra utilizada para el RIA. Así el factor de dilución correspondiente es 15mL.

A continuación, los ng/mL obtenidos en el ensayo, se dividen entre los gramos de muestra iniciales y son multiplicados por el factor de dilución:

$$(\text{ng/mL}) (1/\text{g de muestra}) (15 \text{ mL}) = \text{ng/g}$$

De esta manera los datos obtenidos son transformados de ng/mL a ng/g de muestra. Es importante señalar que esta conversión se realiza únicamente en muestras fecales, en muestras séricas no es necesario realizar dicha transformación puesto que no hay diluciones de por medio.

CRIAS

Mantenimiento postnatal

Al nacimiento se determinaron las medidas morfométricas de las crías. Se midió diámetro abdominal y cefálico, longitud corporal (talla), distancia ano-genital (lo que permitió la determinación del sexo) y peso corporal, este último utilizando una balanza analítica.

Las camadas fueron ajustadas a 10 crías, la ganancia de peso corporal fue registrada diariamente desde el nacimiento hasta el día 21 de lactancia, donde fueron separadas de su madre. Después de la lactancia (día 21 de la vida postnatal) fueron alimentados con dieta para mantenimiento y conservación de roedores (ziegler RQ-25). El acomodo consistió en grupos de cuatro ratas del mismo sexo por caja de acrílico, a continuación fueron pesadas cada 50 días hasta los 350 días de edad.

Parámetros metabólicos

A los 220 días de edad de los animales se obtuvieron muestras de sangre de la región retro-ocular. La sangre fue colectada en tubos de polietileno, centrifugada a 3500 rpm por 15 min a 4 °C para obtener suero, el cual fue almacenado a 4°C hasta el día de análisis. Para cuantificar la concentración de corticosterona y leptina se utilizó el método de RIA; triglicéridos y colesterol fueron determinados por método colorimétrico.

Radioinmunoanálisis (RIA)

a) Leptina

Se utilizaron 100µL de suero para la cuantificación de la hormona por RIA, mediante el uso de estuches adquiridos de Linco Research, Inc. Missouri, E.U. estuche de leptina Cta. No. RL-83K, con rasgos de sensibilidad de 1.1 a 2.3ng/mL, y de 3.8 a 7.9ng/mL. Los reactivos utilizados en cada estuche fueron almacenados en refrigeración (2°- 8°C). Las muestras fueron descongeladas minutos antes de comenzar el RIA.

b) Corticosterona

Se utilizaron 50µL de suero para la cuantificación de la hormona por RIA, utilizando el mismo esquema que en la determinación materna.

c) Triglicéridos y colesterol

La concentración de colesterol y triglicéridos fue determinada enzimáticamente por medio de Synchron CX de autoanálisis.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos de madres fueron promediados por grupo y la n corresponde a animales individuales, los datos de crías de cada camada fueron promediados, en este caso el número de datos (n) corresponde a camadas, no a animales individuales. Todos los datos se presentan con media \pm EE. El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba de t -test para las madres y ANOVA de 2 vías para crías con el programa Sigma Stat. $P < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

EFFECTO DE LA EDAD Y RESTRICCIÓN PROTEINICA EN LA MADRE

Gestación y Lactancia

De inicio a fin de la gestación, no se apreciaron diferencias significativas en el peso corporal entre grupos experimentales a la misma edad materna. Entre edades, al inicio de la gestación el peso corporal de las madres de 70 días fue significativamente menor con respecto a las madres de 150 días. Al final del periodo no hay diferencias en peso entre edades maternas. Durante la lactancia, no hay diferencias en el peso corporal entre grupos experimentales de la misma edad materna. Entre edades, al inicio y fin de la lactancia, el grupo control de madres de 70d es significativamente menor con respecto al control de madres de 150d (figura 1, tabla 3).

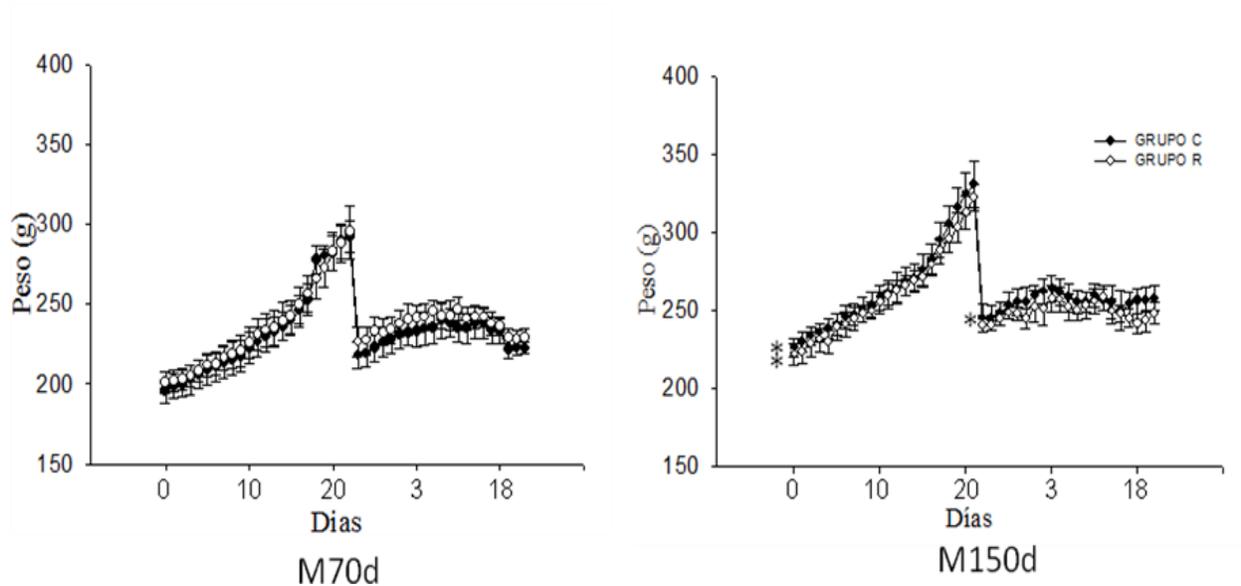


Figura 1. Peso corporal de la madre durante gestación y lactancia. * $P < 0.05$ Diferente de madres de M70d mismo grupo experimental al inicio de la gestación y en la lactancia.

Tabla 3. Peso corporal de las madres en la gestación y la lactancia.

		M70d		M150d	
	PESO	GRUPO C	GRUPO R	GRUPO C	GRUPO R
GESTACION	INICIO (g)	195.4±7.4	200.7±6.5	226.2±5.7*	221.9±6.8*
	FINAL (g)	292.1±9.9	295.1±16.6	331.1±14.8	321.9±8.5
Ganancia de peso total en gestación (g)		96.7 ± 4.6	94.7 ± 12.3	104.9 ± 10.5	100.0 ± 4.7
LACTANCIA	INICIO (g)	217.9±8.0	226.4±9.3	245.2±8.6*	240.2±4.2
	FINAL (g)	222.2±3.6	228.8±5.9	257.8 ±7.7*	248.2±6.7

Tabla 3. Peso corporal de la madre durante gestación y lactancia.*P<0.05 diferente de M70d en el mismo grupo experimental al inicio de la gestación y en la lactancia.

Ingesta de alimento materno.

Con respecto a la ingesta de alimento durante la gestación, no se presentaron diferencias significativas entre grupos experimentales y edad materna. En la lactancia, tanto las madres de 70 como las de 150 días ingieren más alimento que en la gestación, no encontrándose diferencias entre grupos experimentales de la misma edad. Sin embargo, al analizar entre edades maternas, se encontró que las madres de 150 días tienden a ingerir más alimento aproximadamente a partir del día 9 de lactancia, es importante considerar que a esta edad las crías ya comienzan a ingerir el mismo alimento que la madre. Al final de este periodo, la ingesta del grupo control de M70d disminuye y es significativamente menor con respecto al de M150d (Figura 2).

