



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN PROTEÍNIC A DURANTE LA GESTACIÓN Y/O LA LACTANCIA  
SOBRE LOS MECANISMOS DE SÍNTESIS Y METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS  
POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA EN LA RATA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA**

**Q.F.B. CLAUDIA JANET BAUTISTA CARBAJAL**

**TUTOR PRINCIPAL: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. NIMBE TORRES Y TORRES**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DRA. MARIA TERESA TUSIÉ LUNA.**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (IIB)**

**MÉXICO D.F. NOVIEMBRE 2013**



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.



PDCB/grad/ 034Jur/2012

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN**  
**ESCOLAR, UNAM**  
Presente.


Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 299ª del 18 de abril del 2012, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **CLAUDIA JANET BAUTISTA CARBAJAL**, con número de cuenta **50801090-9** con la tesis titulada **"EFECTO DE LA RESTRICCIÓN PROTEINICA DURANTE LA GESTACIÓN Y O LACTANCIA SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE Y ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA SINTESIS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE LA RATA"** dirigida por la Dra. Elena Zambrano González.

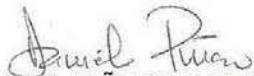
Presidente: Dr. Armando Roberto Tovar Palacio  
Secretario: Dra. Elena Zambrano González  
Vocal: Dr. Euclides Ávila Chávez  
Vocal: Dr. Ignacio Camacho Arroyo  
Vocal: Dra. Gina Lorena Quirarte G.

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumna, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente

**"Por mi raza hablará el espíritu"**  
Cd. Universitaria, a 18 de abril de 2012.

  
**DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL**  
**RESPONSABLE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

  
**DR. DANIEL PIÑERO DALMAU**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

C.c.p. Dr. Manuel Enrique Vázquez Valdés, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM  
Tutor (a) Dra. Elena Zambrano González  
Coordinación de PDCB  
DPD/YLV/evb

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: [pdcb@servidor.unam.mx](mailto:pdcb@servidor.unam.mx)

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Bajo la asesoría de la Dra. Elena Zambrano González y la Co-asesoría de la Dra. Nimbre Torres y Torres y la Dra Maria Teresa Tusié Luna.

Este Trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) No. 48839

La beca para la realización de estos estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas fue otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) No. de Becario: 232637/210333

## **DEDICATORIAS:**

**A Dios por estar siempre conmigo, por el cuidado especial que pone en mi vida y por siempre dirigirme por un sendero de sabiduría, tolerancia, honradez y justicia.**

**A mi padre por darme siempre ejemplo de fortaleza y confianza en mí misma, porque gracias a su apoyo y esfuerzo, hoy no solo consolido un paso más en mi vida profesional, hoy escribo en el libro de mi vida que el amor y el cuidado perfecto que dedico a mi persona quedara plasmado en mi corazón por toda la eternidad.**

**A mi madre por sus desvelos, por su incesante trabajo, por darme la vida, pero sobre todo por su dedicación y entrega total conmigo, porque gracias a ello, hoy soy una mujer de bien.**

**A mis hermanos Victor y Regina porque siempre encontré apoyo en ellos, porque nunca me dejaron caer y porque siempre están a mi lado en todos los momentos de mi vida.**

**A mi esposo por que iniciamos juntos este recorrido, porque siempre me mantuvo persistente en este proyecto y sobre todo por su comprensión, por eso y por todo el amor que le tengo, hoy con gran gozo comparto con el mi felicidad.**

**A mis abuelos porque gracias a ellos tengo a mis padres.**

**Donde hay fe hay amor, donde hay amor hay paz, donde hay paz esta Dios y donde está Dios no falta nada.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

**A mi asesora Dra. Elena Zambrano González, por contribuir con su ejemplo a mi formación profesional y por dedicar incontables horas de su tiempo a esta investigación.**

**A mis Co-tutoras Dra. Nimbe Torres y Torres y la Dra. Maria Teresa Tusié Luna, por su tan oportuna y valiosa contribución a mi proyecto de investigación.**

**A mis compañeros de trabajo Guadalupe Rodríguez González y Luis Reyes Castro por su participación y colaboración laboral.**

**Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por darme la oportunidad de llevar acabo mi investigación, en especial Depto. de Biología de la Reproducción, Depto. de Fisiología de la Nutrición y Depto. de Investigación Experimental y Bioterio.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México y al CONACyT por recibirme, confiar en mí y por el apoyo económico que me brindaron para llevar acabo mi proyecto de Doctorado.**

**A todos los que de alguna u otra forma contribuyeron en la realización de este proyecto, “gracias a su apoyo”:**

**Dr. Fernando Larrea**

**Dr. Peter W Nathanielsz**

**Secr. Guadalupe Alarcón**

**Dr. Armando Tovar**

**Dr. Ignacio Camacho**

**Dra. Gina Quirarte**

**Dr. Euclides Ávila**

**Dra. Maricela Rodríguez**

**Dr. Omar Granados**

**Dr. Iván Torre**

**Q.F.B. Roberto Cabrera**

**MCs. Hector Ledesma**

**Dra. Cun li**

**Dr. Rogelio Hernández**

**MCs. Carlos Ibáñez**

**Vet. Regina Bautista**

**Q.F.B. Lourdes Boeck**

**MCs. Roberto Chavira**

**Dra. Sara Montaña**

**Q.F.B. Guillermo Ordaz**

**Dra. Carolina Guzmán**

**Q.F.B Ingrid de la peña**

## ÍNDICE.

<b>1. Resumen</b>	<b>9</b>
<b>2. Abstract</b>	<b>11</b>
<b>3. Introducción</b>	<b>13</b>
3.1 Programación del desarrollo	
3.2 Gestación:	
3.2.1 Desarrollo y crecimiento fetal	
3.2.2 Evidencia experimental y epidemiológica del estado nutricional durante la gestación	
3.2.3 Aporte de los AGPIs-CL durante la gestación	
3.3 Lactancia:	
3.3.1 Evidencia experimental y epidemiológica del estado nutricional durante la lactancia	
3.3.2 Aporte de los AGPIs-CL durante la lactancia	
3.4 Metabolismo de los AGPIs-CL	
3.5 Mecanismos moleculares y biosíntesis de las desaturasas y elongasas:	
3.5.1 Desaturasas	
3.5.2 Elongasas	
<b>4. Justificación</b>	<b>35</b>
<b>5. Planteamiento del problema</b>	<b>35</b>
<b>6. Hipótesis</b>	<b>35</b>
<b>7. Objetivos</b>	<b>37</b>
7.1 General	
7.2 Particulares	
<b>8. Diseño experimental</b>	<b>40</b>
<b>9. Metodología</b>	<b>42</b>
9.1 Animales experimentales	
9.2 Apareamiento, cuidado y mantenimiento de los animales	
9.3 Dietas (modelo de restricción proteínica)	
9.4 Medición de peso corporal e ingesta	
9.5 Extracción de suero de las ratas experimentales	
9.6 Extracción de órganos:	
9.6.1 Placenta	
9.6.2 Fetos	
9.6.3 Hígado y glándula Mamaria	
9.6.3 (1) Análisis morfométrico	
9.7 Producción de leche e ingesta de alimento de las crías	
9.8 Extracción de leche	
9.9 Componentes químicos de la leche:	
9.9.1 Concentración de glucosa	
9.9.2 Extracción de lípidos	
9.9.3 Ácidos grasos. Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos	

- 9.9.4 Proteínas totales
- 9.9.5 Sólidos totales y humedad
- 9.10 Lípidos totales y contenidos de ácidos grasos en tejido
- 9.11 Carcasas
- 9.12 Análisis químico proximal de carcasas:
  - 9.12.1 Proteínas totales (método de Kjeldahl)
  - 9.12.2 Contenido de lípidos crudos (método de Soxhlet)
- 9.13 Química sanguínea:
  - 9.13.1- Glucosa
  - 9.13.2- Colesterol
  - 9.13.3- Triacilglicéridos
- 9.14 Determinación de Hormonas:
  - 9.14.1 Leptina
  - 9.14.2 Insulina
- 9.15 Análisis de la expresión de RNAm por RT-PCR de tiempo real
- 9.16 Análisis de la concentración de proteína por Western Blot
- 9.17 Análisis estadístico:
  - 9.17.1 Gestación
  - 9.17.2 Lactancia

## 10. Resultados-----63

### **Gestación**

- 10.1 Peso corporal e ingesta de alimento de las madres durante la gestación
- 10.2 Parámetros maternos a 19 dG
- 10.3 Características bioquímicas en el suero materno a 19dg

### **Hígado materno a 19 dG**

- 10.4 Composición del hígado
- 10.5 Porcentaje de ácidos grasos en el hígado materno a 19dG
- 10.6 Expresión génica de enzimas desaturasas y elongasas en el hígado materno a 19dG

### **Glándula mamaria 19dG**

- 10.7 Composición bioquímica de la glándula mamaria
- 10.8 Porcentaje de ácidos grasos en la glándula mamaria materna 19dG
- 10.9 Análisis histológico y microfotografía de la glándula mamaria a 19dG
- 10.10 Expresión génica de las enzimas desaturasas y elongasas en la glándula mamaria a 19dG
- 10.11 Concentración de las enzimas desaturasas y elongasas en la glándula mamaria a 19dG

### **Resultados en fetos a 19dG**

- 10.12 Parámetros fetales a 19dG

### **Lactancia**

#### **Parámetros a 7dL**

- 10.13 Peso materno durante la gestación y lactancia
- 10.14 Parámetros maternos a 7dL
- 10.15 Parámetros bioquímicos maternos a 7dL
- 10.16 Histología de la glándula mamaria a 7dL



- 10.17 Producción y concentración de leptina en la leche a 7dL
- 10.18 Grasa total y contenido de ácidos grasos en la leche a 7dL
- 10.19 Composición bioquímica de la leche a 7dL

#### **Parámetros a 14dL**

- 10.20 Parámetros maternos a 14dL
- 10.21 Parámetros bioquímicos maternos a 14dL
- 10.22 Histología de la glándula mamaria a 14dL
- 10.23 Producción y concentración de leptina en la leche a 14dL
- 10.24 Grasa total y contenido de ácidos grasos en la leche a 14dL
- 10.25 Composición bioquímica de la leche a 14dL

#### **Parámetros a 21dL**

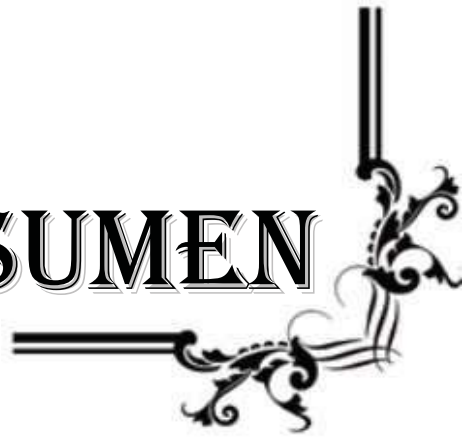
- 10.26 Parámetros maternos a 21dL
- 10.27 Parámetros bioquímicos maternos a 21dL
- 10.28 Histología de la glándula mamaria a 21dL
- 10.29 Producción y concentración de leptina en la leche a 21dL
- 10.30 Grasa total y contenido de ácidos grasos en la leche a 21dL
- 10.31 Composición bioquímica de la leche a 21dL

#### **Resultados de las crías durante la lactancia**

- 10.32 Parámetros de las crías al nacimiento 7, 14 y 21 dL
- 10.33 Concentraciones séricas de leptina en las crías
- 10.34 Composición corporal de las crías a 21dL

<b>11. Discusión</b> -----	<b>92</b>
<b>12. Conclusiones</b> -----	<b>101</b>
<b>13. Bibliografía</b> -----	<b>104</b>
<b>14. Publicaciones</b> -----	<b>115</b>

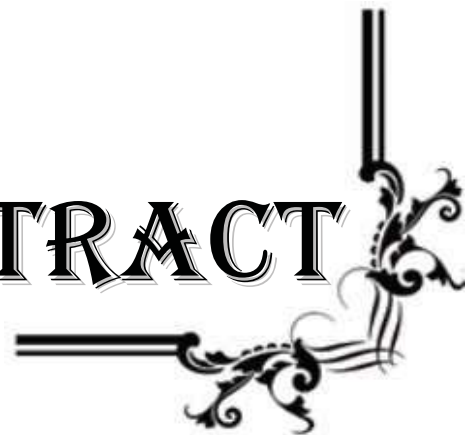
# RESUMEN



## 1. RESUMEN

**Introducción.** “La hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad” propone que la desnutrición fetal desencadena adaptaciones endócrinas que cambian la morfología, fisiología y el metabolismo. Por ello la madre debe nutrirse para proporcionar los elementos necesarios a su crío vía placentaria en la gestación o por medio de la leche en la lactancia. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPIs-CL) como el araquidónico (AA) y docosahexaenoico (DHA) son necesarios para la cría ya que favorecen su desarrollo. Estos son sintetizados por las desaturasas ( $\Delta 5D$  y  $\Delta 6D$ ) y elongasas (ELOVL 2 y 5) en hígado y glándula mamaria (GM) materna. Por otro lado, la ingesta de alimento y el gasto de energía de la madre es regulada por la leptina, la cual, está relacionada positivamente con los depósitos grasos de la madre. **Objetivo:** Se investigó el efecto de la dieta baja en proteína durante la gestación y la lactancia, en la síntesis de enzimas que forman los AGPIs-CL en el hígado y GM materna y la producción y composición bioquímica de la leche, finalmente determinamos parámetros de desarrollo en las crías. **Métodos:** Se emplearon ratas Wistar alimentadas con dietas isocalóricas con contenido proteínico normal (C) 20% caseína o restringido (R) 10% caseína. Los grupos experimentales fueron control (C) durante gestación y lactancia y restringida (R) en ambos periodos. A 6, 13 y 20 días de lactancia (dL) se extrajo la leche y a 7, 14 y 21 dL se determinó la producción. A 19 días de gestación (dG) y 7, 14 y 21 dL obtuvimos el hígado y GM materna. Tanto a los órganos como a las leches se les determinó la grasa total por el método de Folch y la cromatografía de gases se usó para determinar el contenido de AGPIs-CL. Se utilizó RT-PCR para la expresión de  $\Delta 6D$  y  $\Delta 5D$  y ELOVL 2 y 5 y el análisis de las proteínas por Western Blot. La morfometría de la GM, se evaluó, con la tinción de H&E y se usó el programa Leica Q500W para su análisis, los parámetros bioquímicos en suero por método enzimático y la leptina e insulina por RIA. A los fetos de 19 dG se les extrajo el hígado y cerebro y se determinó la grasa total y a las crías de 7, 14 y 21 dL, se les tomó el peso corporal y el de sus órganos. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  EE, “t” de Student, \* $p \leq 0.05$ . **Resultados:** El peso materno no tuvo cambios durante la gestación, sin embargo, la composición de AA y DHA en el hígado y GM fue menor en el grupo R a 19 dG, y en la diferenciación de la GM esta fue menor en R. Durante la gestación los triacilglicéridos se incrementaron tres veces más en ambos grupos comparados con ratas vírgenes y la leptina fue más alta en R vs C, sin embargo la ingesta de alimento no mostró diferencias entre grupos a esta edad. Las desaturasas y elongasas tuvieron menor expresión en R comparadas con C. En la lactancia la leptina fue más alta que en la gestación en ambos grupos y a partir de 9 dL se observó menor ingesta en R. Los cambios en la ingesta de alimento durante la lactancia, sin relación con la leptina, nos muestra que los procesos de regulación de apetito probablemente tengan mecanismos alternos que intervengan con la secreción de la hormona a la circulación materna. El desarrollo mamario fue menor en R a 7 y 14 dL lo que afectó la composición de leche a 14 y 21 dL esto sugiere que la restricción proteínica en algún periodo del desarrollo juega un papel importante en el establecimiento de la GM, afectando la producción de leche, ya que a 13 y 20 dL la madre R produce menos, lo que repercute en la cría ya que esta consume menos componentes grasos y menos AA y DHA, por lo que esto afecta la ganancia de peso de la cría y el de sus órganos ya que las crías provenientes de madres R tuvieron menor peso tanto corporal como del hígado y cerebro. **Conclusión:** los siguientes resultados sugieren, que la restricción proteínica, afecta la biosíntesis de los ácidos grasos maternos, el desarrollo y función mamaria, esto afectó el peso corporal y el contenido AA y DHA en el cerebro de los fetos de 19 dG, los cuales son responsables de la maduración y desarrollo final del sistema neurológico y corporal de la cría. La menor ganancia de peso persistió aun hasta el día final de la lactancia, lo cual indica que una menor suplementación de AA y DHA en la leche materna por la restricción proteínica, afecta la ganancia de peso de la cría, debido a la menor producción materna, pero también por su menor consumo por parte de la cría, lo que probablemente tenga injerencia en los mecanismos de aprendizaje y respuesta temprana de las mismas.

# ABSTRACT



## 2. ABSTRACT

**Introduction:** "The hypothesis of developmental origins of health and disease" proposes that fetal malnutrition triggers endocrine adaptations that change the morphology, physiology and metabolism. Thus the mother must be nurtured to provide the necessary elements to their fetus through the placenta or to their baby through breast milk. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LC-PUFAs) like arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) are needed to finish the baby development and organ maturation. These are synthesized by desaturases ( $\Delta 5D$  and  $\Delta 6D$ ) and elongases (ELOVL 2 and 5) in liver and lactating mammary gland (MG). Furthermore, food intake and energy expenditure of the mother is regulated by leptin, which is positively related to the mother's fatty deposits. **Objective:** We evaluated the effect of low protein diet during pregnancy and lactation, in the synthesis of enzymes that produce LC-PUFAs in the liver and lactating MG and analyzed the milk biochemical production and composition, finally we determined development parameters in the offspring. **Methods:** Wistar rats were fed isocaloric diets with normal protein content (C) 20% casein or restricted (R) 10% casein. The experimental groups were control (C) during gestation and lactation and restricted (R) in both periods. Maternal milk production was measure at 6, 13 and 20 days of lactation (dL). In other hand, at 19 days of gestation (dG) and 7, 14 and 21 dL the maternal liver, MG and milk only during lactation was obtained to analyze total fat and percentage of LC-PUFAs by gas chromatography. RT-PCR was used to measure  $\Delta 5D$ ,  $\Delta 6D$  and ELOVL 2 and 5, and confirmed by Western Blot. The morphometric analysis in MG was evaluated by H&E staining and counted by Leica Q500W software. Biochemical parameters in serum were determined by enzymatic method and insulin and leptin by RIA. At 19 dG fetuses were weighted and liver and brain were obtained to determine total fat. At 7, 14 and 21 dL, pups, liver and brain were weighted. The result was expressed by mean  $\pm$  SEM, "t" Students, \* $p \leq 0.05$  vs C **Results:** The maternal weight did not change during pregnancy. However, at 19 dG the composition of AA and DHA in liver and MG decreased in R vs C, the MG differentiation were lower in R group at 19 dG comparison with C. During pregnancy triacylglycerol increased three times in both groups compared with virgin rats, and leptin was increased in R group vs C not having correlation with food intake because between groups they were not different. The desaturase and elongase had lower expression in R compared with C. In lactation period leptin was higher than gestation in both groups and from 9 dL was observed in R group lower intake, this changes in food intake during lactation, unrelated to leptin, showed that the appetite regulation processes had alternative mechanisms were probably involved in the secretion of the hormone into the maternal circulation. MG development were lower in R group at 7 and 14 dL suggesting that the protein restriction in some period of development, plays an important role in the establishment of MG, this negative effect alters the composition of milk and correlated with milk production, because at 13 and 20 dL R mother produces less milk. This deleterious condition affects pups fatty acid intake and AA and DHA intake, having negative consequences in gain weight and also liver and brain weight in pups from R mothers. **Conclusion:** These results suggest that protein restriction affects the maternal fatty acid biosynthesis and mammary gland development and function, this negatively condition alters the fetus weight and the content of AA and DHA in fetus brain at 19 dG. The lower weight gain persisted even until the end of lactation, indicating that lower AA and DHA supplementation on breast milk from maternal protein restriction affects weight gain of offspring, due to reduced maternal production but also for their lower consumption by breeding, which probably have interference in the mechanisms of learning and early response from them.

# INTRODUCCIÓN



### 3. INTRODUCCIÓN

Una adecuada y correcta alimentación es fundamental en todos los momentos biológicos del ser humano, sin embargo, adquiere singular importancia en el embarazo (1) y la lactancia, debido a la formación y desarrollo de un nuevo ser, el crecimiento y maduración del crío está determinado por la conducta nutricional materna y el adecuado aporte de estos componentes (2, 3). Desafortunadamente los trastornos nutricionales son muy comunes durante este periodo de la vida, ya que la mujer cubre antojos y no necesidades nutricias, de tal forma que en algunos casos, no puede satisfacer los requerimientos nutricionales necesarios para esta etapa y llega a ser tan comprometedor cualquiera de estos trastornos alimenticios en estos momentos, porque no sólo tiene consecuencias en la madre, sino porque repercute directamente en los mecanismos de división y proliferación celular del embrión en desarrollo que darán origen a los órganos y sistemas del nuevo individuo (4); por lo tanto, condiciones ambientales desfavorables durante este periodo del desarrollo, predispondrán a la progenie a desarrollar enfermedades en la vida adulta principalmente vinculadas con el síndrome metabólico, resistencia a la insulina, metabolismo de glucosa, obesidad, hipertensión y daño vascular (3, 5, 6).

La evidencia científica en animales de experimentación durante el desarrollo, ha comprobado que la adaptación y diferenciación de órganos maternos, como la placenta y glándula mamaria (GM) es crucial, ya que por medio de ellos el aporte de nutrimentos al crío se ve eficiente o negada (7), ejemplo de ello es cuando la madre consume bajas concentraciones de ácidos grasos poli insaturados (AGPIs), su transporte y biosíntesis a AGPIs de cadena larga (AGPIs-CL), se ve afectada, por tanto, esto provoca estrés y ansiedad en la madre durante la gestación (8) y en el caso de su crío en los primeros días de vida extrauterina desarrollará retinitis pigmentosa (9), dermatitis atópica (10, 11) y en la vida adulta, enfermedad de Alzheimer, Parkinson (12, 13), cáncer (14), diabetes (10, 15), problemas cardiovasculares (16), trastornos hiperactivos y esquizofrenia, entre otras enfermedades (16-19).

Esta información nos permite establecer que la cantidad y la calidad de los AGPIs que ingerimos a diario juegan un papel importante en nuestro organismo, sin embargo, durante el desarrollo se ha probado tanto en niños como en roedores lactantes que el sistema metabólico es todavía inmaduro, por lo que la ingesta de estos componentes a partir de suplementación o dieta no es posible, por ello, la madre es la única fuente de administración de estos compuestos al crío a partir de la leche, su presencia en el organismo permite al producto el desarrollo de la habilidad para aprender,

comunicarse, pensar analíticamente, socializarse efectivamente y adaptarse a nuevos ambientes y personas (4, 13).

### 3.1 Programación del Desarrollo

Investigaciones científicas tanto en humanos como en animales de experimentación, han demostrado que la salud está íntimamente relacionada con la calidad de vida en las primeras etapas del crecimiento. El ambiente perinatal subóptimo puede programar la predisposición para el desarrollo de enfermedades crónicas, incluyendo la alteración del metabolismo de carbohidratos y de lípidos (20-24). Esto se fundamentaba en algunos estudios que se centraban en asociar determinados patrones de crecimiento intrauterino a enfermedades específicas del adulto (25). Así, la combinación de una placenta grande y un recién nacido pequeño (26, 27) son marcadores de riesgo de hipertensión, mientras que el bajo peso al nacimiento es un predictor más potente de resistencia a la insulina (28, 29). La idea de que la nutrición fetal podía tener efectos a largo plazo inquietaba al ambiente científico, por lo que surgen los primeros estudios clásicos de Widdowson y McCance en diferentes modelos animales, los cuales mostraron que aquellos que tenían bajo peso al nacimiento, no llegaban a alcanzar el tamaño de sus congéneres nacidos con peso normal, incluso ni al llegar a la madurez (30, 31), la disminución en el número de células de algunos órganos, sería la explicación de este fenómeno.

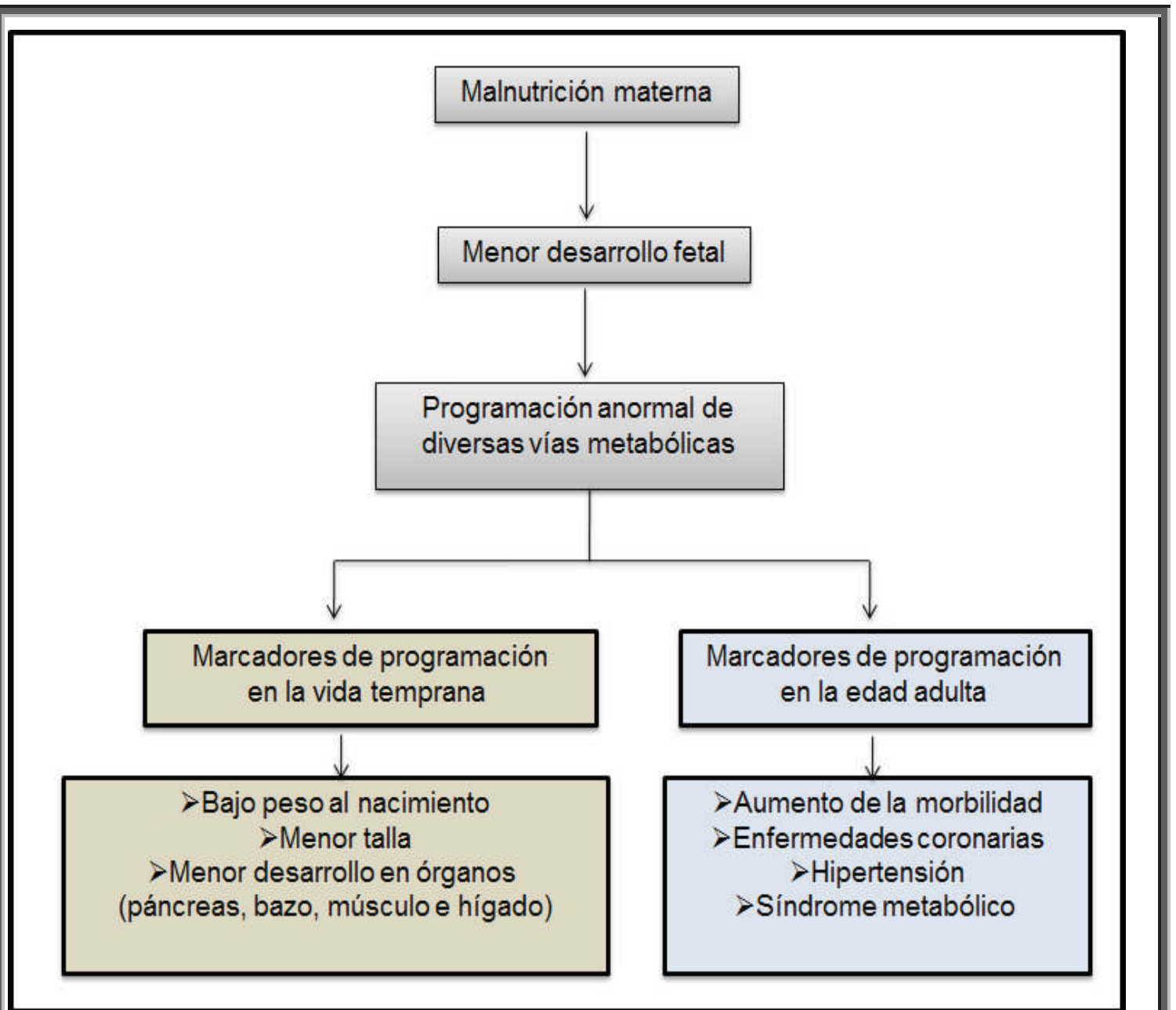
Otras aportaciones llevadas a cabo respecto a este fenómeno, fueron basadas en observaciones epidemiológicas, realizadas por la aparición de obesidad y problemas metabólicos, principalmente relacionados con diabetes mellitus e hipertensión en individuos concebidos durante el *Invierno de hambre Holandés*, tal como se le conoce al periodo de hambruna ocurrido durante la ocupación alemana de los países bajos durante la Segunda Guerra Mundial, de noviembre de 1944 a mayo de 1945. Durante estos seis meses, las raciones de alimento se redujeron de 1800 Kcal/día a 600 Kcal/día y posteriormente al terminar la invasión, aumentaron a 1700 Kcal/día; asombrosamente el peso de estos sujetos restringidos no pareció afectado por dicho “reto” en su desarrollo, por la etapa de exposición a esta grave situación, en especial de los dos primeros trimestres de la gestación, si no que fue hasta la adultez temprana, donde se encontró una clara relación con el peso de estos individuos y la nutrición deficiente durante los primeros meses del embarazo, ya que ellos presentaron un riesgo dos veces mayor de sufrir problemas metabólicos en la vida adulta (32). Esta información, no quedaba clara en ese momento y fue hasta 1986 cuando el Dr. David Barker de la Universidad de Southampton, Inglaterra, propuso la idea de una correlación entre el bajo peso al



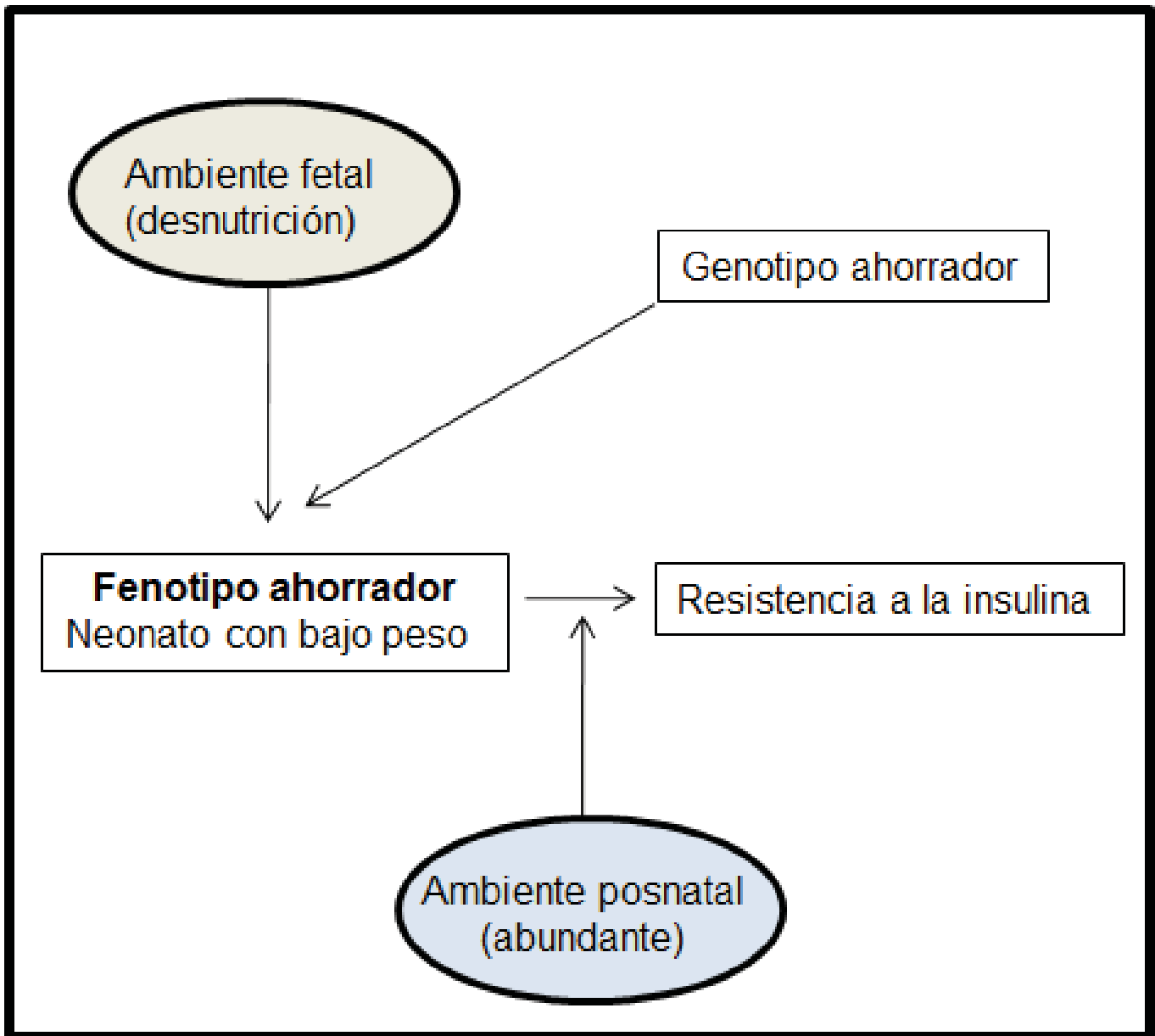
nacimiento y el riesgo a enfermedades coronarias en la vida adulta (33). Este fue el inicio de varios estudios epidemiológicos y con modelos animales, encaminados a identificar la relación que existe entre la talla y peso del neonato con la hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, obesidad, dislipidemias e intolerancia a la glucosa (34-36). Entonces surge el término: “hipótesis en los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD)”, por sus siglas en inglés, antes conocido como “programación del desarrollo”, que propone que la fisiología y el metabolismo fetal y neonatal pueden ser alterados por cambios durante una ventana de tiempo crítica del desarrollo, como la gestación y la lactancia. Estas alteraciones generan una respuesta fisiológica permanente en el feto que se asocia con el desarrollo de enfermedades en el adulto (5, 37, 38).

El feto metabólicamente programado presenta modificaciones permanentes en la estructura y fisiología de órganos, así como alteraciones en la expresión de genes involucrados en su propio metabolismo, por lo que el fenotipo del adulto es la suma de los factores genéticos, así como de la influencia del ambiente fetal y posnatal (39) (Figura 1). Más adelante Hales y cols. relacionaron que la pobreza y desnutrición aumenta la morbilidad y mortalidad infantil. Debido a que el medio ambiente en el cual un niño crece puede tener efectos a largo plazo sobre su salud. Esta aseveración se basó en observaciones realizadas en el Reino Unido y en Suecia en 1934, donde encontraron que la tasa de mortalidad se veía incrementada en un grupo específico de edad, por lo que analizaron la fecha de nacimiento de estos individuos y el día de defunción, así como, las causas de su muerte las cuales eran por isquemia del corazón. Esta hipótesis, que podía ser explicada por una relación entre una pobre nutrición en el período fetal y posnatal temprano y la presencia posterior de enfermedad cardiovascular, fue apoyada por un estudio en hombres de Inglaterra de 64 años de quienes se tenía su historia de peso al nacer y a quienes se les practicó una prueba de tolerancia a la glucosa posteriormente. Este experimento permitió concluir que existía una relación inversa entre la presencia de intolerancia a la glucosa o diabetes y el bajo peso al nacer, relación que se mantuvo a lo largo de todos los pesos obtenidos al nacimiento ya que se notó que los individuos que nacieron con peso menor a (<2.5 Kg) tenían siete veces más probabilidad de sufrir intolerancia a la glucosa o diabetes que aquellos con peso mayor a (>4.5 Kg). Una relación mucho más estrecha se encontró con los individuos de bajo peso al nacer y la presencia de síndrome metabólico (intolerancia a la glucosa, hipertensión e hipertrigliceridemia). Estos individuos tuvieron 18 veces más probabilidades de sufrir síndrome metabólico que los que tuvieron mayor peso al nacimiento (40). Lo anterior entonces dio lugar a proponer una nueva teoría conocida como genotipo-fenotipo ahorrador: la cual propone que una deficiente nutrición fetal puede alterar el

desarrollo de diferentes tejidos, entre ellos, el páncreas y que frente a un ambiente de abundancia en la vida adulta, darán lugar a la aparición de intolerancia a la glucosa, así como problemas metabólicos (41-43) (Figura 2). De esta manera se refuerza la idea de que los problemas metabólicos que se padecen en la vida adulta, están fuertemente vinculados desde la vida temprana, esto por un ambiente de privación nutricional o lo contrario un exceso de ellos. Estos hallazgos han sido reproducidos en otras poblaciones a lo largo del mundo y en diferentes grupos étnicos y se da como hecho que esta relación existe; sin embargo, las bases moleculares son desconocidas y los papeles relativos que juegan los genes y los factores ambientales son muy debatidos, sin embargo, hasta el momento podemos concluir que los orígenes de las enfermedades crónicas no está estrictamente limitada por los genes heredados y/o la vida sedentaria si no por las experiencias nutricionales durante la vida temprana las cuales pueden contribuir a la programación metabólica, conduciendo a enfermedades en la vida adulta. El surgimiento de este nuevo campo de la programación del desarrollo ofrece, por lo tanto, una ruta adicional para explicar la etiología de las enfermedades crónicas de aparición en la edad adulta y nos permite seguir investigando en un campo más específico las causas y raíces de estas enfermedades.



**Figura 1. Hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad:** la malnutrición materna durante la gestación produce una agresión *in utero* que altera la nutrición normal y el desarrollo fetal.



**Figura 2. Hipótesis del fenotipo ahorrador:** la deficiente nutrición fetal puede alterar el desarrollo de diferentes tejidos fetales, que si persiste en la vida posnatal va a favorecer al desarrollo de problemas metabólicos.

### 3.2 Gestación

El embarazo representa el período más intenso de crecimiento y desarrollo; en el humano dura aproximadamente de 38 a 42 semanas, mientras que en las ratas sólo 21 días. En este periodo, en la madre se presentan cambios de manera muy drástica como el incremento en el volumen sanguíneo, resistencia a la insulina con aumento en la concentración de glucosa, crecimiento de

órganos y tejidos (44, 45). En el humano, el sistema respiratorio amplía su flujo de aire inhalando y exhalando de un 30 a 40% más de lo normal y el sistema circulatorio sube su gasto cardiaco debido a la elevación de la frecuencia cardiaca (46, 47). La forma en que se presentan estas adaptaciones al organismo, dependen de muchos factores que ocurren en condiciones normales durante el embarazo. Sin embargo, existen otros cambios como los metabólicos, que están íntimamente relacionados con la conducta nutricia que adopte la madre durante la gestación (48). En modelos animales como el de la rata y en algunos casos en humanos, se han probado estos cambios metabólicos los cuales son: a) el contenido de agua corporal, el cual en el humano pasa de 7 a 10 litros y en la rata se sabe que al llegar al día 13 de gestación incrementa su ingesta y retención en líquidos, esto con el fin de acumular minerales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  que deberá transferir al producto, el cual los incorpora rápidamente al organismo (47, 49); b) los cambios hormonales que son producidos por la placenta para sintetizar hormonas esteroides, como la progesterona y estrógenos que promueven la acumulación de lípidos (50, 51); c) el ajuste del metabolismo de carbohidratos, ya que se requiere glucosa para generar energía, lo cual permite el desarrollo del feto (52); d) el aporte de proteínas, el cual debe ser alto, ya que juega un papel importante en la síntesis de nuevos tejidos maternos y fetales (48); e) los cambios en el metabolismo de lípidos, estos promueven la acumulación de grasa en la primera mitad del embarazo, con el fin de tener depósitos suficientes que solventarán los últimos meses de la gestación (10), también hay incremento en las concentraciones de colesterol y en las lipoproteínas de baja (LDL) y alta (HDL) densidad en sangre, pero son los triacilglicéridos los que al final de la gestación, tanto en ratas (45) como en humanos (53, 54), se ha visto que aumentan hasta tres veces más las concentraciones de estos en comparación con las no embarazadas (10). Este aumento de grasa corporal juega un papel importante en la adaptación metabólica (55), ya que cuando existen condiciones adversas como la desnutrición, la madre responde, disminuyendo dramáticamente su gasto energético para mantener el aporte de nutrimentos al feto (56). Durante la última etapa de la gestación el metabolismo materno de lípidos cambia a un proceso catabólico, acelerándose la movilización de ácidos grasos, por lo que la madre depende de sus depósitos de grasa para obtener energía, a medida que avanza el embarazo el aumento de las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (AG) circulantes e incremento en lipoproteínas, triacilglicéridos, fosfolípidos y colesterol, reflejan que hay aumento en la lipólisis (57, 58), lo cual nos indica que hay una transferencia intensa de AG unidos a lipoproteínas a través del sinciotrofoblasto en la placenta humana al feto (59). En ratas la transferencia de estos componentes grasos ocurre desde el día 15 al 20 de gestación donde el crecimiento del feto es acelerado por lo que la demanda de grasas se vuelve indispensable para el

feto ya que lo necesitará en los primeros días de vida extrauterina (60). Estudios en ratas y en ovejas han demostrado que la glucosa es el sustrato que cruza la placenta en mayor cantidad seguida de los aminoácidos (1, 50, 52) y los AG, lo hacen en menor proporción, sin embargo, cabe mencionar que no por ser la menor proporción dejan de ser importantes, ya que dentro de esta fracción existen los AGPIs como el ácido linoleico conocido como omega 6 ( $\omega 6$ ) (AL; 18:2n-6) y el ácido alfa-linolénico conocido como omega 3 ( $\omega 3$ ) ( $\alpha$ -ALN; 18:3n-3) y los AGPIs-CL como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (AA), los cuales son de suma importancia para las membranas celulares de todos los órganos, pero también, son elementos indispensables que permiten la formación y maduración del cerebro y del sistema inmunológico, esto por mencionar unas de las tantas funciones de estos componentes en el feto. Los humanos y las ratas nacen con alto contenido de grasa, debido a que durante los primeros meses de la gestación los AG son obtenidos por el aporte placentario materno, pero en la gestación tardía aparte de ser obtenidos por la madre, son obtenidos también de la síntesis de *novo*, en el tejido adiposo fetal, por esta razón es que su concentración aumenta en el recién nacido, pero este aumento es necesario, ya que al final de la gestación, el feto crece aceleradamente y por tanto requiere suficiente energía para completar diversos procesos del desarrollo y para solventar los primeros días de vida posnatal (50, 61).

### **3.2.1 Desarrollo y crecimiento fetal.**

El desarrollo fetal se caracteriza por una secuencia de patrones de crecimiento y maduración de tejidos, los cuales son dependientes del equilibrio y la interrelación entre constituyentes maternos, placentarios y fetales, los cuales están determinados por el control genético y factores ambientales. Es el caso de la oferta de sustratos nutritivos de la madre al feto que no sólo depende de la ingesta materna sino también de la concentración de estos componentes en la sangre, adecuado flujo sanguíneo y la regulación hormonal materna, estos mecanismos adecuadamente orquestados permitirán el transporte útero-placentario y favorecerán la diferenciación y maduración celular del individuo. Cuando las circunstancias son óptimas, ninguno de estos factores tiene un efecto limitante en el crecimiento y desarrollo fetal. Sin embargo esto no siempre se da (62, 63), en modelos experimentales como la rata, se probó que la restricción proteínica al 8% aumentaba el espacio intravelloso en la placenta y disminuía el tamaño de los vellos, lo cual generaba dificultad en el transporte de nutrimentos y afectaba el peso al nacimiento en el crío (64).

Se estima que aproximadamente el 40% de la variación total del peso al nacer se debe al control genético y el 60% restante a los factores ambientales, entre los que se encuentra la nutrición fetal. El periodo más rápido de crecimiento fetal se da entre las semanas 12 y 36 de gestación y entre la 32 y 36 el rango de aumento de peso es de 200-223 gramos/semana (65, 66), en la última semana el feto gana 85% de peso más respecto al que ha estado ganando día con día. En la rata el desarrollo acelerado se da desde el día 15 al 20 de gestación y entre el día 18 a 21 existe un aumento de hasta una cuarta parte más del peso que ha estado ganando durante toda la gestación (3, 60). El crecimiento fetal es diferente durante la etapa temprana que durante la última etapa de la vida fetal. En la etapa temprana el crecimiento de las células de los tejidos y los órganos pasan por la fase de hiperplasia (aumento en el número de células). En el periodo tardío el desarrollo de las células pasan por la fase hipertrófica (aumento del tamaño celular) (31) y en el caso del músculo y cerebro (especialmente en el cerebelo), la fase del crecimiento puede continuar hasta el segundo año de vida en el caso del humano (31, 62, 64) y en la rata en las primeras dos semanas de lactancia (67, 68). Desde el punto de vista nutricional la dependencia del feto hacia el organismo materno es total. Todos los nutrientes que recibe el feto, le son transferidos de la madre a través de la placenta, esto mismo ocurre en todas las demás especies mamíferas (64). El feto adquiere diversos nutrientes a través de la placenta los cuales obtiene por diversos mecanismos de transporte (69). El feto puede desnutrirse o sobre nutrirse, dependiendo de la extracción y la composición de estos en el cordón umbilical, del flujo y la calidad de los alimentos extraídos (70-72). El feto necesita del sustento materno para tener una fuente de energía oxidable y así llenar los requerimientos energéticos necesarios para sobrevivir, también necesita carbono y nitrógeno para llevar a cabo el crecimiento fetal. Los substratos utilizados por el feto para llenar estos requerimientos incluyen carbohidratos (principalmente glucosa y lactato), aminoácidos y lípidos, dentro de los cuales el aporte de los AGPIs es esencial, ya que el feto no puede construirlos, ni tampoco adquirirlos por otra vía que no sea la madre y la madre tampoco puede sintetizarlos *de novo* si no los adquiere a partir de su dieta (73). En el humano un mínimo de 200 a 300 mg de AGPIs por día son suficientes para poder desaturar y elongar en el hígado (74) y formar AGPIs-CL, los cuales son transportados a la placenta para que lleguen específicamente al feto. Esta información ha sido demostrada también en ratas (75, 76).

### **3.2.2 Evidencia experimental y epidemiológica del estado nutricional durante la gestación**

Se ha demostrado en ratas que una dieta restringida y en especial en proteínas, durante el embarazo causa disminución del peso al nacimiento y en la edad adulta, hipertensión e intolerancia a la glucosa (7, 20, 77-79). Algunos órganos en estos animales (páncreas, bazo, músculo e hígado) presentan menor tamaño, mientras que el cerebro y los pulmones mantienen crecimiento normal (80). Contrario a esto son los reportes de Bennis-Taleb y cols. donde la restricción proteínica en ratas si generaba alteraciones en la vascularización cerebral y daño a los vasos sanguíneos de la corteza (67). Otros estudios han demostrado que la restricción proteínica en ratas gestantes no modifica la composición de la carcasa en las crías, el peso del hígado y cerebro a los 20 días de gestación (81). Sin embargo, en ovejas se observó que la restricción proteínica durante la gestación temprana incrementa el flujo sanguíneo materno, lo cual genera hipoxia en el feto (68).

Los datos en humanos apoyan la teoría de que la malnutrición materna, la disminución en la ingestión de calorías o la deficiencia en la capacidad de absorción, son factores que influyen en la programación y que causan retraso en el crecimiento fetal (80). Por otro lado se ha observado que dependiendo del estadio en el que se produzca la malnutrición, de su duración e intensidad, ésta puede afectar la síntesis de hormonas y la sensibilidad del organismo a ellas (71, 82). También se pueden producir defectos persistentes, como la reducción en el número de células de los tejidos y la modificación en la estructura de los órganos (25). Estos hallazgos han demostrado que cada órgano y tejido tienen un periodo crítico o sensible, de mayor replicación celular, durante el cual se verá más afectado (38), ejemplo de ello es, la embriogénesis temprana. El crecimiento embrionario y trofoblástico es influenciado por la concentración de nutrientes, el embrión es selectivo en el uso de nutrientes y antes de la fase de mórula este se nutre de piruvato, lactato y aminoácidos y no de glucosa, por lo que la hiperglucemia a principios del embarazo retrasa el crecimiento embrionario y puede estar implicado en el desarrollo de malformaciones, contrastado con la hipoglucemia donde también puede retrasar el crecimiento y desarrollo del embrión, de esta manera la hiperglucemia o hipoglucemia en la embriogénesis temprana pueden asociarse al bajo peso al nacer (31, 41, 82, 83). Otro ejemplo es a la mitad del embarazo, donde el crecimiento de la placenta es más rápido con respecto al feto, un bajo depósito de nutrientes por parte de la madre, genera hipertrofia placentaria, la cual ocurre como un mecanismo de adaptación para mantener el aporte de nutrientes al feto y disminuir en lo posible daños al mismo (31, 84). Al final del embarazo el efecto de la desnutrición materna es inmediato: el crecimiento fetal se vuelve lento, cuando debía ser acelerado por encontrarse al final del desarrollo, por tanto, el desarrollo fetal es sacrificado para favorecer la función placentaria, el oxígeno, la glucosa y aminoácidos son redistribuidos, la placenta reduce su consumo de oxígeno y glucosa y al mismo tiempo le da un aporte alto de lactato al feto,



este lactato proviene en su mayoría de los aminoácidos fetales. Este catabolismo fetal puede producir un importante desgaste y reducir el peso al nacer (82).

La evidencia experimental demuestra qué graves son los resultados que se presentan en el desarrollo y maduración del feto debido a una alimentación inadecuada, sin embargo las costumbres sociales y culturales de los diferentes países, también han orillado a este problema en el crecimiento fetal, ya que en las diferentes comunidades del mundo, se tienen costumbres alimenticias que afectan al establecimiento, desarrollo y maduración del mismo, es el caso de la sociedad americana la cual tiene bajo consumo de productos marinos con respecto a la asiática, esto repercute en el consumo de AGPIs y sus derivados los AGPIs-CL (AA y DHA), los cuales se sabe que son componentes estructurales de las membranas celulares y por tanto esenciales para la formación de nuevos tejidos como ocurre durante la gestación (1). Tanto en roedores como en humanos el sistema nervioso central es particularmente rico en DHA y AA (74). En roedores, el cerebro tiene un pico de crecimiento al final de la gestación y culmina su maduración durante la lactancia, en humanos esto se da en el último trimestre del embarazo y al principio de la lactancia, por lo que un adecuado suministro de estos AGPIs-CL se considera esencial para el funcionamiento neurológico, mejora de las funciones cognitivas y de atención, así como desarrollo de la habilidad motora, lo cual facilita el aprendizaje y el buen comportamiento (85). Esto ha sido demostrado en roedores y primates principalmente, donde daños en este establecimiento se ha visto que afecta en la velocidad de respuesta de estos animales y en el desarrollo de habilidades motoras (86-88). Estudios poblacionales indican que la falta de atención y el poco aprendizaje de los niños prescolares son el resultado del carente consumo de estos productos y a las malas costumbres sociales que se tienen para llevar a cabo una adecuada gestación (89).

### **3.2.3 Aporte de los AGPIs-CL durante la gestación**

Las recomendaciones para el consumo de estos compuestos de manera habitual fue establecido por la agencia nacional de salud en Estados Unidos, donde se menciona, que su ingesta debe de ser en una proporción 1:4 con la relación  $\omega 6/\omega 3$  si existiera un mayor consumo de  $\omega 3$  se establece competencia para la formación de los productos provenientes del  $\omega 6$  y como resultado un desbalance en las proporciones adecuadas de cada compuesto (90). En el caso del embarazo, la DRIs, (por sus siglas en inglés DRIs Dietary Reference Intakes) establece que, durante el segundo y tercer trimestre de la gestación la mujer entre 19 y 24 años debe consumir un mínimo de 1.36 g/d de

$\omega$ 3 y las mujeres de 25 a 49 años 1.26 g/d de  $\omega$ 3 respectivamente, mientras que para  $\omega$ 6 lo establecido por día es de 1.4 g/d para compensar el requerimiento fetal (8, 91).

En el modelo de la rata se ha estudiado el metabolismo de los AGPIs marcando con  $^{14}\text{C}$  compuestos como ácido linolénico y ácido linoleico, estos estudios han demostrado, que una vez que han sido ingeridos los compuestos, comienza el proceso de conversión a partir de la actividad enzimática de las desaturasas ( $\Delta$ 6D,  $\Delta$ 5D) y elongasas (ELOVL 2 y 5) (92). Ubicadas en el retículo endoplásmico de los hepatocitos en el hígado, estas enzimas, forman AGPIs-CL biológicamente activos los cuales durante la gestación y lactancia la madre transfiere al feto, para que, los incorpore rápidamente a los fosfolípidos que forman parte de las membranas de los diversos tejidos y órganos. Durante el desarrollo fetal, se demostró en ratas que los AGPIs-CL atraviesan la placenta de forma selectiva, ya que se observó que el AA y el DHA pasan directamente a través de la placenta por un compartimento materno específico hacia el feto, este mecanismo se conoce como enriquecimiento de AGPIs-CL durante la vida intrauterina o "Proceso de Biomagnificación" (1, 10, 74, 93). Esto ocurre durante el tercer trimestre de la gestación en humanos cuando la demanda fetal para el crecimiento neuronal y vascular es mayor, pero en los roedores este abastecimiento comienza desde la segunda etapa de la gestación y culmina en la lactancia. Otros estudios en roedores han demostrado que la placenta selecciona AA y DHA a expensas del AL,  $\alpha$ -ALN y ácido eicosapentaenoico (EPA), para mantener proporciones considerablemente elevadas de AA y DHA en la circulación fetal a la mitad (61, 88) y al final del embarazo (61). En humanos se ha visto que se estimula el desarrollo fetal, ya que niños nacidos prematuramente, presentan peso bajo al nacer y tienen un riesgo alto de trastornos e incapacidades del desarrollo neurológico (53), debido al menor tiempo de exposición a los AGPIs-CL en el feto.

### **3.3 Lactancia**

Para el organismo vivir el proceso de la lactancia sugiere una cascada de cambios a nivel tisular, celular y molecular, los cuales se van presentando desde la gestación y culminan en ella (94, 95). La glándula mamaria, el órgano de mayor importancia en esta etapa, comienza su preparación, proliferación, división celular y diferenciación lóbulo alveolar durante la gestación (96). Los cambios fisiológicos y bioquímicos que se adaptan en este momento dependen del ambiente nutricional y hormonal adecuado para el establecimiento de la misma, pero con mayor importancia, es el ambiente metabólico, donde el tejido adiposo es uno de los órganos con mayor participación en el progreso de esta, ya que este moviliza todas sus reservas energéticas provenientes de la dieta,

para preparar el ambiente necesario que requiere el desarrollo mamario. El éxito que se tenga en la formación y maduración de la glándula mamaria influirá en el número y actividad de las células mamarias, repercutiendo así en la producción de leche (97-99). Uno de los factores más importantes que están involucrados en la programación del desarrollo es la adecuada nutrición durante la lactancia. La práctica del amamantamiento se ha visto que disminuye el riesgo a desarrollar obesidad en los niños (100, 101). Muchos factores determinan la composición de la leche materna, estos factores se sabe que también pueden inducir el apetito en el crío y se han querido relacionar con la presencia de leptina en la leche (102) la cual puede o no regular o inducir la ingesta de alimento del lactante. Hasta el momento se encuentran en interrogante los mecanismos de regulación de la conducta del apetito, ya que es complejo establecer si esta regulación se lleva a cabo por la leptina que se ingiere vía leche materna o bien por la secreción de ella por parte del crío a partir de su tejido adiposo. En la actualidad se sabe que para los días 10 a 14 de lactancia existe un incremento en las concentraciones de leptina en el suero de la crías de ratas, este pico se ha relacionado con la maduración de los centros del apetito en el cerebro ya que la rata continua y termina su maduración del cerebro durante este periodo, de manera que la leptina, culmina con los procesos de programación y desarrollo de las función estructural y de los centros orexigénicos y anorexigénicos en el periodo posnatal temprano (3). De todos los componentes de la leche de la rata, la fracción que más varía es la formada por las grasas; los triacilglicéridos son los componentes mayoritarios de la leche, constituyen el 95% del total de lípidos (103) y aportan el 70 % de la energía total (104, 105) principalmente estos son obtenidos de dos fuentes: 1) de la síntesis de ácidos grasos *de novo* en el tejido adiposo y 2) de los ácidos grasos de la circulación (106). La composición de los ácidos grasos de la leche, puede modificarse muy fácilmente debido a tres mecanismos: 1) La intervención nutricional (consumo excesivo o carente en grasas); 2) la modificación en la síntesis de ácidos grasos *de novo* en la glándula mamaria o tejido adiposo y 3); la captación de ácidos grasos por las lipoproteínas en la glándula mamaria (106, 107). Existe una fracción minoritaria de componentes grasos en la leche, la cual está formada por:  $\alpha$ -ALN, AL, AA y DHA (108), esta fracción no por ser de menor concentración, deja de ser importante, esto se debe a que el 100% del  $\alpha$ -ALN y del AL existentes en la leche, provienen de la dieta y el metabolismo materno. Cerca del 95% de estos compuestos son oxidados en las mitocondrias hepáticas para la producción de energía (109), mientras que el otro 5% de  $\alpha$ -ALN y AL es transformado en DHA o AA en el hígado materno y transportado a la glándula mamaria, o bien, son llevados directamente a la glándula mamaria para formar parte de la leche (109, 110). Una vez que estos son ingeridos a través de la leche, estos siguen diferentes rutas, como por ejemplo, el DHA atraviesa la barrera

hematoencefálica y empiezan a depositarse en las membranas de las neuronas, también llega a los bastones de la retina. El AA llega al sistema nervioso central y la retina (89). El transporte del AA hacia la glándula mamaria es unido a fosfolípidos y triacilglicéridos de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) o unido a seroalbúmina, mientras que el DHA no puede ser transportado por las VLDL por lo que en el hígado y en el tejido adiposo, existe un reservorio considerable de DHA lo cual explica por qué en algunas ocasiones la deficiencia de DHA sólo se manifiesta en forma tardía, cuando la dieta es carente en este compuesto y por qué tarda en llegar al niño (111).

### **3.3.1 Evidencia experimental y epidemiológica del estado nutricional durante la lactancia**

La Cumbre Mundial para la Infancia en 1990, la Conferencia Internacional para la Nutrición en 1992 y la Cumbre Mundial para la Alimentación en 1996, acordaron disminuir la malnutrición como parte de una amplia estrategia para eliminar la pobreza a nivel mundial. Sin embargo, en el continente Africano, los porcentajes aun no muestran cambios significativos importantes que indiquen beneficios en la población infantil y el bajo peso y retraso en la talla, en preescolares, sigue siendo un problema de salud a nivel mundial, por lo que la proyección del número absoluto de niños mal nutridos aún está en aumento (112). La mejor manera de medir la salud de una población es conocer cómo crecen y se desarrollan sus niños. Durante los últimos diez años la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estudiado de manera persistente el progreso de los niños de diferentes partes de los continentes, los cuales tuvieron el beneficio de tener condiciones adecuadas sanitarias y una alimentación saludable, con lactancia materna en forma exclusiva durante los primeros meses de vida, estos estudios demostraron, que hay un adecuado peso e ingesta durante los primeros cinco años de vida y el crecimiento y desarrollo es apropiado (113). Estudios demuestran que la práctica de la lactancia, provee a los niños de los nutrimentos suficientes y ayuda en la inmunización para prevenirlos de enfermedades comunes en la niñez, lo contrario se presentó en niños en los que la inadecuada alimentación y la prevalencia e incidencia de enfermedades infecciosas afectaron su desarrollo y madurez, influyendo sobre los factores genéticos de los infantes, convirtiendo la desnutrición infantil en una de las variables más sensibles a las condiciones de vida (82). Por tanto la leche materna es el alimento por excelencia que cubre los requerimientos indispensables, esto asegura que el bebé obtendrá su máximo crecimiento y desarrollo final. Cabe mencionar que la calidad y la cantidad de la leche debe ser la adecuada, de tal forma que la nutrición de la madre debe ser la apropiada, debido a que una mala nutrición podría modificar las proteínas, los carbohidratos, pero con mayores cambios en su concentración serán las grasas,

debido a que el 50% de las calorías totales que aporta la leche provienen de los lípidos encontrados en ella (114). Dentro los componentes grasos de la leche los AGPIs y los AGPIs-CL han mostrado tener funciones relevantes en el desarrollo de órganos y sistemas del neonato (108, 115, 116). El hecho de que los lactantes sean amamantados, ha mostrado tener mejores resultados en las pruebas de evaluación neurológica (116, 117). La principal evidencia para esta afirmación, es el mayor depósito cerebral de DHA encontrado en los lactantes que recibieron leche materna, en relación a los alimentados con fórmulas lácteas que no contienen DHA (118, 119). Algunos otros experimentos, muestran correlación positiva entre la práctica de amamantamiento, el desarrollo corporal y la respuesta cognitiva, indicando que la leche materna contiene componentes biológicos que son benéficos para el niño. Esta correlación se ha atribuido al contenido de AA y al DHA (120), ya que las madres presentaron concentraciones adecuadas de estos, lo cual mejora la visión, el desarrollo neurológico y corporal de los niños, en comparación con los que tuvieron lactancia con fórmulas que no aportaron el contenido adecuado de AA y DHA, ya que son fórmulas fortificadas en AGPIs pero no en AGPIs-CL (121, 122). La nutrición de la madre es crucial en esta etapa debido a que cualquier conducta alimenticia inadecuada puede modificar el contenido de grasas en la leche en especial los AGPIs y AGPIs-CL. Cabe mencionar que la concentración de estos es mínima pero necesaria para el producto, debido a que permite al infante finalizar su desarrollo corporal, establecer los compuestos que regulan la respuesta inmune y los procesos de inflamación, constituir las redes fotosensibles de la visión para afinar su vista, desarrollar y madurar el cerebro (123), lo cual permite llevar a cabo y establecer la neurogénesis, mielinización, arborización dendrítica y neurotransmisión (124-127), activar la región motora neuronal, la cual conducirá al desarrollo del lenguaje, la maduración del aprendizaje, la activación de las funciones motoras y finalmente brindar estructura, permeabilidad, movilidad y comunicación a todas las membranas celulares del cuerpo (2).

### **3.3.2 Aporte de los AGPIs-CL durante la lactancia**

Durante la lactancia en humanos existen tres fases importantes en la producción de leche: calostro, transición y leche madura. Trabajos recientes demuestran que el aporte de los AGPIs-CL en las diferentes etapas de la lactancia es variado (128, 129). Estos estudios señalan, que el AL disminuye durante el calostro en comparación con la leche madura, esto lo relacionan con el contenido de AA en donde encuentran en porcentaje menor durante el calostro con respecto al encontrado en la leche madura, por otro lado el DHA, se encuentra mayor en el calostro en

contraste con la etapa madura (129, 130), estos estudios han permitido establecer cifras en el aporte de los AGPIs y los AGPIs-CL a los bebés durante la lactancia y los beneficios en su desarrollo (129), sin embargo, todavía existe controversia en establecer estos parámetros en las fórmulas y suplementos alimenticios, ya que Cuthbertson y cols. (131) establecieron que el mínimo requerido de AL durante la lactancia debe ser de 0.6% mientras que Crawford y cols. determinaron que debía ser del 1% (132). Hoy en día varios comités de nutrición infantil a nivel mundial han establecido que el mínimo requerido será del 2-3% (2, 133, 134), dejando las cifras de Cuthbertson y Crawford por debajo de lo establecido.

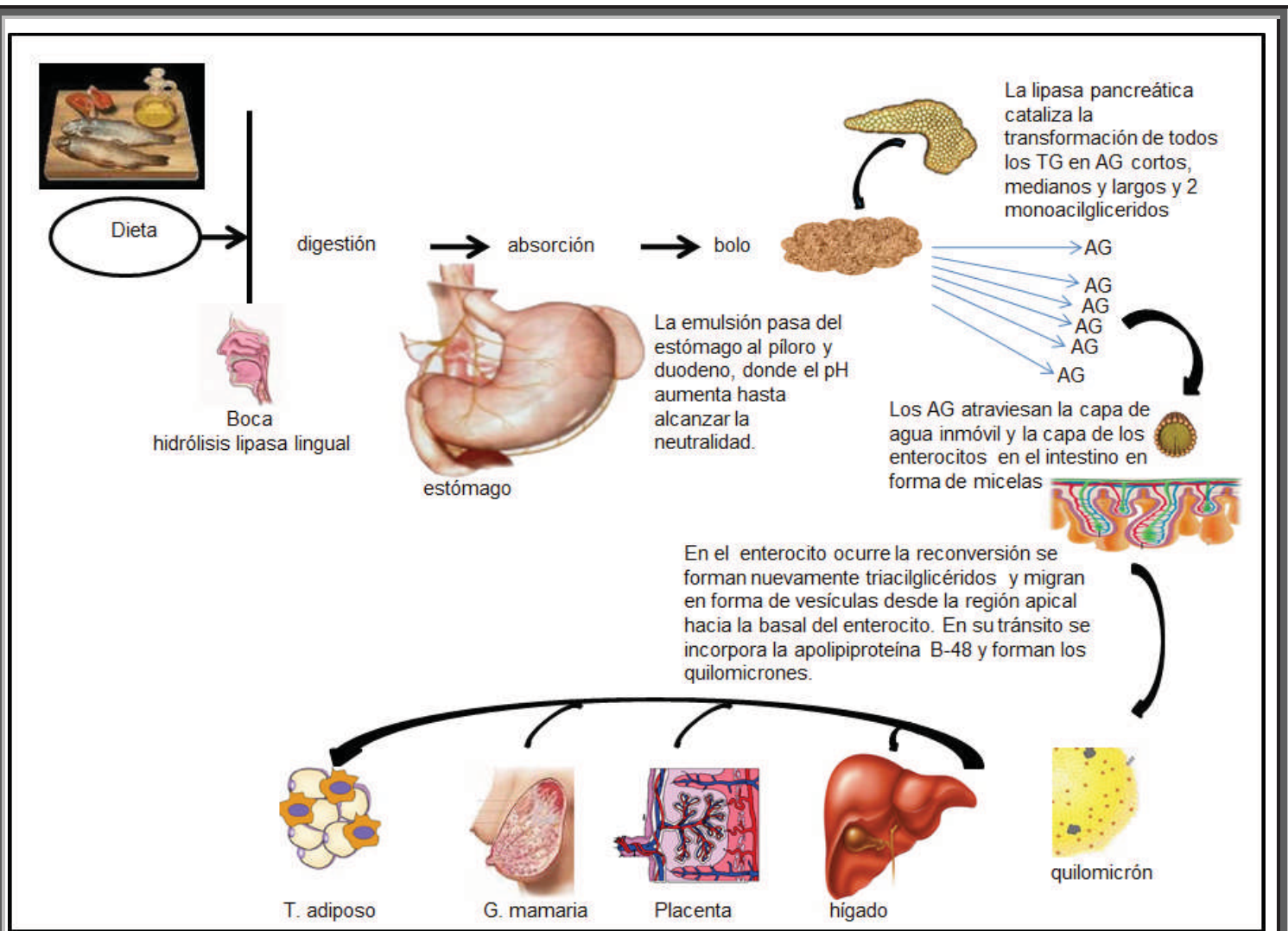
**1) Aporte de AL (18:2 n-6) y  $\alpha$ -ALN (18:3 n-3):** la fuente de obtención de AL (18:2 n-6) u omegas 6, es el consumo de vegetales y semillas como son la soya, el aguacate, el coco, la semilla de girasol, la calabaza, la nuez, el cacahuate. En el caso de la lactancia la madre debe consumirlos para que estos puedan verse reflejados en la leche que aportara a su crío. Para el  $\alpha$ -ALN (18:3 n-3) son los productos marinos como sardina, salmón, trucha, atún, pez bagre, carpa, lucio y algunos mariscos como el camarón, la langosta y la ostra (88, 135, 136) quienes ofrecen el aporte de  $\alpha$ -ALN o mejor conocidos como omega 3. Desafortunadamente, en la mayor parte de América no se tiene el hábito del consumo de productos marinos proveedores de estos ácidos grasos esenciales (137), lo cual dificulta su existencia en la leche materna. Actualmente se ha adoptado un método de suplementación en las madres, con el fin de regular su concentración. A las madres se les administran cápsulas de  $\alpha$ -ALN o alimentos fortificados con  $\alpha$ -ALN, en dosis diarias de 200 a 1300 mg, también se les han ofrecido guías y orientación nutricional durante este periodo, lo que en décadas pasadas no se hacía, esto ha logrado resultados importantes, ya que estos niños, tienen mejores resultados en pruebas conductuales, que aquellos niños que no tuvieron una lactancia suplementada y orientada (115-117, 137-140).

**2) Aporte de AA (20:4 n-6) y DHA (22:6 n-3):** la madre aportará estos compuestos a su bebé obteniéndolos a partir de: **1)** la absorción intestinal de lípidos dietarios, la madre debería de ingerir por lo menos 200 mg/día de DHA para lograr el aporte suficiente al bebé (2) y mantener la relación de ingesta 6:1 con el AA, ya que esto proporcionará al bebé un adecuado suministro de los componentes grasos provenientes de la leche (2, 138), **2)** de la movilización de reservas maternas en el tejido adiposo. En México estudios realizados por Villalpando y cols. mostraron que la mal nutrición observada en comunidades indígenas no permite el aporte de estos componentes debido al bajo reservorio adipocitario, lo cual conlleva al neonato a desarrollar una respuesta cognitiva tardía y problemas cardiovasculares (141) y **3)** de la síntesis endógena en el hígado y la glándula mamaria.

Experimentos en roedores muestran que un déficit o ausencia y en algunos casos sobre expresión de las enzimas formadoras de DHA y AA pueden afectar la concentración de estos componentes en la leche y repercutir directamente en el consumo de la cría (139, 140, 142, 143).

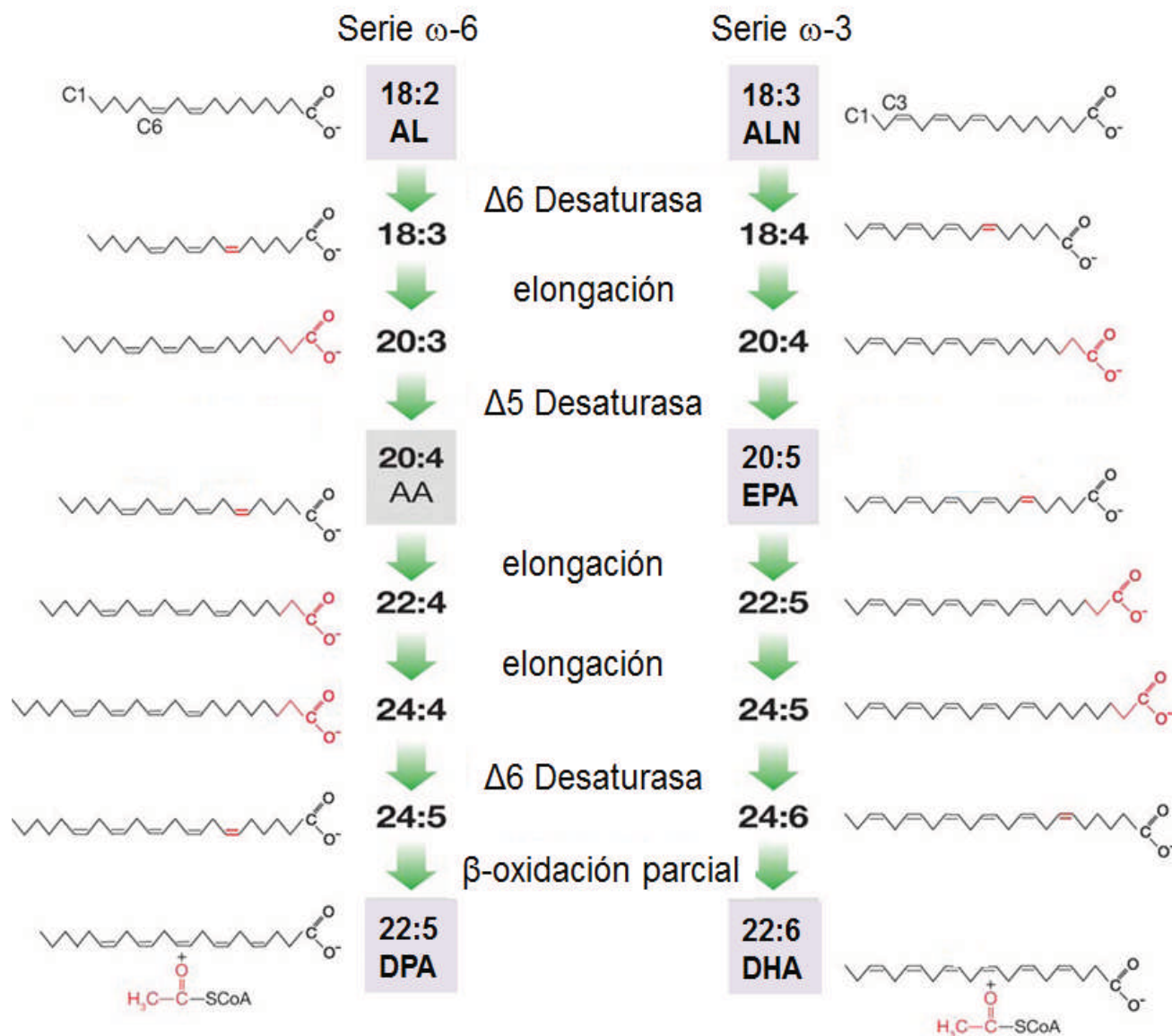
### **3.4 Metabolismo de los AGPIs-CL**

El metabolismo de los ácidos grasos que provienen de la dieta comienza, cuando los ácidos grasos, entran a los enterocitos por medio de una proteína localizada en la pared intestinal que transporta ácidos grasos. Los ácidos grasos con más de 14 carbonos, como es el caso del AL y  $\alpha$ -ALN, se esterifican para formar triacilglicéridos dentro del enterocito y pasan a la circulación sanguínea a través de la vía linfática en forma de quilomicrones. La enzima lipoproteína lipasa (LPL), que se encuentra en la pared interna de los capilares sanguíneos hidroliza los triacilglicéridos en ácidos grasos saturados, mono insaturados o poliinsaturados, es así, como pueden ser transportados a sus diferentes destinos metabólicos como el hígado y el tejido adiposo (10) (Figura 3). Ya en los órganos blanco, a nivel celular se inicia el proceso de desaturación y elongación en el retículo endoplásmico donde por acción de las enzimas desaturasas y elongasas se forman los componentes grasos de cadena larga (AA y DHA) (Figura 4). Estos componentes como ya se ha expuesto extensamente tienen importancia para el feto y neonato ya que finalizan procesos biológicos y permiten la maduración final y el desarrollo del individuo, cabe mencionar que durante la gestación llegan a placenta para ser transportados al feto y durante la lactancia a la glándula mamaria para poder ser parte de la leche (4).



**Figura 3.** Metabolismo de los ácidos grasos esenciales indicando los principales destinos metabólicos.





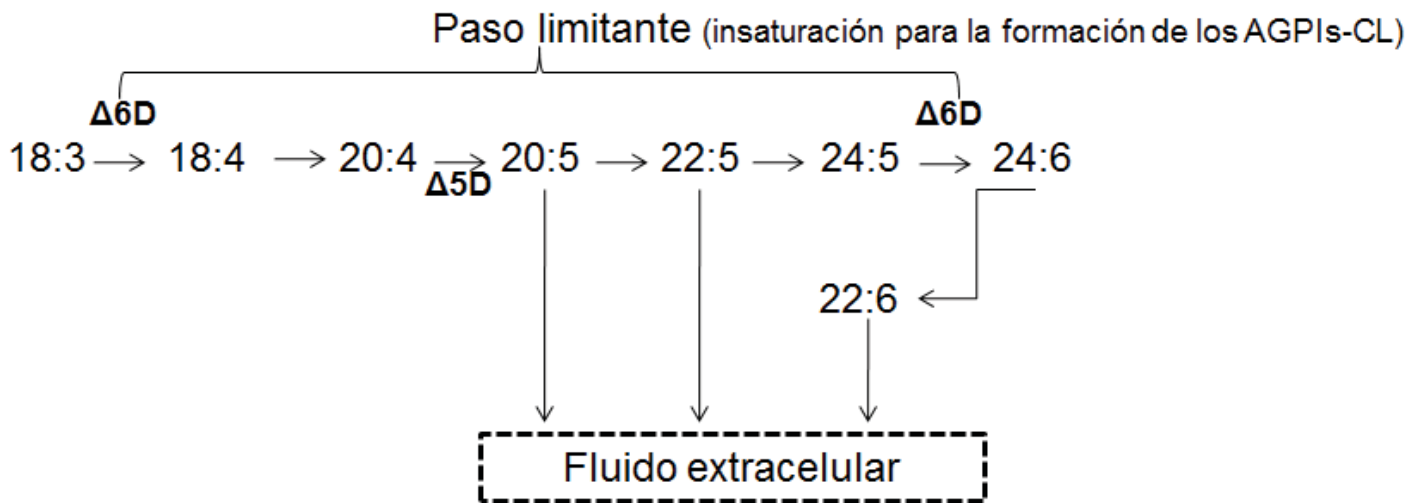
**Figura 4.** Mecanismo de desaturación y elongación de los ácidos grasos esenciales, estos productos han sido clasificados por el número de carbonos y de insaturaciones. C1, C3, C6= posición 1, 3,6 en la cadena hidrocarbonada para numerar la posición de los dobles enlaces. AL, ácido linoleico, ALN, ácido alfa-linolénico, AA, ácido araquidónico, EPA, ácido eicosapentaenoico, DPA, ácido docosapentaenoico, DHA, ácido docosahexaenoico.

### 3.5 Mecanismos moleculares y biosíntesis de las desaturasas y elongasas

#### 3.5.1 Desaturasas

La función molecular de las desaturasas es poner un doble enlace en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos provenientes de la dieta, esta saturación, le confiere al ácido graso ciertas

características específicas que le permiten a la célula realizar funciones de vital importancia. Estas enzimas fueron clonadas en mamíferos y su estructura genómica fue descrita en el año 2000 (144). En este estudio los autores describen minuciosamente los subtipos de la familia de las FADS (Fatty Acid Desaturases) y sus funciones primordiales, actualmente estos subtipos se conocen como la FAD1, FAD2 y FAD3. En el caso de la FADS 1, también llamada  $\Delta 5D$  es una enzima de 444 aminoácidos, localizada como una proteína de membrana en el retículo endoplásmico, se expresa con mayor abundancia en el hígado, cerebro, corazón y glándulas adrenales, su peso molecular es de 52 kDa, su función principal es la de catalizar la reacción de desaturación que se produce entre el ácido dihomolinoleico y el ácido eicosatetraenoico para producir AA y EPA respectivamente (143-146). Durante la lactancia estos componentes son vitales ya que son precursores de eicosanoides y la base de los componentes del inositol. La FADS 2 también conocida como  $\Delta 6D$  es la enzima limitante en la reacción inicial de la desaturación, a este paso se le conoce como el primer paso de insaturación para la formación de los AGPIs-CL (Figura 5). Esta proteína está conformada por 444 aminoácidos, con un peso molecular de 52 kDa, se expresa con mayor abundancia en el hígado, el cerebro, el pulmón, la retina y el corazón (144, 146, 147) y está localizada en la membrana del retículo endoplásmico (147, 148).



**Figura 5.** Reacción de insaturación de la cadena hidrocarbonada del ácido graso por la  $\Delta 6D$  para formar AGPIs-CL.

### 3.5.2 Elongasas

Se conocen hasta el momento 6 isoformas de la familia de las ELOVL (Elongation of very long chain fatty acid-like). Estas enzimas juegan un papel importante en la biosíntesis de los AGPIs-CL y en la formación de los esfingolípidos en tejidos específicos. Las proteínas ELOVL actúan como elongasas, incrementando la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos, al igual que las desaturasas, estas se encuentran en el retículo endoplásmico. La ELOVL 2 es una proteína de 35 KDa expresada en el testículo, el riñón y el hígado. La ELOVL 2 participa en la elongación de los AGPIs-CL de 20 a 22 átomos de carbonos. También se sabe que regula la actividad del receptor activado para la proliferación de peroxisomas (PPAR $\alpha$ ) en la reacción de la oxidación de los ácidos grasos (149, 150), y se ha demostrado que la sobreexpresión de la ELOVL 2 incrementa la síntesis de triacilglicéridos (149). La ELOVL 5 al igual que la ELOVL 2 pesa 35 kDa. Esta proteína se expresa preferentemente en las glándulas adrenales y los testículos, pero también se localiza en el pulmón, el cerebro y la próstata. ELOVL 5 participa en la elongación de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados de 18 a 20 átomos de carbono, al igual que la ELOVL 2 participa en la regulación de la expresión de PPAR $\alpha$ . Adicionalmente se ha encontrado que ELOVL 5 está en la glándula sebácea donde se producen las feromonas y actualmente se ha descrito que posiblemente tenga implicación con la producción y regulación de las mismas (150-152).

**JUSTIFICACIÓN Y  
PLANTEAMIENTO DEL  
PROBLEMA**



#### **4. Justificación**

Las enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, la hipertensión, la obesidad, etc. han aumentado su prevalencia a nivel mundial. El ambiente nutricional materno juega un papel importante en el desarrollo de estas enfermedades. Es el caso de la desnutrición materna la cual es una de las causas que conlleva a la predisposición de estos padecimientos en la vida adulta de la progenie, los cuales ya son considerados como la primera incidencia de muerte en el mundo. Aunque existen estudios que explican los mecanismos por los cuales se producen estas enfermedades, hasta el momento no se han descrito todas las rutas celulares y moleculares. Por tal motivo nos interesamos en obtener evidencia científica básica para conocer las causas bioquímicas, biológicas y moleculares, que desencadenan estas alteraciones en el desarrollo y que repercuten en la vida adulta de la progenie.