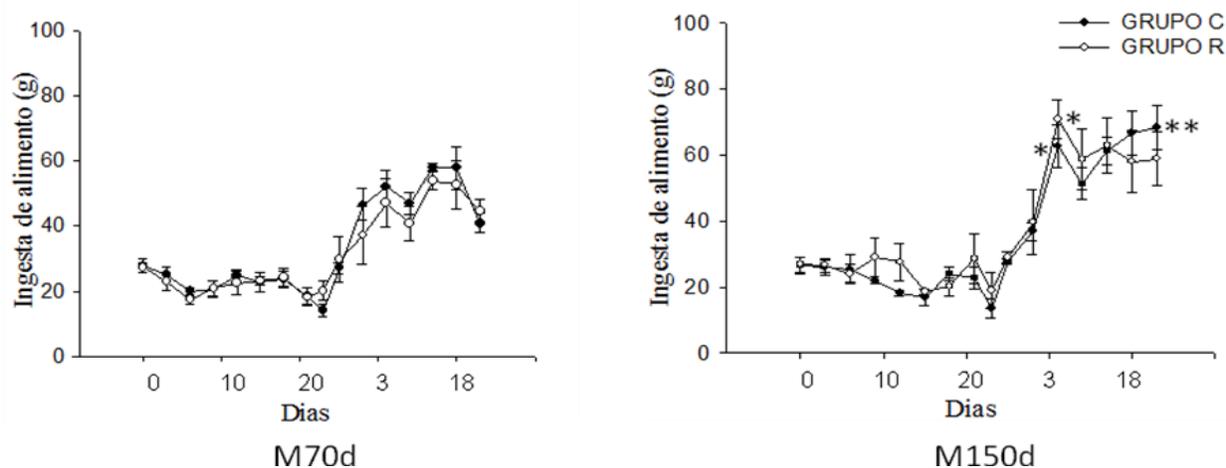


Figura 2. Ingesta de alimento de la madre durante la gestación y lactancia. *p<0.05 vs. M70d en la ingesta al día 12 de lactancia entre grupos experimentales. ** vs. Control M70d en la ingesta al día 21 de lactancia.

Tabla 4. Ingesta de alimento materno durante la última semana de la lactancia.

Días de lactancia	MADRES DE 70d		MADRES DE 150d	
	GRUPO C	GRUPO R	GRUPO C	GRUPO R
12	46.96 ± 3.3	40.70±5.4	51.30±4.8*	58.80±9.1*
15	57.96±1.1	53.84±2.9	61.20±4.1	62.78±8.4
18	57.89±6.6	52.70±7.4	66.70±6.5	58.10±9.4
21	40.90±3.0	44.60±3.5	68.50±6.7**	58.92±8.1

Tabla 4. Ingesta de alimento materno al final de la lactancia. *P<0.05 diferente de M70d en el mismo grupo experimental. ** vs. Control de M70d al día 21 de lactancia.

La concentración de corticosterona en la materia fecal de la madre

Las concentraciones de corticosterona materna revelan que al día 10 de gestación, la restricción proteínica no genera alteración alguna entre grupos experimentales a la misma edad. Sin embargo, la edad es un factor importante ya que la concentración es mayor en madres de edad adecuada para reproducción (M150d).

Al día 19 de gestación el efecto de la dieta se ve reflejado entre grupos experimentales de M70d, donde la concentración de la hormona en el grupo restringido es considerablemente menor. A la edad de 150 días no hay diferencia significativa. Al comparar entre edades maternas, es posible apreciar mayor concentración en el grupo control de las M70d con respecto a las M150d. Es evidente que la concentración de corticosterona aumenta del día 10 al 19, lo cual es necesario para la maduración de los órganos fetales y además es un indicativo del aumento en el grado de estrés de la madre, debido a que en los últimos días empieza su preparación para el parto (figura 3).

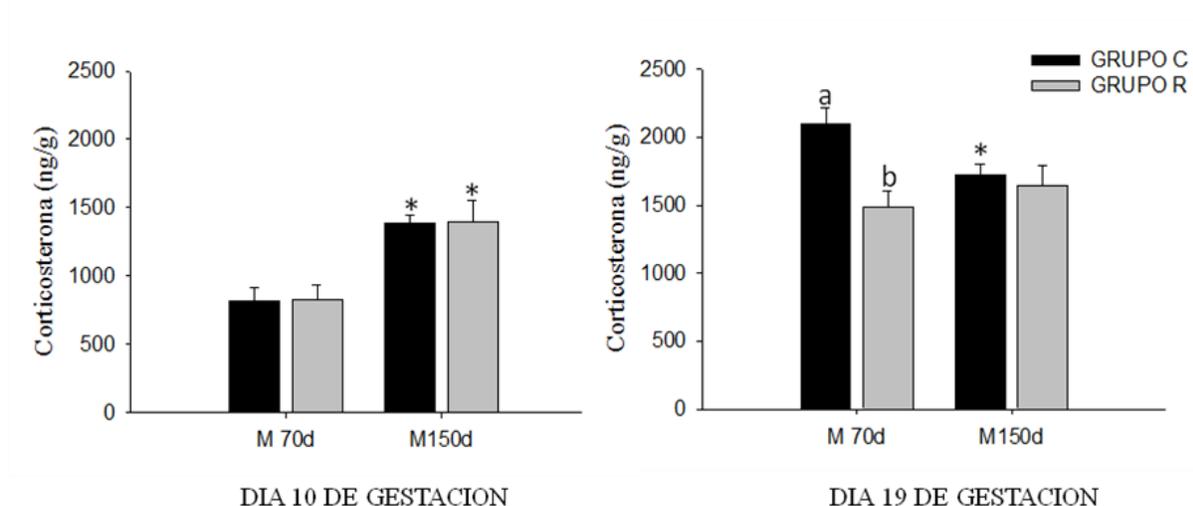


Figura 3. Concentración de corticosterona en materia fecal de la madre. $P < 0.05$ Letras distintas, indica diferencia entre grupos experimentales a la misma edad materna. *Diferente M70d en el mismo grupo experimental.

EFFECTO DE LA EDAD MATERNA Y LA RESTRICCIÓN PROTEINICA EN LAS CRIAS MACHO

Medidas morfométricas al nacimiento de las crías

Al nacimiento se evaluaron los parámetros morfométricos de las crías, el peso corporal entre grupos experimentales de M70d no presentó diferencia, sin embargo en las crías del grupo restringido de M150 el peso fue significativamente menor con respecto al control. Al comparar entre edades tanto grupo C como R de las crías de M70d fue menor con respecto a las crías de M150d.

En cuanto a la distancia ano-genital (DAG), tanto grupo C como R provenientes de M150d presentan mayor DAG con respecto a las crías de M70d. Al hacer la relación DAG/peso (mm/g), en el grupo R la relación es mayor que en el grupo C tanto de crías de M70d (6.8% sin ser significativo), como en las crías de M150d (27%). Entre edades maternas, esta relación se encuentra mayor tanto en el grupo C como en el R de M150d con respecto a los grupos de M70d. En el diámetro cefálico y longitud (de la punta de la nariz al inicio de la cola) no se observan diferencias grupos y edades experimentales.

Tabla 5. Medidas morfométricas de las crías macho al nacimiento

CRIAS MACHO	M70d		M150d	
	CONTROL	RESTRINGIDO	CONTROL	RESTRINGIDO
PESO (g)	5.6±0.1	5.5±0.04	5.9±0.1a*	5.0±0.22b*
DAG (mm)	3.3±0.1	3.4±0.1	3.7±0.02*	3.9±0.01*
DAG (mm/g)	0.58±0.008	0.62±0.01	0.63±0.03a	0.8±0.03b*
CEFALICA (mm)	11.3±0.07	11.1±0.14	11.4±0.05	11.4±0.01
ABDOMINAL (mm)	12.3±0.08	12.1±0.06	12.4±0.06	12.3±0.05
CEF/ABD	0.92±0.01	0.91±0.01	0.92±0.005	0.92±0.004
LONGITUG (cm)	4.6±0.05	4.6±0.08	4.7±0.09	4.6±0.1

Tabla 5. DAG: distancia ano genital. $p < 0.05$ letras distintas diferencia entre grupos experimentales de la misma edad materna.