#### **5. Planteamiento del Problema**

La carencia de AGPIs en la dieta de la madre disminuye la biosíntesis de AGPIs-CL, durante la gestación y la lactancia, afectando el transporte y aporte de estos componentes a su crío durante ambas etapas, esto desencadena adaptaciones de todo tipo, endócrino, morfológico, fisiológico y metabólico lo que conlleva a la predisposición de enfermedades en la vida adulta de la progenie, principalmente vinculadas con el aprendizaje, cociente intelectual (IQ), hiperactividad, falta de atención y problemas de la visión.

#### **6. Hipótesis**

La restricción proteínica materna, sin cambio en la cantidad y/o calidad de las grasas en la dieta, genera alteraciones en la ruta metabólica de los AGPIs y AGPIs-CL durante la gestación y lactancia, principalmente en su función y regulación de la expresión génica de las enzimas involucradas en este metabolismo de lípidos.

# OBJETIVOS



## 7. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo General

Estudiar el efecto que produce la dieta materna baja en proteína sobre la biosíntesis  $\Delta 5D$ ,  $\Delta 6D$  y ELOVL 2, ELOVL 5 y formación de AGPIs-CL en su hígado y glándula mamaria a 19 días de gestación (dG) y a 7, 14 y 21 días de lactancia (dL) y estudiar los efectos en el desarrollo de la cría.

### 7.2 Objetivos Particulares

- Estudiar el impacto de la restricción proteínica materna sobre la ingesta, peso, parámetros metabólicos (glucosa, triacilglicéridos, y colesterol) y hormonales (leptina e insulina) a 19 dG y a 7, 14 y 21 dL.
- Estudiar el peso del hígado, la GM, la placenta y la carcasa de las madres a los diferentes días de estudio.
- Evaluar la composición química de la carcasa a 19 dG y a 21 dL en las madres de los diferentes grupos de estudio.
- Determinar la expresión y actividad enzimática de las desaturasas  $\Delta 5D$  y  $\Delta 6D$  y elongasas ELOVL 2 y ELOVL 5 en la GM materna a 19 dG.
- Analizar el contenido de AGPIs y AGPIs-CL (AA y DHA) en el hígado y en la GM a 19 dG.
- Realizar estudios histológicos a 19 dG y a 7,14 y 21 dL para conocer la distribución de parénquima y tejido adiposo en la GM.
- Determinar la producción y la calidad de la leche (proteínas, carbohidratos y grasas) de los diferentes grupos a los diferentes días de estudio.
- Cuantificar la leptina en la leche de las madres de los diferentes grupos de estudio a las diferentes edades.

- Estudiar en la grasa de la leche los AGPIs y AGPIs-CL a 7, 14 y 21 dL.
- Analizar el peso y la talla de las crías a 19 dG y durante la lactancia.
- Cuantificar la concentración de leptina en el suero de crías de 7, 14 y 21 dL.

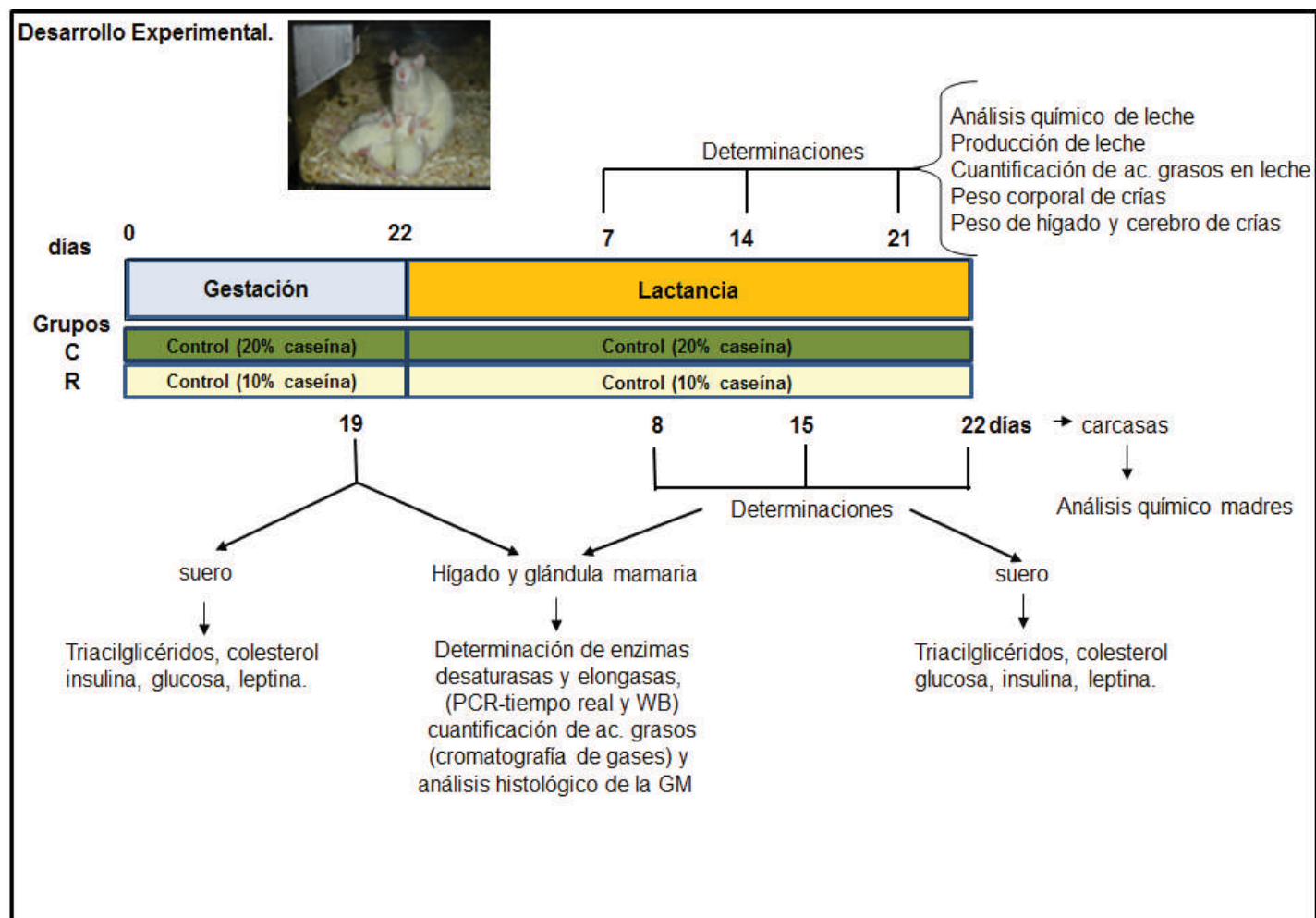


# DISEÑO Y DESARROLLO EXPERIMENTAL



## 8. DISEÑO Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

La investigación se desarrolló utilizando ratas como modelo experimental. En la Figura 6 observamos los tiempos de estudio, el análisis que se realizó a las muestras obtenidas en los diferentes días y en los grupos experimentales. Utilizamos ratas debido al costo y número de la camada, así como por sus tiempos de gestación y lactancia los cuales son cortos y permiten dar seguimiento controlado al experimento.



**Figura 6.** Esquema del desarrollo experimental en días, en cada periodo importante se muestra la edad materna y se describe el análisis que se hizo.

# METODOLOGÍA



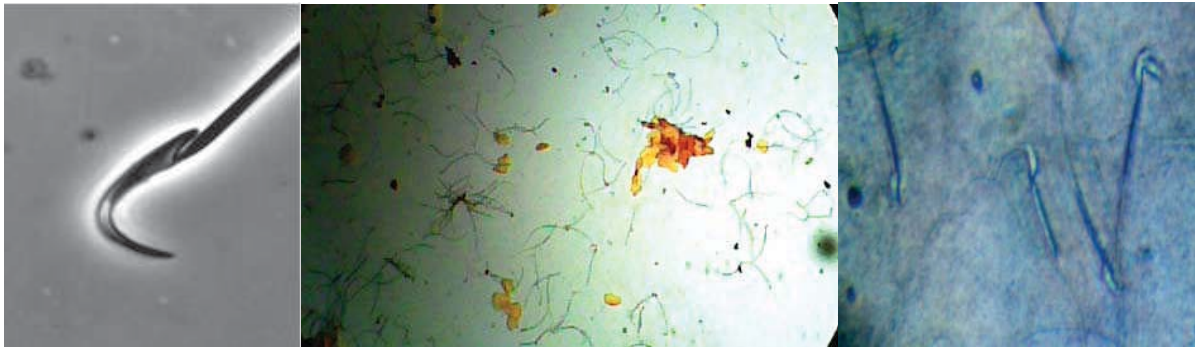
## 9. METODOLOGÍA

### 9.1 Animales

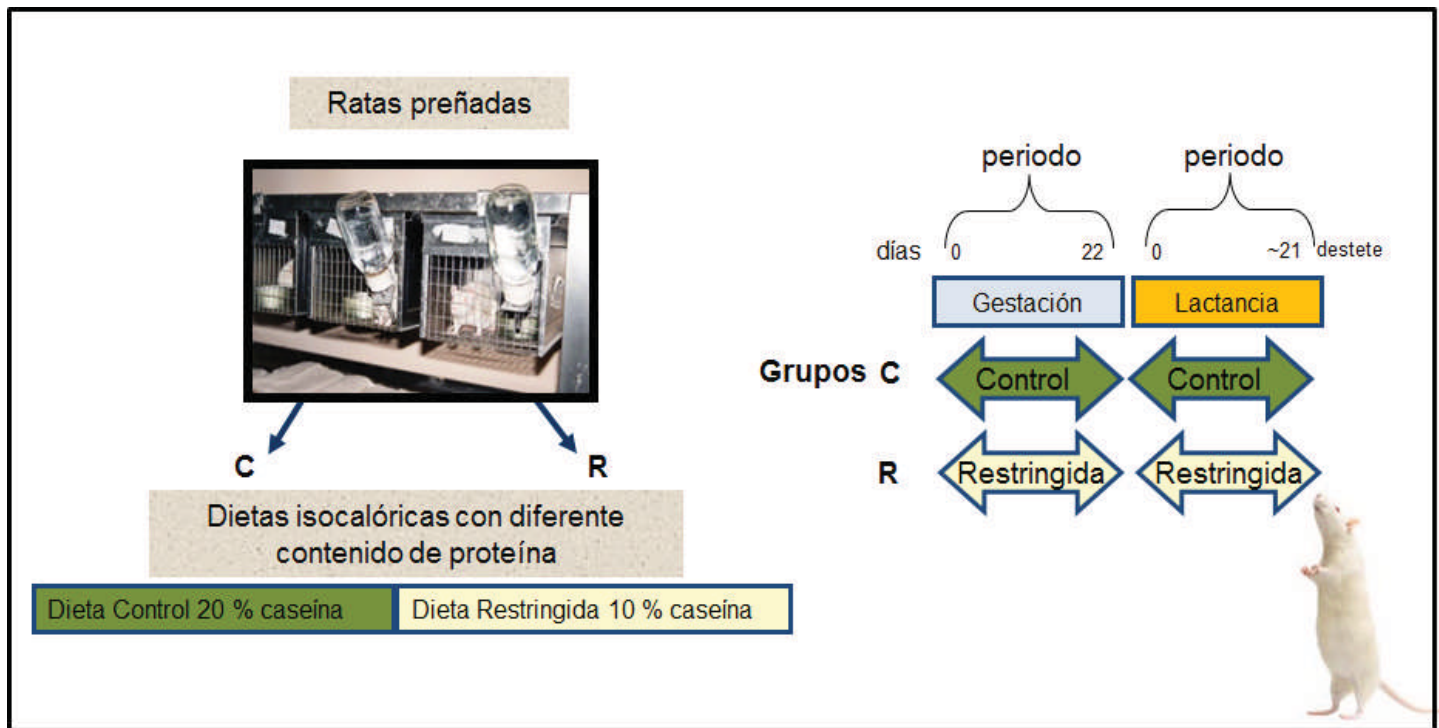
Los animales que se utilizaron para este estudio fueron ratas albinas especie *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar (obtenidos de Charles River Laboratories, Inc.), provenientes de la colonia mantenida en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ). Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité de Investigación en Animales (CINVA) del mismo instituto. Tanto la dieta como el agua de beber se administraron *ad libitum*. Los machos empleados para el apareamiento con las hembras, fueron ratas de fertilidad probada y durante todo el estudio las ratas permanecieron en el área asignada dentro de las instalaciones del bioterio del DIEB, donde fueron mantenidas bajo condiciones controladas de luz: oscuridad (luz de 7 a 19 h) y de temperatura (22 – 23 °C) y a 75% de humedad respectivamente.

### 9.2 Apareamiento, cuidado y mantenimiento de los animales

Se usaron 18 ratas para el experimento gestacional y para el de la lactancia 20 ratas con una edad promedio de 15-17 semanas y peso aproximado de 220-260 g, con ciclos regulares y alimentadas con purina 5001 (alimento para roedores). Las ratas fueron colocadas con machos probados, a fin de que se llevara a cabo el apareamiento, el cual fue comprobado por medio del frotis vaginal cada 24 horas (a las 08:00 h), durante cinco días, (los frotis fueron teñidos con solución de lugol (INNSZ) y observados con un microscopio fotónico (Axiostar Plus de Carl Zeiss®) a un objetivo de 100X. En el momento en que observamos espermatozoides en el frotis (Figura 7), este se consideró como resultado positivo y se registró, como día cero de gestación, (en caso de tener ratas negativas por más de cinco días consecutivos, para la prueba de concepción, éstas fueron descartadas del experimento). El macho fue retirado de la caja y la hembra colocada de manera individual para ser asignada de forma aleatoria a alguna de las dietas isocalóricas, Control (C -20% caseína) o dieta Restringida (R -10% caseína)(38)(Figura 8). El peso de las ratas gestantes y lactantes así como la ingesta de alimento fueron registrados diariamente hasta el día del sacrificio. Para asegurar la homogeneidad del estudio durante la lactancia, madres con más de 12 o menos de 10 crías no fueron incluidas en el estudio.



**Figura 7.** Ejemplo de un frotis vaginal positivo para el apareamiento.



**Figura 8.** Asignación de dietas isocalóricas con diferente contenido de proteína.

Grupos experimentales:

- Control (C): Madres que recibieron dieta control (caseína al 20%) durante la gestación y la lactancia.
- Restringsido (R): Madres que recibieron dieta restringida (caseína 10%) durante la gestación y la lactancia.

### 9.3 Dietas: modelo de restricción proteínica

Las fórmulas utilizadas en nuestro modelo biológico fueron elaboradas en la planta piloto del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (DCyTA) del INNSZ, las dietas fueron isocalóricas con diferente contenido de proteína, sin modificación alguna en la calidad y cantidad de grasa en ambas dietas. La dieta control, fue diseñada bajo la formulación recomendada por la AIN-93 del American Institute of Nutrition (153), en donde se estableció la composición adecuada para la alimentación de roedores que permitiera el mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactancia de los mismos. En el caso de la dieta restringida fue reducida a un 50% de proteína, en la que utilizó la caseína como fuente de proteína. Las modificaciones hechas a las dos formulaciones ya han sido previamente publicadas (3, 5, 37, 38, 76). Para la elaboración de las dietas se mezclaron todos los productos que se encontraban en forma de polvo durante 10 min. Posteriormente se agregaron el aceite y agua hasta obtener materia consistente lista para formar galletas o bisquets que eran los que se les proporcionaban a las ratas diariamente. El procedimiento de elaboración se describe con mayor detalle en el Apéndice 1, el contenido energético que aportaron ambas dietas fue de 4 Kcal/g (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición de las dos dietas isocalóricas dieta control (20 % de caseína) y dieta restringida (10 % caseína).

Dieta isocalórica. 4 Kcal/g		PROTEÍNA 20% Control		PROTEÍNA 10% Restringida	
	(%)		(%)		(%)
Caseína	20	Caseína	10		
Cistina	0.3	Cistina	0.15		
Colina	0.165	Colina	0.165		
Mezcla de vitaminas	1	Mezcla de vitaminas	1		
Mezcla de minerales	5	Mezcla de minerales	5		
Fibra	5	Fibra	5		
Aceite de maíz	5	Aceite de maíz	5		
almidón	31.76	almidón	37.34		
glucosa	31.76	glucosa	37.34		

#### 9.4 Medición de peso corporal e ingesta

La ingesta y el peso corporal de las hembras gestantes y lactantes fueron registradas diariamente de forma individual. Dicha determinación se realizó, colocando una rata madre en una caja de acrílico con 300 a 500 g aproximadamente de aserrín, se pesó la cantidad de alimento diariamente y para asegurarnos de que no tuviera variaciones este análisis por la hora y el equipo, este se realizó siempre a las 9:00 h, utilizando una balanza analítica ADAM® modelo PGW 1502e, (capacidad = 1500g, d = 0.01g), usándola en función de pesaje de animales para el caso del peso corporal y en el caso de la ingesta se colocó una cantidad de alimento inicial la cual fue registrada en la bitácora diariamente y al día siguiente se compensaba lo ingerido con más dieta. Los cálculos para determinar el alimento ingerido fueron realizados de la siguiente manera (3).

- Cálculo de la ingesta de alimento por día

$$\text{Ingesta diaria} = A_i - A_f$$

Dónde:

$A_i$  = Alimento inicial (gramos de alimento en el comedero el día anterior a la determinación)

$A_f$  = Alimento final (gramos de alimento en el comedero el día de la determinación)

#### 9.5 Extracción de suero de las ratas experimentales

A las madres de 19 dG se les retiró el alimento 4 h antes dejándoles sólo acceso al agua de forma *ad libitum* y en el caso de la lactancia a los días 8, 15 y 22 se retiró el alimento y las crías 4 h antes de la eutanasia. Se colectó la sangre en tubos de vidrio de borosilicato de 16 X 100 sin anticoagulante, previo a centrifugar la sangre, se dejó formar un coágulo por 45 min a temperatura ambiente, posteriormente se removió el coágulo de sangre y se colocaron las muestras en una centrifuga refrigerada RT6000B (Sorvall®) a 1500×g por 20 min, a 4 °C. Una vez extraído el suero fue separado con pipetas Pasteur de vidrio de punta mediana y colocado en tubos de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml para ser almacenados a -20 °C hasta el día de su análisis.

## 9.6 Extracción de órganos

### 9.6.1 Placenta

Al día 19 dG se hizo una incisión abdominal en dirección de la línea media, los cuernos uterinos fueron expuestos (Figura 9) y los embriones fueron extraídos. Cada placenta se limpió y se registró su peso en una balanza analítica BP 310S de SARTORIUS® (Cap. max.=320g, d=0.001 g) y el diámetro fue obtenido con un vernier digital (Titan).



**Figura 9.** Ejemplo de cuernos uterinos expuestos y medidas morfométricas de la placenta tomadas con el vernier.

### 9.6.2 Fetos

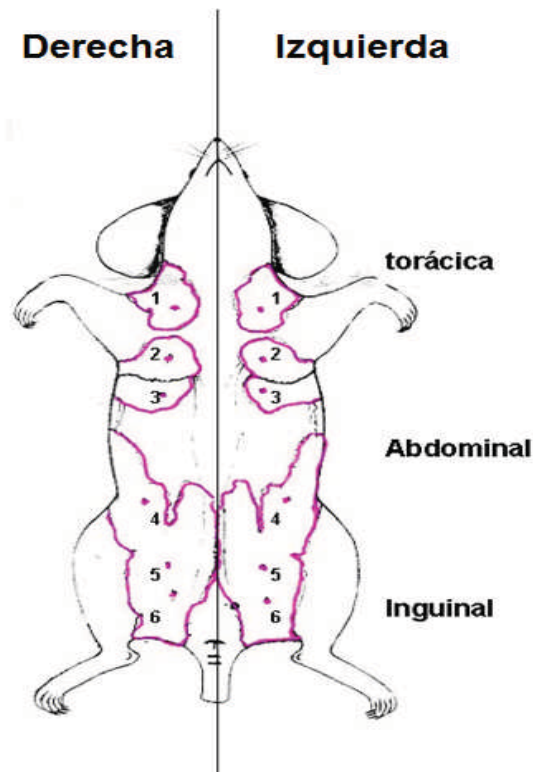
Los fetos fueron contados y pesados. El cerebro del feto y el hígado fueron aislados, pesados y agrupados por camada, posteriormente se hizo un homogenizado de la muestra y fueron colocados en tubos cónicos de polipropileno estériles de 5 ml, los cuales fueron previamente etiquetados y congelados en nitrógeno líquido para ser almacenados a  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el día del análisis de ácidos grasos por Folch.

### 9.6.3 Hígado y glándula mamaria

Después de la recolección de sangre, se procedió a la disección del cuerpo de forma inmediata (para mantener los tejidos íntegros en RNA y proteínas), se extrajo el hígado y la glándula mamaria



de todo el perímetro mamario, (región torácica, abdominal e inguinal) el tejido fue pesado y registrado en una bitácora de laboratorio. Posteriormente se cortó el lóbulo inferior derecho del hígado y la región abdominoinguinal derecha de la glándula mamaria (4to. y 5to. pezón respectivamente) (Figura 10). Estos fueron puesto en tubos de polipropileno de 1.5 ml estériles previamente etiquetados para ser almacenados a -75 °C a los cuales se les hizo el análisis de proteínas. El resto del hígado y la glándula mamaria izquierda de la región abdominoinguinal (4to. 5to. y 6to. pezón), fueron puestos en tubos cónicos de polipropileno estériles con capacidad de 25 ml y almacenados a -20 °C para el estudio de ácidos grasos.



**Figura 10.** Localización anatómica de la glándula mamaria de la rata. Distribución mamaria; (1-3) región torácica, (4) región abdominal y (5, 6) región inguinal.

### 9.6.3 (1) Análisis morfométrico

El sexto pezón (Figura 10) con glándula mamaria fue puesto en un caset de hidratación para análisis histológico, esta fue diseccionada, extraída e inmediatamente fijada en paraformaldehído

(no. cat P6148, SIGMA ALDRICH®) al 4% durante 24 h en un caset (no. cat. M505-6 UNISSETTE SIMPORT ®). El tejido fue re-hidratado con etanol (DECON laboratorios®) a diferentes concentraciones (100, 95, 75 y 50%) y posteriormente fue embebido en parafina y cortado con microtomo (LEITZ 1512 GMI lab equipments®) en secciones de 5 µm, las cuales fueron fijadas en laminillas (Snowcoat X-tra precleaned Micro Slides 1" x 3" x 1.0 mm ½ gross SURGIPATH®), que posteriormente, fueron puestas en racks y colocadas en un horno durante 20 min a 60°C para ser desparafinadas. Una vez hecho esto, el tejido continua desparafinandose con xileno (Histo Prep no. cat. 700-1gal FISHER SCIENTIFIC®) tres veces por 10 min y luego pasadas por etanol a diferentes concentraciones empezando con etanol al 100% por tres veces cada una por 5 min, posteriormente en etanol al 95% por dos veces por 3 min seguido de etanol al 70% una vez por 1 min y finalmente por etanol al 50% por 1 min, posteriormente fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E). Una vez teñidas las laminillas, cinco regiones al azar de cada laminilla (la cual representa una rata), fueron analizadas con microscopio óptico y procesadas con el programa Leica Q 500W a un objetivo de (10X) para calcular el porcentaje de área ocupada por el tejido parenquimal y el porcentaje de área ocupada por el tejido adiposo (epitelio acinar y ductal). La talla y el total de las células acinares (área citoplasmática y núcleos) fueron calculadas con un objetivo de (100X) en el mismo equipo.

### **9.7 Producción de leche e ingesta de alimento de las crías**

A las 07:00 h del día 7, 14 y 21 dL las crías fueron removidas de sus madres por 4 h tiempo en el cual las madres tuvieron libre acceso a comida y agua y las crías estuvieron en ayuno. Las madres fueron pesadas antes y después de las 4 h. Las crías también fueron pesadas antes de ser regresadas con sus madres y después de haber estado 1 h con ellas alimentándose, todos los datos de peso fueron registrados en una bitácora de laboratorio. Los cálculos para determinar la producción de leche y la ingesta de alimento se realizaron de forma indirecta considerando las siguientes fórmulas:

$$\text{Producción de leche} = (T_1 - T_2)$$

$$\text{Ingesta de alimento de las crías} = (T_1^* - T_2^*)$$

Dónde:

Peso Madre ( $T_1$ )= peso de la madre tiempo cero (g)

Peso Madre ( $T_2$ )= peso de la madre después de 4 h sin las crías (g)

Peso cría ( $T_1$ )\*= peso de la cría después de 4 h (ayuno) (g)

Peso cría ( $T_2$ )\*=peso de la cría después de 1 h de haber comido (g)

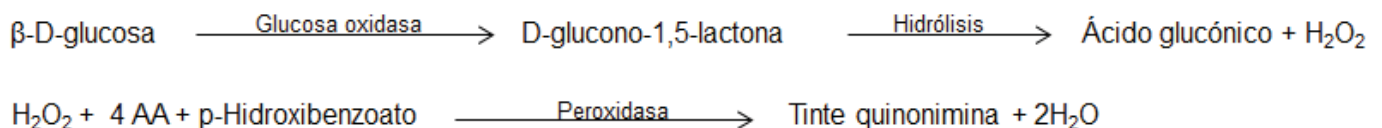
## 9.8 Extracción de leche

Al día 8, 15 y 22 dL, la madre fue separada de sus crías por 4 h transcurrido el tiempo se administraron 8U de oxitocina (solución inyectable ampollas con 1 ml conteniendo 5 U.I/ml, SYNTOCINON NOVARTIS®), con una jeringa de insulina por vía intraperitoneal, para estimular la producción de leche durante 15 min. Pasado este tiempo se colocó a la rata en una cámara de anestesia con éter etílico (J.T. BAKER®) y se insensibilizó para poder extraer la leche, lo cual se hizo, estimulando los pezones de la rata y colectando la leche en tubos de polialómero con rosca de 5 ml estériles previamente etiquetados, los cuales fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  donde posteriormente se evaluó la composición bioquímica y calidad por parámetros bioquímicos (3).

## 9.9 Componentes bioquímicos de la leche

### 9.9.1 Concentración de glucosa

La prueba de la glucosa oxidasa se fundamenta en oxidar a la glucosa generando D-glucono-1,5-lactona que posteriormente se hidroliza a ácido glucónico y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El peróxido de hidrógeno liberado reacciona con un cromógeno (fenol/4-aminoantipirina) por la reacción de Trinder, para dar una quinona que absorbe entre 492 y 550 nm en el espectrofotómetro, la intensidad de color producida es directamente proporcional a la concentración de glucosa en las muestras, la cual puede ser calculada de la siguiente manera, conociendo las absorbancias (DO) tanto de la muestra problema como de los estándares y la concentración de los estándares, se calcula la concentración de las muestras problemas como se describe en la fórmula, la cual también describe los eventos que ocurren en este procedimiento.



Por lo tanto las muestras de leche, fueron extraídas del congelador y puestas en un baño María a 37°C, una vez que las muestras estaban totalmente descongeladas se homogenizaron vigorosamente durante 5 min y se extrajeron 100 µl de leche de los diferentes grupos de estudio, los cuales fueron puestos en tubos de vidrio de borosilicato de 13 X 100 y se les agregaron 2 ml de reactivo de glucosa oxidasa, se incubaron los tubos con el reactivo durante 15 min. a 37 °C en un baño María y posteriormente tanto el blanco, la curva estándar y las muestras fueron leídos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm. Con los valores de DO del estándar y de los tubos problema se puede calcular la concentración de glucosa en la muestra de la siguiente manera.

$$\text{Conc. problema} = \frac{\text{DO problema} \times \text{concentración estándar}}{\text{DO estándar}}$$

### **9.9.2 Extracción de lípidos**

En este método (Folch modificado), las grasas de la muestra son extraídas y evaluadas como porcentaje del peso después de evaporar el solvente. En un tubo de 16 X 100 se colocó 1 ml de leche y se agregó 3 ml de cloroformo:metanol en una relación (2:1) y 2 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9%, estos fueron homogenizados con ayuda de un vórtex y centrifugados a 1500×g por 20 min a 4 °C. Se obtuvo la fase orgánica la cual se colocó en un tubo de vidrio de 16 X 100, los que previamente ya habían sido puestos a peso constante en un horno-mufla de secado SUTTEX® a 60°C y un desecador de vidrio con gel de sílice para eliminar la humedad, antes de poner la fase orgánica se registró su peso seco el cual fue tomado en una balanza analítica Cubis SARTORIUS® (Cap. Max =220g d= 0.0001 g), y posteriormente se agregó la fase y se evaporó con CO<sub>2</sub> en un baño de agua a 37°C, la diferencia entre el registro de los pesos de cada tubo, determina el contenido de grasa de la muestras, las cuales posteriormente fueron almacenadas a -20°C hasta el día del análisis de ácidos grasos. Fórmulas utilizadas para determinar el contenido de lípidos crudos:

$$\text{Contenido de lípidos crudos (\%)} = 100((B - A)/C)$$

## Cálculos

A = Peso del tubo limpio y seco (g)

B = Peso del tubo con grasa (g)

C = Peso de la muestra (g)

### 9.9.3 Ácidos grasos [Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)]

Se utilizó la cromatografía de gases para este análisis, la cual es una técnica, en el que la muestra se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica y esta se volatiliza debido a la variación de la temperatura que es regulada por un termostato, la elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte, la cual es detectada por un equipo sistematizado que registra el tiempo y la temperatura en la que la muestra fue arrastrada y la compara contra los estándares los cuales se conoce su temperatura y tiempo de arrastre. Finalmente el resultado es expresado como porcentaje total de AG en la muestra. Por lo tanto, 2 ml de metanol (no. cat MX0475-1 EMD ® grado HPLC), 100 µl de tolueno y 40 µl de ácido sulfúrico al 2% en metanol fueron agregados a la muestra extraída por Folch, la cual se calentó a 90 °C durante 2 h. Posteriormente, los tubos se colocaron en hielo y se agregó 1 ml de cloruro de sodio al 5%, este homogenado fue extraído con hexano y centrifugado a 1500 rpm durante 1 min. Posteriormente se tomaron 200 µl de la muestra y fueron inyectados en el cromatógrafo de gases (AGILENT® modelo 6850 equipado con un detector de ionización de llama) y de inyección con división automática mediante un inyector automático (AGILENT 6850), para el análisis de los FAME. La columna cromatográfica fue una columna capilar HP-INNOWAX (30 m, 0,25 mm, 0.25 µm J & W Científica, EE.UU). Como estándar interno utilizamos 125 µg de ácido heptadecanoico y mezclado en una muestra control e inyectado de la misma forma que las muestras problema. Por tanto las muestras en el equipo fueron arrastradas con helio a una velocidad lineal constante de 24 cm/s, cada ácido graso es detectado de acuerdo a la temperatura de fusión por tanto el equipo lo revela de acuerdo a este efecto y lo grafica por tiempo y temperatura detectada.

#### 9.9.4 Proteínas Totales

La técnica para la determinación de proteínas totales se basa en la unión de un colorante, (Coomassie Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas, azul y naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. La sensibilidad del método es (1-15 µg), por tanto puede ser utilizado en muestras pequeñas y pocas sustancias interfieren en su determinación. Utilizamos 10 µl de leche, los cuales diluimos 1:100 y sobre la dilución realizada tomamos 1 µl de muestra y añadimos 1 ml del reactivo de Bradford (BIO-RAD®), los tubos estándar fueron preparados con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BIO-RAD®) a los que al final también se le agregó 1 ml de reactivo de Bradford, se dejó a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm frente al blanco.

#### 9.9.5 Sólidos totales y humedad

El método se basa en el secado de muestras en un horno y su determinación por diferencia de peso entre el material seco y el húmedo, por tanto las charolas de aluminio que se utilizaron en este análisis debieron ser puestas a peso constante con ayuda de un horno-mufla de secado marca SUTTEX® a 60°C y un desecador de vidrio con gel de sílice para eliminar la humedad de las charolas y pesadas en una balanza analítica, con el peso conocido de la charola, se agregó 1 ml de leche y se volvió a pesar la charola registrándolo como peso húmedo, la muestra se colocó posteriormente en el horno a 100°C por un mínimo de 12 h y se dejó enfriar en el desecador, una vez que la muestra estaba a temperatura ambiente, se pesó nuevamente cuidando de que el material no estuviera expuesto al medio ambiente por mucho tiempo, para evitar que las muestras ganen humedad, por lo tanto la diferencia entre los dos registros de peso es el contenido de agua de las muestras.

Cálculos:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = 100(((B-A) - (C-A))/(B-A))$$

Dónde:

A = Peso de la charola seca y limpia (g)

B = Peso de la charola + muestra húmeda (g)

C = Peso de la charola + muestra seca (g)

### **9.10 Lípidos totales y contenidos de ácidos grasos en glándula mamaria e hígado**

La grasa total de un gramo de la glándula mamaria e hígado materno, así como cerebro e hígado fetal, fueron extraídos por la técnica modificada de Folch la cual ya ha sido explicada ampliamente (en el apartado 9.9.2) y al extracto se le cuantificó el contenido de ácidos grasos por cromatografía de gases la cual se describe en el apartado (9.9.3).

### **9.11 Carcasas**

A los cuerpos de las madres a 19 dG y a 21dL se les extrajo la cabeza y el tracto gastrointestinal y no fueron incluidos en el análisis químico proximal, posteriormente fue registrado el peso (peso húmedo) y colocadas cada una en soportes individuales de aluminio dentro de un horno-mufla de secado SUTTEX® a 60°C hasta obtener su peso constante. El peso perdido es considerado como la cantidad de agua corporal, la cual fue calculada como se presenta en la fórmula, la carcasa seca fue homogenizada en una licuadora (OSTERIZER® con doble cuchilla de acero inoxidable y motor de 600 watts) y almacenada en tubos cónicos de 50 ml de plástico estériles a 4°C hasta el día de su estudio.

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = 100 \{[(B-A) - (C-A)]/(B-A)\}$$

Dónde:

A = Peso del soporte de aluminio seco y limpio (g)

B = Peso del soporte + muestra húmeda (g)

C = Peso del soporte + muestra seca (g)

## 9.12 Análisis Químico Proximal de Carcasas

### 9.12.1 Proteínas totales (método de Kjeldahl)

El análisis se efectuó mediante el método de Kjeldahl, que evalúa el contenido de nitrógeno total en la muestra, después de ser digerida con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador de mercurio o selenio. Se pesó 1 g de muestra y colocó en el matraz Kjeldahl; al que posteriormente se le agregó 10 g de sulfato de potasio (SIGMA-ALDRICH ®) y 0.7 g de óxido de mercurio y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado (SIGMA-ALDRICH ®). Una vez hecha la mezcla se puso en el digestor en un ángulo inclinado y caliente a ebullición hasta que la solución se vio clara. Se dejó enfriar y durante el enfriamiento se fue adicionando poco a poco alrededor de 90 ml de agua destilada y desionizada. Ya frío se agregaron 25 ml de solución de sulfato de sodio y se mezcló (5). Se pusieron perlas de ebullición y 80 ml de la solución de hidróxido de sodio (SIGMA-ALDRICH ®) al 40% manteniendo inclinado el matraz, cuando se formaron dos capas se conectó rápidamente el matraz a la unidad de destilación, se calentó y se colectaron 50 ml del destilado conteniendo el amonio en 50 ml de solución indicadora. Al terminar de destilar se tituló la solución estándar de ácido clorhídrico y se calculó la concentración.

Cálculos: **Nitrógeno en la muestra (%) =  $100[(A \times B)/C] \times 0.014$**

**Proteína cruda (%) = Nitrógeno en la muestra \* 6.25**

A = Ácido clorhídrico usado en la titulación (ml)

B = Normalidad del ácido estándar

C = Peso de la muestra (g)

### 9.12.2 Contenido de lípidos crudos (método de Soxhlet)

El contenido de lípidos en las carcasas se realizó por el método de Soxhlet la extracción es semi-continua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso. Para esta técnica se utilizó un matraz bola al cual agregamos alrededor de 1 g de muestra más 5 ml de éter etílico (J.T. BAKER®) y 3 ml de ácido clorhídrico, posteriormente colocamos el matraz en un sistema de extracción Soxhlet, el cual es calentado y



agitado en una estufa (no.cat PC-4200 CORNING®) a 60°C durante 2 h, a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/s. Pasado el tiempo se filtró la muestra en un papel filtro Whatman de 5 mm, el cual una vez seco fue puesto en un dedal de celulosa (no. cat 2800-105 10 X 15 WHATMAN®) y montado en el equipo de evaporación durante 90 min hasta que ya no quedara solvente, el remanente obtenido se colocó en vasos de aluminio los cuales previamente habían sido puestos a peso constante ya que se colocaron en un desecador de vidrio con gel de sílice para eliminar la humedad y pesados posteriormente, la diferencia en pesos se determinó como el contenido de grasa en la muestra.

$$\text{Contenido de lípidos crudos (\%)} = 100(B - A)/C$$

Cálculos

A = Peso del vaso de aluminio limpio y seco (g)

B = Peso del vaso de aluminio con grasa (g)

C = Peso de la muestra (g)

### 9.13 Química sanguínea

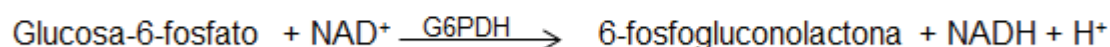
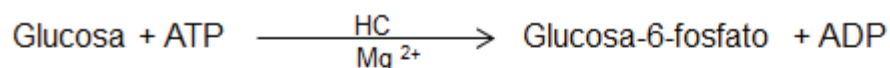
El suero conservado a -20°C, fue descongelado a temperatura ambiente durante 15 min previos al inicio del análisis, una vez descongeladas se adicionaron 10 µl del suero en las cubetas del equipo, el cual procesó las muestras automáticamente. La medición de la concentración sanguínea de glucosa, colesterol total y triacilglicéridos fue realizado con el sistema automatizado SYNCHRON CX® 5 Delta de BECKMAN-COULTER el cual utiliza el multicalibrador MULTI™ SYNCHRON CX diseñado para este sistema, se incluyó también dentro de la corrida el control de calidad interno correspondiente. Las determinaciones se llevaron a cabo con reactivos diseñados especialmente para este sistema y los parámetros antes mencionados fueron programados en el equipo, el cual realiza un análisis espectrofotométrico a partir de ensayos enzimáticos que se describen a continuación (5).

#### 9.13.1 Glucosa

La concentración se determinó por un método de punto final a tiempo fijo utilizando un reactivo denominado GLU (Ref.: 467825), compuesto por: ATP 3.8 mM, NAD<sup>+</sup> 2.7 mM, hexocinasa (HC) 2.0 KUI/L, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) 3.0 KUI/L, además de otras sustancias no

reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema. El equipo dispensa en forma automática los volúmenes de muestra y reactivo. La proporción es 1 parte de muestra a 100 partes de reactivo. En las reacciones dadas en el sistema de análisis durante la corrida la enzima HC cataliza la transferencia de un grupo fosfato a partir del ATP a la glucosa formándose ADP y glucosa-6-fosfato. Luego la glucosa-6-fosfato se oxida a 6-fosfogluconolactona con la reducción concomitante de  $\text{NAD}^+$  a NADH por la acción catalítica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Puesto que el NADH muestra a 340 nm un pico de absorbancia que no tiene el  $\text{NAD}^+$ , esta reacción producirá un aumento de la absorbancia a esta magnitud la cual será proporcional a la concentración de glucosa la cual se expresa en mg/dl.

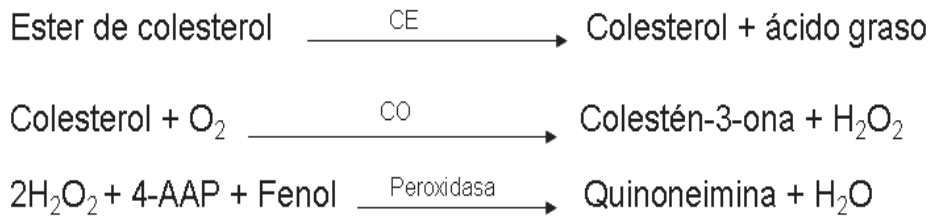
Las siguientes son reacciones químicas empleadas en la cuantificación de glucosa sérica.



### 9.13.2 Colesterol

Se utilizó un método de punto final a tiempo fijo empleando el reactivo CHOL (No. Ref.: 467825) el cual se compone de 4-aminoantipirina (4-AAP) 0.28 mM, fenol 8.06 mM, colesterol esterasa (CE) 211 UI/L, colesterol oxidasa (CO) 216 UI/L, peroxidasa 6.667 UI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema. El SYNCHRON CX® dispensa en forma automática los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en una cubeta, en proporción de 1 parte de muestra a 100 partes de reactivo. En las reacciones efectuadas en el equipo la CE hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos, el colesterol libre es oxidado a colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno por medio de la CO, la peroxidasa cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con 4-AAP y fenol produciendo quinoneína, un producto de color.

Reacciones químicas empleadas en la cuantificación de colesterol sérico.

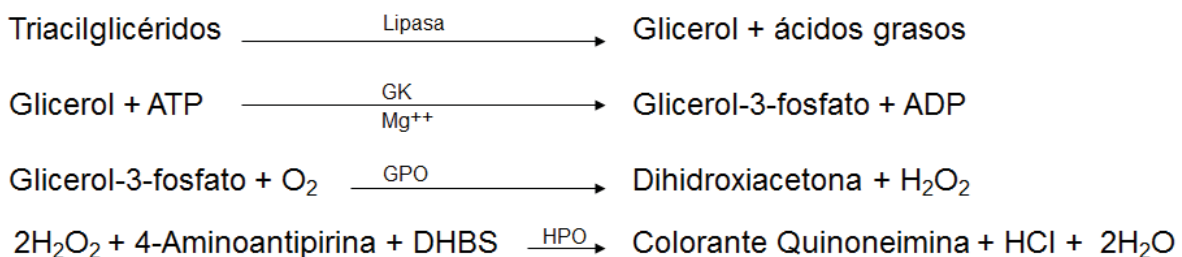


Así, el sistema determina el cambio de absorbancia a  $\lambda=582$  nm, ya que este es proporcional a la cantidad de colesterol en la muestra, de este modo el sistema puede calcular y expresar la concentración de colesterol en mg/dl.

### 9.13.3 Triacilglicéridos

Para esta determinación se requiere del reactivo GPO (ref.: 445850), el cual mediante un método de punto final a tiempo fijo el sistema dispensa automáticamente los volúmenes en proporción de 1 parte de muestra por cada 100 partes de reactivo. El reactivo se compone de: lipasa 68 U/L, ATP 2.56 mM, glicerol cinasa (GK) 4 KUI/L, glicerofosfato oxidasa (GPO) 1.1 KUI/L, 4-AAP 0.71 mM, ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfónico (DHBS) 1.56 mM, peroxidasa de rábano (HPO) 9 KUI/L, además de otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema. Los triacilglicéridos de la muestra por la adición del reactivo son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por medio de la lipasa. Se da así una secuencia de tres pasos enzimáticos justamente, por la GK, el glicerol se transforma en glicerol-3-fosfato y este por acción de la GPO se transforma en dihidroxiacetona y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y así la HPO causa el acoplamiento oxidante a partir del peróxido de hidrógeno generado junto con el DHBS y la 4-AAP forman un colorante rojo de quinoneína.

Reacciones químicas empleadas en la cuantificación de triacilglicéridos.



El sistema monitoriza la variación de la absorbancia a  $\lambda=520$  nm justo antes de la adición de lipasa y durante un intervalo fijo de tiempo tras su adición. Esta variación de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triacilglicéridos en la muestra y el sistema la utiliza para calcular y expresar la concentración de triacilglicéridos en mg/dl.

### 9.14 Determinación de hormonas

La concentración de insulina y leptina se realizó por el método de radioinmunoanálisis (RIA por sus siglas en inglés). Este método radioinmunométrico se basa en la formación específica de los complejos antígeno-anticuerpo el cual resulta ser altamente sensible y específico. En dicha técnica, una concentración establecida de antígeno marcado [radiactivamente, yodo ( $^{125}\text{I}$ )] es mezclada con una concentración desconocida de antígeno considerado como el analito (de la muestra) estos son incubados con una dilución constante de antisuero, de tal forma que la concentración de sitios de unión al antígeno en los anticuerpos es limitada. Por tanto se establece un sistema de competencia entre los sitios de unión al antígeno marcado y no marcado (proveniente de la muestra), por el número limitado y constante de los sitios disponibles en el antisuero (Figura 11). Así, la cantidad de antígeno marcado unido al anticuerpo disminuirá a medida que la concentración de antígeno no marcado aumente. Este complejo antígeno-anticuerpo formado puede ser medido por inmunoprecipitación, midiendo la radiactividad emitida por el componente marcado y comparándolo contra la curva patrón de emisiones conocidas que incrementa su concentración de antígeno no marcado y a partir de ésta curva, la cantidad desconocida de antígeno en la muestras puede ser calculada.



**Figura 11. Fundamento del RIA.** Reacción antígeno-anticuerpo, el anticuerpo (Ac) específico se une al antígeno marcado (Ag-marca radiactiva) y no marcado (Ag) los cuales “compiten” por los sitios de unión debido a la cantidad limitada de anticuerpo en el sistema y finalmente calcula la concentración a partir de las cuentas por minuto emitidas para cada muestra.

### 9.14.1 Leptina

Para la cuantificación de la concentración de leptina se utilizaron 100 µl de suero de los diferentes grupos de estudio y el estuche de leptina con no. de catálogo: RL-83K para rata, este fue obtenido en LINCO® Research, el cual utiliza leptina de rata marcada con el isótopo radiactivo <sup>125</sup>I y un anticuerpo específico para leptina de rata con una sensibilidad de 0.5 ng/ml, así como un contador de radiaciones y (PACKARD INSTRUMENT Co.) para determinar la concentración. El estuche cuenta con sus propios patrones de leptina con los cuales se elaboró la curva patrón (5).

### 9.14.2 Insulina

Se utilizaron 100 µl de suero de los diferentes grupos de estudio y se analizó la concentración de insulina en un estuche para rata con no. de catálogo: RI-13K de LINCO® Research, el cual emplea insulina de rata marcada con el isótopo radiactivo <sup>125</sup>I y un anticuerpo específico para insulina de rata con una sensibilidad de 0.1 ng/ml, el estuche contiene sus propios estándares de insulina con los cuales se elaboró la curva patrón; asimismo se usó un contador de radiaciones gamma (PACKARD INSTRUMENT Co.) para su cuantificación (76).

## 9.15 Análisis de la expresión de RNA por RT-PCR de tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real (del inglés *real time PCR*- reacción en cadena de la polimerasa) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (DNA), emplea un molde de DNA, un par de oligonucleótidos específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado y una DNA polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo, la cual con ayuda de un termociclador que alberga sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permitirá medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Por tanto nosotros determinamos la presencia de RNAm específicos para las proteínas  $\Delta 6D$  y  $\Delta 5D$ , para ello se utilizaron 300 ng de RNA total, los cuales fueron sujetos a la reacción de la Transcriptasa Reversa (RT) y amplificados por la Reacción en Cadena de la Polimerasa usando Taqman Universal Master Mix (APPLIED BIOSYSTEM). Las sondas y oligonucleótidos de los genes de estudio específicos para rata fueron obtenidos por APPLIED BIOSYSTEM® (Pre-developed TaqMan Assay Reagents Control kits).  $\Delta 6D$  (no. cat. Rn00580220\_m1) y  $\Delta 5D$  (no. cat.

Rn00584915\_m1). Todos los resultados fueron normalizados contra el gen constitutivo  $\beta$ -actina. Las regiones diana para la detección de las elongasas (ELOVL 2 y 5) y el gen constitutivo fueron contruidos a partir de cDNA de tejido y de células epiteliales de glándula mamaria de ratón HC11. Con ayuda del Light Cycler Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche, Indianapolis, IN), se obtuvieron las regiones para la reacción de amplificación de los genes de estudio: para ELOVL 2, el oligonucleótido directo fue (GGA AGA AAT ACC TCA CGC AG) y el reverso (TGG CTT TTT TCG GTA TGT C); para ELOVL 5, el oligonucleotido directo fue (CTC AAC CTG CTG TCT CTC TA) y el reverso (ATC TGG TGG TTG TTC TTA CG); para  $\beta$ -actina, el oligonucleótido directo (TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG) y el reverso (TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG) posteriormente estos fueron sujetos a la reacción de la PCR de tiempo real usando el Light Cycler 2.1 (ROCHE).

### **9.16 Análisis de la concentración de proteína por Western Blot**

Es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura o hidrofobicidad, etc. Estas posteriormente son transferidas a una membrana adsorbente [típicamente de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinildeno (PVDF)] para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar la cantidad relativa respecto a otras proteínas de acuerdo a la intensidad de la banda la cual es comparada contra un anticuerpo que no modifica su concentración (gen constitutivo). Alrededor de 200 mg de glándula mamaria fueron homogenizados en RIPA, amortiguador de lisis, [PBS 1%, NP-40 1%, Desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% y Azida de sodio 0.006% (g/vol)]. Posteriormente a cada muestra se le determinó la concentración total de proteína por el método de Bradford (apartado 6.7.4) y se cargó en un gel de SDS al 10% durante 2 h 30 min para poder ser transferido a una membrana de nitrocelulosa (0.45  $\mu$ m BIO-RAD 9364001). Cada membrana fue probada con los anticuerpos de estudio:  $\Delta$ 6D,  $\Delta$ 5D, ELOVL 2 y ELOVL 5 a una dilución 1:500 en TBSt (Tris-buffer salina tween, pH= 7.4: Tris HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20, 0.01%) con 5% de leche, e incubados durante 60 min. Al  $\Delta$ 6D y  $\Delta$ 5D se les agregó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y ELOVL 2 y 5 fue incubado con el anticuerpo secundario apropiado (SANTA CRUZ). La proteína fue detectada por quimioluminiscencia y revelada en una placa de rayos X (KODAK). El análisis de densitometría de cada muestra fue realizado con el programa ImageJ. Cada membrana incluye 8 muestras de las

cuales las primeras cuatro son grupo C y las otras 4 grupo R. Todos los resultados fueron normalizados con  $\gamma$ -tubulina.

## **9.17 Análisis Estadístico**

### **9.17.1 Gestación**

Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  EE. El análisis estadístico fue hecho con la prueba de t de Student para comparar el grupo C y R. Los resultados del RT-PCR de tiempo real fueron expresados con respecto al control y normalizados como (RNAm/ $\beta$ -actina). Los datos del Western Blot fueron normalizados con  $\gamma$ -tubulina y expresados relativos al control;  $p < 0.05$  fue considerado como diferencia significativa.

### **9.17.2 Lactancia**

Los resultados de los animales del mismo grupo fueron promediados y el análisis final fue realizado solamente por el número de camadas. El análisis estadístico fue hecho con la prueba de t de Student para comparar el grupo C y R. Además se analizó con la prueba de t de Student los datos entre machos y hembras,  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

# RESULTADOS

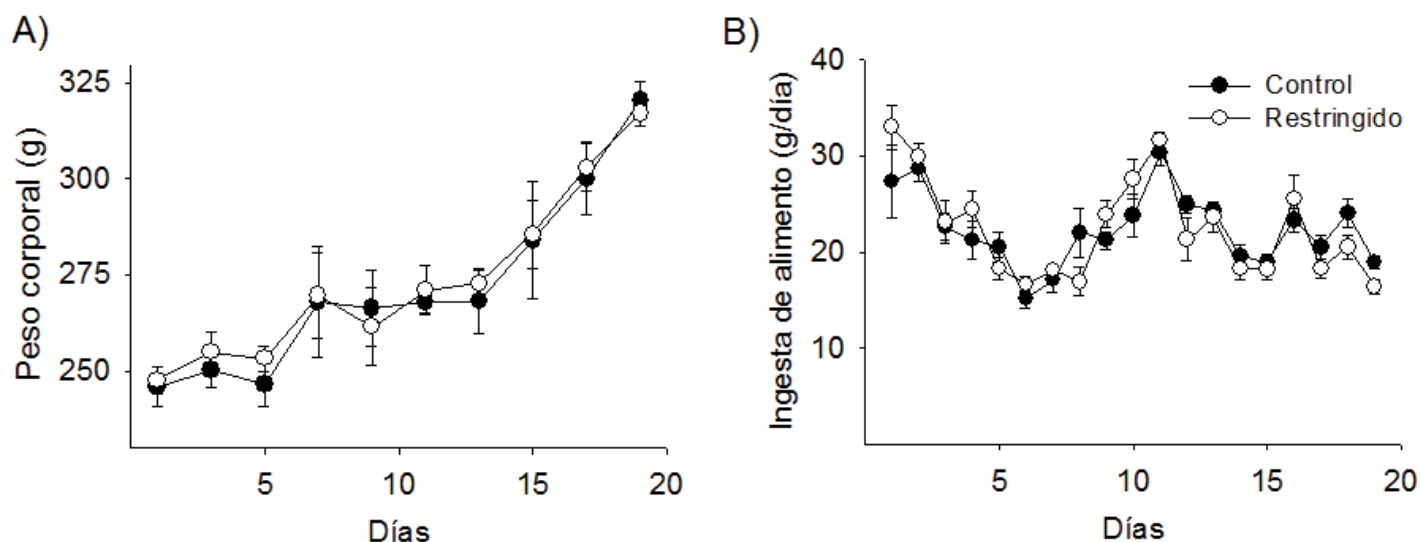




## 10. RESULTADOS

### 10.1 Peso Corporal e ingesta de alimento de las madres durante la gestación.

Cuando se compararon los grupos R y C del día 1 al 19 dG en la ganancia de peso e ingesta de alimento, no encontramos diferencias significativas. La ganancia total de peso de ambos grupos de estudio desde el día cero al 19 dG fue de 75 g (Figura 12).



**Figura 12.** A) peso corporal (g) y B) ingesta de alimento (g/día) de madres durante la gestación hasta el día 19, madres alimentadas con dieta control (C - 20% n= 7) o restringida (R - 10% n=6), los resultados están expresados como la media  $\pm$  EE.

### 10.2 Parámetros maternos a 19 dG

Las madres de 19 dG no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal y contenido de proteína entre los grupos, sin embargo, el contenido de grasa corporal fue menor en el grupo R (Tabla 2).

**Tabla 2.** Peso corporal y composición corporal de madres 19 dG alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \*  $p < 0.05$  vs C.

Grupo		Control (n=7)	Restringido (n=6)
Peso corporal (g)		314 $\pm$ 13	305 $\pm$ 12
Composición corporal	Grasa (g)	9 $\pm$ 1	7 $\pm$ 0.8*
	Proteína (g)	30 $\pm$ 3	26 $\pm$ 4

### 10.3 Características bioquímicas en el suero materno a 19 dG

Los triacilglicéridos, colesterol, glucosa no tuvieron cambios significativos entre ambos grupos experimentales. Sin embargo, las concentraciones de leptina materna fueron más altas en el grupo R con respecto al C y la insulina aumentó 3.6 veces más en el grupo R en comparación con el C (Tabla 3).

**Tabla 3.** Parámetros bioquímicos en suero 19 dG, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs C.

Grupo	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Glucosa (mg/dl)	64 $\pm$ 3	54 $\pm$ 11
Triacilglicéridos (mg/dl)	237 $\pm$ 32	239 $\pm$ 13
Colesterol (mg/dl)	44 $\pm$ 4	42 $\pm$ 2
Insulina (ng/ml)	0.19 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.2**
Leptina (ng/ml)	5 $\pm$ 0.1	7 $\pm$ 0.7*

### HIGADO MATERNO 19 dG

#### 10.4 Composición del hígado a 19 dG

El peso y la proteína en el hígado no fue diferente entre los grupos, sin embargo, el contenido de grasa en el hígado resultó menor en el grupo R (Tabla 4).

**Tabla 4.** Peso, contenido de grasa y de proteína en el hígado de 19 dG de madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \*  $p < 0.05$  vs C.

Grupo	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Peso (g)	12.1 $\pm$ 0.7	11.4 $\pm$ 0.5
Grasa (mg/100mg)	9.3 $\pm$ 1	6.2 $\pm$ 0.7*
Proteína (mg/100mg)	3 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.8

### 10.5 Porcentaje de ácidos grasos en el hígado materno a 19 dG

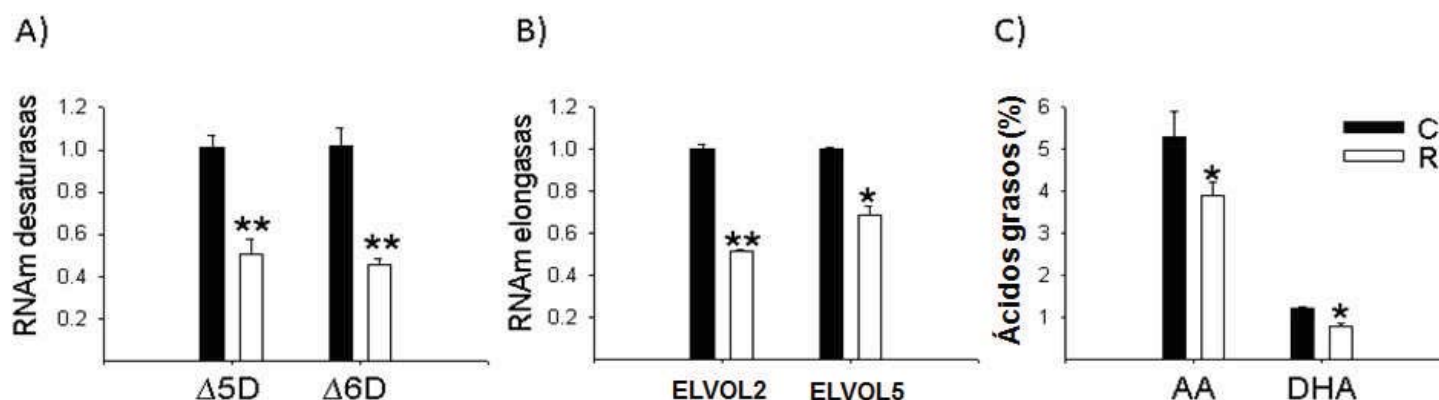
La composición de ácidos grasos en el hígado muestra que los monoinsaturados y los omega 3 están en menor proporción en R vs C, en su análisis individual podemos decir que el ácido oleico (C=  $26 \pm 1.4$  vs R=  $22 \pm 1.3^*$  %), el ácido araquídico (C=  $0.3 \pm 0.01$  vs R=  $0.2 \pm 0.01^*$  %), el AA (C=  $5.3 \pm 1.6$  vs R=  $3.9 \pm 0.6^*$  %) y el DHA (C=  $1.2 \pm 0.06$  vs R=  $0.8 \pm 0.07^*$  %) se encuentran en menor proporción en el grupo R con respecto al C (Tabla 5).

**Tabla 5.** Porcentaje de ácidos grasos en el hígado materno 19 dG de madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \*  $p < 0.05$  vs C.

Ácidos Grasos (%)	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Total monoinsaturados	$29 \pm 1.6$	$24 \pm 1.6^*$
Total saturados	$56 \pm 4.0$	$61 \pm 3.0$
Total poliinsaturados	$15 \pm 2.4$	$15 \pm 1.0$
Omegas 3	$1.4 \pm 0.08$	$0.9 \pm 0.9^*$
Omegas 6	$13 \pm 2.0$	$13 \pm 1.0$

### 10.6 Expresión génica de enzimas desaturasas y elongasas en el hígado materno a 19 dG

La expresión de las enzimas  $\Delta 5D$ ,  $\Delta 6D$ , ELOVL 2 y ELOVL 5 se observaron disminuidas en el grupo R con respecto al C, este efecto parece ser que repercute en el porcentaje de ácidos grasos de forma especial en el AA y DHA en el hígado de la madre (Figura 13).



**Figura 13.** La abundancia relativa de la expresión génica de las enzimas A)  $\Delta 5D$  y  $\Delta 6D$ , B) ELOVL 2 y ELOVL 5, y C) ácidos grasos (%) (AA y DHA) en el hígado de las madres de 19 dG, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. n = 5 por grupo \*  $p < 0.05$  vs C, \*\*  $p < 0.01$  vs C.

## GLANDULA MAMARIA A 19 dG

### 10.7 Composición bioquímica de la glándula mamaria a 19dG

El peso y el contenido de grasa en la glándula mamaria fue menor en el grupo R y el contenido de proteína no fue diferente entre los grupos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Peso, grasa y contenido de proteína en la glándula mamaria de 19 dG, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \*  $p < 0.05$  vs C.

Grupo	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Peso (g)	17 $\pm$ 0.9	13 $\pm$ 0.9*
Grasa (mg/100mg)	13 $\pm$ 0.7	10 $\pm$ 0.8*
Proteína (mg/100mg)	7.3 $\pm$ 0.8	7.2 $\pm$ 0.5

### 10.8 Porcentaje de ácidos grasos en la glándula mamaria materna a 19 dG

El porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados, saturados y poliinsaturados no fue diferente entre los grupos de estudio (Tabla 7), sin embargo en el análisis por separado de los componentes grasos observamos que el ácido láurico (C= 0.5  $\pm$  0.03 vs R= 0.3  $\pm$  0.05\* %), el AA (C= 3  $\pm$  0.1 vs R= 2  $\pm$  0.08\* %), el EPA (C= 0.1  $\pm$  0.002 vs R= no detectable %) y el DHA (C= 0.4  $\pm$  0.002 vs R= 0.02  $\pm$  0.001\* %) están en menor proporción en el grupo R comparado con el grupo C.

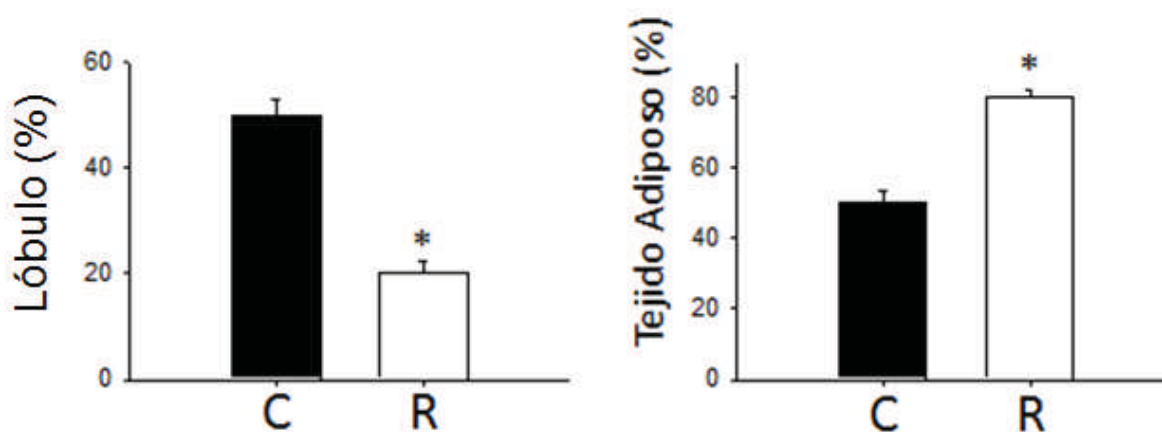
**Tabla 7.** Porcentaje de ácidos grasos en la glándula mamaria a 19 dG, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE.

Ácidos Grasos (%)	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Total monoinsaturados	34 $\pm$ 0.8	32 $\pm$ 2
Total saturados	34 $\pm$ 0.8	34 $\pm$ 0.9
Total poliinsaturados	32 $\pm$ 0.7	34 $\pm$ 2
Omegas 3	1 $\pm$ 0.04	1 $\pm$ 0.08
Omegas 6	31 $\pm$ 0.7	33 $\pm$ 2

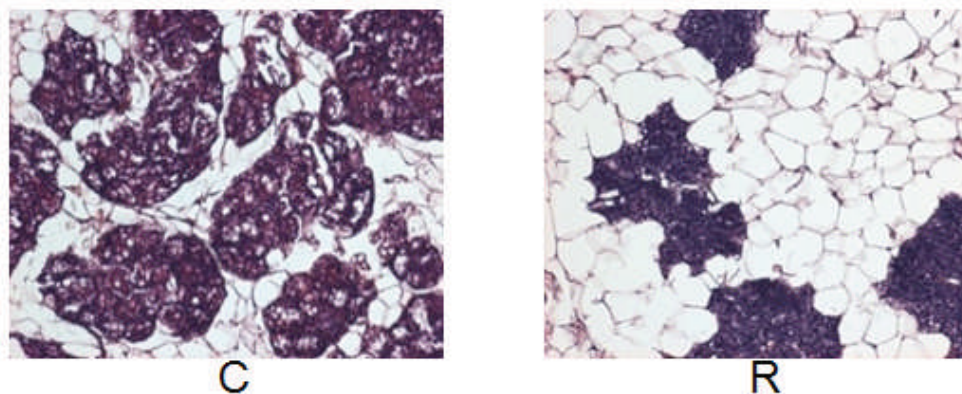
## 10.9 Análisis histológico y microfotografías de la glándula mamaria a 19 dG

El análisis histológico y las microfotografías muestran que el grupo C tiene mayor desarrollo lóbulo alveolar y menos tejido adiposo respecto del R, donde se ve que existe mayor adiposidad y menor abundancia de desarrollo glandular (Figura 14), también se observa menor tamaño en las células acinares, así como menor área citoplasmática con respecto al grupo C (Figura 15).

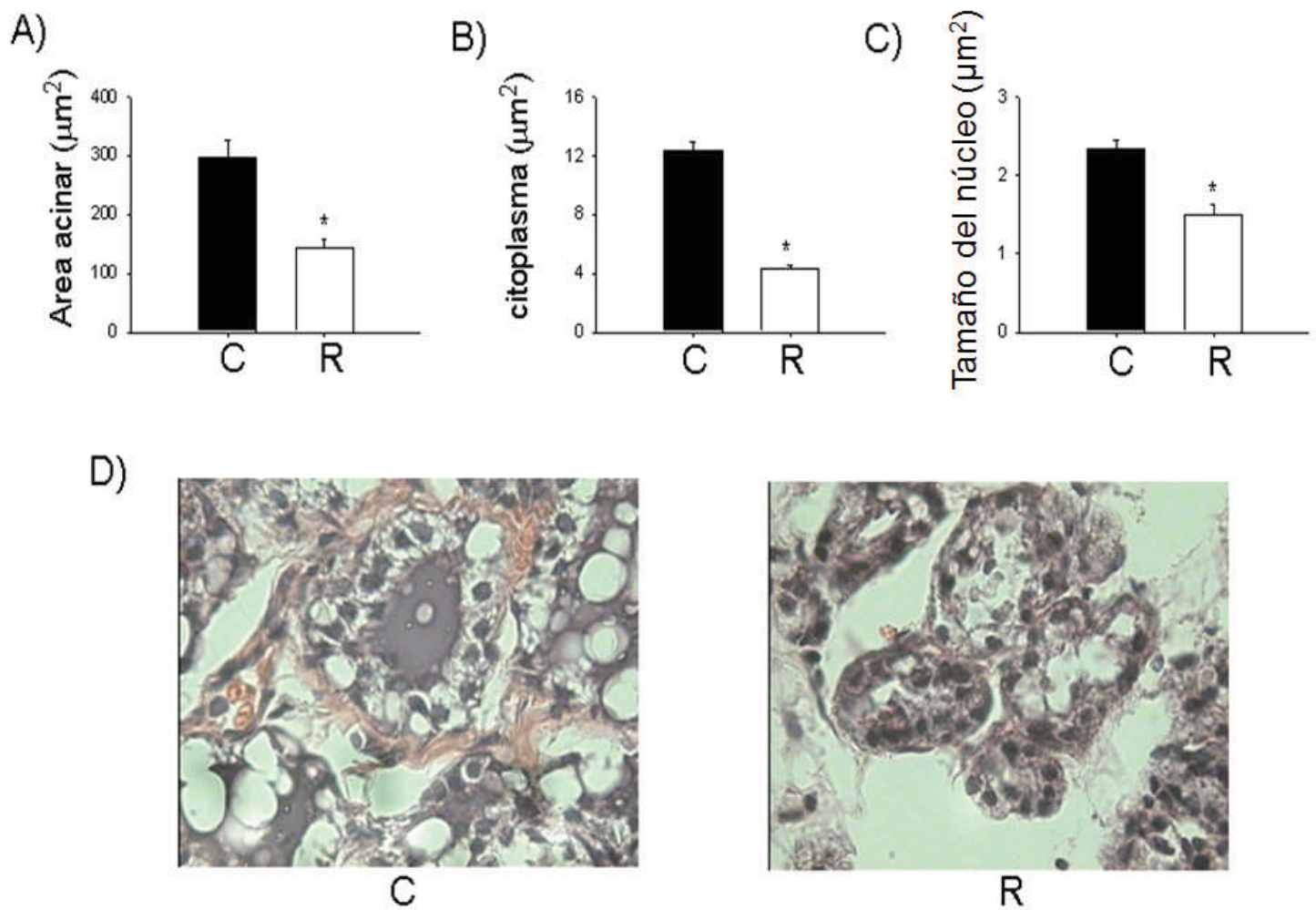
A)



B)



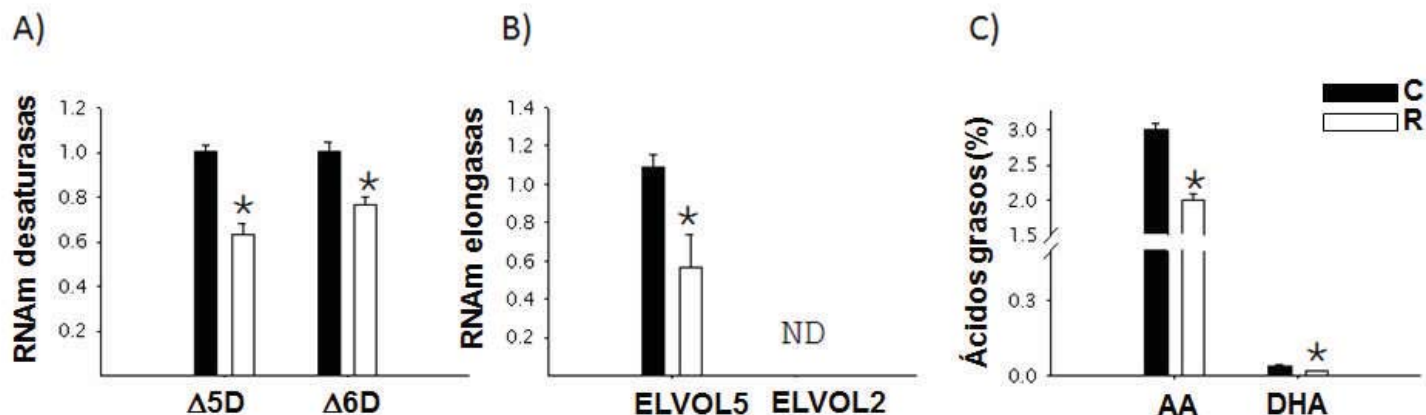
**Figura 14.** A) análisis histológico (% de área) y B) Microfotografías de la glándula mamaria (10 X) de las madres a 19 dG, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. n = 6-7 por grupo \*p < 0.05 vs C.



**Figura 15.** A) área acinar ( $\mu\text{m}^2$ ), B) citoplasma ( $\mu\text{m}^2$ ), C) tamaño del núcleo ( $\mu\text{m}^2$ ) y D) Microfotografía de la glándula mamaria (100 X) de las madres a 19 dG, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. n = 6-7 por grupo \*p < 0.05 vs C.

### 10.10 Expresión génica de las enzimas desaturasas y elongasas en la glándula mamaria materna a 19 dG

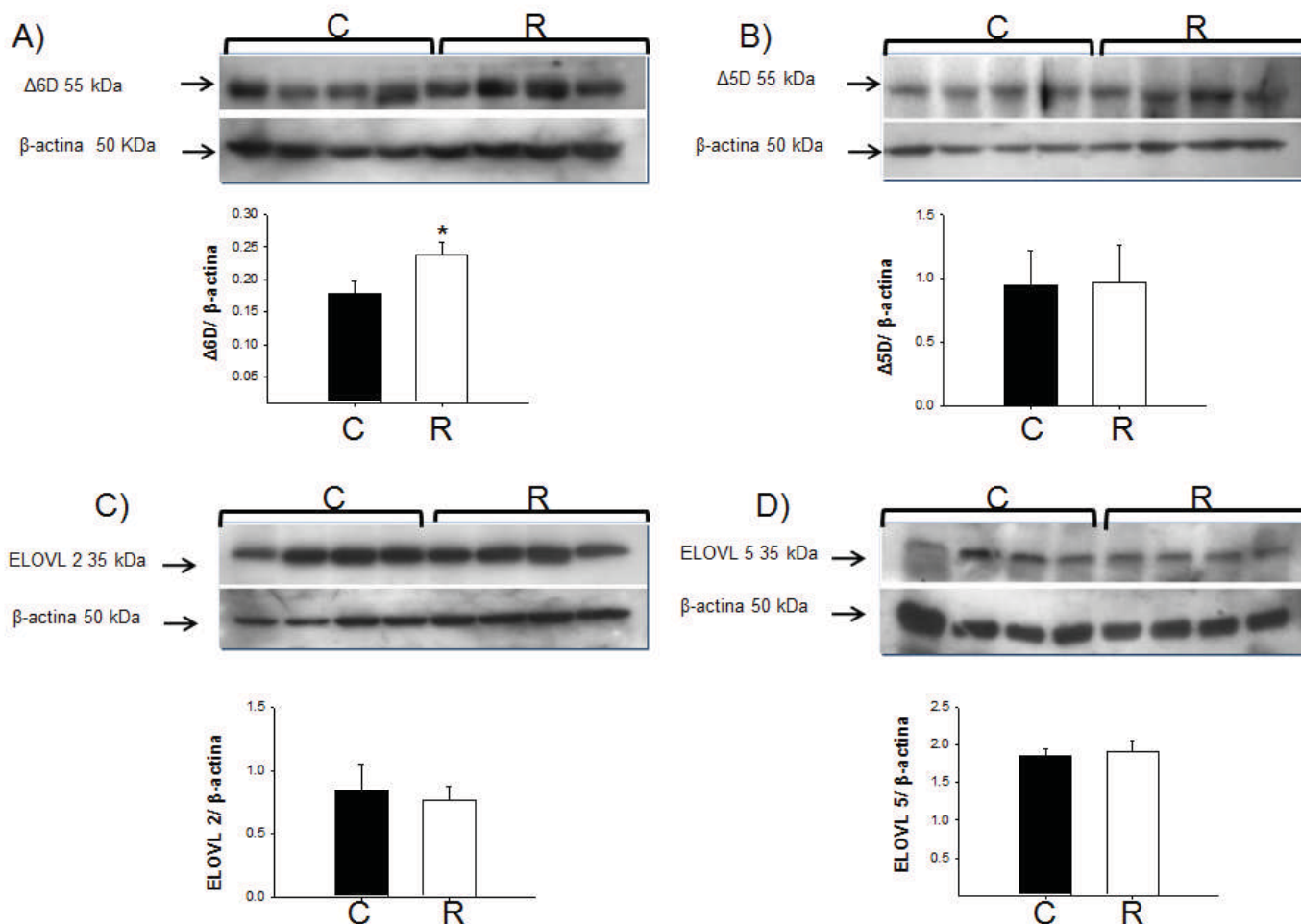
La expresión génica de las enzimas  $\Delta 5D$ ,  $\Delta 6D$ , ELOVL 2 y ELOVL 5 y el contenido de AA y DHA se observó disminuida significativamente en el grupo R con respecto al C (Figura 16). La elongasa 2 no fue detectable (ND) por este método en la GM para los dos grupos de estudio.



**Figura 16.** La abundancia relativa de la expresión génica de las enzimas A)  $\Delta 5D$  y  $\Delta 6D$ , B) ELOVL 5 y ELOVL 2, C) Ácidos grasos (%) (AA y DHA), en la glándula mamaria de las madres de 19 dG, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. n = 5 por grupo \*p < 0.01 vs C.

### 10.11 Concentración de las enzimas desaturasas y elongasas en la glándula mamaria materna a 19 dG

En el análisis de Western Blot la  $\Delta 6D$  (Figura 17A) mostro mayor expresión de la proteína en el grupo R en comparación con el C, mientras que en la expresión de las demás proteínas no encontramos diferencias significativas entre los grupos de estudio (Figura 17 B, C y D).



**Figura 17.** Concentración de las enzimas A)  $\Delta 6D$ , B)  $\Delta 5D$ , C) ELOVL 2 y D) ELOVL 5, en la glándula mamaria de las madres de 19 dG, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. n = 4 por grupo.



## RESULTADOS EN FETOS 19 dG

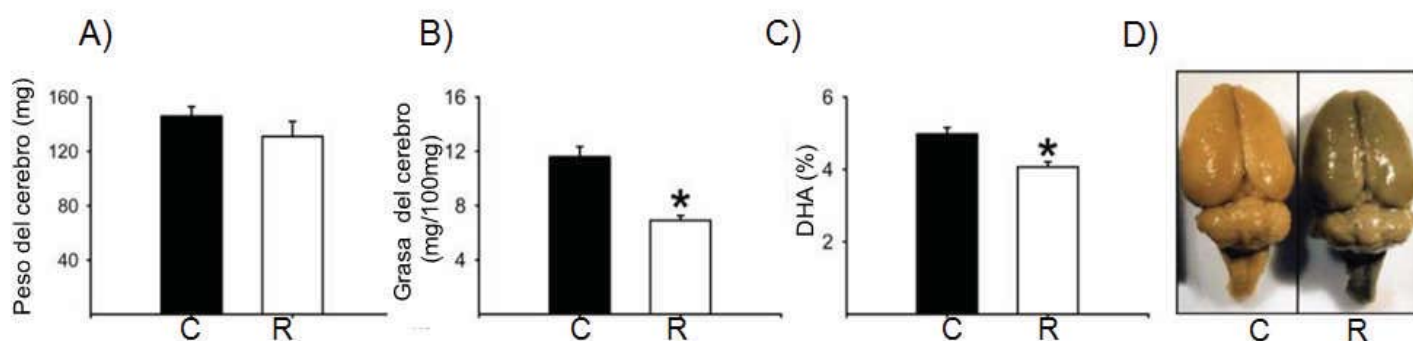
### 10.12 Parámetros fetales 19 dG

Los fetos de los diferentes grupos de estudio no presentaron diferencias con respecto al peso y tamaño de la placenta, sin embargo, el peso corporal, peso del hígado y porcentaje de grasa en hígado fueron menor en el grupo R (Tabla 8).

**Tabla 8.** Características del feto y la placenta a 19 dG, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs C.

Grupos	Control (n=7)	Restringido (n=6)
No. Fetos/madre	10.3 $\pm$ 0.9	9.2 $\pm$ 0.6
Peso de la placenta (g)	0.42 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.02
Diámetro de la placenta (mm)	0.99 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.02
Peso del feto (g)	3.1 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.1*
Peso del hígado fetal (mg)	175 $\pm$ 19	140 $\pm$ 3*
Grasa del hígado fetal (mg)	35.8 $\pm$ 1.8	18.7 $\pm$ 2.7**

El peso de los cerebros fetales no tuvo diferencia significativa (Figura 18 A), sin embargo, el contenido de grasa y el porcentaje de DHA fue menor en el cerebro del grupo R respecto del C (Figura 18 B y C). El color y aspecto de los cerebros del grupo R presentaron diferencias (puntos negros) con respecto al C (Figura 18 D).

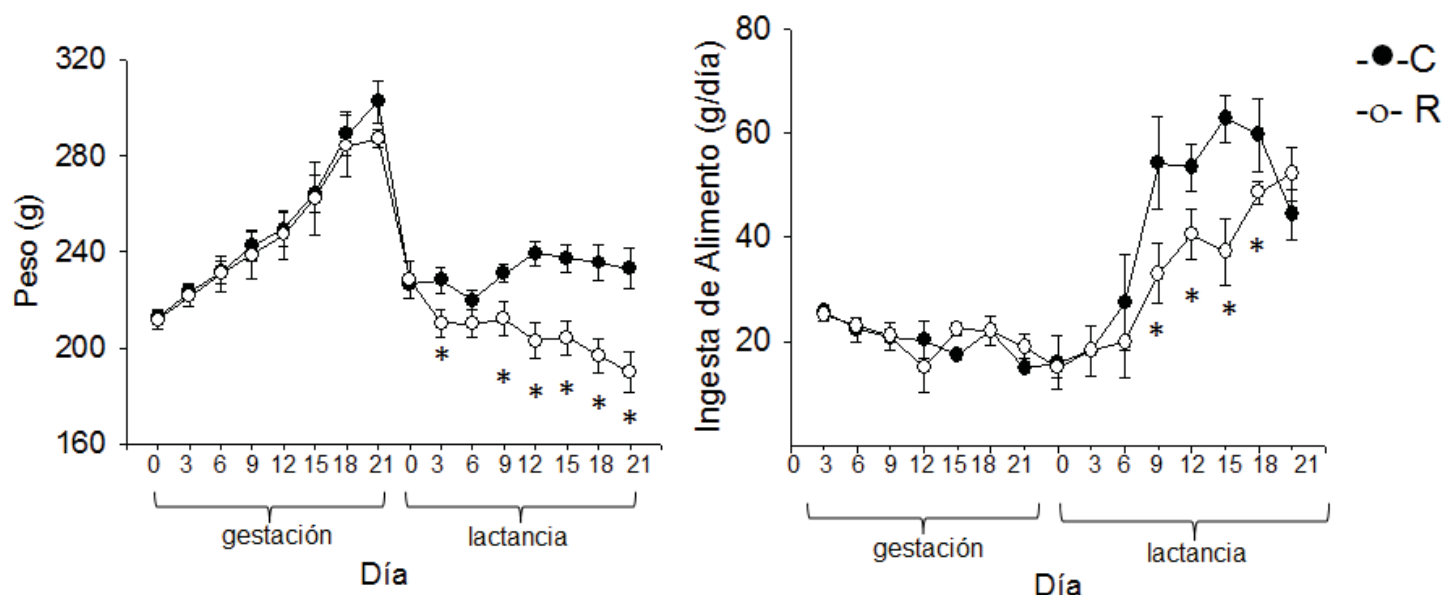


**Figura 18.** A) peso del cerebro (mg), B) grasa del cerebro (mg/100mg), C) DHA (%) y D) fotos de los cerebros de los fetos de 19 dG, de madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, n = 6-7 por grupo \* $p < 0.01$  vs C.

## RESULTADOS EN LA LACTANCIA

### 10.13 Peso materno durante la gestación y lactancia

Las madres del grupo R no tuvieron diferencia significativa en el peso durante la gestación, sin embargo, desde el día 6 de lactancia el grupo R presentó menor peso y menor ingesta de alimento, aunque al final de la lactancia no se dio ninguna diferencia en la ingesta (Figura 19).



**Figura 19.** A) peso corporal materno (g) y B) ingesta de alimento (g/día) durante la gestación y lactancia. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, n = 6-7 por grupo \*p  $\leq$  0.05.vs C.

### 10.14 Parámetros maternos a 7 dL

Las madres R tuvieron menor peso en glándula mamaria e hígado, sin embargo, no hubo diferencias en el peso corporal (Tabla 9).

**Tabla 9.** Parámetros maternos a 7 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, \*p  $\leq$  0.05.vs C.

Grupo	Control (n=7)	Restringida (n=6)
Peso corporal (g)	219 $\pm$ 4	210 $\pm$ 5
Glándula mamaria (g)	28 $\pm$ 2	17 $\pm$ 1*
Hígado (g)	13 $\pm$ 0.3	10 $\pm$ 0.4*

### 10.15 Parámetros bioquímicos maternos a 7 dL

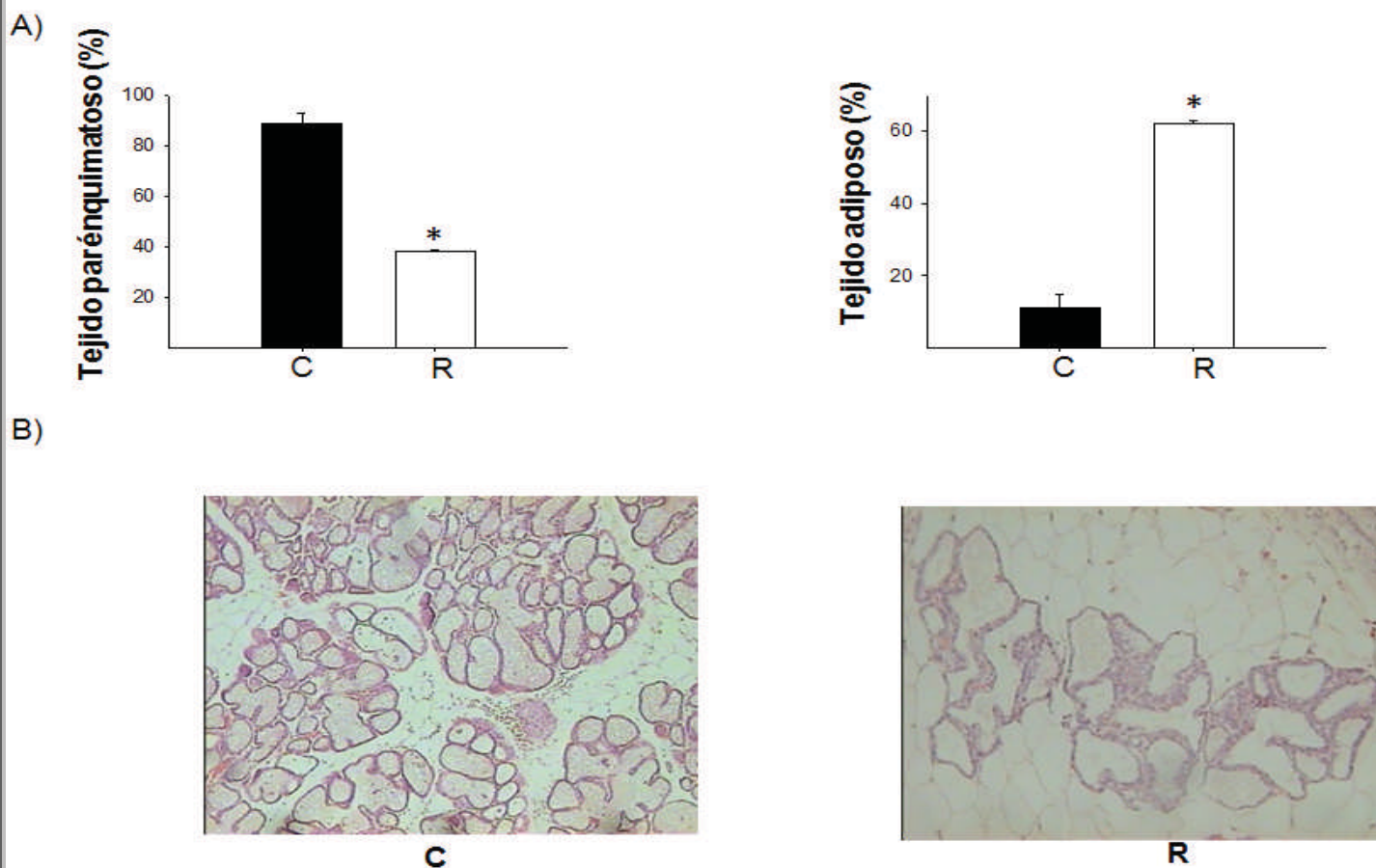
No hubo diferencias estadísticas en las concentraciones de glucosa, leptina y colesterol en los sueros de los diferentes grupos de estudio, sin embargo el restringido tuvo menor concentración de insulina y triacilglicéridos (Tabla 10).

**Tabla 10.** Parámetros bioquímicos en madres de 7 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, \* $p \leq 0.05$ .vs C.

Grupo	Control (n=7)	Restringida (n=6)
Glucosa (mg/dl)	103 $\pm$ 5	95 $\pm$ 8
Insulina (ng/ml)	1.5 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.09*
Leptina (ng/ml)	2.8 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.4
Triacilglicéridos (mg/dl)	78 $\pm$ 11	40 $\pm$ 5*
Colesterol (mg/dl)	39 $\pm$ 4	34 $\pm$ 1

## 10.16 Histología de la glándula mamaria 7 dL

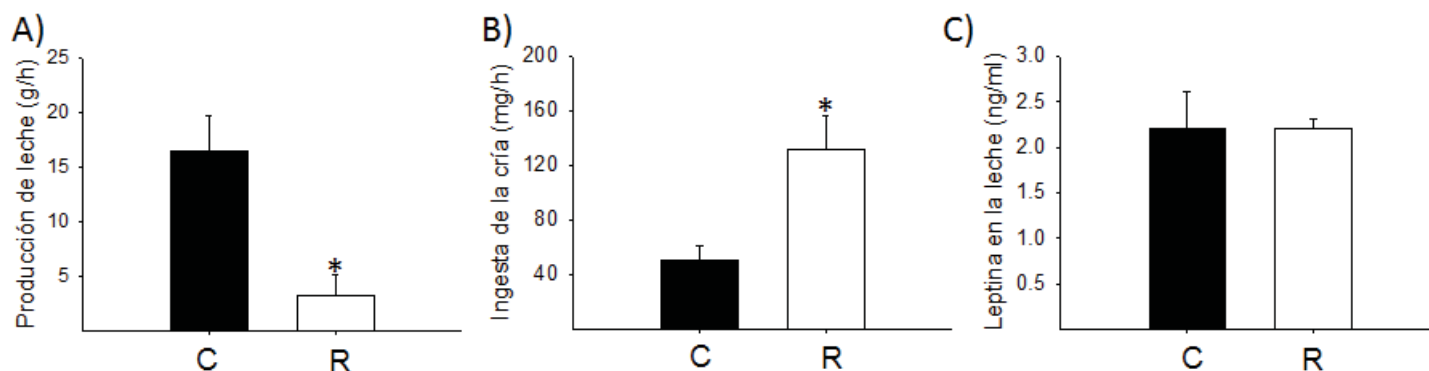
El análisis histológico y las microfotografías muestran que el grupo C tiene mayor desarrollo lóbulo alveolar y menor tejido adiposo respecto a los grupos R donde se ve que existe mayor presencia de tejido adiposo y menor desarrollo glandular a 7dL (Figura 20).



**Figura 20.** A) análisis histológico (% de área) y B) microfotografías de la glándula mamaria de las madres a 7 dL, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, n = 6-7 por grupo \* $p \leq 0.05$  vs C.

### 10.17 Producción y concentración de leptina en la leche 7 dL

A 7 dL las madres R tienen menor producción de leche (Figura 21 A), pero mayor consumo por parte de las crías (Figura 21 B). Con respecto a la concentración de leptina en la leche (Figura 21 C), no existe ninguna diferencia significativa.



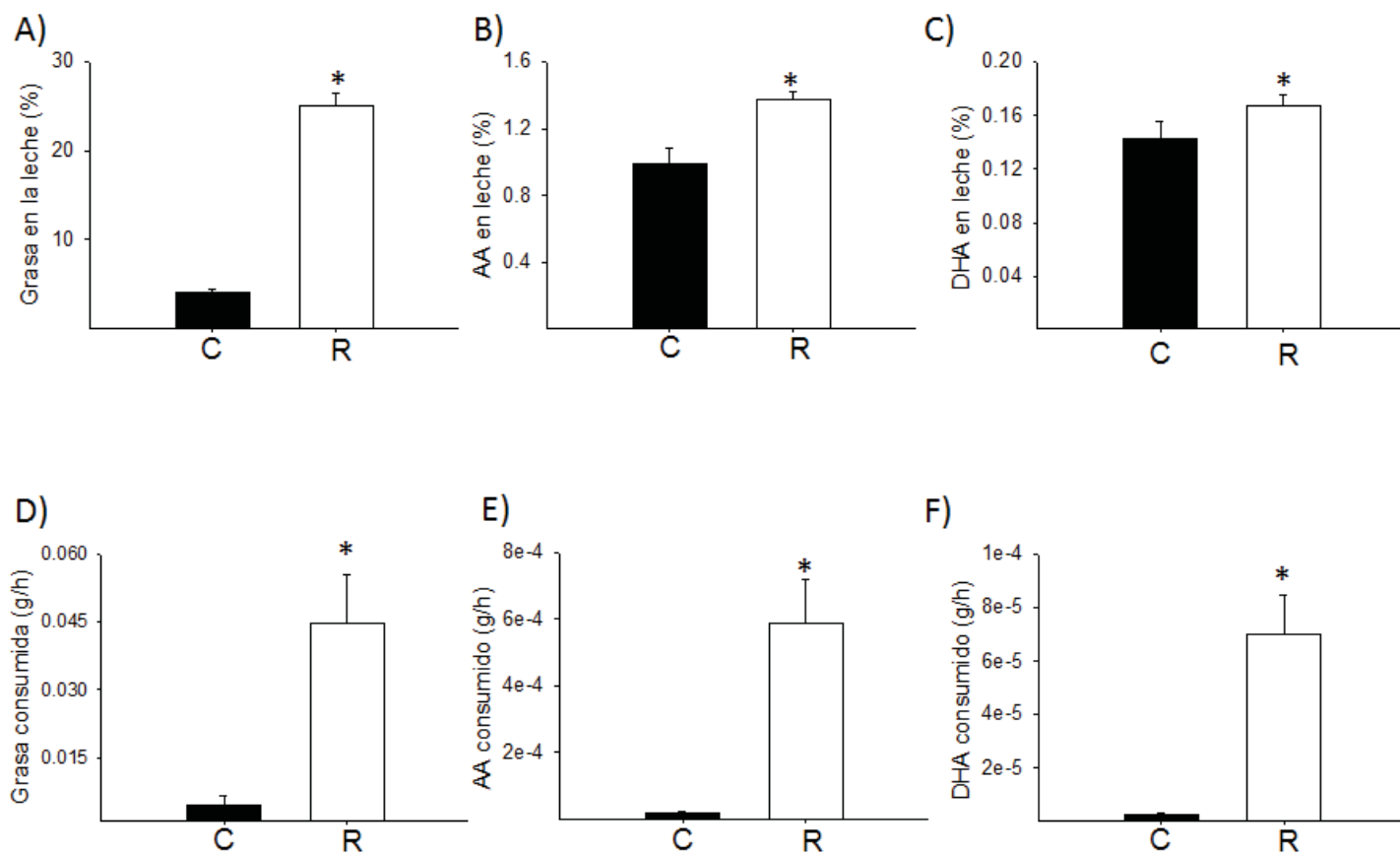
**Figura 21.** A) producción de leche (g/h), B) ingesta de leche de la cría (mg/h) y C) concentración de leptina en la leche 7 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, n = 6-7 por grupo \*p  $\leq$  0.05.vs C.

### 10.18 Grasa total y contenido de ácidos grasos en la leche de madres de 7 dL

El contenido de ácidos monoinsaturados, poliinsaturados, omega 6 y AA (C=  $1.0 \pm 0.1$  vs R=  $1.3 \pm 0.06^*$  %) es mayor en el grupo R. Sin embargo, el ácido láurico (C=  $9.8 \pm 0.5$  vs R=  $7.3 \pm 0.5^*$  %), el ácido mirístico (C=  $15 \pm 1$  vs R=  $9 \pm 1^*$  %) y el ácido palmítico (C=  $37 \pm 1$  vs R=  $29 \pm 1^*$  %) se encontraron en menor proporción en el grupo R vs C. El porcentaje de DHA (C=  $0.14 \pm 0.01$  vs R=  $0.17 \pm 0.02$  %), no fue diferente entre los grupos de estudio. Cabe mencionar que aunque la producción de la madre es menor (Figura 22), el consumo de grasa y de los componentes grasos es mayor en el grupo R (Tabla 11 y Figura 22).

**Tabla 11.** Concentración de ácidos grasos en la leche a 7 dL, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, \*p  $\leq$  0.05.vs C.

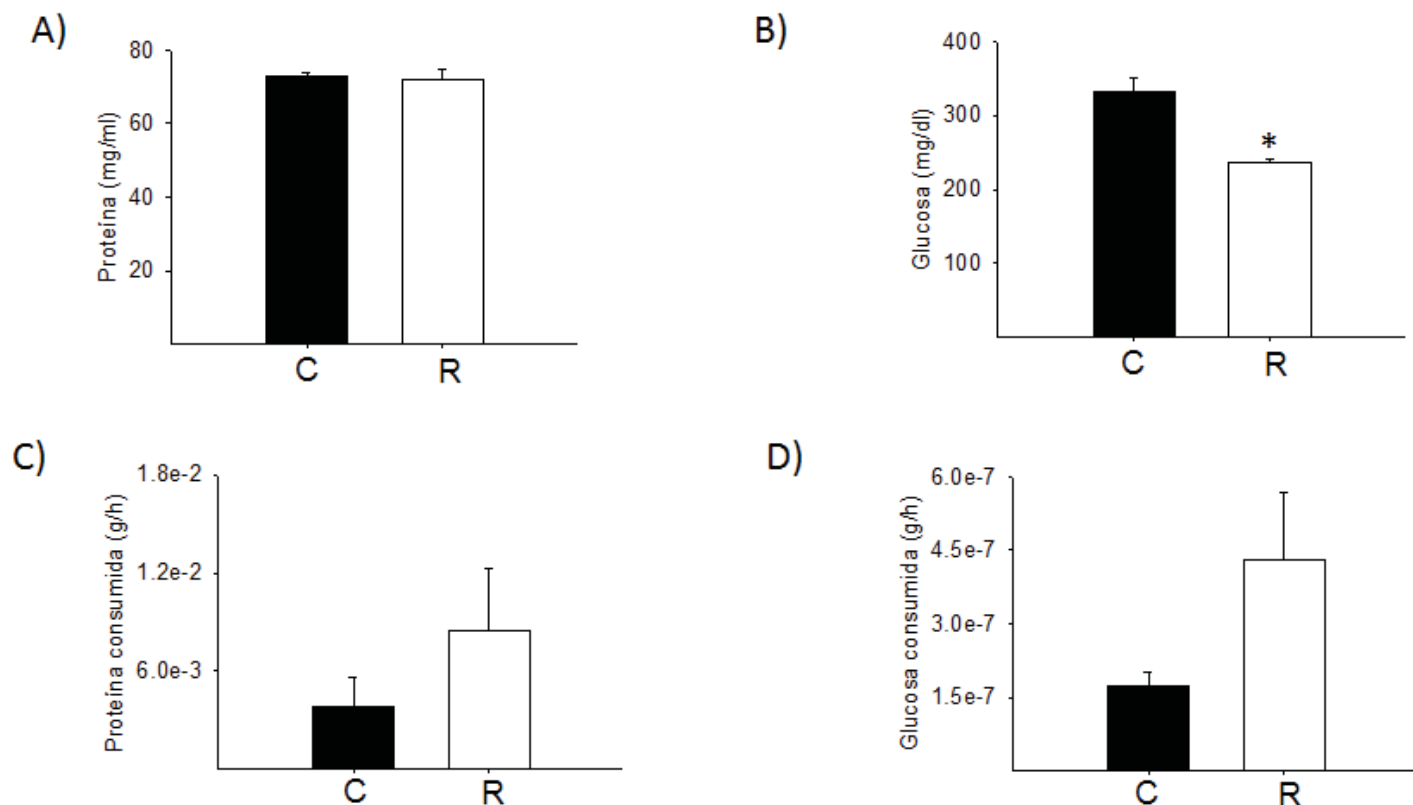
Ácidos Grasos (%)	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Total monoinsaturados	22 $\pm$ 1.0	30 $\pm$ 3.0*
Total saturados	66 $\pm$ 2.0	50 $\pm$ 2.0*
Total poliinsaturados	11 $\pm$ 1.0	20 $\pm$ 2.0*
Omega 3	0.3 $\pm$ 0.02	1.0 $\pm$ 0.8*
Omega 6	11 $\pm$ 1.0	19 $\pm$ 1.0*



**Figura 22.** A) grasa total (%), B) AA (%), C) DHA (%), D) grasa consumida (g/h), E) AA consumido (g/h) y F) DHA consumido (g/h), en leches de 7 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, n = 6-7 por grupo \*p  $\leq$  0.05.vs C.

### 10.19 Composición bioquímica de la leche de madres a 7 dL

La concentración de glucosa en la leche fue menor en el grupo R; Respecto al consumo en proteína y glucosa calculada, observamos que no hubo diferencia entre los grupos de estudio (Figura 23).



**Figura 23.** Composición química de la leche. A) proteína (mg/ml), B) glucosa (mg/dl), C) proteína consumida (g/h) y D) glucosa consumida (g/h) en leche de 7dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, n = 6-7 por grupo \*p  $\leq$  0.05.vs C.

## 10.20 Parámetros maternos a 14 dL

El peso corporal, peso de la glándula mamaria y del hígado de las madres R a 14 dL fue menor respecto al grupo C (Tabla 12).

**Tabla 12.** Parámetros maternos a 14 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, \* $p \leq 0.05$ .vs C.

Grupo	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Peso corporal (g)	237 $\pm$ 6	204 $\pm$ 7*
Glándula mamaria (g)	38 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1*
Hígado (g)	16 $\pm$ 0.8	12 $\pm$ 0.4*

## 10.21 Parámetros bioquímicos maternos a 14 dL

No hubo diferencias estadísticas en las concentraciones de glucosa y colesterol en los grupos de estudio, sin embargo en la concentración de leptina, insulina y triacilglicéridos fue menor el grupo R en comparación con el grupo C (Tabla 13).

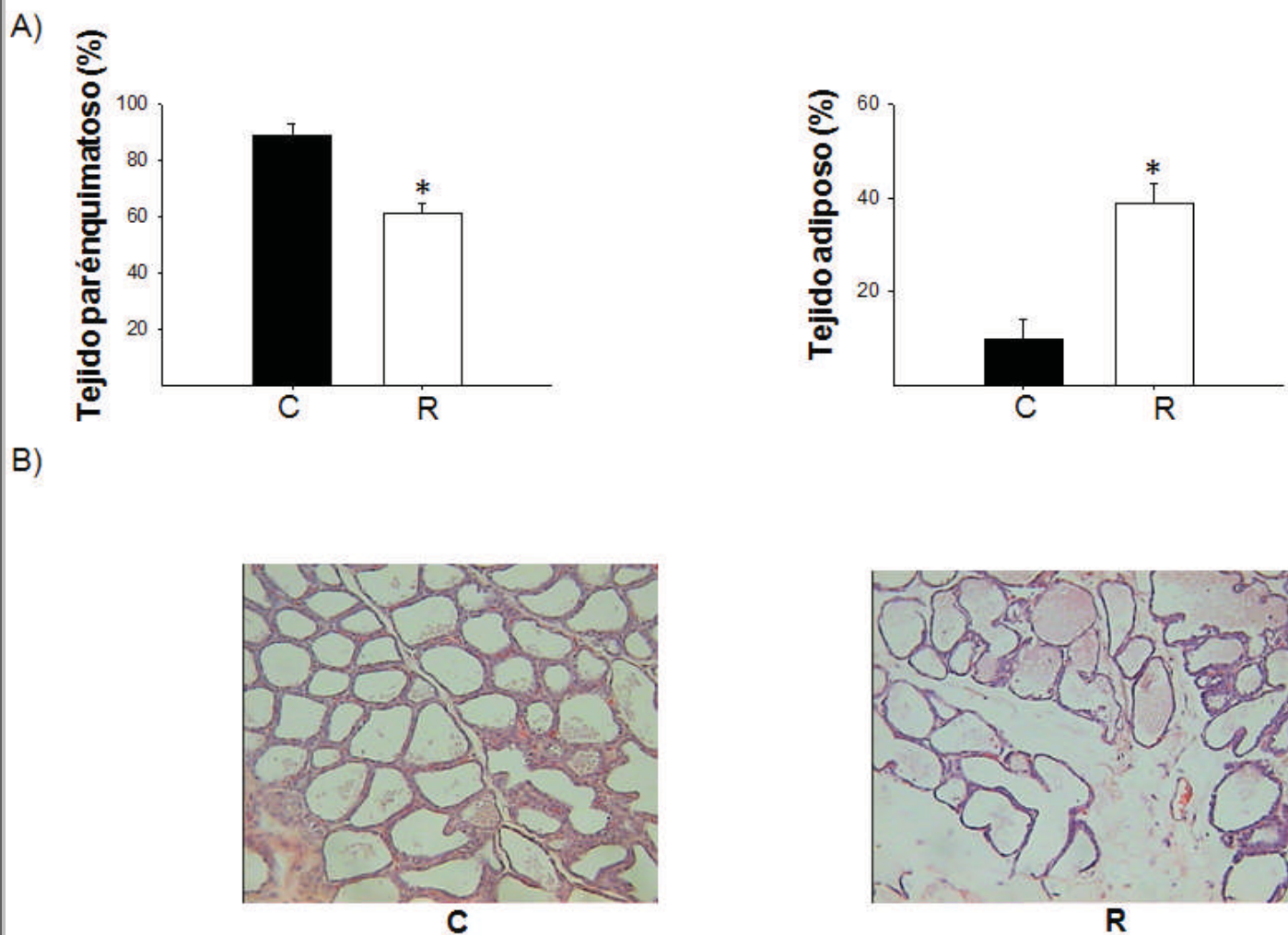
**Tabla 13.** Parámetros bioquímicos en madres de 14 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, \* $p \leq 0.05$ .vs C.

Grupo	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Glucosa (mg/dl)	99 $\pm$ 10	96 $\pm$ 4
Insulina (ng/ml)	1.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.07*
Leptina (ng/ml)	5.7 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.07*
Triacilglicéridos (mg/dl)	92 $\pm$ 19	44 $\pm$ 6*
Colesterol (mg/dl)	39 $\pm$ 1	41 $\pm$ 1



## 10.22 Histología de la glándula mamaria 14 dL

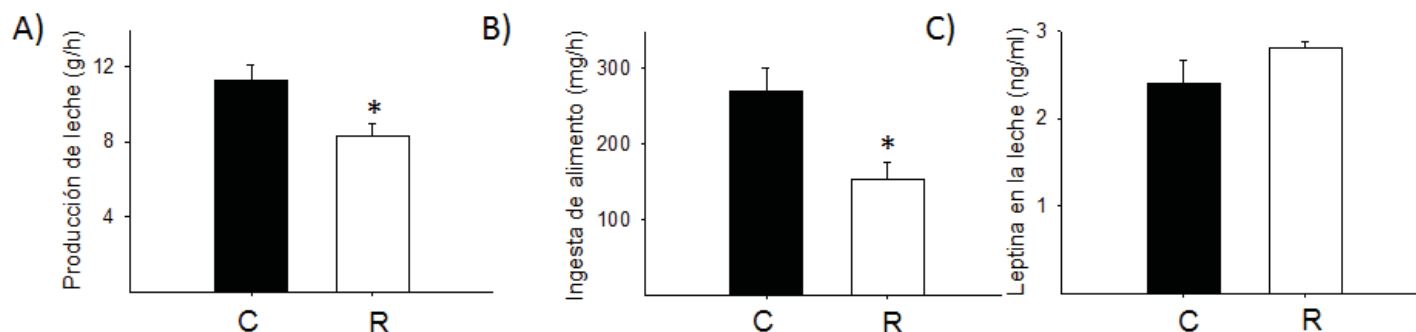
El análisis histológico y las microfotografías muestran que el grupo C tiene mayor desarrollo lóbulo alveolar y menor tejido adiposo respecto al grupo R, donde se ve que existe mayor presencia de tejido adiposo y menor desarrollo glandular (Figura 24).



**Figura 24.** A) análisis histológico (% de área) y B) microfotografías de la glándula mamaria de las madres a 14 dL, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE, n = 6-7 por grupo \* $p \leq 0.05$ .vs C.

### 10.23 Producción e ingesta de alimento de las crías y concentración de leptina en la leche 14 dL

A 14 dL las madres que producen menor cantidad de leche (Figura 25 A) y las crías que menor ingesta de leche tienen (Figura 25 B) son las del grupo R en comparación con su grupo C. Con respecto a la concentración de leptina en la leche no hubo diferencias entre los grupos de estudio (Figura 25 C).



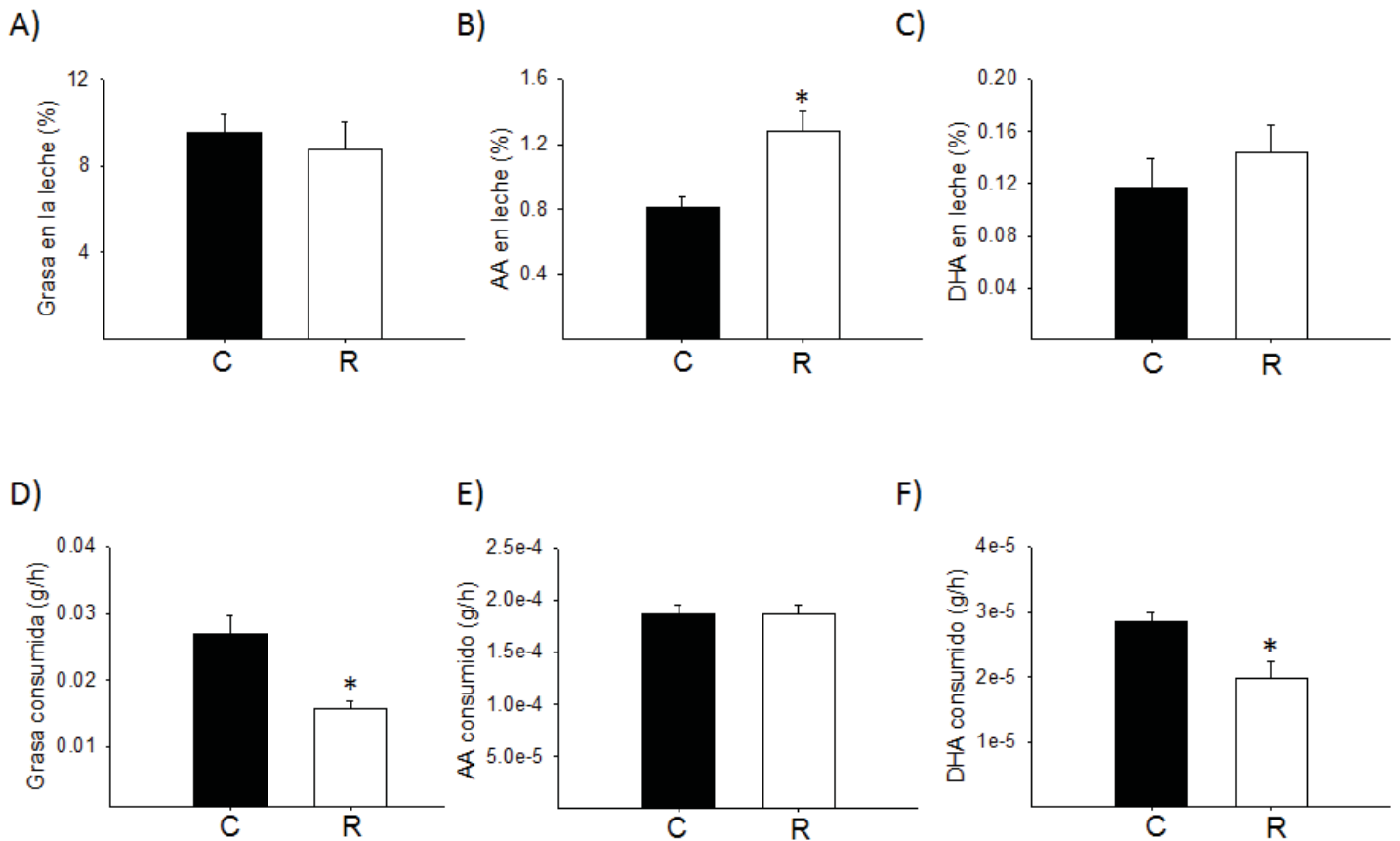
**Figura 25.** A) producción de leche (g/h), B) ingesta de alimento (mg/h) y C) concentración de leptina en la leche en madres de 14 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE.  $n = 6-7$  por grupo \*  $p \leq 0.05$  vs C.

### 10.24 Grasa total y contenido de ácidos grasos en la leche de madres de 14 dL

El contenido de ácidos grasos monoinsaturados, poliinsaturados en la leche es mayor en el grupo R mientras que los saturados son menores en el mismo grupo (Tabla 14). En cuanto a su análisis individual observamos que el ácido láurico (C=  $12 \pm 1$  vs R=  $8.4 \pm 0.6^*$  %), ácido mirístico (C=  $15 \pm 2$  vs R=  $10 \pm 0.8^*$  %), ácido palmítico (C=  $35 \pm 1$  vs R=  $10 \pm 0.8^*$  %), se encontraron en menor contenido en el grupo R comparado contra su C. Con respecto al porcentaje de grasa y DHA no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio (Figura 26 A y B), pero el porcentaje de AA en el grupo R fue mayor con respecto al grupo C (Figura 26 C). Cabe mencionar que debido a la menor producción de leche materna y a la menor ingesta de alimento por parte de las crías (Figura 25 A y B), existe menor ingesta de grasa (Figura 26 D) y menor ingesta de DHA (Figura 26 F) y en cuanto al consumo de AA no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio (Figura 26 E).

**Tabla 14.** Concentración de ácidos grasos en la leche a 14 dL, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \*  $p \leq 0.05$  vs C.

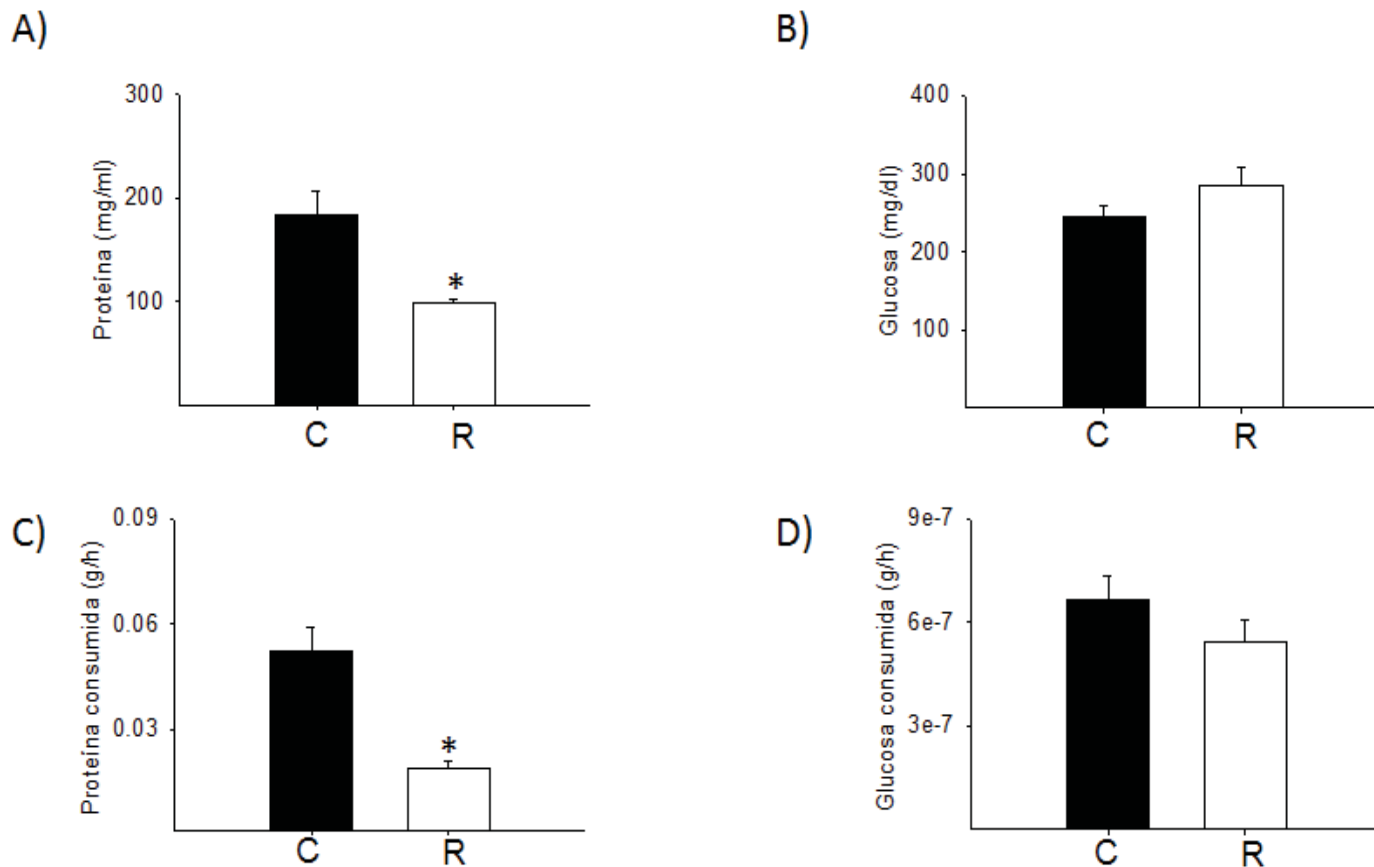
Ácidos Grasos (%)	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Total monoinsaturados	26 $\pm$ 2	33 $\pm$ 1*
Total saturados	66 $\pm$ 4	55 $\pm$ 2*
Total poliinsaturados	7.3 $\pm$ 1	13 $\pm$ 0.9*
Omega 3	0.1 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.03*
Omega 6	7.2 $\pm$ 1.5	12.3 $\pm$ 0.9*



**Figura 26.** A) grasa total (%), B) AA (%), C) DHA (%), D) grasa consumida (g/h), E) AA consumido (g/h) y F) DHA consumido (g/h), en madres a 14 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. n = 6-7 por grupo\*  $p \leq 0.05$  vs C.

## 10.25 Composición bioquímica de la leche de madres de 14 dL

A 14 dL la concentración de proteína y el consumo de la misma fue menor en el grupo R, sin embargo el contenido de glucosa no fue diferente entre los grupos de estudio (Figura 27).



**Figura 27.** Composición química de la leche. A) proteína (mg/ml), B) glucosa (mg/dl), C) proteína consumida (g/h) y D) glucosa consumida (g/h) en leche de 14 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. n = 6-7 por grupo \*  $p \leq 0.05$  vs C.

### 10.26 Parámetros maternos a 21 dL

El peso corporal y el de la glándula mamaria fue menor en el grupo R en comparación con el C (Tabla 15), sin embargo el peso del hígado no mostro ninguna diferencia estadística.

**Tabla 15.** Parámetros maternos 21dL, madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \*  $p \leq 0.05$  vs C.

Grupo	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Peso corporal (g)	233 $\pm$ 8	189 $\pm$ 8*
Glándula mamaria (g)	25 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2*
Hígado (g)	12 $\pm$ 0.2	11 $\pm$ 0.7

### 10.27 Parámetros bioquímicos maternos día 21 dL

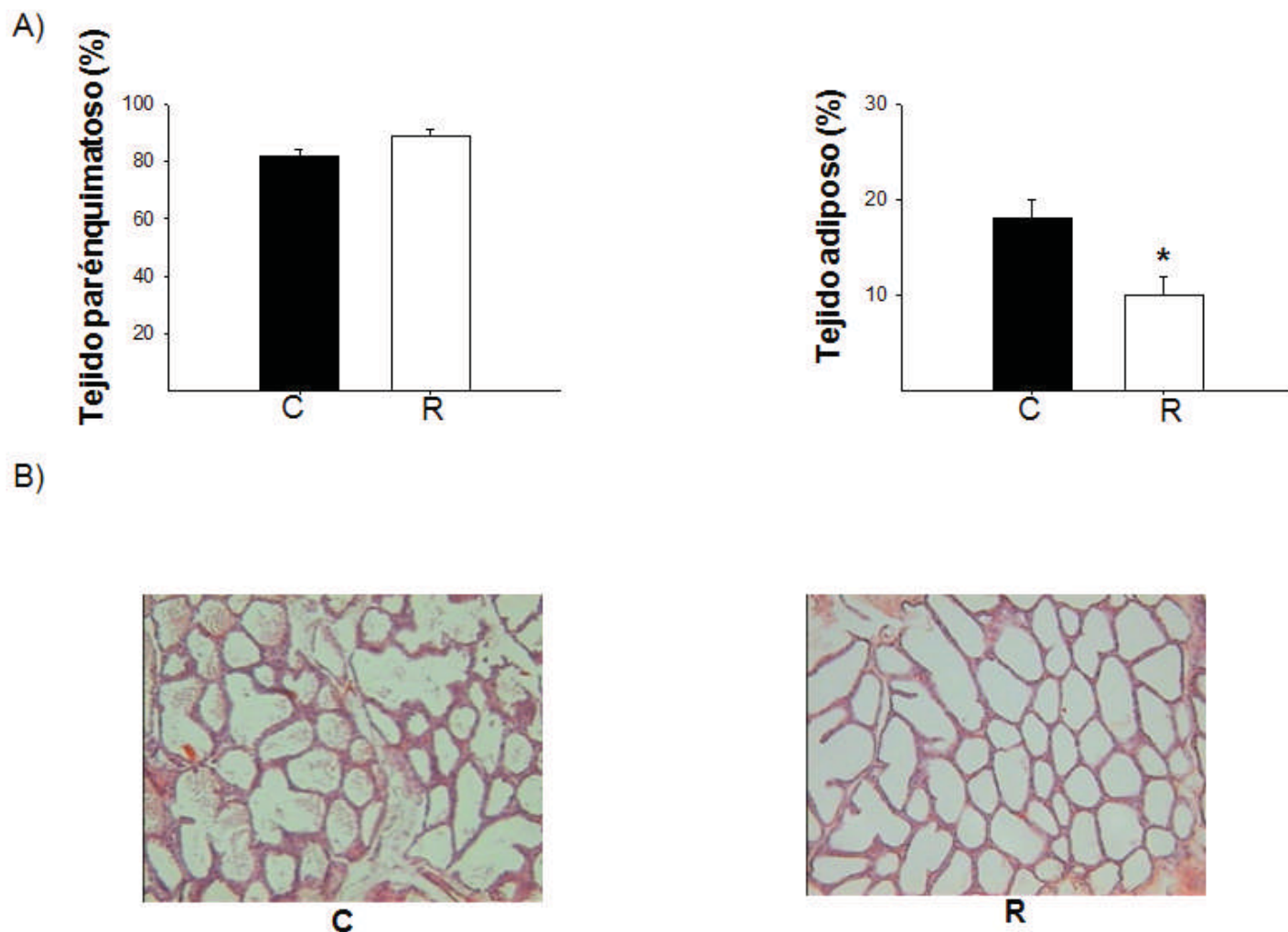
La concentración de insulina, triacilglicéridos y colesterol fue menor en el grupo R, mientras que la glucosa y leptina no tuvieron diferencias significativas entre los grupos de estudio (Tabla 16).

**Tabla 16.** Parámetros bioquímicos en madres de 21 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \*  $p \leq 0.05$  vs C.

Grupo	Control (n=7)	Restringido (n=6)
Glucosa mg/dl	102 $\pm$ 8	97 $\pm$ 5
Insulina ng/ml	1.2 $\pm$ 0.08	0.2 $\pm$ 0.01*
Leptina ng/ml	1.8 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2
TG mg/dl	75 $\pm$ 7.9	59 $\pm$ 2.6*
Colesterol mg/dl	58 $\pm$ 4.2	49 $\pm$ 1.3*

## 10.28 Histología de la glándula mamaria 21 dL

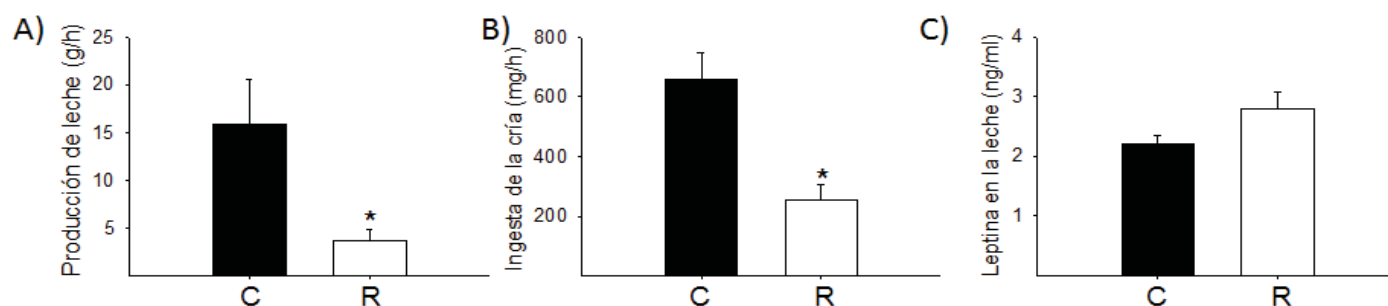
El análisis histológico y las microfotografías muestran que al final de la lactancia los grupos de estudios son semejantes en cuanto al desarrollo lóbulo alveolar aunque el contenido de grasa es menor en el grupo R (Figura 28).



**Figura 28.** A) análisis histológico (% de área) y B) microfotografías de la glándula mamaria de las madres a 21 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE.  $n = 6-7$  por grupo \*  $p \leq 0.05$  vs C.

### 10.29 Producción y concentración de leptina en la leche 21 dL

El grupo R tuvo menor producción de leche y menor consumo por parte de la cría, la concentración de leptina en la leche no fue diferente (Figura 29).



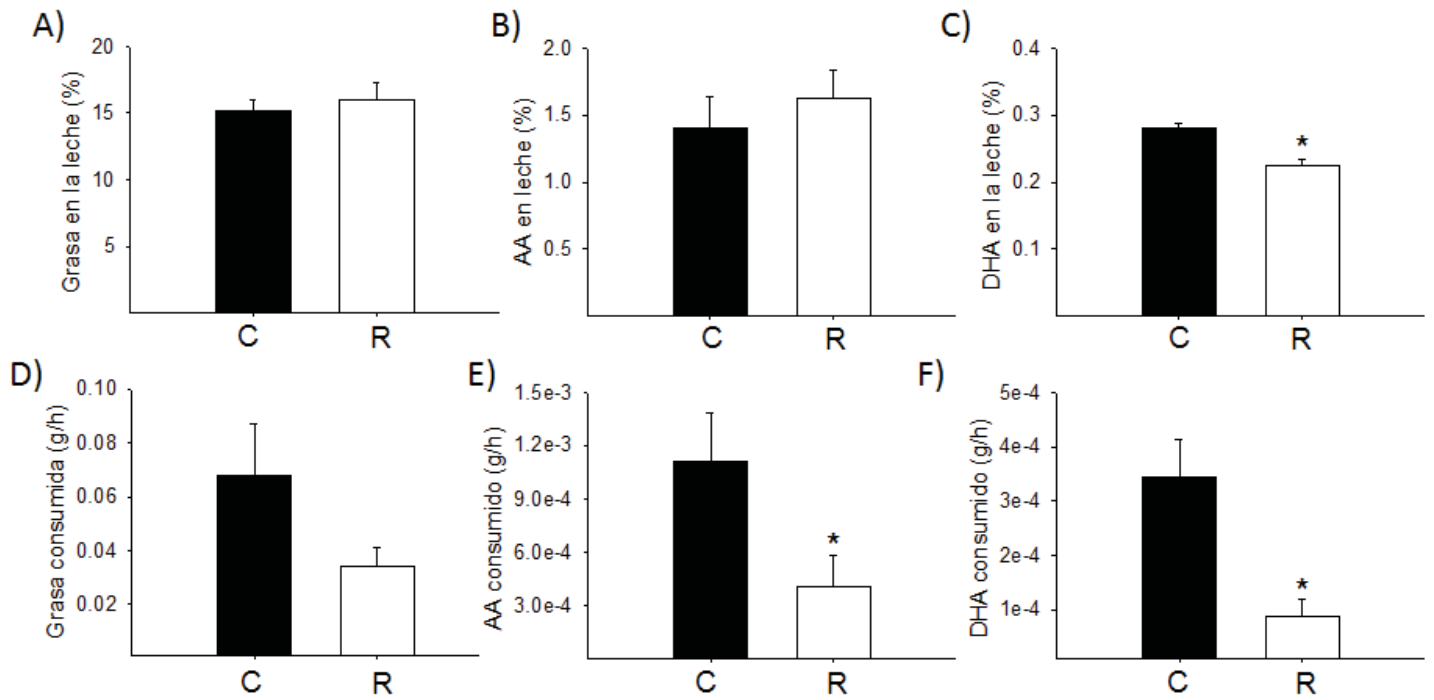
**Figura 29.** A) producción de leche (g/h), B) Ingesta de alimento (mg/h) y C) concentración de leptina en la leche en madres de 21 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. n = 6-7 por grupo \*  $p \leq 0.05$  vs C.

### 10.30 Grasa total y contenido de ácidos grasos en la leche de madres de 21 dL

En el análisis del porcentaje total, tanto de grasa, como de AA y DHA no tuvimos diferencias significativas (Figura 30 A, B y C). sin embargo los ácidos grasos monoinsaturados se encuentran en menor proporción en el grupo R vs el C, con respecto a los demás componentes no se muestra diferencias significativas, (Tabla 17) sin embargo, en el análisis individual observamos que el ácido láurico (C=  $12.5 \pm 0.7$  vs R=  $10 \pm 0.2^*$  %), el ácido palmitoleico (C=  $3.2 \pm 0.2$  vs R=  $2.4 \pm 0.2^*$  %), el ácido oleico (C=  $27 \pm 1$  vs R=  $23 \pm 0.6^*$  %) y DHA (C=  $0.4 \pm 0.02$  vs R=  $0.2 \pm 0.007^*$  %) están en menor porcentaje en la leche de R vs C y debido a la menor producción materna y el menor consumo por parte de la cría (Figura 29 A y B) observamos que el grupo R consume menos AA y menos DHA (Figura 30 E y F).

**Tabla 17.** Concentración de ácidos grasos en la leche a 14 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \*  $p \leq 0.05$  vs C.

Ácidos Grasos (%)	Control (n=7)	Restringido ( n=6)
Total monoinsaturados	$30 \pm 1.2$	$26 \pm 0.8^*$
Total saturados	$48 \pm 3.6$	$50 \pm 1.7$
Total poliinsaturados	$22 \pm 1.4$	$23 \pm 1.3$
Omega 3	$0.5 \pm 0.07$	$0.5 \pm 0.02$
Omega 6	$22 \pm 1.3$	$23 \pm 1.2$

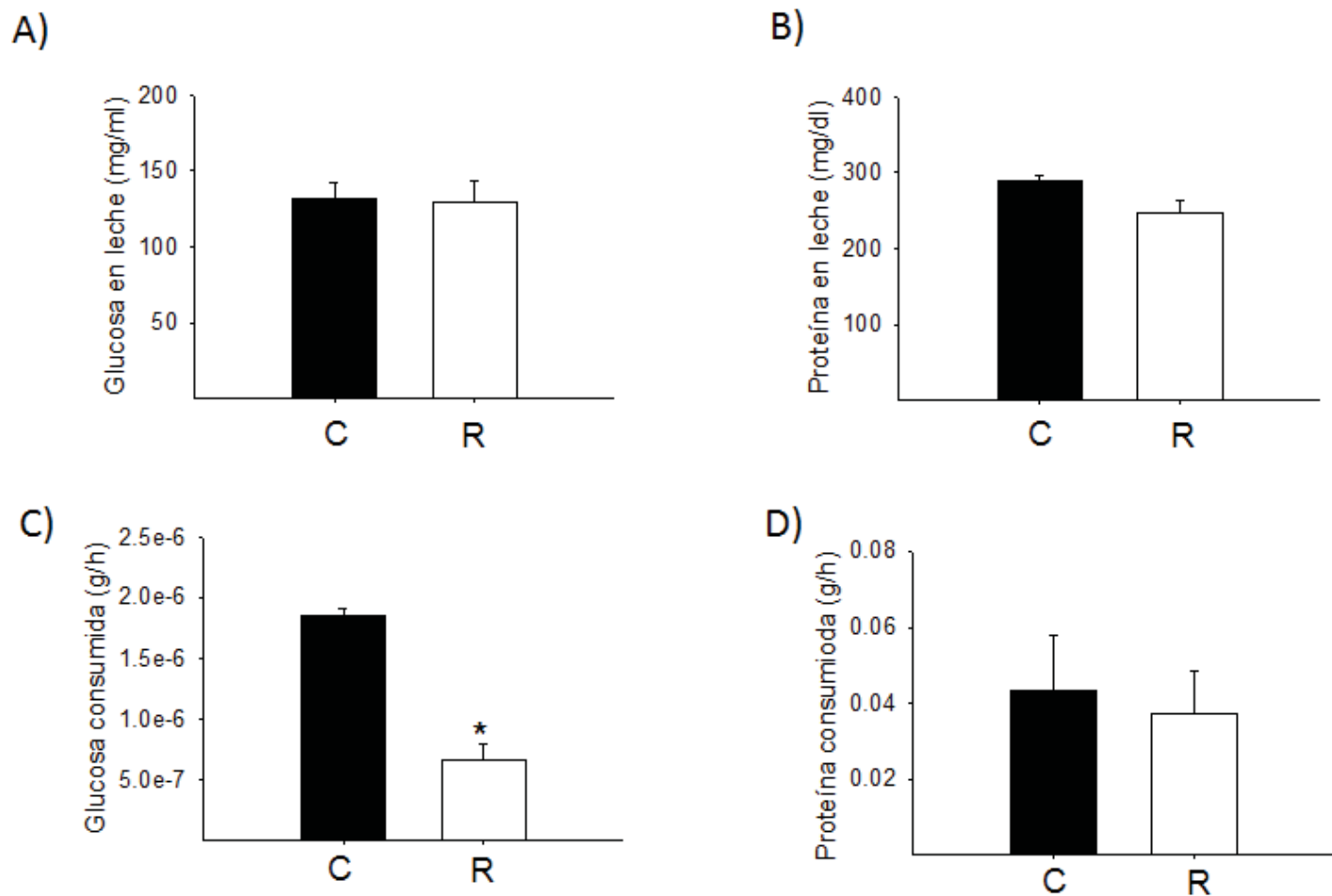


**Figura 30.** A) grasa total (%), B) AA (%), C) DHA (%), D) grasa consumida (g/h), E) AA consumido (g/h) y F) DHA consumido (g/h), en madres de 21 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE.  $n = 6-7$  por grupo \*  $p \leq 0.05$  vs C.



### 10.31 Composición bioquímica de la leche de madres de 21 dL

Al día 21 dL no hubo diferencias significativas en la concentración de glucosa y proteína en los grupos de estudio, pero si observamos menor consumo de glucosa por parte del grupo R (Figura 31).



**Figura 31.** Composición química de la leche A) glucosa (mg/dl), B) proteína (mg/ml), C) glucosa consumida (g/h) y D) proteína consumida (g/h) en leche de 21dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. n = 6-7 por grupo \*  $p \leq 0.05$  vs C.

## RESULTADOS DE LAS CRÍAS DURANTE LA LACTANCIA

### 10.32 Parámetros de las crías al nacimiento, 7,14 y 21 dL

Al día del nacimiento tanto hembras como machos no tuvieron ninguna diferencia significativa en peso, observamos menor diámetro cefálico en las hembras y machos del grupo R y menor longitud corporal en las hembras respecto de los machos. Al día 7, 14 y 21 las crías provenientes de madres restringidas, tuvieron menor peso corporal así como menor peso del hígado y del cerebro (Tabla 18).

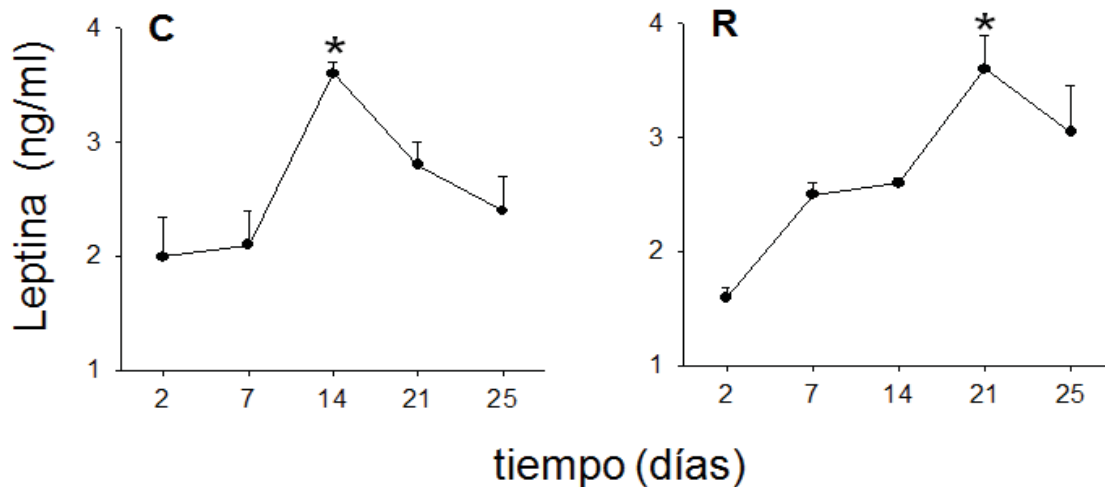
**Tabla 18.** Medidas morfométricas al día del nacimiento y peso corporal, del hígado y cerebro de las crías a 7, 14 y 21 dL. Madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE. \* $p \leq 0.05$  vs C. # $p \leq 0.05$  significa diferente entre sexos.

	Grupo	Control (n=12)	Restringido (n=14)
Nacimiento	♂ Peso corporal (g)	6.4 $\pm$ 0.2	6.1 $\pm$ .02
	♂ diámetro cefálico (mm)	11 $\pm$ 0.08	10 $\pm$ 0.1*
	♂ diámetro abdominal (mm)	14 $\pm$ 0.1	14 $\pm$ 0.1
	♂ longitud corporal (mm)	50 $\pm$ 0.2	51 $\pm$ 0.6
	♀ Peso corporal (g)	5.7 $\pm$ 0.2	5.7 $\pm$ 0.2
	♀ diámetro cefálico (mm)	11 $\pm$ 0.2	10 $\pm$ 0.1*
	♀ diámetro abdominal (mm)	13 $\pm$ 0.1	13 $\pm$ 0.1
	♀ longitud corporal (mm)	48 $\pm$ 0.3	48 $\pm$ 0.4 <sup>#</sup>
7dL	♂ Peso corporal (g)	12 $\pm$ 1.2	11 $\pm$ 0.5
	♂ Peso hígado (g)	0.92 $\pm$ 0.01	0.79 $\pm$ 0.01*
	♂ Peso cerebro (g)	0.36 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01
	♀ Peso corporal (g)	11 $\pm$ 1.0	10 $\pm$ 0.4
	♀ Peso hígado (g)	0.9 $\pm$ 0.01	0.6 $\pm$ 0.01*
	♀ Peso cerebro (g)	0.5 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.009*

14dL	♂ Peso corporal (g)	21 ± 1.1	15 ± 0.8*
	♂ Peso hígado (g)	1.2 ± 0.02	0.9 ± 0.06*
	♂ Peso cerebro (g)	1.0 ± 0.02	0.9 ± 0.009*
	♀ Peso corporal (g)	20 ± 1.1	14 ± 0.7 *
	♀ Peso hígado (g)	1.2 ± 0.02	0.9 ± 0.01*
	♀ Peso cerebro (g)	1.0 ± 0.004	0.9 ± 0.006*
21dL	♂ Peso corporal (g)	30 ± 3.0	17 ± 1.7*
	♂ Peso hígado (g)	1.5 ± 0.06	0.9 ± 0.1*
	♂ Peso cerebro (g)	1.6 ± 0.03	1.4 ± 0.02*
	♀ Peso corporal (g)	29 ± 2.8	16 ± 1.8*
	♀ Peso hígado (g)	1.5 ± 0.04	1.0 ± 0.02*
	♀ Peso cerebro (g)	1.5 ± 0.02	1.3 ± 0.03*

### 10.33 Concentraciones séricas de leptina en las crías

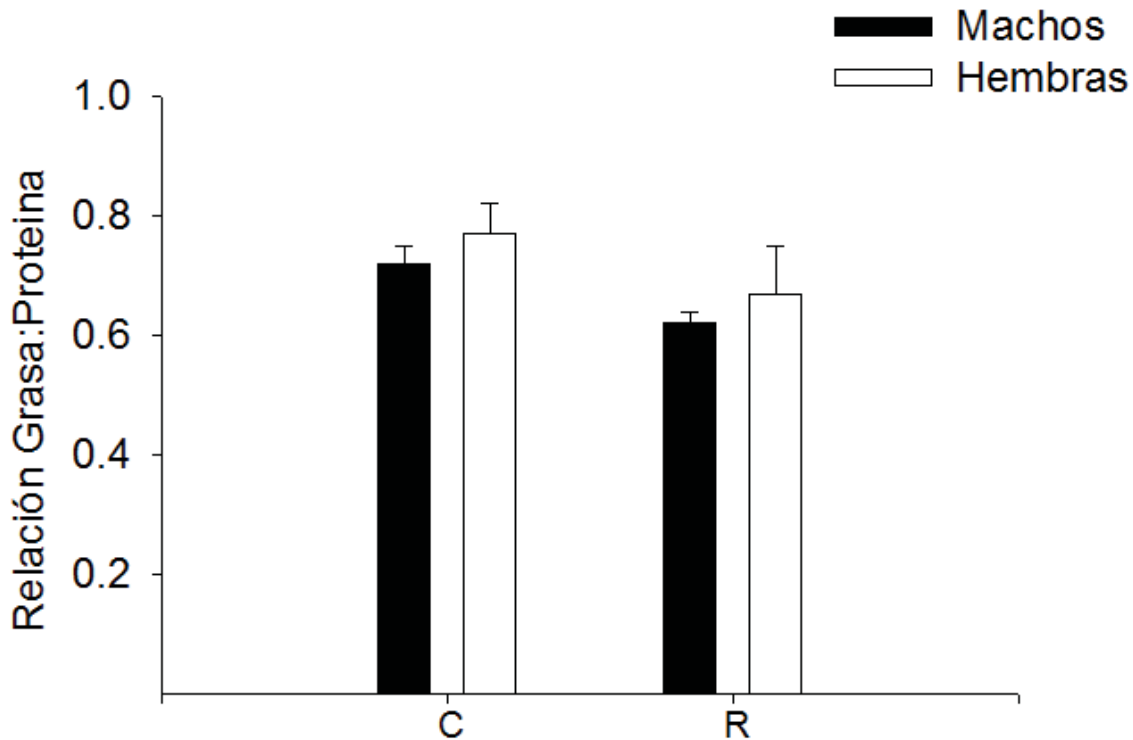
En las gráficas se observa un retraso en el aumento de la concentración de leptina en el grupo R en comparación con el grupo C (Figura 32).



**Figura 32.** Concentración de leptina en el suero de las crías de 2, 7, 14, 21 y 25 días de madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media ± EE. n = 6-7 por grupo. \*El valor máximo de leptina en el mismo grupo p ≤ 0.05.

### 10.34 Composición corporal de las crías a 21 dL.

En la relación grasa: proteína corporal de las crías se observó que no hubo diferencias entre sexos y los grupos de estudio (Figura 33).



**Figura 33.** Relación (grasa:proteína) de las crías a 21 dL de madres alimentadas con dieta control (C-20%) o restringida (R-10%). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE.  $n = 6-7$  por grupo \*  $p \leq 0.05$  vs C.

# DISCUSIÓN



## 11. DISCUSION

Muchos investigadores han examinado el efecto de la desnutrición materna durante el embarazo y la lactancia en las crías, sin embargo, pocos estudios han tomado en cuenta el impacto de la restricción proteínica sobre las adaptaciones del metabolismo e implicaciones en el desarrollo de órganos claves maternos y sus efectos en la formación del cerebro del feto y neonato durante la gestación y la lactancia. La desnutrición temprana afecta la susceptibilidad a las enfermedades crónicas en la edad adulta (154), y la dieta materna baja en proteínas puede programar la actividad enzimática de las crías (155). Estudios previos indican que las crías de ratas alimentadas con dieta baja en proteínas durante el embarazo, tenían mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades crónicas en la vida adulta (5, 38) y las madres las cuales habían sido sometidas a estas condiciones de restricción, desarrollaban adaptaciones metabólicas para mantener la demanda de sustratos a sus críos y permitir el desarrollo fetal adecuado (3, 5, 38).

Durante la primera mitad del embarazo hay un incremento de la ingesta de alimento en humanos, en ratas se observa durante el día 10 a 16 dG, debido al aumento en el desarrollo de órganos y proliferación celular fetal (76). Este efecto lo observamos de igual forma en nuestros grupos de estudio, donde desde el día 8 de gestación hasta el 15 dG, encontramos mayor ingesta de alimento en ambos grupos de estudio. Otra adaptación metabólica existente durante los primeros días de la gestación, es la acumulación progresiva de depósitos de grasa, tanto en ratas como en humanos, esto ocurre debido al aumento de la lipogénesis del tejido adiposo, hiperfagia y glicerol-neogénesis (156). En nuestro estudio observamos que durante la gestación, no hubo diferencias significativas en la ganancia de peso materna entre los grupos, sin embargo, a 19 dG el contenido de grasa en el hígado y corporal fue menor en las madres del grupo restringido, lo cual repercutió directamente, en el peso corporal fetal, ya que los fetos de madres restringidas, presentaron 25% menos del peso con respecto al control, resultados similares se han reportado en los experimentos de restricción proteínica severa (6%) (157).

Existen numerosos estudios en animales los cuales han investigado la restricción proteínica materna y el efecto en el metabolismo de la glucosa en la descendencia (5, 158), sin embargo, poco se sabe, sobre la respuesta materna derivada de esta condición. En el experimento, no observamos diferencias en las concentraciones séricas de glucosa materna con respecto al control, esta condición, probablemente pueda ser justificada, debido al incremento en la concentración de insulina en este grupo, la cual puede estar mediando, la glucosa ingerida por los tejidos periféricos y suprimir la producción hepática de glucosa, esto sugiere que la restricción proteínica materna

genera adaptaciones metabólicas de la glucosa al final de la gestación. La hiperinsulinemia es un hallazgo frecuente en el embarazo (158) y la resistencia a la insulina es responsable tanto de la disminución de la lipoproteína lipasa del tejido adiposo, como el aumento en la actividad lipolítica del mismo, esta condición resulta en el incremento en la síntesis de triacilglicéridos, lo cual genera mayor AG y glicerol en el hígado, esto se refleja en las concentraciones de triacilglicéridos en el suero, el cual se ve incrementado tres veces más que los parámetros en condiciones de no embarazo (159), este efecto fue similar en nuestro modelo experimental, ya que los triacilglicéridos en ambos grupos de estudio se incrementaron, más del doble de la concentración normal que presentan ratas vírgenes (159, 160).

La leptina es una hormona que regula la ingesta de alimentos y el gasto energético. Las concentraciones de leptina aumentan generalmente desde el principio hasta el final del embarazo (161, 162). Durante este período, los altos niveles de leptina no intervienen en la regulación de la ingesta de alimentos (163). En nuestro estudio las concentraciones séricas de leptina estaban en el rango de las ratas preñadas (3 a 7 ng/ml). Sin embargo, las concentraciones de leptina en el suero de las ratas R en ayunas eran más altos que los de las ratas C embarazadas, a pesar de tener menor grasa corporal en este grupo, por lo que las altas concentraciones de leptina en las madres R probablemente repercute en el balance de energía materno y el desarrollo del feto, promoviendo al progreso de enfermedades de tipo metabólico, reproductivo y cognitivo en la vida adulta de estas crías (5, 37, 38, 164).

La restricción proteínica materna, afectó significativamente la composición del hígado y glándula mamaria, así como la producción de AGPIs-CL en ambos tejidos maternos. Una explicación de cómo la baja en proteínas (por tanto de aminoácidos) dietarias, afecta el establecimiento y desarrollo de la glándula mamaria, durante la gestación puede ser que, la madre depende de los componentes nutricios de la dieta, para desarrollar la glándula mamaria, dentro de los cuales la fracción que mayormente necesita es la de proteínas (165), para poder desarrollar los conductos lóbulo-alveolares y permitir la proliferación y diferenciación celular (96, 166) antes de la lactancia, si este desarrollo no se da en tiempo y forma, probablemente repercute en la producción y calidad de la leche materna (167-169). Datos de Mayer y col demuestran que la baja de proteína en la dieta afecta en el desarrollo de la glándula mamaria de la oveja y por tanto repercute directamente en la producción de leche de estas ovejas principalmente en el tiempo de duración del calostro (170). Nuestros datos muestran que la restricción proteínica, afecta el tamaño alveolar de la glándula mamaria, específicamente de las células epiteliales y su proliferación, lo cual indica que el 50% menos de proteína en la dieta, resulta inadecuado para el desarrollo normal de la glándula mamaria,

pero también para el hígado ya que ambos tejidos presentaron menor contenido de AGPIs-CL al final de la gestación, nosotros creemos que puede ser debido, a que probablemente no hay disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de las enzimas (desaturasas y elongasas) responsables de la formación de estos compuestos o bien otra posible explicación, es que la actividad enzimática, la cual, puede verse afectada, específicamente, en los mecanismos de acetilación y metilación de histonas, que permiten la relajación o compactación de la cadena de DNA para generar señales de activación o represión de las funciones enzimáticas, este pudiera ser, la clave para explicar por qué no hay una adecuada concentración de DHA y AA tanto en el hígado como en la GM a 19 dG.

Durante el desarrollo, la madre debe consumir AGPIs, los cuales pueden ser obtenidos de la dieta y sintetizados tanto por el hígado como la GM y ser transferidos al feto por la placenta (88) y por la leche en la lactancia (10), para permitir el desarrollo y maduración corporal y cerebral del individuo (76). En la restricción proteínica materna resultó de manera negativa la capacidad del hígado y de la GM de la madre para desaturar y elongar el AL y  $\alpha$ -ALN, ya que se demostró que existió menor AA y DHA de forma significativa tanto en el hígado como en la GM en el grupo R, lo cual correlacionó con los niveles bajos de expresión de las enzimas  $\Delta 6D$ ,  $\Delta 5D$ , ELOVL2 y ELOVL5, importante mencionar que también cuantificamos estas enzimas por PCR y los hallazgos obtenidos fueron iguales con la diferencia de que la ELOVL2 no fue detectable por el equipo. Estudios previos de Mercuri, et al, demostraron que la restricción proteica materna severa (5% de proteína) durante la gestación disminuía la actividad  $\Delta 6D$  en el hígado materno, concluyendo que este resultado probablemente podría afectar el aporte normal de AGPIs-CL, al crío y tener consecuencias negativas en el desarrollo de los tejidos fetales, en especial el cerebro y la retina (171). Cabe resaltar que con esta investigación, no sólo pudimos corroborar lo antes indicado por Mercuri et al, si no que se demostró, que los fetos de madres restringidas presentaban menor peso del hígado y menor concentración de grasa tanto en el hígado como en el cerebro y este tenía menor contenido de DHA (76), por lo que los cambios en el metabolismo de lípidos del hígado de la madre con restricción proteínica, podrían predisponer al desarrollo de enfermedades en la vida adulta del individuo, lo cual actualmente estamos analizando en nuestro grupo, en los críos provenientes de estas madres a diferentes edades. Estudios de *Ozanne et al*, demostraron en críos de tres meses de edad (que provenían de madres restringidas durante el embarazo), que tenían menor actividad en la  $\Delta 5D$  hepática y por tanto menor concentraciones de DHA (155). Estos resultados, señalaron que ocurrían cambios desfavorables en el establecimiento de la expresión génica de algunas enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos durante la gestación, ya que estos cambios se



veían manifestados en la cría adulta, que provenía de madres con restricción proteínica durante la vida intrauterina en la rata.

Finalmente durante el último periodo de la vida intrauterina de la rata (17-21 dG), se sabe, que está determinado por el intenso incremento del peso corporal y del cerebro, así como los incesantes ajustes fisiológicos de la neurogénesis, los cuales están altamente activos y sensibles a los cambios en la nutrición materna, por lo que, debe existir un continuo abastecimiento de DHA de la madre a su crío y este debe generar un depósito importante de este compuesto, así como de AG, ya que durante los primeros días de vida extrauterina, serán de importancia vital para lograr la adaptación y final maduración de todos los sistemas y ejes nerviosos del mismo (172-176), mientras se recibe el aporte por parte de la leche materna. De hecho, se sabe que el estado nutricional de la madre durante el último periodo de la gestación, está asociado, con el crecimiento final fetal y en particular para la maduración final del sistema nervioso e inmunológico se ha establecido una relación directa con las concentraciones de DHA (177). El cerebro es uno de los órganos con mayor composición en grasa y su contenido en DHA es mínimo pero necesario para el buen funcionamiento de la comunicación celular e importante componente de los bastones de las retinas. En nuestro estudio, el contenido de grasa en el cerebro fetal, especialmente de DHA, fue significativamente menor en el grupo restringido en comparación con las ratas control. Esto se correlaciona con los datos de Burdge (81), en el que la concentración de DHA en el cerebro del feto a los 20 días de gestación de madres con 50% menos de proteínas fue menor en comparación con los controles, las consecuencias de estos cambios en la grasa del cerebro fetal por causa de una restricción proteínica materna están siendo investigadas en nuestro grupo de trabajo, hasta el momento podemos decir que las perturbaciones en la conducta de las ratas como ansiedad, insuficiente motivación para la exploración y un déficit en el aprendizaje, pueden ser el resultado de esta exposición a la restricción proteínica, en una ventana crítica del desarrollo, la cual no permitió el adecuado progreso y maduración del cerebro, generando así respuestas negativas en la conducta animal durante la vida posnatal (164, 178-180).

Estudios en ratas han demostrado los diversos problemas que ocurren en el crecimiento posnatal, cuando estas han sido expuestas a diversos regímenes alimenticios durante la gestación y lactancia, sin embargo, pocos estudios demuestran cómo es la calidad y la cantidad de la leche de estas ratas que reciben una restricción proteínica y sus efectos en las crías de estas madres. El presente estudio no sólo se encargó de analizar los efectos de la restricción materna en proteínas durante el embarazo sobre los mecanismos de síntesis y metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la rata, si no también estudiamos, durante la lactancia la

disponibilidad y la calidad de las leches, en especial de los componentes grasos, debido a que es la fracción mayoritaria, pero también la más modificable frente a un desorden alimenticio, así mismo se analizó el contenido de AL,  $\alpha$  ALN, DHA y AA, ya que si bien es cierto, se ha demostrado que tienen múltiples funciones durante la gestación, poco se sabe de su aporte, función y acción durante la lactancia en el individuo y sus consecuencias frente a la restricción proteínica.

Durante la lactancia en ratas (38) existe una pérdida de peso después del parto y se inician diversos ajustes metabólicos propios del periodo para llevar a cabo la lactancia. En el presente estudio después del parto se observó una caída total de peso en los grupos experimentales y durante los 21 días del periodo de la lactancia, encontramos que el grupo R, no tuvo ganancia de peso, en contraste con el grupo C, donde después del parto comienza a ganar peso. Una posible explicación para la baja ganancia de peso en el grupo R es debido a la dieta que tiene este grupo, la madre resiente la falta de proteína y trata de compensar esta en la leche de su cría ya que el contenido de proteína en la leche de los diferentes grupos de estudio no resultó diferente, en los días 7 y 21 de lactancia, sin embargo, al día 14 el grupo R, tuvo menor proteína, lo cual resulta contrario con lo que reportan otros estudios con restricción proteínica al 9%, ya que Oldham y Cols presentan menor concentración de proteína al día 2, 4 y 12 de lactancia en ratas Sprague-Dawley y mayor al día 8 comparado con su grupo control, el cual recibe 22% de proteína (181). Tanto el peso al nacimiento en las crías como el de las madres de los diferentes grupos de estudio no fue diferente, nuestro hallazgo de pesos similares se correlaciona muy bien con lo que presentan otros estudios, donde la restricción de proteínas en estos porcentajes no resulta perjudicial para generar diferencia en el peso de la madre y de las crías al nacer (182).

Actualmente se sabe que los efectos de la programación, no incluyen cambios en el peso al nacimiento, sino los cambios que se generan durante la vida posnatal (3). Nuestro estudio incluyó el análisis de ganancia de peso durante la lactancia y observamos que el peso de las crías R fue menor, tanto en hembras como en machos durante la lactancia. En ovejas restringidas durante la gestación y la lactancia también se observa esta tendencia (170).

El análisis de la producción de leche se realizó de forma indirecta, determinando la ganancia de peso materna (4h) e ingesta de alimento de la cría (1h) a lo largo de la lactancia, este estudio reveló diferencias interesantes, al día 7 dL el grupo R fue el que mayor ingesta registró con respecto al C pero al día 14 el grupo C duplicó su ingesta con respecto al R, ya para el día 21 dL el grupo C come tres veces más que el grupo R. La producción de leche y la ingesta de alimento son dos factores importantes para determinar el volumen de leche total, en un contexto, hay datos en la literatura que indican que la producción de leche está determinada por la mayor demanda de la cría (183, 184).

Estudios de Pine y cols, refieren que el tiempo de espera de las madres sin sus crías también es un factor que modifica el volumen y composición de la leche en rata (181), por lo que una manera posible para descartar estas dos posibilidades sería realizar un estudio a futuro en el cual redujéramos el número de crías y determinaríamos su consumo. Otra posible explicación puede ser el desarrollo mamario de las madres el cual estudiamos desde la gestación y durante la lactancia, la bibliografía menciona que es importante que durante este periodo haya un consumo continuo de nutrimentos por parte de la madre, para que exista un adecuado desarrollo mamario y función de la misma (94, 95, 170). En este estudio, observamos que el grupo R tiene un menor peso total en la glándula mamaria y también un menor desarrollo mamario durante la lactancia, lo cual comprobamos con el análisis histológico que hicimos, por lo que probablemente podría ser otro posible mecanismo que explique, las causas por la que haya menor ganancia de peso de las crías así como menor consumo. Cabe mencionar que aparte de la nutrición, también existen factores que regulan la síntesis y secreción de leche a nivel celular y sub-celular, así como la regulación hormonal, los cuales no se encuentran muy bien comprendidos cuando hay una restricción proteínica materna, pero están siendo estudiados (185, 186).

La leche materna es el alimento que cubre todas las necesidades nutricias del crío, hoy en día sabemos que la leche aporta cantidades importantes de carbohidratos, proteínas y grasas, los cuales permiten al lactante crecer y madurar en sus órganos y sistemas (170, 187). En los humanos se sabe que existe de un 6.9%-7.2% (188) de carbohidratos en la leche y en la rata es de 2.6%, cabe mencionar que entre la leche del humano y la de la rata, existen diferencias en la composición de la misma, ya que la leche humana tiene mayor contenido de glucosa, pero menor contenido de grasa, en contraste con la de la rata que tiene mayor contenido de grasa y menos glucosa (188). Frente a la restricción proteínica durante la gestación y la lactancia se observó que el contenido de glucosa en la leche al día 7, fue menor con respecto a nuestro grupo control, este resultado es semejante con los resultados de Pine y cols. donde al día 8 de lactancia encuentran menor contenido de glucosa en la leche (181) en el grupo restringido (9% de proteína). Un parámetro que no sufrió cambios fue el contenido de agua. El mayor contenido de grasa lo tuvo el grupo R al día 7, tal como lo reportan otros autores (170, 189) pero al día 14 y 21 fue menor el grupo C. Cabe mencionar que la grasa es el componente mayoritario de la leche de rata, los triacilglicéridos es la fracción con mayor presencia en la misma y aportan el 70% de la energía total que requiere el neonato para vivir (104), dentro de este aporte existe la presencia de los AGPIs-CL (190) la cual es mínima pero esencial para el neonato, se sabe que el aporte de estos componentes resulta eficiente, siempre y cuando haya una biosíntesis adecuada de ellos, tanto en el hígado como la

glándula mamaria materna, es por ello que debe ser madurada y desarrollada durante la gestación, para ello, como ya lo hemos mencionado dentro de nuestra discusión. La madre requiere de una fuente adecuada de proteína y demás componentes nutricionales que favorecen el desarrollo mamario, ya que al inicio de la lactancia será de suma importancia aportar estos componentes en la leche, ya que permitirán al crío finalizar diversos procesos de maduración como lo es el sistema nervioso, cerebro y retina (191). Este estudio demostró que desde el día 14 y 21 de lactancia las crías de madres restringidas en proteína consumen menos DHA y al día 21 dL menos AA, por tanto la falta de estos AGPIs-CL en la vida temprana de nuestro modelo experimental podrían estar explicando los hallazgos que hemos publicado en la vida adulta de estas ratas las cuales presentaron alteraciones en el aprendizaje, disminución de la motivación, incremento de la ansiedad y una disminución en la exploración (179). Estos resultados observados en la progenie a nivel conductual y aprendizaje potencialmente los hemos relacionado a la deficiencia de proteína en la dieta materna en especial a la menor fuente de aminoácidos esenciales o también a la relación ácidos grasos/lípidos necesarios para el adecuado desarrollo del cerebro durante estas etapas críticas del desarrollo; lo cual conducen a efectos negativos en la maduración y establecimiento final del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

La leptina está presente en la leche de diferentes especies (192-194), incluyendo los seres humanos (102). Las ratas puede transferir leptina a los recién nacidos a través de la leche (195). La concentración de leptina en la leche está determinada por diversos factores, los principales son la secreción de leptina por parte de la glándula mamaria y la proporción adecuada sobre el volumen total de leche producida.