* $p < 0.05$ Diferente de crías de M70d en el mismo grupo experimental.

Crecimiento hasta los 21 días de la vida postnatal

Durante la lactancia, desde el nacimiento hasta los 21 días de la vida postnatal, fue monitoreado el peso corporal de las crías. El comportamiento entre grupos experimentales provenientes de la misma edad materna fue muy similar, sin embargo al comparar entre edades maternas, las crías que provienen de madres de 150d fueron significativamente más grandes, lo que es un indicativo de la influencia de la edad de la madre sobre el peso en los primeros días de vida de las crías. Lo anterior se hace más evidente en el peso al final de la lactancia (día 21), se observa que las crías provenientes de M150d fueron considerablemente más grandes que las que provienen de M70d, en ambos grupos experimentales (figura 5).

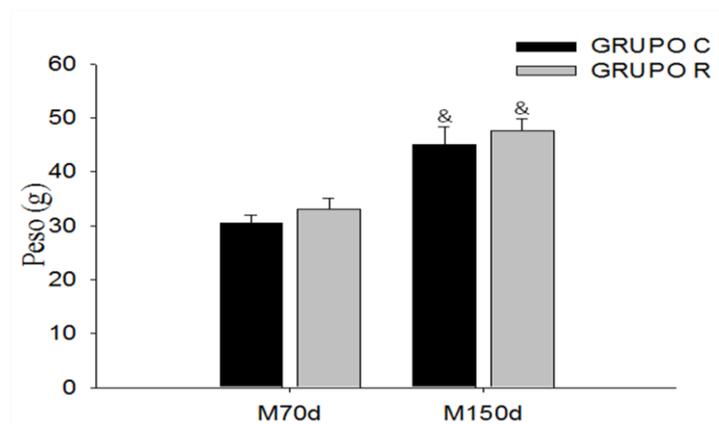


Figura 5. Peso de las crías macho a los 21 días de la vida postnatal. $p < 0.05$ diferente de M70d en el mismo grupo experimental.

Crecimiento hasta los 220 días de la vida postnatal

A los 220 días de edad, el grupo R de crías de M70d es notablemente mayor en comparación con el grupo C. Por el contrario, en las crías de M150d el grupo R presenta una ganancia de peso corporal menor con respecto al grupo C. Al hacer la comparación entre crías provenientes de diferente edad materna, se observó que el grupo C de M150d tiene una ganancia de peso corporal mayor que el grupo C de M70d. No se encontraron diferencias entre grupos restringidos (figura 6).

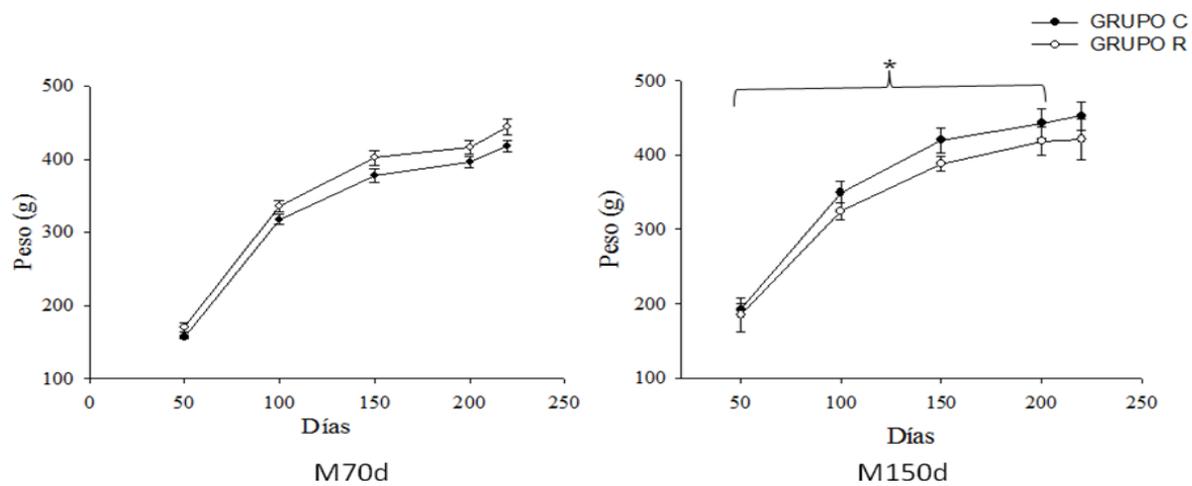


Figura 6. Crecimiento de crías macho hasta los 220 días de edad. * $p < 0.05$ diferente de M70d en el grupo control.

Concentración de leptina, triglicéridos, colesterol y corticosterona en suero de las crías macho a los 220 días de edad.

a) Concentración de Leptina

La concentración de leptina fue mayor en las crías provenientes de madres restringidas tanto de 70 días como de 150 días. Al comparar entre edades maternas, las crías de M70d presentaron mayor concentración de leptina tanto en el grupo control como en el restringido con respecto a los grupos de M150d. (figura 7).

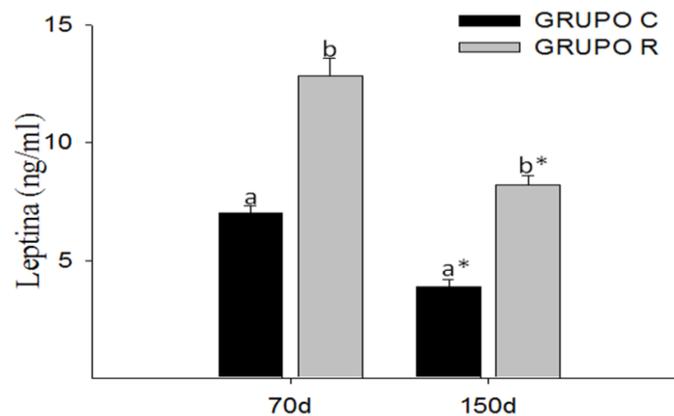


Figura 7. Concentración de Leptina en crías macho a los 220 días de edad. $P < 0.05$ Letras distintas, indica diferencia entre grupos experimentales a la misma edad materna. * $p < 0.01$ diferente de crías de M70d en el mismo grupo experimental. $n = 5-6$

b) Concentración de Triglicéridos y Colesterol

La restricción proteínica no modificó la concentración de triglicéridos y colesterol entre grupos experimentales a la misma edad materna. Sin embargo la edad materna aparece como un factor importante en esta determinación, ya que es evidente que la concentración fue mayor en crías de ambos grupos provenientes de madres de 70 días (figura 8).