Las concentraciones de leptina son más altas en los recién nacidos que en adultos (196, 197) a pesar de que hay una menor proporción de grasa en el cuerpo inmediatamente después del nacimiento (197). En el análisis que hicimos de las concentraciones de leptina a diferentes edades en los diferentes grupos de estudio observamos, un retraso en la aparición del pico de la leptina a 21 dL en el grupo R, cabe mencionar que la rata durante la vida posnatal aumenta su concentración de leptina alrededor del día 10-14 este aumento se ha relacionado directamente con el papel central en la maduración del eje hipotálamo y centros del apetito (198). La leptina de forma exógena por vía subcutánea durante este periodo conduce a la obesidad en la vida adulta (199); sin embargo, Harris M y col han reportado lo contrario en roedores (200). Hasta el momento no existen datos de que efectos ocurren cuando el aumento de leptina se ve retrasado como ocurre en nuestro grupo R. Nuestros resultados hasta el momento muestran que los críos de madres R son los que menor ganancia de peso tienen durante toda la vida (5, 37, 38), estos hallazgos indican que los efectos

perjudiciales en el embarazo, trascienden en la vida adulta, no sólo por la gestación deficiente sino por el nivel de nutrimentos disponible durante la lactancia. Otro análisis que hicimos en nuestro estudio es determinar el papel de la leptina durante este periodo. Nuestros resultados indican que no existe una correlación entre las concentraciones de leptina en la leche y los niveles séricos de leptina en la cría, lo cual podría tener un importante papel en la conducta de succión del crío demostrando así que la motivación por succionar no está determinada por el consumo de leptina en la leche. Es conocido que en los adultos la hormona leptina inhibe la ingesta de alimentos. Sin embargo, en la correlación que hicimos entre la concentración de leptina sérica del crío y la ingesta de leche se observa una respuesta muy débil, la cual no alcanza diferencias significativas en los grupos de estudio. Este resultado puede ser comparado con las observaciones anteriores de que la administración de leptina no es capaz de influenciar el peso corporal, el almacén de grasa, y la ingesta de leche (197). Finalmente podemos apoyar este hallazgo con los resultados encontrados con la leptina exógena donde ésta no modificó la ingesta de leche en ratones de 7-10 de vida posnatal (197). En contraste, existen otros estudios con ratas donde demostraron que las dosis orales fisiológicas de leptina administrada durante la lactancia tienen efectos anorexígenos, sin afectar la ganancia del peso corporal de la cría (192).

# CONCLUSIÓN



## 12. CONCLUSIÓN

Con base en los datos obtenidos podemos concluir que el costo proteínico de la gestación, afecta la biosíntesis de los ácidos grasos maternos, el desarrollo mamario y probablemente su función, lo cual afecta directamente en la composición de AGPIs- CL en el cerebro de los fetos, esto probablemente repercute en los procesos de maduración y desarrollo del sistema neurológico, corporal y visual de la cría en la vida posnatal y adulta, teniendo efectos en la respuesta motora, conductual e índice de aprendizaje de la descendencia.

Durante la lactancia el menor contenido de grasa total y AGPIs-CL en la leche, pero además la menor producción y el menor consumo por parte de la cría, son resultado de madres restringidas al 50% en proteína en su dieta, esto influye negativamente en la ganancia de peso y desarrollo de la cría, lo que posiblemente predisponga a la descendencia a desarrollar enfermedades en la vida adulta directamente vinculadas con el síndrome metabólico, resistencia a la insulina, hipertensión, obesidad y daño cardiovascular, por lo que un buen estado de nutrición en el momento de la concepción es uno de los mejores recursos para combatir los factores de riesgo durante el embarazo y la lactancia ya que las necesidades energéticas, proteicas, minerales y vitamínicas aumentan debido a la formación de un nuevo ser, por tal motivo se propone una alimentación correcta para todas las mujeres, de ser posible aun antes del embarazo ya que el éxito que tengan en la práctica de esta, se verá reflejado en la salud física y emocional de su descendencia.

## APENDICE 1.

### Procedimiento para la elaboración de dietas experimentales.

Los reactivos utilizados para la elaboración de las dietas se enlistan a continuación:

Caseína libre de vitaminas, de Harlan Teklad  
L-Cistina Diclorhidrato, de Sigma Aldrich  
Mezcla de Minerales AIN-76, de Harlan México S.A. de C.V.  
Mezcla de Vitaminas AIN-93 VX, de Harlan México S.A. de C.V.  
Colina, Clorhidrato de Sigma Aldrich  
 $\alpha$ -Celulosa de Sigma Aldrich  
Almidón de maíz de Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.  
Glucosa Anhidra de Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.  
Aceite Comestible Puro de Soya Nutrioli® de Ragasa Industrias S.A. de C.V.  
Azúcar refinada de Great Value®

La dieta fue elaborada de la siguiente manera

1. Se pesó según la formulación mencionada en el texto, la cantidad correspondiente de cada componente por separado usando la balanza analítica Sartorius® ED623SCW así como la báscula EURA® 2000/100 (cap. máx.=100 Kg y d=50g), según la sensibilidad requerida en cada caso.
2. Se pusieron todos los componentes sólidos durante 5 minutos en una mezcladora Hobart modelo A-200 de 20 L de capacidad, potencia de 1/3 HP y 1425 rpm, en velocidad baja. (siendo las mezclas: de vitaminas AIN-76 y de minerales AIN-93VX las últimas en incorporarse).
4. Después, sin detener el mezclado se agregó la cantidad correspondiente del aceite.
5. A velocidad intermedia se mezcló por 5 minutos y se agregó un litro de agua, hasta haber obtenido una masa homogénea de consistencia adecuada para ser roída por los animales y a la vez ser moldeada con las manos.
6. La dieta se almacenó en bolsas de polietileno opacas, por lapsos no mayores a un mes en un cuarto frío de 4° C.



# BIBLIOGRAFÍA



### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Cetin, I., and G. Alvino. 2009. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta* **30 Suppl A**: S77-82.
2. Koletzko, B., E. Lien, C. Agostoni, H. Bohles, C. Campoy, I. Cetin, T. Decsi, J. W. Dudenhausen, C. Dupont, S. Forsyth, I. Hoesli, W. Holzgreve, A. Lapillonne, G. Putet, N. J. Secher, M. Symonds, H. Szajewska, P. Willatts, and R. Uauy. 2008. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med* **36**: 5-14.
3. Bautista, C. J., L. Boeck, F. Larrea, P. W. Nathanielsz, and E. Zambrano. 2008. 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* **63**: 358-363.
4. Bautista, C. J., and E. Zambrano. 2010. [Biology and biochemical aspects of long-chains polyunsaturated fatty acid during gestation]. *Rev Invest Clin* **62**: 267-275.
5. Zambrano, E., C. J. Bautista, M. Deas, P. M. Martinez-Samayoa, M. Gonzalez-Zamorano, H. Ledesma, J. Morales, F. Larrea, and P. W. Nathanielsz. 2006. 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* **571**: 221-230.
6. Martin-Gronert, M. S., and S. E. Ozanne. 2005. Programming of appetite and type 2 diabetes. *Early Hum Dev* **81**: 981-988.
7. Woodall, S. M., B. M. Johnston, B. H. Breier, and P. D. Gluckman. 1996. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* **40**: 438-443.
8. Levant, B., M. K. Ozias, and S. E. Carlson. 2006. Diet (n-3) polyunsaturated fatty acid content and parity interact to alter maternal rat brain phospholipid fatty acid composition. *J Nutr* **136**: 2236-2242.
9. Hoffman, D. R., J. C. DeMar, W. C. Heird, D. G. Birch, and R. E. Anderson. 2001. Impaired synthesis of DHA in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *J Lipid Res* **42**: 1395-1401.
10. Rodriguez-Cruz, M., A. R. Tovar, B. Palacios-Gonzalez, M. Del Prado, and N. Torres. 2006. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of Delta5 and Delta6 desaturases, SREBP-1, PPARalpha, and PGC-1. *J Lipid Res* **47**: 553-560.
11. Horrobin, D. F. 2000. Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *Am J Clin Nutr* **71**: 367S-372S.
12. Logan, A. C. 2004. Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional. *Lipids Health Dis* **3**: 25.
13. Green, P., and E. Yavin. 1996. Natural and accelerated docosahexaenoic acid accumulation in the prenatal rat brain. *Lipids* **31 Suppl**: S235-238.
14. Bartsch, H., J. Nair, and R. W. Owen. 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* **20**: 2209-2218.
15. Joshi, S., S. Rao, A. Golwilkar, M. Patwardhan, and R. Bhonde. 2003. Fish oil supplementation of rats during pregnancy reduces adult disease risks in their offspring. *J Nutr* **133**: 3170-3174.
16. Ander, B. P., C. M. Dupasquier, M. A. Prociuk, and G. N. Pierce. 2003. Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol* **8**: 164-172.
17. Enslin, M., H. Milon, and A. Malnoe. 1991. Effect of low intake of n-3 fatty acids during development on brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. *Lipids* **26**: 203-208.
18. Glozman, S., P. Green, and E. Yavin. 1998. Intraamniotic ethyl docosahexaenoate administration protects fetal rat brain from ischemic stress. *J Neurochem* **70**: 2484-2491.
19. Yavin, E., S. Glozman, and P. Green. 2001. Docosahexaenoic acid accumulation in the prenatal brain: prooxidant and antioxidant features. *J Mol Neurosci* **16**: 229-235; discussion 279-284.

20. Dahri, S., A. Snoeck, B. Reusens-Billen, C. Remacle, and J. J. Hoet. 1991. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* **40 Suppl 2**: 115-120.
21. Kind, K. L., P. M. Clifton, P. A. Grant, P. C. Owens, A. Sohlstrom, C. T. Roberts, J. S. Robinson, and J. A. Owens. 2003. Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**: R140-152.
22. Petry, C. J., and C. N. Hales. 2000. Long-term effects on offspring of intrauterine exposure to deficits in nutrition. *Hum Reprod Update* **6**: 578-586.
23. Ravelli, A. C., J. H. van Der Meulen, C. Osmond, D. J. Barker, and O. P. Bleker. 1999. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* **70**: 811-816.
24. Roseboom, T. J. 2001. The fetal origins hypothesis. *Twin Res* **4**: iii.
25. Barker, D. J. 1999. Early growth and cardiovascular disease. *Arch Dis Child* **80**: 305-307.
26. Barker, D. J., A. R. Bull, C. Osmond, and S. J. Simmonds. 1990. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* **301**: 259-262.
27. Martyn, C. N., D. J. Barker, S. Jespersen, S. Greenwald, C. Osmond, and C. Berry. 1995. Growth in utero, adult blood pressure, and arterial compliance. *Br Heart J* **73**: 116-121.
28. Law, C. M., G. S. Gordon, A. W. Shiell, D. J. Barker, and C. N. Hales. 1995. Thinness at birth and glucose tolerance in seven-year-old children. *Diabet Med* **12**: 24-29.
29. Phillips, D. I., D. J. Barker, C. N. Hales, S. Hirst, and C. Osmond. 1994. Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetologia* **37**: 150-154.
30. Widdowson, E. M., and R. A. McCance. 1975. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res* **9**: 154-156.
31. McCance, R. A., and E. M. Widdowson. 1974. The determinants of growth and form. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **185**: 1-17.
32. Ravelli, G. P., Z. A. Stein, and M. W. Susser. 1976. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* **295**: 349-353.
33. Barker, D. J., and C. Osmond. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* **1**: 1077-1081.
34. Barker, D. J. 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* **95**: 115-128.
35. Barker, D. J., and C. H. Fall. 1993. Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child* **68**: 797-799.
36. Barker, D. J., P. D. Gluckman, K. M. Godfrey, J. E. Harding, J. A. Owens, and J. S. Robinson. 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* **341**: 938-941.
37. Guzman, C., R. Cabrera, M. Cardenas, F. Larrea, P. W. Nathanielsz, and E. Zambrano. 2006. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* **572**: 97-108.
38. Zambrano, E., P. M. Martinez-Samayoa, C. J. Bautista, M. Deas, L. Guillen, G. L. Rodriguez-Gonzalez, C. Guzman, F. Larrea, and P. W. Nathanielsz. 2005. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* **566**: 225-236.
39. Desai, M., N. J. Crowther, S. E. Ozanne, A. Lucas, and C. N. Hales. 1995. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans* **23**: 331-335.
40. Lau, C., and J. M. Rogers. 2004. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res C Embryo Today* **72**: 300-312.
41. Hales, C. N., and D. J. Barker. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* **60**: 5-20.
42. Lee, H. K., K. S. Park, Y. M. Cho, Y. Y. Lee, and Y. K. Pak. 2005. Mitochondria-based model for fetal origin of adult disease and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* **1042**: 1-18.
43. Hales, C. N. 1997. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance in adulthood: the "thrifty phenotype" hypothesis revisited. *Acta Paediatr Suppl* **422**: 73-77.
44. Nien, J. K., S. Mazaki-Tovi, R. Romero, J. P. Kusanovic, O. Erez, F. Gotsch, B. L. Pineles, L. A. Friel, J. Espinoza, L. Goncalves, J. Santolaya, R. Gomez, J. S. Hong, S. Edwin, E. Soto, K. Richani, M. Mazor, and S.

- S. Hassan. 2007. Resistin: a hormone which induces insulin resistance is increased in normal pregnancy. *J Perinat Med* **35**: 513-521.
45. Munilla, M. A., and E. Herrera. 2000. Maternal hypertriglyceridemia during late pregnancy does not affect the increase in circulating triglycerides caused by the long-term consumption of a sucrose-rich diet by rats. *J Nutr* **130**: 2883-2888.
46. Osol, G., and M. Mandala. 2009. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology (Bethesda)* **24**: 58-71.
47. Guan, J., C. Mao, X. Feng, H. Zhang, F. Xu, C. Geng, L. Zhu, A. Wang, and Z. Xu. 2008. Fetal development of regulatory mechanisms for body fluid homeostasis. *Braz J Med Biol Res* **41**: 446-454.
48. Do Carmo, S., J. C. Forest, Y. Giguere, A. Masse, J. Lafond, and E. Rassart. 2009. Modulation of Apolipoprotein D levels in human pregnancy and association with gestational weight gain. *Reprod Biol Endocrinol* **7**: 92.
49. Atherton, J. C., J. M. Dark, H. O. Garland, M. R. Morgan, J. Pidgeon, and S. Soni. 1982. Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat. *J Physiol* **330**: 81-93.
50. Cetin, I., and P. Antonazzo. 2009. The role of the placenta in intrauterine growth restriction (IUGR). *Z Geburtshilfe Neonatol* **213**: 84-88.
51. Kallen, C. B. 2004. Steroid hormone synthesis in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* **31**: 795-816, x.
52. Hay, W. W., Jr. 2006. Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **117**: 321-339; discussion 339-340.
53. Jensen, C. L. 2006. Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* **83**: 1452S-1457S.
54. Silliman, K., V. Shore, and T. M. Forte. 1994. Hypertriglyceridemia during late pregnancy is associated with the formation of small dense low-density lipoproteins and the presence of large buoyant high-density lipoproteins. *Metabolism* **43**: 1035-1041.
55. Campioni, M., G. M. Toffolo, R. Basu, R. A. Rizza, and C. Cobelli. 2009. Minimal Model Assessment of Hepatic Insulin Extraction during an Oral Test from Standard Insulin Kinetic Parameters. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
56. Garcia-Guerra, A., L. M. Neufeld, S. Hernandez-Cordero, J. Rivera, R. Martorell, and U. Ramakrishnan. 2009. Prenatal multiple micronutrient supplementation impact on biochemical indicators during pregnancy and postpartum. *Salud Publica Mex* **51**: 327-335.
57. Mangravite, L. M., K. Dawson, R. R. Davis, J. P. Gregg, and R. M. Krauss. 2007. Fatty acid desaturase regulation in adipose tissue by dietary composition is independent of weight loss and is correlated with the plasma triacylglycerol response. *Am J Clin Nutr* **86**: 759-767.
58. Ramos, M. P., M. D. Crespo-Solans, S. del Campo, J. Cacho, and E. Herrera. 2003. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**: E318-328.
59. Magnusson-Olsson, A. L., S. Lager, B. Jacobsson, T. Jansson, and T. L. Powell. 2007. Effect of maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**: E24-30.
60. Diamant, Y. Z., S. Diamant, and N. Freinkel. 1980. Lipid deposition and metabolism in rat placenta during gestation. *Placenta* **1**: 319-325.
61. Larque, E., S. Krauss-Etschmann, C. Campoy, D. Hartl, J. Linde, M. Klingler, H. Demmelmair, A. Cano, A. Gil, B. Bondy, and B. Koletzko. 2006. Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins. *Am J Clin Nutr* **84**: 853-861.
62. Godfrey, K. M., and D. J. Barker. 1995. Maternal nutrition in relation to fetal and placental growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **61**: 15-22.
63. Langley-Evans, S. C. 1999. Fetal origins of adult disease. *Br J Nutr* **81**: 5-6.
64. Jansson, T., and T. L. Powell. 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)* **113**: 1-13.

65. Lucas, A. 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* **156**: 38-50; discussion 50-35.
66. Lumey, L. H. 1992. Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944-1945. *Paediatr Perinat Epidemiol* **6**: 240-253.
67. Bennis-Taleb, N., C. Remacle, J. J. Hoet, and B. Reusens. 1999. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J Nutr* **129**: 1613-1619.
68. Gallagher, E. A., J. P. Newman, L. R. Green, and M. A. Hanson. 2005. The effect of low protein diet in pregnancy on the development of brain metabolism in rat offspring. *J Physiol* **568**: 553-558.
69. Marconi, A. M., and C. L. Paolini. 2008. Nutrient transport across the intrauterine growth-restricted placenta. *Semin Perinatol* **32**: 178-181.
70. Metcoff, J. 1994. Clinical assessment of nutritional status at birth. Fetal malnutrition and SGA are not synonymous. *Pediatr Clin North Am* **41**: 875-891.
71. Scrimshaw, N. S. 1997. The relation between fetal malnutrition and chronic disease in later life. *BMJ* **315**: 825-826.
72. Styne, D. M. 1998. Fetal growth. *Clin Perinatol* **25**: 917-938, vii.
73. Hanebutt, F. L., H. Demmelmair, B. Schiessl, E. Larque, and B. Koletzko. 2008. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr* **27**: 685-693.
74. Ozias, M. K., S. E. Carlson, and B. Levant. 2007. Maternal parity and diet (n-3) polyunsaturated fatty acid concentration influence accretion of brain phospholipid docosahexaenoic acid in developing rats. *J Nutr* **137**: 125-129.
75. Levant, B., J. D. Radel, and S. E. Carlson. 2006. Reduced brain DHA content after a single reproductive cycle in female rats fed a diet deficient in N-3 polyunsaturated fatty acids. *Biol Psychiatry* **60**: 987-990.
76. Torres, N., C. J. Bautista, A. R. Tovar, G. Ordaz, M. Rodriguez-Cruz, V. Ortiz, O. Granados, P. W. Nathanielsz, F. Larrea, and E. Zambrano. 2010. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**: E270-277.
77. Langley-Evans, S. C., G. J. Phillips, and A. A. Jackson. 1994. In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. *Clin Nutr* **13**: 319-324.
78. Snoeck, A., C. Remacle, B. Reusens, and J. J. Hoet. 1990. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* **57**: 107-118.
79. Iglesias-Barreira, V., M. T. Ahn, B. Reusens, S. Dahri, J. J. Hoet, and C. Remacle. 1996. Pre- and postnatal low protein diet affect pancreatic islet blood flow and insulin release in adult rats. *Endocrinology* **137**: 3797-3801.
80. Ceesay, S. M., A. M. Prentice, T. J. Cole, F. Foord, L. T. Weaver, E. M. Poskitt, and R. G. Whitehead. 1997. Effects on birth weight and perinatal mortality of maternal dietary supplements in rural Gambia: 5 year randomised controlled trial. *BMJ* **315**: 786-790.
81. Burdge, G. C., R. L. Dunn, S. A. Wootton, and A. A. Jackson. 2002. Effect of reduced dietary protein intake on hepatic and plasma essential fatty acid concentrations in the adult female rat: effect of pregnancy and consequences for accumulation of arachidonic and docosahexaenoic acids in fetal liver and brain. *Br J Nutr* **88**: 379-387.
82. Fernandez B, A. 1999. Malnutrición Fetal y Enfermedad Metabólica en la Vida Adulta *Nutrición y Obesidad* **5**: 243-251.
83. Ravelli, A. C., J. H. van der Meulen, R. P. Michels, C. Osmond, D. J. Barker, C. N. Hales, and O. P. Bleker. 1998. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* **351**: 173-177.
84. Barker, D. J. 1997. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* **13**: 807-813.
85. McCann, J. C., and B. N. Ames. 2005. Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am J Clin Nutr* **82**: 281-295.
86. Calderon, F., and H. Y. Kim. 2004. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* **90**: 979-988.

87. Dehaut, F., I. Bertrand, T. Miltaud, A. Pouplard-Barthelaix, and M. Maingault. 1993. n-6 polyunsaturated fatty acids increase the neurite length of PC12 cells and embryonic chick motoneurons. *Neurosci Lett* **161**: 133-136.
88. Marszalek, J. R., and H. F. Lodish. 2005. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 633-657.
89. Crawford, M. 2000. Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Am J Clin Nutr* **71**: 275S-284S.
90. Holub, D. J., and B. J. Holub. 2004. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem* **263**: 217-225.
91. Denomme, J., K. D. Stark, and B. J. Holub. 2005. Directly quantitated dietary (n-3) fatty acid intakes of pregnant Canadian women are lower than current dietary recommendations. *J Nutr* **135**: 206-211.
92. Igarashi, M., K. Ma, L. Chang, J. M. Bell, and S. I. Rapoport. 2007. Dietary n-3 PUFA deprivation for 15 weeks upregulates elongase and desaturase expression in rat liver but not brain. *J Lipid Res* **48**: 2463-2470.
93. Cetin, I., and B. Koletzko. 2008. Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **11**: 297-302.
94. McCave, E. J., C. A. Cass, K. J. Burg, and B. W. Booth. 2010. The normal microenvironment directs mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**: 291-299.
95. Cowin, P., and J. Wysolmerski. 2010. Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a003251.
96. Park, C. S. 2005. Role of compensatory mammary growth in epigenetic control of gene expression. *FASEB J* **19**: 1586-1591.
97. Rudolph, M. C., J. Monks, V. Burns, M. Phistry, R. Mariani, M. R. Foote, D. E. Bauman, S. M. Anderson, and M. C. Neville. Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**: E918-927.
98. Cowin, P., and J. Wysolmerski. Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a003251.
99. Jackson, A. A., M. H. Golden, R. Byfield, F. Jahoor, J. Royes, and L. Soutter. 1983. Whole-body protein turnover and nitrogen balance in young children at intakes of protein and energy in the region of maintenance. *Hum Nutr Clin Nutr* **37**: 433-446.
100. Li, L., T. J. Parsons, and C. Power. 2003. Breast feeding and obesity in childhood: cross sectional study. *BMJ* **327**: 904-905.
101. von Kries, R., B. Koletzko, T. Sauerwald, E. von Mutius, D. Barnert, V. Grunert, and H. von Voss. 1999. Breast feeding and obesity: cross sectional study. *BMJ* **319**: 147-150.
102. Houseknecht, K. L., M. K. McGuire, C. P. Portocarrero, M. A. McGuire, and K. Beerman. 1997. Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 742-747.
103. Keesey, R. E., and S. W. Corbett. 1990. Adjustments in daily energy expenditure to caloric restriction and weight loss by adult obese and lean Zucker rats. *Int J Obes* **14**: 1079-1084.
104. Fernando-Warnakulasuriya, G. J., J. E. Staggars, S. C. Frost, and M. A. Wells. 1981. Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. I. Fatty acid composition and concentrations of major lipid components. *J Lipid Res* **22**: 668-674.
105. Staggars, J. E., G. J. Fernando-Warnakulasuriya, and M. A. Wells. 1981. Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. II. Triacylglycerols: molecular species, stereospecific analysis, and specificity of hydrolysis by lingual lipase. *J Lipid Res* **22**: 675-679.
106. Ringseis, R., D. Saal, A. Muller, H. Steinhart, and K. Eder. 2004. Dietary conjugated linoleic acids lower the triacylglycerol concentration in the milk of lactating rats and impair the growth and increase the mortality of their suckling pups. *J Nutr* **134**: 3327-3334.
107. Del Prado, M., S. Villalpando, J. Gordillo, and H. Hernandez-Montes. 1999. A high dietary lipid intake during pregnancy and lactation enhances mammary gland lipid uptake and lipoprotein lipase activity in rats. *J Nutr* **129**: 1574-1578.

108. Heird, W. C. 2001. The role of polyunsaturated fatty acids in term and preterm infants and breastfeeding mothers. *Pediatr Clin North Am* **48**: 173-188.
109. Benatti, P., G. Peluso, R. Nicolai, and M. Calvani. 2004. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr* **23**: 281-302.
110. Hughes, C. L., and T. R. Dhiman. 2002. Dietary compounds in relation to dietary diversity and human health. *J Med Food* **5**: 51-68.
111. Haggarty, P., J. Ashton, M. Joynson, D. R. Abramovich, and K. Page. 1999. Effect of maternal polyunsaturated fatty acid concentration on transport by the human placenta. *Biol Neonate* **75**: 350-359.
112. Engesveen, K., and R. Shrimpton. 2007. Nutrition education in the context of the United Nations Standing Committee on Nutrition activities and publications, 1985-2006. *J Nutr Educ Behav* **39**: 351-356.
113. María Isabel Bove, F. C. 2007. Encuesta de lactancia, estado nutricional y alimentación complementaria. setiembre 2007 ed. UNICEF, Montevideo, Uruguay.
114. Aguilar, M. J. 2005. Lactancia Materna: Composición, propiedades y Bioquímica de la leche humana. 1 ed., España.
115. Makrides, M., M. A. Neumann, and R. A. Gibson. 2001. Perinatal characteristics may influence the outcome of visual acuity. *Lipids* **36**: 897-900.
116. Neuringer, M. 2000. Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results, and implications. *Am J Clin Nutr* **71**: 256S-267S.
117. SanGiovanni, J. P., C. S. Berkey, J. T. Dwyer, and G. A. Colditz. 2000. Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review. *Early Hum Dev* **57**: 165-188.
118. Makrides, M., M. A. Neumann, R. W. Byard, K. Simmer, and R. A. Gibson. 1994. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* **60**: 189-194.
119. Farquharson, J., F. Cockburn, W. A. Patrick, E. C. Jamieson, and R. W. Logan. 1992. Infant cerebral cortex phospholipid fatty-acid composition and diet. *Lancet* **340**: 810-813.
120. Angelsen, N. K., T. Vik, G. Jacobsen, and L. S. Bakketeig. 2001. Breast feeding and cognitive development at age 1 and 5 years. *Arch Dis Child* **85**: 183-188.
121. Birch, E. E., S. Garfield, D. R. Hoffman, R. Uauy, and D. G. Birch. 2000. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev Med Child Neurol* **42**: 174-181.
122. Helland, I. B., L. Smith, K. Saarem, O. D. Saugstad, and C. A. Drevon. 2003. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* **111**: e39-44.
123. Haag, M. 2003. Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry* **48**: 195-203.
124. He, C., X. Qu, L. Cui, J. Wang, and J. X. Kang. 2009. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neurogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11370-11375.
125. Uauy, R., D. R. Hoffman, P. Peirano, D. G. Birch, and E. E. Birch. 2001. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* **36**: 885-895.
126. Innis, S. M. 2000. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev Neurosci* **22**: 474-480.
127. Morales, E., M. Bustamante, J. R. Gonzalez, M. Guxens, M. Torrent, M. Mendez, R. Garcia-Esteban, J. Julvez, J. Forns, M. Vrijheid, C. Molto-Puigmarti, C. Lopez-Sabater, X. Estivill, and J. Sunyer. Genetic variants of the FADS gene cluster and ELOVL gene family, colostrums LC-PUFA levels, breastfeeding, and child cognition. *PLoS One* **6**: e17181.
128. Martin, J. C., P. Bougnoux, A. Fignon, V. Theret, J. M. Antoine, F. Lamisse, and C. Couet. 1993. Dependence of human milk essential fatty acids on adipose stores during lactation. *Am J Clin Nutr* **58**: 653-659.
129. Sala-Vila, A., A. I. Castellote, M. Rodriguez-Palmero, C. Campoy, and M. C. Lopez-Sabater. 2005. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): changes during lactation. *Nutrition* **21**: 467-473.

130. van Beusekom, C., I. A. Martini, H. M. Rutgers, E. R. Boersma, and F. A. Muskiet. 1990. A carbohydrate-rich diet not only leads to incorporation of medium-chain fatty acids (6:0-14:0) in milk triglycerides but also in each milk-phospholipid subclass. *Am J Clin Nutr* **52**: 326-334.
131. Cuthbertson, W. F. 1976. Essential fatty acid requirements in infancy. *Am J Clin Nutr* **29**: 559-568.
132. Crawford, M. A., A. G. Hassam, and J. P. Rivers. 1978. Essential fatty acid requirements in infancy. *Am J Clin Nutr* **31**: 2181-2185.
133. Muskiet, F. A. J. 2010. Pathophysiology and Evolutionary Aspects of Dietary Fats and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids across the Life Cycle.
134. Yoshizawa, K., T. Sasaki, M. Kuro, N. Uehara, H. Takada, A. Harauma, N. Ohara, T. Moriguchi, and A. Tsubura. 2012. Arachidonic acid supplementation during gestational, lactational and post-weaning periods prevents retinal degeneration induced in a rodent model. *Br J Nutr* **109**: 1424-1432.
135. Bautista, C. J., and E. Zambrano. [Biology and biochemical aspects of long-chains polyunsaturated fatty acid during gestation]. *Rev Invest Clin* **62**: 267-275.
136. Gao, F., D. Kiesewetter, L. Chang, K. Ma, S. I. Rapoport, and M. Igarashi. 2009. Whole-body synthesis secretion of docosahexaenoic acid from circulating eicosapentaenoic acid in unanesthetized rats. *J Lipid Res* **50**: 2463-2470.
137. Abbadi, A., F. Domergue, J. Bauer, J. A. Napier, R. Welti, U. Zahringer, P. Cirpus, and E. Heinz. 2004. Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation. *Plant Cell* **16**: 2734-2748.
138. Teller, D. Y. 1997. First glances: the vision of infants. the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**: 2183-2203.
139. Hornstra, G. 2000. Essential fatty acids in mothers and their neonates. *Am J Clin Nutr* **71**: 1262S-1269S.
140. Cherian, G., and J. S. Sim. 1996. Changes in the breast milk fatty acids and plasma lipids of nursing mothers following consumption of n-3 polyunsaturated fatty acid enriched eggs. *Nutrition* **12**: 8-12.
141. Ramirez-Silva, I., S. Villalpando, J. E. Moreno-Saracho, and D. Bernal-Medina. Fatty acids intake in the Mexican population. Results of the National Nutrition Survey 2006. *Nutr Metab (Lond)* **8**: 33.
142. Wang, Y., D. Botolin, B. Christian, J. Busik, J. Xu, and D. B. Jump. 2005. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res* **46**: 706-715.
143. Pedrono, F., H. Blanchard, M. Kloareg, S. D'Andrea, S. Daval, V. Rioux, and P. Legrand. The fatty acid desaturase 3 gene encodes for different FADS3 protein isoforms in mammalian tissues. *J Lipid Res* **51**: 472-479.
144. Marquardt, A., H. Stohr, K. White, and B. H. Weber. 2000. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics* **66**: 175-183.
145. Schaeffer, L., H. Gohlke, M. Muller, I. M. Heid, L. J. Palmer, I. Kompauer, H. Demmelmair, T. Illig, B. Koletzko, and J. Heinrich. 2006. Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet* **15**: 1745-1756.
146. Cho, H. P., M. Nakamura, and S. D. Clarke. 1999. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem* **274**: 37335-37339.
147. Xie, L., and S. M. Innis. 2008. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids in women during pregnancy and in breast milk during lactation. *J Nutr* **138**: 2222-2228.
148. Malerba, G., L. Schaeffer, L. Xumerle, N. Klopp, E. Trabetti, M. Biscuola, U. Cavallari, R. Galavotti, N. Martinelli, P. Guarini, D. Girelli, O. Olivieri, R. Corrocher, J. Heinrich, P. F. Pignatti, and T. Illig. 2008. SNPs of the FADS gene cluster are associated with polyunsaturated fatty acids in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Lipids* **43**: 289-299.
149. Tvrdik, P., R. Westerberg, S. Silve, A. Asadi, A. Jakobsson, B. Cannon, G. Loison, and A. Jacobsson. 2000. Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids. *J Cell Biol* **149**: 707-718.

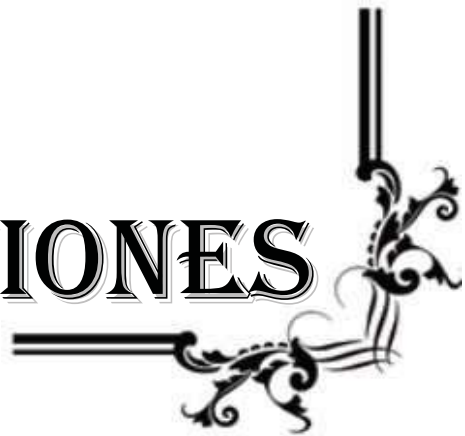


150. Leonard, A. E., B. Kelder, E. G. Bobik, L. T. Chuang, C. J. Lewis, J. J. Kopchick, P. Mukerji, and Y. S. Huang. 2002. Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids* **37**: 733-740.
151. Mamalakis, G., M. Kiriakakis, G. Tsibinos, and A. Kafatos. 2004. Depression and adipose polyunsaturated fatty acids in an adolescent group. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **71**: 289-294.
152. Inagaki, K., T. Aki, Y. Fukuda, S. Kawamoto, S. Shigeta, K. Ono, and O. Suzuki. 2002. Identification and expression of a rat fatty acid elongase involved in the biosynthesis of C18 fatty acids. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 613-621.
153. Reeves, P. G., F. H. Nielsen, and G. C. Fahey, Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**: 1939-1951.
154. Armitage, J. A., I. Y. Khan, P. D. Taylor, P. W. Nathanielsz, and L. Poston. 2004. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol* **561**: 355-377.
155. Ozanne, S. E., N. D. Martensz, C. J. Petry, C. L. Loizou, and C. N. Hales. 1998. Maternal low protein diet in rats programmes fatty acid desaturase activities in the offspring. *Diabetologia* **41**: 1337-1342.
156. Palacin, M., M. A. Lasuncion, M. Asuncion, and E. Herrera. 1991. Circulating metabolite utilization by periuterine adipose tissue in situ in the pregnant rat. *Metabolism* **40**: 534-539.
157. Macedo, G. S., C. L. Ferreira, A. Menegaz, V. C. Arantes, R. V. Veloso, E. M. Carneiro, A. C. Boschero, C. M. Oller do Nascimento, M. Q. Latorraca, and M. H. Gomes-da-Silva. 2008. Correlation of serum leptin and insulin levels of pregnant protein-restricted rats with predictive obesity variables. *Braz J Med Biol Res* **41**: 519-525.
158. Fernandez-Twinn, D. S., A. Wayman, S. Ekizoglou, M. S. Martin, C. N. Hales, and S. E. Ozanne. 2005. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-month-old female rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**: R368-373.
159. Herrera, E., M. A. Lasuncion, L. Huerta, and A. Martin-Hidalgo. 2000. Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biol Neonate* **78**: 315-320.
160. Waterland, R. A., and C. Garza. 1999. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* **69**: 179-197.
161. Du, F., D. A. Higginbotham, and B. D. White. 2000. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr* **130**: 514-521.
162. Ehrhardt, R. A., R. M. Slepatis, A. W. Bell, and Y. R. Boisclair. 2001. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Domest Anim Endocrinol* **21**: 85-96.
163. Seeber, R. M., J. T. Smith, and B. J. Waddell. 2002. Plasma leptin-binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat. *Biol Reprod* **66**: 1762-1767.
164. Reyes-Castro, L. A., J. S. Rodriguez, G. L. Rodriguez-Gonzalez, R. Chavira, C. J. Bautista, T. J. McDonald, P. W. Nathanielsz, and E. Zambrano. 2012. Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav Brain Res* **227**: 324-329.
165. Ravi, R. T., and N. C. Ganguli. 1980. Effect of dietary protein restriction on chromatin proteins of rat mammary gland. *J Nutr* **110**: 1144-1151.
166. Fernandez-Twinn, D. S., S. Ekizoglou, B. A. Gusterson, J. Luan, and S. E. Ozanne. 2007. Compensatory mammary growth following protein restriction during pregnancy and lactation increases early-onset mammary tumor incidence in rats. *Carcinogenesis* **28**: 545-552.
167. Innis, S. M. 2007. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proc Nutr Soc* **66**: 397-404.
168. Herrera, E. 2002. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* **19**: 43-55.

169. Gomez Dantes, H., M. E. Garnica, J. Sepulveda, J. L. Valdespino-Gomez, N. Lam, and M. C. Herrera. 1990. [Lactation and weaning patterns in Mexico. 1986 National Health Survey]. *Salud Publica Mex* **32**: 725-734.
170. Meyer, A. M., J. J. Reed, T. L. Neville, J. F. Thorson, K. R. Maddock-Carlin, J. B. Taylor, L. P. Reynolds, D. A. Redmer, J. S. Luther, C. J. Hammer, K. A. Vonnahme, and J. S. Caton. 2011. Nutritional plane and selenium supply during gestation affect yield and nutrient composition of colostrum and milk in primiparous ewes. *J Anim Sci* **89**: 1627-1639.
171. Mercuri, O., M. Elena de Tomas, and H. Itarte. 1979. Prenatal protein depletion and delta 9, delta 6 and delta 5 desaturases in the rat. *Lipids* **14**: 822-825.
172. Schiefermeier, M., and E. Yavin. 2002. n-3 Deficient and docosahexaenoic acid-enriched diets during critical periods of the developing prenatal rat brain. *J Lipid Res* **43**: 124-131.
173. Clandinin, M. T., J. E. Chappell, S. Leong, T. Heim, P. R. Swyer, and G. W. Chance. 1980. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev* **4**: 121-129.
174. Foreman-van Drongelen, M. M., A. C. van Houwelingen, A. D. Kester, T. H. Hasaart, C. E. Blanco, and G. Hornstra. 1995. Long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants: status at birth and its influence on postnatal levels. *J Pediatr* **126**: 611-618.
175. Leaf, A. A., M. J. Leighfield, K. L. Costeloe, and M. A. Crawford. 1992. Long chain polyunsaturated fatty acids and fetal growth. *Early Hum Dev* **30**: 183-191.
176. Neuringer, M., and W. E. Connor. 1986. n-3 fatty acids in the brain and retina: evidence for their essentiality. *Nutr Rev* **44**: 285-294.
177. Clandinin, M. T., J. Jumpsen, and M. Suh. 1994. Relationship between fatty acid accretion, membrane composition, and biologic functions. *J Pediatr* **125**: S25-32.
178. Reyes-Castro, L. A., J. S. Rodriguez, G. L. Rodriguez-Gonzalez, R. D. Wimmer, T. J. McDonald, F. Larrea, P. W. Nathanielsz, and E. Zambrano. 2011. Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. *Int J Dev Neurosci* **29**: 177-182.
179. Reyes-Castro, L. A., J. S. Rodriguez, R. Charco, C. J. Bautista, F. Larrea, P. W. Nathanielsz, and E. Zambrano. 2012. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci* **30**: 39-45.
180. Rodriguez, J. S., G. L. Rodriguez-Gonzalez, L. A. Reyes-Castro, C. Ibanez, A. Ramirez, R. Chavira, F. Larrea, P. W. Nathanielsz, and E. Zambrano. 2012. Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation. *Int J Dev Neurosci* **30**: 75-81.
181. Pine, A. P., N. S. Jessop, G. F. Allan, and J. D. Oldham. 1994. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 4. Tissue protein synthesis and turnover associated with mobilization of maternal protein. *Br J Nutr* **72**: 831-844.
182. Langley, S. C., R. F. Browne, and A. A. Jackson. 1994. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol* **109**: 223-229.
183. McDonald, J. M., and M. K. Nielsen. 2006. Correlated responses in maternal performance following divergent selection for heat loss in mice. *J Anim Sci* **84**: 300-304.
184. Morag, M. 1970. Estimation of milk yield in the rat. *Lab Anim* **4**: 259-272.
185. Cowie, A. T., I. A. Forsyth, and I. C. Hart. 1980. Hormonal control of lactation. *Monogr Endocrinol* **15**: I-XIV, 1-275.
186. Lyons, W. R., C. H. Li, and R. E. Johnson. 1958. The hormonal control of mammary growth and lactation. *Recent Prog Horm Res* **14**: 219-248; discussion 248-254.
187. Donovan, S. M., and J. Odle. 1994. Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annu Rev Nutr* **14**: 147-167.
188. Jenness, R. 1979. The composition of human milk. *Semin Perinatol* **3**: 225-239.
189. Grigor, M. R., J. M. Carrington, P. G. Arthur, and P. E. Hartmann. 1989. Lack of correlation between milk glucose concentrations and rates of milk production in the rat. *J Dairy Res* **56**: 37-43.

190. Yonekubo, A., S. Honda, M. Okano, K. Takahashi, and Y. Yamamoto. 1993. Dietary fish oil alters rat milk composition and liver and brain fatty acid composition of fetal and neonatal rats. *J Nutr* **123**: 1703-1708.
191. Wainwright, P. E. 2002. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* **61**: 61-69.
192. Sanchez, J., P. Oliver, O. Miralles, E. Ceresi, C. Pico, and A. Palou. 2005. Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology* **146**: 2575-2582.
193. McFadin, E. L., C. D. Morrison, P. R. Buff, N. C. Whitley, and D. H. Keisler. 2002. Leptin concentrations in periparturient ewes and their subsequent offspring. *J Anim Sci* **80**: 738-743.
194. Whitley, N. C., E. L. Walker, S. A. Harley, D. H. Keisler, and D. J. Jackson. 2005. Correlation between blood and milk serum leptin in goats and growth of their offspring. *J Anim Sci* **83**: 1854-1859.
195. Casabiell, X., V. Pineiro, M. A. Tome, R. Peino, C. Dieguez, and F. F. Casanueva. 1997. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 4270-4273.
196. Devaskar, S. U., C. Ollesch, R. A. Rajakumar, and P. A. Rajakumar. 1997. Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 44-47.
197. Mistry, A. M., A. Swick, and D. R. Romsos. 1999. Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *Am J Physiol* **277**: R742-747.
198. Grove, K. L., and M. S. Smith. 2003. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav* **79**: 47-63.
199. Yura, S., H. Itoh, N. Sagawa, H. Yamamoto, H. Masuzaki, K. Nakao, M. Kawamura, M. Takemura, K. Kakui, Y. Ogawa, and S. Fujii. 2005. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* **1**: 371-378.
200. Vickers, M. H., P. D. Gluckman, A. H. Coveny, P. L. Hofman, W. S. Cutfield, A. Gertler, B. H. Breier, and M. Harris. 2005. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* **146**: 4211-4216.

# PUBLICACIONES



## 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

CLAUDIA J. BAUTISTA, LOURDES BOECK, FERNANDO LARREA, PETER W. NATHANIELSZ, AND ELENA ZAMBRANO

Department of Reproductive Biology [C.J.B., L.B., FL, E.Z.], Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, 14000, Mexico; Department of Obstetrics [P.W.N.], University of Texas, Health Science Center San Antonio, San Antonio, Texas, 78229

**ABSTRACT:** Suboptimal developmental environments program offspring to lifelong metabolic problems. We evaluated effects of maternal isocaloric low protein diet during pregnancy and/or lactation on milk quantity and leptin concentration at postnatal day 7, 14, and 21. Control mothers ate 20% casein (C) and restricted mothers (R) 10% casein to provide four groups: CC, RR, CR, and RC (first letter pregnancy and second lactation diet) to enable evaluation of effects influenced by maternal diet during pregnancy and lactation. Milk leptin was not a determinant of pup serum leptin. Pup serum leptin did not inhibit milk appetite at any postnatal age. Pup serum leptin did not correlate with pup adipose tissue. Finally, the normal postnatal leptin rise in pup serum was delayed by prenatal undernutrition. These data suggest that fetal nutrition modifies timing of neonatal leptin surge and may contribute to the development of altered appetite and metabolic disorders in later life. (*Pediatr Res* 63: 358–363, 2008)

Human epidemiologic (1) and experimental animal studies (2) have shown that suboptimal environments in the womb and during early neonatal life alter growth and predispose individuals to lifelong health problems. Effects of maternal nutrient restriction during pregnancy and/or lactation have been studied in many different models. A variety of growth, endocrine and cardiovascular phenotypes result from nutrient restriction in different developmental windows. Perinatal malnutrition predisposes to offspring obesity in adulthood by changes during the development of central neural pathways mediated by regulatory mechanisms including leptin (3). Rapid catch-up growth after early growth restriction increases the risk of developing obesity and cardiovascular disease in later life (4,5).

One of the most important neonatal factors involved in developmental programming is the adequacy of nutrition during the lactation period. Breast feeding decreases the risk of obesity in later childhood (6). Many factors including maternal milk composition, energy content, and quantity may influence future appetite control. Breast milk contains leptin (7) a hormone produced and secreted in a variety of tissues,

predominantly by adipocytes (8) which regulates food intake and energy expenditure at the hypothalamic level in adult animals (8,9). Circulating levels of leptin correlate positively with the amount of fat stores (10). During the first days of postnatal life, leptin levels are higher than those observed later in development (11). Several studies have demonstrated a surge of leptin around postnatal days (PND) 10–14 in the rat (11). This surge has been correlated with maturation of the central nervous mechanisms that regulate appetite in later life. Leptin also seems to play a key role in programming the structural and functional development of hypothalamic orexigenic and anorexigenic centers in the early postnatal period.

We have demonstrated that maternal protein restriction in the rat during either pregnancy or lactation alters postnatal growth, appetitive behavior, and leptin concentrations at 110 d postnatal age (12). The developmental programming effects on pups are dependent on offspring sex and the period of exposure to undernutrition. Teixeira *et al.* have shown changes in leptin concentration, during lactation, in pups whose mothers were exposed to protein or energy restriction (13). In contrast with our reported data (12), the leptin serum concentrations after weaning were unchanged. This discrepancy could be explained by differences in the litter size retained during suckling in these studies.

Little attention has been given to how the various nutrient restriction regimens alter quantity and quality of milk available during lactation. Associations have been published between offspring weight, offspring growth, and milk leptin concentration (14). However, in altricial species where the early postnatal leptin surge plays a critical role in the maturation of appetitive centers in the brain, it is important to determine whether the leptin responsible for this key maturational function is of fetal or maternal origin.

We evaluated the effects of feeding an isocaloric low protein diet, during pregnancy and/or lactation, on milk quantity and milk leptin concentration available to pups at PND 7, 14, and 21 to determine whether there is any correlation between neonatal serum leptin concentrations with milk leptin concentrations and total milk leptin provided to the pups on neonatal life in the rat.

Received June 19, 2007; accepted November 6, 2007.

Correspondence: Elena Zambrano, Ph.D., Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Sección XVI 14000, Mexico City, Mexico; e-mail: zamgon@servidor.unam.mx

This work was partially supported by CONAcYT-48839 (México) and the NIH HD21350.

**Abbreviations:** PND, postnatal day; C, control; R, restricted

## MATERIALS AND METHODS

**Care and maintenance of animals.** All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the "Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán" (INCMNSZ), Mexico. Details of maternal diet, breeding, and management of the four groups of offspring have been published in detail (15). Briefly, mothers were virgin female albino Wistar rats aged  $11 \pm 1$  wk and weighing  $240 \pm 20$  g, obtained from INCMNSZ. Female rats with regular cycles were maintained on Purina Laboratory Chow 5001 and under controlled lighting (lights on from 7:00 AM to 7:00 PM at 22–23°C).

Female rats were mated overnight with proven male breeders and the day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the day of conception, day 0. Only rats which were pregnant within 5 d of introduction of the male were retained in the study. Pregnant rats were transferred to individual metabolic cages and allocated at random to one of two groups to be fed either a 20% casein (control diet—C) or 10% casein isocaloric diet (restricted diet—R) (16). Food and water were available *ad libitum*.

Food was provided in the form of flat biscuits, which were retained behind a grill through which the rats nibbled the food. On day 20 postconception, pregnant rats were transferred to normal cages to optimal conditions for delivery, which occurred in the early daylight hours between 9:00 AM and noon on postconceptual day 22. Day of delivery was considered as day 0 of postnatal life.

Maternal weight, litter size, and pup weight were recorded at birth. Ano-genital distance was measured with calipers. According to our published data (12), sex was judged according to whether the ano-genital distance was less (female) or greater than (male) 2.5 mm. To ensure homogeneity of study subjects, litters of over 14 pups, or less than 12 pups, were not included in the study. Litters of 12–14 pups were adjusted to 12 pups for each mother while maintaining as close to a 1:1 sex ratio as possible. Four groups were established: CC in which mothers that received the control diet during pregnancy continued to be fed the control diet during lactation; RR in which mothers that had received the restricted diet during pregnancy continued to receive the restricted diet during lactation; CR in which mothers that received the control diet during pregnancy received the restricted diet during lactation; and RC in which mothers that received the restricted diet during pregnancy were provided with the control diet during lactation. After weaning (PND 21), all pups were fed with C diet.

**Experiment 1.** Twenty-two mothers/litters: CC ( $n = 5$ :  $5.6 \pm 0.4$  male/litter,  $6.4 \pm 0.4$  female/litter), RR ( $n = 6$ :  $5.5 \pm 0.5$  male/litter,  $6.5 \pm 0.5$  female/litter), CR ( $n = 6$ :  $5.3 \pm 0.7$  male/litter,  $6.7 \pm 0.7$  female/litter), and RC ( $n = 5$ :  $6.2 \pm 0.2$  male/litter,  $5.8 \pm 0.2$  female/litter) were studied for maternal milk production and pup milk intake. Randomly two male and two female pups per litter were used to determine carcass components. Preliminary analysis for differences according to the sex of the pup revealed no difference, and thus all data were pooled.

**Experiment 2.** Eighty mothers and litters,  $n = 5$  for group per age were used to study maternal milk and pup serum leptin concentrations. Randomly, two male and two female pups/litter per age were used for serum leptin determination with the exception of offspring from PND 2 in which all the pups for each sex per litter ( $n = 4$ –8 pups/sex) were used and the samples pooled. No sex differences were found in serum leptin at this age, therefore, we averaged male and female data.

**Measurement of maternal milk production and pup milk intake.** At 7:00 AM on PND 7, 14, and 21, pups were removed from the mothers for 4 h during which mothers ate *ad libitum* whereas the pups did not feed. Pups were labeled on the tail with a permanent marker. Mothers were weighed at the beginning and end of the 4-h period. Pups were weighed individually immediately before they were returned to the mothers and again 1 h later.

As discussed below, the excellent correlation between the increase in maternal and pup weight was used to justify approximation of maternal weight gain to milk production. Relative milk intake was calculated from the absolute food intake/pup body weight.

**Measurement of milk leptin concentration.** Milk was obtained on PND 7, 14, and 21. Pups were removed from the mothers for 4 h after which the mothers received 0.8 U oxytocin (ip) and milk expressed 15 min later. Samples were vortexed, divided in aliquots, and frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. Milk samples were thawed at  $37^\circ\text{C}$  and vortexed vigorously before pipetting to ensure sample uniformity. Milk leptin concentration was determined by RIA using a commercial rat kit from Linco Research, Inc. with a detection limit 0.5 ng/mL using 100  $\mu\text{L}$  samples size. Milk samples were assayed in duplicate.

**Measurement of pup serum leptin concentrations.** At 7:00 AM on PND 7, 14, and 21 pups were removed from the mothers for 4 h during which pups did not feed. We obtained all samples from rats in the fasted state to avoid leptin variation. Offspring of 2 d of age were not subjected to fasting. Between

11:00 AM and noon, pups were rapidly killed by decapitation using a rodent guillotine (Thomas Scientific, NJ). Trunk blood was collected into polyethylene tubes and allowed to clot at  $4^\circ\text{C}$  for 1 h. Blood samples were centrifuged at 1500 g for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Serum samples were kept at  $-20^\circ\text{C}$  until assayed. Pup serum leptin concentrations were determined by RIA using a commercial rat kit from Linco Research, Inc. Each serum sample was assayed in duplicate.

**Carcass components (fat-to-protein ratio).** At 25 d of age, rats were rapidly killed as described above and kept frozen in small plastic bags until they were analyzed. Head and gastrointestinal tract were discarded from pups and not included in the analysis. After weighing (wet weight), each carcass was chopped into small pieces, placed in a tared beaker and dried at  $60^\circ\text{C}$  to constant weight. The weight lost is considered to be water weight. The dried carcasses were ground-up and aliquots were taken. Fat was determined gravimetrically, evaporating the solvent from an aliquot of the hexane-isopropanol extract by Soxhlet method and total nitrogen by the Kjeldahl method (17).

**Statistical analysis.** Data from animals within the litter were averaged and analysis performed only on number of litters. All data are presented as the means  $\pm$  standard error of the mean. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. Unpaired  $t$  test was also used to compare male and female data. Maternal milk production, pup milk intake, maternal and pup serum leptin, and pup body weight correlations were calculated using a Pearson correlation.  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

**Maternal body weight.** Table 1 shows maternal weight. There were no differences between the groups on the day of delivery. The maternal weight data on the day of birth lack precision because of the irregular timing of delivery relative to the time at which the dams were weighed, therefore, data at birth are provided to give an approximate weight at the start of lactation. Although maternal weight showed a tendency to be lower in RR and CR compared with CC, the difference was only significant on PND 14.

**Milk production and leptin concentration.** Maternal milk production was lower in RR and CR and was higher in RC at PND 14 and 21 (Table 2). CC milk leptin concentration was not different at the three ages studied. RR milk leptin concentration was higher at PND 14 than at PND 7. CR milk leptin concentration was higher at PND 21 than at 14 and higher at PND 14 than 7 and milk leptin concentration in the RC group was higher at PND 21 than PND 7 (Table 2). Milk leptin concentration was higher in the CR group than in the CC, RR, and RC groups at PND 14 and 21, and higher in the RC group than in the CC group at PND 21 (Table 2).

**Pup serum leptin.** For CC and CR groups, the highest pup leptin concentration was at PND 14. In contrast, in RR and RC the highest was observed at PND 21, indicating a delay in the leptin peak occurrence in animals which were undernourished prenatally (Fig. 1). At PND 2, there were no differences among groups in pup serum leptin. At PND 14, RR and RC had lower leptin values in comparison with those in CC. At PND 21, leptin values in RR were higher than in CC and CR,

Table 1. Maternal body weight during lactation

Weight (g)	CC ( $n = 5$ )	RR ( $n = 6$ )	CR ( $n = 6$ )	RC ( $n = 5$ )
At birth	281 $\pm$ 5	283 $\pm$ 7	285 $\pm$ 22	274 $\pm$ 7
7 d	292 $\pm$ 16	288 $\pm$ 5	273 $\pm$ 12	286 $\pm$ 9
14 d	314 $\pm$ 7	279 $\pm$ 8*	253 $\pm$ 10*	294 $\pm$ 6†
21 d	323 $\pm$ 9	307 $\pm$ 16	288 $\pm$ 20	310 $\pm$ 11

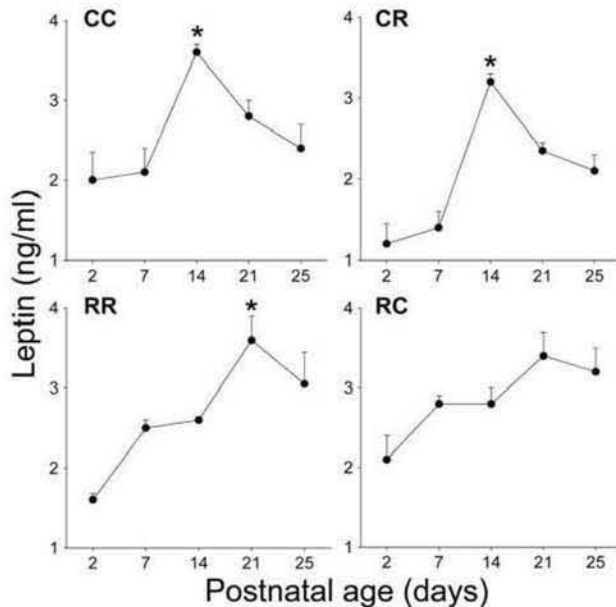
Maternal body weight at birth and during lactation (postnatal days 7, 14, and 21) in the 4 groups exposed to different diets during pregnancy and lactation. Mean  $\pm$  SEM.  $p < 0.05$ . \* vs. CC; † vs. CR, at the same age.

**Table 2.** Maternal milk production, milk leptin concentration, and milk leptin-to-pup serum leptin ratio

	CC	RR	CR	RC
Milk production (g) (n = 5-6)				
7 d	16.5 ± 3.5	3.2 ± 1.9*	5.6 ± 1.3*	22.2 ± 1.2
14 d	11.3 ± 0.8	8.3 ± 0.7*	2.0 ± 0.6*†	22.7 ± 1.7‡
21 d	16.1 ± 1.0	4.2 ± 2.4*	7.1 ± 3.2*	23.4 ± 1.0‡
Milk leptin (ng/mL) (n = 5)				
7 d	2.2 ± 0.41	2.2 ± 0.11	2.4 ± 0.06	2.2 ± 0.08
14 d	2.4 ± 0.26	2.8 ± 0.08	3.4 ± 0.08§	2.6 ± 0.12
21 d	2.2 ± 0.14	2.8 ± 0.28	4.5 ± 0.19§	3.0 ± 0.14¶
Milk leptin-to-pup serum leptin ratio (n = 5)				
7 d	1.0 ± 0.13	0.9 ± 0.05	1.7 ± 0.19§	0.8 ± 0.04
14 d	0.7 ± 0.07	1.1 ± 0.03¶	1.1 ± 0.04¶	1.0 ± 0.12¶
21 d	0.8 ± 0.04	0.8 ± 0.11	2.2 ± 0.18§	1.1 ± 0.27

Maternal milk production, milk leptin concentration, and milk leptin-to-pup serum leptin ratio on postnatal days 7, 14, and 21 in the 4 groups exposed to different diets during pregnancy and lactation. Mean ± SEM, n indicates mothers or litters.

p < 0.05 \* vs. CC and RC; † vs. RR; ‡ vs. CC, at the same age.  
p < 0.05 § vs. CC, RR, and RC; ¶ vs. CC, at the same age.



**Figure 1.** Pup serum leptin. Mean ± SEM, n = 5 litters of separate mothers. \*Maximal leptin value in the same group, p < 0.05.

and at PND 25, pup leptin concentration for RC was higher than for CC and CR.

There was no correlation between milk and pup serum leptin concentrations at any age either in the individual groups (p > 0.05) or when all the groups and the different days were pooled (r = 0.04, p = 0.7). Milk leptin-to-pup serum leptin ratio was higher in CR than in CC at all ages (p < 0.05) as were RR and RC at PND 14 (Table 2).

**Pup body weight and milk intake.** There were no important offspring sex differences for pup body weight in the first 25 PND (Table 3). At PND 7, RC pup body weight was higher than the weight in RR and CR. Both male and female offspring in the groups restricted during lactation had lower body weights in comparison with the weights in CC and RC from PND 14 to 25.

Absolute food intake by the pups increased in all groups with age (Table 4). Pups in the RC group had a higher milk intake at PND 7 in comparison with those in CC and CR. At PND 14, the RC group had the highest and CR the lowest absolute food intake. At PND 21, the absolute food intake in the RR group was lower than the intake in CC and RC. The only differences in relative food intake were at PND 14 when RC pups had a higher relative food intake than those at RR and CR (Table 4).

**Correlation studies.** There was a positive correlation between milk production and milk intake when all groups and days were pooled (Fig. 2). No correlation was found for PND 7, but there was a high positive correlation on PND 14 (r = 0.8 p < 0.001) and approaching significance at PND 21 (r = 0.4 p = 0.08) (Fig. 2).

There was no correlation between pup serum leptin and body weight gain after 1 h of feeding (milk intake) in any individual group on the 3 days of measurement. However, when all groups and ages were pooled, milk intake and pup serum leptin were significantly positively correlated (r = 0.3, p = 0.01) (Fig. 3).

There was a positive correlation between absolute milk intake (g/h) and pup body weight (g) in CC, CR, and RC groups at PND 7, 14, and 21 (p < 0.05). No correlation was

**Table 3.** Pup body weight at different ages

Weight (g)	CC (n = 5)	RR (n = 6)	CR (n = 6)	RC (n = 5)
Males				
Birth	6.4 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.4 ± 0.2	6.1 ± 0.2
7 d	11.9 ± 1.2	10.8 ± 0.5	10.0 ± 0.4*	13.1 ± 0.4†
14 d	21.3 ± 1.1	15.0 ± 0.8*	13.3 ± 0.6*	25.0 ± 0.9
21 d	29.5 ± 3.0	16.9 ± 1.7*	18.8 ± 2.5*	30.5 ± 2.7
25 d	60.6 ± 2.4	40.6 ± 2.8*	45.0 ± 2.5*	62.5 ± 2.6
Females				
Birth	5.7 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.7 ± 0.2
7 d	11.2 ± 1.0	10.4 ± 0.4	9.9 ± 0.4*	12.8 ± 0.6†
14 d	20.3 ± 1.1	14.2 ± 0.7*	12.8 ± 0.5*	24.1 ± 1.0‡
21 d	29.3 ± 2.8	16.0 ± 1.8*	15.7 ± 2.7*	29.7 ± 2.8
25 d	53.8 ± 3.8	38.0 ± 2.0*	38.1 ± 2.9*	57.8 ± 1.4

Pup body weight at birth and on postnatal days 7, 14, 21, and 25 in the 4 groups exposed to different diets during pregnancy and lactation. Mean ± SEM, n indicates number of litters.

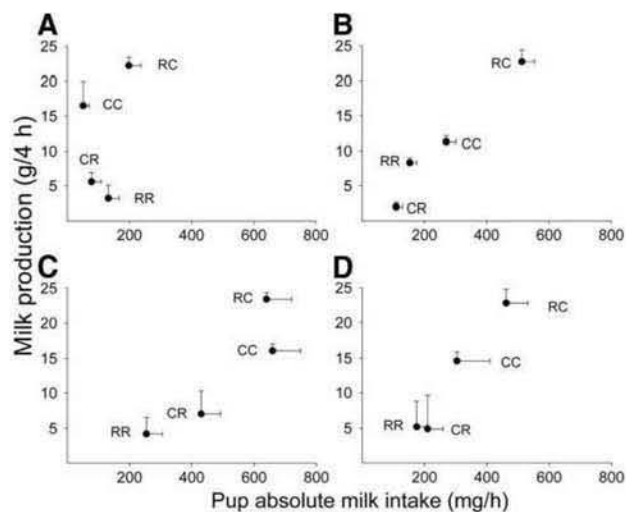
p < 0.05, \* vs. CC and RC; † vs. RR; ‡ vs. CC, at the same age.

**Table 4.** Individual pup absolute and relative milk intake

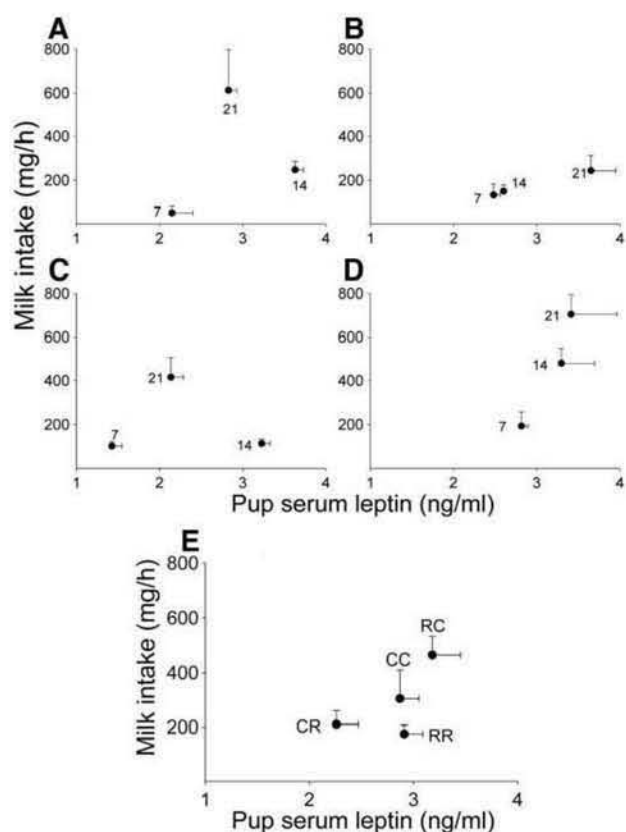
	CC (n = 5)	RR (n = 6)	CR (n = 6)	RC (n = 5)
Absolute food intake (mg/h)				
7 d	51 ± 20	132 ± 34	78 ± 30	198 ± 40*
14 d	270 ± 31	153 ± 22	109 ± 21†	513 ± 40‡
21 d	659 ± 90	254 ± 51§	430 ± 62	640 ± 80
Relative food intake (mg/h/g body wt)				
7 d	3.9 ± 2	13.0 ± 5	6.6 ± 3	15.4 ± 5
14 d	12.7 ± 3.0	10.6 ± 2.5	8.6 ± 1.3	19.7 ± 2.3‡
21 d	18.6 ± 7	14.9 ± 5	22.2 ± 3	22.2 ± 5

Individual pup absolute and relative milk intake on postnatal days 7, 14, and 21 in the 4 groups of mothers exposed to different diets during pregnancy and lactation. Absolute milk intake expressed as body weight gain after 1 h feeding (mg/h). Relative milk intake was calculated from absolute milk intake/pup body weight. Mean ± SEM, n indicates number of litters.

p < 0.05, \* vs. CC and CR; † vs. CC; ‡ vs. CC, RR, and RC; § vs. CC and RC, at the same age.



**Figure 2.** Pup milk intake as a function of milk production on (A) PND 7 ( $r = 0.14$ ,  $p = 0.6$ ), (B) 14 ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.001$ ), and (C) 21 ( $r = 0.4$ ,  $p = 0.08$ ). (D) All groups and days ( $r = 0.4$ ,  $p = 0.004$ ). Mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$ –6 mothers or litters.



**Figure 3.** Pup serum leptin as a function of milk intake (A) CC ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.3$ ), (B) RR ( $r = 0.003$ ,  $p = 0.9$ ), (C) CR ( $r = 0.1$ ,  $p = 0.7$ ), (D) RC ( $r = 0.5$ ,  $p = 0.07$ ), and (E) all groups and days ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.01$ ). Mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$  litters.

found for the RR group ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.3$ ) (Fig. 4). Relative food intake expressed as weight gain/h/g of body weight was positively correlated with pup weight in CC and CR. No

correlation was observed in the RR and RC groups. It is interesting to note that these groups were those that presented a delay in serum leptin peak occurrence.

**Pup body composition at 25 d of age.** At PND 25, body fat-to-protein ratio was higher in RC than RR male offspring and higher in RC than in CC, RR, and CR female pups (Fig. 5).

## DISCUSSION

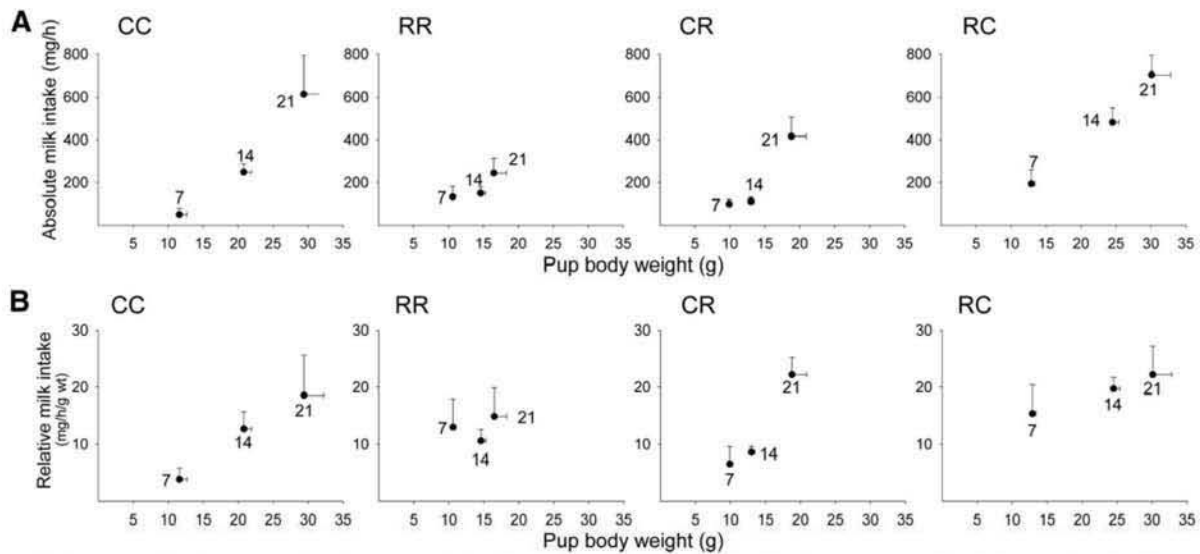
In comparison with the literature on postnatal growth and function of offspring of rats submitted to various nutritional challenges during pregnancy and lactation there are few data on how various nutrient restriction regimens alter quantity and quality of milk available to the pups. Consideration of the ways in which milk leptin may affect pup development has received less attention than the effects of experimental leptin administration in the neonatal period. The present study was conducted to determine the effects of maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation on offspring milk availability and intake, milk leptin concentration and total milk leptin provided to the pups, pup serum leptin and pup growth, and their relationship to offspring body composition at weaning.

Maternal weight showed a tendency to be lower in RR and CR, with not statistical differences among them. However, the subsequent weight gain during lactation of RR was 24 g whereas CR was 3 g. We do not have an explanation for this difference, but because the mothers in RR group were restricted during pregnancy they probably had a greater drive to eat during lactation than those in the CR group.

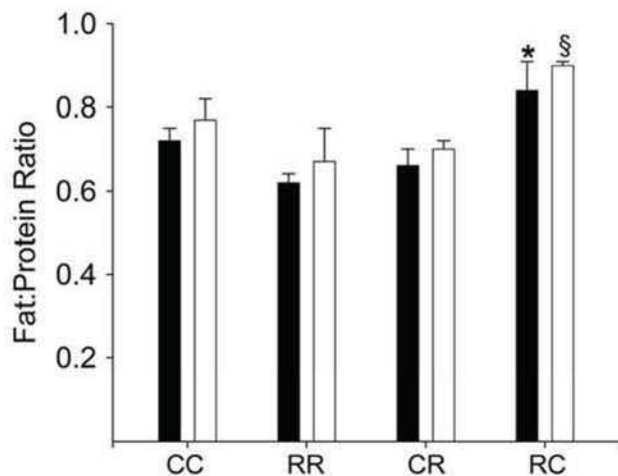
Our finding of similar maternal weight at birth and similar pup weight at birth correlates very well. As in many other studies, protein restriction at these levels is not enough to make any difference in maternal and pup weight at birth (18). In the developmental programming field, it is now generally considered that weight is a very poor measure of changes. Important modifications occur in the pups without a change in the overall weight.

Analysis of the data for maternal weight gain over a period of 4 h (milk production) revealed interesting differences in the four groups. Although weight at all the three ages studied was similar in CC and RC, the maternal weight gain in RC was 50% greater than in that in CC. Because maternal weight over the whole period did not differ in these two groups we have made the assumption that increased weight gain in the 4 h reflects increased milk production. This conclusion is supported by the greater increase in pup weight gain after 1 h with the mother (milk intake) in the RC compared with CR group at PND 7 and 14. In contrast, mothers in RR and CR exhibited decreased milk production. Maternal and offspring suckling factors are both likely to be involved in the increased milk production in a setting of increased pup milk consumption. There are data in the literature that indicate that pup consumption affects milk production as well as data showing that milk production has an influence on pup consumption (19,20). One way to determine the relative influences of these two possibilities in future studies would be to reduce the number of pups suckling the dam.





**Figure 4.** Pup body weight (A) as a function of absolute milk intake: CC ( $r = 0.76$ ,  $p = 0.001$ ), RR ( $r = 0.28$ ,  $p = 0.3$ ), CR ( $r = 0.9$ ,  $p < 0.001$ ), and RC ( $r = 0.66$ ,  $p = 0.006$ ) or (B) as a function of relative milk intake: CC ( $r = 0.7$ ,  $p = 0.005$ ), RR ( $r = 0.08$ ,  $p = 0.8$ ), CR ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.001$ ), and RC ( $r = 0.16$ ,  $p = 0.55$ ) on PND 7, 14, and 21. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$ –6 litters.



**Figure 5.** Offspring body composition (fat-to-protein ratio) on PND 25 of male (black bar) and female (white bar). Mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$  litters.  $p < 0.05$ , \*vs. RR; §versus CC, RR, and CR, in the same sex.

Leptin is present in the milk of many different species (21–23), including humans (7). Nursing rats can transfer leptin to the neonates *via* the milk (24). Milk leptin concentration is determined by a number of factors, the major ones being mammary gland leptin secretion and total volume of milk produced. There were no clear associations between milk leptin concentration at the different postnatal ages and the four dietary regimens. This finding of constancy in milk leptin in mothers with different dietary histories is in keeping with the view that milk composition is protected under a wide range of maternal metabolism (25). This protection does not however extend to the quantity of milk produced as we show here.

The milk production and pup milk intake in RC group is significantly higher than in the CC group, but pup body weights between these two groups are similar. This observa-

tion demonstrates the complexity of just evaluating postnatal development in terms of weight. Clearly other factors such as metabolic rate, activity, and heat loss will all play a role. The results observed in the RC group (milk intake and body composition) are of importance for determination of optimal postdelivery and preweaning feeding of human neonates undernourished *in utero* due to causes other than poor maternal nutrition such as uterine vascular disease when the fetus is undernourished but the neonate is not exposed to poor maternal nutrition during lactation. The changes we have observed in pup serum leptin and in body growth postnatally in the RC group, may be those for which this type of newborn is most at risk. Rapid catch-up growth during the early months of life during lactation or feeding with artificial formulas can result in problems in later life (26).

Serum leptin concentrations are higher in neonates than in adults (27,28) despite the presence of a lower proportion of body fat immediately after birth (28). We observed a delay in the leptin peak (PND 21) in RR and RC. This observation suggests that the common factor is the restriction during pregnancy and is of considerable interest in the light of the work from several laboratories that indicates that the normal rat postnatal serum leptin surge that takes place around PND 10–14 plays a central role in the maturation of the hypothalamic appetitive centers (29). Advancing the leptin peak by exogenous subcutaneous leptin administration leads to obesity in later life (3), however, the opposite effects have been reported by others (30). There are no data on the effects of a delayed serum leptin surge such as we describe in the RR and RC groups. We have reported that the offspring of RC mothers become very obese whereas offspring of RR mothers have the lowest weight gain of all four groups in adulthood. These observations apply to both males and females (12,31). These findings indicate that the effects of developmental influences during pregnancy are further modified by the level of nutrition

available in lactation. There is currently much interest in an altered timing of the leptin surge in predicting future appetite and phenotype of offspring. Our findings indicate that there are many factors determining eventual phenotype in addition to the timing of the leptin surge.

When body composition was evaluated at PND 25, the highest leptin and body fat were seen in the RC group. However, body fat did not correlate with pup leptin in the other three groups. Further studies are needed to evaluate both the source of pup serum leptin and the mechanism by which the leptin surge is delayed in the offspring of mothers restricted during pregnancy and how changes in appetite brought about by this alteration interact with other factors such as activity and altered metabolic rate in the genesis of obesity.

We also sought to determine whether the leptin in fetal serum is of fetal or maternal origin. Our findings indicate that there is no correlation between milk leptin intake and pup serum leptin. This finding is of importance in relation to the potential role of pup leptin in inhibiting pup suckling behavior. It is well known that in adults the hormone leptin inhibits food intake. However, the correlation between pup serum leptin and milk intake was very weak and showed no significance in any individual group. This finding is consistent with previous observations that leptin administration is unable to influence body weight, fat pad, and milk intake (28). In addition, exogenous leptin did not modify milk intake in neonatal mice at PND 7–10 (28). In contrast, rat studies have shown that physiologic oral doses of leptin administered during lactation exert anorexigenic effects without affecting body weight gain (23). Our findings are not surprising in view of the very different timing of maximal pup serum leptin values in the four groups. In fact the poor correlation of pup serum leptin and milk intake over the full study was positive showing no indication of an inhibitory effect of leptin on milk appetite in the neonatal pups.

In conclusion, we would make four major observations from our evaluation of changes in milk and pup leptin. First, our findings indicate that milk leptin is unlikely to be a major determinant of pup serum leptin. Secondly, we could find no evidence that pup serum leptin inhibits milk appetite at this age. Thirdly, pup adipose tissue may not be the only neonatal source of leptin in pup serum. Finally, the normal postnatal rise in leptin was delayed in animals undernourished prenatally. These data are compatible with the view that the timing of neonatal leptin surge is influenced by fetal nutrition and may play a role in altered appetitive regulation and contribute to the development of metabolic disorders in later life.

## REFERENCES

1. Strauss RS 1997 Effects of the intrauterine environment on childhood growth. *Br Med Bull* 53:81–95
2. Nathanielsz PW 2006 Animal models that elucidate basic principles of the developmental origins of adult diseases. *ILAR J* 47:73–82
3. Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S 2005 Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 1:371–378
4. Gluckman PD, Cutfield W, Hofman P, Hanson MA 2005 The fetal, neonatal, and infant environments—the long-term consequences for disease risk. *Early Hum Dev* 81:51–59
5. Anguita RM, Sigulem DM, Sawaya AL 1993 Intrauterine food restriction is associated with obesity in young rats. *J Nutr* 123:1421–1428
6. von Kries R, Koletzko B, Sauerwald T, von Mutius E, Barnert D, Grunert V, von Voss H 1999 Breast feeding and obesity: cross sectional study. *BMJ* 319:147–150
7. Houseknecht KL, McGuire MK, Portocarrero CP, McGuire MA, Beerman K 1997 Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. *Biochem Biophys Res Commun* 240:742–747
8. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546–549
9. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540–543
10. Ostlund RE Jr, Yang JW, Klein S, Gingerich R 1996 Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3909–3913
11. Rayner DV, Dalglish GD, Duncan JS, Hardie LJ, Hoggard N, Trayhurn P 1997 Postnatal development of the ob gene system: elevated leptin levels in suckling fa/fa rats. *Am J Physiol* 273:R446–R450
12. Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, Martinez-Samayo PM, Gonzalez-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW 2006 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* 571:221–230
13. Teixeira C, Passos M, Ramos C, Dutra S, Moura E 2002 Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem* 13:493–498
14. Dundar NO, Anal O, Dundar B, Ozkan H, Caliskan S, Buyukgebiz A 2005 Longitudinal investigation of the relationship between breast milk leptin levels and growth in breast-fed infants. *J Pediatr Endocrinol Metab* 18:181–187
15. Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW 2005 A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 563:275–284
16. Zambrano E, Martinez-Samayo PM, Bautista CJ, Deas M, Guillen L, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Larrea F, Nathanielsz PW 2005 Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 566:225–236
17. AOAC 2002 Official Methods of Analysis of AOAC International No. 920.05, 920.39
18. Langley SC, Browne RF, Jackson AA 1994 Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol* 109:223–229
19. McDonald JM, Nielsen MK 2006 Correlated responses in maternal performance following divergent selection for heat loss in mice. *J Anim Sci* 84:300–304
20. Morag M 1970 Estimation of milk yield in the rat. *Lab Anim* 4:259–272
21. McFadin EL, Morrison CD, Buff PR, Whitley NC, Keisler DH 2002 Leptin concentrations in periparturient ewes and their subsequent offspring. *J Anim Sci* 80:738–743
22. Whitley NC, Walker EL, Harley SA, Keisler DH, Jackson DJ 2005 Correlation between blood and milk serum leptin in goats and growth of their offspring. *J Anim Sci* 83:1854–1859
23. Sanchez J, Oliver P, Miralles O, Ceresi E, Pico C, Palou A 2005 Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology* 146:2575–2582
24. Casabiell X, Pineiro V, Tome MA, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF 1997 Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4270–4273
25. Jenness R 1974 Proceedings: biosynthesis and composition of milk. *J Invest Dermatol* 63:109–118
26. Singhal A, Lanigan J 2007 Breastfeeding, early growth and later obesity. *Obes Rev* 8:51–54
27. Devaskar SU, Ollesch C, Rajakumar RA, Rajakumar PA 1997 Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 238:44–47
28. Mistry AM, Swick A, Romsos DR 1999 Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *Am J Physiol* 277:R742–R747
29. Grove KL, Smith MS 2003 Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav* 79:47–63
30. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M 2005 Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 146:4211–4216
31. Guzman C, Cabrera R, Cardenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E 2006 Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* 572:97–108

**Nimbe Torres, Claudia J. Bautista, Armando R. Tovar, Guillermo Ordáz, Maricela Rodríguez-Cruz, Victor Ortiz, Omar Granados, Peter W. Nathanielsz, Fernando Larrea and Elena Zambrano**

*Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:270-277, 2010. First published Nov 17, 2009;  
doi:10.1152/ajpendo.00437.2009

**You might find this additional information useful...**

---

This article cites 41 articles, 17 of which you can access free at:

<http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/full/298/2/E270#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/full/298/2/E270>

Additional material and information about *AJP - Endocrinology and Metabolism* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpendo>

---

This information is current as of June 14, 2010 .

*AJP - Endocrinology and Metabolism* publishes results of original studies about endocrine and metabolic systems on any level of organization. It is published 12 times a year (monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2005 by the American Physiological Society. ISSN: 0193-1849, EISSN: 1522-1555. Visit our website at <http://www.the-aps.org/>.

## Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat

Nimbe Torres,<sup>1</sup> Claudia J. Bautista,<sup>2,5</sup> Armando R. Tovar,<sup>1</sup> Guillermo Ordáz,<sup>1</sup> Maricela Rodríguez-Cruz,<sup>3</sup> Victor Ortiz,<sup>1</sup> Omar Granados,<sup>1</sup> Peter W. Nathanielsz,<sup>4</sup> Fernando Larrea,<sup>2</sup> and Elena Zambrano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología de la Nutrición and <sup>2</sup>Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran; <sup>3</sup>Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico, <sup>4</sup>Department of Obstetrics, University of Texas Health Science Center San Antonio, San Antonio, Texas, and <sup>5</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Submitted 13 July 2009; accepted in final form 11 November 2009

**Torres N, Bautista CJ, Tovar AR, Ordáz G, Rodríguez-Cruz M, Ortiz V, Granados O, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E.** Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E270–E277, 2010. First published November 17, 2009; doi:10.1152/ajpendo.00437.2009.—Suboptimal developmental environments program offspring to lifelong metabolic problems. The aim of this study was to determine the impact of protein restriction in pregnancy on maternal liver lipid metabolism at 19 days of gestation (dG) and its effect on fetal brain development. Control (C) and restricted (R) mothers were fed with isocaloric diets containing 20 and 10% of casein. At 19 dG, maternal blood and livers and fetal livers and brains were collected. Serum insulin and leptin levels were determined in mothers. Maternal and fetal liver lipid and fetal brain lipid quantification were performed. Maternal liver and fetal brain fatty acids were quantified by gas chromatography. In mothers, liver desaturase and elongase mRNAs were measured by RT-PCR. Maternal body and liver weights were similar in both groups. However, fat body composition, including liver lipids, was lower in R mothers. A higher fasting insulin at 19 dG in the R group was observed ( $C = 0.2 \pm 0.04$  vs.  $R = 0.9 \pm 0.16$  ng/ml,  $P < 0.01$ ) and was inversely related to early growth retardation. Serum leptin in R mothers was significantly higher than that observed in C rats ( $C = 5 \pm 0.1$  vs.  $R = 7 \pm 0.7$  ng/ml,  $P < 0.05$ ). In addition, protein restriction significantly reduced gene expression in maternal liver of desaturases and elongases and the concentration of arachidonic (AA) and docosahexanoic (DHA) acids. In fetus from R mothers, a low body weight ( $C = 3 \pm 0.3$  vs.  $R = 2 \pm 0.1$  g,  $P < 0.05$ ), as well as liver and brain lipids, including the content of DHA in the brain, was reduced. This study showed that protein restriction during pregnancy may negatively impact normal fetal brain development by changes in maternal lipid metabolism.

programming; development; docosahexanoic acid; arachidonic acid

HUMAN EPIDEMIOLOGICAL (28, 31) and experimental animal studies (16, 23, 25) have shown that a suboptimal environment either in the womb or early in the neonatal life alters growth and predisposes individuals to lifelong health problems. Maternal dietary deficiencies in pregnancy result in multiple adverse outcomes in the offspring (3, 12). Fetal growth depends mostly on the amount and type of nutrients obtained from the mother. Therefore, the mother must adapt her metab-

olism to support this continuous draining of substrates. The effects of an altered intrauterine environment can be passed transgenerationally by epigenetic mechanisms involving changes in gene expression (41). During late gestation, maternal liver plays a central role in whole body lipid metabolism. Maternal triglycerides (TG) are not transported intact across the placenta, whereas free fatty acids (FAs), including long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs), can be transported (32). Therefore, a deficient maternal FA intake, particularly essential FAs (EFAs), may have important consequences on fetal maturation and postnatal development.

Arachidonic acid (AA) and docosahexanoic acid (DHA) constitute the major LC-PUFAs in brain tissue and are important structural components of the central nervous system. Low content of AA and DHA is associated with abnormal prenatal and postnatal development of retina and brain (24). These FAs transferred across the placenta are accumulated in brain during fetal development (34). AA and DHA are formed from the dietary linoleic acid (LA) and  $\alpha$ -linolenic acid (LNA), respectively, by a series of alternating desaturation and elongation reactions to form LC-PUFAs (37). Maternal liver is probably the main source for fetal brain LC-PUFAs, since no measurable activity of fetal liver and placenta desaturases has been found (30). In the rat, downregulation of  $\Delta 6$  desaturase ( $\Delta 6D$ ) in the liver of maternal protein deficiency during pregnancy has been reported (9), and a reduction in maternal dietary protein intake in pregnancy resulted in a lower concentration of DHA in maternal liver and plasma and impaired accumulation of DHA into fetal brain phospholipids (5). In the sheep, maternal nutrient restriction (50% of regular food intake) from early to midgestation modifies the profiles of LC-PUFAs in fetal tissues (43). However, to our knowledge, little attention has been paid to studying the effects of nutrient restriction on maternal liver lipid metabolism during pregnancy. We hypothesized that maternal dietary protein restriction in the absence of any change, either qualitative or quantitative, in the fat content of the diet would lead to lowered DHA and AA concentrations in the maternal liver, the key site of LC-PUFA synthesis. Since the fetus has a low ability to synthesize these essential fats, we further hypothesized that fetal brain concentrations would also be reduced. Although brain development spans the fetal and neonatal period in both altricial species such as rodents and precocial species such as man, early development is a period marked by myelination in critical areas of the brain such as the cortex.

Address for reprint requests and other correspondence: E. Zambrano: Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, Vasco de Quiroga 15, Sección XVI, Tlalpan, 14000, Mexico City, Mexico (e-mail: zamgon@servidor.unam.mx).

## METHODS

## Care and Maintenance of Animals

All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion, Salvador Zubiran (INNSZ). Details of maternal diet, breeding, and management of the experimental groups of offspring have been published in detail (42). Briefly, mothers were virgin female albino Wistar rats aged 11 ± 1 wk and weighing 240 ± 20 g, obtained from the INNSZ. Female rats with regular cycles were maintained on Purina 5001 rodent diet and under controlled lighting (lights on from 0700 to 1900 at 22–23°C). Eighteen female rats were mated overnight with proven male breeders, and the day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the day of conception (*day 0*). Only rats that were pregnant within 5 days of introduction of the male were retained in the study. Pregnant rats were transferred to individual cages and allocated at random to one of two groups to be fed either a 20% casein [control diet (C); n = 7] or 10% casein isocaloric diet [restricted diet (R); n = 6] (42). Rats were weighed daily and during the study had free access to the experimental diet and water. Food was provided in the form of large, flat biscuits that were retained behind a grill through which the rats nibbled the food. The amount of food provided each day was weighed, as was the amount remaining after 24 h. Food intake was also measured in six female age-matched nonpregnant rats. At 19 days of gestation (dG) (19 was chosen as a day representative of late gestation but before enough of the occurrence of events leading to parturition), at 6 AM, food was removed from pregnant rats. On this day, between 10 and 11 AM (4-h fasting), pregnant rats were rapidly euthanized by decapitation by experienced personnel trained in the procedure using a rodent guillotine (Thomas Scientific). To ensure homogeneity of study subjects, litters of more than 12 or less than eight pups were excluded from the study. Trunk blood was collected into polyethylene tubes and allowed to clot at 4°C for 1 h and centrifuged at 1,500 g for 15 min at 4°C; after that, serum was stored at -20°C until assayed. Maternal livers were dissected, cleaned, weighed, and frozen at -75°C. Abdominal midline incision was performed, the uterine horns were exposed, and embryos were delivered alive, counted, and weighed. Each placenta was cleaned and weighed, and the diameter was measured with calipers. Fetal brain and liver were isolated, weighed, and pooled per litter and immediately frozen in liquid nitrogen for further determinations. The need to pool tissues from all fetuses in the litter precluded the ability to analyze outcomes according to offspring sex.

## Biochemical Analyses

**Carcass components.** After being weighed (wet weight), each carcass was chopped into small pieces, placed in a tared beaker, and dried at 60°C to constant weight. The weight lost is considered to be body water. The dried carcasses were ground up, and aliquots were taken for lipid determination by the Soxhlet method (1).

**Leptin radioimmunoassay.** Maternal serum leptin concentration was determined by radioimmunoassay (RIA) using a commercial rat kit from Linco Research (St. Charles, MO), cat. no. RL-83K, with

**Table 1. Maternal characteristics at 19 dG in rats fed control (20% protein) or restricted (10% protein) diet during pregnancy**

	Control (n = 7)	Restricted (n = 6)
Body weight, g	314 ± 13	305 ± 12
Body fat, g	9.2 ± 0.44	6.8 ± 0.3 <sup>†</sup>
Liver weight, g	12.1 ± 0.7	11.4 ± 0.5
Liver lipids, mg/100 mg	6.3 ± 0.04	4.7 ± 0.01*

Results are means ± SE. dG, days of gestation. \*P < 0.05; †P < 0.001 vs. control.

**Table 2. Maternal biochemical parameters at 19 dG in rats fed control (20% protein) or restricted (10% protein) diet during pregnancy**

	Control (n = 7)	Restricted (n = 6)
Glucose, mg/dl	64.5 ± 3.5	54.5 ± 11.7
Insulin, ng/ml	0.19 ± 0.04	0.88 ± 0.16 <sup>†</sup>
Leptin, ng/ml	5.05 ± 0.13	6.9 ± 0.7*
Triglycerides, mg/dl	237 ± 32	239 ± 13
Cholesterol, mg/dl	44 ± 3.9	42 ± 1.6
HDL, mg/dl	23 ± 0.8	24 ± 2.3
LDL, mg/dl	16.4 ± 2.9	13.2 ± 1.5
VLDL, mg/dl	4.6 ± 0.1	4.8 ± 0.5

Results are means ± SE. \*P < 0.05; †P < 0.01 vs. control.

detection limit 0.5 ng/ml, using 100- $\mu$ l samples. Each serum sample was assayed in duplicate. The intra- and interassay coefficients of variations were <4 and <5%, respectively.

**Insulin RIA.** Serum insulin concentration was determined by RIA using commercial rat kits from Linco Research, cat. no. RI-13K. Each serum sample was determined in duplicate. The intra- and interassay coefficients of variations were <4 and <6%, respectively.

**Blood glucose measurement.** Serum glucose concentration was determined spectrophotometrically using the enzymatic hexokinase method (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Intra- and interassay coefficients of variations were <2 and <3%, respectively.

**Lipid measurements.** Serum TG, HDL, LDL, VLDL, and cholesterol were determined enzymatically with the Synchron CX auto analyzer (Beckman Coulter).

## FA Analysis

Total lipids were extracted from maternal liver by Soxhlet method (1) and fetus brain and liver according to the method used by Folch et al. (13), with some modifications. This sample was homogenized with 500  $\mu$ l of 0.9% NaCl and 1 ml of chloroform-methanol (2:1). After that, extraction of FAs was carried out with the addition of chloroform (3 × 2 ml). The organic phase was pooled, and 120–150  $\mu$ l of methanol was added until organic phase turned transparent, and then 1 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added and vortexed. The organic phase was transferred in a new tube and evaporated under a stream of nitrogen.

## Preparation of FA Methyl Esters

Two milliliters of methanol, 100  $\mu$ l of toluene, and 40  $\mu$ l of 2% methanolic sulfuric acid were added to the above residue and heated at 90°C for 2 h. After that the tubes were placed on ice, and 1 ml of 5% NaCl was added. FA methyl esters (FAME) were extracted with

**Table 3. %Fatty acids in the maternal liver at 19 dG in rats fed control (20% protein) or restricted (10% protein) diet during pregnancy.**

%Fatty Acid	Control	Restricted
C12:0 Lauric	0.2 ± 0.06	ND
C14:0 Myristic	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.7
C16:0 Palmitic	33.3 ± 3.0	33.9 ± 1.1
C16:1 Palmitoleic	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.3
C18:0 Stearic	21.4 ± 1.1	26.1 ± 1.0*
C18:1 Oleic	26.0 ± 1.4	21.8 ± 1.3*
C18:2 Linoleic	8.1 ± 0.7	9.1 ± 0.4
C18:3 Linolenic	0.158 ± 0.02	0.188 ± 0.02
C20:3 Arachidic	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.01*
C20:4 Arachidonic	5.3 ± 1.6	3.9 ± 0.6*
C20:5 Eicosapentaenoic	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.01
C22:6 Docosahexaenoic	1.2 ± 0.06	0.8 ± 0.07*

Results are means ± SE; n = 5. ND, not detectable. \*P < 0.05 vs. control.

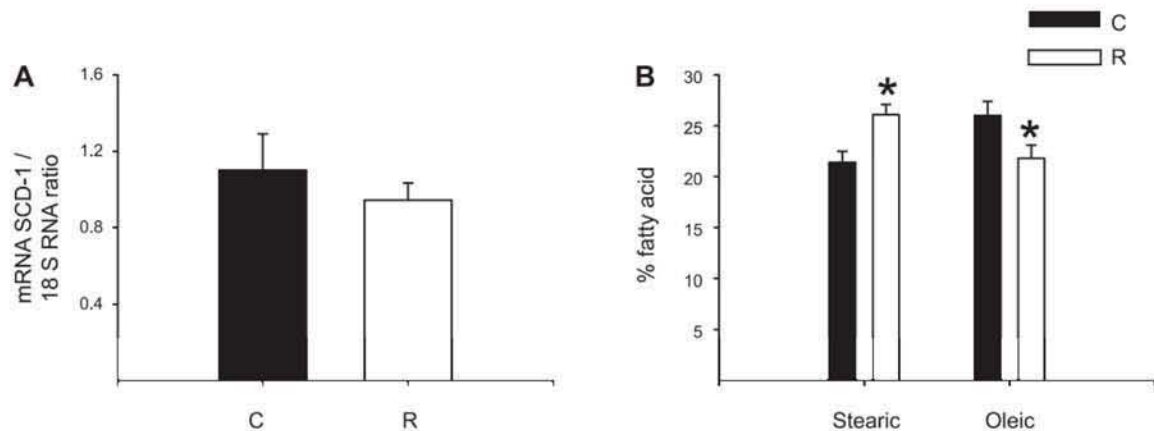


Fig. 1. Maternal liver stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) relative abundance gene expression by real-time PCR assay (A) and %fatty acid (stearic and oleic) by gas chromatography (B) at 19 days of gestation (dG) of rats fed control (C; 20% protein) or restricted (R; 10% protein) diet during pregnancy. Means  $\pm$  SE;  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs. C.

hexane ( $3 \times 2$  ml), and mixture was centrifuged at 1,500 g for 1 min. The organic phase was pooled and evaporated under stream of nitrogen. Two hundred microliters of hexane was added to the dark-colored residue and then centrifuged at 1,500 g for 5 min. The clear solution was injected in the chromatograph. The FA analysis was carried out in an Agilent model 6850 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector, and automatic split injection was carried out using an Agilent 6850 autosampler. The chromatographic column was an HP-INNOWax capillary column (30 m, 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m) (J & W Scientific). One hundred twenty-five micrograms of heptadecanoic acid as internal standard was added to 100 mg of tissue. A sample of 1  $\mu$ l was injected in split mode (50:1) at 250°C. The carrier gas was helium with a constant linear velocity of 24 cm/s, and the interface temperature was kept at 280°C. The oven temperature was raised from 50 to 230°C (33). Identification of the FAME was based upon retention times obtained for methyl ester standards from Poly Science, and each one was expressed as percentage of total FA in the sample.

#### Isolation of Total RNA and Northern Blot Analysis

Total RNA was isolated from maternal liver of rats at 19 dG using the method of Chomczynski and Sacchi (8). Fifteen micrograms of RNA was electrophoresed in a 1% agarose gel containing 37% formaldehyde, transferred to a nylon membrane filter (Hybond- $N^+$ ), and cross-linked with an ultraviolet cross-linker (Amersham). RNA integrity and location of the 28S and 18S ribosomal RNA bands were determined under ultraviolet light.  $\Delta 5D$  and  $\Delta 6D$  mRNA expression

in the pregnant rat liver were analyzed by Northern blot. The  $\Delta 5D$  cDNA probe was a 688-bp PCR product amplified from rat liver cDNA. The forward and reverse primers used for the PCR reaction were 5'-TCTTGGCCACGATGCCACGAC-3' and 5'-CTTTGC-CCCGCTGCTTCTGA-3', respectively. The  $\Delta 6D$  cDNA probe was a 925-bp PCR product. The forward and reverse primers were 5'-TGCCTCCGTGCCTTCCAC-3' and 5'-GTGCCGCTGAACCA-GTCATT-3', respectively. The PCR products were purified with the high pure PCR product purification kit (Roche) and labeled with Redivue [ $^{32}$ P]deoxycytidine triphosphate (110 TBq/mmol) by using the Rediprime DNA labeling kit (Amersham). Membranes were prehybridized with rapid-hyb buffer at 65°C for 1 h and then hybridized with the cDNA probe (53.3 MBq/l) for 2.5 h at 65°C. Membranes were washed once with  $2\times$  citrate saline solution (SSC;  $1\times$  SSC = 0.15 mol/l sodium chloride and 15 mol/l sodium citrate) and 0.1% SDS (wt/vol) at room temperature for 20 min and then twice for 15 min with  $0.1\times$  SSC/0.1% SDS (wt/vol) at 65°C. Digitized images and quantification of radioactivity (dpm) of the bands were carried out using the Instant Imager (Packard Instrument, Meriden, CT). Membranes were also exposed to Ektascan film (Kodak) at  $-70^\circ\text{C}$  with an intensifying screen.

#### Analysis of mRNA Expression by Real-time Quantitative RT-PCR

For mRNA expression of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1),  $\Delta 5D$  and  $\Delta 6D$  by real-time RT-PCR, 300 ng of total RNA was subjected to reverse transcription and then amplified by PCR using Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems). Parallel nontemplate

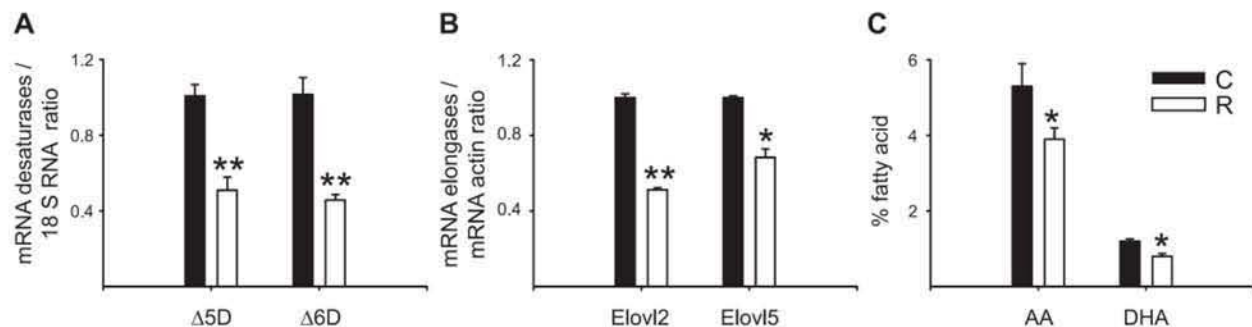


Fig. 2. Maternal liver desaturases (A), elongase relative abundance gene expression by real-time RT-PCR (B), and %fatty acid [arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA)] by gas chromatography (C) at 19 dG of rats fed C (20% protein) or R (10% protein) diet during pregnancy. Means  $\pm$  SE;  $n = 5$ . \*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$  vs. C.  $\Delta 5D$  and  $\Delta 6D$ ,  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturase; Elovl2 and -5, elongase-2 and -5.

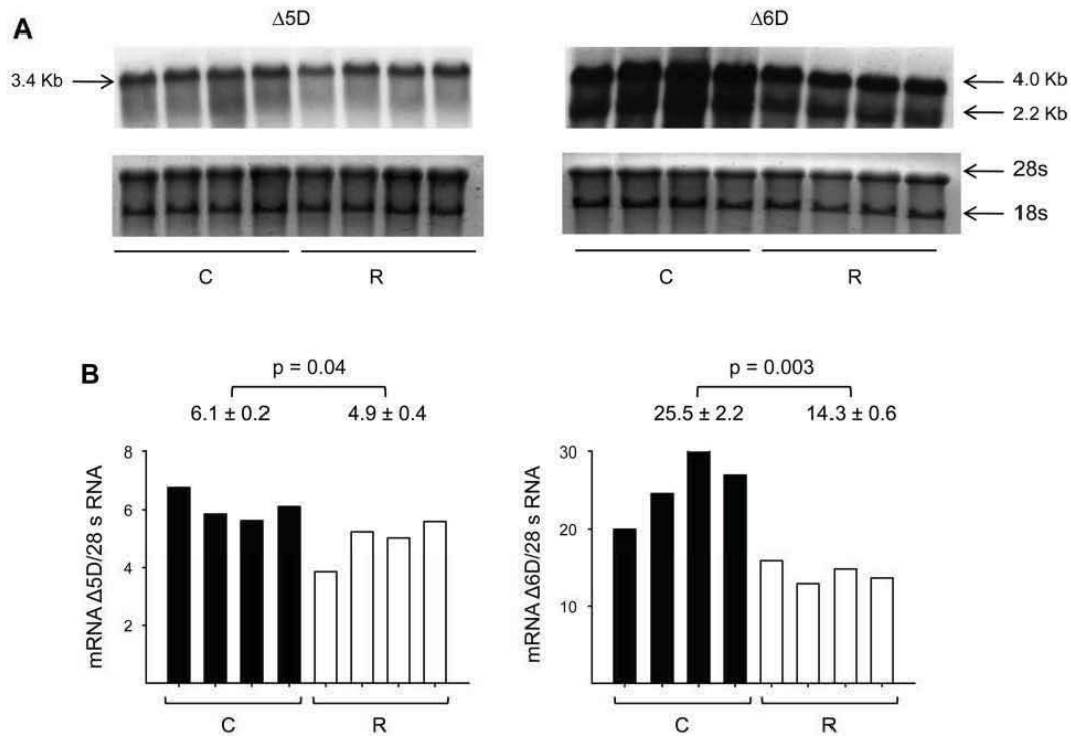


Fig. 3. Northern blot analysis of  $\Delta 5D$  and  $\Delta 6D$  (A) and relative abundance or mRNA/ribosomal 28S of maternal liver (B) at 19 dG of rats fed C (20% protein) or R (10% protein) diet during pregnancy. Means  $\pm$  SE;  $n = 4$ .

control reactions were run in the absence of RNA to assess the degree on any nucleic acid contamination in the reaction mixture. TaqMan fluorogenic probes and oligonucleotide primers were obtained from Applied Biosystems. TaqMan PCR assays for each target gene were carried out by triplicate in 96-well optical plates with the ABI prism 7000 sequence detection system (PerkinElmer Applied Biosystems). PCR was performed using 1.4  $\mu$ l of cDNA, 0.6  $\mu$ l of TaqMan assay mix containing 200 nM sense and antisense primers and 100 nM TaqMan fluorogenic probe, 6  $\mu$ l of TaqMan Universal PCR Master Mix, and 4  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O. The protocol used for PCR amplifications was as follows: one cycle at 50°C for 2 min, one cycle at 95°C for 10 min, and 40 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 1 min. The relative amount of each mRNA was calculated by using the comparative threshold cycle method (user bulletin no. 2; PerkinElmer Applied Biosystems). The probes and primers for rat genes were obtained from PerkinElmer Applied Biosystems (predeveloped TaqMan assay reagent control kits). The probes and primers for rat genes were obtained from PE Applied Biosystems (predeveloped TaqMan Assay Reagent Control kits). The assay numbers for each gene were Rn00594894-g1 (SCD-1), Rn00584915\_m1 ( $\Delta 5D$ ), and Rn00580220\_m1 ( $\Delta 6D$ ). Amplification was then performed by 45 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 60 s. The cDNA quantity in each sample was normalized with the 18S. Real-time PCR was carried out in triplicate for each sample.

For elongase-2 and -5 (Elovl-2 and -5) by RT-PCR, relative mRNA levels of target genes and invariant transcript  $\beta$ -actin were determined using cDNA preparation for tissues and HC11 cells. Synthesized cDNA was mixed with LightCycler Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche, Indianapolis, IN) and with various sets of gene-specific forward and reverse primers as follows and subjected to real-time PCR quantification using the LightCycler 3.5 detection

System (Roche); for Elovl-2, forward GGA AGA AAT ACC TCA CGC AG and reverse TGG CTT TTT TCG GTA TGT C; for Elovl-5, forward CTC AAC CTG CTG TCT CTC TA and reverse ATC TGG TGG TTG TTC TTA CG; for  $\beta$ -actin, forward TGG AAT CCT GTG

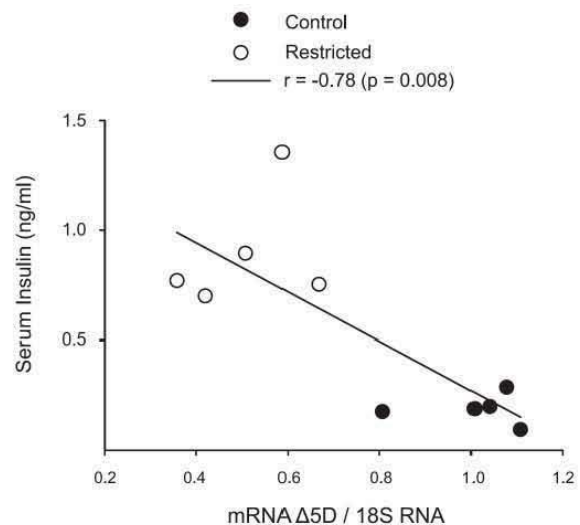


Fig. 4. Maternal liver  $\Delta 5D$  gene expression as a function of serum insulin at 19 dG of rats fed C (20% protein) or R (10% protein) diet during pregnancy. Pearson correlation,  $P = 0.008$  and  $r = -0.78$ .

Table 4. Fetal and placenta characteristics at 19 dG in rats fed control (20% protein) or restricted (10% protein) diet during pregnancy

	Control (n = 7)	Restricted (n = 6)
No. of fetuses/dam	10.3 ± 0.9	9.2 ± 0.6
Placenta weight, g	0.42 ± 0.02	0.40 ± 0.02
Placenta diameter, mm	0.99 ± 0.05	0.96 ± 0.06
Fetal weight, g	3.1 ± 0.3	2.0 ± 0.1*
Liver weight, mg	175 ± 19	140 ± 3 <sup>‡</sup>
Liver lipids, mg/100 mg	35.8 ± 1.8	18.7 ± 2.7 <sup>‡</sup>

Results are means ± SE. Fetuses or placentas were averaged per litter. \* $P < 0.05$ ; <sup>‡</sup> $P < 0.001$  vs. control.

GCA TCC ATG and reverse TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG. PCR amplification was performed in a total volume of 20  $\mu$ l containing 2  $\mu$ l of the cDNA sample, 40 pmol of each primer, and 4  $\mu$ l of Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green. For each reaction, the polymerase was activated by preincubation at 95°C for 10 min. Amplification was then performed by 35 cycles at 95°C for 10 s and at 60°C or 62°C for 7 s. All reactions were performed in triplicate. Relative amounts of mRNA were calculated using the comparative threshold cycle method (cycle method, LightCycler software version 4.0; Roche). All results were normalized to the housekeeping gene abundance of  $\beta$ -actin mRNA.

#### Statistical Analysis

All data are presented as means ± SE. Fetal body weight and liver and brain weight, as well as placenta diameter and weight, are the average of the whole litter. Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t*-test to compare C and R mothers. Real time RT-PCR results (mRNA gene/18S or  $\beta$ -actin normalized ratio) are expressed relative to C group. Correlations for maternal serum insulin and  $\Delta$ 5D liver gene expression and maternal serum insulin and fetal weight were calculated using a Pearson correlation.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Maternal Parameters at 19 dG

At the beginning of pregnancy, both groups of pregnant rats, C and R, increased their food intake (C = 38.7 ± 3.0, R = 42.9 ± 2.0 g/day) compared with age-matched nonpregnant rats (22.8 ± 1.03 g/day). Food intake was rising during pregnancy, and there were no differences between C and R groups except at 19 dG, in which both groups decreased their food intake, and this drop was more evident in the R group (C = 18.9 ± 0.7, R = 16.4 ± 0.8 g/day,  $P < 0.05$ ). Table 1 shows that, at 19 dG, rats fed a low-protein diet have similar

body weights compared with C pregnant rats. However, the R group showed a significant decrease in fat body composition. In both groups, the liver weights were similar; however, a significant decrease in maternal liver lipids was observed in the R group.

### Biochemical Maternal Serum Parameters at 19 dG in Rats Fed Protein-Restricted Diet

There were no differences in glucose, TG, HDL, LDL, VLDL, and cholesterol serum levels between C and R (Table 2). However, serum leptin levels were significantly higher in the R than in the C group. Serum insulin concentrations were 3.6 times higher in the R group compared with C mothers (Table 2).

### Percentage of FAs in Maternal Liver at 19 dG

In the R group, the percentage of stearic acid in maternal liver was higher compared with C. In contrast, oleic acid, arachidic acid, AA, and DHA percentages were lower in the R group (Table 3).

### Maternal Liver Desaturase and Elongase Gene Expression at 19 dG

No differences in SCD-1 mRNA relative abundance between C and R groups were observed (Fig. 1), but there was a significant decrease in  $\Delta$ 5D,  $\Delta$ 6D, and Elovl-2 and -5 mRNAs in the R group (Fig. 2). By Northern blots (Fig. 3), maternal liver  $\Delta$ 6D mRNA was in both groups significantly more abundant than  $\Delta$ 5D mRNA, and as expected, there was a significant negative correlation ( $r = -0.78$ ,  $P < 0.001$ ) between maternal insulin serum concentrations and liver  $\Delta$ 5D mRNA (Fig. 4).

### Fetal Characteristics

Fetal weight and placenta weight and diameter at 19 dG are summarized in Table 4. Mean fetal weight was significantly lower in the R group than in the C group, with no differences in number of fetuses per dam and in placenta weight and diameter. There were also no changes in brain weight; however, color and texture were different, brains from the R group were darker (many dark spots) compared with C brains (Fig. 5D), and the texture for C brains was tougher than R. In contrast, liver weight, fetal liver, and brain lipids were lower in the R group (Fig. 5). The percentage of DHA from total FA in fetal brain was significantly lower in the R group (Fig. 5). In

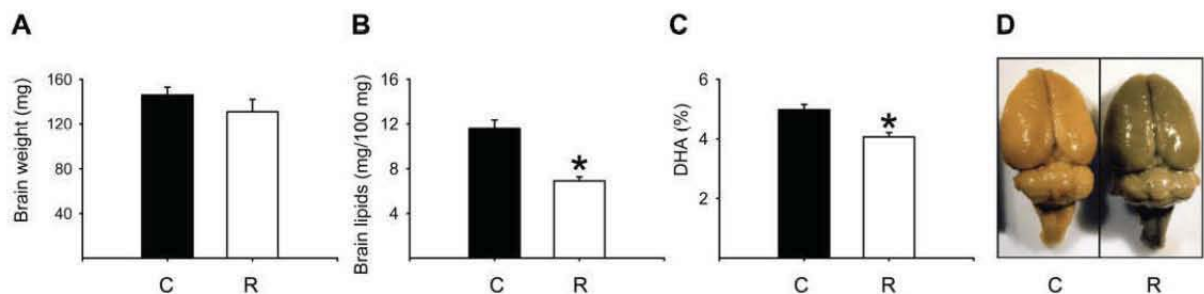


Fig. 5. Fetal brain weight (A), lipids (B; mg/100 mg), %DHA (C), and photograph at 19 dG (D) of rats fed C (20% protein) or R (10% protein) diet during pregnancy. Means ± SE (n = 6–7 litters/group). \* $P < 0.05$  vs. C.



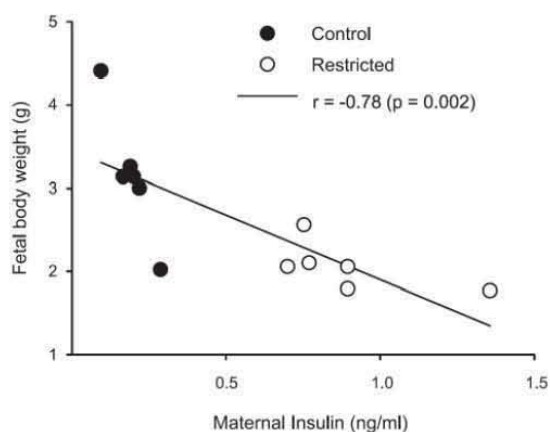


Fig. 6. Fetal body weight as a function of maternal serum insulin at 19 dG. Pearson correlation,  $P = 0.002$  and  $r = -0.78$  ( $n = 6$  mothers or litters).

addition, there was a negative correlation between fetal body weight and maternal serum insulin concentration at 19 dG ( $r = -0.78$ ,  $P < 0.01$ ; Fig. 6).

**DISCUSSION**

Many investigators have examined the effect of maternal malnutrition during pregnancy and lactation on the offspring; however, few studies have taken into consideration the impact of protein restriction on maternal lipid metabolism and its implication in fetal brain formation during gestation. Early malnutrition affects susceptibility to chronic diseases in adulthood (2), and maternal low-protein diet can program enzyme activity in offspring (26). However, previous studies indicated

that offspring from rats fed a low-protein diet during pregnancy had higher susceptibility to develop chronic diseases (40, 41), and their mothers underwent metabolic adaptations to maintain an adequate fetal development. During the first half of normal pregnancy, progressive accumulation of maternal fat depots occurs due to increased adipose tissue lipogenesis and glycerolneogenesis (27). In this study, although there were not differences in maternal body and liver weights, there was a significant decrease in maternal body and liver lipid content as well as on fetal body weight; similar results have been reported with severe protein restriction (6%) (21).

Numerous animal studies have investigated the effect of maternal low-protein diet on glucose metabolism in the offspring (12, 40); however, little is known on the maternal responses derived from this condition. Herein, no differences in maternal serum glucose and TG concentrations were seen in C and R rats, which may be the result of an increased insulin-mediated glucose uptake by peripheral tissues and by the ability of insulin to suppress hepatic glucose output.

Hyperinsulinemia is a common finding in pregnancy (12). Insulin resistance is responsible for both decline in adipose tissue lipoprotein lipase and enhanced adipose tissue lipolytic activities. This condition results in high TG synthesis by increasing FA and glycerol uptake by the liver. In this study, although protein restriction during gestation did not affect maternal serum glucose levels, high insulin serum concentrations were observed, suggesting metabolic adaptations in glucose metabolism at the end of pregnancy. In addition, high insulin concentrations at 19 dG in R rats were negatively correlated to fetal weight. These results were in agreement with those reported previously in pregnant women (38).

Leptin is a hormone that regulates food intake and energy expenditure. Serum leptin concentrations usually increase from

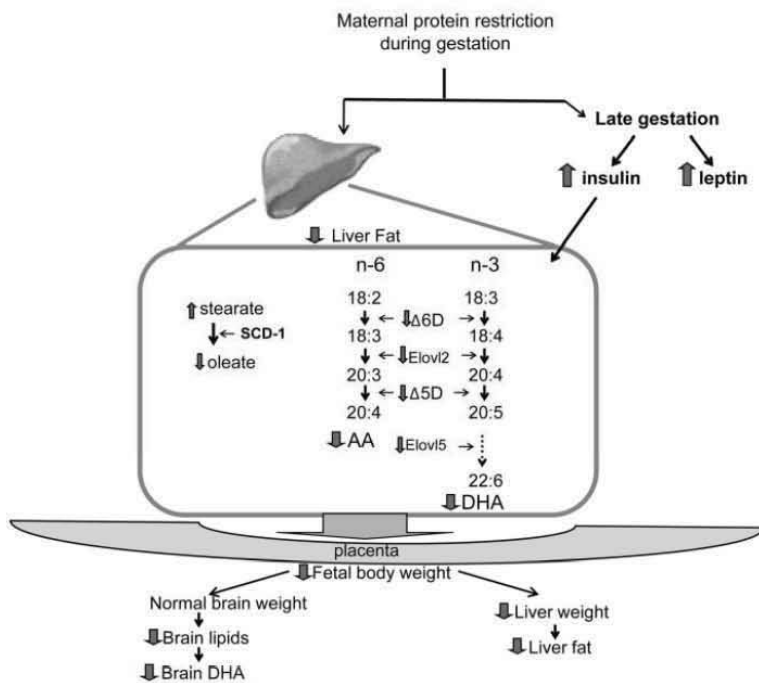


Fig. 7. Adaptive mechanisms proposed in the pregnant rat subjected to isocaloric protein restriction diet during pregnancy.

the middle to the end of pregnancy (10, 11). During this period, the high levels of leptin do not mediate a great inhibitory effect on food intake (36). In this study, leptin serum concentrations were on the range of pregnant rats (3–7 ng/ml). However, fasting serum leptin concentrations in R rats were higher than those observed in C pregnant rats; despite the lower body fat in this group, leptin in the R mothers may alter the energy balance in contribution to fetal development.

Protein restriction significantly affected the production of maternal liver LC-PUFAs. There are several potential ways in which low protein (and hence, amino acid) intake in the maternal diet may affect maternal liver PUFA synthesis. The most likely is an effect on availability of amino acids for enzyme synthesis. Enzyme activity could also be impacted by altered histone acetylation and methylation resulting from changes such as decreased one-carbon cycle components. Indeed, maternal liver contained an increased stearic to oleic acid ratio. Although a nonsignificant difference in hepatic SCD-1 mRNA relative abundance, an enzyme that catalyzes oleic acid formation from stearic acid, which is the rate-limiting step for cellular synthesis of monosaturated FA from saturated FA, was observed in R rats compared with controls, alterations in the expression of SCD-1 cannot be ruled out and deserve further investigation.

In this study, maternal protein restriction resulted in a negative effect, particularly on the capacity of maternal liver to desaturate LA and LNA. A significant decrease in maternal hepatic AA and DHA was observed in the R group, which correlated with low expression levels of  $\Delta 5D$ ,  $\Delta 6D$ , *Elovl-2*, and *Elovl-5*. In line with this observation, Mercuri et al. (22) showed that maternal severe protein restriction (5% protein) during gestation decreased  $\Delta 6D$  activity in the maternal liver, and they suggested that this could affect the normal supply of LC-PUFAs for the normal fetus growth and tissue development. In fact, in the present study, mild protein restriction during pregnancy reduced significantly the concentration of DHA in maternal liver and fetal brain. Before birth, most if not all fetal FAs originate from the maternal circulation (17). After birth, milk, maternal liver (29), and diet later in life (17) represent the main sources of FAs. Whether these maternal liver changes in lipid metabolism could be expressed transgenerationally cannot be ascertained from the results presented in this study. Ozanne et al. (26) demonstrated in 3-mo-old offspring from R pregnant mothers a decrease in hepatic  $\Delta 5D$  activity and DHA concentrations, suggesting the establishment of a particular gene expression pattern, such as that involving metabolic lipid enzymes, as seen in this study.

The last period of intrauterine life in the rat (17–21 dG) is demarcated by an increase in body and brain weight together with an active neurogenesis stage. During this period, a rapid accumulation of DHA, unparalleled to other FAs, takes place (35). The supply of EFA and LC-PUFAs is critical for normal development of the fetus (6, 15, 20, 24). Indeed, nutritional status of the mother during gestation has been positively associated with fetal growth. In general, reduced maternal nutritional status, particularly regarding EFAs, has been correlated with reduced neonatal growth and head circumference in humans (7). In fact, at birth, AA status in preterm infants has been correlated with body weight (18, 19), and it has been proposed that it is related to intrauterine growth rather than to postnatal growth (39).

The brain is one of the richest organs in lipids (4). Our results showed that a protein-restricted diet during gestation significantly reduced fetal body weight and liver weight, with no significant changes in fetal brain weight. However, the content of fetal brain lipids, particularly DHA, was significantly lower compared with C rats. This last finding correlates with data reported previously by Burdge et al. (5) in which DHA concentration in fetal brain at 20 dG from 50% of protein restriction was lower compared with controls. As described in METHODS, the need to pool tissue from all fetuses in a litter removes the possibility of an analysis by fetal sex. We are currently studying the effect of the observed changes in brain composition on offspring behavioral phenotype.

In conclusion, there is evidence that small changes in maternal dietary fat intake modify the composition of brain membranes during fetal growth; however, few studies deal with the negative impact of maternal protein restriction during gestation on fetal brain development. The present study showed that moderated protein restriction during pregnancy significantly reduced the concentration of maternal liver AA and DHA and maternal liver desaturase and elongase gene expression. These results may negatively impact fetal development, including the brain (Fig. 7).

#### GRANTS

C. J. Bautista is a graduate student from Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México. This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (48839), Mexico, and the National Institute of Child Health and Human Development (HD-21350).

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest are declared by the author(s).

#### REFERENCES

1. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.), edited by Harwitz W. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2002, p. 920.05–920.39.
2. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol* 561: 355–377, 2004.
3. Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. 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* 63: 358–363, 2008.
4. Bourre JM. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J Nutr Health Aging* 8: 163–174, 2004.
5. Burdge GC, Dunn RL, Wootton SA, Jackson AA. Effect of reduced dietary protein intake on hepatic and plasma essential fatty acid concentrations in the adult female rat: effect of pregnancy and consequences for accumulation of arachidonic and docosahexaenoic acids in fetal liver and brain. *Br J Nutr* 88: 379–387, 2002.
6. Clandinin MT, Chappell JE, Leong S, Heim T, Swyer PR, Chance GW. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev* 4: 121–129, 1980.
7. Clandinin MT, Jumpson J, Suh M. Relationship between fatty acid accretion, membrane composition, and biologic functions. *J Pediatr* 125: S25–S32, 1994.
8. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159, 1987.
9. De Tomas ME, Mercuri O, Serres C. Effect of cross-fostering rats at birth on the normal supply of essential fatty acids during protein deficiency. *J Nutr* 113: 314–319, 1983.
10. Du F, Higginbotham DA, White BD. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr* 130: 514–521, 2000.

11. Ehrhardt RA, Slepatis RM, Bell AW, Boisclair YR. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 21: 85–96, 2001.
12. Fernandez-Twinn DS, Wayman A, Ekizoglou S, Martin MS, Hales CN, Ozanne SE. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R368–R373, 2005.
13. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509, 1957.
15. Foreman-van Drongelen MM, van Houwelingen AC, Kester AD, Hasaart TH, Blanco CE, Hornstra G. Long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants: status at birth and its influence on postnatal levels. *J Pediatr* 126: 611–618, 1995.
16. Guzman C, Cabrera R, Cardenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* 572: 97–108, 2006.
17. Innis SM. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr* 143: S1–S8, 2003.
18. Koltzko B, Braun M. Arachidonic acid and early human growth: is there a relation? *Ann Nutr Metab* 35: 128–131, 1991.
19. Leaf AA, Leighfield MJ, Costeloe KL, Crawford MA. Factors affecting long-chain polyunsaturated fatty acid composition of plasma choline phosphoglycerides in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 14: 300–308, 1992.
20. Leaf AA, Leighfield MJ, Costeloe KL, Crawford MA. Long chain polyunsaturated fatty acids and fetal growth. *Early Hum Dev* 30: 183–191, 1992.
21. Macêdo GS Ferreira CL, Menegaz A, Arantes VC, Veloso RV, Carneiro EM, Boschero AC, Oller do Nascimento CM, Latorraca MQ, Gomes-da-Silva MH. Correlation of serum leptin and insulin levels of pregnant protein-restricted rats with predictive obesity variables. *Braz J Med Biol Res* 41: 519–525, 2008.
22. Mercuri O, Elena de Tomas M, Itarte H. Prenatal protein depletion and delta 9, delta 6 and delta 5 desaturases in the rat. *Lipids* 14: 822–825, 1979.
23. Nathanielsz PW. Animal models that elucidate basic principles of the developmental origins of adult diseases. *ILAR J* 47: 73–82, 2006.
24. Neuringer M, Connor WE. n-3 fatty acids in the brain and retina: evidence for their essentiality. *Nutr Rev* 44: 285–294, 1986.
25. Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 427: 411–412, 2004.
26. Ozanne SE, Martensz ND, Petry CJ, Loizou CL, Hales CN. Maternal low protein diet in rats programmes fatty acid desaturase activities in the offspring. *Diabetologia* 41: 1337–1342, 1998.
27. Palacin M, Lasuncion MA, Asuncion M, Herrera E. Circulating metabolite utilization by peruterine adipose tissue in situ in the pregnant rat. *Metabolism* 40: 534–539, 1991.
28. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 70: 811–816, 1999.
29. Rodriguez-Cruz M, Tovar AR, Palacios-González B, Del Prado M, Torres N. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of Delta5 and Delta6 desaturases, SREBP-1, PPARalpha, and PGC-1. *J Lipid Res* 47: 553–560, 2006.
30. Rodriguez A, Sarda P, Nessmann C, Boulot P, Leger CL, Descomps B. Delta6- and delta5-desaturase activities in the human fetal liver: kinetic aspects. *J Lipid Res* 39: 1825–1832, 1998.
31. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, van Montfrans GA, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Blood pressure in adults after prenatal exposure to famine. *J Hypertens* 17: 325–330, 1999.
32. Ruyle M, Connor WE, Anderson GJ, Lowensohn RI. Placental transfer of essential fatty acids in humans: venous-arterial difference for docosahexaenoic acid in fetal umbilical erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7902–7906, 1990.
33. Sandra P, David F. High-throughput capillary gas chromatography for the determination of polychlorinated biphenyls and fatty acid methyl esters in food samples. *J Chromatogr Sci* 40: 248–253, 2002.
34. Sastry PS. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24: 69–176, 1985.
35. Schiefermeier M, Yavin E. n-3 Deficient and docosahexaenoic acid-enriched diets during critical periods of the developing prenatal rat brain. *J Lipid Res* 43: 124–131, 2002.
36. Seeber RM, Smith JT, Waddell BJ. Plasma leptin-binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat. *Biol Reprod* 66: 1762–1767, 2002.
37. Sprecher H, Luthria DL, Mohammed BS, Baykousheva SP. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 36: 2471–2477, 1995.
38. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 69: 179–197, 1999.
39. Wolf HA, van Beusekom CM, Schaafsma A, Muskiet FA, Okken A. Long-chain polyunsaturated fatty acid status and early growth of low birth weight infants. *Eur J Pediatr* 157: 146–152, 1998.
40. Zambrano E, Bautista CJ, 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* 571: 221–230, 2006.
41. Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deás M, Guillén L, Rodríguez-González GL, Guzmán C, Larrea F, Nathanielsz PW. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 566: 225–236, 2005.
42. Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 563: 275–284, 2005.
43. Zhou Y, Nijland M, Miller M, Ford S, Nathanielsz PW, Brenna JT. The influence of maternal early to mid-gestation nutrient restriction on long chain polyunsaturated fatty acids in fetal sheep. *Lipids* 43: 525–531, 2008.



## ORIGINAL ARTICLE

## Protein Restriction in the Rat Negatively Impacts Long-chain Polyunsaturated Fatty Acid Composition and Mammary Gland Development at the End of Gestation

Claudia J. Bautista,<sup>a,b</sup> Guadalupe L. Rodríguez-González,<sup>a,b</sup> Nimbe Torres,<sup>c</sup> Rogelio Hernández-Pando,<sup>d</sup> Victoria Ramírez,<sup>e</sup> Maricela Rodríguez-Cruz,<sup>f</sup> Peter W. Nathanielsz,<sup>g</sup> and Elena Zambrano<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán," Mexico City, Mexico

<sup>b</sup>Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup>Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán," Mexico City, Mexico

<sup>d</sup>Departamento de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán," Mexico City, Mexico

<sup>e</sup>Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán," Mexico City, Mexico

<sup>f</sup>Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico

<sup>g</sup>Center for Pregnancy and Newborn Research, Department of Obstetrics, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas

Received for publication February 14, 2013; accepted August 14, 2013 (ARCMED–D–13–00098).

**Background and Aims.** Maternal nutrition during gestation is critical for mammary gland cell proliferation and differentiation and development of optimal delta-6 ( $\Delta 6D$ ) and delta-5 ( $\Delta 5D$ ) desaturase and elongase 2 and 5 (Elovl 2 and 5) activity for synthesis of the long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs), arachidonic (AA), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, important for normal fetal and neonatal brain development. We hypothesized that maternal low protein diet (LPD) impairs mammary gland preparation for lactation and PUFA synthesis. The aim of the study was to evaluate consequences of maternal LPD on mammary gland structure and development and expression of enzymes responsible for LC-PUFA production.

**Methods.** Pregnant rats were assigned to control or protein restricted, isocaloric diet (R). At 19 days gestation, mammary gland tissue was removed for histological analysis and lipid, AA, EPA and DHA determination by gas chromatography. Gene transcription was quantified by RT-PCR and protein by Western blot.

**Results.** In R mothers, mammary gland lobuloalveolar development was decreased and showed fat cell infiltration.  $\Delta 6D$ ,  $\Delta 5D$ , and Elovl 5 mRNA were lower in R, whereas protein levels measured by Western blot were unchanged. This is the first report that detects mammary gland desaturase and elongase protein. Although Elovl 2 mRNA was not detectable by RT-PCR, Elovl 2 protein was not different between groups. AA and DHA were lower and EPA undetectable in the mammary gland of R mothers.

**Conclusions.** Maternal LPD decreased late gestation mammary gland lobuloalveolar development and LC-PUFAs. Protein restriction negatively impacts maternal mammary gland development prior to lactation. © 2013 IMSS. Published by Elsevier Inc.

**Key Words:** Mammary gland, Low protein, Pregnancy and LC-PUFAs.

Address reprint requests to: Elena Zambrano, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Sección XVI, Tlalpan, 14000, México, D.F., Mexico; Phone: (+52) (55) 5487–0900 Ext. 2417; FAX: (+52) (55) 5655–9859; E-mail: zamgon@unam.mx

### Introduction

Appropriate maternal nutrition during gestation is critical for optimal fetal growth and organ development (1). In addition, an adequate maternal nutrient supply is necessary to support the changes that occur in maternal structure and function during pregnancy, especially development and

function of the mammary gland for lactation. Normal mammary epithelial cell proliferation is essential to the production of a mature mammary gland capable of synthesizing the enzymes responsible for the formation of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFAs) through the conversion of precursors such as linoleic acid (LA 18:2 n-6) to arachidonic (AA) and  $\alpha$ -linolenic acid (LNA 18:3 n-3) to eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) via delta-6 ( $\Delta 6D$ ) and delta-5 ( $\Delta 5D$ ) desaturases. Both enzymes introduce an unsaturated double bond into the fatty acid carbon backbone, whereas elongases 2 and 5 (Elovl 2 and 5) are responsible for elongation of the fatty acid chain (2,3). It is well established that the developing fetus and neonate lack the ability to synthesize adequate amounts of PUFAs (4,5), which therefore have to be provided to the fetus by the mother via the placenta and to the newborn via the mother's milk during lactation. LC-PUFAs are then incorporated into cell membranes throughout the developing nervous system and retina as essential elements of infant maturation (6,7), especially cognitive development (8).

There are many studies of the impact of the quantity and quality of fat intake during pregnancy and lactation and its effects on fetal and neonatal development. However, to our knowledge, there are no studies that have explored effects of low protein intake during gestation on mammary epithelial cell proliferation and lipid metabolism, particularly the enzymes involved in production of LC-PUFAs ( $\Delta 5D$ ,  $\Delta 6D$  and Elovl 2 and Elovl 5). In a previous study we demonstrated that maternal body fat including liver lipids were lower in protein-restricted mothers. In addition, protein restriction reduces desaturase and elongase gene expression in the maternal liver as well as the concentration of AA and DHA (8). We therefore hypothesized that protein restriction during pregnancy would impair lobuloalveolar development of the mammary gland and decrease expression of the enzymes involved in LC-PUFAs formation. We investigated effects of a well-established model of maternal low protein dietary intake on mammary gland cell differentiation and histology, metabolic function and enzymes responsible for LC-PUFAs production in the pregnant rat at 19 days of gestation.

## Materials and Methods

### Care and Maintenance of Animals

All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ). Details of maternal diet, breeding and management have been previously published in detail (9). Twenty one virgin female albino adult Wistar rats aged 15–17 weeks and weighing 220–260 g with regular cycles were fed Purina 5001 rodent diet and maintained under controlled lighting conditions

(lights on from 07:00–19:00 h at 22/23°C). Female rats were mated overnight with proven male breeders and the day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the day of conception (day 0). Female rats that did not have spermatozoa in a vaginal smear in 5 consecutive days were excluded. As soon as the female rats that were positive for spermatozoa in the vaginal smear were immediately transferred to an individual cage, they were randomly allocated to be fed either with 20% protein (C – control diet group,  $n = 10$ ) or 10% protein isocaloric diet (R – restricted diet group,  $n = 11$ ) (10). Rats were weighed daily and provided with free access to the experimental diet and water. Food was delivered in the form of large flat biscuits retained behind a grill through which the biscuits could be nibbled. The amount of food provided each day was weighed as well as the amount remaining after 24 h. Food intake was also measured in six female age-matched non pregnant rats. On day 19 of gestation (dG) (chosen as a day representative of late gestation but avoiding the rapid and accentuated hormonal and metabolic changes leading to parturition), food was removed from pregnant rats at 6:00 AM. Between 10:00 and 11:00 AM rats were rapidly euthanized by decapitation by experienced personnel trained in the use of the rodent guillotine (Thomas Scientific, USA). To ensure homogeneity of the study subjects, rats with litters of  $>12$  or  $<8$  pups were excluded from the experiment; three control and five restricted mothers were excluded because of these criteria. Trunk blood was collected into polyethylene tubes, allowed to clot at 4°C for 1 h, centrifuged at 1500 g for 15 min at 4°C and serum stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed. The right inguinal (4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> nipples/gland, counted from the cephalad end) mammary gland chain was excised. The 6<sup>th</sup> was fixed in paraformaldehyde for morphometric analysis, whereas the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> were immediately frozen at  $-75^{\circ}\text{C}$  for later study by real-time RT-PCR and Western blot analysis. Mammary glands 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> from the left inguinal mammary gland chain were collected for Folch analysis of fatty acids.

### Morphometric Analysis

Mammary gland number six, including the nipple and skin, was dissected, sectioned longitudinally into two halves and immediately fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in neutral phosphate saline buffer. After 24 h of fixation, tissue sections were dehydrated with ethanol at increasing concentrations from 75–95% and embedded in paraffin. Sections (5  $\mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Five random fields in each section from each rat were used to determine the percentage area occupied by each of the adipose and parenchymal tissues (acinar and ductal epithelium) at low power magnification (10x). Total acinar and acinar cell sizes (area of cytoplasm and nucleus) were evaluated at higher magnification (100x) in five

structures per section using the software equipment Leica Q 500W.

#### *Fatty Acid Analysis*

Mammary gland lipids were extracted by a modified Folch technique (11). Samples were homogenized as previously described (8) with 2 mL of 0.9% NaCl and 5 mL of chloroform:methanol (2:1). Fatty acid extraction was performed by addition of chloroform (3 x 2 mL). The organic phase was pooled, and 120–150  $\mu$ L of methanol was added until the organic phase turned transparent; 1 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was then added and vortexed. The organic phase was evaporated under a stream of nitrogen.

#### *Preparation of Fatty Acid Methyl Esters*

Preparations of samples for fatty acid methyl esters (FAMES) were performed as previously described (8). Briefly, FAMES were extracted with hexane, and the organic phase was pooled and evaporated. Hexane was added to the residue and centrifuged followed by injection into the chromatograph. Identification of the FAMES was based upon retention times obtained for methyl ester standards from PolyScience and each was expressed as percentage (%) of total fatty acid in the sample. Another 33 different fatty acid components (including LC-PUFAs and free fatty acids) present in the mammary gland tissue were also detected by gas chromatography.

#### *Analysis of mRNA Expression by Real-time Quantitative RT-PCR*

Measurement of mRNA expression of  $\Delta$ 6D and  $\Delta$ 5D by real-time RT-PCR was performed as previously described (8). Briefly, 300 ng of total RNA was subjected to reverse transcription and then amplified by PCR using Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). The probes and primers for rat genes were obtained from PE Applied Biosystems (Pre-developed TaqMan Assay Reagents Control Kits)  $\Delta$ 6D (Rn00580220\_m1) and  $\Delta$ 5D (Rn00584915\_m1). mRNA expression of Elovl 2 and 5 by real-time RT-PCR was performed as previously described. Briefly, relative mRNA levels of target genes and invariant transcript  $\beta$ -actin were determined using cDNA preparation for tissues and HC11 cells. Synthesized cDNA was mixed with Light Cycler Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche, Indianapolis, IN) and with various sets of gene-specific forward and reverse primers as follows: for Elovl 2, forward (GGA AGA AAT ACC TCA CGC AG) and reverse (TGG CTT TTT TCG GTA TGT C); for Elovl 5, forward (CTC AAC CTG CTG TCT CTC TA) and reverse (ATC TGG TGG TTG TTC TTA CG); for  $\beta$ -actin, forward (TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG) and reverse (TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG) and subjected to RT-PCR quantification using

the Light Cycler 3.5 detection System (Roche). All results were normalized to abundance of  $\beta$ -actin mRNA as the housekeeping gene using the equation  $\Delta$ Ct = Ct target gene – Ct  $\beta$ -actin. Fold change in expression of genes analyzed was calculated using the equation 2 ( $\Delta\Delta$  Ct gene), where  $\Delta\Delta$  Ct gene = mean  $\Delta$ Ct target gene control –  $\Delta$ Ct target gene restricted. Values represent mean fold changes  $\pm$  SEM.

#### *Analysis of Protein Concentration by Western Blot*

Mammary gland tissue was homogenized in RIPA lysis buffer (PBS 1%, NP-40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1% and sodium azide 0.006% [wt/vol]). Total lysate protein concentration was determined by the Bradford method. Protein samples were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred onto a pure nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m, BIO-RAD9364001). Each membrane was probed with antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) either to  $\Delta$ 6D,  $\Delta$ 5D Elovl 2 and Elovl 5 at 1:500 dilution in TBSt (Tris-buffered saline Tween: 20 mM Tris HCl, 500 mmol NaCl, pH 7.4, 0.01% Tween-20) with 5% non-fat dried milk for 60-min incubation.  $\Delta$ 6D and  $\Delta$ 5D were incubated with goat anti-rabbit IgG-HRP and Elovl 2 and 5 with donkey anti-goat IgG-HRP secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Proteins were detected by chemiluminescence. Autoradiograph images were captured and spot-densitometry analysis was performed using ImageJ software. A total of eight samples were included per gel. The first four spots of each gel contained samples from the C group and the next four from the R group. All results were normalized to  $\beta$ -actin.

#### *Statistical Analysis*

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using unpaired Student t test to compare C ( $n = 7$ ) and R ( $n = 6$ ) groups. Results from the real time RT-PCR (mRNA gene/ $\beta$ -actin normalized ratio) are expressed relative to the C group. Western blot data were normalized with  $\beta$ -actin;  $p < 0.05$  was considered significant.

## **Results**

### *Maternal Parameters at 19 dG*

There were no differences in body weight at the beginning of pregnancy between the experimental groups (C = 245  $\pm$  5 g and R = 247  $\pm$  4 g). Body weight gain from 0 to 19 dG was similar in both groups (C = 105  $\pm$  4 g and R = 109  $\pm$  4 g). Mammary gland weight was lower in R compared to C mothers (C = 16.2  $\pm$  0.7 g vs. R = 13.9  $\pm$  0.6 g;  $p < 0.05$ ). There were no differences in food intake between C and R groups; food intake increased at the beginning of pregnancy

(C = 30 ± 1.3 g/day and R = 31 ± 1.3 g/day) compared with age-matched nonpregnant rats (22.8 ± 1.03 g/day). At the end of gestation, 19 dG, both groups decreased their food intake (C = 18.9 ± 0.7 and R = 16.4 ± 0.04 g/day) compared with the first 2 weeks of pregnancy.

*Morphometric Analysis at 19 dG*

The percentage of surface area occupied by adipose tissue was lower in the mammary gland from C than the R mothers, whereas the parenchymal tissue area was higher in C than R mothers (Figure 1). Total acinar area, acinar cell cytoplasm and nuclear size were all larger in C mothers compared with R (Figure 2).

*Δ6D, Δ5D, Elovl 2 and 5 Gene Expression by RT-PCR and Protein by Western Blot at 19 dG*

Mammary gland mRNA expression of Δ6D, Δ5D and Elovl 5 was decreased in R in comparison with the C mothers. The relative expression of Elovl 2 mRNA in the mammary gland was undetectable in both groups (Figure 3). There were no differences in the amount of Δ6D, Δ5D, Elovl 5 and Elovl 2 protein levels between C and R groups (Figure 4).

*Fatty Acid Composition at 19 dG*

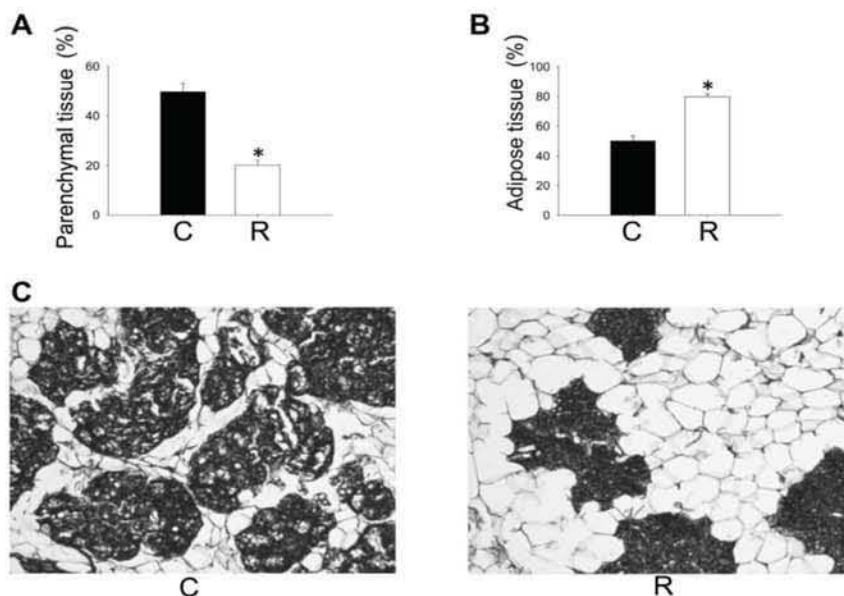
There were no differences between C and R in the percentage of total n-3, n-6 PUFAs, monoenes and saturated fatty acids in the mammary gland (Table 1); however, the

percentage of AA, EPA and DHA was lower in R group compared with C (Figure 5).

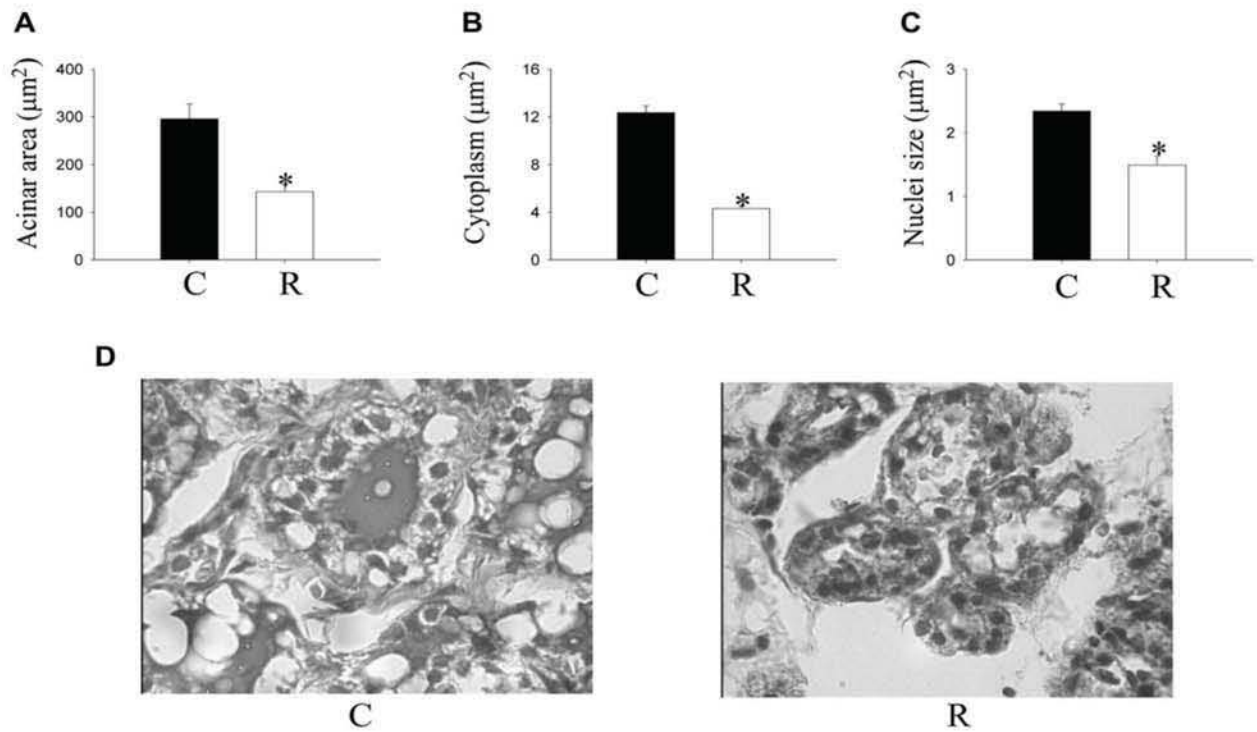
**Discussion**

We previously reported that maternal protein restriction during gestation affects maternal milk (12). The aim of the present study was to evaluate the effect of maternal protein restriction on the development of the maternal mammary gland during gestation as an adaptation to enable adequate future supply of important lipids to pups during lactation. In agreement with our previous reports (8,9,13) and others (14), pregnant rats gained the same amount of weight across pregnancy and there were no differences in body weight between protein restricted and non-restricted groups. Body fat accumulation during early pregnancy has been associated with increased lipogenesis and hyperphagia in both pregnant women and rats (15). Fat accumulation increased as gestation advanced. Food intake increased in the 10–16 dG period, a window that corresponds to the initiation of major fetal organ growth and augmented cell proliferation. The progressive increase in the availability of exogenous substrates actively contributes to maternal accumulation of fat depots. The restricted protein diet has been shown to produce lower fat deposits in the maternal carcass (8).

Our data show that protein restriction impairs mammary gland weight, epithelial cell size and proliferation in late gestation indicating that, in the presence of poor protein



**Figure 1.** Mammary gland morphology at 19 days of gestation. (A) Parenchymal tissue. (B) Adipose tissue. (C) Photomicrograph stained with hematoxylin and eosin (10x). Rats fed control (C – 20% protein, n = 7) or restricted (R – 10% protein, n = 6) diet during pregnancy. Mean ± SEM. \*p < 0.001 vs. C.

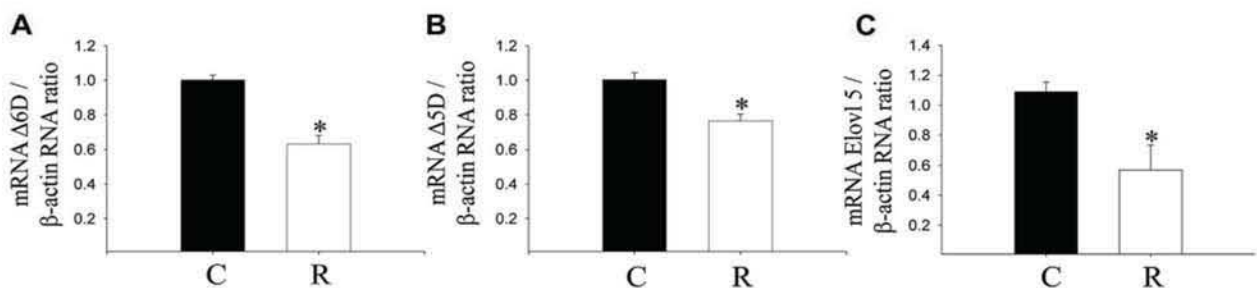


**Figure 2.** Mammary gland morphology at 19 days gestation. (A) Acinar area. (B) Cytoplasm. (C) Nuclei size of acinar cells. (D) Photomicrograph stained with hematoxylin and eosin (100x). Rats fed control (C – 20% protein,  $n = 7$ ) or restricted (R – 10% protein,  $n = 6$ ) diet during pregnancy. Mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.001$  vs. C.

intake, nutrient provision is inadequate for normal mammary gland development. Mammary gland development is sensitive to the precise mix of key steroid hormones to which it is exposed. We have previously reported an increase in maternal progesterone (13), testosterone and estradiol (9) concentrations in restricted mothers at 19 dG. Studies from Haslam (16) indicate that progesterone plays a major role in normal mammary gland development. Thus, the changes we observe may well act through altered steroid stimulation of growth and differentiation resulting

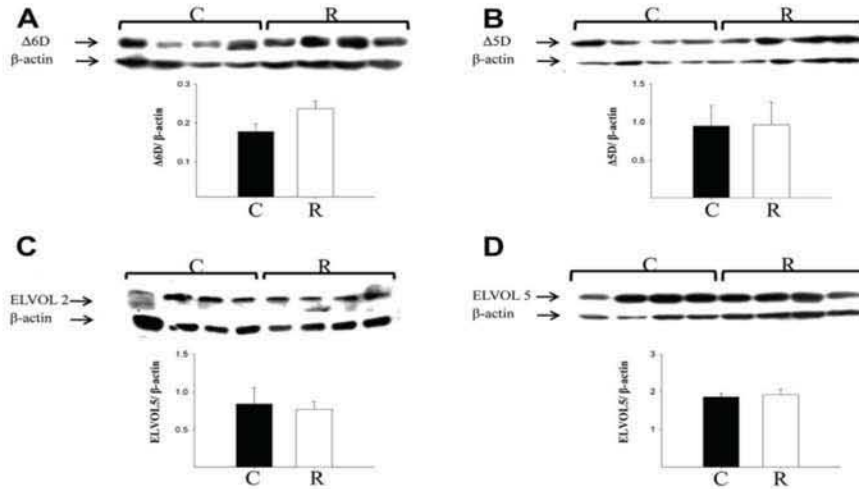
from the deficient diet. However, we know of no data on effects of excess steroid exposure or even the optimum ratio of these steroids in the setting of a low protein diet.

A compelling body of data shows that early malnutrition predisposes to life-long chronic diseases. Appropriate maternal nutrition during gestation is critical for optimal growth and development of all fetal organs (1). However, there are very few studies that address potential effects of maternal protein restriction during gestation on availability of PUFAs (8,17,18). We previously demonstrated in the rat



**Figure 3.** Maternal mammary gland. (A)  $\Delta 6$  desaturase. (B)  $\Delta 5$  desaturase. (C) Elovl 5 (elongase) relative abundance gene expression by real-time RT-PCR at 19 days of gestation. Rats fed control (C – 20% protein) or restricted (R – 10% protein) diet during pregnancy. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ . \* $p < 0.05$  vs. C.





**Figure 4.** Maternal mammary gland protein quantification by Western blot. (A) Δ6 desaturase. (B) Δ5 desaturase. (C) Elovl 2 (elongase). (D) Elovl 5 (elongase). β-actin at 19 days of gestation. Rats fed control (C – 20% protein) or restricted (R – 10% protein) diet during pregnancy. Mean ± SEM, n = 4.

that maternal protein restriction during pregnancy negatively impacts fetal brain development associated with changes in maternal lipid metabolism. At 19 dG, fetal brain lipids, particularly DHA, were significantly lower in fetuses of protein-restricted mothers compared with controls (8). Maternal protein restriction in pregnancy affects offspring behavioral phenotype and impairs offspring learning and motivation (19–21). During adult life, pups from rats fed with low protein diet during gestation increased their body weight (13,22) and demonstrated abnormal appetitive behavior and leptin regulation (12,22). In the present study, at 19 dG, AA and DHA were lower in the mammary gland of restricted in comparison with control mothers. In addition, EPA, another important LC–PUFA that has beneficial actions in many developing fetal systems including the immune (23), neural (24,25) and cardiovascular systems (26), was present in the mammary gland of the control group and not detectable in the restricted group at 19 dG. The reduced expression of desaturases and elongases in maternal liver would explain, in part, the decreased mammary gland content of AA, EPA and DHA, even when the mother is

subjected to a protein-restricted diet during pregnancy without modifying the quantity and quality of dietary fat.

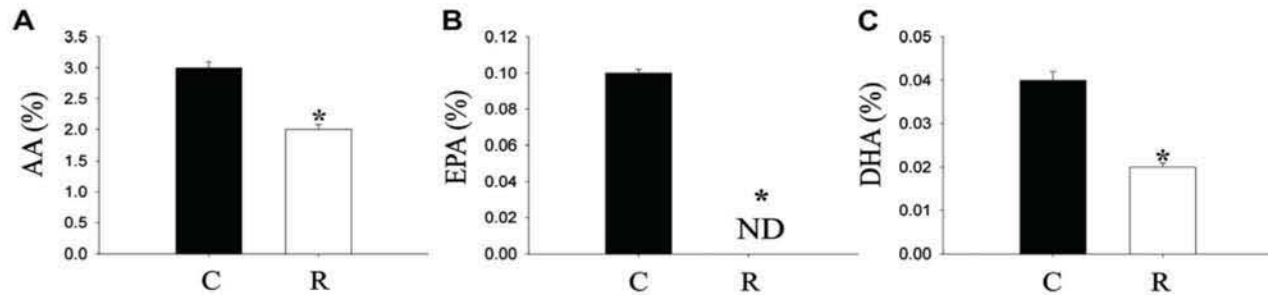
Proper maternal nutrition during pregnancy is crucial for LC–PUFA synthesis by the maternal liver and mammary gland processes that are key to normal fetal development. Adequate PUFA supply and metabolism during the pre- and postnatal period are essential for optimal nervous system maturation (6,27–29). AA, EPA and DHA, major products of desaturation and elongation enzyme activity, are important in fetal development particularly for development of the retina, neural and vascular tissue. The demand for maternal PUFAs increases during pregnancy and lactation because the mother needs to provide these essential fatty acids to the fetus and neonate (30,31). Although pregnant women have the option to increase their dietary intake of these nutrients to maintain adequate maternal reserves and ensure an optimal infant supply, altering dietary consumption was not possible for the deprived rats in our study because food was provided *ad libitum*; our results show that food intake, including PUFAs intake was the same for both groups. All changes observed in R group are related to protein restriction rather than alteration in PUFAs consumption.

The AA and DHA status of the human neonate at birth is correlated to maternal pregnancy levels of these fatty acids, especially during the last trimester (32,33). Breast milk DHA levels are directly related to adequate mammary gland development and function (34). Although the liver is the principal source of LC–PUFAs, in the last week of gestation and during lactation the maternal mammary gland also plays an important role in LC–PUFA biosynthesis (35) and production of milk with normal concentrations of these essential nutrients requires adequate proliferation and synthesis within the mammary gland in late gestation.

**Table 1.** Maternal fatty acid composition in mammary gland at 19 days of gestation

Fatty acids (%)	Control n = 7	Restricted n = 6
Total n-3 PUFAs	1 ± 0.04	1 ± 0.08
Total n-6 PUFAs	31 ± 0.7	33 ± 2
Total saturates	33 ± 0.9	33 ± 1
Total monoenes	35 ± 1	33 ± 2

Note: Rats fed control (C–20% protein, n = 7) or restricted (R–10% protein, n = 6) diet during pregnancy (mean ± SEM).



**Figure 5.** Fatty acid content (%) of (A) arachidonic acid (AA), (B) eicosapentaenoic acid (EPA) and (C) docosahexaenoic acid (DHA) at 19 days of gestation. Rats fed control (C – 20% protein,  $n = 7$ ) or restricted (R – 10% protein,  $n = 6$ ) diet during pregnancy. Mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. C.

Previously we reported several potential ways in which low protein intake in the maternal diet may affect maternal hepatic PUFA synthesis (8). Gene expression of hepatic  $\Delta 6D$ ,  $\Delta 5D$ , Elov1 2 and Elov1 5 was significantly lower in mothers exposed to a protein restricted diet in comparison with those fed with a normal diet (8). In the present study we were able to measure mammary gland mRNA and protein for both desaturases,  $\Delta 6D$  and  $\Delta 5D$ , as well as Elov1 5. However, in the case of Elov1 2, we only detected the protein. mRNA was unmeasurable using a probe that detected this message in liver (8). One potential explanation is that there are different spliced variants in these two tissues. Elov1 2 transcription produces three different mRNAs, two alternatively spliced variants and one unspliced form (36).

Until very recently the accepted view was that the mammary gland does not participate in the production of LC-PUFAs present in milk and that all milk LC-PUFAs come from maternal plasma (37). However, a very recent publication has demonstrated gene expression within the mammary gland of key enzymes needed to synthesize LC-PUFAs (35). To our knowledge this is the first report that detects mammary gland desaturase and elongase protein. Our results show that both  $\Delta 6D$  and  $\Delta 5D$  desaturases, as well as Elov1 5, are present in the rat mammary gland at least in the last third of pregnancy (19 dG). mRNA expression of these enzymes was reduced in restricted compared with control mothers. However, protein expression was unchanged. This discrepancy may be explained by different regulation of production, degradation and/or activity.

In conclusion, results indicate that during pregnancy the mammary gland expresses desaturases and elongases necessary for the production of LC-PUFA synthesis in addition to production of LC-PUFAs shown previously in the liver. Low maternal dietary protein intake during gestation negatively impacts mammary gland development accompanied by marked infiltration of the gland with adipose tissue. As a result, a smaller proportion of the gland is made up of acinar cells resulting in decreasing synthesis of desaturases and elongases and a decline in mammary

gland LC-PUFA content. Abnormal mammary function resulting from poor maternal nutrition during preparation for lactation period likely affects the quality of maternal milk and availability of key nutrients for neonatal brain and retinal development with potential consequences for cognitive and visual function in later life.

#### Acknowledgments

C.J. Bautista and G.L. Rodríguez-González are graduate students from the Doctorado en Ciencias Biomédicas program, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and are recipients of a CONACyT fellowship. The authors experimental work presented in this review was supported by a grant from CONACyT (#48839).