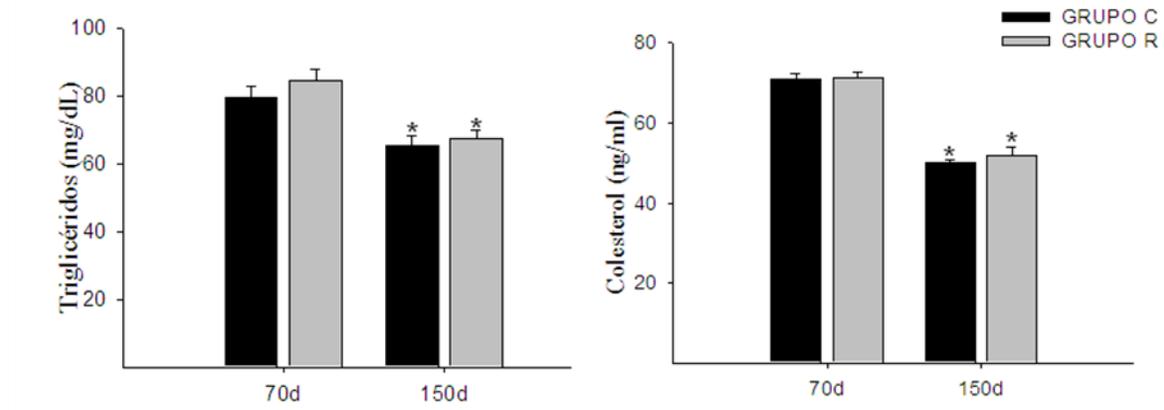


Figura 8. Concentración de triglicéridos y colesterol de crías macho a los 220 días de edad. * $p < 0.001$ diferente de crías de M70d en el mismo grupo experimental. $n = 5-6$

c) Concentración de corticosterona

En cuanto a la concentración de corticosterona en suero, no hay diferencias entre los grupos experimentales de M70d; sin embargo, es evidente que el grupo R de M150d presentó concentración significativamente menor con respecto al grupo C. Al comparar entre grupos de crías provenientes de madres de diferente edad, las crías de M70d mostraron mayor concentración de corticosterona en comparación con las de M150d, encontrándose diferencia significativa sólo en los grupos restringidos (Figura 9).

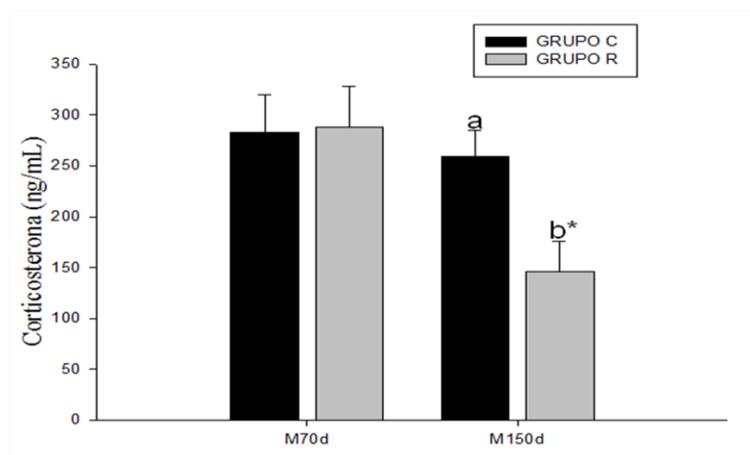


Figura 9. Concentración de corticosterona de crías macho a 220 días de edad. $P < 0.05$ Letras distintas, indican diferencias entre grupos experimentales a la misma edad materna, *Diferente de crías de M70d en el mismo grupo experimental.

Crecimiento de las crías a los 350 días de edad.

A los 350 días de edad, el grupo R de M70d es notablemente más grande en cuanto al peso corporal en comparación con el grupo C. Por el contrario, en las crías de M150d el grupo R presentó una ganancia de peso corporal menor con respecto al grupo C. Al hacer la comparación entre grupos de crías de diferente edad materna, se observó que hasta los 220 días de la vida postnatal no existen diferencias en la ganancia de peso corporal, sin embargo si la hay a los 350 días de edad.

En el peso corporal al día 350 de la vida postnatal, existió diferencia considerable tanto entre grupos experimentales como entre edades maternas. En este caso se observó que las crías del grupo R de M70d tuvieron mayor peso comparadas con el grupo C; en cambio, en las madres de 150d el grupo R fue de menor peso que el C. Al comparar entre edades, el dato interesante es que el grupo R proveniente de madres en crecimiento (M70d) tienden a recuperar el peso más rápidamente que las crías que provienen de edad adecuada para reproducción (M150d) (figura 10).

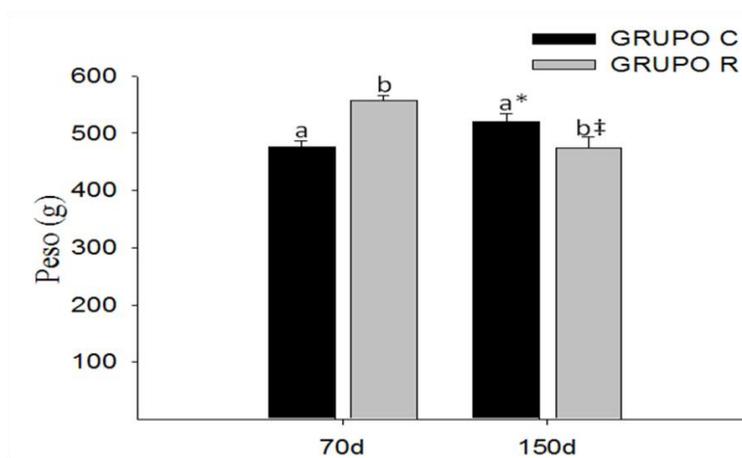


Figura 10. Peso de las crías macho a los 350 días de edad. $P < 0.05$ Letras distintas indican diferencia entre grupos experimentales a la misma edad materna. ‡ diferente del grupo R de M70d. * $P < 0.01$ diferente del grupo C de M70d.

DISCUSION

Actualmente existen estudios de programación donde se utilizan como modelo experimental animales que son sexualmente reproductivos, pero aun están en crecimiento a edades como 65 días de edad (William D. Rees), 75 días (Langley- Evans SC, Elmes MJ), y otras adultas de 120 días (Taylor PD) 150 días de edad (Burdge GC) e incluso de mayor edad. La edad es un factor que puede alterar la respuesta de la madre y del feto debido a la competencia de nutrientes, además del tipo de cepa de la rata y la diferencia en la calidad nutricional de la dieta.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el impacto de la edad y la restricción proteínica materna sobre el grado de estrés tanto en madres como en crías, así como las alteraciones en el crecimiento y metabolismo de la progenie en la vida postnatal.

Con base en los resultados obtenidos en nuestro estudio, se puede apreciar que la edad materna aunada con restricción proteínica genera determinado grado de estrés en la madre, el cual probablemente repercute en el desarrollo, crecimiento y metabolismo de las crías durante el periodo de lactancia y a lo largo de la vida.

Durante la gestación, las madres alimentadas con la dieta restringida mantuvieron el peso corporal menor con respecto al grupo control, sin ser significativo en ambas edades maternas. A pesar de que la ingesta de alimento fue muy similar en ambos grupos, la calidad nutricional de la dieta no es la misma, lo cual también se ve reflejado en el feto, quien tiende a limitar el uso de nutrientes y a disminuir su metabolismo como un mecanismo de adaptación a la falta de proteínas [28].

Los glucocorticoides, son hormonas esteroides producidas predominantemente por la glándula adrenal y son mediadores clave de las respuestas de estrés [51]. En ratas, elevado nivel de glucocorticoides prenatales es asociado con crecimiento retardado, bajo peso al nacimiento [62] y alteraciones en la regulación del eje HHA [63, 91]. Existen estudios que demuestran que el incremento en su concentración está relacionado con la predisposición de las crías a problemas de salud como hipertensión, diabetes y disfunción reproductiva en la vida adulta [51], incluso ha sido asociado con problemas de conducta y aprendizaje [92].