#### References

1. Park CS. Role of compensatory mammary growth in epigenetic control of gene expression. *FASEB J* 2005;19:1586–1591.
2. Nakamura MT, Nara TY. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr* 2004;24:345–376.
3. Rodríguez-Cruz M, Tovar AR, Palacios-Gonzalez B, et al. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of Delta5 and Delta6 desaturases, SREBP-1, PPARalpha, and PGC-1. *J Lipid Res* 2006;47:553–560.
4. McCann JC, Ames BN. Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am J Clin Nutr* 2005;82:281–295.
5. Ruyle M, Connor WE, Anderson GJ, et al. Placental transfer of essential fatty acids in humans: venous–arterial difference for docosahexaenoic acid in fetal umbilical erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7902–7906.
6. Larque E, Demmelmair H, Koletzko B. Perinatal supply and metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids: importance for the early development of the nervous system. *Ann NY Acad Sci* 2002;967:299–310.
7. Marszalek JR, Lodish HF. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:633–657.
8. Torres N, Bautista CJ, Tovar AR, et al. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid

- composition in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E270–E277.
9. Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 2005;563:275–284.
  10. Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005;566:225–236.
  11. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.
  12. Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, 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;63:358–363.
  13. Guzman C, Cabrera R, Cardenas M, 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;572:97–108.
  14. Martin-Hidalgo A, Holm C, Belfrage P, et al. Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. *Am J Physiol* 1994;266:E930–E935.
  15. Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 2002;19:43–55.
  16. Haslam SZ, Shyamala G. Progesterone receptors in normal mammary gland: receptor modulations in relation to differentiation. *J Cell Biol* 1980;86:730–737.
  17. Burdge GC, Delange E, Dubois L, et al. Effect of reduced maternal protein intake in pregnancy in the rat on the fatty acid composition of brain, liver, plasma, heart and lung phospholipids of the offspring after weaning. *Br J Nutr* 2003;90:345–352.
  18. Burdge GC, Dunn RL, Wootton SA, et al. Effect of reduced dietary protein intake on hepatic and plasma essential fatty acid concentrations in the adult female rat: effect of pregnancy and consequences for accumulation of arachidonic and docosahexaenoic acids in fetal liver and brain. *Br J Nutr* 2002;88:379–387.
  19. Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Rodriguez-Gonzalez GL, et al. Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. *Int J Dev Neurosci* 2011;29:177–182.
  20. Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Charco R, et al. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci* 2012;30:39–45.
  21. Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Rodriguez-Gonzalez GL, et al. Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav Brain Res* 2012;227:324–329.
  22. Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, et al. 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;571:221–230.
  23. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1505S–1519S.
  24. Salem N Jr, Litman B, Kim HY, et al. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 2001;36:945–959.
  25. Freeman MP, Hibbeln JR, Wisner KL, et al. Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *J Clin Psychiatry* 2006;67:1954–1967.
  26. Holub DJ, Holub BJ. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem* 2004;263:217–225.
  27. Del Prado M, Villalpando S, Gordillo J, et al. A high dietary lipid intake during pregnancy and lactation enhances mammary gland lipid uptake and lipoprotein lipase activity in rats. *J Nutr* 1999;129:1574–1578.
  28. Nakamura MT, Nara TY. Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochem Soc Trans* 2002;30:1076–1079.
  29. Jensen CL, Voigt RG, Prager TC, et al. Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *Am J Clin Nutr* 2005;82:125–132.
  30. Arterburn LM, Boswell KD, Henwood SM, et al. A developmental safety study in rats using DHA- and ARA-rich single-cell oils. *Food Chem Toxicol* 2000;38:763–771.
  31. Innis SM. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proc Nutr Soc* 2007;66:397–404.
  32. Connor WE, Lowensohn R, Hatcher L. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids* 1996;31(suppl):S183–S187.
  33. Otto SJ, Houwelingen AC, Antal M, et al. Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:232–242.
  34. Gibson RA, Neumann MA, Makrides M. Effect of dietary docosahexaenoic acid on brain composition and neural function in term infants. *Lipids* 1996;31(suppl):S177–S181.
  35. Rodriguez-Cruz M, Sanchez R, Sanchez AM, et al. Participation of mammary gland in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis during pregnancy and lactation in rats. *Biochim Biophys Acta* 2011;1811:284–293.
  36. Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, et al. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 2004;43:36–54.
  37. Heird WC. The role of polyunsaturated fatty acids in term and preterm infants and breastfeeding mothers. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:173–188.



# Aspectos biológicos y bioquímicos de los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga durante la gestación

Claudia J Bautista,<sup>\*,\*\*</sup> Elena Zambrano<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

<sup>\*\*</sup> Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Biology and biochemical aspects of long-chains polyunsaturated fatty acid during gestation*

## ABSTRACT

*During pregnancy, the mother must provide the nutrients necessary for proper differentiation, maturation and growth of fetal organs and systems.*

*During this period, the mother adapts her metabolism to address the continuing demand for substrates to be transferred to the fetus through the placenta. Essential fatty acids cannot be synthesized by humans, therefore, should be consumed as part of the diet. Its derivatives, Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LC-PUFAs) from biosynthesis in the maternal liver during pregnancy and lactation are compounds that will form part of the cell membranes of the brain, retina, and liver, fetal and newborn heart, thereby enabling the smooth, activation and regulation of cellular functions. Therefore, adequate nutritional status of the mother during pregnancy and lactation is necessary to ensure adequate product development. This article aims to review some aspects of the adaptive mechanisms of maternal lipid metabolism, mainly from LC-PUFAs compensating energy expenditure and allow the proper development of the product.*

**Key words.** Gestation. Nutrition. Metabolism. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid and Function.

*El estado nutricional de las mujeres antes de la concepción influye sobre los factores fisiológicos que se presentan durante el embarazo. Además, el adecuado estado nutricional en el embarazo es determinante para cubrir las necesidades nutricionales durante la lactancia.*

J.C. King

## RESUMEN

Durante la gestación, la madre debe proporcionar al feto los nutrientes necesarios para su adecuada diferenciación, maduración y crecimiento de órganos y sistemas. Durante este periodo, la madre adapta su metabolismo para solventar la continua demanda de sustratos que deben ser transferidos al feto a través de la placenta. Los ácidos grasos esenciales no pueden ser sintetizados por el humano, por tanto deben ser consumidos como parte de la dieta. Sus derivados, los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (AGPIs-CL) provenientes de la biosíntesis en el hígado materno durante la gestación y la lactancia, son compuestos que van a formar parte de las membranas celulares del cerebro, retina, hígado, corazón del feto y del neonato, permitiendo así el buen funcionamiento, activación y regulación de las funciones celulares. Por tanto, el adecuado estado nutricional de la madre durante la gestación y la lactancia, es necesario para permitir el adecuado desarrollo del producto. Este artículo tiene como objetivo revisar algunos aspectos de los mecanismos de adaptación del metabolismo de lípidos maternos, principalmente de los AGPIs-CL que compensan el gasto energético y permiten el desarrollo adecuado del producto.

**Palabras clave.** Gestación. Nutrición. Metabolismo. Ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga y Función.

## INTRODUCCIÓN

### Ajustes fisiológicos maternos durante el embarazo

Los nueve meses del embarazo en el ser humano representan el periodo más intenso de crecimiento y desarrollo. En este periodo se presentan cambios como el incremento en el volumen sanguíneo, resis-

tencia a la insulina con aumento en la concentración de glucosa, crecimiento de órganos y tejidos.<sup>1</sup> Además el sistema respiratorio amplía su flujo de aire inhalando y exhalando 30 a 40% más de lo normal y el sistema circulatorio sube su gasto cardiaco debido a la elevación de la frecuencia cardiaca.<sup>2,3</sup> La forma en que se presentan estos cambios depende de muchos factores que ocurren en condiciones normales durante el embarazo. Sin embargo, existen cambios metabólicos, que están relacionados de acuerdo a la conducta nutricia que adopte la madre durante la gestación.<sup>4</sup> Estos cambios son:

- El contenido de agua corporal, el cual aumenta de 7 a 10 litros.<sup>3</sup>
- Los cambios hormonales que son producidos por la placenta para sintetizar hormonas esteroides, como la progesterona y estrógenos que promueven el acúmulo de lípidos.<sup>5,6</sup>
- El ajuste del metabolismo de carbohidratos, ya que la glucosa es el combustible preferido del feto y del adulto, para generar energía.<sup>7</sup>
- El aumento en la necesidad de proteínas, la cual juega un papel importante, ya que permite la síntesis de nuevos tejidos maternos y fetales.<sup>4</sup>
- El metabolismo de lípidos promueve la acumulación de grasa en la primera mitad del embarazo, esto para tener depósitos suficientes que solventarán los últimos meses de la gestación,<sup>8</sup> también hay incremento en las concentraciones de colesterol y en las lipoproteínas de baja (LDL) y alta (HDL) densidad en sangre, pero son los triacilglicéridos los que al final de la gestación se ha visto que aumentan hasta tres veces más que las concentraciones de las mujeres no embarazadas,<sup>8</sup> este aumento de grasa corporal juega un papel importante en la adaptación metabólica,<sup>9</sup> ya que cuando existen condiciones adversas como la desnutrición, la madre responde disminuyendo dramáticamente su gasto energético para mantener el aporte de nutrimentos al feto.<sup>10</sup>

Durante la última etapa de la gestación, el metabolismo materno de lípidos cambia a un proceso catabólico acelerándose la movilización de ácidos grasos, por lo que la madre depende de sus depósitos de grasa para obtener energía a medida que avanza el embarazo, el aumento de las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (AG) circulantes e incremento en lipoproteínas, triacilglicéridos, fosfolípidos y colesterol, refleja que hay aumento en la actividad de la lipólisis,<sup>11,12</sup> lo cual nos indica que hay una transferencia intensa de AG unidos a lipo-

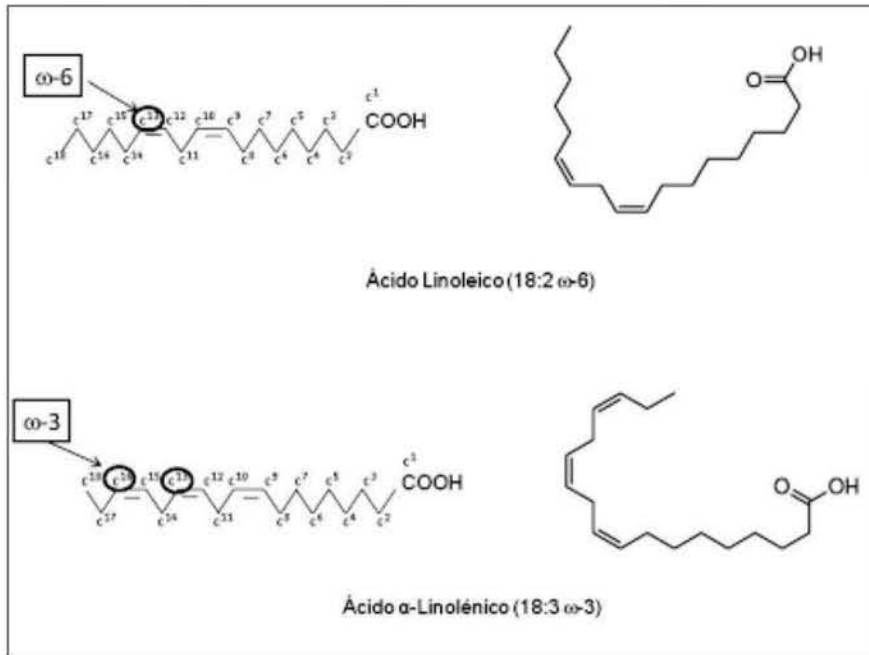
proteínas a través del sincitiotrofoblasto en la placenta humana al feto.<sup>13</sup> Estudios en ratas y en ovejas han demostrado que la glucosa es el sustrato que cruza la placenta con mayor cantidad seguida de los aminoácidos<sup>5,7,14</sup> y los AG que atraviesan la placenta, lo hacen en menor proporción. Los seres humanos nacen con alto contenido de grasa, porque durante los primeros meses de la gestación los AG son derivados del aporte placentario materno y en la gestación tardía existe síntesis de novo AG del tejido adiposo fetal y también materno, esto es debido, a que al final de la gestación el feto crece aceleradamente y por tanto requiere suficiente energía para completar diversos procesos del desarrollo.<sup>5,15</sup>

Si bien es cierto que muchos de los componente grasos son transferidos por la madre y otros obtenidos de novo por el feto durante la gestación tardía, es de suma importancia aclarar que también se deben aportar componentes grasos esenciales al feto que sólo pueden llegar al producto, si la madre los adquiere a partir de su dieta, estos ácidos grasos son el ácido linoleico  $\omega 6$  (AL; 18:2n-6) y el ácido alfa-linolénico  $\omega 3$  ( $\alpha$ -ALN; 18:3n-3),<sup>16</sup> los cuales, a partir de la actividad enzimática de desaturasas y elongasas,<sup>17</sup> en el hígado materno forman productos con importancia biológica para el feto, éstos se conocen comúnmente como ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (AGPIs-CL) y juegan un papel importante durante la gestación, ya que se ha demostrado en diversos modelos experimentales en ratas,<sup>18,19</sup> ovejas<sup>20</sup> y primates<sup>20</sup> que tienen múltiples funciones para el feto y el neonato.<sup>18-20-23</sup>

### Química, fuente y requerimiento

El ácido linoleico (AL) también conocido como omega 6 se expresa con la fórmula abreviada 18:2 n-6, el cual se representa con una estructura de 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces en la posición 6 y 9 de la cadena hidrocarbonada, considerando la numeración desde el extremo carboxilo como primer carbono de la cadena hasta el grupo metilo terminal y adopta el nombre de omega 6 ( $\omega 6$ ) por la posición en la que interviene el primer doble enlace en la estructura considerando como carbono inicial al metilo. El ácido alfa-linolénico, se representa con la fórmula abreviada 18:3 n-3, este tiene tres insaturaciones o dobles enlaces en las posiciones 3, 6 y 9 de su cadena, este ácido es el que presenta el doble enlace más cercano al extremo metilo y por ello es conocido como omega<sup>38,23</sup> (Figura 1).

El AL lo podemos encontrar principalmente en los vegetales y semillas como son la soya, el aguacate, el

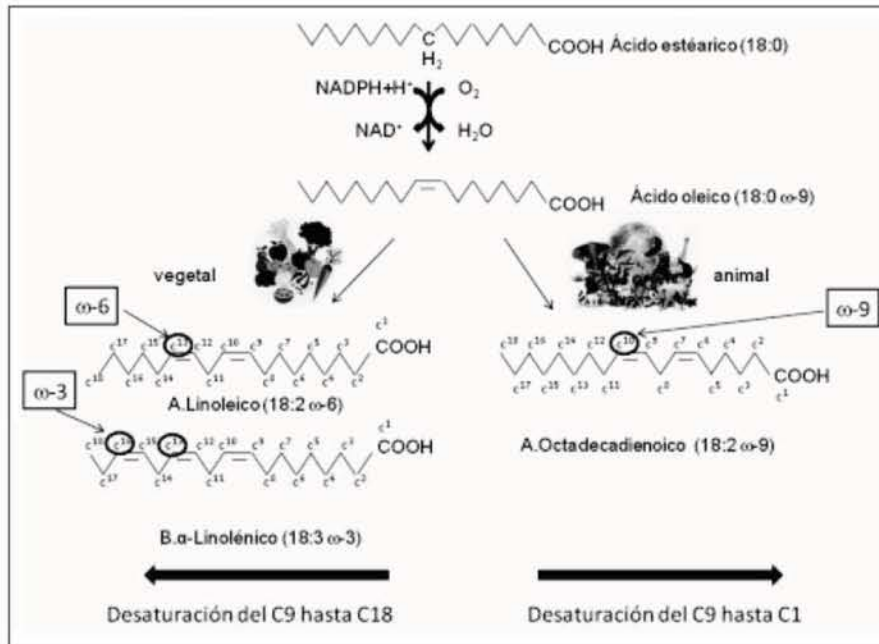


**Figura 1.** Estructura química de los ácidos grasos esenciales. A. ácido linoleico (18:2 ω6). B. ácido α-linolénico (18:3 ω3).

coco, la semilla de girasol, la calabaza, la nuez, el cacahuate entre otros; mientras que el α-ALN lo encontramos en los productos marinos como sardina, salmón, trucha, atún, pez bagre, carpa, lucio y algunos mariscos como el camarón, la langosta, la ostra, etc.<sup>25</sup> Las verduras contienen ácidos grasos esenciales, ya que poseen tanto las enzimas, desaturasa 12 (Δ12D) como la desaturasa 15 (Δ15D) que actúan sobre los fosfolípidos que contienen una molécula de ácido oleico y que pueden introducir los dobles enlaces en la posición ω3 y ω6 en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos.<sup>25</sup> Los productos marinos poseen el α-ALN, ya que éstos se alimentan del plancton que se encuentra en las profundidades del mar que es rico en α-ALN, es por ello que los peces y mariscos lo contienen en su organismo.<sup>26</sup> Las células de los mamíferos no tienen actividad enzimática de desaturasas capaces de introducir dobles enlaces en los átomos de carbono 12 y 15 de los ácidos grasos; por lo tanto, no pueden sintetizar al AL (18:2 ω-6) ni al α-ALN (18:3 ω-3),<sup>27</sup> esto hace que sea necesario que los mamíferos los consuman a partir de la dieta<sup>25</sup> (Figura 2).

Las recomendaciones para el consumo de estos compuestos fue establecido por la Agencia Nacional de Salud en Estados Unidos, donde se menciona, que su ingesta debe de ser en una proporción 1:4 con la

relación ω6/ω3 si existiera un mayor consumo de ω3 se establecería entonces, una competencia para la formación de los productos provenientes del ω6 y como resultado un desbalance en las proporciones adecuadas de cada compuesto.<sup>28</sup> Durante el embarazo, las Referencias en el Consumo de Dietas, por sus siglas en inglés (DRIs Dietary Reference Intakes) establece que durante el segundo y tercer trimestre de la gestación la mujer entre 19 y 24 años debe consumir un mínimo de 1.36 g/d de ω3 y mujeres de 25 a 49 años 1.26 g/d de ω3, respectivamente, mientras que de ω6 lo establecido por día es de 1.4 g/d para compensar el requerimiento fetal.<sup>29,30</sup> Los ácidos grasos esenciales y sus derivados son de vital importancia, ya que son elementos estructurales de las membranas celulares y, por tanto, esenciales para la formación de nuevos tejidos como ocurre durante la gestación y la lactancia.<sup>14</sup> El sistema nervioso central es particularmente rico en ADH (ácido docosahexaenoico) y AA (ácido araquidónico).<sup>17</sup> El cerebro tiene un pico de crecimiento en el último trimestre del embarazo y al principio de la lactancia,<sup>21</sup> por lo tanto un adecuado suministro de estos AGPIs-CL se considera esencial para el funcionamiento neurológico, mejora de las funciones cognitivas y de atención, así como desarrollo de la habilidad motora, lo cual facilita el aprendizaje y el



**Figura 2.** Biosíntesis de ácidos grasos esenciales. Las plantas pueden insertar dobles enlaces desde el carbono 18 hasta el 9 y los animales a partir del carbono 9 al 1 de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos esenciales.

buen comportamiento.<sup>21</sup>

#### FUNCIÓN DE LOS AGPIs-CL

Actualmente existe diversa evidencia epidemiológica y experimental, que ha demostrado cuáles son las funciones de los AGPIs-CL; sin embargo, se sigue estudiando la gama de funciones de estos compuestos, ya que se ha visto en diversos experimentos tanto en roedores como en primates, algunas otras funciones importantes que podrían prevenir muchas enfermedades de tipo metabólico en la vida adulta.

#### Ácido linoleico 18:2 n-6 y sus productos durante la gestación

- **Ácido linoleico**, también llamado ω6, favorece el crecimiento neonatal y permite el desarrollo de la función nerviosa, visual, cerebral en el feto y neonato.<sup>17,27</sup>
- **Ácido dihomo-gama-linoleico**. Precursores de sustancias eicosanoides (tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas) que tienen función antiinflamatoria y regulatoria de las plaquetas.<sup>31</sup>
- **Ácido araquidónico (AA)**. Importante marcador del desarrollo.<sup>32</sup> Permite la formación de membranas en todos los órganos, es también un precursor importante de las moléculas lipídicas

de señalización, unido a fosfolípidos en la membrana permite el flujo adecuado de componentes como proteínas y hormonas.<sup>8</sup>

#### Ácido α-linolénico 18:3 n-3 y sus productos durante la gestación

- **Ácido α-linolénico**. Sirve como fuente de energía para las funciones celulares en el oocito y pre implantación del embrión en el desarrollo, regula procesos reproductivos y actúa en la formación de sustancias eicosanoides vía regulación de la enzima COX-2 (ciclooxigenasa-2), la cual es la responsable de la conversión de los AGPIs-CL en prostaglandinas.<sup>33</sup>
- **Ácido eicosapentaenoico (AEP)**. Compuesto de 20 átomos de carbono que durante la gestación establece un mecanismo de competencia con el AA para la formación de sustancias que son parte de la respuesta inmune.<sup>34</sup>
- **Ácido docosahexaenoico (ADH)**. Regula la extensión y establecimiento de la arborización dendrítica, la cual ocurre durante la formación de la memoria. Se encuentra en altas concentraciones en el tejido neuronal principalmente en la corteza cerebral permitiendo el óptimo desarrollo neuronal y en las membranas de los foto receptores en la retina

favoreciendo la función visual, finalmente es transportado por los eritrocitos en el torrente sanguíneo.<sup>23,25,35,36</sup>

### Metabolismo de los AGPIs-CL durante la gestación

La conversión de los ácidos grasos esenciales consumidos en la dieta por los mamíferos durante la gestación es a partir de la actividad enzimática de elongasas (elovl 2, elovl5) y desaturasas ( $\Delta 6D$ ,  $\Delta 5D$  y probablemente  $\Delta 4D$ ) (Figura 3). Ubicadas en el retículo endoplásmico de los enterocitos en el hígado materno, estas enzimas forman AGPIs-CL biológicamente activos para la madre y el feto, los cuales se incorporan rápidamente en los fosfolípidos que forman parte de las membranas de los diversos tejidos y órganos. Durante el desarrollo fetal, los AGPIs-CL, atraviesan la placenta de forma selectiva, ya que se ha demostrado que el AA y el ADH pasan directamente a través de la placenta por un compartimento materno específico hacia el feto, este mecanismo se conoce como enriquecimiento de AGPIs-CL durante la vida intrauterina o Proceso de Biomagnificación.<sup>8,14,17,37</sup> Esto ocurre durante el tercer trimestre cuando la demanda fetal para el crecimiento neuro-

nal y vascular es mayor. Existen estudios que han demostrado que la placenta selecciona AA y ADH a expensas del AL,  $\alpha$ -ALN y AEP, para mantener proporciones considerablemente elevadas de AA y ADH en la circulación fetal a la mitad del embarazo<sup>15,25</sup> y al final,<sup>15</sup> esto se ha visto que estimulan el desarrollo fetal, ya que niños nacidos prematuramente presentan bajo peso al nacer y tienen un alto riesgo de trastornos e incapacidades del desarrollo neurológico,<sup>23</sup> esto porque hubo menos tiempo de exposición a los AGPIs-CL en el feto. En la lactancia la madre debe proporcionar la fuente necesaria de estos componentes, a través de la leche, ya que serán determinantes para la maduración final y el adecuado funcionamiento de los sistemas y órganos del producto.

El metabolismo de los ácidos grasos que provienen de la dieta comienza, cuando los ácidos grasos, entran a los enterocitos por medio de una proteína localizada en la pared intestinal que transporta ácidos grasos. Los ácidos grasos con más de 14 carbonos, como es el caso del AL y  $\alpha$ -ALN, se esterifican para formar triacilgliceroles dentro del enterocito y pasan a la circulación sanguínea a través de la vía linfática en forma de quilomicrones. La enzima lipoproteína lipasa (LPL), que se encuentra en la pared

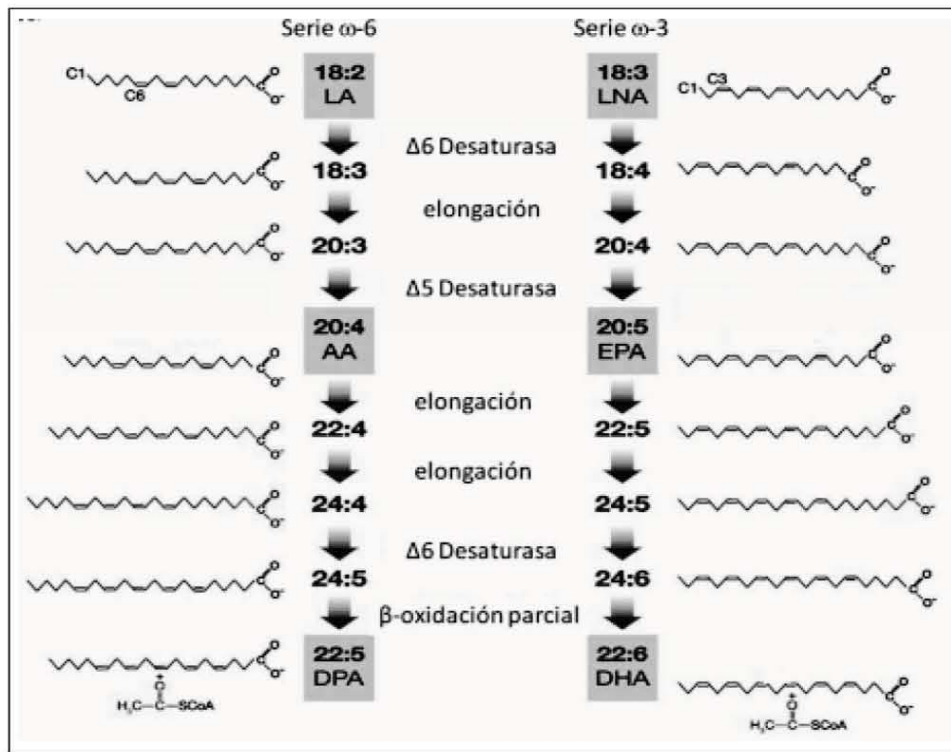
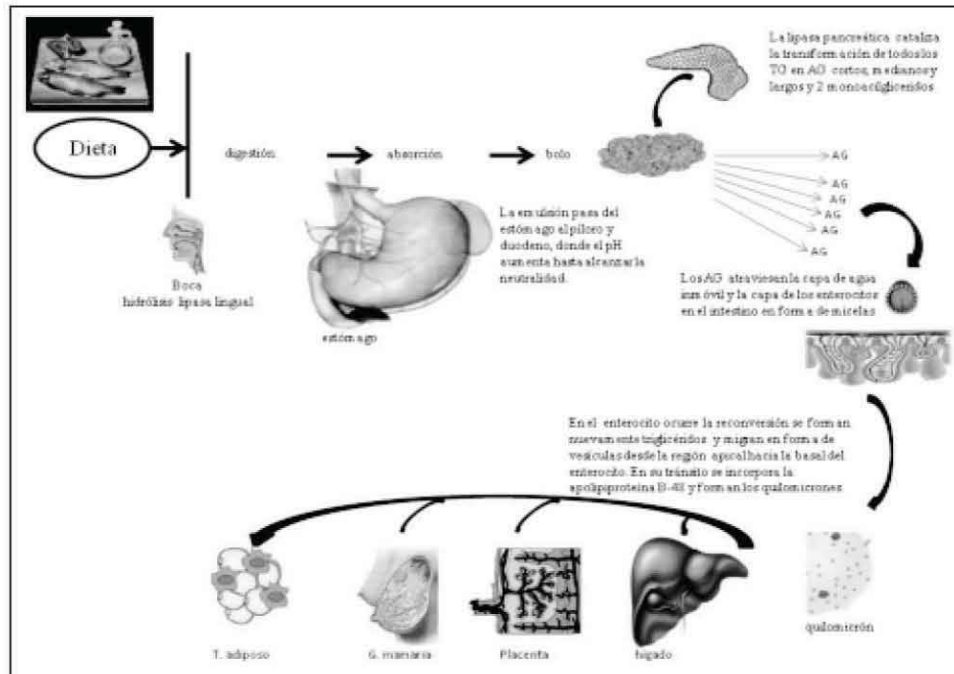


Figura 3. Mecanismo de desaturación y elongación de los ácidos grasos esenciales, estos productos han sido clasificados por el número de carbonos y de insaturaciones. C1, C3, C6 = posición 1, 3, 6 en la cadena hidrocarbonada para numerar la posición de los dobles enlaces. LA, ácido linoleico, LNA, ácido alfa-linolénico, AA, araquidónico, EPA, eicosapentaenoico, ADH, docosahexaenoico.





**Figura 4.** Metabolismo de los ácidos grasos esenciales indicando los principales destinos metabólicos.

interna de los capilares sanguíneos hidroliza los triacilglicéridos en AG (saturados, mono insaturados o poli insaturados, AGPIs), es así como pueden ser transportados a sus diferentes destinos metabólicos como el hígado y el tejido adiposo, durante la gestación llegan a la placenta para ser transportados al feto y durante la lactancia a la glándula mamaria para poder ser parte de la leche<sup>8</sup> (Figura 4).

El descubrimiento de que algunos ácidos grasos pueden actuar como ligandos de factores de transcripción, indica que estos ácidos grasos no son meramente moléculas pasivas que aportan energía, sino que también son reguladores metabólicos.

### Regulación de los AGPIs-CL y la expresión de genes metabólicos

Los AGPIs-CL, son ligandos específicos sobre los PPARs (elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas), éstos se activan por concentraciones micromolares de los mismos.<sup>38</sup> El PPARα es un miembro de la súper familia de receptores nucleares esteroides, estos ligandos específicos activos regulan la expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de lípidos.<sup>30</sup> El papel de las señales de PPARα denota una sucesiva unión del receptor con ligandos específicos y luego una especificidad a una

secuencia de DNA [elementos responsables de la proliferación de peroxisomas (PPRE)], durante el proceso de oxidación la activación de la transcripción de los genes PPRE, es decir, genes diana de PPARα, transcribe y traduce una serie de enzimas proteínicas implicadas en la oxidación, como CPT 1 (carnitina palmitoiltransferasa I) enzima limitante en ciclo de la oxidación mitocondrial. Su función principal es de transportar los AG al interior de la membrana para poder ser parcialmente oxidados y formar ADH y ADP, así como también se encarga del transporte de lípidos, el almacenamiento y formación de energía.<sup>8</sup> Cuando existe una alta concentración de AGPIs-CL se ha propuesto que se activa la vía de la lipogénesis de igual forma que la β-oxidación por factores de transcripción como SREBP-1 (proteínas de unión a elementos de respuesta a los esteroides) que inducen la transcripción y traducción de enzimas limitantes en la vía de la lipogénesis como acetil Coenzima A Carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS).<sup>39</sup> Sin embargo, hasta el momento no está del todo claro cómo es que ocurre esta regulación, ya que los AGPIs-CL no son ligando específicos de este factor de transcripción, por lo que se propone que existen algunos otros mecanismos que pueden activar a SREBP-1 induciendo la síntesis y almacenamiento de ácidos grasos en la vía de la lipogénesis.<sup>25,39</sup>

## DISEÑOS EXPERIMENTALES

Tres tipos de protocolos son los comúnmente usados en los diseños experimentales para tratar de explicar los mecanismos metabólicos de los AG y los AGPIs-CL durante la gestación. Cada uno utiliza diferentes dietas suplementadas con AG o AGPIs-CL, durante el desarrollo y sus resultados concluyen que dietas enriquecidas o disminuidas en estos ácidos grasos, tienen efecto directo en las concentraciones ADH en el cerebro fetal, lo cual tiene, consecuencias positivas o negativas en pruebas de habilidad cognitiva y conductual de acuerdo al tipo de suplementación dietaria que se administró.<sup>21</sup> Otros estudios en roedores y primates han apoyado esta evidencia en experimentos realizados con restricción en a-ALN, en los que han visto cómo la concentración de ADH en el cerebro disminuye dramáticamente en 85% en roedores<sup>21,40</sup> y en primates en 75%, teniendo efectos negativos en pruebas de conducta animal.<sup>21</sup> Algunas otras investigaciones se han hecho en hijos de madres suplementadas con aceite de pescado (rico en ADH) durante el embarazo teniendo mejores resultados en diferentes pruebas cognitivas a los cuatro años de edad que el grupo suplementado con aceite de maíz, que es rico en AL.<sup>8,23,41</sup> Los datos obtenidos en los experimentos realizados con animales y epidemiológicos, sugieren que la nutrición precedente y posterior al nacimiento presenta importantes efectos en la composición lipídica del cerebro y sobre el aprendizaje.<sup>23</sup> Las carencias específicas de ácidos grasos w3 influyen en la integridad neurológica y afectan selectivamente al aprendizaje y a la capacidad visual.<sup>21,29</sup>

Los estudios realizados con primates confirman que la carencia de w3 disminuye el desarrollo de la función retinal y de la agudeza visual, por lo que es de suma importancia declarar que el consumo de estos compuestos por la madre es vital, ya que suplementa y compensa las necesidades de su producto durante el desarrollo.<sup>21</sup> En cuanto a la lactancia se sabe por estudios recientes que los w3 son indispensables, ya que finalizan los procesos de maduración de algunos órganos y por tanto es necesario incluir (ADH) en los alimentos para lactantes.<sup>42</sup> Aunque no existen estudios similares con el AA, los datos experimentales sugieren que los niveles bajos de AA, se asocian al crecimiento prenatal y postnatal lento en niños prematuros, por tanto, el AA debe considerarse un componente necesario durante las primeras etapas del desarrollo debido a que se encuentra en la leche humana junto con el ADH.<sup>42</sup>

## CONCLUSIONES

La dieta cumple un papel social muy importante y las diferentes formas de preparar los alimentos forman parte de la cultura propia de cada región y raza. Sin embargo, los trastornos nutricionales son comunes en todos los lugares del mundo y en cualquier periodo de la vida. Durante la gestación y la lactancia llega a ser tan dramático cualquier trastorno alimenticio, no sólo porque tiene consecuencias en la madre, sino porque repercute directamente en el establecimiento, desarrollo y maduración de órganos y sistemas durante la vida perinatal y postnatal del individuo, esta condición ambiental desfavorable durante este periodo del desarrollo, predisponen a enfermedades en la vida adulta principalmente vinculadas con el síndrome metabólico, resistencia a la insulina, metabolismo de glucosa y obesidad, hipertensión y daño vascular.<sup>43-45</sup> Hoy en día existe evidencia científica de cómo cada componente de la dieta afecta a diferentes sistemas en el organismo, es el caso de los ácidos grasos esenciales, en donde el inadecuado consumo de ellos conduce a la madre a padecer estrés, ansiedad y depresión postparto<sup>26,46-49</sup> y el producto que proviene de madres mal suplementadas durante este periodo llegan a padecer en los primeros días de vida extrauterina retinitis pigmentosa,<sup>50</sup> dermatitis atópica<sup>8,51</sup> y en la vida adulta, enfermedad de Alzheimer, Parkinson,<sup>52</sup> cáncer, diabetes<sup>8</sup> y problemas cardiovasculares,<sup>24</sup> desórdenes hiperactivos, esquizofrenia, entre otras.<sup>24</sup> Por tanto la cantidad y la calidad de los ácidos grasos esenciales que ingerimos a diario juegan un papel importante y determinante en cada etapa de nuestra vida, ya que con ello aseguramos obtener todo el espectro AGPIs-CL necesario en nuestro organismo, el niño es indefenso durante las etapas del desarrollo es por ello que la madre debe ser la fuente primaria de estos compuestos que permitirán a su hijo desarrollar la habilidad para aprender, para comunicarse, pensar analíticamente, socializarse efectivamente y adaptarse a nuevos ambientes y personas.

Una dieta que reúna todas las características adecuadas es fundamental para lograr un buen estado de salud.

## REFERENCIAS

1. Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, Gotsch F, Pineles BL, et al. Resistin: a hormone which induces insulin resistance is increased in normal pregnancy. *J Perinat Med* 2007; 35: 513-21.

2. Osol G, Mandala M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology (Bethesda)* 2009; 24: 58-71.
3. Guan J, Mao C, Feng X, Zhang H, Xu F, Geng C, Zhu L, et al. Fetal development of regulatory mechanisms for body fluid homeostasis. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 446-54.
4. Do Carmo S, Forest JC, Giguere Y, Masse A, Lafond J, Rassart E. Modulation of Apolipoprotein D levels in human pregnancy and association with gestational weight gain. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 92.
5. Cetin I, Antonazzo P. The role of the placenta in intrauterine growth restriction (IUGR). *Z Geburtshilfe Neonatol* 2009; 213: 84-8.
6. Kallen CB. Steroid hormone synthesis in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004; 31: 795-816.
7. Hay WW Jr. Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2006; 117: 321-39; discussion 39-40.
8. Rodriguez-Cruz M, Tovar AR, Palacios-Gonzalez B, Del Prado M, Torres N. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of Delta5 and Delta6 desaturases, SREBP-1, PPARalpha, and PGC-1. *J Lipid Res* 2006; 47: 553-60.
9. Campioni M, Toffolo GM, Basu R, Rizza RA, Cobelli C. Minimal Model Assessment of Hepatic Insulin Extraction during an Oral Test from Standard Insulin Kinetic Parameters. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;
10. Garcia-Guerra A, Neufeld LM, Hernandez-Cordero S, Rivera J, Martorell R, Ramakrishnan U. Prenatal multiple micronutrient supplementation impact on biochemical indicators during pregnancy and postpartum. *Salud Pública Méx* 2009; 51: 327-35.
11. Mangravite LM, Dawson K, Davis RR, Gregg JP, Krauss RM. Fatty acid desaturase regulation in adipose tissue by dietary composition is independent of weight loss and is correlated with the plasma triacylglycerol response. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 759-67.
12. Ramos MP, Crespo-Solans MD, Del Campo S, Cacho J, Herrera E. Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E318-28.
13. Magnusson-Olsson AL, Lager S, Jacobsson B, Jansson T, Powell TL. Effect of maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E24-E30.
14. Cetin I, Alvino G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta* 2009; 30(Suppl. A): S77-82.
15. Larque E, Krauss-Etschmann S, Campoy C, Hartl D, Linde J, Klingler M, Demmelmair H, Cano A, Gil A, Bondy B, Koletzko B. Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 853-61.
16. Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larque E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr* 2008; 27: 685-93.
17. Ozias MK, Carlson SE, Levant B. Maternal parity and diet (n-3) polyunsaturated fatty acid concentration influence accretion of brain phospholipid docosahexaenoic acid in developing rats. *J Nutr* 2007; 137: 125-9.
18. Levant B, Radel JD, Carlson SE. Reduced brain DHA content after a single reproductive cycle in female rats fed a diet deficient in N-3 polyunsaturated fatty acids. *Biol Psychiatry* 2006; 60: 987-90.
19. Torres N, Bautista CJ, Tovar AR, Ordaz G, Rodriguez-Cruz M, Ortiz V, Granados O, et al. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;
20. Zhou Y, Nijland M, Miller M, Ford S, Nathanielsz PW, Brenna JT. The influence of maternal early to mid-gestation nutrient restriction on long chain polyunsaturated fatty acids in fetal sheep. *Lipids* 2008; 43: 525-31.
21. McCann JC, Ames BN. Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 281-95.
22. Calderon F, Kim HY. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 2004; 90: 979-88.
23. Jensen CL. Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1452S-57S.
24. Ander BP, Dupasquier CM, Prociuk MA, Pierce GN. Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol* 2003; 8: 164-72.
25. Marszalek JR, Lodish HF. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 633-57.
26. Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development a review. *Placenta* 2002; 23(Suppl. A): S9-S19.
27. Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 2007; 77: 190-201.
28. Holub DJ, Holub BJ. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem* 2004; 263: 217-25.
29. Levant B, Ozias MK, Carlson SE. Diet (n-3) polyunsaturated fatty acid content and parity interact to alter maternal rat brain phospholipid fatty acid composition. *J Nutr* 2006; 136: 2236-42.
30. Denomme J, Stark KD, Holub BJ. Directly quantitated dietary (n-3) fatty acid intakes of pregnant Canadian women are lower than current dietary recommendations. *J Nutr* 2005; 135: 206-11.
31. Teraoka N, Kawashima H, Shiraishi-Tateishi A, Tanaka T, Nakamura J, Kakutani S, Kiso Y. Oral supplementation with dihomo-gamma-linolenic acid-enriched oil altered serum fatty acids in healthy men. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73: 1453-5.
32. Duttaroy AK. Fetal growth and development: roles of fatty acid transport proteins and nuclear transcription factors in human placenta. *Indian J Exp Biol* 2004; 42: 747-57.
33. Wakefield SL, Lane M, Schulz SJ, Hebart ML, Thompson JG, Mitchell M. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E425-E434.
34. Peng Y, Zhou T, Wang Q, Liu P, Zhang T, Zetterstrom R, Strandvik B. Fatty acid composition of diet, cord blood and breast milk in Chinese mothers with different dietary habits. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009; 81: 325-30.
35. Tappia PS, Nijjar MS, Mahay A, Aroutiounova N, Dhalla NS. Phospholipid profile of developing heart of rats exposed to low-protein diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R1400-R1406.
36. De Groot RH, Hornstra G, van Houwelingen AC, Roumen F. Effect of alpha-linolenic acid supplementation during pregnancy on maternal and neonatal polyunsaturated fatty acid status and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 251-60.
37. Cetin I, Koletzko B. Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 297-302.

38. Wahle KW, Rotondo D, Heys SD. Polyunsaturated fatty acids and gene expression in mammalian systems. *Proc Nutr Soc* 2003; 62: 349-60.
39. Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41: 41-78.
40. Greiner RS, Catalan JN, Moriguchi T, Salem N, Jr. Docosapentaenoic acid does not completely replace DHA in n-3 FA-deficient rats during early development. *Lipids* 2003; 38: 431-5.
41. Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 2003; 111: e39-44.
42. Makrides M, Gibson RA. Long-chain polyunsaturated fatty acid requirements during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 307S-11S.
43. Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Programming of appetite and type 2 diabetes. *Early Hum Dev* 2005; 81: 981-8.
44. Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, Martinez-Samayoa PM, Gonzalez-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, et al. 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: 221-30.
45. Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. 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: 358-63.
46. Llorente AM, Jensen CL, Voigt RG, Fraley JK, Berretta MC, Heird WC. Effect of maternal docosahexaenoic acid supplementation on postpartum depression and information processing. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 1348-53.
47. Otto SJ, de Groot RH, Hornstra G. Increased risk of postpartum depressive symptoms is associated with slower normalization after pregnancy of the functional docosahexaenoic acid status. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 237-43.
48. Freeman MP, Hibbeln JR, Wisner KL, Brumbach BH, Watchman M, Gelenberg AJ. Randomized dose-ranging pilot trial of omega-3 fatty acids for postpartum depression. *Acta Psychiatr Scand* 2006; 113: 31-5.
49. Mamalakis G, Kiriakakis M, Tsimbinos G, Kafatos A. Depression and adipose polyunsaturated fatty acids in an adolescent group. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 71: 289-94.
50. Hoffman DR, DeMar JC, Heird WC, Birch DG, Anderson RE. Impaired synthesis of DHA in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *J Lipid Res* 2001; 42: 1395-401.
51. Horrobin DF. Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 367S-72S.
52. Logan AC. Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional. *Lipids Health Dis* 2004; 3: 25.

*Reimpresos:*

**Claudia Janet Bautista Carbajal**

Departamento de Biología de la Reproducción.  
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
 Salvador Zubirán.  
 Vasco de Quiroga 15.  
 Col. Secc. XVI, Tlalpan,  
 14000, México, D.F.  
 Tel.: 5784-0900 Ext.: 2417. Fax: 5655-9859  
 Correo electrónico: bautistacarbjal@yahoo.com.mx

*Recibido: Falta Fecha*  
*Aceptado: Falta Fecha*

## **"Obesidad materna: Consecuencias sobre el metabolismo de la Progenie"**

\* Claudia J. Bautista

\* Paola Martínez Samayoa

\* Elena Zambrano

### **Antecedentes**

Los cambios en los patrones de alimentación y de actividad física han incrementado el desarrollo de obesidad a nivel mundial. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, OMS(1) la obesidad se encuentra entre las primeras diez causas de riesgo importante para la salud y en países en vías de desarrollo la obesidad ocupa el quinto lugar por prevalencia en donde la obesidad entre mujeres en edad reproductiva se encuentra entre el 20 y el 34%.

La obesidad materna también se ha convertido en un problema importante de salud pública cuya prevalencia va en aumento en todo el mundo. La OMS clasifica a la obesidad como una pandemia, que afecta más a mujeres que a hombres. La obesidad en mujeres en edad reproductiva disminuye la tasa de fertilidad y durante la gestación, implica un alto riesgo de presentar diversas patologías como defectos congénitos en la descendencia, mayor probabilidad de diabetes gestacional, hipertensión inducida por el embarazo (pre- eclampsia), mayor riesgo de aborto espontáneo en la segunda mitad del embarazo y se ha demostrado mayor mortalidad perinatal vinculada al exceso del peso materno.

Estudios epidemiológicos recientes han relacionado el aumento en el índice de masa corporal (IMC) previo al embarazo como un factor importante para el aumento de enfermedades metabólicas en la descendencia, lo cual se origina por el desarrollo de obesidad materna durante el embarazo. (2)

\* Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición,  
"Salvador Zubirán".

Departamento de Biología de la Reproducción,  
México, D.F.

Autor Responsable: Elena Zambrano

Correo electrónico: zamgon@servidor.unam.mx

Los bebés de madres con obesidad en general son más grandes, inclusive pueden ser macrosómicos, sobre todo cuando va acompañada de diabetes gestacional, y son más susceptibles a la obesidad en la adolescencia y en la edad adulta(3,4), por lo que en años más recientes, la preocupación se ha centrado en la obesidad materna, sin embargo existen pocos estudios epidemiológicos sobre este tema.

El desarrollo de obesidad infantil puede ser resultado, no sólo de las condiciones de sedentarismo, estilos de vida y alimentación, sino también de las condiciones nutricionales y metabólicas de la madre. Esto se debe a que el desarrollo de obesidad materna durante la gestación y la lactancia, es una condición de estrés que predispone al feto en crecimiento al desarrollo de enfermedades metabólicas desde la niñez y en mayor grado, en la vida adulta.

Dentro de los sectores de la población afectados por el desarrollo de obesidad en México, se encuentran las mujeres en edad joven y reproductiva, cuya prevalencia ha aumentado de 9 a 32 %, de 1988 al 2006, y el sector infantil, en donde la prevalencia de obesidad en niños en edad escolar ha incrementado de 11 a 18 %, de 1999 al 2006, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Nutrición. (5)

La prevención es la mejor manera de evitar este problema y debido a que el embarazo es la peor etapa para perder peso, las mujeres con IMC alto deben disminuir su peso antes de la concepción. (4)

### **Orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad**

Investigaciones científicas tanto en humanos como en animales de experimentación, han demostrado que la salud está íntimamente relacionada con la calidad de vida en las primeras etapas del crecimiento. El ambiente perinatal subóptimo puede programar la predisposición para el desarrollo de enfermedades crónicas, incluyendo la alteración del metabolismo de hidratos de carbono (6-10).

Los hallazgos realizados en 1986 por el Dr. David Barker de la Universidad de Southampton, Inglaterra, en donde encuentra una correlación entre el bajo peso al nacimiento y el riesgo a enfermedades coronarias en la vida adulta (11), fueron el inicio de varios estudios epidemiológicos encaminados a identificar la relación que existe entre la talla y peso del neonato con la hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, obesidad, dislipidemias e intolerancia a la glucosa (12-14).

La hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD, por sus siglas en inglés), antes conocida como "programación del desarrollo", propone que la fisiología y metabolismo fetal y neonatal pueden ser alterados por cambios durante una ventana de tiempo crítica del desarrollo, como la gestación y la lactancia. Estas alteraciones generan una respuesta fisiológica permanente en el feto que se asocia con el desarrollo de enfermedades en el adulto (15-17). El feto metabólicamente programado presenta modificaciones permanentes en la estructura y fisiología de órganos, así como en la expresión de genes involucrados en su propio metabolismo (18).

Por lo que el fenotipo del adulto es la suma de los factores genéticos, así como de la influencia del ambiente fetal y postnatal.

La obesidad materna incrementa el riesgo de complicaciones obstétricas (diabetes gestacional y pre-eclampsia) y origina alteraciones en el desarrollo fetal así como complicaciones en el parto y muerte neonatal. Estudios epidemiológicos con humanos así como en estudios de investigación con animales de experimentación han demostrado una clara asociación entre la obesidad materna durante el embarazo y la programación negativa durante el desarrollo del metabolismo, función cardiaca (2, 19-21) y endócrina de la cría (22,23).

#### **Estudios epidemiológicos:**

La mayoría de los seres humanos en los países desarrollados experimentan un entorno en el que la escasez de alimentos es rara y el consumo de productos de alto contenido energético está disponible, esto ha generado el incremento de obesidad materna y sobrealimentación.

Actualmente, más de un tercio de las mujeres embarazadas de los Estados Unidos de América son obesas(24), esto porque la mayoría de ellas consume una cantidad excesiva de carbohidratos y grasas(25). Hoy en día los estudios epidemiológicos muestran que la obesidad materna aumenta la incidencia de la obesidad y el síndrome metabólico en niños(26). El efecto de la obesidad materna en la susceptibilidad a desarrollar obesidad en sus hijos, parece ser independiente de la diabetes gestacional, así como mujeres obesas con concentraciones normales de glucosa en sangre tienen bebés con mayor adiposidad o porcentaje de tejido adiposo (27).

En un estudio longitudinal en donde 179 niños fueron expuestos a obesidad materna, se observó que éstos presentaron mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico. La obesidad materna, aun sin el desarrollo de diabetes gestacional, genera cambios metabólicos que afectan la salud de la descendencia (28).

Un punto importante a mencionar es que actualmente en México no se ha estudiado la relación entre el sobrepeso y la obesidad materna con la obesidad del niño en edad escolar (29).

#### **Estudios con animales de experimentación**

Estudios con animales de experimentación han utilizado diferentes modelos para evaluar el efecto de la programación del desarrollo en el metabolismo. Algunos de estos modelos son la restricción nutricional en la dieta de la madre gestante y durante la lactancia, o la diabetes gestacional. Varios modelos animales se utilizan para estudiar los efectos del exceso de nutrición durante la gestación y el periodo postnatal temprano en las crías en desarrollo, es el caso del modelo de madres alimentadas con dietas ricas en grasa (HFD por sus siglas en inglés high fat diet - fed mothers) durante la gestación y la lactancia, para desarrollar obesidad materna (actualmente es el modelo más utilizado). En la rata, las crías provenientes de estas madres, son más pesadas, más gordas, desarrollan hiperglucemia y tienen mayor contenido de lípidos hepáticos al destete, comparadas con las crías de madres control(30).

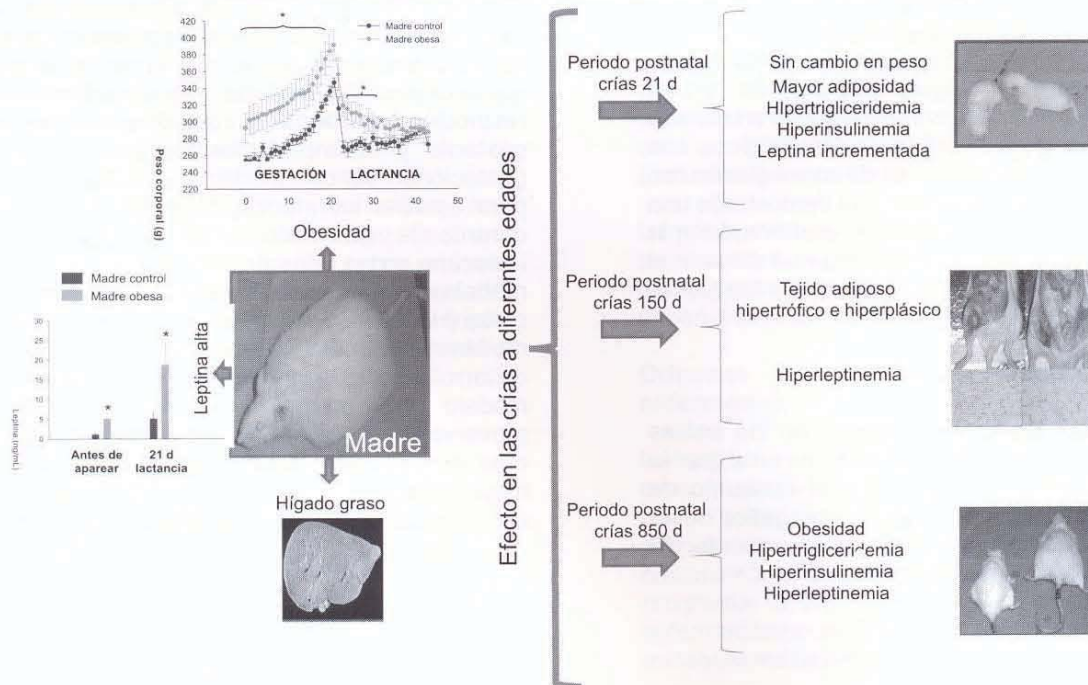
En ratones con el modelo de exceso de nutrición materna crónica, se observó, que la progenie era hiperfágica y que ello reducía la locomoción, por tanto, las crías de estos ratones aumentaban la adiposidad, presentando desarrollo celular de adipocitos de 6 meses, cuando estos ratones tenían 3 meses de edad(23). Otro grupo de investigación demostró, que la descendencia de ratas madres alimentadas durante la gestación y la lactancia con dietas altamente procesadas, ricas en grasas y carbohidratos (las cuales son muy agradables al paladar de estos animales) tenían mayor ganancia de peso y preferencia al consumo de productos grasosos, azucarados y salados cuando eran adultas (31).

En la mayoría de los estudios donde se analiza a la progenie que proviene de madres-HFD con sobrepeso, reportan que la camada tenía menor peso, esto potencialmente debido al periodo en el que se expuso a la rata madre a desarrollar obesidad (32). Las diferencias en la duración del consumo HFD (es decir, crónica o sólo durante la gestación y la lactancia) y la composición de ácidos grasos de las dietas son importantes para explicar las diferencias en el fenotipo de la descendencia (32).

Nuestro grupo de investigación, utilizando ratas madres obesas con dietas hiperlipídicas, ha comprobado el incremento de peso y adiposidad, concentraciones séricas de leptina así como hígado graso en las madres. Mientras que en la progenie, tanto hembras como machos, no existe diferencia de peso al nacimiento ni al destete (día 21 postnatal), pero si desde edades tempranas, y acentuándose con la edad hasta los 800 días, incremento del peso, tejido adiposo con características hipertróficas, hiperleptinemia y trigliceridemia (datos en prensa, J. Physiol). Figura 1.

**Figura 1. Efecto de la obesidad materna por la ingesta de dieta alta en grasa antes y durante la gestación y la lactancia sobre las crías ? y ? alimentadas con dieta control.**

(\* p<0.05 madre obesa vs madre control; C = cría de madre control, O = cría de madre obesa)



Para las investigaciones de obesidad materna y sus efectos en las crías también se utiliza el modelo de roedores genéticamente predispuestos a la obesidad, como ejemplo el ratón obeso agouti (33), en el que la descendencia fue más pesada al nacimiento que la resultante de cruces de ratones normales. Curiosamente, ninguna diferencia fue encontrada en el peso cuando eran adultos. El receptor de leptina heterocigoto deficiente en ratones ( $lepr^{db/+}$ ) se utiliza para explicar la obesidad materna, ya que durante el embarazo aumenta el peso materno debido al exceso de alimentación(34). En este modelo, fruto de  $lep^{db/+}$  las hembras son más pesadas que los controles, independientemente del genotipo. Sin embargo, este modelo se complica por el hecho de que las madres también presentan diabetes gestacional espontánea. Levin y sus colegas (35 y 36), examinaron la interacción entre la genética y las madres sobrealimentadas en sub- cepas de ratas Sprague-Dawley que fueron resistentes o sensibles a la obesidad inducida por la dieta. Las ratas sensibles que consumieron dieta alta en energía antes y durante el embarazo y la lactancia tuvieron descendencia con mayor adiposidad, hiperglucemia, aumento de peso y altos niveles de leptina como resultado de una madre sensible expuesta a una dieta alta en energía en comparación con los hijos de madres sensibles con la dieta control. Por el contrario, madres resistentes con la dieta alta en energía no mostraron ningún efecto en la ganancia de peso en sus crías, lo cual indicaba que las madres obesas tienen crías con mayor susceptibilidad de obesidad y predisposición genética inducida por la dieta(35).

La sobre alimentación postnatal en roedores es comúnmente estudiada, en este modelo animal donde se ajusta el número de crías por camada, las crías crecen más en camadas pequeñas ya que reciben mayor alimento por parte de la madre y crías que provienen de camadas grandes crecen menos pues ellas reciben menos alimento por parte de la madre.

Este paradigma ha llevado a una serie de conclusiones interesantes: sobre la sobrealimentación durante la lactancia la cual se sabe que tiene efectos a largo plazo, en especial en la regulación del balance de energía, como ejemplo las ratas adultas provenientes de camadas pequeñas aumentan de peso gradualmente desarrollando así en la vida adulta obesidad (37), resistencia a la leptina (38) y anomalías en la sensibilidad de las neuronas del hipotálamo de diversas señales de neuropéptidos y nutrientes (39).

Por otro lado, se ha demostrado que la descendencia de madres sobrealimentadas es hipersensible a las dietas altas en grasa en la edad adulta, al tener mayor ganancia de peso acelerada y trastornos metabólicos en comparación con crías provenientes de madres control, que son sometidas a este tipo de dieta en la edad adulta, al parecer presentan en parte, defectos a largo plazo en la sensibilidad a la leptina a nivel hipotalámico (40).

Las consecuencias de la obesidad materna y el consumo de HFD sobre la regulación del balance de energía en las crías ha sido estudiada en modelos de primates no humanos por el grupo de Grove y colegas, sorprendentemente los resultados en fetos de macacos japoneses alimentados con HFD mostraron que había fetos obesos con resistencia a la insulina o fetos delgados con sensibilidad a la insulina normal, lo cual evidencia señales severas de lipotoxicidad. Las crías jóvenes de este modelo animal (de 6 meses de edad) que provienen de madres HFD son más pesadas y con mayor adiposidad, también presentan altos niveles de leptina y signos de enfermedad de hígado graso(41). Esto sugiere que tanto el modelo en primates, como en roedores, demuestran que la sobrealimentación materna predispone a la progenie de forma temprana a la obesidad y trastornos metabólicos.

Los efectos de la sobrealimentación postnatal temprana se han estudiado también en hembras jóvenes adultas de la especie babuina que fueron sobrealimentadas, lo que generó bebés más pesados y con mayor adiposidad en comparación con hembras del grupo control(42). Sorprendentemente, sobrealimentación antes del destete aumenta la adiposidad en babuinos machos, pero no afecta el peso corporal (42).

Aunque la programación de la fisiología de la cría por la obesidad materna y el efecto del consumo de dietas hipercalóricas puede ser revertida con la intervención nutricional materna previa a la concepción, este tema continúa siendo una pregunta de importancia clínica y fisiológica. Los modelos con roedores para la programación metabólica del desarrollo de la cría por la obesidad materna y el excedente de nutrición materna han sido extensamente investigados, pero todavía no existen investigaciones enfocadas a la prevención en el tema.



En un estudio reciente de nuestro grupo se demostró que la intervención nutricional un mes previo a la gestación de ratas con obesidad, puede revertir parcial o totalmente algunos de los efectos adversos de la programación del desarrollo generados por la obesidad materna en las crías macho (datos en prensa. *J Physiol*). Algunos de los parámetros de las crías macho que pudieron revertirse por la intervención nutricional de las madres con obesidad previa a la gestación, fueron la resistencia a la insulina, concentraciones séricas de leptina e insulina, así como la cantidad y tamaño de células del tejido adiposo visceral, a la edad adulta joven,

### Conclusión

El incremento de obesidad de mujeres en edad reproductiva y las complicaciones que implica a corto y a largo plazo tanto en la madre como en el hijo, es motivo para desarrollar a la brevedad posible estudios sobre la intervención preventiva que mejoren la calidad de vida de ambos. Sin lugar a dudas, la intervención con mayor probabilidad de éxito sería el cambio nutricional y de estilo de vida que previene el desarrollo de la obesidad en la mujer antes de los años reproductivos (43). La intervención en el embarazo, así como la mayoría de las áreas de la salud, necesitan bases firmes y evidencias científicas reproducibles. Las evidencias que ayudarían a persuadir a las mujeres obesas de reducir su IMC ya sea antes o durante el embarazo, serían dos: primero que la obesidad materna es dañina para la madre y la progenie en muchos sentidos y segundo, que la disminución apropiada del IMC y de ingesta de alimentos puede proporcionar beneficios significativos para ellas y sus hijos.

Sin embargo, no toda la responsabilidad debe recaer en la mujer en edad reproductiva. Las decisiones y estilo de vida que se tengan en el presente afectarán la calidad de vida de nuestros hijos y nietos. La problemática nos incumbe a toda la sociedad, autoridades, el sector salud, costumbres familiares y culturales. Cuando una mujer está embarazada, la sociedad que la rodea está embarazada, tomemos consciencia y luchemos por la salud de nuestros niños.

### Referencias:

- 1.- World, H.O., Global Database on Body Mass Index: an interactive surveillance tool for monitoring nutrition transition. <http://apps.who.int/bmi/index.jsp>, 2006.
- 2.- Catalano, P.M., et al., Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care*, 2009. 32(6): p. 1076-80.
- 3.- Atalah, E. and R. Castro, [Maternal obesity and reproductive risk]. *Rev Med Chil*, 2004. 132(8): p. 923-30.
- 4.- Satpathy, H.K., et al., Maternal obesity and pregnancy. *Postgrad Med*, 2008. 120(3): p. E01-9.
- 5.- Rivera-Domarco, J., Encuesta Nacional de Nutrición. 1999-2006. México, 2001.
- 6.- Dahri, S., et al., Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes*, 1991. 40 Suppl 2: p. 115-20.
- 7.- Kind, K.L., et al., Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 284(1): p. R140-52.
- 8.- Petry, C.J. and C.N. Hales, Long-term effects on offspring of intrauterine exposure to deficits in nutrition. *Hum Reprod Update*, 2000. 6(6): p. 578-86.
- 9.- Ravelli, A.C., et al., Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr*, 1999. 70(5): p. 811-6.
- 10.- Roseboom, T.J., The fetal origins hypothesis. *Twin Res*, 2001. 4(5): p. iii.
- 11.- Barker, D.J. and C. Osmond, Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, 1986. 1(8489): p. 1077-81.
- 12.- Barker, D.J., In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*, 1998. 95(2): p. 115-28.
- 13.- Barker, D.J. and C.H. Fall, Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child*, 1993. 68(6): p. 797-9.
- 14.- Barker, D.J., et al., Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, 1993. 341(8850): p. 938-41.
- 15.- 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.
- 16.- Zambrano, E., et al., 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.

- 17.- Zambrano, E., et al., Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol*, 2005. 566(Pt 1): p. 225-36.
- 18.- Desai, M., et al., Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans*, 1995. 23(2): p. 331-5.
- 19.- Armitage, J.A., et al., Maternal dietary supplementation with saturated, but not monounsaturated or polyunsaturated fatty acids, leads to tissue-specific inhibition of offspring Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J Physiol*, 2008. 586(Pt 20): p. 5013-22.
- 20.- Armitage, J.A., L. Poston, and P.D. Taylor, Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. *Front Horm Res*, 2008. 36: p. 73-84.
- 21.- Nathanielsz, P.W., Animal models that elucidate basic principles of the developmental origins of adult diseases. *ILAR J*, 2006. 47(1): p. 73-82.
- 22.- Kirk, S.L., et al., Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*, 2009. 4(6): p. e5870.
- 23.- Samuelsson, A.M., et al., Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, 2008. 51(2): p. 383-92.
- 24.- King, J.C., Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr*, 2006. 26: p. 271-91.
- 25.- Alberti-Fidanza, A., J. Parizkova, and D. Fruttini, Relationship between mothers' and newborns' nutritional and blood lipid variables. *Eur J Clin Nutr*, 1995. 49(4): p. 289-98.
- 26.- Oken, E. and M.W. Gillman, Fetal origins of obesity. *Obes Res*, 2003. 11(4): p. 496-506.
- 27.- Sewell, M.F., et al., Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. 195(4): p. 1100-3.
- 28.- Low, S., M.C. Chin, and M. Deurenberg-Yap, Review on epidemic of obesity. *Ann Acad Med Singapore*, 2009. 38(1): p. 57-9.
- 29.- Flores M, C.C., Barquera S., Sobrepeso materno y obesidad en escolares mexicanos. *Salud Pública de México*, 2005. 47(6): p. 34.
- 30.- Guo, F. and K.L. Jen, High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav*, 1995. 57(4): p. 681-6.
- 31.- Bayol, S.A., S.J. Farrington, and N.C. Stickland, A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr*, 2007. 98(4): p. 843-51.
- 32.- Ferezou-Viala, J., et al., Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. 293(3): p. R1056-62.
- 33.- Han, J., et al., Long-term effect of maternal obesity on pancreatic beta cells of offspring: reduced beta cell adaptation to high glucose and high-fat diet challenges in adult female mouse offspring. *Diabetologia*, 2005. 48(9): p. 1810-8.
- 34.- Yamashita, H., et al., Effect of spontaneous gestational diabetes on fetal and postnatal hepatic insulin resistance in Lepr(db/+) mice. *Pediatr Res*, 2003. 53(3): p. 411-8.
- 35.- Levin, B.E. and E. Govek, Gestational obesity accentuates obesity in obesity-prone progeny. *Am J Physiol*, 1998. 275(4 Pt 2): p. R1374-9.
- 36.- Levin, B.E., Metabolic imprinting on genetically predisposed neural circuits perpetuates obesity. *Nutrition*, 2000. 16(10): p. 909-15.
37. Levin, B.E., Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006. 361(1471): p. 1107-21.
- 38.- Schmidt, I., et al., Interaction of genetic and environmental programming of the leptin system and of obesity disposition. *Physiol Genomics*, 2000. 3(2): p. 113-20.
- 39.- Bouret, S.G., Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009. 48 Suppl 1: p. S31-8.
- 40.- Rodrigues, A.L., et al., Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol*, 2009. 587(Pt 11): p. 2647-61.
- 41.- McCurdy, C.E., et al., Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest*, 2009. 119(2): p. 323-35.
- 42.- Lewis, D.S., et al., Prewaning food intake influences the adiposity of young adult baboons. *J Clin Invest*, 1986. 78(4): p. 899-905.
- 43.- Nelson, S.M., P. Matthews, and L. Poston, Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome. *Hum Reprod Update*, 2009.

## "Regulación del Apetito por las Hormonas Esteroides"

<sup>1,2</sup> C.J. Bautista  
<sup>1,2</sup> L.A. Reyes Castro  
<sup>1</sup> E. Zambrano

### RESUMEN

El apetito es el deseo de satisfacer la necesidad de consumir alimentos, el cual está regulado por el equilibrio entre la ingesta y el gasto energético a través de señales existentes en el cerebro, el tracto digestivo y el tejido adiposo. Los hombres y las mujeres tienen variaciones en la conducta alimentaria y la forma en que se almacena la grasa corporal. El balance de energía y la distribución de la grasa del cuerpo son parte del dimorfismo sexual en muchas especies de mamíferos incluyendo el ser humano. Estas diferencias sexuales podrían estar relacionadas con el perfil de las hormonas sexuales esteroideas diferentes en cada sexo. Las hormonas esteroideas gonadales juegan un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos y la homeostasis energética. Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado que el estradiol tiene un papel clave en el control del consumo de alimentos y el balance energético, así como en la inhibición del apetito. En las mujeres existen cambios importantes en los patrones de consumo de alimentos durante el ciclo menstrual, presentando disminución en su ingesta durante el periodo de ovulación, cuando las concentraciones de estradiol alcanzan los niveles más altos. En los hombres existe menos grasa total y la distribución de ésta es regularmente en la parte central (abdominal), lo cual conlleva a mayor riesgo de desarrollar desórdenes metabólicos.

<sup>1</sup> Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14000, México.

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, México D.F.

Autor Responsable: Elena Zambrano.

Afiliación: Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Dirección: Vasco de Quiroga #15, Sección XVI, Tlalpan 14000, México D.F., México.

Teléfono: (52) 55-5487-0900 ext 2417

Fax: (52)55-5655-9859

Email: [zamgon@servidor.unam.mx](mailto:zamgon@servidor.unam.mx)

En el caso de las mujeres, se ha visto que tienen más grasa total, pero su distribución es subcutánea principalmente en la región glúteo/femoral, con menor predisposición a problemas metabólicos. En el caso de las mujeres post menopáusicas se ha reportado que tienden a acumular más grasa en la parte intra-abdominal. Es por ello que el objeto de esta revisión es presentar los mecanismos por los cuales los esteroideas sexuales afectan la conducta alimenticia y distribución de la grasa corporal.

**Palabras Clave:** Hormonas esteroideas gonadales, apetito, ingesta de alimento, estradiol, leptina e insulina.

### Regulación del apetito por las hormonas sexuales.

El apetito se define como el deseo de satisfacer la sensación de consumir alimentos (hambre). El apetito se activa debido a que el individuo no sólo debe cubrir la necesidad de satisfacer el hambre, sino también otra función fisiológica como la termorregulación, la cual mantiene el flujo continuo de energía que está siendo utilizada por las células de nuestro cuerpo<sup>1</sup>. La sensación de apetito, el cual existe en todas las formas de vida, permite regular la ingesta de energía para mantener las necesidades metabólicas. Esta sensación está estrictamente regulada por un complejo sistema fisiológico que equilibra el consumo de alimentos y el gasto energético a través de una estrecha comunicación de las señales aferentes y eferentes entre el cerebro, el tracto digestivo y el tejido adiposo. Cuando se ingiere alimento se inicia el proceso de digestión lo que emite la sensación de saciedad. Circuitos en el cerebro central integran las señales de saciedad para mantener el flujo de energía continuo durante el cambio en el estado nutricional.<sup>(2,3)</sup>

El peso corporal se mantiene estable cuando la ingesta de alimentos y el gasto de energía están en equilibrio.

Fecha de recepción: 3 de septiembre de 2011

Fecha de aceptación: 31 de octubre de 2011

El hipotálamo integra las señales de las vías centrales y periféricas, lo cual nos demuestra el papel importante que tiene en la regulación del apetito<sup>4</sup>, la homeostasis energética está controlada por el tejido adiposo, el páncreas y el tracto gastrointestinal<sup>2</sup>, los cuales tienen regulación y comunicación directa con los circuitos centrales en el hipotálamo y el tronco cerebral, para producir efectos negativos o positivos sobre el balance energético. El núcleo arqueado (ARC) del hipotálamo integra las señales mediante la alteración de la actividad relativa de las neuronas que expresan el neuropéptido Y (NPY), relacionados con la proteína Agouti (AgRP), la melanocortina (MSH) y el péptido regulador de la transcripción de la anfetamina y la cocaína (CART). Estos neuropéptidos activan a los núcleos intermedios y modulan la liberación de péptidos anorexigénicos y orexigénicos que ajustan el gasto y el consumo de energía, para mantener el peso corporal estable<sup>5</sup>. Si bien estas señales dependen de los circuitos en el hipotálamo, el tronco cerebral y el sistema límbico para modular la liberación de neuropéptidos relacionados con la ingesta de alimento y el gasto de energía<sup>5,6</sup> a nivel periférico la regulación se ve apoyada por señales que se producen en el tejido adiposo (leptina y adiponectina), en el páncreas [insulina y polipéptido pancreático (PP) y glucagón] y en el tracto gastrointestinal [colecistoquinina (CCK), péptido YY, el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), oxintomodulina (OXM) y la grelina]. La función primordial de todas estas señales generadas a nivel periférico es atravesar la barrera hemato-encefálica para poder entregar la información a nivel del hipotálamo y el tallo cerebral. **Fig. (1)**

Por otro lado, las hormonas esteroides gonadales, como los andrógenos, los estrógenos y los progestágenos, son altamente conocidos por su participación directa en la regulación e intervención en el desarrollo sexual y la función reproductiva<sup>7,8</sup>.

Estas hormonas sexuales regulan el eje hipotálamo-hipófisis-gónada por retroalimentación positiva o bien negativa, esto lo hacen por medio de los receptores a nivel de hipotálamo e hipófisis. Sin embargo, también se ha reconocido el papel que juegan en otras acciones biológicas que no son relacionadas necesariamente con tejidos reproductivos o funciones reproductivas<sup>9</sup>. La obesidad, se describe como una epidemia, que cada vez es mayor en los países desarrollados y en vías de desarrollo.

Esta epidemia ha provocado problemas metabólicos adversos que ponen en riesgo la vida del humano y se sabe que tiene importantes diferencias entre género, para establecer la prevalencia de estas enfermedades metabólicas. Dichas diferencias sexuales, pueden estar relacionadas con el perfil de las hormonas sexuales, las cuales son diferentes en hombre y mujeres. Las hormonas sexuales actúan en diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC) y he aquí donde se cree que existe la comunicación, participación y regulación de éstas en la ingesta de alimento y el gasto de energía. La expresión de receptores de las hormonas sexuales esteroides (estrógenos y andrógenos), se han encontrado en las regiones de ciertas neuronas, las cuales son complejos reguladores del apetito<sup>10</sup>.

Las hormonas esteroides sexuales tienen diversas acciones que afectan el peso corporal y la adiposidad, esto independiente de la alimentación, incluso de los efectos sobre el gasto energético, la función gastrointestinal, el metabolismo y la composición corporal. Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado que el estradiol tiene un papel clave en el control de la ingesta de alimento y el balance energético. Ya que en mujeres postmenopáusicas, se observó, que los niveles de estradiol son más bajos en comparación con las mujeres que tienen sus ciclos regulares, este cambio en las mujeres postmenopáusicas probablemente influya en los cambios en el peso corporal y acumulación de grasa<sup>11</sup>. En el caso de ratas hembras ovariectomizadas, se incrementó la ingesta de alimento y el peso corporal.

Actualmente se sabe, que los estrógenos regulan a nivel periférico la ingesta de alimento, ya que esta hormona tiene relación directa con las hormonas metabólicas como la adiponectina, leptina e insulina, las cuales se expresan en el tejido adiposo y páncreas, pero no sólo eso, también los estrógenos a nivel central controlan la ingesta de alimento y el peso corporal, actuando directamente en el hipotálamo<sup>12</sup>. **Fig. (2).**

### **Señales periféricas hormonales debido a la ingesta de alimento.**

#### **Leptina**

La leptina es una hormona de 16 kDa con 167 aminoácidos, es secretada por una variedad de tejidos, principalmente el tejido adiposo a través de los adipocitos, el cual se convierte en el órgano de mayor producción<sup>13</sup>,

la leptina regula la ingesta de alimento y el gasto de energía, pero también se ha asociado con funciones relacionadas al crecimiento y desarrollo<sup>13,14</sup>. Una de sus principales acciones es actuar sobre el núcleo arqueado del hipotálamo, para inhibir la ingesta de alimento por la secreción de neuropéptidos estimulantes anorexigénicos, como pro-opiomelanocortina (POMC) y CART. Esta regulación, logra inhibir la unidad del apetito a través de la interacción con sus receptores de leptina (Ob-R), los cuales son miembros de la familia de receptores de citocinas, que tiene un único dominio trans-membranal<sup>15</sup>, estos presentan múltiples isoformas resultado del empalme alternativo del RNAm y procesamiento post-transduccional<sup>16</sup>. Hay tres clases de Ob-R: larga, corta y soluble.

Durante el desarrollo, la leptina juega un papel importante en la organización de las interconexiones entre los diversos núcleos hipotalámicos implicados en el apetito. Varios estudios realizados en roedores, han demostrado aumento en la concentración de la leptina durante los días 10 al 14 de lactancia<sup>17-19</sup>. Lo cual se ha relacionado con la maduración de los procesos nerviosos centrales que regulan el apetito en la vida posterior. La leptina también parece desempeñar en la programación del desarrollo, ciertas funciones importantes implicadas con los mecanismos estructurales y funcionales de los centros hipotalámicos, orexigénicos y anorexigénicos durante el periodo postnatal temprano. La programación del desarrollo es el resultado de determinados cambios que ocurren durante ventanas críticas de crecimiento. Por tanto, alteraciones sobre algún eje o centro de regulación, quedará alterado y con efectos persistentes durante la vida. Varios estudios indican que el tiempo y el establecimiento adecuado de la leptina durante el desarrollo postnatal en los roedores es fundamental, ya que algún daño en ella, predispondrá a presentar obesidad en la edad adulta<sup>19,20</sup>.

Las concentraciones circulantes de leptina se correlacionan positivamente con la cantidad de grasa almacenada<sup>21</sup>. Sin embargo, las concentraciones séricas de leptina en recién nacidos son más altas que en los adultos<sup>22,23</sup> a pesar de tener menor proporción de grasa en el cuerpo, inmediatamente después del nacimiento<sup>23</sup>. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran que la concentración de leptina en el suero de las crías no inhibe el apetito (consumo de leche) durante el periodo neonatal, mostrando que el tejido adiposo de la cría no es la única fuente de leptina<sup>19</sup>.

La leptino-resistencia conlleva a la obesidad. Sin embargo, la leptino-deficiencia contribuye también al aumento de la grasa corporal y peso. La leptina tiene mayores efectos negativos durante el hambre que en el periodo de abundancia, ya que en el ayuno esta se encuentra en niveles bajos, lo cual induce hiperfagia, tendiendo a almacenar grasas y disminuyendo el gasto de energía, mientras que en la obesidad los niveles altos no regulan o favorecen la pérdida de peso<sup>5</sup>.

Hay una compleja interacción entre los esteroides sexuales y la acción de la leptina sobre el peso corporal. Esto se ha establecido debido a que niveles bajos de esteroides sexuales femeninos, aumentan significativamente el peso corporal y la ingesta de alimentos<sup>24,25</sup>.

Diferentes estudios demuestran, que las hormonas sexuales esteroides regulan directamente o indirectamente la producción y secreción de leptina. Esto lo comprobaron en ratas ovariectomizadas, a las que se les administraron estrógenos y observaron que tenían menor ingesta de alimento y peso corporal, lo cual les permitió concluir, que esto era probablemente debido a la regulación positiva de los estrógenos sobre la expresión del gen de la leptina<sup>25</sup>.

Varias hormonas esteroides regulan la formación del RNAm y la expresión de proteínas de la leptina. Esto ha sido comprobado en experimentos in vivo e in vitro, donde la influencia de estrógenos y andrógenos afectan directamente la cantidad de RNAm expresado y la leptina secretada en el tejido adiposo de la rata<sup>26</sup>.

Los andrógenos tienen un efecto negativo y los estrógenos un efecto positivo sobre la expresión de la leptina. Estos mecanismos de regulación están directamente mediados por los receptores nucleares androgénicos y estrogénicos que tiene el adipocito y que permite regular la transcripción del gen de la leptina<sup>26</sup>.

## INSULINA

La insulina es una hormona metabólica producida en el páncreas, es la primera en ser descrita como generadora de señales reguladoras de la adiposidad<sup>27</sup>. La insulina entra en el cerebro a través de un receptor mediado por saturación, estos se absorben en la barrera hematoencefálica en niveles proporcionales a la concentración de insulina

circulante<sup>28</sup>, generando una señal anorexigénica, que induce la baja de ingesta de alimento y peso corporal. La insulina correlaciona positivamente con el balance de energía a largo plazo. La secreción de insulina aumenta inmediatamente después de comer<sup>29</sup> y sus concentraciones en la sangre dependen del total de depósitos de grasa corporal y la distribución de la grasa visceral, la cual puede ser un factor determinante para desarrollar obesidad<sup>30</sup>.

La señalización de la insulina implica una cascada de eventos iniciados por la unión de ésta a su receptor, el cual se compone de una subunidad  $\alpha$  extracelular que se une a la insulina, (permite la auto fosforilación del receptor) y una subunidad  $\beta$  intracelular (traduce la señal), la cual tiene actividad de tirosina quinasa que permite la fosforilación del receptor de la insulina (IRS)<sup>31,32</sup>. Hasta el momento se han identificado dos tipos de receptores el IRS-1 y el IRS-2 en las neuronas<sup>33,34</sup>. El receptor de la insulina tiene dos variantes de empalme lo cual explica los subtipos, el subtipo A, tiene mayor afinidad por la insulina y la expresión más extendida, el subtipo B presenta menor afinidad y menor expresión de la insulina en los tejidos clásicos sensibles, tales como grasa, músculo e hígado<sup>33,34</sup>. Los receptores de la insulina están ampliamente distribuidos en el cerebro, sobre todo en los núcleos hipotalámicos implicados en la ingesta de alimento<sup>35,36</sup> con mayor concentración en el bulbo olfatorio, el hipocampo, la corteza cerebral y el ARC<sup>37</sup>.

La insulina es una hormona anabólica, permite disponer a las células del aporte necesario de glucosa para los procesos de síntesis con gasto de energía. Su función es la de favorecer la incorporación de glucosa de la sangre hacia las células. La insulina es secretada por las células  $\beta$  del páncreas cuando el nivel de glucosa en sangre es alto y por tanto, disminuye la concentración de la misma mediante su captación y transporte al músculo y adipocito, con la finalidad de prevenir la formación de glucosa por el hígado. Se ha demostrado, que los receptores de estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) están principalmente en las neuronas del hipotálamo, hígado, tejido adiposo, músculo y páncreas, su presencia en estos tejidos ha sido relacionada con la regulación del balance de energía, la acumulación de grasa y el metabolismo de la glucosa.

Sin embargo, se ha observado que el ER $\alpha$  tiene mayor implicación sobre estos tejidos que el ER $\beta$  y que tanto el ER $\alpha$  como el ER $\beta$  están involucrados en la regulación de las funciones  $\beta$  pancreáticas de la célula y las neuronas del hipotálamo<sup>38</sup>. Así lo describieron los experimentos realizados en ratones Knock-out en el receptor<sup>39</sup> y la aromatasas<sup>40</sup>, donde se mostró obesidad y resistencia a la insulina debido a la nula acción de los estrógenos<sup>41</sup>.

La predisposición a desarrollar problemas de tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina están presente en ratas ovariectomizadas<sup>42</sup> y en mujeres menopáusicas<sup>43</sup>, ambas con bajos niveles de estrógenos. Esta predisposición se ha visto que se disminuye, cuando ambos modelos son reemplazados con estrógenos<sup>44</sup>. Por otro lado, se ha informado de que la función deficiente de estrógenos en hombres por la ausencia de ER $\alpha$  o la aromatasas, resulta en problemas de salud de tipo metabólico<sup>45</sup>.

Cambios en los niveles de estrógenos en la sangre ocurren durante la gestación, así como durante el ciclo menstrual en el humano o en el ciclo estral en roedores. En esta situación fisiológica, se ha visto que el estradiol está involucrado en mantener los niveles normales de insulina y beneficiar la función de las células  $\beta$  del páncreas. Sin embargo, las concentraciones niveles de estradiol por encima o debajo de los rangos fisiológicos pueden provocar resistencia a la insulina y diabetes tipo II<sup>46</sup>.

#### **Regulación de la Ingesta de alimento en el ciclo ovárico de diferentes especies**

En hembras de diferentes especies, la alimentación está asociada con la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En general, en el ciclo ovulatorio, está demostrado, que en hembras de diferentes especies como, humanos<sup>47</sup>, primates rhesus<sup>48</sup>, ovejas<sup>49</sup>, ratas<sup>50,51</sup> y cuyos<sup>48</sup>, presentan una reducción en la ingesta de alimento cuando éstas se encuentran cercanas o alrededor del periodo ovulatorio, justo cuando las concentraciones de estradiol están en los niveles más altos.

Hay variaciones en la alimentación durante las diferentes fases de los ciclos menstruales en las mujeres. La ingesta de alimento en éstas durante el periodo peri-ovulatorio disminuye, el cual se identifica con los cuatro días donde aparece la hormona luteinizante (LH)<sup>52,53</sup>

y donde los niveles de estradiol se encuentran en su máxima concentración. Algunos estudios también demuestran que la ingesta de alimento es mayor durante la fase lútea en comparación con la fase folicular<sup>53,55</sup>. Estos datos muestran que las mujeres comen alrededor de un 10% menos en la ventana peri-ovulatoria<sup>9</sup>. El estradiol y la progesterona en las mujeres están cíclicamente relacionadas, sin embargo, la variación del estradiol durante el ciclo tiene influencia en la ingesta de alimento, mientras que la progesterona se ha demostrado que no tiene ningún efecto regulatorio sobre esta<sup>9</sup>. En mujeres, las fluctuaciones de leptina durante el ciclo menstrual correlacionan directamente con el estradiol, pero no con la progesterona<sup>56,57</sup>. La concentración de estrógenos, especialmente de estradiol correlaciona inversamente con la alimentación durante muchos procesos fisiológicos, por lo que hoy se sabe que existe definitivamente conexión directa de las hormonas esteroideas y las metabólicas.

Ratas y ratones tienen 4-5 ciclos ováricos. En las ratas alrededor del 80 a 90% de la ingesta de alimentos se produce en la noche. Durante la noche, después del incremento de LH, viene la ovulación; como consecuencia, hay disminución en la ingesta de alimento hasta un 25%, sin haber ningún mecanismo compensatorio de la frecuencia en la comida<sup>11,50,58</sup>. La concentración de estradiol es más alta justo antes del pico de LH, pero muy baja durante el estro. La disminución de la ingesta de alimento debido al estro en ratas y ratones se debe a la activación de ER que estimulan los factores de transcripción que tienen regulación metabólica y parece ser que estos mantienen su efecto durante las siguientes 12 horas. En metaestro, la secreción de esteroideas sexuales disminuye y aumenta la ingesta de alimento. Sin embargo, el metaestro en ratas y ratones dura sólo 6-8 horas y se produce cuando estos animales comen muy poco. Dado que estos animales son nocturnos, se alimentan durante las noches, por lo que son modelos pobres para poder describir los procesos hormonales y fisiológicos del comer durante las fases post-ovulatorias<sup>9</sup>.

El cambio cíclico en la regulación de la ingesta aparentemente no se produce durante los ciclos anovulatorios<sup>59</sup>. También se puede suprimir en las mujeres cuya conducta alimenticia se encuentra bajo fuerte restricción cognitiva<sup>60</sup>, sin embargo no es claro si el tamaño o la proporción es afectada<sup>9</sup>.

La ovariectomía produce aumento inmediato en la alimentación y también aumento del 10 al 30% en la adiposidad corporal en ratas y ratones<sup>61</sup>. La reducción de los estrógenos como ocurre en la menopausia y en los animales gonadectomizados se ha asociado con el aumento de la adiposidad visceral.

### **Diferencias sexuales en la homeostasis del balance de energía.**

El balance de energía y la distribución de grasa del cuerpo son parte del dimorfismo sexual en muchas especies de mamíferos, incluido el ser humano. Los hombres tienen menos grasa total, su distribución es localizada en la región central o intra-abdominal, a esta distribución se le conoce como "androide" o forma de manzana por el patrón de localización de la grasa, también llamada perfil de manzana, esto conlleva a un riesgo mayor para los trastornos metabólicos, ya que el tejido adiposo se distribuye más en la región subcutánea. En contraste, las mujeres tienen más grasa total y mayor distribución de grasa subcutánea en glúteo/femoral, a este perfil se le conoce como "ginoide", o de patrón femenino, también llamado mujer pera. Esta distribución no está directamente relacionada con el riesgo de trastornos metabólicos<sup>62</sup>. **Fig. (3).**

Los esteroideas gonadales son reguladores que tienen efectos importantes sobre el almacenamiento, la distribución de grasa y el tamaño del adipocito<sup>63</sup>. Las hormonas ováricas brindan protección contra el desarrollo del síndrome metabólico. Por el contrario, en los hombres hay mayor prevalencia a los trastornos metabólicos por la falta de estas hormonas, que presentan las mujeres antes de la menopausia. Sin embargo, después de la menopausia, tienen posibilidades cada vez mayores de sufrir problemas metabólicos<sup>62</sup>. Esto, es debido a que la grasa intra-abdominal varía de forma inversa con los niveles de estrógenos. Los hombres tienen concentraciones más bajas de estrógenos, las mujeres después de la menopausia tienen menor producción de estrógenos y por ello aumentan la adiposidad intra-abdominal y si las mujeres reciben terapia de reemplazo hormonal durante esta etapa, pueden reducir el riesgo a acumular grasa, lo que sugiere un papel específico de los estrógenos en la limitación de grasa intra-abdominal<sup>62</sup>.

### **Apetito y los disruptores endocrinos**

El apetito puede verse afectado por disruptores endocrinos. Los disruptores endocrinos son moléculas naturales y sintéticas que se unen a diferentes tipos de receptores hormonales, ya sea imitando o bloqueando la acción hormonal. Estos compuestos endocrinos se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente y muestran actividad estrogénica, antiestrogénica, antiandrogénica e incluso obesogénica. Estos compuestos son lipofílicos y pueden ser almacenados por largos periodos en el tejido adiposo<sup>64</sup>. La exposición excesiva a estos disruptores endocrinos en los seres humanos y otros animales tiene impacto en la ganancia de peso con predisposición a la obesidad<sup>65</sup>.

### **Programación del desarrollo e ingesta de alimento.**

Los estrógenos y sus receptores también pueden modificar el desarrollo del feto, dando lugar a cambios permanentes en los adipocitos y el metabolismo celular. Estos a su vez conducen a un exceso de grasa corporal visceral con desarrollo a enfermedades de tipo cardiovascular y diabetes tipo II en la edad adulta. Nuestro grupo ha demostrado que en ratas embarazadas con restricción proteínica, las concentraciones séricas de progesterona<sup>66</sup>, testosterona, estradiol y corticosterona<sup>67</sup> se incrementan en comparación con el grupo control, justo al final de la gestación. La exposición del feto a estos esteroides puede predisponer al mismo, a desarrollar problemas metabólicos en la vida adulta<sup>68</sup>.

La masculinización del cerebro femenino en el desarrollo temprano disminuye de manera selectiva en la vida adulta los procesos sensibles que regulan la inhibición del apetito por acción del estradiol, por lo contrario, la feminización del cerebro no afecta a la sensibilidad en la vida adulta a los efectos estimulantes de la testosterona<sup>9</sup>.

Los datos disponibles sugieren que la organización de la diferenciación sexual en la vida temprana formará parte de los procesos de regulación de las hormonas gonadales del individuo en la vida adulta. En nuestro modelo en rata, la restricción materna de nutrientes durante el embarazo reduce la cantidad de grasa en el cerebro durante el crecimiento fetal generando un impacto negativo en el desarrollo normal del cerebro<sup>69</sup> y en el comportamiento<sup>70-72</sup>.

Además, hemos demostrado que el aumento de la concentración de leptina en la vida postnatal de las crías se retrasa por la desnutrición prenatal, lo que conlleva a desarrollar alteraciones en el apetito, con trastornos metabólicos en la edad adulta<sup>19</sup>. La madres restringidas durante el embarazo y/o la lactancia tuvieron descendencia femenina con mayores niveles séricos de testosterona durante el ciclo estral<sup>66</sup>, mientras que en los machos estuvo disminuida la concentración, (cabe mencionar que las crías después del destete recibieron dieta control, la cual cubre los requerimientos alimenticios de roedores en desarrollo)<sup>67</sup>. Las concentraciones de colesterol y triacilglicéridos en los machos que provenían de madres restringidas durante el embarazo y las cuales después del parto recibieron una dieta normal estuvieron elevadas. En contraste, las hembras no tuvieron cambios en estos parámetros. Por otro lado, las crías hembras y machos de madres restringidas en ambos periodos, presentaron en la vida adulta mayor leptina, grasa corporal y visceral, así como resistencia a la insulina y mayor ingesta de alimento en comparación con las crías de madres control. Estos resultados nos permiten concluir que la restricción proteínica durante el embarazo y/o la lactancia alteran el crecimiento postnatal y el comportamiento en el apetito, así como la fisiología de la leptina, triacilglicéridos, colesterol, metabolismo de la glucosa y resistencia a la insulina, de acuerdo al tiempo de restricción nutricional y sexo<sup>73-74</sup>. Por otro lado, la obesidad materna también modifica el fenotipo de la descendencia. Nosotros hemos probado en nuestra línea de investigación, que ratas alimentadas con dieta alta en grasa durante la gestación y lactancia y después del destete con dieta control, tiene efectos negativos sobre la descendencia masculina ya que estos presentaron aumento en el tamaño de los adipocitos y mayor masa corporal. Las concentraciones de los triacilglicéridos, leptina e insulina estuvieron altas<sup>75</sup>, lo que nos permite concluir que la programación del desarrollo puede determinar los factores de riesgo para desarrollar trastornos en el apetito, obesidad, diabetes, hipertensión y otras enfermedades crónicas degenerativas en la vida adulta de la progenie.

### **Resumen y Conclusión**

En los últimos años el conocimiento del sistema fisiológico y las redes que regulan la ingesta de alimento y el peso corporal ha aumentado enormemente.



El sobre peso y la obesidad es el resultado del desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, cabe mencionar que existen importantes diferencias con respecto al género, esto directamente relacionado con el número y prevalencia de casos clínicos que presentan enfermedades metabólicas. Estas diferencias sexuales, podrían estar relacionadas con el perfil diferente de las hormonas sexuales entre hombres y mujeres. Hoy en día los estudios relacionados con las diferencias de sexo en la regulación del apetito ha contribuido fuertemente como parte importante en el entendimiento de la fisiología de la alimentación. El profundizar en el conocimiento de la regulación entre las hormonas esteroides y el balance energético, será relevante para el desarrollo de tratamientos efectivos para los pacientes obesos. La mejor comprensión de las diferencias de género en la regulación de la ingesta de alimento y la acumulación de grasa, permitirá de manera trascendental el desarrollo de fármacos que prevengan o reviertan la epidemia de obesidad, la cual hoy en día es la causa de muchas enfermedades de tipo metabólico, principalmente, diabetes, resistencia a la insulina, hipertensión y daño vascular. Es importante mencionar que siguen siendo los tratamientos más efectivos y seguros los que están dirigidos a la regulación y modificación de la calidad y cantidad de ingesta de alimentos y la práctica de ejercicio para aumentar el gasto energético. Sin embargo, es importante reconocer que hoy en día, las necesidades del mundo son diferentes y que se requiere mayor investigación clínica, social, cultural y experimental para tratar de explicar y resolver el problema.

#### Agradecimientos.

CJ Bautista y L.A Reyes-Castro son estudiantes del Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### Bibliografía:

1. Lutz, T. A. Control of food intake and energy expenditure by amylin-therapeutic implications. *Int J Obes (Lond)* 2009, 33 Suppl 1, S24-7.
2. Druce, M.; Bloom, S. R. The regulation of appetite. *Arch Dis Child* 2006, 91, 183-7.
3. Small, C. J.; Parkinson, J. R.; Bloom, S. R. Novel therapeutic targets for appetite regulation. *Curr Opin Investig Drugs* 2005, 6, 369-72.
4. Suzuki, K.; Simpson, K. A.; Minnion, J. S.; Shillito, J. C.; Bloom, S. R. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J* 57, 359-72.
5. Wynne, K.; Stanley, S.; McGowan, B.; Bloom, S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005, 184, 291-318.
6. Chaudhri, O.; Small, C.; Bloom, S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006, 361, 1187-209.
7. Gruber, C. J.; Tschugguel, W.; Schneeberger, C.; Huber, J. C. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002, 346, 340-52.
8. Vanderschueren, D.; Vandenput, L.; Boonen, S.; Lindberg, M. K.; Bouillon, R.; Ohlsson, C. Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004, 25, 389-425.
9. Asarian, L.; Geary, N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006, 361, 1251-63.
10. Ozawa, H. Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nihon Med Sch* 2005, 72, 316-25.
11. Butera, P. C. Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav* 99, 175-80.
12. Clegg, D. J.; Brown, L. M.; Woods, S. C.; Benoit, S. C. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 2006, 55, 978-87.
13. Campfield, L. A.; Smith, F. J.; Guisez, Y.; Devos, R.; Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995, 269, 546-9.
14. Pelleymounter, M. A.; Cullen, M. J.; Bays, M. B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T.; Collins, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995, 269, 540-3.
15. Tartaglia, L. A.; Dembski, M.; Weng, X.; Deng, N.; Culpepper, J.; Devos, R.; Richards, G. J.; Campfield, L. A.; Clark, F. T.; Deeds, J.; Muir, C.; Sanker, S.; Moriarty, A.; Moore, K. J.; Smutko, J. S.; Mays, G. G.; Wool, E. A.; Monroe, C. A.; Tepper, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995, 83, 1263-71.
16. Tartaglia, L. A. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997, 272, 6093-6.
17. Ahima, R. S.; Prabakaran, D.; Flier, J. S. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 1998, 101, 1020-7.
18. Rayner, D. V.; Dalglish, G. D.; Duncan, J. S.; Hardie, L. J.; Hoggard, N.; Trayhurn, P. Postnatal development of the ob gene system: elevated leptin levels in suckling fa/fa rats. *Am J Physiol* 1997, 273, R446-50.
19. Bautista, C. J.; Boeck, L.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W.; Zambrano, E. 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, 358-63.

20. Vickers, M. H.; Gluckman, P. D.; Coveny, A. H.; Hofman, P. L.; Cutfield, W. S.; Gertler, A.; Breier, B. H.; Harris, M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 2005, 146, 4211-6.
21. Ostlund, R. E., Jr.; Yang, J. W.; Klein, S.; Gingerich, R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81, 3909-13.
22. Devaskar, S. U.; Ollesch, C.; Rajakumar, R. A.; Rajakumar, P. A. Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 238, 44-7.
23. Mistry, A. M.; Swick, A.; Romsos, D. R. Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *Am J Physiol* 1999, 277, R742-7.
24. Alonso, A.; Fernandez, R.; Moreno, M.; Ordonez, P.; Diaz, F.; Gonzalez, C. Leptin and its receptor are controlled by 17beta-estradiol in peripheral tissues of ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007, 232, 542-9.
25. Brann, D. W.; De Sevilla, L.; Zamorano, P. L.; Mahesh, V. B. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids* 1999, 64, 659-63.
26. Machinal, F.; Dieudonne, M. N.; Leneuve, M. C.; Pecquery, R.; Giudicelli, Y. In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* 1999, 140, 1567-74.
27. Schwartz, M. W.; Figlewicz, D. P.; Baskin, D. G.; Woods, S. C.; Porte, D., Jr. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 1992, 13, 387-414.
28. Baura, G. D.; Foster, D. M.; Porte, D., Jr.; Kahn, S. E.; Bergman, R. N.; Cobelli, C.; Schwartz, M. W. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* 1993, 92, 1824-30.
29. Polonsky, K. S.; Given, B. D.; Van Cauter, E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 1988, 81, 442-8.
30. Porte, D., Jr.; Baskin, D. G.; Schwartz, M. W. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* 2002, 60, S20-9; discussion S68-84, 85-7.
31. Taniguchi, C. M.; Emanuelli, B.; Kahn, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7, 85-96.
32. White, M. F.; Yenush, L. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998, 228, 179-208.
33. Baskin, D. G.; Schwartz, M. W.; Sipols, A. J.; D'Alessio, D. A.; Goldstein, B. J.; White, M. F. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain. *Endocrinology* 1994, 134, 1952-5.
34. Bruning, J. C.; Gautam, D.; Burks, D. J.; Gillette, J.; Schubert, M.; Orban, P. C.; Klein, R.; Krone, W.; Muller-Wieland, D.; Kahn, C. R. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000, 289, 2122-5.
35. Corp, E. S.; Woods, S. C.; Porte, D., Jr.; Dorsa, D. M.; Figlewicz, D. P.; Baskin, D. G. Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett* 1986, 70, 17-22.
36. Marks, J. L.; Porte, D., Jr.; Stahl, W. L.; Baskin, D. G. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 1990, 127, 3234-6.
37. Coll, A. P.; Farooqi, I. S.; O'Rahilly, S. The hormonal control of food intake. *Cell* 2007, 129, 251-62.
38. Ropero, A. B.; Alonso-Magdalena, P.; Quesada, I.; Nadal, A. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids* 2008, 73, 874-9.
39. Heine, P. A.; Taylor, J. A.; Iwamoto, G. A.; Lubahn, D. B.; Cooke, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97, 12729-34.
40. Takeda, K.; Toda, K.; Saibara, T.; Nakagawa, M.; Saika, K.; Onishi, T.; Sugiura, T.; Shizuta, Y. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J Endocrinol* 2003, 176, 237-46.
41. Alonso-Magdalena, P.; Ropero, A. B.; Carrera, M. P.; Cederroth, C. R.; Baquie, M.; Gauthier, B. R.; Nef, S.; Stefani, E.; Nadal, A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One* 2008, 3, e2069.
42. Livingstone, C.; Collison, M. Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci (Lond)* 2002, 102, 151-66.
43. Godsland, I. F. The influence of female sex steroids on glucose metabolism and insulin action. *J Intern Med Suppl* 1996, 738, 1-60.
44. Godsland, I. F. Oestrogens and insulin secretion. *Diabetologia* 2005, 48, 2213-20.

45. Nadal, A.; Alonso-Magdalena, P.; Soriano, S.; Quesada, I.; Ropero, A. B. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2009, 304, 63-8.
46. Gonzalez, C.; Alonso, A.; Diaz, F.; Patterson, A. M. Dose- and time-dependent effects of 17beta-oestradiol on insulin sensitivity in insulin-dependent tissues of rat: implications of IRS-1. *J Endocrinol* 2003, 176, 367-79.
47. Dalvit-McPhillips, S. P. The effect of the human menstrual cycle on nutrient intake. *Physiol Behav* 1983, 31, 209-12.
48. Czaja, J. A.; Goy, R. W. Ovarian hormones and food intake in female guinea pigs and rhesus monkeys. *Horm Behav* 1975, 6, 329-49.
49. Tarttelin, M. F. Cyclical variations in food and water intakes in ewes. *J Physiol* 1968, 195, 29P-31P.
50. Blaustein, J. D.; Wade, G. N. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav* 1976, 17, 201-8.
51. ter Haar, M. B. Circadian and estrual rhythms in food intake in the rat. *Horm Behav* 1972, 3, 213-9.
52. Gong, E. J.; Garrel, D.; Calloway, D. H. Menstrual cycle and voluntary food intake. *Am J Clin Nutr* 1989, 49, 252-8.
53. Lyons, P. M.; Truswell, A. S.; Mira, M.; Vizzard, J.; Abraham, S. F. Reduction of food intake in the ovulatory phase of the menstrual cycle. *Am J Clin Nutr* 1989, 49, 1164-8.
54. Lissner, L.; Stevens, J.; Levitsky, D. A.; Rasmussen, K. M.; Strupp, B. J. Variation in energy intake during the menstrual cycle: implications for food-intake research. *Am J Clin Nutr* 1988, 48, 956-62.
55. Pelkman, C. L.; Chow, M.; Heinbach, R. A.; Rolls, B. J. Short-term effects of a progestational contraceptive drug on food intake, resting energy expenditure, and body weight in young women. *Am J Clin Nutr* 2001, 73, 19-26.
56. Quinton, N. D.; Smith, R. F.; Clayton, P. E.; Gill, M. S.; Shalet, S.; Justice, S. K.; Simon, S. A.; Walters, S.; Postel-Vinay, M. C.; Blakemore, A. I.; Ross, R. J. Leptin binding activity changes with age: the link between leptin and puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84, 2336-41.
57. Shi, H.; Clegg, D. J. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* 2009, 97, 199-204.
58. Geary, N.; Asarian, L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1999, 67, 141-7.
59. Rock, C. L.; Gorenflo, D. W.; Drownowski, A.; Demitrack, M. A. Nutritional characteristics, eating pathology, and hormonal status in young women. *Am J Clin Nutr* 1996, 64, 566-71.
60. Dye, L.; Blundell, J. E. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. *Hum Reprod* 1997, 12, 1142-51.
61. Geary, N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides* 2001, 22, 1251-63.
62. Shi, H.; Seeley, R. J.; Clegg, D. J. Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol* 2009, 30, 396-404.
63. Nilsson, C.; Niklasson, M.; Eriksson, E.; Bjornorp, P.; Holmang, A. Imprinting of female offspring with testosterone results in insulin resistance and changes in body fat distribution at adult age in rats. *J Clin Invest* 1998, 101, 74-8.
64. Guzman, C.; Zambrano, E. [Endocrine disruptor compounds and their role in the developmental programming of the reproductive axis]. *Rev Invest Clin* 2007, 59, 73-81.
65. Schneider, J. E. Metabolic and hormonal control of the desire for food and sex: implications for obesity and eating disorders. *Horm Behav* 2006, 50, 562-71.
66. Guzman, C.; Cabrera, R.; Cardenas, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W.; Zambrano, E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* 2006, 572, 97-108.
67. Zambrano, E.; Rodriguez-Gonzalez, G. L.; Guzman, C.; Garcia-Becerra, R.; Boeck, L.; Diaz, L.; Menjivar, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 2005, 563, 275-84.
68. Zambrano, E. [The transgenerational mechanisms in developmental programming of metabolic diseases]. *Rev Invest Clin* 2009, 61, 41-52.
69. Torres, N.; Bautista, C. J.; Tovar, A. R.; Ordaz, G.; Rodriguez-Cruz, M.; Ortiz, V.; Granados, O.; Nathanielsz, P. W.; Larrea, F.; Zambrano, E. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E270-7.
70. Reyes-Castro, L. A.; Rodriguez, J. S.; Charco, R.; Bautista, C. J.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W.; Zambrano, E. Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring. *Int J Dev Neurosci* 2012, 30, 39-45.
71. Reyes-Castro, L. A.; Rodriguez, J. S.; Rodriguez-Gonzalez, G. L.; Chavira, R.; Bautista, C. J.; McDonald, T. J.; Nathanielsz, P. W.; Zambrano, E. Pre and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav Brain Res*. 2011, In press.

72. Reyes-Castro, L. A.; Rodriguez, J. S.; Rodriguez-Gonzalez, G. L.; Wimmer, R.; McDonald, T. J.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W.; Zambrano, E. Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. *Int J Dev Neurosci* 2011, 29, 177-82.
73. Zambrano, E.; Bautista, C. J.; Deas, M.; Martinez-Samayoa, P. M.; Gonzalez-Zamorano, M.; Ledesma, H.; Morales, J.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W. 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, 221-30.
74. Zambrano, E.; Martinez-Samayoa, P. M.; Bautista, C. J.; Deas, M.; Guillen, L.; Rodriguez-Gonzalez, G. L.; Guzman, C.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005, 566, 225-36.
75. Zambrano, E.; Martinez-Samayoa, P. M.; Rodriguez-Gonzalez, G. L.; Nathanielsz, P. W. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol* 588, 1791-9.

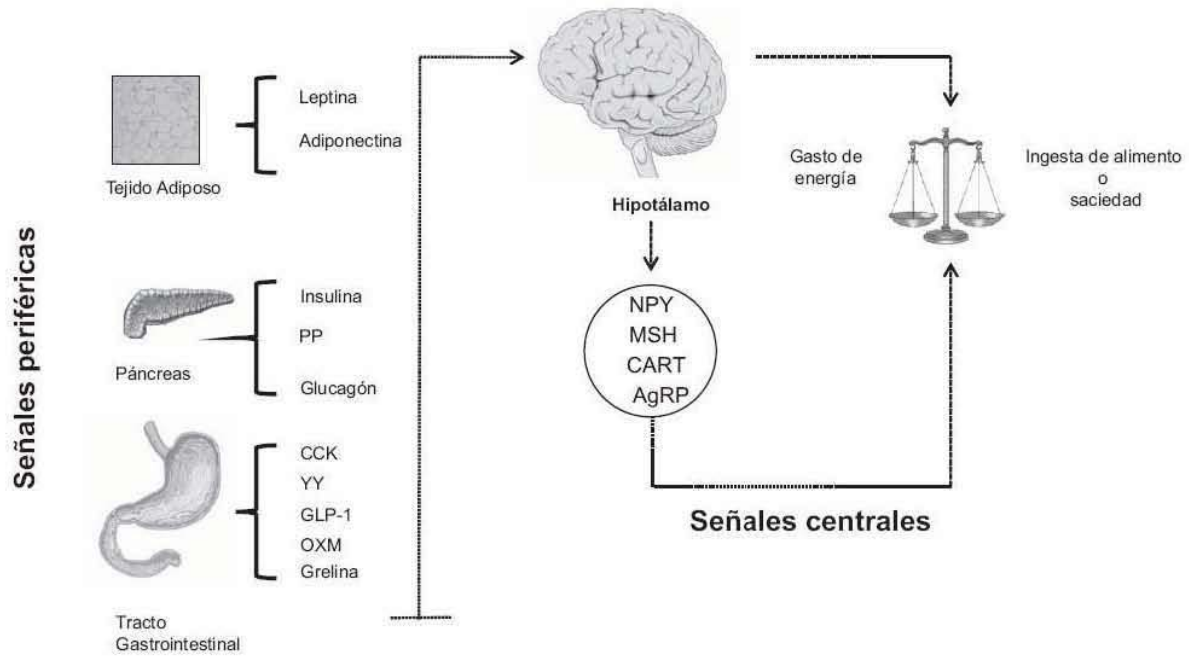


Figura 1. Señales periféricas y centrales que regulan el gasto energético y la ingesta de alimento.

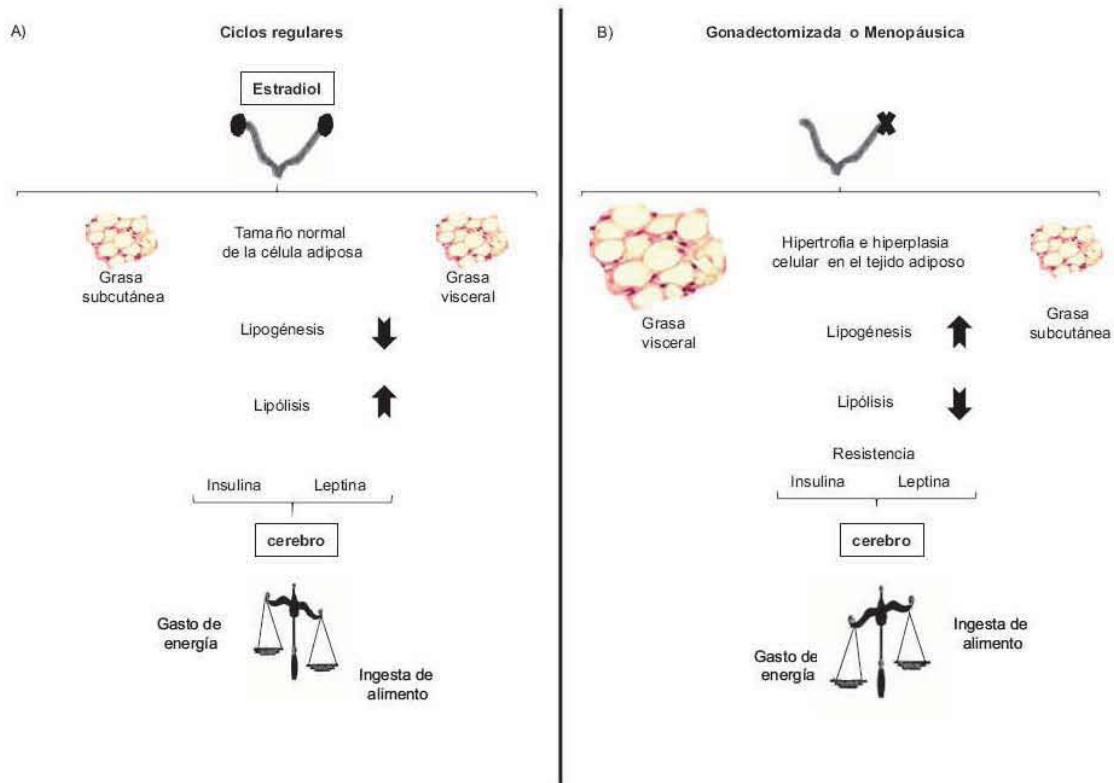


Figura 2. Regulación del balance de energía por el estradiol A) en ciclos regulares y B) en menopáusicas o gonadectomizadas



## Maternal protein restriction in the rat during pregnancy and/or lactation alters cognitive and anxiety behaviors of female offspring

L.A. Reyes-Castro<sup>a</sup>, J.S. Rodriguez<sup>b</sup>, R. Charco<sup>a</sup>, C.J. Bautista<sup>a</sup>, F. Larrea<sup>a</sup>, P.W. Nathanielsz<sup>b</sup>, E. Zambrano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City 14000, Mexico

<sup>b</sup> Center for Pregnancy and Newborn Research, Department of Obstetrics, University of Texas, Health Science Center San Antonio, San Antonio, TX 78229, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 July 2011  
Received in revised form 11 October 2011  
Accepted 12 October 2011

#### Keywords:

Developmental programming  
Risk assessment  
Learning  
Motivation  
Operant conditioning

### ABSTRACT

Maternal protein deficiencies can developmentally program offspring to lifelong dysfunction of many physiological systems. We hypothesized that maternal isocaloric low protein diet during fetal and early postnatal development would negatively affect female offspring anxiety, exploration, associative learning and motivation as measured by the elevated plus maze (EPM), open field test (OFT), operant conditioning and the progressive ratio task, respectively. Control mothers (C) received a 20% casein diet and restricted mothers (R) a 10% casein diet to provide four groups: CC, RR, CR, and RC (first letter pregnancy diet and second lactation diet) to enable evaluation of offspring effects influenced by maternal diet during pregnancy and lactation. Maternal protein restriction decreased open arm time and distance in RR and RC offspring, increased anxiety behavior, in the EPM. In the OFT, the RR and RC offspring displayed decreased exploration (increased stress) as indexed by decreased distance in the center zone. These behaviors in the EPM and OFT was associated with increased corticosterone levels during an immobilization test in the RR offspring with intermediary effects in the RC offspring. Learning impairment was observed in the RR, CR and RC offspring during fixed ratio 5 schedule of reinforcement. Motivational effects were measured in RR offspring responding less, decreased motivation, and CR offspring making more responses, increased motivation, than CC offspring. These findings reveal the negative effects of developmental protein restriction on female offspring behavior. The underlying basis for these negative outcomes remains to be elucidated.

© 2011 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In many societies nutritional insecurity remains a serious problem (Jaron and Galal, 2009; Tanumihardjo et al., 2007). Reduced maternal nutrition certainly affects fetal development with the brain particularly susceptible to the intrauterine environment in both altricial and precocial species (Morgane et al., 1993; Rice and Barone Jr, 2000). We have recently shown in baboon that an adequate maternal diet is vital for the development of the central nervous system (Antonow-Schlorke et al., 2011). Poor nutrition during development profoundly affects the fetal brain especially neurons of the frontal cortex and limbic system (Antonow-Schlorke

et al., 2011; Bedi, 2003; Lister et al., 2005, 2006; Morgane et al., 2002). Behaviors such as learning and memory, emotional regulation, motivation and risk assessment rely on intact cortical and limbic structures and associated neural networks (Morgane et al., 2005). In humans, poor maternal nutrition is a major cause of intrauterine growth restriction which is associated with an increased risk of perinatal mortality and long-term morbidity (McIntire et al., 1999). In addition, intrauterine growth restriction is associated with neurodevelopmental delays (Taylor and Howie, 1989) and alterations of brain structure and neurochemistry (Almeida et al., 1996a). Epidemiological studies in human offspring demonstrate negative influences of insufficient perinatal nutrients on cognition and behavior (Benton, 2008; Galler et al., 1990, 2005; Lucas, 2005; Stein et al., 2009).

Various studies have reported effects of poor maternal nutrition on brain development and risk assessment behavioral outcomes in offspring with reduction in fetal brain fat (Torres et al., 2010) modification to neuronal proliferation in the hypothalamic and hippocampal regions in rat offspring (Coupe et al., 2009; Jahnke and Bedi, 2007). Behavioral outcomes following prenatal protein restriction (6–9% casein) in rodent offspring reveal high

**Abbreviations:** C, control diet; CC, control diet during pregnancy and lactation; FR, fixed ratio; CR, control diet during pregnancy and protein restriction during lactation; EPM, elevated plus maze; R, protein restriction; RR, protein restriction during pregnancy and lactation; RC, protein restriction during pregnancy and control diet during lactation; PND, postnatal day.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5487 0900x2417; fax: +52 55 5655 9859.  
E-mail address: zamgon@servidor.unam.mx (E. Zambrano).

0736-5748/\$36.00 © 2011 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.10.002

impulsiveness and exploration (less anxiety) in the elevated plus maze (EPM) and short inhibitory avoidance (disinhibition) latencies in the elevated T-maze (Almeida et al., 1991, 1996b; da Silva et al., 2005; Watkins et al., 2008). Increases in anxiety have also been reported in the EPM in offspring protein restricted during lactation (Almeida et al., 1993). We have recently reported decreased avoidance behavior in the EPM and no effects in the open field (OFT) in male rats pre and/or postnatal protein restricted (Reyes-Castro et al., 2011a).

To date a limited number of studies have focused on operant conditioning or motivation based behaviors subsequent to pre- and/or postnatal protein restriction. For instance, prenatal protein restriction (6% casein) in adult male rats impairs the acquisition of a differential reinforcement of low rates operant task (Tonkiss et al., 1990a) and impairments in the radial arm maze following pre- and postnatal protein restriction (7% casein) in mice (Ranade et al., 2008). Spatial learning (Morris water maze) results show impairment of performance in rats prenatally protein restricted (Tonkiss et al., 1997; Zhang et al., 2010). We have previously reported impaired learning in pre and/or postnatal protein restricted male rats (Reyes-Castro et al., 2011b). In regards to motivation for positive reinforcement, prenatally undernourished rats show less appetitive motivation (Miles et al., 2009). We also have reported less motivation in male rats following pre and/or postnatal protein restriction (10% casein) (Reyes-Castro et al., 2011b).

These findings on anxiety, exploration, learning and motivation are indicative of the negative behavioral effects in offspring subsequent to insufficient protein in early life. Previous studies of insufficient perinatal protein during development have been associated with a two-thirds reduction of protein from the control diet (25% protein diet reduced to 6%). However, the effects of smaller decreases in perinatal protein have only been determined in male offspring (Reyes-Castro et al., 2011a,b). Therefore we sought to investigate the negative effects of a 50% reduction in perinatal protein on female offspring behavior. This level of protein reduction more accurately reflects the human dietary insecurities in developed countries (for review see Ref. McIntire et al., 1999). For this study we assessed adult female rat offspring born to protein restricted mothers in anxiety, exploration, learning and motivation behaviors, using the EPM, OFT, operant conditioning and progressive ratio, respectively. Control mothers (C) received 20% casein while restricted mothers (R) received 10% casein to provide four groups: CC, RR, CR, and RC (first letter pregnancy diet and second letter lactation diet). These dietary manipulation combinations have not previously been administered in the context of female development and behavioral effects following maternal protein restriction. We hypothesized that maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation would negatively affect neurodevelopment and subsequent behavior in female offspring.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Care and maintenance of animals

All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the "Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán" (INNSZ), Mexico. Details of maternal diet, breeding, and management of the four groups of offspring have been published in detail (Zambrano et al., 2005). Briefly, mothers (obtained from INNSZ) were virgin female albino Wistar rats 122 ± 9 days of age (mean ± SEM) and weighed 221.8 ± 3.8 g (mean ± SEM). Female rats with regular estrous cycles were fed normal laboratory chow (control diet, Zeigler Rodent RQ 22-5, USA) under controlled lighting (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m. at 22–23 °C) and mated overnight with proven male breeders. The day spermatozoa were present in the vaginal smear was designated as day of conception (day 0). Only rats impregnated within 5 days following introduction of the fertile male were retained in the study. Pregnant rats were transferred to individual acrylic cages and allocated randomly to one of two groups: fed either 20% casein ( $n = 20$ , control diet-C) or 10% casein isocaloric diet ( $n = 20$ , restricted diet-R) (Morgane et al., 1993). Food and water were available *ad libitum* and chow provided in the form of flat biscuits.

Offspring delivery occurred in the early daylight hours between 9.00 a.m. and 12 p.m. on post-conception day 22 which was designated postnatal day (PND) 0. Pup weight and morphometric parameters were recorded at birth. Ano-genital distance was measured with calipers and expressed as ano-genital distance/body weight as previously reported (Miles et al., 2009; Morgane et al., 1993, 2002, 2005; Ranade et al., 2008; Reyes-Castro et al., 2011a). Using our previously published data (Morgane et al., 2005), sex was judged according to whether the ano-genital distance was < (female) or > (male) 2.5 mm. To ensure homogeneity of study subjects, litters of over 14 pups, or less than 10 pups, were not included in the study. Litters were adjusted to 10 pups for each mother while maintaining as close to a 1:1 sex ratio as possible. Morphometric measurements were performed on the litters prior to culling them to 10. For the lactation period 4 groups were established: CC, RR, CR, and RC (first letter diet received during pregnancy and second letter maternal diet during lactation) resulting in 8 animals from different litters per group (8 each of female CC, RR, CR and RC offspring). After weaning (PND 21), all pups were fed the C diet and housed 4 offspring in the same treatment group per cage. Two weeks prior to behavioral testing and during the behavioral experiments, subjects were maintained on a reverse 12 h light/dark cycle (lights off at 7 a.m. and on at 7 p.m.). Behavioral assessments occurred during the dark phase on PNDs 90–220 regardless of the stage of the estrous cycle. Order of task administration was: (1) EPM (PNDs 90–92), (2) open field (PNDs 91–93), (3) operant condition (PNDs 110–135), (4) progressive ratio (PNDs 135–146), (5) sucrose consumption (PNDs 147–150) and (6) immobilization (PND 220).

### 2.2. Elevated plus maze

Eight unrelated naïve subjects per treatment group were tested. The EPM was constructed of dark grey plastic situated 64 cm above the floor. It consisted of two unprotected open arms 180 degrees apart, and two closed arms protected by high grey walls 90 degrees from the open arms. The four arms (45 cm × 10 cm each) extended from a common central platform (10 cm × 10 cm). The light level was 30 lux in the open arms and 6 lux in the closed arms. The rat's position on the maze was recorded via a video camera mounted on the ceiling above the center of the maze. The camera was connected to a video tracking motion analysis system (Ethovision, Noldus Information Technology by Wageningen, The Netherlands) running on a personal computer. To start the session, each rat was placed individually into the center of the maze facing an open arm. Subjects were assessed for 5 min, the rat was returned to its home cage and the EPM was cleaned with 70% ethanol. An experimenter naïve to treatment group manually scored the number of entries into the predefined zones of the open and closed arms, while the Ethovision system monitored the distance moved and the time spent in the different zones. An arm entry was scored only if the rat's center of gravity entered into the arm. The animals were tested in a randomized sequence based on early life dietary manipulation.

### 2.3. Open field

The same animals studied in the EPM were evaluated the next day in a 60-min OFT. The open field, made of dark grey Plexiglas, consisted of a square arena (101 cm × 101 cm and 34 cm high) which was located in an experimental room illuminated by low light (12 lux). A video camera mounted above the arena connected to a monitor and served as the video tracking motion analysis system (Ethovision, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). This system recorded subject locomotion in the entire arena (total distance measured in meters). A virtual square center was defined in the open field arena and the locomotor activity of the rats inside this zone was measured. Each rat was placed individually into the center of the open field arena and tested equally in all open field apparatuses. Following each session all zones were cleaned with 70% ethanol.

### 2.4. Operant apparatus

Eight unrelated offspring from different litters per diet group were tested in test-boxes (E10-10TC, Coulbourn-Instruments, PA, USA) enclosed in ventilated, sound-attenuating chambers (E10-20, Coulbourn-Instruments, PA, USA) and fitted with a removable response lever and a liquid dipper (E14-05, Coulbourn-Instruments, PA, USA). These boxes had two side walls of aluminum and a rear and front wall of clear Perspex. Each box contained a grid floor and was illuminated with a diffuse house-light during testing. Response lever and reward-magazine were placed on the right sidewall. When a rat had performed the required number of lever presses, the light was turned on in the reward magazine and the liquid dipper transferred a drop of sucrose solution (7%) from a reservoir into the reward magazine. A nose poke into the magazine was registered by photocell receptors. A personal computer controlled task parameters via universal environment interfaces (E91-12, Coulbourn-Instruments, PA, USA).

### 2.5. Operant conditioning and progressive ratio procedure

Prior to testing offspring were placed on water deprivation for 23 h/day. Subjects were given one hour of free access immediately following behavioral sessions which continued throughout training and testing. To begin training subjects were given a non-contingent reinforcement in the test-box. Subsequently, on the first

**Table 1**

Pup weight/morphometric measurements at birth from mothers fed the control (20% casein) or restricted (10% casein) diet during pregnancy. Mean  $\pm$  SEM, *n* refers to litters.

	Control ( <i>n</i> = 16)	Restricted ( <i>n</i> = 16)
Litter size (pups/litter)	11.2 $\pm$ 0.3	10.9 $\pm$ 0.2
Weight (g)	5.6 $\pm$ 0.05	5.1 $\pm$ 0.04*
Length (mm)	4.5 $\pm$ 0.06	4.4 $\pm$ 0.06
Ano genital distance (mm)	2.4 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.07
Ano genital distance (mm/g)	0.42 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.02*
Head diameter (mm)	11.3 $\pm$ 0.02	11.2 $\pm$ 0.03
Abdominal diameter (mm)	12.4 $\pm$ 0.07	12.2 $\pm$ 0.02
Head:abdominal ratio	0.91 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.01

\* *p* < 0.05 different from control.

training day subjects were conditioned to press a lever for reinforcement, according to a fixed ratio schedule (FR-1). On each trial the lever was presented until the subject pressed it. After which the subject was allowed 120 s to approach there ward magazine and respond with a nose poke. The registration of the nose poke into their ward magazine by the photocell receptors started the feeding which lasted approximately 10 s. Each trial was followed by an inter-trial interval of 5 s during which the lever was retracted. FR-1 training was completed when subjects made more than 20 responses during a 15-min session. After all subjects reached this criterion, they were introduced to a FR-5 schedule with the identical performance criteria as in the FR-1 schedule albeit with 5 responses required per trial. After the training sessions, subjects were placed on a progressive ratio schedule for ten days. In the progressive ratio schedule, the response increment doubled every eighth reinforcement and hence the number of lever presses required to obtain successive sucrose reinforcements was as follows: 1, 2, ..., 8; 10, 12, ..., 24; 28, 32, ..., 56; 64, 72, ..., 120; 136, 152, ..., etc. Each progressive ratio session lasted 30-min. The subjects of the different groups were tested in equal numbers across test boxes.

### 2.6. Free sucrose consumption

The day following the last progressive ratio session the subjects were given direct access to bottled sucrose solution for 30-min in the familiar colony room and the amount of consumed solution was measured. For this evaluation subjects were single caged and the amount of sucrose consumption was calculated by the subtraction of the bottle weight before and after the consummatory period. This procedure was performed in 3 consecutive days and administered in order to assess for differences in sucrose consummatory behavior.

### 2.7. Immobilization and corticosterone measurement

Following all behavioral testing, subjects were physically restrained for 20 min and corticosterone levels were measured. Starting at 12:00 hours on PND 220, a blood sample was taken from the tail vein to determine time 0 corticosterone serum levels. Subjects were then immobilized for 20 min and blood samples were obtained at 20, 40, 80, and 120 min. Blood samples were centrifuged at 4°C for 15 min at 3500 rpm to remove the red blood cells. The serum was stored at -20°C until all samples were analyzed. Corticosterone serum levels were determined by radioimmunoassay using commercial rat kits, DPC Coat-a-count (TKRC1) from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). Intra- and inter-assay variability was <6 and <7%. The kit was used in accordance with manufacturer's instructions and samples were measured in duplicate.

### 2.8. Statistical analyses

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Differences in body weight and morphometric measurements at birth were calculated by *t*-test. Body weight at adult age and behavioral endpoints were analyzed by one-ANOVA with between-subject factors of early life manipulation (maternal diet during pregnancy and lactation). Post-hoc analyses were performed by Tukey's test (Sigma Stat 3.5). Corticosterone measurements were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test (GraphPad Prism 4.0).

## 3. Results

### 3.1. Offspring morphometrics

Table 1 shows morphometric analysis of offspring at birth. Body weight for pups of protein restricted mothers was reduced compared to pups from mothers fed the control diet (*p* < 0.05). Ano-genital distance relative to body weight was increased 19% in the protein restricted female offspring (*p* < 0.05). No changes were

**Table 2**

Offspring weight as adults at the beginning of the training (PND 120) and before immobilization (PND 220) (Top table). Free sucrose consumption test – average intake of 30 min during 3 days (Bottom table). Offspring from mothers fed with control (C = 20% casein) or restricted (R = 10% casein) diet during pregnancy (first letter) and lactation (second letter). Mean  $\pm$  SEM; *n* = 8 pups from different litters. Groups not sharing a letter are statistically different, *p* < 0.05.

Offspring weights (g)	CC	RR	CR	RC
PND 21	39 $\pm$ 0.8a	24 $\pm$ 0.7b	25 $\pm$ 1.5b	42 $\pm$ 1.1a
PND 90	209 $\pm$ 4	199 $\pm$ 10	190 $\pm$ 6	200 $\pm$ 7
PND 120	226 $\pm$ 3a	206 $\pm$ 7ab	198 $\pm$ 4b	219 $\pm$ 5ab
PND 150	236 $\pm$ 5a	217 $\pm$ 7ab	206 $\pm$ 5b	226 $\pm$ 5ab
PND 220	256 $\pm$ 8a	223 $\pm$ 11bc	222 $\pm$ 9b	247 $\pm$ 6ac

7% Sucrose	CC	RR	CR	RC
mL	28.5 $\pm$ 0.5	29.1 $\pm$ 0.7	28.7 $\pm$ 0.8	28.8 $\pm$ 0.8

observed in other parameters at birth. Offspring weights were measured on PND 21, 90, 120, 150 and 220 (Table 2, top panel). The RR offspring weighed less than CC offspring on PND 21 and 220 while the CR offspring weighed less than CC on PND 21, 120, 150 and 220.

### 3.2. Elevated plus maze

Differences were measured in the total distance with a decrease in the RR offspring compared to CC and no differences in the CR and RC (Fig. 1A, *p* < 0.05). Differences were also measured in open arm time and open arm distance with decreases in the RR and RC offspring compared to CC and no difference in the CR (Fig. 1C and D, *p* < 0.05). No differences were revealed in open arm entries (Fig. 1B).

### 3.3. Open field

Differences in the number of center zone and border zone entries showed the RC offspring had decreased entries in both zones versus CC offspring with intermediary effects in RR and CR (Fig. 2A and B, *p* < 0.05). Decrease in center zone distance was observed in the RR and RC offspring with intermediary effects in the CR (Fig. 2E, *p* < 0.05). No differences were determined for center or border zones time, border zone distance or total distance (Fig. 2).

### 3.4. Operant conditioning

For FR-1 training a significant effect of diet was determined (*p* < 0.001), the number of FR-1 training sessions required to reach performance criterion in both the RR and CR groups was increased compared to CC offspring (Fig. 3A, *p* < 0.05). Additionally, for FR-5 training a significant effect of diet was determined (*p* < 0.001) RR, CR and RC offspring required more sessions to attain performance criterion compared to CC offspring (Fig. 3B, *p* < 0.05).

### 3.5. Progressive ratio

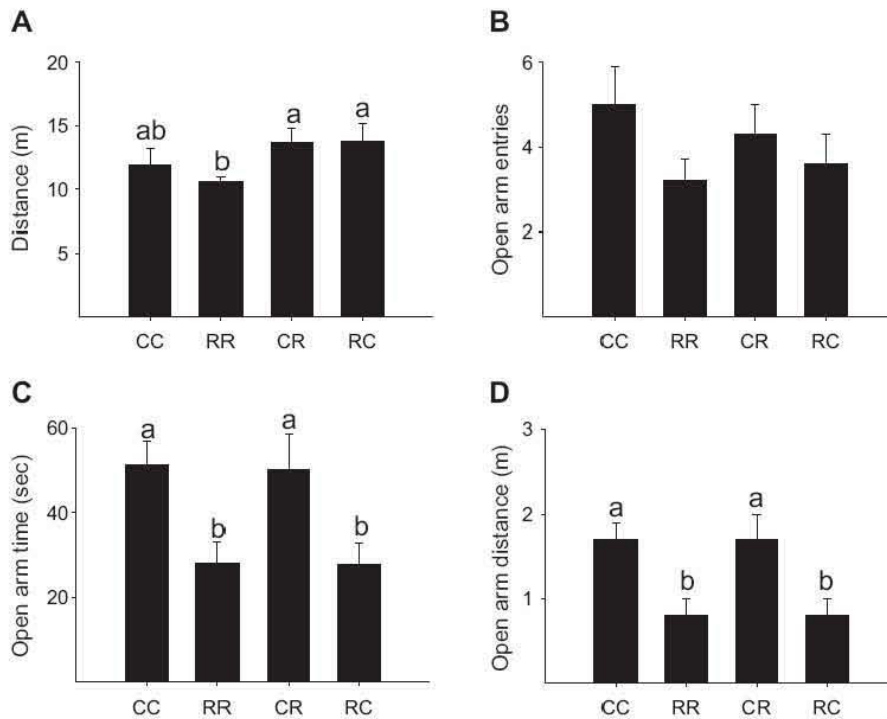
Analysis of number of responses made per session show a significant effect of diet (*p* < 0.001). Number of responses were decreased in the RR offspring while the CR offspring responded more than the CC group with no difference found in the RC group (Fig. 4A). Comparisons for number of rewards earned per session show a significant effect of diet (*p* < 0.001). Post-hoc analysis confirmed the CR group earned more rewards than the CC group with no difference found in the RR and RC groups (Fig. 4B).

### 3.6. Free sucrose consumption

No differences were determined between experimental offspring in the free sucrose consumption test (Table 2, bottom panel).



### ELEVATED PLUS MAZE (EPM) 5 MIN



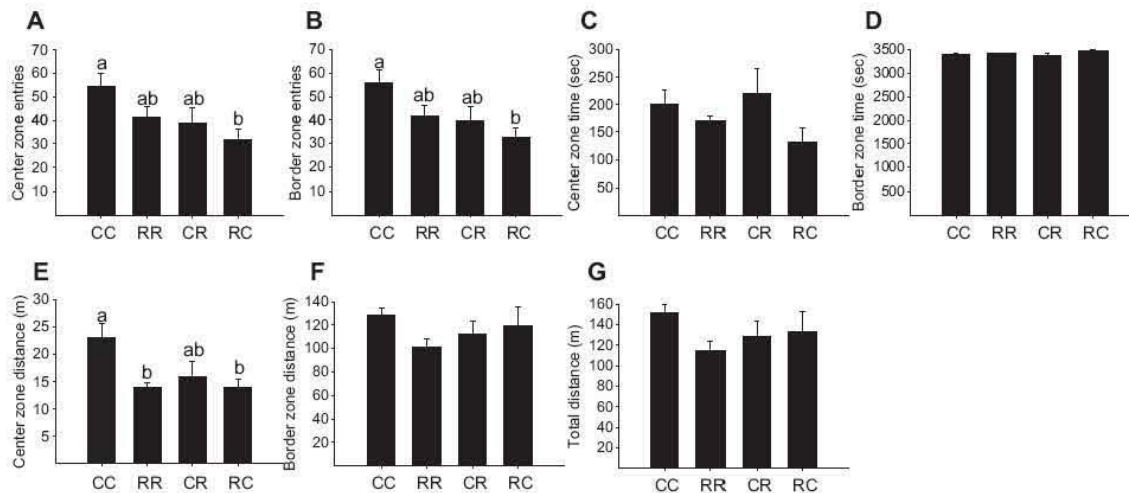
**Fig. 1.** Elevated plus maze comparisons. (A) Total distance, (B) open arm entries, (C) open arm time and (D) open arm distance. Offspring of rats fed with control (C=20% casein) or restricted (R=10% casein) diet during pregnancy (first letter) and lactation (second letter). Mean ± SEM, n=8 offspring from different litters.

### 3.7. Immobilization and corticosterone measurements

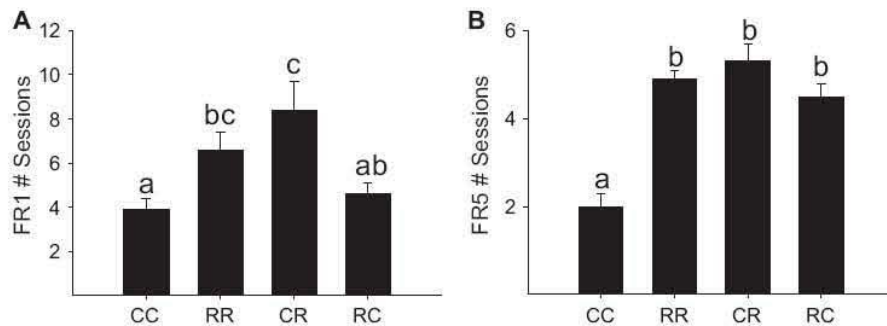
Analysis of corticosterone levels at 0, 20, 40, 80 and 120 min show the RR offspring had increased levels at the 0 min time point versus CC and CR offspring with the RC having intermediary levels (Fig. 5A; letter symbols,  $p < 0.05$ ). Corticosterone increase ( $\Delta$ ) after immobilization (between 0 and 20) was higher in CC in comparison

with RR and RC, with no difference in the CR (CC  $350 \pm 53$ a, RR  $154 \pm 50$ b, CR  $287 \pm 53$ ab, RC  $184 \pm 30$ b, ng/ml;  $p < 0.05$ ). No group differences were observed from 20–120 min. Within group differences were observed for all time points subsequent to the 0 min time point measurement (Fig. 5A; \* and # symbols,  $p < 0.05$ ). Corticosterone levels remained elevated from 20–120 min time points in the CC, CR and RC offspring. In the RR offspring corticosterone

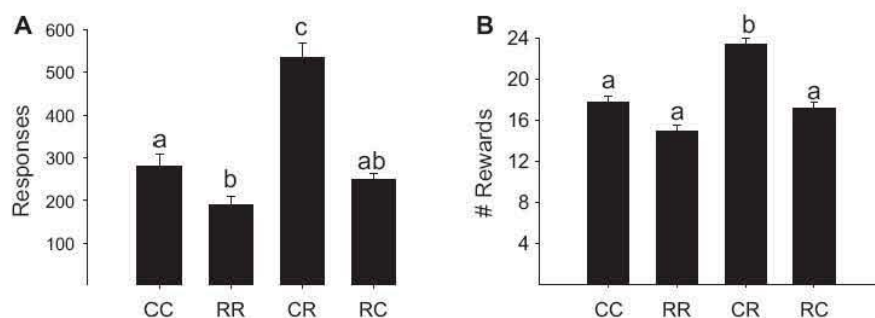
### OPEN FIELD (OF)



**Fig. 2.** Open field test. (A) Center zone entries, (B) border zone entries, (C) center zone time, (D) border zone time, (E) center zone distance, (F) border zone distance and (G) total distance. Offspring of rats fed with control (C=20% casein) or restricted (R=10% casein) diet during pregnancy (first letter) and lactation (second letter). Mean ± SEM, n=8 pups from different litters. Groups not sharing a letter are statistically different,  $p < 0.05$ .



**Fig. 3.** Operant conditioning. (A) Number of FR1 sessions and (B) FR5 sessions to reach performance criterion. Offspring of rats fed with control (C=20% casein) or restricted (R=10% casein) diet during pregnancy (first letter) and lactation (second letter). Mean  $\pm$  SEM,  $n=8$  pups from different litters. Groups not sharing a letter are statistically different,  $p < 0.05$ .



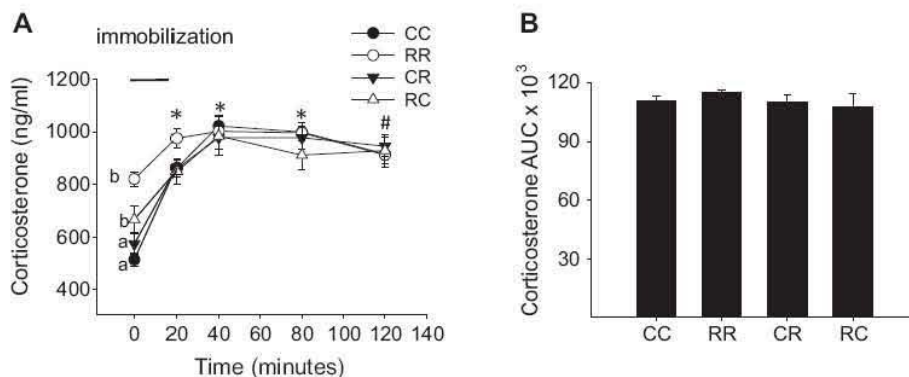
**Fig. 4.** Progressive ratio test. (A) Average number of responses and (B) reinforcements earned during 10 sessions. Offspring of rats fed with control (C=20% casein) or restricted (R=10% casein) diet during pregnancy (first letter) and lactation (second letter). Mean  $\pm$  SEM,  $n=8$  pups from different litters. Groups not sharing a letter are statistically different,  $p < 0.05$ .

levels subsided to 0 time point levels by 120 min. There were no differences among groups for overall corticosterone levels – area under the curve (Fig. 5B).

#### 4. Discussion

The goal of these studies was to assess anxiety, exploration, associative learning and motivation behaviors in female offspring born to mothers administered a 50% reduction in protein during pregnancy and lactation. In addition to behavioral outcomes, morphometric and corticosterone measurements were determined in offspring. Maternal protein restriction reduced pup birth weights and increased the ano-genital distance which in many species

provides an external marker of sexual differentiation at birth (Manno III, 2008). An increase in the ano-genital distance indicates prenatal exposure to maternally derived steroids (Hotchkiss et al., 2007). We have also reported increases in ano-genital distance in offspring born to prenatally protein restricted mothers, following the identical diets used here, resulting in elevated maternal progesterone, corticosterone, estradiol, and testosterone concentration at 19 days gestation (Guzman et al., 2006; Zambrano et al., 2005). Although speculative, effects of these steroids on fetal development could have a role in the current behavioral findings since we previously reported behavioral impairments in male offspring administered the identical protein restriction diet used in this study (Reyes-Castro et al., 2011 a,b).



**Fig. 5.** (A) Immobilization and corticosterone measurement at PND 220. Groups not sharing a letter are statistically different; \* indicates within group differences from 0 time point; # indicates difference from 0 time point for all groups except the RR offspring,  $p < 0.05$ . (B) Area under the curve (AUC) for overall corticosterone levels. Mean  $\pm$  SEM,  $n=8$  offspring from different litters.

Results from the EPM did show perinatal diet differences – decreases in open arm time and distance in RR and RC offspring. These behavioral changes are consistent to previous studies in similar rodent models and indicative of increased anxiety phenotype (Almeida et al., 1993). In males we have shown the CR and RC offspring make more open arm entries and the RR, CR, and RC offspring spend more time in the open arms than the CC offspring (Reyes-Castro et al., 2011a). Taken together, the pre and/or postnatal protein restricted male offspring show increased approach and less avoidance behavior (less anxiety) and thus exhibited disinhibition of avoidance as compared to controls (Reyes-Castro et al., 2011a). However, the current observations in female offspring submitted to the same protein restrictions during development did not duplicate the findings in males and hence is an example of sex specific differences in our perinatal protein restriction paradigm.

In the open field, differences were detected in the RR and RC offspring traveling less distance in the center zone with only the RC offspring showing decreases in center and border zone entries. This increase in avoidance/risk assessment is indicative of decreased exploration and possibly increased anxiety or stress in both the RR and RC offspring which is supported by other studies showing a similar behavioral phenotype (Gallo, 1981; Levay et al., 2008; Trzcinska et al., 1999; Watkins et al., 2008). In males, pre and postnatal protein restricted offspring (RR) showed a marginal decrease in the number of center zone entries, thus suggesting an increased anxiety state (Reyes-Castro et al., 2011a), similar to the female RC offspring in this study.

Behavioral observations during operant conditioning revealed the RR and CR offspring required more sessions to attain performance criterion during acquisition of FR-1 schedule and the RR, CR and RC offspring all required more sessions to perform to criterion during FR-5 schedule of reinforcement compared to CC offspring. So, during FR-1 training pre and postnatal protein restriction in combination (RR offspring) or postnatal protein restriction alone (CR offspring) caused learning impairments. However, all experimental offspring required more sessions to reach performance criterion during FR-5 sessions. The increased number of sessions to attain performance criterion during operant conditioning implies impairment in procedural and/or associative learning in the experimental groups. We have recently reported learning impairment during FR-1 conditioning in male RC offspring and in male RR, CR and RC offspring during FR-5 conditioning (Reyes-Castro et al., 2011b). So in this perinatal protein restriction paradigm, prenatal protein restriction alone (RC offspring) in males impaired FR-1 performance while in females postnatal protein restriction (RR and CR) impaired FR-1 performance. These results suggest that the critical window for the development of the brain areas underlying task performance is earlier in males than females.

The cognitive deficits we report in these experimental offspring are consistent with impaired learning in adult rat offspring globally undernourished during gestation (30% reduction from *ad libitum* consumption) using concurrent variable-interval schedules (Landon et al., 2007). Similarly adult sheep offspring prenatally undernourished (a 50% reduction in diet) display impaired cognitive flexibility as assessed by learning speed during reversal tasks in a T-maze (Erhard et al., 2004). Perinatal diet restriction or protein restriction impairs spatial learning and memory in the Morris water maze (Tonkiss et al., 1997; Zhang et al., 2010), in the differential reinforcement of low rates operant task (Tonkiss et al., 1990a) and the radial arm maze (Ranade et al., 2008) in male rat offspring. Although those studies do not precisely reflect the dietary challenges and operant tasks we administered, a commonality exists in our offspring exhibiting learning impairment during operant conditioning. Additionally, we have recently reported learning impairment in male offspring administered the identical protein restriction protocol (Reyes-Castro et al., 2011b). It should be noted

that our paradigm is only a 50% reduction of protein in an isocaloric diet (10% casein) which is a more modest protein restriction versus those studies mentioned above which administered an approximately 70% protein reduction (6% casein).

In this study differences in motivation during progressive ratio testing were observed – the RR group responded less and the CR group responded more than CC offspring and no differences were observed between groups during the free sucrose consumption implying similar appetitive/consummatory behaviors. These results indicate that pre and postnatal protein restriction in combination (RR offspring) reduces motivation, similarly to what we have reported in male protein restricted offspring (Reyes-Castro et al., 2011b). On the other hand, protein restriction during the postnatal period alone (CR offspring) increases motivation. As a basis for decreased motivation in the RR offspring, prenatal exposure to androgens have been shown to induce aversive properties to appetitive stimuli postnatally (Dominguez-Salazar et al., 2008). We have previously reported increases in maternal steroids near term in an identical protein restriction model (Guzman et al., 2006; Zambrano et al., 2005). The increased motivation displayed by the CR offspring is consistent with a previous study that revealed prenatal protein restriction increases the response for reward in adult male rats (Tonkiss et al., 1990b). In males we have reported decreased motivation in all experimental groups, i.e. RR, RC and CR offspring (Reyes-Castro et al., 2011b). Our studies in pre and/or postnatal protein restricted males and females show sex specific outcomes during progressive ratio testing.

Corticosterone levels measured during immobilization show that the RR and RC offspring had elevated corticosterone levels at the 0 min time point of immobilization and no difference in the CR offspring. This increased basal corticosterone could be a general physiological change in these offspring consistent with what has been previously reported – increased basal corticosterone concentrations have been measured in pre and postnatal food restricted weaned and adult rats (Leonhardt et al., 2002; Sebaai et al., 2004). Those studies suggest that developmental programming of the HPA axis by fetal and early postnatal malnutrition can result in persistent impairment of feedback (Chisari et al., 2001). In this report we measured an increase in basal corticosterone prior to immobilization in RR and RC offspring suggesting pre and postnatal protein restriction in combination or prenatal protein restriction alone can have a negative effect on HPA axis function during physical restraint. However as reported, in males there was an overall difference in corticosterone levels (area under the curve) in the RR offspring (Reyes-Castro et al., 2011a) but in this study there was no cumulative difference.

In conclusion, the behavioral perturbations observed in female offspring in anxiety, exploration, learning and motivation behavior are potentially due to the insufficient protein (essential amino acids) or fatty acids/lipids available during critical windows of brain development. Differential hormonal responses to the dietary challenge in both mother and fetus must also be considered as potential programming mechanisms as steroids in particular greatly determine neural proliferation, differentiation, and migration (Jazin and Cahill, 2010). Observed differences clearly reflect impairments in anxiety, exploration, cognition and motivation without affecting consummatory behavior, as determined by the free sucrose consumption test. Mechanistically one might hypothesize that the lack of sufficient protein components required for normal neurodevelopment resulted in persistent dysfunction of the limbic system and cortex (Bedi, 2003; Lister et al., 2005, 2006; Morgane et al., 1993) at the time of testing. We have also shown that protein restriction during pregnancy negatively impacts normal fetal brain development by changes in maternal lipid metabolism (Torres et al., 2010). Prenatal protein restriction significantly reduces maternal liver desaturase and elongase gene expression, and formation

of the LC-PUFAs: arachidonic and docosahexaenoic acid (Torres et al., 2010). Thus, fetuses born to protein restricted mothers exhibit low body weight as well as reduced brain fat including the content of docosahexaenoic acid in the brain (Torres et al., 2010). This study shows that a modest reduction in protein during the perinatal period can have profound effects on offspring. These findings are similar to what we have previously reported in male offspring protein restricted during the same critical developmental windows (Reyes-Castro et al., 2011a,b). Further studies of discrete brain areas, especially neurons and support cells of the limbic system and the hypothalamic pituitary adrenal axis are necessary to determine mechanisms.

### Acknowledgements

LRC is a graduate student from Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and a recipient of CONACyT fellowship.

### References

- Almeida, S.S., de Oliveira, L.M., Graeff, F.G., 1991. Early life protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl.)* 103, 513–518.
- Almeida, S.S., Garcia, R.A., de Oliveira, L.M., 1993. Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 54, 749–752.
- Almeida, S.S., Tonkiss, J., Galler, J.R., 1996a. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20, 389–402.
- Almeida, S.S., Tonkiss, J., Galler, J.R., 1996b. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav.* 60, 675–680.
- Antonow-Schlorke, I., Schwab, M., Cox, L.A., Li, C., Stuchlik, K., Witte, O.W., Nathanielsz, P.W., McDonald, T.J., 2011. Vulnerability of the fetal primate brain to moderate reduction in maternal global nutrient availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 3011–3016.
- Bedi, K.S., 2003. Nutritional effects on neuron numbers. *Nutr. Neurosci.* 6, 141–152.
- Benton, D., 2008. The influence of children's diet on their cognition and behavior. *Eur. J. Nutr.* 47 (Suppl. 3), 25–37.
- Chisari, A.N., Giovambattista, A., Perello, M., Spinedi, E., 2001. Impact of maternal undernutrition on hypothalamic-pituitary-adrenal axis and adipocyte functions in male rat offspring. *Endocrine* 14, 375–382.
- Coupe, B., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Lefevre, F., Mairesse, J., Dickes-Coopman, A., Silhol, M., Tapia-Arancibia, L., Lesage, J., Vieau, D., 2009. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J. Neuroendocrinol.* 21, 40–48.
- da Silva, H.A., Franconin-Silva, A.L., Valadares, C.T., Fukuda, M.T., Almeida, S.S., 2005. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. *Behav. Brain Res.* 162, 240–245.
- Dominguez-Salazar, E., Camacho, F.J., Paredes, R.G., 2008. Perinatal inhibition of aromatization enhances the reward value of sex. *Behav. Neurosci.* 122, 855–860.
- Erhard, H.W., Boissy, A., Rae, M.T., Rhind, S.M., 2004. Effects of prenatal undernutrition on emotional reactivity and cognitive flexibility in adult sheep. *Behav. Brain Res.* 151, 25–35.
- Galler, J.R., Ramsey, F.C., Morley, D.S., Archer, E., Salt, P., 1990. The long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus. IV. Performance on the national high school entrance examination. *Pediatr. Res.* 28, 235–239.
- Galler, J.R., Waber, D., Harrison, R., Ramsey, F., 2005. Behavioral effects of childhood malnutrition. *Am. J. Psychiatry* 162, 1760–1761.
- Gallo, P.V., 1981. Physiological and behavioral consequences of maternal and post-weaning protein restriction. *Physiol. Behav.* 26, 77–84.
- Guzman, C., Cabrera, R., Cardenas, M., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2006. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J. Physiol.* 572, 97–108.
- Hotchkiss, A.K., Lambright, C.S., Ostby, J.S., Parks-Saldutti, L., Vandenberg, J.G., Gray Jr., L.E., 2007. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 96, 335–345.
- Jahnke, S., Bedi, K.S., 2007. Undernutrition during early life increases the level of apoptosis in the dentate gyrus but not in the CA2+CA3 region of the hippocampal formation. *Brain Res.* 1143, 60–69.
- Jaron, D., Galal, O., 2009. Food security and population health and well being. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 18, 684–687.
- Jazin, E., Cahill, L., 2010. Sex differences in molecular neuroscience: from fruit flies to humans. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 9–17.
- Landon, J., Davison, M., Krageloh, C.U., Thompson, N.M., Miles, J.L., Vickers, M.H., Fraser, M., Breier, B.H., 2007. Global undernutrition during gestation influences learning during adult life. *Lear. Behav.* 35, 79–86.
- Leonhardt, M., Lesage, J., Dufourny, L., Ckes-Coopman, A., Montel, V., Dupouy, J.P., 2002. Perinatal maternal food restriction induces alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and in plasma corticosterone-binding globulin capacity of weaning rat pups. *Neuroendocrinology* 75, 45–54.
- Levy, E.A., Paolini, A.G., Govic, A., Hazi, A., Penman, J., Kent, S., 2008. Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction. *Behav. Brain Res.* 191, 164–172.
- Lister, J.P., Blatt, G.J., DeBassio, W.A., Kemper, T.L., Tonkiss, J., Galler, J.R., Rosene, D.L., 2005. Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus* 15, 393–403.
- Lister, J.P., Tonkiss, J., Blatt, G.J., Kemper, T.L., DeBassio, W.A., Galler, J.R., Rosene, D.L., 2006. Asymmetry of neuron numbers in the hippocampal formation of prenatally malnourished and normally nourished rats: a stereological investigation. *Hippocampus* 16, 946–958.
- Lucas, A., 2005. Long-term programming effects of early nutrition – implications for the preterm infant. *J. Perinatol.* 25 (Suppl. 2), S2–S6.
- Manno III, F.A., 2008. Measurement of the digit lengths and the anogenital distance in mice. *Physiol. Behav.* 93, 364–368.
- McIntire, D.D., Bloom, S.L., Casey, B.M., Leveno, K.J., 1999. Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N. Engl. J. Med.* 340, 1234–1238.
- Miles, J.L., Landon, J., Davison, M., Krageloh, C.U., Thompson, N.M., Triggs, C.M., Breier, B.H., 2009. Prenatally undernourished rats show increased preference for wheel running. V. Lever pressing for food in a choice task. *Br. J. Nutr.* 101, 902–908.
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Galler, J.R., 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 91–128.
- Morgane, P.J., Galler, J.R., Mokler, D.J., 2005. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog. Neurobiol.* 75, 143–160.
- Morgane, P.J., Mokler, D.J., Galler, J.R., 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 471–483.
- Ranade, S.C., Rose, A., Rao, M., Gallego, J., Gressens, P., Mani, S., 2008. Different types of nutritional deficiencies affect different domains of spatial memory function checked in a radial arm maze. *Neuroscience* 152, 859–866.
- Reyes-Castro, L.A., Rodriguez, J.S., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Chavira, R., Bautista, C.J., McDonald, T.J., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2011a. Pre and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav. Brain Res.*
- Reyes-Castro, L.A., Rodriguez, J.S., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Wimmer, R.D., McDonald, T.J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2011b. Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 177–182.
- Rice, D., Barone Jr., S., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 (Suppl. 3), 511–533.
- Sebaai, N., Lesage, J., Breton, C., Vieau, D., Deloof, S., 2004. Perinatal food deprivation induces marked alterations of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in 8-month-old male rats both under basal conditions and after a dehydration period. *Neuroendocrinology* 79, 163–173.
- Stein, A.D., Pierik, F.H., Verrips, G.H., Susser, E.S., Lumey, L.H., 2009. Maternal exposure to the Dutch famine before conception and during pregnancy: quality of life and depressive symptoms in adult offspring. *Epidemiology* 20, 909–915.
- Tanumihardjo, S.A., Anderson, C., Kaufer-Horwitz, M., Bode, L., Emenaker, N.J., Haqq, A.M., Satia, J.A., Silver, H.J., Stadler, D.D., 2007. Poverty, obesity, and malnutrition: an international perspective recognizing the paradox. *J. Am. Diet. Assoc.* 107, 1966–1972.
- Taylor, D.J., Howie, P.W., 1989. Fetal growth achievement and neurodevelopmental disability. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 96, 789–794.
- Tonkiss, J., Galler, J.R., Formica, R.N., Shukitt-Hale, B., Timm, R.R., 1990a. Fetal protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats. *Physiol. Behav.* 48, 73–77.
- Tonkiss, J., Shukitt-Hale, B., Formica, R.N., Rocco, F.J., Galler, J.R., 1990b. Prenatal protein malnutrition alters response to reward in adult rats. *Physiol. Behav.* 48, 675–680.
- Tonkiss, J., Shultz, P.L., Shumsky, J.S., Galler, J.R., 1997. Development of spatial navigation following prenatal cocaine and malnutrition in rats: lack of additive effects. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 363–372.
- Torres, N., Bautista, C.J., Tovar, A.R., Ordaz, G., Rodriguez-Cruz, M., Ortiz, V., Granados, O., Nathanielsz, P.W., Larrea, F., Zambrano, E., 2010. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (2), E270–E277.
- Trzctnska, M., Tonkiss, J., Galler, J.R., 1999. Influence of prenatal protein malnutrition on behavioral reactivity to stress in rats. *Stress* 3, 71–83.
- Watkins, A.J., Wilkins, A., Cunningham, C., Perry, V.H., Seet, M.J., Osmond, C., Eckert, J.J., Torrrens, C., Gagampang, F.R., Cleal, J., Gray, W.P., Hanson, M.A., Fleming, T.P., 2008. Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *J. Physiol.* 586, 2231–2244.
- Zambrano, E., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Guzman, C., Garcia-Becerra, R., Boeck, L., Diaz, L., Menjivar, M., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2005. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J. Physiol.* 563, 275–284.
- Zhang, Y., Li, N., Yang, Z., 2010. Perinatal food restriction impaired spatial learning and memory behavior and decreased the density of nitric oxide synthase neurons in the hippocampus of adult male rat offspring. *Toxicol. Lett.* 193, 167–172.



## Research report

**Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats**L.A. Reyes-Castro<sup>a,1</sup>, J.S. Rodríguez<sup>b,1</sup>, G.L. Rodríguez-González<sup>a</sup>, R. Chavira<sup>a</sup>, C.J. Bautista<sup>a</sup>, T.J. McDonald<sup>b</sup>, P.W. Nathanielsz<sup>b</sup>, E. Zambrano<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, 14000, Mexico<sup>b</sup> Center for Pregnancy and Newborn Research, Department of Obstetrics, University of Texas Health Science Center San Antonio, San Antonio, TX, 78229, USA

## ARTICLE INFO

*Article history:*

Received 29 October 2010

Received in revised form 26 May 2011

Accepted 9 June 2011

Available online 17 June 2011

*Keywords:*Anxiety  
Stress  
Locomotion  
Protein restriction  
Emotional reactivity

## ABSTRACT

Developmental programming resulting from a suboptimal intrauterine environment can predispose offspring to a wide-range of lifelong health complications. Little is known about the effects maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation has on offspring neurodevelopment. We hypothesized that maternal isocaloric low protein diet during pregnancy and/or lactation would negatively influence male offspring affect and risk assessment behaviors as measured by elevated plus maze and open field tests. Control mothers received 20% casein (C) and restricted mothers (R) 10% casein to provide four groups: CC, RR, CR, and RC (first letter pregnancy diet and second letter lactation diet) to evaluate effects of maternal diet on offspring risk assessment, anxiety and exploratory behaviors. Elevated plus maze results showed an effect of pre- and/or postnatal diet manipulation in open arm time ( $p < 0.05$ ) with increases seen in the RR ( $157 \pm 22.7$  s), CR ( $137 \pm 23.2$  s) and RC ( $146.8 \pm 10.8$  s) offspring relative to CC ( $52 \pm 8.6$  s) offspring. This behavior indicates decreased avoidance (less anxiety) and increased exploration by experimental groups. However, in the open field test the RR ( $17 \pm 4.2$  entries) offspring entered the center zone less than the CC ( $35 \pm 6.6$  entries) offspring thus exhibiting increased anxiety with no other groups showing effects. Elevated levels of corticosterone were measured before, during and after immobilization in the RR compared to CC offspring. These findings show protein restriction during critical periods of development negatively program offspring behavior. The underlying anatomical structures affected remain to be elucidated.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

**1. Introduction**

Fetal and offspring morbidity associated with poor maternal nutrition during development is a global health concern and results in developmental programming of adult disease in offspring [1]. In particular, a well-balanced maternal diet is vital for the development of the fetal and neonatal central nervous system [2]. For example, cognition and behaviors such as learning and memory, anxiety, and risk assessment depend on the proper development of the limbic system and associated neural areas [3]. Impaired development of limbic system neurons, which play an important role in

normal affect and cognition, occurs when maternal protein intake is reduced with resulting brain abnormalities [4–8]. Epidemiological studies also show that insufficient protein availability during development has detrimental effects on the brain and subsequent behavior, cognition and emotional reactivity [9–16]. These critical findings indicate the need for precisely controlled animal models to study perinatal nutritional challenges and their effects on offspring development and behavior.

Several studies report effects of poor maternal nutrition on the development of brain and behavioral outcomes in offspring. For example, protein restriction during gestation and/or lactation modifies neuronal proliferation in the hypothalamic and hippocampal regions in rat offspring [17]. Behavioral outcomes following prenatal protein restriction (6–9% casein) or other types of malnutrition in rodent offspring reveal high impulsiveness and exploration (less anxiety) in the elevated plus maze (EPM) and short inhibitory avoidance (disinhibition) latencies in the elevated T-maze [18–22]. However, several outcomes have been described in the open field test – an anxious phenotype, decreased locomotion as well as no effects [22–27]. Although equivocal and sometimes

*Abbreviations:* C, control diet; R, protein restriction diet; CC, control diet during pregnancy and lactation; RR, protein restricted diet during pregnancy and lactation; CR, control diet during pregnancy and protein restriction during lactation; RC, protein restriction during pregnancy and control diet during lactation; PND, postnatal day; HPA, hypothalamo-pituitary-adrenal axis; EPM, elevated plus maze.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5487 0900x2417, fax: +52 55 5655 9859.

E-mail address: [zamgon@servidor.unam.mx](mailto:zamgon@servidor.unam.mx) (E. Zambrano).