La maduración adrenal puede ser regulada por el estado nutricional materno durante la gestación [93]. En el análisis de los glucocorticoides, Fernández–Twinn [94] encontró que la concentración de corticosterona tanto en la circulación materna como fetal no es afectada por la restricción proteínica materna (restricción $\approx 60\%$ de proteínas), lo que sugiere que cambios en la concentración de glucocorticoides maternos no juega un papel directo en la programación en este modelo de restricción. Por otro lado, Zambrano E [95], demostró en ratas al día 19 de gestación un incremento en la concentración de corticosterona en el suero de madres restringidas, atribuyendo tal aumento al estrés generado por la restricción proteínica. En nuestro estudio, se utilizó materia fecal de la madre para determinar la concentración de corticosterona presente en cada grupo experimental, con la finalidad de validar y estandarizar un método no invasivo y evitar un estrés adicional a la madre durante la gestación al momento de toma de muestra, además de que se ha encontrado que para anticuerpos de cortisol y corticosterona, el metabolito fecal correlaciona positivamente ($r=0.552$, $p<0.03$, $n=16$) con la concentración en suero [72]. Por lo anterior, podemos establecer que los resultados de nuestro método son válidos; obteniendo que al día 10 de gestación no se presentaron diferencias en la concentración de corticosterona fecal entre grupos experimentales, tanto de madres de 70 como de 150 días; sin embargo, al día 19 de gestación fue evidente que en el grupo control de M70d la concentración de corticosterona fue mayor con respecto al grupo restringido, no encontrándose diferencia entre grupos de madres de 150 días. Estos resultados se pueden atribuir al método de obtención de muestra, puesto que a pesar de encontrarse correlación positiva entre suero y materia fecal, sin duda la obtención de suero implica manipulación del animal ocasionando así un estrés adicional al de la dieta restringida en proteínas, mientras que la materia fecal es considerado un método no invasivo y un acumulado real de la hormona circulante en el animal durante el día ([75], [72]).

Al nacimiento, el primer parámetro evaluado en las crías fue el peso corporal. En varios modelos de estudio sobre restricción proteínica, el peso al nacimiento de crías provenientes de madres restringidas es usualmente bajo ([96]; [97]; [26], [98], [82]) sin embargo, algunos estudios reportan incremento en el peso al nacimiento [54] o ningún efecto por la restricción [97]. El peso al nacimiento, es un indicador del compromiso del desarrollo, ya que los mamíferos en desarrollo van a reclutar mecanismos adaptativos para proteger el crecimiento, especialmente de órganos vitales durante el desarrollo [99]. El bajo peso al nacimiento es asociado con incremento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular y diabetes tipo II [100]. Nuestros datos indican que el peso corporal al nacimiento de las crías procedentes de madres restringidas fue menor en comparación con el control. Es evidente que la madre de 70 días provee a sus

crías de mayor cantidad de nutrientes, lo que genera mayor peso al nacimiento en comparación con el grupo restringido de crías de M150d, lo cual se debe a que el feto capta la mayoría de los nutrientes para satisfacer sus necesidades, a expensas de la madre quien probablemente frene su propio metabolismo.

Otros parámetros evaluados al nacimiento fue la DAG en las crías macho, parámetro considerado como marcador de diferenciación sexual al nacer [99], diámetro cefálico, abdominal y longitud corporal (talla). Zambrano E [95], demostró incremento en la distancia ano-genital de crías macho provenientes de madres restringidas, este parámetro es normalmente regulado por testosterona y puede ser usado como un marcador de exposición fetal a andrógenos. El incremento de la concentración tanto de esteroides maternos como de andrógenos que pueden atravesar la placenta puede contribuir al incremento en la distancia ano-genital de las crías de madres restringidas. En este caso, encontramos mayor distancia ano-genital en crías provenientes de grupos restringidos de ambas edades maternas, lo que puede ser un indicativo del efecto de la restricción proteínica materna sobre este parámetro en las crías.

Algunos investigadores relacionados con esta área, han propuesto que proveer nutrición adecuada a un grupo de crías de bajo peso al nacimiento como producto de la restricción proteínica materna, genera ganancia recuperada de peso corporal en la vida postnatal ([95]; [97]), lo que corresponde con la hipótesis de que el desarrollo de la programación es consecuencia de falta de coincidencia entre el ambiente visto durante el periodo de desarrollo de la plasticidad y el ambiente maduro, la desnutrición materna ha indicado al feto un ambiente pobre de nutrimentos tanto actual como futuro, pero la ingesta de dieta normal después de la lactancia crea severas incongruencias metabólicas en la cría [101]. En este caso, las crías de madres de 70 días presentaron menor peso corporal al día 21 de lactancia con respecto a las crías provenientes de madres de 150 días de edad en ambos grupos experimentales, lo que nos indica que la edad materna tiene un impacto directo sobre el crecimiento del individuo. Durante la lactancia, las crías continúan su crecimiento y algunos órganos continúan su desarrollo, de tal forma que el estado nutricional durante el periodo de rápido desarrollo puede alterar de forma irreversible el tamaño de algunos órganos [102].

Se ha propuesto que la discrepancia entre el ambiente intrauterino y postnatal ocasionan fenotipos mal adaptados debido a respuestas adaptativas predictivas generadas durante el desarrollo fetal que no coinciden con el ambiente postnatal esperado [103]. De acuerdo con esta hipótesis, nuestro estudio

esperaba que cada grupo experimental presentara alteraciones fenotípicas y funcionales distintas debido al tratamiento específico de cada uno. De este modo, el grupo restringido adquirió adaptaciones en la vida fetal para un medio adverso y se preparó para él, sin embargo, en la vida postnatal creció en un medio distinto para el cual no estaba programado, es decir, en medio de abundancia de nutrientes. Como resultado, el grupo restringido proveniente de madres de 70 días de edad presentó una ganancia de peso corporal considerablemente mayor que el control a los 350 días de edad, ya que los mecanismos adaptativos desarrollados no fueron adecuados y las alteraciones fisiológicas pueden influir en su metabolismo. En cambio, en las crías restringidas de madres de 150d se observa que el peso se mantiene menor con respecto al control a lo largo de la vida del animal.

Uno de los mayores problemas de salud pública es la obesidad, generalmente asociada a otras enfermedades tales como hipertensión, diabetes mellitus, hiperlipidemia y enfermedades cardíacas. El tejido adiposo se considera como la base celular de la obesidad, es una glándula capaz de producir gran cantidad de péptidos y metabolitos asociados al control de la masa corporal así como al control de la respuesta inmune [104]. Una de las moléculas de mayor investigación en los últimos años y que está involucrada con ambos sistemas es la hormona leptina. El transporte y metabolismo de la glucosa, son factores importantes en el control de la expresión y modulación de la leptina, la insulina estimula la utilización de glucosa por los adipocitos, por lo que el mecanismo por el cual la concentración en suero de leptina disminuye con el ayuno prolongado, puede ser la disminución de la absorción de glucosa por el tejido adiposo [105].

Los parámetros metabólicos aquí presentados corresponden a los 220 días de edad en crías macho; se determinaron con la finalidad de analizar el efecto de la restricción proteínica y edad materna en la vida adulta de la rata. Debido a que el peso es a veces un pobre marcador del metabolismo, se evaluó la concentración de leptina como marcador indirecto del grado de adiposidad, además de la concentración de triglicéridos, colesterol y corticosterona como posibles indicativos de algún tipo de alteración metabólica.

La desnutrición materna durante la gestación genera en las crías obesidad, hiperinsulinemia e hiperlipidemia en la vida adulta, particularmente si estas ingieren dieta alta en grasa en la vida postnatal [82]. La concentración de leptina en plasma aumenta con el aumento de peso corporal y disminuye con la pérdida del mismo, consistente con el papel de la leptina como señal de almacenamiento de tejido adiposo [106]. Así, la leptina se considera una hormona anti-obesidad que previene el almacenamiento de exceso

de tejido adiposo por retroalimentación del hipotálamo para reducir la ingesta de alimento e incrementar el gasto de energía [107].

Bautista CJ (2008), demostró retraso en el punto de concentración máxima de leptina en la vida neonatal en las crías provenientes de madres restringidas, el cual se presenta de forma normal alrededor de los días 12-14 de lactancia, y que juega un papel central en la maduración del centro hipotalámico de apetito. La leche que secretan las madres en la lactancia, puede contener hormonas reguladoras del apetito y la saciedad, las cuales son transferidas a las crías. La alta o baja concentración de leptina llega al torrente sanguíneo de la cría y actúa a nivel hipotalámico, lo que causa disminución de la ingesta de alimento y aumento del gasto energético de crías cuyas madres fueron alimentadas con dieta restringida durante la lactancia, lo que se ve reflejado en el bajo peso corporal respecto al grupo control. Se ha reportado la disminución de leptina en suero de crías de madres sometidas a restricción proteínica durante la lactancia a los 12 y 21 días de edad. A partir del final de la lactancia, la concentración de leptina aumenta con la edad ([108],[80]). Un análisis de composición corporal al día 25 de la vida postnatal demuestra que la mayor cantidad de grasa corporal y concentración de leptina fue vista en el grupo restringido [20]. Con base en nuestros resultados, la leptina en machos provenientes de madres restringidas mostró incremento en la concentración con respecto al control a los 220 días de edad a ambas edades maternas experimentales.

Bautista CJ (2008), Encontró también que las crías de madres restringidas en la gestación pueden llegar a ser obesas, lo que indica que los efectos del ambiente de desarrollo durante la gestación son modificados aun más por el nivel de nutrición disponible durante la lactancia. Nuestros resultados revelan que las crías provenientes de madres restringidas no siempre tienen este comportamiento en cuanto al peso corporal, ya que en este caso las crías del grupo restringido provenientes de madres de 70 días de edad fueron de mayor peso corporal con respecto al control, mientras que en las crías restringidas madres de 150 días se observó lo contrario, presentaron menor peso corporal en comparación con el control. Lo anterior demuestra que la edad materna es un factor importante en la programación del desarrollo de obesidad del individuo, lo que se comprueba al comparar la cantidad de grasa abdominal de los grupos, siendo mayor en el grupo restringido que en el grupo control de madres de 70d.

El tejido adiposo juega un papel crucial en la regulación de la homeostasis de la grasa del cuerpo. En periodo de abundantes calorías, en los almacenes de ácidos grasos libres en forma de triglicéridos por la esterificación del glicerol y liberación nuevamente en la circulación en etapas de poca energía [106]. En ovejas se ha reportado que la restricción de nutrientes maternos durante el final de la gestación, que corresponde a la etapa en que de forma paralela se presenta el máximo crecimiento fetal y aumento de los depósitos de grasa, resulta en reducción de tejido adiposo en las crías [109], experimentos de restricción de crecimiento placentario resultan en bajo peso al nacimiento, rápido crecimiento postnatal temprano e incremento de tejido adiposo de las crías a las 6 semanas en ovejas [109]. En nuestro caso, no se observan cambios en la concentración de triglicéridos y colesterol, sin embargo se observa un impacto generado por la edad materna, donde las crías que provienen de madres aun en crecimiento presentan mayor concentración tanto de triglicéridos como de colesterol.

En humanos, se ha demostrado que la disminución de la concentración de cortisol materno puede causar crecimiento intrauterino retardado, lo que lleva a bajo peso al nacimiento ([110, 111]) de la misma manera que lo demostrado con el exceso de glucocorticoides. En animales, la remoción de glucocorticoides maternos por adrenalectomía lleva a ciertas consecuencias en las crías, algunas de las cuales son similares a las observadas en crías expuestas a elevados niveles de glucocorticoides maternos en útero. Por ejemplo, en crías recién nacidas de madres con adrenalectomía se ha reducido el peso corporal [112], y estas crías tienden a presentar valores altos de corticosterona en plasma en comparación con el control en la vida adulta ([113], [70]).

En el análisis de glucocorticoides en crías, nuestros datos revelan que la concentración de corticosterona materna no aumenta en el grupo restringido a ninguna edad, por el contrario disminuye en M70d al día 19 de gestación, por lo que la baja concentración de corticosterona materna puede desempeñar un papel determinante en el peso al nacimiento de las crías, así la dieta restringida y la edad de la madre pueden ser responsables del grado de estrés materno y por consiguiente del crecimiento disminuido al nacimiento de las crías con respecto al grupo control, puesto que tanto en crías restringidas de M70d como de M150d el peso al nacimiento fue menor a pesar de que la diferencia no se considera significativa en crías provenientes de madres de 70 días.

Existe información escasa acerca de la evaluación los niveles de corticosterona en gestación temprana (equivalente al primer trimestre en humano), tanto en madres como en crías, ya que la mayoría de los estudios van enfocados únicamente a los efectos generados en las crías. Por esta razón se evaluó también la concentración de corticosterona en crías macho a los 220 días de edad (adultos), encontrándose que las provenientes de madres de 70 días no se hubo diferencias entre grupos experimentales, sin embargo las crías restringidas de M150d tuvieron significativamente menor concentración con respecto a los grupos control. Estos datos sugieren que la programación del eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal en crías de madres de menor edad puede no ser afectada por la restricción proteínica materna. Existen estudios que demuestran que disminución de glucocorticoides maternos programa el desarrollo del eje HHA y depresión en conducta en una manera sexualmente dimórfica [70]. Resultado que se puede comprobar realizando estudios de aprendizaje y conducta en crías durante diferentes etapas del crecimiento.

RESUMEN DE RESULTADOS

-La restricción proteínica durante la gestación provoca disminución de la concentración de corticosterona en madres de 150 días, pero la aumenta en madres aun en crecimiento (M70d).

-En las crías, la restricción proteínica en la madre aun en crecimiento (M70d) repercute en el bajo peso al nacimiento y alteraciones en la distancia ano-genital, además tiene efectos en la regulación de la leptina, causando mayor concentración de la misma lo que puede estar relacionado con modificaciones en el apetito y el desarrollo de obesidad en la vida adulta.

-La madre aun en crecimiento (M70d) genera aumento en la concentración de triglicéridos y colesterol en crías, lo que puede estar relacionado con el desarrollo de obesidad.

-La restricción proteínica materna genera aumento en la concentración de corticosterona en crías provenientes de madres en crecimiento (M70d), lo cual puede repercutir en el desarrollo y funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, y generar posibles alteraciones en aprendizaje y conducta.

CONCLUSION

La restricción proteínica durante la gestación de una rata aun en crecimiento (M70d) produce mayor grado de estrés en la madre e incrementa el desarrollo de alteraciones metabólicas en la vida adulta

BIBLIOGRAFIA

1. Marsoosi, V., A. Jamal, and L. Eslamian, *Pre-pregnancy weight, low pregnancy weight gain, and preterm delivery*. Int J Gynaecol Obstet, 2004. 87(1): p. 36-7.
2. Nybo Andersen, A.M., et al., *Maternal age and fetal loss: population based register linkage study*. BMJ, 2000. 320(7251): p. 1708-12.
3. Orr, S.T., et al., *Unintended pregnancy and preterm birth*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2000. 14(4): p. 309-13.
4. Wallace, J.M., et al., *Nutritionally mediated placental growth restriction in the growing adolescent: consequences for the fetus*. Biol Reprod, 2004. 71(4): p. 1055-62.
5. Kirchengast, S. and B. Hartmann, *Impact of maternal age and maternal somatic characteristics on newborn size*. Am J Hum Biol, 2003. 15(2): p. 220-8.
6. Kitson, C., *Young maternal age was associated with increased risk of postneonatal death in full term, healthy infants*. Evid Based Nurs, 2003. 6(2): p. 57.
7. Phipps, M.G., J.D. Blume, and S.M. DeMonner, *Young maternal age associated with increased risk of postneonatal death*. Obstet Gynecol, 2002. 100(3): p. 481-6.
8. Chen, X.K., et al., *Teenage pregnancy and adverse birth outcomes: a large population based retrospective cohort study*. Int J Epidemiol, 2007. 36(2): p. 368-73.
9. Amini, S.B., et al., *Trends in an obstetric patient population: an eighteen-year study*. Am J Obstet Gynecol, 1994. 171(4): p. 1014-21.
10. Reichman, N.E. and D.L. Pagnini, *Maternal age and birth outcomes: data from New Jersey*. Fam Plann Perspect, 1997. 29(6): p. 268-72, 295.
11. Mardones, F., *Evolucion de la antropometria materna y del peso al nacimiento en Chile*. Rev. Chilena de Nutricion, 2003. 30(1).
12. Hashizume, K., K. Ohashi, and F. Hamajima, *Adolescent pregnancy and growth of progeny in rats*. Physiol Behav, 1991. 49(2): p. 367-71.
13. Borja, J.B. and L.S. Adair, *Assessing the net effect of young maternal age on birthweight*. Am J Hum Biol, 2003. 15(6): p. 733-40.
14. Godfrey, K., et al., *Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth*. BMJ, 1996. 312(7028): p. 410-4.
15. Gluckman, P.D., M.A. Hanson, and C. Pinal, *The developmental origins of adult disease*. Matern Child Nutr, 2005. 1(3): p. 130-41.
16. Nathanielsz, P.W., *Life in Womb: The origin of health disease*. 1999: p. 1-10,20-21,30-31.
17. Barker, D.J., *Developmental origins of adult health and disease*. J Epidemiol Community Health, 2004. 58(2): p. 114-5.
18. Seckl, J.R., *Prenatal glucocorticoids and long-term programming*. Eur J Endocrinol, 2004. 151 Suppl 3: p. U49-62.
19. Hoet, J.J., S. Ozanne, and B. Reusens, *Influences of pre- and postnatal nutritional exposures on vascular/endocrine systems in animals*. Environ Health Perspect, 2000. 108 Suppl 3: p. 563-8.
20. Bautista, C.J., et al., *Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat*. Pediatr Res, 2008. 63(4): p. 358-63.
21. Guzmán C, Z.E., *Endocrine disruptor compounds and their role in the developmental programming of the reproductive axis*. Rev Invest Clin. , 2007 59(1): p. 73-81.

22. Nyirenda MJ, W.L., Seckl JR., *Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect or maternal influence?* J Endocrinol. , 2001 170(3): p. 653-60.
23. Garofano, A., P. Czernichow, and B. Breant, *Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat.* Diabetologia, 1998. 41(9): p. 1114-20.
24. Reusens B, R.C., *Effects of maternal nutrition and metabolism on the developing endocrine pancreas.* In fetal origins of cardiovascular and lung disease, ed. Barker DJ., 2001: p. 339-358.
25. Neitzke, U., et al., *Intrauterine growth restriction in a rodent model and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal of the experimental evidence.* Placenta, 2008. 29(3): p. 246-54.
26. Holemans, K., L. Aerts, and F.A. Van Assche, *Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development.* J Physiol, 2003. 547(Pt 1): p. 11-20.
27. Barker, D.J., *The malnourished baby and infant.* Br Med Bull, 2001. 60: p. 69-88.
28. Zambrano E, B.C., Deás M, Martínez-Samayoa PM, González-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW., *A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat.* J Physiol. , 2006. 571(Pt 1): p. 221-30.
29. Paolini, C.L., et al., *Placental transport of leucine, phenylalanine, glycine, and proline in intrauterine growth-restricted pregnancies.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(11): p. 5427-32.
30. Jansson, T., et al., *Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction.* Placenta, 2002. 23(5): p. 392-9.
31. Mendelson CR, C.J., *New insights into the molecular endocrinology of parturition.* J Steroid Biochem Mol Biol., 2005. 93(2-5): p. 113-9.
32. Myatt, L., *Placental adaptive responses and fetal programming.* J Physiol, 2006. 572(Pt 1): p. 25-30.
33. Lindsay, R.S., et al., *Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring.* Hypertension, 1996. 27(6): p. 1200-4.
34. Welberg, L.A., J.R. Seckl, and M.C. Holmes, *Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring.* Eur J Neurosci, 2000. 12(3): p. 1047-54.
35. Krozowski, Z., et al., *The human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme: comparisons with other species and localization to the distal nephron.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. 55(5-6): p. 457-64.
36. Pepe, S., *The other second messenger gas: carbon monoxide signalling for myocardial protection?* Heart Lung Circ, 2001. 10(3): p. 113-4.
37. Seckl, J.R., M. Cleasby, and M.J. Nyirenda, *Glucocorticoids, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming.* Kidney Int, 2000. 57(4): p. 1412-7.
38. McMullen S, L.-E.S., *Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 2005 288(1): p. R85-90.
39. Genbacev, O., et al., *Regulation of human placental development by oxygen tension.* Science, 1997. 277(5332): p. 1669-72.
40. Abuzzahab, M.J., et al., *IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation.* N Engl J Med, 2003. 349(23): p. 2211-22.
41. Nathanielsz, P.W., *The role of basic science in preventing low birth weight.* Future Child, 1995. 5(1): p. 57-70.
42. Gluckman, P.D., *Editorial: nutrition, glucocorticoids, birth size, and adult disease.* Endocrinology, 2001. 142(5): p. 1689-91.

43. Wallace JM, B.D., 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(1): p. 100-8.
44. Petry, C.J., S.E. Ozanne, and C.N. Hales, *Programming of intermediary metabolism*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 185(1-2): p. 81-91.
45. Cole, T.J., et al., *Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation*. *Genes Dev*, 1995. 9(13): p. 1608-21.
46. Pepin, M.C., F. Pothier, and N. Barden, *Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene*. *Nature*, 1992. 355(6362): p. 725-8.
47. Michailidou, Z., et al., *Glucocorticoid receptor haploinsufficiency causes hypertension and attenuates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and blood pressure adaptations to high-fat diet*. *FASEB J*, 2008. 22(11): p. 3896-907.
48. Levitt, N.S., et al., *Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat*. *Neuroendocrinology*, 1996. 64(6): p. 412-8.
49. Goland, R.S., et al., *Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 77(5): p. 1174-9.
50. Wadhwa, P.D., et al., *Maternal corticotropin-releasing hormone levels in the early third trimester predict length of gestation in human pregnancy*. *Am J Obstet Gynecol*, 1998. 179(4): p. 1079-85.
51. Cottrell, E.C. and J.R. Seckl, *Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease*. *Front Behav Neurosci*, 2009. 3: p. 19.
52. Carter, C.S., et al., *Adrenocorticoid hormones and the development and expression of mammalian monogamy*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 771: p. 82-91.
53. Bertram, C., et al., *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(7): p. 2841-53.
54. Langle-Evans, S.C., et al., *Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat*. *Placenta*, 1996. 17(2-3): p. 169-72.
55. Plagemann, A., et al., *Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams*. *J Nutr*, 2000. 130(10): p. 2582-9.
56. Drake, A.J., B.R. Walker, and J.R. Seckl, *Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. 288(1): p. R34-8.
57. Edwards CR, B.R., Lindsay RS, Seckl JR., *Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension?* *Lancet*. , 1993 341(8841): p. 355-7.
58. Lesage, J., et al., *Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat*. *Endocrinology*, 2001. 142(5): p. 1692-702.
59. Stocker C, O.D.J., Morton NM, Wargent E, Sennitt MV, Hislop D, Glund S, Seckl JR, Arch JR, Cawthorne MA., *Modulation of susceptibility to weight gain and insulin resistance in low birthweight rats by treatment of their mothers with leptin during pregnancy and lactation*. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Jan;28(1):129-36., 2004 28(1): p. 129-36.
60. Mairesse, J., et al., *Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. 292(6): p. E1526-33.

61. Rondó PH, F.R., Nogueira F, Ribeiro MC, Lobert H, Artes R., *Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation*. Eur J Clin Nutr., 2003 57(2): p. 266-72.
62. McDonald TJ, F.K., Brown JM, Jenkins SL, Nathanielsz PW, Nijland MJ., *Betamethasone in the last week of pregnancy causes fetal growth retardation but not adult hypertension in rats*. J Soc Gynecol Investig., 2003. 10(8): p. 469-73.
63. Benediktsson, R., et al., *Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension*. Lancet, 1993. 341(8841): p. 339-41.
64. Koenen SV, M.C., Smith GS, Jenkins S, Nathanielsz PW., *Effects of maternal betamethasone administration on fetal and maternal blood pressure and heart rate in the baboon at 0.7 of gestation*. Am J Obstet Gynecol. 2002 186(4): p. 812-7.
65. Nyirenda, M.J., et al., *Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring*. J Clin Invest, 1998. 101(10): p. 2174-81.
66. Clifton VL, M.V., *Maternal asthma as a model for examining fetal sex-specific effects on maternal physiology and placental mechanisms that regulate human fetal growth*. Placenta.2004. 25(Suppl A): p. S45-52.
67. Mueller, B.R. and T.L. Bale, *Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy*. J Neurosci, 2008. 28(36): p. 9055-65.
68. Leonhardt, M., et al., *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(1): p. 45-54.
69. Weinstock, M., *Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour*. Neurochem Res, 2007. 32(10): p. 1730-40.
70. Wilcoxon, J.S. and E.E. Redei, *Maternal glucocorticoid deficit affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and behavior of rat offspring*. Horm Behav, 2007. 51(3): p. 321-7.
71. Slone-Wilcoxon, J. and E.E. Redei, *Maternal-fetal glucocorticoid milieu programs hypothalamic-pituitary-thyroid function of adult offspring*. Endocrinology, 2004. 145(9): p. 4068-72.
72. Mateo, J.M. and S.A. Cavigelli, *A validation of extraction methods for noninvasive sampling of glucocorticoids in free-living ground squirrels*. Physiol Biochem Zool, 2005. 78(6): p. 1069-84.
73. Munck A, G.P., Holbrook NJ., *Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions*. Endocr Rev. 1984 5(1): p. 25-44.
74. Holst, D.v., *The Concept of Stress and Its Relevance for Animal Behavior* Advances in the Study of Behavior.1998. 27 p. 1-131
75. Touma, C., et al., *Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice*. Gen Comp Endocrinol, 2003. 130(3): p. 267-78.
76. Graham LH, B.J., *Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for noninvasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids*. Zoo Biol. , 1996. 15: p. 71-82.
77. Monfort, S.L., et al., *Evaluating adrenal activity in African wild dogs (Lycaon pictus) by fecal corticosteroid analysis*. J Zoo Wildl Med, 1998. 29(2): p. 129-33.
78. Goymann, W., et al., *Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, Crocuta crocuta*. Gen Comp Endocrinol, 1999. 114(3): p. 340-8.
79. Spackman, D.H. and V. Riley, *Corticosterone concentrations in the mouse*. Science, 1978. 200(4337): p. 87.

80. Léonhardt M, L.J., Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC, Dupouy JP., *Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty.* Biol Reprod., 2003 68(2): p. 390-400.
81. Cohen, P. and J.M. Friedman, *Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1).* J Nutr, 2004. 134(9): p. 2455S-2463S.
82. Vickers MH, R.S., Ikenasio BA & Breier BH. , *Dysregulation of the edipoinsular- axis a mechanism for the pethogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming.* . J Endocrinol 2001. 170: p. 323-332.
83. Vickers, M.H., et al., *Neonatal leptin treatment reverses developmental programming.* Endocrinology, 2005. 146(10): p. 4211-6.
84. Hamann, A. and S. Matthaei, *Regulation of energy balance by leptin.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1996. 104(4): p. 293-300.
85. Hoggard, N., et al., *Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(20): p. 11073-8.
86. Ahima, R.S., D. Prabakaran, and J.S. Flier, *Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function.* J Clin Invest, 1998. 101(5): p. 1020-7.
87. Houseknecht KL, M.M., Portocarrero CP, McGuire MA, Beerman K., *Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity.* Biochem Biophys Res Commun. 1997 240(3): p. 742-7.
88. Iniguez, G., et al., *Adiponectin levels in the first two years of life in a prospective cohort: relations with weight gain, leptin levels and insulin sensitivity.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(11): p. 5500-3.
89. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, Jr., *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.* J Nutr, 1993. 123(11): p. 1939-51.
90. Margni, R.A., *Inmunologia e imunquímica : fundamentos.* Panamericana, 1996.
91. Cleasby ME, L.D., Nyirenda MJ, Seckl JR, Walker BR., *Is programming of glucocorticoid receptor expression by prenatal dexamethasone in the rat secondary to metabolic derangement in adulthood?* Eur J Endocrinol., 2003 148(1): p. 129-38.
92. Nolan, L.A., et al., *Lack of effect of protein deprivation-induced intrauterine growth retardation on behavior and corticosterone and growth hormone secretion in adult male rats: a long-term follow-up study.* Endocrinology, 2001. 142(7): p. 2996-3005.
93. Bloomfield, F.H., et al., *Periconceptional undernutrition in sheep accelerates maturation of the fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in late gestation.* Endocrinology, 2004. 145(9): p. 4278-85.
94. Fernandez-Twinn, D.S., et al., *The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction.* Br J Nutr, 2003. 90(4): p. 815-22.
95. Zambrano, E., et al., *A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development.* J Physiol, 2005. 563(Pt 1): p. 275-84.
96. Galler, J.R. and J. Tonkiss, *Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats.* J Nutr, 1991. 121(5): p. 762-9.
97. Langley, S.C. and A.A. Jackson, *Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets.* Clin Sci (Lond), 1994. 86(2): p. 217-22; discussion 121.
98. Langley-Evans, *Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat.* Int J Food Sci Nutr. 2000 51(1): p. 11-7.

99. Guzman, C., et al., *Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny*. J Physiol, 2006. 572(Pt 1): p. 97-108.
100. Langley-Evans, S.C., *Metabolic programming in pregnancy: studies in animal models*. Genes Nutr, 2007. 2(1): p. 33-8.
101. Gluckman, P.D. and M.A. Hanson, *The developmental origins of the metabolic syndrome*. Trends Endocrinol Metab, 2004. 15(4): p. 183-7.
102. Ozanne, S.E., D. Fernandez-Twinn, and C.N. Hales, *Fetal growth and adult diseases*. Semin Perinatol, 2004. 28(1): p. 81-7.
103. Wells, J., *The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect*. Biol Rev Camb Philos Soc. , 2007. 82(1): p. 143-72.
104. Ibañez E, T.E., *La leptina*. Cuad nutr. , 1999. 22 (5): p. 200-204.
105. Mueller WM, G.F., Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS, Havel PJ., *Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes*. Endocrinology.1998 139(2): p. 551-8.
106. Galic S, O.J., Steinberg GR., *Adipose tissue as an endocrine organ*. Mol Cell Endocrinol. 2010. 316(2): p. 129-39.
107. Ahima, R.S. and S.M. Hileman, *Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation*. Regul Pept, 2000. 92(1-3): p. 1-7.
108. Engelbregt MJ, v.W.M., Popp-Snijders C, Lips P, Delemarre-van de Waal HA., *Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction*. Pediatr Res. 2001. 50(4): p. 474-8.
109. Mostyn, A. and M.E. Symonds, *Early programming of adipose tissue function: a large-animal perspective*. Proc Nutr Soc, 2009. 68(4): p. 393-400.
110. O'Shaughnessy, R.W. and K.J. Hackett, *Maternal Addison's disease and fetal growth retardation. A case report*. J Reprod Med, 1984. 29(10): p. 752-6.
111. Hilden, J. and F. Ronnike, *On birth weight and gestation period in infants born to mothers with Addison's disease*. Dan Med Bull, 1971. 18(3): p. 62-5.
112. Wilcoxon, J.S., et al., *Sexually dimorphic effects of maternal alcohol intake and adrenalectomy on left ventricular hypertrophy in rat offspring*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. 285(1): p. E31-9.
113. Milkovic, K., J. Joffe, and S. Levine, *The effect of maternal and fetal corticosteroids on the development of function of the pituitary-adrenocortical system*. Endokrinologie, 1976. 68(1): p. 60-5.