<sup>1</sup> These authors equally contributed as first author.

contradictory, these findings on emotional reactivity are indicative of potential behavioral modifications due to neurodevelopmental modulation subsequent to insufficient protein in early life and establish the concept that reduced perinatal protein has effects on emotional reactivity when protein is reduced by 75% of control diet (25% protein diet reduced to 6%) [18–27]. However, the effects of smaller decreases in perinatal protein have yet to be determined. Since behavioral effects have been reported following extreme reduction in protein, we sought to investigate the potential effects on offspring behavior of a more modest protein restriction (a 50% decrease) which potentially more accurately reflects the human dietary insecurities in developed countries (for review see Ref. [28]). We assessed anxiety and exploratory behaviors, using the EPM and open field testing, in adult male rat offspring protein restricted during pregnancy and/or lactation. Control mothers received 20% casein (C) while restricted mothers (R) received 10% casein to provide four groups: CC, RR, CR, and RC (first letter pregnancy diet and second letter lactation diet). These dietary manipulation combinations have not previously been administered in the context of anxiety and exploratory assessments. To more directly match human conditions, offspring were not cross-fostered but kept with their biological dams during development. We hypothesized that perinatal protein restriction would affect development of anxiety and exploratory-based behaviors.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Care and maintenance of animals

All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the “Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán” (INNSZ), Mexico. Details of maternal diet, breeding, and management of the four offspring groups have been published in detail [29]. Briefly, 40 virgin female albino Wistar rats 11 to 13 weeks of age and weighing  $212 \pm 6$  g (mean  $\pm$  SEM) were obtained from INNSZ. Female rats with regular estrous cycles were fed normal laboratory chow (control diet, Zeigler Rodent RQ 22-5, USA) under controlled lighting (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m. at 22–23°C) and mated overnight with proven male breeders. The day spermatozoa were present in the vaginal smear was designated as day of conception (day 0). Only rats impregnated within 5 days following introduction of the fertile male were retained in the study. Pregnant rats were transferred to individual acrylic cages and allocated randomly to one of two groups: fed either 20% casein ( $n=20$ , control diet–C) or 10% casein isocaloric diet ( $n=20$ , restricted diet–R) [30]. Food and water were available *ad libitum* and chow provided in the form of flat biscuits retained behind a tray grill through which the rats nibbled the food.

Offspring delivery occurred in the early daylight hours between 9:00 a.m. and noon on post-conception day 22, which was designated postnatal day (PND) 0. Pup weight and morphometric parameters were recorded at birth. Anogenital distance was measured with calipers and expressed as ano-genital distance/body weight as previously reported [29–34]. Using our previously published data [31], sex was judged according to whether the ano-genital distance was <(female) or >than (male) 2.5 mm. To ensure homogeneity of study subjects, litters of over 14 pups, or less than 10 pups, were not included in the study. Litters were adjusted to 10 pups for each dam while maintaining as close to a 1:1 sex ratio as possible. Morphometric measurements were performed on the litters prior to culling them to 10. For the lactation period 4 groups were established: CC, RR, CR, and RC (first letter diet received during pregnancy and second letter maternal diet during lactation) resulting in 8 animals from different litters per group (8 each of male CC, RR, CR and RC offspring). After weaning (PND 21), all pups were fed the C diet and housed 4 offspring in the same treatment group per cage. Two weeks prior to behavioral testing (PND 75) and during the behavioral experiments, subjects were maintained on a reverse 12 h light/dark cycle (lights off at 7 a.m. and on at 7 p.m.). Behavioral assessments occurred during the dark phase on PNDs 90–95. The EPM was administered first followed by the open field test on the next day.

### 2.2. Elevated plus maze

Eight unrelated naïve subjects per treatment group were tested. The EPM was constructed of dark grey plastic situated 64 cm above the floor. It consisted of two unprotected arms (open arms) facing each other, and two arms protected by high grey walls (closed arms). The four arms (45 cm  $\times$  10 cm each) extended from a common central platform (10 cm  $\times$  10 cm). The light level was 30 lux in the open arms and 6 lux in the closed arms. The rat's position on the maze was recorded via a video camera mounted on the ceiling above the center of the maze. The camera was

connected to a video tracking motion analysis system (Ethovision, Noldus Information Technology by Wageningen, The Netherlands) running on a personal computer. To start the session, each rat was placed individually into the center of the maze facing an open arm. After 10 min of EPM exploration, the rat was returned to its home cage and the EPM was cleaned with 70% ethanol. An experimenter naïve to treatment group of the subject being tested manually scored the number of entries into the predefined zones of the open and closed arms, while the Ethovision system monitored the distance moved and the time spent in the different zones. An arm entry was scored only if the rat's center of gravity entered into the arm. The animals were tested in a randomized sequence based on early life dietary manipulation. We excluded animals that fell off the EPM during testing (2 from the RC group and 1 from the RR) and substituted that animal with another male from the same litter.

### 2.3. Open field

The same animals studied in the EPM were evaluated the next day in a 60-min open field test. The open field, made of dark grey Plexiglas, consisted of a four square arena (101 cm  $\times$  101 cm and 34 cm high) which was located in an experimental room illuminated by low light (12 lux). A video camera was mounted above the arena connected to a monitor and a video tracking motion analysis system (Ethovision, Noldus Information Technology by, Wageningen, The Netherlands) to record the locomotor activity of the rats in the entire arena (total distance measured in meters). A virtual square center was defined in the open field arena and the locomotor activity of the rats inside this zone was measured. Each rat was placed individually into the center of the open field arena and subjects of each group were tested equally in all open field apparatuses. Following each session all zones were cleaned with 70% ethanol.

### 2.4. Immobilization and corticosterone measurement

Following the open field test but prior to immobilization/corticosterone assessment, progressive ratio sessions commenced on PND 96 to assess motivation (findings to be reported elsewhere) during which the subjects were water restricted. Subjects were returned to *ad libitum* water following that task. Starting at 12:00 h on PND 220, a blood sample was taken from the tail vein to determine time 0 corticosterone serum levels. Animals were then immobilized for 20 min and blood samples obtained at 20, 40, 80, and 120 min. Blood samples were centrifuged at 4°C for 15 min at 3500 rpm to remove red blood cells and serum stored at –20°C until all samples were analyzed. Corticosterone serum levels were determined by radioimmunoassay using commercial rat kits, DPC Coat-a-count (TKRC1) from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). Intra- and inter-assay variability were <6 and <7%. The kit was used in accordance with manufacturer's instructions and samples were measured in duplicate.

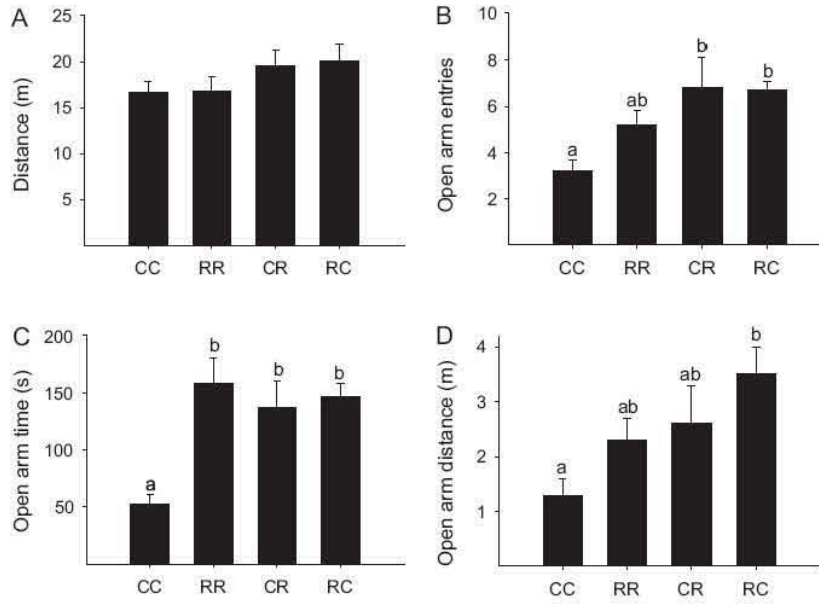
### 2.5. Statistical analyses

All data are presented as mean  $\pm$  SEM, alpha level was set at 0.05. Differences in body weight and morphometric measurements at birth were calculated by *t*-test. Body weight at adult age was performed by one-way ANOVA. Behavioral endpoints and corticosterone area under the curve were analyzed by one-way ANOVA with post hoc analyses using Tukey's (SigmaStat 3.5). Corticosterone levels across time points and between treatment groups were compared by using 2-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests (GraphPad Prism 5.0).

## 3. Results

### 3.1. Offspring morphometrics

Of the forty dams utilized in this study, 4 dams were eliminated from each of the C and R groups for various factors. Additionally, we have previously reported differences in the amount of food intake in dams at 10 days lactation [29] and no differences in preweaning offspring [35], so food and water intake were not measured in this study. Table 1 shows morphometric analysis of offspring at birth. Body weight of pups born to R dams was lower than that of pups from dams fed the C diet. Anogenital distance relative to body weight was increased by 7% in the R offspring. No changes were observed in other parameters at birth. As adults when operant assessments began (PND 90), the CR offspring body weight was lower than that of CC and RC offspring while RR offspring did not differ from any of the other groups (Table 1).



**Fig. 1.** Elevated plus maze comparisons. (A) Distance traveled shows no difference between groups. (B) Open arm entries reveal the CR and RC made more entries than the CC group. (C) Open arm time shows the RR, CR and RC offspring spent more time in the open arm as compared to the CC offspring. (D) Open arm distance shows the RC group traveled more in the open arm as compared to the CC group with no differences in the RR and CR offspring. Groups not sharing a letter are statistically different,  $p < 0.05$ . Mean  $\pm$  SEM,  $n = 8$  offspring from different litters.

**Table 1**

Pup weight and birth morphometrics from offspring born to dams fed the control (20% casein) or restricted (10% casein) diet during pregnancy and adult weights (PND 90) from CC, RR, CR and RC offspring are shown. \* denotes different from control; groups not sharing a letter are statistically different,  $p < 0.05$ . Mean  $\pm$  SEM;  $n = 8$ , the number of litters from which subjects were obtained.

Newborn offspring	Control ( $n = 8$ )		Restricted ( $n = 8$ )	
Weight (g)	5.8 $\pm$ 0.07		5.2 $\pm$ 0.01*	
Length (mm)	4.6 $\pm$ 0.03		4.5 $\pm$ 0.05	
Ano-genital distance (mm)	3.4 $\pm$ 0.10		3.2 $\pm$ 0.02	
Ano-genital distance (mm/g)	0.58 $\pm$ 0.01		0.62 $\pm$ 0.01*	
Head diameter (mm)	11.4 $\pm$ 0.02		11.4 $\pm$ 0.02	
Abdominal diameter (mm)	12.2 $\pm$ 0.03		12.2 $\pm$ 0.03	
Head:abdominal ratio	0.93 $\pm$ 0.01		0.93 $\pm$ 0.01	
Adult Offspring	CC	RR	CR	RC
Body weight (g)	330 $\pm$ 13a	298 $\pm$ 13ab	281 $\pm$ 6b	340 $\pm$ 7a

3.2. Elevated plus maze

Elevated plus maze comparisons for total distance traveled revealed no differences between groups [ $F_{(3,31)} = 1.17$ ,  $p = 0.34$ , Fig. 1A]. Comparisons for open arm entries showed the CR and RC offspring made more open arm entries compared to the CC offspring but not RR [ $F_{(3,35)} = 4.54$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 1B]. RR, CR and RC offspring spent an increased amount of time in the open arms compared with the CC offspring [ $F_{(3,35)} = 7.45$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 1C]. RC offspring showed

**Table 2**

Open field test comparisons. An overall effect of perinatal diet was determined for number of center zone entries ( $p < 0.05$ ), post hoc comparisons showed the RR offspring entered the center zone marginally less than the CC offspring ( $\dagger$ ,  $p = 0.07$ ). Mean  $\pm$  SEM;  $n = 8$  offspring from different litters.

	Number entries center zone	Time center zone (s)	Time border zone (s)	Distance center zone (m)	Distance border zone (m)	Total Distance (m)
CC	35.8 $\pm$ 6.6	124.6 $\pm$ 25.2	3475.4 $\pm$ 25.1	14.1 $\pm$ 2.4	114.5 $\pm$ 10.3	128.7 $\pm$ 9
RR	17.6 $\pm$ 4.2†	116.7 $\pm$ 33.0	3483.3 $\pm$ 33.0	9.4 $\pm$ 2.4	72.5 $\pm$ 12.3	82.0 $\pm$ 11
CR	34.4 $\pm$ 5.1	127.7 $\pm$ 17.0	3472.3 $\pm$ 17.0	13.4 $\pm$ 2.4	74.6 $\pm$ 10.8	88.1 $\pm$ 11.2
RC	19.2 $\pm$ 3.6	141.0 $\pm$ 59.2	3459.0 $\pm$ 59.2	7.2 $\pm$ 1.7	76.2 $\pm$ 16.0	83.5 $\pm$ 15.4

increased open arm distance traveled compared with CC offspring but not RR and CR [ $F_{(3,35)} = 3.08$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 1D].

3.3. Open field

Table 2 shows the comparisons in the open field behavioral endpoints. An overall effect of pre- and/or postnatal diet in offspring was determined for number of entries into the center zone [ $F_{(3,35)} = 3.69$ ,  $p < 0.05$ ], with a post hoc borderline effect ( $p = 0.07$ ) in the RR offspring making less entries than the CC with no differences in the CR and RC groups. Comparisons for time spent in the center or border zones, distance traversed in center zone or border zone and total distance showed no differences between groups.

3.4. Immobilization and corticosterone levels

There was an overall effect of group ( $F_{(3,20)} = 4.08$ ,  $p < 0.05$ ) and time ( $F_{(4,20)} = 20.93$ ,  $p < 0.0001$ ) on serum corticosterone levels but no interaction ( $F_{(12,80)} = 1.79$ ,  $p = 0.06$ ) between variables (Fig. 2A). Fig. 2A represents average corticosterone serum levels at 0, 20, 40, 80 and 120 min time points during physical restraint (immobilization) in the CC, RR, CR and RC offspring. Increases in corticosterone were observed in the CC, RR and RC groups at 20 min; in all groups at 40 min; in the CC, CR and RC groups at 80 min; and in the CC and CR offspring at 120 min. Fig. 2B shows corticosterone area under the curve (AUC) for the entire duration of behavioral assessment. RR offspring displayed an overall increased corticosterone

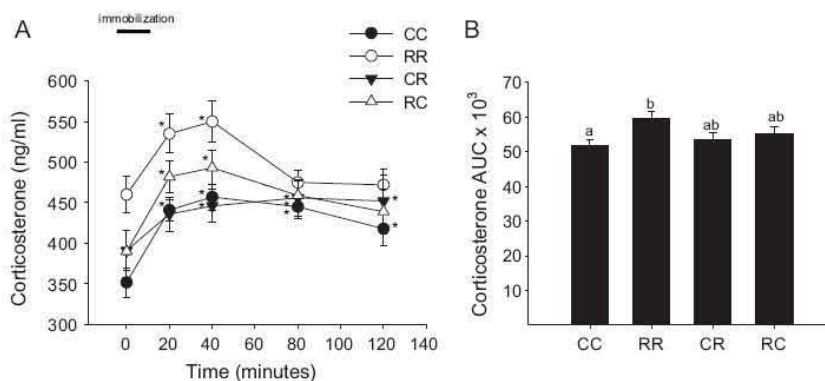


Fig. 2. Immobilization and corticosterone measurement at PND 220. (A) An overall effect of perinatal diet on corticosterone levels was determined between groups during immobilization and differences within groups are shown across time; \* indicates within group differences from time 0,  $p < 0.05$ . (B) Area under the curve (AUC) analysis indicates that RR offspring had increased corticosterone production compared to CC offspring during the immobilization test. Groups not sharing a letter are statistically different,  $p < 0.05$ . Mean  $\pm$  SEM,  $n = 8$  offspring from different litters.

AUC compared with CC offspring ( $p < 0.05$ ), while the CR and RC offspring had intermediate values that did not reach significance.

#### 4. Discussion

The goal of these studies was to assess anxiety/stress and exploratory/locomotor behavior in male offspring delivered by dams fed a reduced protein diet in two specific windows of offspring development; pregnancy and lactation. Morphometric effects due to maternal protein restriction (50% reduced) were determined in offspring, such as reduced birth weights and increased ano-genital distance, demonstrating the negative effects of decrease in protein intake during pregnancy on fetal maturation. Many studies have reported different effects of maternal protein restriction on birth weight including a decrease [33,36–40], no change [29,41] or increase [42] which may be attributed to the level of protein restriction and/or carbohydrate compensation in an isocaloric diet. Our birth weight results are consistent with outcomes reported in models of intra-uterine growth restriction and fetal programming [43]. In addition, increases in the ano-genital distance of offspring born to protein restricted dams replicates our previous studies [34]. We have also reported a concomitant increase of the ano-genital distance in protein restricted offspring and elevated maternal androgen levels at term [29]. Maternal steroids can cross the placenta, and such exposure to transplacentally acquired androgens in fetal life can increase the ano-genital distance [44]. Effects of androgenic steroids on fetal development could have a role in the observed behavioral findings since human studies report impairment of spatial learning ability and emotional reactivity abnormalities in offspring exposed to excess levels of androgens *in utero* [45,46].

Behavioral observations in the EPM revealed differences in approach/avoidance behavior: the CR and RC offspring made more open arm entries and the RR, CR, and RC offspring spent more time in the open arms than the CC offspring. However, only the RC offspring traveled more in the open arms. Taken together, these pre- and/or postnatal protein restricted offspring show increased approach and less avoidance behavior (less anxiety) and thus exhibited disinhibition of avoidance as compared to controls. The results demonstrate the negative effect of reduced protein during pregnancy and/or lactation in male rats during risk assessment behaviors in the EPM and are supported by previous findings in rats of the same age subsequent to exposure to a greater degree of protein restriction during development [18–21]. The increased exploratory behavior in the RR, CR and RC groups in the EPM is

unlikely due to increased food seeking since no differences were observed during a free sucrose consumption test [34].

In the open field test the pre- and postnatal protein restricted offspring (RR) showed a marginal decrease in the number of center zone entries; less than half the amount of CC center zone entries although it did not reach significant. This behavior is potentially linked to the increase in corticosterone measured in the RR offspring during physical restraint in the immobilization test. The elevated corticosterone levels could be a general physiological response in the RR offspring and thus a similar response could be predicted in the increased anxiety state displayed in the open field apparatus, although no attempts to detect corticosterone levels were implemented during evaluation of that behavior. The lack of effect in the CR and RC groups is in agreement with results obtained with similar developmental programming paradigms [25,26]. Similarly our findings of increased anxiety in the RR offspring are supported by others [22–24,27]. These inconsistent behavioral responses of the experimental groups in the two anxiety/stress based tests were not unexpected. Studies have shown stress-based tests that rely on unconditioned responses, such as in the two tests used here, assess different aspects of affect and that emotional reactivity is multidimensional [47–50]. A recent review states that the EPM, open field apparatus and the light/dark box tests should be administered concomitantly to more adequately assess anxiety/stress since time and/or sequence of test administration and other factors can influence outcomes [47]. One potential effect of testing sequentially across days is that this leads to reduction in observed effects with each subsequent test, in this case the open field. This appears to be a likely explanation for the CR and RC offspring behavior. When rats were administered the open field test they were no longer test naive, since they had previously been exposed to the EPM apparatus [49]. Alternatively, inconsistent results obtained across tests may be due to construct differences between tests or to uncontrolled, intra-individual fluctuations in behavior [47].

Mechanistically one might hypothesize that adequate availability of protein components required during normal neurodevelopment resulted in persistent dysfunction of the limbic system at the time of testing [2,4,7,8]. The effects of perinatal protein restriction on brain development have been reported in rats and swine. In most cases protein was restricted by roughly two-thirds of control diet during gestation and lactation [51,52] or only during pregnancy [53] or lactation [54,55]. Those studies in general show brain sparing in terms of weight. However, another study demonstrates reduced brain weight and volume in rat offspring delivered from dams administered an 8% casein diet during pregnancy or lactation



[54]. As adults those offspring displayed partial recovery of neural cell density with the RC offspring showing permanent residual deficiency versus the CR offspring implicating the prenatal period as a more critical neurodevelopmental time window. Recently, we have shown that protein restriction during gestation significantly decreases delivery to the fetus of essential fatty acids and lipids required for normal brain development in rat [56]. This deficiency in brain fatty acid content could affect important brain regions involved in approach/risk assessment behavior in the experimental offspring resulting in disinhibited behavior specific to the EPM. However, the potentially divergent mechanisms that are responsible for the different outcomes in the two behavioral tests remain to be established.

Human and animal studies show that early exposure to global under nutrition during the perinatal period is often associated with altered hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis function in later life [57,58]. In rodents, maternal under nutrition blunts HPA axis function in fetuses, induces small changes in young adults and is frequently associated with chronic hyperactivity of the neuroendocrine axis in older adults [57,59–61]. However, increased basal corticosterone concentrations have been measured in pre- and postnatal food restricted weaned and adult rats [59,62], which is in agreement with our current findings. Those studies indicate that developmental programming of the HPA axis by fetal and early postnatal under nutrition can result in persistent impairment of feedback [63]. In this report we measured an increase in postnatal corticosterone during immobilization in RR offspring with intermediate corticosterone levels in the RC and CR offspring relative to CC. These results suggest pre- and postnatal protein restriction in combination can have a negative effect on HPA axis function during physical restraint. This observation is in agreement with reports showing increased corticosterone or adrenocorticotrophic hormone levels following dehydration stress in pre- and postnatal nutrient restricted offspring [59,62]. Developmental programming of the HPA axis seems a likely contributor to the behavioral and physiological observations reported here since dysregulation of the HPA axis occurs in response to perinatal protein restriction. At 2 days postnatal age offspring corticosterone levels are decreased, potentially due to the inhibition by high levels of steroid passing from the mother in the milk [33]. After weaning this maternal influence is removed and by 220 days HPA activity was increased in the present study.

In conclusion, human studies have shown negative effects on numerous developmental parameters such as affect, learning, intellect, neuromotor and behavioral development in offspring following perinatal malnutrition [9–16,64]. Our results show that protein restriction during the pre- and postnatal periods (RR), postnatal period alone (CR) or prenatal period alone (RC) disinhibits risk assessment in male offspring in the EPM. However, in the open field apparatus only the RR offspring showed increased avoidance, which could be related to the increased corticosterone levels observed during restraint testing. Additionally, during immobilization the CR and RC offspring had intermediate corticosterone levels demonstrating that protein insufficiency during either pre- or postnatal periods can have unwanted effects on post natal HPA axis function. The behavioral outcomes indicate the complexity of emotional reactivity assessment and the multidimensional nature of emotionality as evident from the differing results in the EPM and open field apparatus. The reduced protein in the RR offspring exacerbated anxiety in the open field, but facilitated less avoidance in the EPM, whereas the CR and RC offspring only showed less avoidance in the EPM and no effects in the open field. The behavioral outcomes observed in male offspring in anxiety and exploratory based behavior show diet specific effects potentially due to the insufficient protein (essential amino acids) or fatty acids/lipids available during critical windows of brain development

and effects on HPA axis activity. Hormonal responses in both dams and fetus must also be considered as regulatory factors together and separately with the protein effects. These differences clearly reflect impairments in affect with only the RR offspring exhibiting obvious concomitant HPA axis abnormality. Further studies of discrete brain areas, especially neurons and support cells of the limbic system, and HPA axis are necessary to determine the mechanisms of insufficiency protein during development.

### Role of funding source

This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT– 48839) México and the NIH HD21350. Funding sources had no role in the study design, collection, analyses, interpretation of data, or the preparation and submission of this report.

### Disclosure

This work is original findings that have not been submitted nor are being considered for publication in any other journal.

### Conflict of interest

There is no conflict of interest to declare for all authors.

### Acknowledgements

L.A. Reyes-Castro and G.L. Rodríguez-González are graduate students from Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and are recipients of CONACyT fellowship.

### References

- [1] Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J* 2010;427(3):333–47.
- [2] Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17(1):91–128.
- [3] Morgane P, Galler J, Mokler D. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol* 2005;75(2):143–60.
- [4] Lister J, Blatt G, DeBassio W, Kemper T, Tonkiss J, Galler J, et al. Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus* 2005;15(3):393–403.
- [5] Morgane P, Mokler D, Galler J. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26(4):471–83.
- [6] Rosene D, Lister J, Schwagerl A, Tonkiss J, McCormick C, Galler J. Prenatal protein malnutrition in rats alters the c-Fos response of neurons in the anterior cingulate and medial prefrontal region to behavioral stress. *Nutr Neurosci* 2004;7(5–6):281–9.
- [7] Lister J, Tonkiss J, Blatt G, Kemper T, DeBassio W, Galler J, et al. Asymmetry of neuron numbers in the hippocampal formation of prenatally malnourished and normally nourished rats: a stereological investigation. *Hippocampus* 2006;16(11):946–58.
- [8] Bedi K. Nutritional effects on neuron numbers. *Nutr Neurosci* 2003;6(3):141–52.
- [9] Galler JR, Ramsey F, Solimano G, Lowell WE, Mason E. The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development. I. Degree of impairment in intellectual performance. *J Am Acad Child Psychiatry* 1983;22(1):8–15.
- [10] Galler JR, Ramsey F, Solimano G. The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development III. Learning disabilities as a sequel to malnutrition. *Pediatr Res* 1984;18(4):309–13.
- [11] Galler JR, Ramsey F, Solimano G, Kucharski LT, Harrison R. The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development. IV. Soft neurologic signs. *Pediatr Res* 1984;18(9):826–32.
- [12] Galler JR, Ramsey F, Solimano G. A follow-up study of the effects of early malnutrition on subsequent development. II. Fine motor skills in adolescence. *Pediatr Res* 1985;19(6):524–7.
- [13] Galler JR, Ramsey FC, Forde V, Salt P, Archer E. Long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus. II. Intellectual performance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987;6(6):847–54.

- [14] Galler JR, Ramsey FC, Salt P, Archer E. Long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus. III. Fine motor skills. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987;6(6):855–9.
- [15] Galler JR, Ramsey FC, Morley DS, Archer E, Salt P. The long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus. IV. Performance on the national high school entrance examination. *Pediatr Res* 1990;28(3):235–9.
- [16] Stein AD, Pierik FH, Verrips GHW, Sussler FS, Lumey IH. Maternal exposure to the Dutch famine before conception and during pregnancy: quality of life and depressive symptoms in adult offspring. *Epidemiology* 2009;20(6):909–15.
- [17] Coupe B, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Lefevre F, Mairesse J, Viques-Coopman A, et al. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J Neuroendocrinol* 2009;21(1): 40–8.
- [18] da Silva Hernandez A, Françolin-Silva AL, Valadares CT, Fukuda MTH, Almeida SS. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 2005;162(2):240–5.
- [19] Almeida SS, de Oliveira LM, Graeff FG. Early life protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl)* 1991;103(4):513–8.
- [20] Almeida SS, Garcia RA, de Oliveira LM. Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiol Behav* 1993;54(4):749–52.
- [21] Almeida S, Tonkiss J, Galler J. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav* 1996;60(2):675–80.
- [22] Watkins A, Wilkins A, Cunningham C, Perry V, Seet M, Osmond C, et al. Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *J Physiol* 2008;586(8): 2231–44.
- [23] Trizctnska M, Tonkiss J, Galler J. Influence of prenatal protein malnutrition on behavioral reactivity to stress in adult rats. *Stress* 1999;3(1):71–83.
- [24] Gallo PV. Physiological and behavioral consequences of maternal and post-weaning protein restriction. *Physiol Behav* 1981;26(1): 77–84.
- [25] Wiener SG, Robinson L, Levine S. Influence of perinatal malnutrition on adult physiological and behavioral reactivity in rats. *Physiol Behav* 1983;30(1):41–50.
- [26] Nolan LA, Hart EJ, Windle RJ, Wood SA, Hu XW, Levi AJ, 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):2996–3005.
- [27] Levay E, Paolini A, Govic A, Hazi A, Penman J, Kent S. Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction. *Behav Brain Res* 2008;191(2):164–72.
- [28] Kursmark M, Weitzman M. Recent findings concerning childhood food insecurity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12(3):310–6.
- [29] Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez G, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 2005;563(Pt 1):275–84.
- [30] Zambrano E, Martinez-Samayoa P, Bautista C, Deas M, Guillen L, Rodriguez-Gonzalez G, et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005;566(Pt 1):225–36.
- [31] Zambrano E, Bautista C, Deas M, Martinez-Samayoa P, Gonzalez-Zamorano M, Ledesma H, et al. 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):221–30.
- [32] Graham S, Gandelman R. The expression of ano-genital distance data in the mouse. *Physiol Behav* 1986;36(1):103–4.
- [33] Guzman C, Cabrera R, Cardenas M, Larrea F, Nathanielsz P, Zambrano E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* 2006;572(Pt 1):97–108.
- [34] Reyes-Castro LA, Rodriguez JS, Rodriguez-González GL, Wimmer RD, McDonald TJ, Larrea F, et al. Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. *Int J Dev Neurosci* 2010;29(2): 177–82.
- [35] Bautista C, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz P, Zambrano E. 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):358–63.
- [36] Langley-Evans S. Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int J Food Sci Nutr* 2000;51(1):11–7.
- [37] Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci* 1994;86(2):217–22 [discussion 121].
- [38] Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH. Dysregulation of the adipoinular axis—a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol* 2001;170(2):323–32.
- [39] Holemans K, Gerber R, Meurrens K, De CF, Poston L, Van Assche F. Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring. *Br J Nutr* 1999;81(1):73–9.
- [40] Galler J, Tonkiss J. Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 1991;121(5):762–9.
- [41] Langley SC, Browne RF, Jackson AA. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol* 1994;109(2):223–9.
- [42] Langley-Evans S, Gardner D, Jackson A. Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J Reprod Fertil* 1996;106(2):307–12.
- [43] Vuguin PM. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm Res* 2007;68(3):113–23.
- [44] Horchkiss AK, Lambright CS, Ostby JS, Parks-Saldutti L, Vandenbergh JG, Gray LE. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2007;96(2):335–45.
- [45] Meyer-Bahlburg HFL. Brain development and cognitive, psychosocial, and psychiatric functioning in classical 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Dev* 2011;20:88–95.
- [46] Puts DA, McDaniel MA, Jordan CL, Breedlove SM. Spatial ability and prenatal androgens: meta-analyses of congenital adrenal hyperplasia and digit ratio (2D:4D) studies. *Arch Sex Behav* 2008;37(1):100–11.
- [47] Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci* 2008;29(10):493–8.
- [48] Ramos A, Mormède P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;22(1):33–57.
- [49] Trullas R, Skolnick P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 1993;111(3):323–31.
- [50] Vendruscolo LF, Takahashi RN, Brüske GR, Ramos A. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NK1P608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;170(3):287–93.
- [51] Atallah M, Barbeau I, Pellett P. Metabolic and development changes in growing rats born to dams restricted in protein and/or energy intake. *J Nutr* 1977;107(4):650–5.
- [52] Forbes W, Tracy C, Resnick O, Morgane P. Effects of maternal dietary protein restriction on growth of the brain and body in the rat. *Brain Res Bull* 1977;2(2):131–5.
- [53] Pond W, Yen J, Yen L. Body weight deficit in the absence of reduction in cerebrum weight and nucleic acid content in progeny of swine restricted in protein intake during pregnancy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988;188(2): 117–21.
- [54] Siassi F, Siassi B. Differential effects of protein-calorie restriction and subsequent repletion on neuronal and nonneuronal components of cerebral cortex in newborn rats. *J Nutr* 1973;103(11):1625–33.
- [55] Desai M, Crowther N, Lucas A, Hales C. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr* 1996;76(4):591–603.
- [56] Torres N, Bautista C, Tovar AR, Ordez G, Rodriguez-Cruz M, Ortiz V, et al. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;298(2):E270–277.
- [57] Lesage J, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, et al. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 2006;9(4):183–98.
- [58] Schäffer L, Müller-Vizentini D, Burkhart T, Rauh M, Ehler U, Beinder E. Blunted stress response in small for gestational age neonates. *Pediatr Res* 2009;65(2):231–5.
- [59] Sebaai N, Lesage J, Breton C, Vieau D, Deloof S. Perinatal food deprivation induces marked alterations of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in 8-month-old male rats both under basal conditions and after a dehydration period. *Neuroendocrinology* 2004;79(4):163–73.
- [60] Vieau D, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Molendi-Coste O, Laborie C, et al. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32(Suppl. (1)):S16–20.
- [61] Sebaai N, Lesage J, Vieau D, Alaoui A, Dupouy J, Deloof S. Altered control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in adult male rats exposed perinatally to food deprivation and/or dehydration. *Neuroendocrinology* 2002;76(4):243–53.
- [62] Leonhardt M, Lesage J, Dufoury L, Dickes-Coopman A, Montel V, Dupouy J. 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):45–54.
- [63] Chisari A, Giovambattista A, Perello M, Spinardi E. Impact of maternal undernutrition on hypothalamo-pituitary-adrenal axis and adipocyte functions in male rat offspring. *Endocrine* 2001;14(3):375–82.
- [64] Galler JR, Bryce CP, Waber D, Hock RS, Exner N, Eaglesfield D, et al. Early childhood malnutrition predicts depressive symptoms at ages 11–17. *J Child Psychol Psychiatry* 2010;51(7):789–98.

## Sex Steroids Regulation of Appetitive Behavior

C.J. Bautista<sup>1,2</sup>, P.M. Martínez-Samayoa<sup>1,2</sup> and E. Zambrano\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14000, México; <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, Mexico City, México

**Abstract:** Appetite is the desire to satisfy the need to consume food, felt as hunger. It is regulated by the balance of food intake and energy expenditure via signals between the brain, the digestive tract and the adipose tissue. Males and females vary in terms of eating behavior as well as the way the body fat is stored. Energy balance and body fat distribution are part of the sexual dimorphism in many mammalian species including human beings. These sex dissimilarities could be related to the different sex steroid hormone profile in each sex. Gonadal steroid hormones play an important role in the regulation of food intake and energy homeostasis. Human epidemiological and experimental animal studies have shown that estradiol has a key role in the control of food intake and energy balance. Estradiol has long been known to inhibit feeding in animals. There are important changes in food intake patterns during the estrous cycle, with a reduction of food intake around the time of ovulation, when estradiol presents its highest levels. Men have less total fat and more central fat distribution which carries a much greater risk for metabolic disorders while women have more total fat and more gluteal/femoral subcutaneous fat distribution. Men and postmenopausal women accumulate more fat in the intra-abdominal depot. This review is focused on the mechanism by which sex steroids affect feeding behavior and fat distribution.

**Keywords:** Gonadal steroid, appetite, food intake, estradiol, leptin, insulin.

### THE MODULATION OF EATING BY SEX HORMONES

Appetite is defined as the desire to satisfy the need to consume food, felt as hunger. Appetite exists in all higher life-forms and serves to regulate adequate energy intake to maintain metabolic needs. It is regulated by a complex physiological system that balances food intake and energy expenditure via close communication of afferent and efferent signals between the brain, the digestive tract and the adipose tissue.

When a meal is ingested, satiety hormones contribute to a digestion process and a feeling of fullness. Central circuits in the brain integrate satiety signals and signals of long term energy status to produce a coordinated response to the change in nutritional status [1, 2].

Body weight is stable when food intake and energy expenditure are in equilibrium. The hypothalamus integrates signals from central and peripheral pathways to play an important role in appetite regulation [3], and energy homeostasis is controlled by the adipose tissue, pancreas, and the gastrointestinal tract [1] that regulate central circuits in the hypothalamus and brain stem to produce a negative or positive effect on energy balance.

The arcuate nucleus of the hypothalamus integrates signals by altering the relative activity of neurons expressing

neuropeptide Y (NPY), Agouti-related protein (AgRP), melanocortin (MSH) and amphetamine-regulated transcript (CART). These neuropeptides project to downstream nuclei and modulate the release of further anorectic or orexigenic peptides that adjust energy intake and expenditure to maintain a stable body weight [4]. While these signals depend on circuits in the hypothalamus, brain stem, and limbic system to modulate neuropeptide release and hence food intake and energy expenditure [4, 5], peripheral signals are driven from adipose tissue (leptin and adiponectin), pancreas (insulin, pancreatic polypeptide PP and glucagon), and gastrointestinal tract (cholecystokinin CCK, peptide YY, glucagon-like peptide-1 GLP-1, oxyntomodulin OXM and ghrelin). These peripheral signals cross the blood-brain barrier and act on brain regions such as the hypothalamus and brain stem.

Gonadal steroid hormones, such as androgens, estrogens and progestins, are well known for their regulation of sexual development and reproductive functions [6, 7].

Sex steroid hormones regulate the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal axis by positive and negative feedback actions on receptors at the hypothalamus and pituitary levels but they also play an important role in diverse biological actions (in non-reproductive tissues) non related to their reproductive functions [8].

Obesity represents an ever increasing epidemic in developing and developed countries that causes adverse metabolic problems with important gender differences in the prevalence of these metabolic diseases. These sex dissimilarities could be related to the different sex hormone profile in men and women. Sex hormones act on regions of

\*Address correspondence to this author at the Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga #15, Sección XVI, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico; Tel: (52) 55-5487-0900 ext 2417; Fax: (52)55-5655-9859; E-mail: zamgon@servidor.unam.mx

the central nervous system involved in the regulation of food intake and energy homeostasis. The expression of sex steroid hormone receptors such as estrogen and androgen receptors has been found in certain neurons of the appetite complexes [9].

Sex steroid hormones have many actions that affect body weight and adiposity independent of eating, including effects on energy expenditure, gastrointestinal function, metabolism, growth and body composition. The mechanisms underlying these effects and their relations to eating are not well understood [8].

Human epidemiological and experimental animal studies have shown that estradiol has a key role in control of food intake and energy balance. In postmenopausal women, when estradiol levels are lower in comparison with a regular cycling woman, the incidence of obesity increases [10], and in female rats the food intake and body weight increases after ovariectomy. Besides the action of estrogens in appetite by regulation of hormones from adipose tissue and pancreas such as leptin, adiponectin and insulin, estrogen reduces food intake and body weight acting directly in the hypothalamus [11].

## HORMONAL PERIPHERAL SIGNALS OF FOOD INTAKE

### Leptin

Leptin is a 16 kD hormone with 167 aminoacids produced and secreted in a variety of tissues, predominantly by adipocytes [12], that regulates food intake and energy expenditure and has many functions related to growth and development [12, 13]. One of its major functions is to act on hypothalamic arcuate neurons to inhibit food intake by stimulating secretion of the anorexigenic neuropeptides POMC and CART and thereby inhibits appetitive drive through the interaction with its receptor (Ob-R) which is a member of the cytokine receptor family and has a single trans-membrane domain [14], that presents multiple isoforms resulted from alternative mRNA splicing and post-translational processing [15]. There are three classes of Ob-R: long, short and secreted.

During development leptin plays a major role in organizing the detailed interconnections among the various hypothalamic nuclei involved in appetite. Several studies in rodents have demonstrated a surge of leptin around postnatal days 10 to 14 [16-18]. This surge has been correlated with maturation of the central nervous mechanisms that regulate appetite in later life. Leptin also appears to play a key role in programming the structural and functional development of hypothalamic orexigenic and anorexigenic centers in the early postnatal period, associated with developmental programming of appetitive centers and thought to have an important role in regulating later life leptin sensitivity. Developmental programming is the response to a specific challenge in a critical developmental time window that alters the developmental path with persistent effects. Several studies indicate that the timing and trajectory of the postnatal leptin surge in rodents is critical to the development of obesity in later life [18,19].

Circulating levels of leptin correlate positively with the amount of fat stored [20]. Serum leptin concentrations are higher in neonates than adults [21,22] despite the presence of a lower proportion of body fat immediately after birth [22]. Research accomplished in our lab could find no proof that pup serum leptin inhibits milk appetite during the neonatal period, we also found evidence that pup adipose tissue may not be the only neonatal source of leptin in pup serum [18].

Leptin resistance is a result of obesity, but a lack of sensitivity to circulating leptin also contributes to gain body fat and weight. Leptin role is more important in periods of starvation than in times of abundance, during hunger times low leptin levels affects body weight while during obesity high leptin levels have lower effects in decreasing body weight [4].

There is a complex interaction between sex steroids and leptin effects on body weight. The decrease of female sex steroid levels is linked to a significant increase in body weight and food intake, which seems to be related to an impairment of the central actions of leptin [23, 24].

Different studies have shown that sex steroid hormones directly or indirectly regulate leptin production and secretion by adipose cells. Estrogens administration to ovariectomized rats decreases food intake and body weight; it has been suggested that this effect is related to the ability of estrogens to positive regulate leptin gene expression [24].

Various steroid hormones regulate leptin mRNA and protein expression. In rat models the influence of androgenic and estrogenic status on the leptin gene expression has been studied in isolated adipocytes, the results have shown that androgens and estrogens modulate both *in vivo* and *in vitro* leptin gene expression in various white adipose tissues [25]. Androgens have a negative effect and in contrast estrogens a positive effect on leptin expression. These modulation effects are direct, mediated by the adipocyte androgen and estrogen nuclear receptors and affect the leptin gene transcription [25].

### Insulin

Insulin is a major metabolic hormone produced by the pancreas and it was the first adiposity signal to be described [26].

Insulin enters into the brain via saturable receptor-mediator uptake across the blood brain barrier at levels proportional to circulating insulin concentrations [27] and acts as an anorexigenic signal, decreasing food intake and body weight. Insulin positively correlated with long-term energy balance. Insulin secretion increases immediately after a meal [28] and its concentrations in blood depend on total body fat storages and distribution, with visceral fat being a key determinant [29].

Insulin signaling involves a cascade of events initiated by insulin binding to its receptor, the insulin receptor is composed of an extracellular  $\alpha$ -subunit which binds insulin followed by receptor autophosphorylation, and an intracellular  $\beta$ -subunit which transduces the signal and has intrinsic tyrosine kinase activity, which results in tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates (IRS) [30, 31].

including IRS-1 and IRS-2 identified in neurons [32, 33]. The insulin receptor exists as two splice variants resulting in subtype A, with higher affinity for insulin and more widespread expression, and subtype B with lower affinity and expression in classical insulin responsive tissues such as fat, muscle and liver [32, 33]. Insulin receptors are widely distributed in the brain, particularly in hypothalamic nuclei involved in food intake [34, 35] with the highest concentrations found in the olfactory bulb, hippocampus, cerebral cortex and the arcuate nucleus in the hypothalamus [36].

Insulin is secreted from pancreatic  $\beta$ -cell and decreases blood glucose by promoting glucose uptake by muscle and adipocytes, as well as preventing the formation of glucose by the liver. The  $ER\alpha$  and  $ER\beta$  have been both involved in energy balance, fat and glucose metabolism in hypothalamic neurons, liver, adipose tissue, muscle and the endocrine pancreas, however, data have shown that  $ER\alpha$  has a major action.  $ER\alpha$  and  $ER\beta$  as well as membrane estrogen receptors are involved in the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell function and hypothalamic neurons [37].  $ER\alpha$  knockout [38] as well as aromatase knockout mice [39] are obese and insulin resistant probably due to lack of estrogen actions [40].

Predisposition to impaired glucose tolerance and insulin resistance are present in ovariectomized rats [41] and menopausal women [42], in both conditions estrogen levels are low. This predisposition decreases with estrogen replacement, for both situations [43]. It has also been reported that estrogen function deficiency in men, due to absence of  $ER\alpha$  or aromatase, results in impaired glucose metabolism [44].

Changes in blood estrogen levels occur during pregnancy as well as during the menstrual cycle in humans or the estrous cycle in rodents. In each physiological situation, estradiol is involved in maintaining normal insulin sensitivity and to be beneficial for  $\beta$ -cell function. However, estradiol levels above or below the physiological range may promote insulin resistance and type II diabetes [45].

### Cholecystokinin (CCK)

Cholecystokinin (CCK) is a gut peptide found in the gastrointestinal tract, predominantly in the duodenum and jejunum. This peptide has also been found in the brain where it has been associated to diverse processes such as satiety. CCK major function is the control of appetite. It stimulates the release of enzymes from the pancreas and gall bladder, coordinating digestion by increasing intestinal motility and inhibiting gastric emptying [46]. The peptide is thought to act both locally and hormonally in the gut, and as a neuromodulator in the brain.

It is well known that the administration of CCK in humans [47] as well as in animal models [48], inhibits food intake by reducing meal size and duration, an effect which is enhanced by gastric distension. Infusion of CCK at the onset of every spontaneous meal, decreases food intake by consistently limiting meal size.

CCK has a short half-life, only 1-2 minutes, its effect on food intake is rapid and brief. This peptide apparently does not regulate long-term food ingestion, if CCK is administered more than 15 minutes before a meal, it does not have any effect at reducing meal size. In rats, chronic pre-prandial administration of CCK reduces food intake, but increases at the same time meal frequency, without changes in body weight [4]. Additionally, several studies with rodents have shown that various pharmacological antagonists of CCK stimulate feeding [49].

CCK satiating action is estrogen-sensitive. The inhibitory effect of CCK on food intake is enhanced in ovariectomized rats treated with physiological doses of estradiol [50]. Experimental manipulations of CCK and estradiol have shown that estradiol cyclically increases the activity of the CCK satiation-signaling pathway resulting in the decrease of meal size and food intake during the ovulatory phase of the ovarian cycle [51-53].

### Ghrelin

Ghrelin is a 28 amino acid peptide synthesized as a prohormone. During its synthesis a modification is imposed in the hormone in the form of an n-octanoic acid bound to one of its amino acids, necessary for biological activity. Ghrelin is synthesized and released primarily from the oxyntic cells of the stomach, but also in smaller amounts from duodenum, ileum, caecum and colon [54, 55]. The hypothalamus, pituitary, placenta and kidney are also other sources of ghrelin.

Ghrelin plays an important role in the regulation of feeding behavior and energy metabolism by mainly acting at the CNS [56]. It has orexigenic effects (stimulates appetite and promotes adiposity) and increases food intake in both animals and human beings [57], via action on the hypothalamic ARC [58] by modulating hypothalamic appetite-regulating pathways, primarily the orexigenic NPY network and/or the agouti-related protein [59].

Ghrelin concentrations increase before meals and are suppressed by the intake of nutrients [54]. An increase in circulating ghrelin levels may occur as a consequence of the anticipation of food, or may have a physiological role in initiating feeding. Administration of ghrelin, either centrally or peripherally, increases food intake and body weight and decreases fat utilization in rodents [60]. Ghrelin levels fall in response to the ingestion of food or glucose, but not following ingestion of water, suggesting that gastric distension is not a regulator [61]. Plasma ghrelin levels increase in response to food restriction, fasting and malnutritional states. Anorexic patients also have high levels of ghrelin which falls to normal after weight gain [62]. Ghrelin levels negatively correlate with body mass index in normal and obese subjects as well as in patients with anorexia nervosa [58, 62].

Although ghrelin acts as a modulator of feeding behavior and energy metabolism it has been recently implicated in reproductive physiology. It has been reported the expression of ghrelin and its receptor in various reproductive organs, such as placenta, testis Leydig cells, ovary in rat [63, 64], and mouse embryos and endometrium [65].

Changes in the expression of ghrelin gene was demonstrated in rat ovary throughout the estrous cycle [63]. Ghrelin immunoreactivity was predominantly located in the luteal compartment of the ovary, being detected by immunostaining more intensely in steroidogenic cells from corpus luteum of the current cycle as well as in all generations of regressing corpora lutea. Its relative mRNA levels varied depending on the stage of the cycle, with the lowest levels in the highest estradiol concentration, proestrus, and peak expression values during the luteal phase of the cycle [61].

#### **Adiponectin**

Adiponectin, also called adipocyte complement-related protein (Acrp30), apM1 or adipoQ, is a 244-amino acid protein secreted from adipose tissue. Its circulating levels are up to 1,000-fold higher than other circulating hormones such as leptin and insulin [66, 67], encoded by gene APM1, which has been mapped to chromosome 3q 27 [68] and it has structural homology to complement factor C1q and collagen VIII and X [69]. Adiponectin binds to a number of receptors. Two receptors have been identified, with homology to G protein-coupled receptors and one receptor similar to the cadherin family: adiponectin receptor 1 – ADIPOR1, adiponectin receptor 2 – ADIPOR2, T-cadherin - T-Cad [70].

It has been shown that adiponectin release is significantly lower in omental than in subcutaneous adipose tissue [71]. It regulates several metabolic processes, such as glucose [72] and fatty acid metabolism [73], and energy homeostasis. It has been observed that adiponectin treatment in mice increased fatty acid oxidation in muscle [74].

In contrast to leptin, adiponectin levels are inversely correlated with body fat percentage and body mass index in adults [75, 76] while it is positively correlated with fat cell size [77, 78]. Low adiponectin concentration is related to metabolic derangements [76] such as obesity and type 2 diabetes [79], atherosclerosis [73], coronary artery disease [80], non-alcoholic fatty liver disease and an independent risk factor for metabolic syndrome [81].

Adiponectin levels in women have been found to be significantly higher than in men [75], it has been demonstrated that after neonatal castration in male and ovariectomy in female mice, tissue adiponectin content increased [82], while in other experimental studies it has been shown that androgens and estrogens also decreased adiponectin levels [82, 83]. Furthermore, there has been found decreased adiponectin levels in the last trimester of pregnancy and in patients with gestational diabetes [84]. During postmenopause, women present lower adiponectin levels, and this has been related to an increase in body mass index, which may lead to insulin resistance [85].

#### **Glucagon**

Glucagon is a 29 amino acid peptide secreted by endocrine cells of the intestinal mucosa and by the  $\alpha$ -cells of the islets of Langerhans in the pancreas [86]. Glucagon acts in the opposite way than insulin, increasing blood glucose levels [87]. The pancreas releases glucagon when blood

glucose levels fall too low, its action in the liver is to convert stored glycogen into glucose, which is released into the bloodstream. Glucagon also stimulates the release of insulin intended to be used on glucose by insulin-dependent tissues. Glucagon and insulin keep together the right blood glucose levels [87]. Studies with healthy human subjects as well as experimental animal models have shown that glucagon also has a role in the control of appetite and energy intake [88].

Gastric motility and secretion is inhibited by the presence of nutrients in the ileal lumen. Glucagon participates in the regulation of energy intake by the inhibition of gastric emptying, which limits the food intake 86, 89, 90].

Glucagon is released by the pancreas during meals, apparently largely due to cephalic phase reflexes, and each appears to act as a physiological negative feedback control of meal size in male animals. It was demonstrated that estradiol treatment in ovariectomized rats increases the satiating potency of intra-meal hepatic portal infusions of glucagon [91] and the hepatic portal infusion of glucagon antibodies (neutralization of glucagon) in the same model increased feeding in estradiol treated rats [8, 91] (Fig. (1)).

#### **FOOD INTAKE DURING THE OVARY CYCLE IN DIFFERENT SPECIES**

In females a number of species, feeding is closely associated with hypothalamic-pituitary-gonadal axis function. In general in the ovulatory cycle, it has been shown that in females from different species, including humans [92], rhesus monkey [93], sheep [94], rats [95, 96] and guinea pigs [93] there is a reduction of food intake around the time of ovulation, when estradiol presents its highest levels.

Menstrual cycle in women presents eating variations. Daily food intake in women is at its lowest during the peri-ovulatory period, which is usually defined as the 4 days surrounding the LH surge [97, 98] in which estradiol levels are maximal. Some studies also demonstrate that average daily food intake is higher during the luteal phase, than during the follicular phase [98-100]. These data show that women eat around 10% less during the peri-ovulatory window [8]. In females, estradiol and progesterone are cyclically released, however, estradiol, but not progesterone, produces the cyclic variation in food intake [8]. In women, leptin fluctuations during the menstrual cycle directly correlate with estradiol, but not with progesterone [101, 102]. The concentration of estrogens, especially estradiol, inversely correlate with feeding during many physiological states.

Rats and mice have 4-5 day ovarian cycles. In rats, around of 80 to 90% of food intake occurs nocturnally. During the night following the LH surge, the night of ovulation, there is a decrease in food intake up to 25%, accomplished by a decrease in meal size without a compensatory increase in meal frequency [10, 95, 103]. Estradiol concentration is at its highest just before the LH surge but very low during estrus. The estrous decrease in food intake in rats and mice is caused by preceding increase in estradiol secretion, probably because activation of ER stimulates transcription factors and the physiological effects

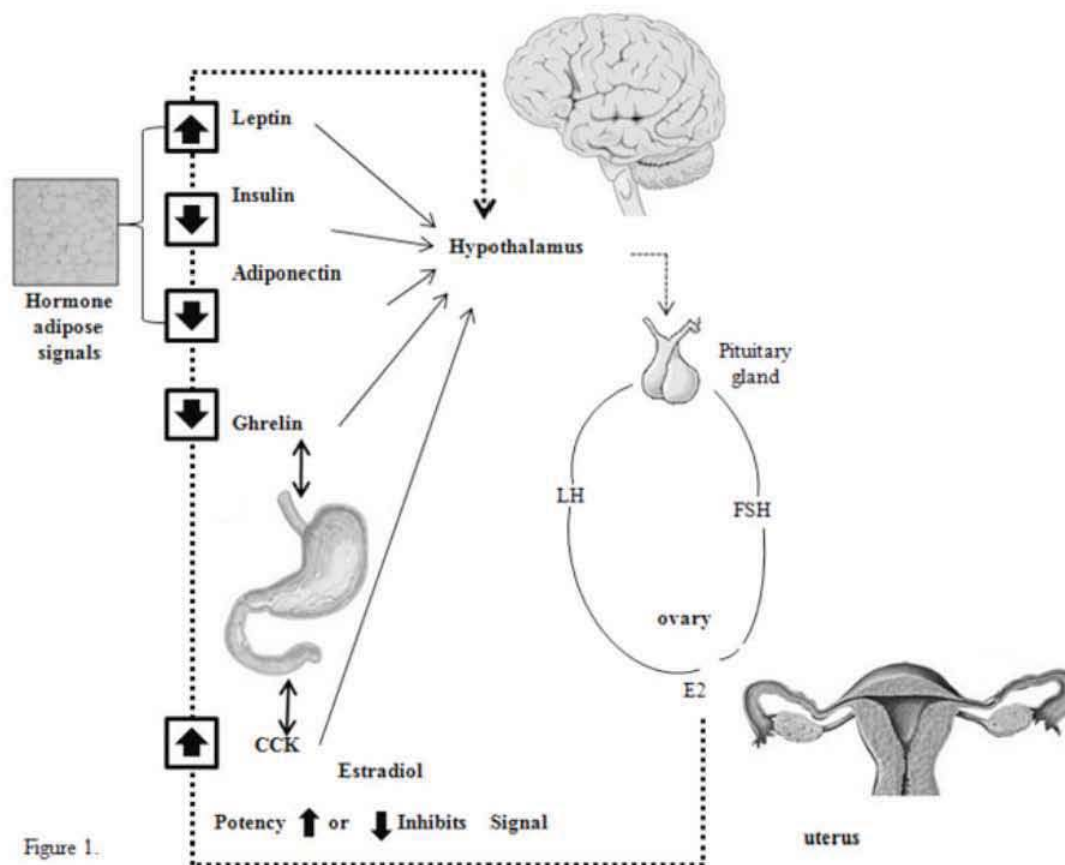


Figure 1.

Fig. (1). Interaction between estradiol and peripheral feedback signals in the regulation of food intake.

of estradiol linger for about 12 hours. In metestrus, sex steroid secretion decreases and food intake increases. However, metestrus in rats and mice lasts only 6-8 hours and occurs diurnally, when these animals eat very little. Thus, rats and mice are poor models for eating studies during the post-ovulatory phases [8].

The cyclic change in eating apparently does not occur during anovulatory cycles [104]. It can also be suppressed in women whose eating behavior is under strong cognitive restraint [105], but it is not clear whether meal size or number is affected [8].

Ovariectomy produces an immediate increase in feeding and a 10–30% increase in body adiposity in rats and mice [53]. Estrogens reduction, as occurs in menopause and gonadectomized animals, is associated with the increase of visceral adiposity (Fig. (2)).

#### SEX DIFFERENCES IN HOMEOSTASIS OF ENERGY BALANCE

Energy balance and body fat distribution are part of the sexual dimorphism in many mammalian species including human beings. Men have less total fat and more central or intra-abdominal distribution, the adipose tissue distributed in the abdominal or visceral region ('android' or male-pattern body fat distribution, also called male apple profile or apple

shaped) carries a much greater risk for metabolic disorders than does adipose tissue distributed subcutaneously. In contrast, women have more total fat and more gluteal/femoral subcutaneous fat distribution ('gynoid', or female-pattern, also called female pear profile or pear shaped) which is poorly correlated with risk for these metabolic disorders [102]. Gonadal steroids are regulators with important effects of body size, body fat content and body fat distribution [106]. Ovarian hormones protect against the metabolic syndrome. Prevalence of metabolic disorders is higher in men, than women before menopause, however, after menopause, women have an increasing possibility to suffer from metabolic disorders [107]. Intra-abdominal fat inversely varies with estrogen levels. Men have lower estrogen levels, women after menopause decline estrogen production and increase intra-abdominal adiposity, but if women receive estrogen replacement therapy there is not an increase in fat accumulation, suggesting a specific role of estrogens in limiting intra-abdominal fat mass. In contrast, androgens favor abdominal fat deposits [107].

The amount of fat stored in adipose tissue is the balance between lipogenesis and lipolysis. When energy intake is lower than energy needs, lipolysis starts and fat stored in the form of triglycerides is broken into free fatty acids and glycerol via hormone-sensitive lipase. Visceral adipose tissue uptake of triglycerides is greater in men than in

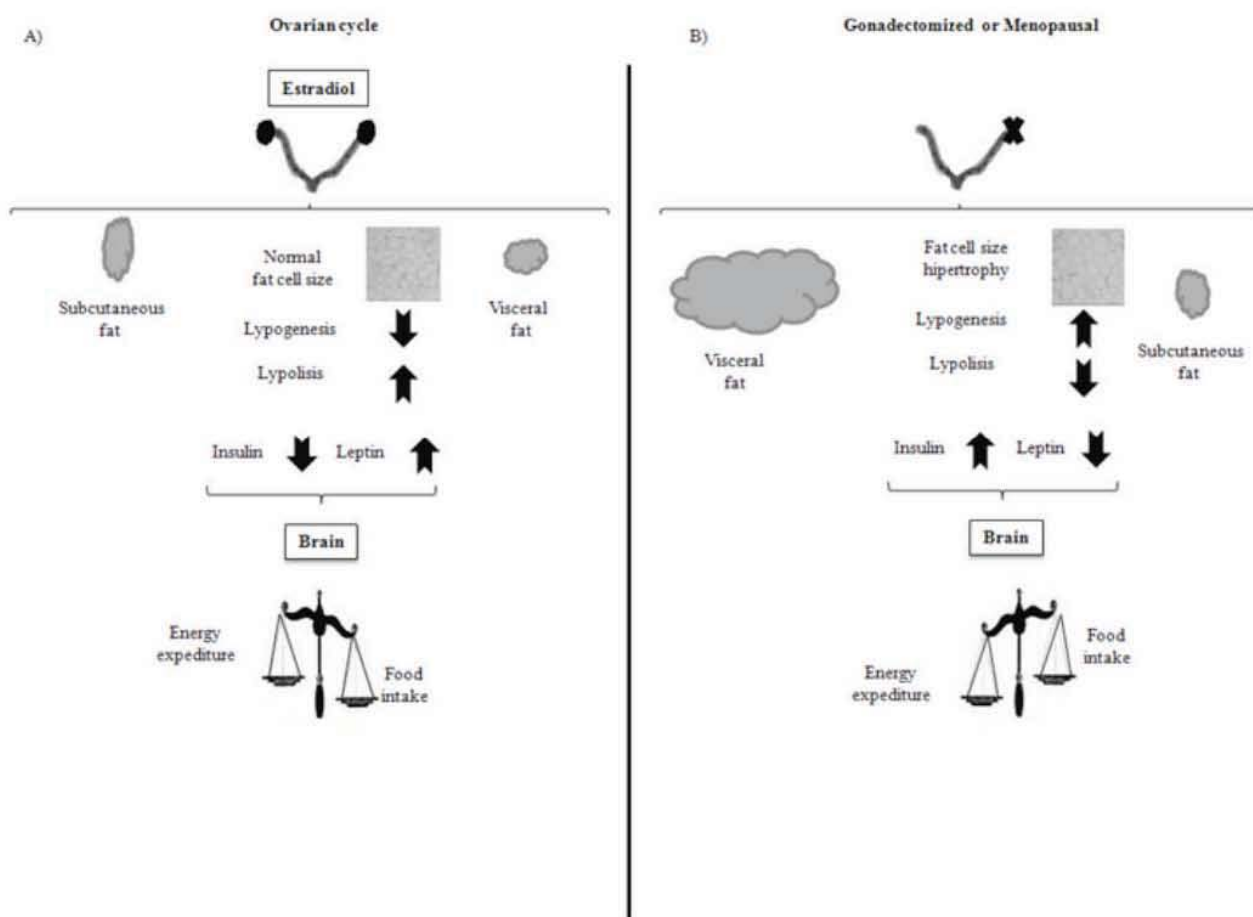


Fig. (2). Modulation of energy balance by estradiol. A) in the ovary cycle and B) in menopausal or gonadectomized conditions.

women, whereas females carry more fat subcutaneously [107].

Estradiol has long been known to inhibit feeding in animals, but the mechanisms mediating its effects have not been clear. Estrogen regulates food intake and fat distribution by acting at hypothalamus and adipose tissue level. It may probably regulate satiety signals as part of its mechanism of action. Estradiol as an indirect control of eating and meal size, produces changes in feeding behavior by modulating the central processing of both satiating and orexigenic peptides that represent direct controls of eating [10].

One of the mechanisms for estradiol to reduce body weight is increasing excitatory synapses upon POMC soma, resulting in both a reduction in energy intake and an increase in energy expenditure [108]. Estradiol triggers a robust increase in the number of excitatory inputs to POMC neurons in the arcuate nucleus of wild-type rats and mice. This rearrangement of synapses in the arcuate nucleus is leptin independent because it also occurred in leptin-deficient (*ob/ob*) and leptin receptor-deficient (*db/db*) mice, and was paralleled by decreased food intake and body weight gain as well as increased energy expenditure [109]. Estradiol exerts direct controls on metabolism, as well, so that it plays

a multifaceted role in the control of body weight. Indeed, mutant mice (of either sex) with null mutations of the ER $\alpha$  or of aromatase, become obese without increased feeding. Nevertheless, in ad libitum-fed, genetically normal females, the weight gain following ovariectomy and the weight loss following estradiol treatment are due mainly to altered food intake [53].

ER is expressed in the hypothalamus as well as in the adipose tissues. Catabolic action of estrogens is motivated by enhancing leptin sensitivity within the brain, in addition of modifying the white fat distribution to favor the subcutaneous fat deposition through activation of ER [11]. Specifically, estrogen binds on ER $\alpha$  in visceral adipose tissues to regulate lipid metabolism [107].

The estrogen activation of membrane ER (different from ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) controls the electrical activity of three excitable cells relevant for energy and glucose homeostasis: insulin containing  $\beta$ -cells, glucagon secreting  $\alpha$ -cells and dopamine and POMC hypothalamic neurons [37].

In males, it has been shown that androgens enhance the lipolytic capacity of cultured rat adipose precursor cells by increasing the number of  $\beta$ -adrenoreceptors and the activity of adenylate cyclase [102, 110]. Some studies have



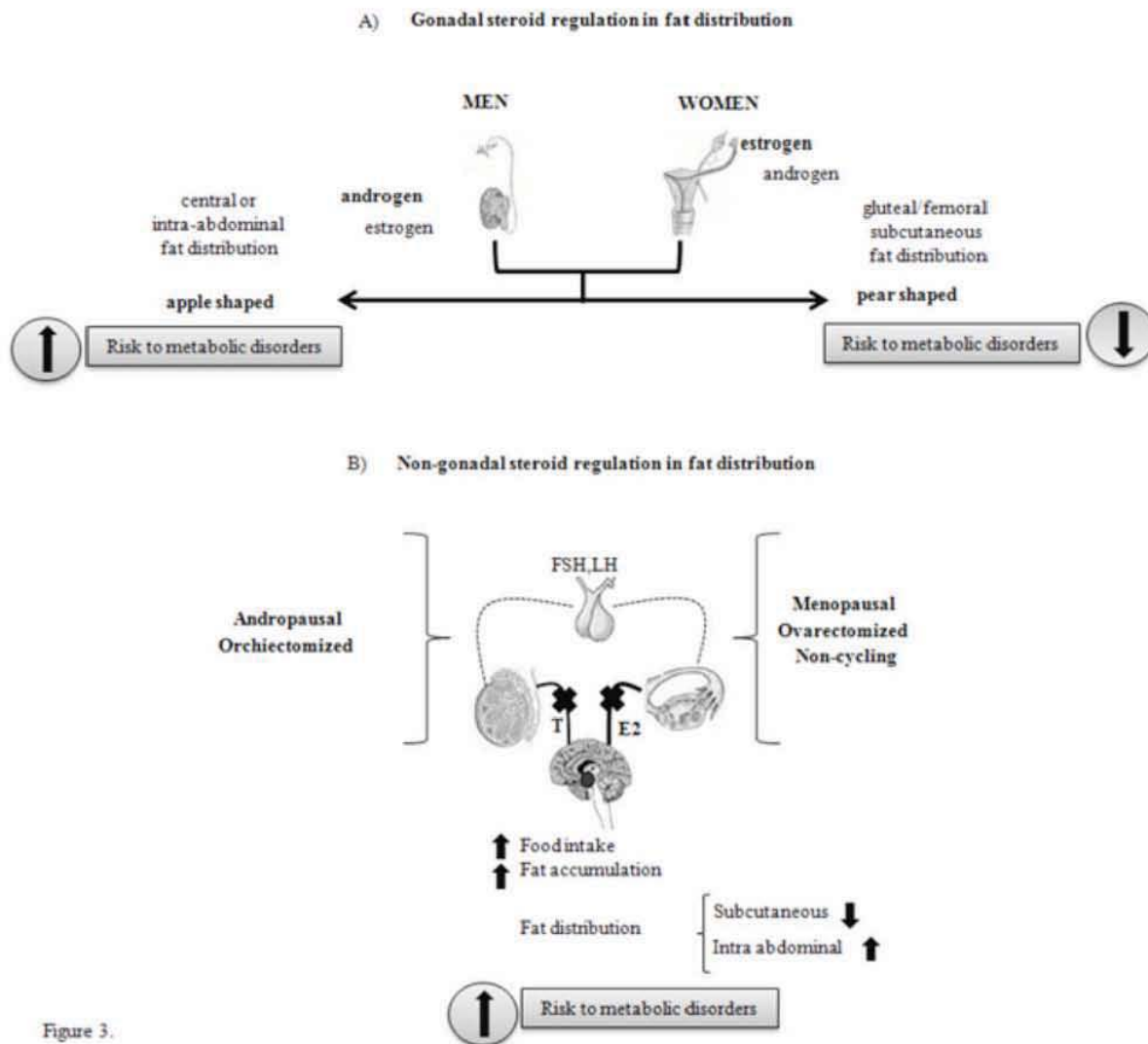


Figure 3.

Fig. (3). A) Gonadal steroid regulation in fat distribution. B) Non-gonadal steroid regulation in fat distribution.

demonstrated the presence of androgen receptors in the adipose tissue [111]. At the adipocyte level, androgens directly modulate lipid mobilization and lipid uptake, presumably by binding to androgen receptors expressed in adipose tissue [102]. In adult male rats constant daily testosterone release results in a constant level of daily food intake, the circadian rhythm is controlled separately [8] (Fig. (3)).

Leptin production also presents sexual dimorphism. Serum leptin levels are higher in cycling women than in both men and postmenopausal women and remain still higher in postmenopausal women than in men [112]. However, in rats there are controversial findings regardless the sexual dimorphism differences in leptin concentration. The higher concentrations of serum leptin in males in comparison with females have been reported by our group and others [113-115] and most likely reflects the difference in the amount of fat between males and females. In contrast, other researchers

have reported that the marked sexual dimorphism in leptin plasma levels in which is much higher in females than males, is at least in part, explained by a suppressive effect of androgens on leptin production [36] and that leptin levels inversely correlated with those of testosterone [116].

Leptin expression is inhibited in human fat cell cultures exposed to testosterone or dihydrotestosterone [117]. In aging and obese men, there is increased aromatase activity and therefore a higher conversion of androgens to estrogens that has been associated to increased serum leptin [118]. Testosterone replacement normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men and in castrated male rats [102]. Estradiol administration in female ovariectomized or intact male rats increases hypothalamic sensitivity to leptin and favors body fat accrual in the subcutaneous over visceral adipose depot [11, 102].

Leptin and insulin have proven different eating-inhibitory strength in male and female rats. Clegg *et al* showed that the

brains of male and female rats are differentially sensitive to the catabolic actions of small doses of leptin and insulin [119]. Leptin was administered into the third cerebral ventricle of age and weight-matched male and female rats. This hormone reduced food intake in both male and female rats over 4 hours, but it only reduced food intake in females for 24 hours. The eating inhibitory efficiency after intracerebroventricular injection of leptin was not observed in ovariectomized rats, however, estradiol treatment in those animals reverted the effect [11, 119], suggesting that leptin effects are increased by estradiol [120]. The opposite happens with insulin, in which male but not female rats had a significant reduction in food intake over 24 hours after insulin administration into the third cerebral ventricle [119].

In human, plasma levels of insulin and leptin correlates with body fat content. Insulin concentration is more related with visceral fat content, in men total body fat is more closely correlated with plasma insulin levels than with plasma leptin levels; in contrast, leptin concentration is more related with subcutaneous fat content, in women total body fat is more closely associated with plasma leptin concentrations than with plasma insulin concentrations [119].

Estradiol plays an important role for the sex difference in leptin and insulin sensitivity. Leptin and estrogen receptors are localized on the same hypothalamic neurons [109], suggesting cross talk and interactions between both hormones. In addition, estradiol and its action on ER $\alpha$  and ER $\beta$  are implicated in control of body fat content and distribution. Mice without ER $\alpha$  (ER $\alpha$  knockout) are obese. In humans, abnormal adiposity has been associated with the XbaI polymorphism of the human ER $\alpha$  [121].

#### APPETITE AND ENDOCRINE DISRUPTORS

Appetite behavior may also be affected by the endocrine disruptors. Endocrine disruptors are natural and synthetic molecules that bind to different kind of hormone receptors, either mimicking or blocking hormone action. Endocrine disruptor compounds are widely spread on the environment and display estrogenic, anti-estrogenic or anti-androgenic activity, they are lipophilic and can be stored for long periods on the adipose tissue [122]. Excessive exposure to endocrine disruptors in humans and other animals is a consequence of the modern life, having some impact in the rise of obesity at these days [123].

#### DEVELOPMENTAL PROGRAMMING AND FOOD INTAKE

Estrogen and its receptors may also modify the development of fetus, resulting in permanent changes to the adipocytes and cellular metabolism, and these, in turn, lead to excess visceral body fat, cardiovascular disease and type II diabetes in adulthood. Our group has shown that progesterone [124], testosterone, estradiol and corticosterone [125] serum levels are increased in pregnant protein restricted rats at the end of gestation in comparison with control pregnant rats. The overexposure of the developing fetus to steroids may predispose individual to lifelong health problems [126]. The masculinization of the female brain in early development selectively decreases the sensitivity of the

adult to the eating-inhibitory effects of estradiol, but the feminization of the brain does not affect the sensitivity of the adult to the eating-stimulatory effects of testosterone [8]. The data available suggest that sex differences in adult eating partially depend on organizational effects of gonadal hormones during development. In our rat model, maternal nutrient restriction during pregnancy reduced the fat composition of brain during fetal growth generating a negatively impact in normal brain development [127]. In addition, postnatal leptin rise in pup serum was delayed by prenatal undernutrition, contributing to the development of altered appetite and metabolic disorders in later life [18]. Female offspring from rat mothers restricted during pregnancy and/or lactation, fed with control diet after weaning, presented higher testosterone serum levels during the normal estrous cycle [124] whereas in the male offspring testosterone serum concentrations were depressed [125]. Elevated cholesterol and triglycerides occurred in male pups whose mothers were nutrient restricted during pregnancy and received a normal postnatal diet, but no changes in those parameters were observed in the female offspring. However, in both, female and male pups from restricted mothers in adult life presented more visceral body fat, higher serum leptin levels, insulin resistance, as well as increased food intake in comparison to the control pups. We concluded that maternal protein restriction during either pregnancy and/or lactation alters postnatal growth, appetitive behavior, leptin physiology, triglycerides and cholesterol concentrations and modifies glucose metabolism and insulin resistance in a sex and time window of exposure-specific manner [115, 128]. Maternal obesity also modified offspring phenotype. Our group, using high fat diet in the rat as experimental animal model, have shown that male offspring, from fat mother fed with control diet after weaning presented an increase in fat cell size and mass, serum triglycerides, leptin and insulin concentrations [129], leading to developmental programming of offspring who are predisposed to obesity, diabetes, hypertension, appetite disorders and other chronic disease.

#### CONFLICT OF INTEREST

None declared.

#### ACKNOWLEDGEMENT

CJ Bautista and P Martínez-Samayoá are graduate students from Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and are recipients of CONACyT fellowship. The authors experimental work presented in this review was supported by grant from CONACyT – 48839.

#### ABBREVIATIONS

AgRP	=	Agouti-related protein
CART	=	amphetamine-regulated transcript
AR	=	androgen receptor
CNS	=	central nervous system
CCK	=	cholecystokinin
DHT	=	5 $\alpha$ -dihydrotestosterone
$\alpha$ and $\beta$	=	estrogen receptors

ER $\alpha$  and ER $\beta$ 

GLP-1 = glucagon-like peptide-1

GSH = gonadal steroid hormones

GSH-R = growth hormone secretagogue receptor

Ob-R = leptin receptor

MSH = melanocortin

Y NPY = neuropeptide

OXM = Oxyntomodulin

PP = pancreatic polypeptide

PR = progesterone receptor

POMC = pro-opiomelanocortin

IRS = receptor substrates

## REFERENCES

- [1] Druce, M.; Bloom, S. R. The regulation of appetite. *Arch Dis Child* **2006**, *91*, 183-7.
- [2] Small, C. J.; Parkinson, J. R.; Bloom, S. R. Novel therapeutic targets for appetite regulation. *Curr Opin Investig Drugs* **2005**, *6*, 369-72.
- [3] Suzuki, K.; Simpson, K. A.; Minnion, J. S.; Shillito, J. C.; Bloom, S. R. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J* **2010**, *57*, 359-72.
- [4] Wynne, K.; Stanley, S.; McGowan, B.; Bloom, S. Appetite control. *J Endocrinol* **2005**, *184*, 291-318.
- [5] Chaudhri, O.; Small, C.; Bloom, S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2006**, *361*, 1187-209.
- [6] Gruber, C. J.; Tschugguel, W.; Schneeberger, C.; Huber, J. C. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* **2002**, *346*, 340-52.
- [7] Vanderschueren, D.; Vandenput, L.; Boonen, S.; Lindberg, M. K.; Bouillon, R.; Ohlsson, C. Androgens and bone. *Endocr Rev* **2004**, *25*, 389-425.
- [8] Asarian, L.; Geary, N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2006**, *361*, 1251-63.
- [9] Ozawa, H. Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nippon Med Sch* **2005**, *72*, 316-25.
- [10] Butera, P. C. Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav* **2010**, *99*, 175-80.
- [11] Clegg, D. J.; Brown, L. M.; Woods, S. C.; Benoit, S. C. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* **2006**, *55*, 978-87.
- [12] Campfield, L. A.; Smith, F. J.; Guisez, Y.; Devos, R.; Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* **1995**, *269*, 546-9.
- [13] Pellemounter, M. A.; Cullen, M. J.; Baker, M. B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T.; Collins, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **1995**, *269*, 540-3.
- [14] Tartaglia, L. A.; Dembski, M.; Weng, X.; Deng, N.; Culpepper, J.; Devos, R.; Richards, G. J.; Campfield, L. A.; Clark, F. T.; Deeds, J.; Muir, C.; Sanker, S.; Moriarty, A.; Moore, K. J.; Smutko, J. S.; Mays, G. G.; Wool, E. A.; Monroe, C. A.; Tepper, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **1995**, *83*, 1263-71.
- [15] Tartaglia, L. A. The leptin receptor. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 6093-6.
- [16] Ahima, R. S.; Prabakaran, D.; Flier, J. S. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* **1998**, *101*, 1020-7.
- [17] Rayner, D. V.; Dalglish, G. D.; Duncan, J. S.; Hardie, L. J.; Hoggard, N.; Trayhurn, P. Postnatal development of the ob gene system: elevated leptin levels in suckling fa/fa rats. *Am J Physiol* **1997**, *273*, R446-50.
- [18] Bautista, C. J.; Boeck, L.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W.; Zambrano, E. 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*, 358-63.
- [19] Vickers, M. H.; Gluckman, P. D.; Coveny, A. H.; Hofman, P. L.; Cutfield, W. S.; Gertler, A.; Breier, B. H.; Harris, M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* **2005**, *146*, 4211-6.
- [20] Ostlund, R. E., Jr.; Yang, J. W.; Klein, S.; Gingerich, R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* **1996**, *81*, 3909-13.
- [21] Devaskar, S. U.; Ollesch, C.; Rajakumar, R. A.; Rajakumar, P. A. Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *238*, 44-7.
- [22] Mistry, A. M.; Swick, A.; Romsos, D. R. Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *Am J Physiol* **1999**, *277*, R742-7.
- [23] Alonso, A.; Fernandez, R.; Moreno, M.; Ordonez, P.; Diaz, F.; Gonzalez, C. Leptin and its receptor are controlled by 17 $\beta$ -estradiol in peripheral tissues of ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **2007**, *232*, 542-9.
- [24] Brann, D. W.; De Sevilla, L.; Zamorano, P. L.; Mahesh, V. B. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids* **1999**, *64*, 659-63.
- [25] Machinal, F.; Dieudonne, M. N.; Leneuve, M. C.; Pecquery, R.; Giudicelli, Y. *In vivo* and *in vitro* ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* **1999**, *140*, 1567-74.
- [26] Schwartz, M. W.; Figlewicz, D. P.; Baskin, D. G.; Woods, S. C.; Porte, D., Jr. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* **1992**, *13*, 387-414.
- [27] Baura, G. D.; Foster, D. M.; Porte, D., Jr.; Kahn, S. E.; Bergman, R. N.; Cobelli, C.; Schwartz, M. W. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs *in vivo*. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* **1993**, *92*, 1824-30.
- [28] Polonsky, K. S.; Given, B. D.; Van Cauter, E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* **1988**, *81*, 442-8.
- [29] Porte, D., Jr.; Baskin, D. G.; Schwartz, M. W. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* **2002**, *60*, S20-9; discussion S68-84, 85-7.
- [30] Taniguchi, C. M.; Emanuelli, B.; Kahn, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 85-96.
- [31] White, M. F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* **1998**, *182*, 3-11.
- [32] Baskin, D. G.; Schwartz, M. W.; Sipols, A. J.; D'Alessio, D. A.; Goldstein, B. J.; White, M. F. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain. *Endocrinology* **1994**, *134*, 1952-5.
- [33] Bruning, J. C.; Gautam, D.; Burks, D. J.; Gillette, J.; Schubert, M.; Orban, P. C.; Klein, R.; Krone, W.; Muller-Wieland, D.; Kahn, C. R. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **2000**, *289*, 2122-5.
- [34] Corp, E. S.; Woods, S. C.; Porte, D., Jr.; Dorsa, D. M.; Figlewicz, D. P.; Baskin, D. G. Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett* **1986**, *70*, 17-22.
- [35] Marks, J. L.; Porte, D., Jr.; Stahl, W. L.; Baskin, D. G. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by *in situ* hybridization. *Endocrinology* **1990**, *127*, 3234-6.
- [36] Coll, A. P.; Farooqi, I. S.; O'Rahilly, S. The hormonal control of food intake. *Cell* **2007**, *129*, 251-62.
- [37] Ropero, A. B.; Alonso-Magdalena, P.; Quesada, I.; Nadal, A. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids* **2008**, *73*, 874-9.
- [38] Heine, P. A.; Taylor, J. A.; Iwamoto, G. A.; Lubahn, D. B.; Cooke, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-

- alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 12729-34.
- [39] Takeda, K.; Toda, K.; Saibara, T.; Nakagawa, M.; Saika, K.; Onishi, T.; Sugiura, T.; Shizuta, Y. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J Endocrinol* **2003**, *176*, 237-46.
- [40] Alonso-Magdalena, P.; Ropero, A. B.; Carrera, M. P.; Cederroth, C. R.; Baquie, M.; Gauthier, B. R.; Nef, S.; Stefani, E.; Nadal, A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One* **2008**, *3*, e2069.
- [41] Livingstone, C.; Collison, M. Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci (Lond)* **2002**, *102*, 151-66.
- [42] Godsland, I. F. The influence of female sex steroids on glucose metabolism and insulin action. *J Intern Med Suppl* **1996**, *738*, 1-60.
- [43] Godsland, I. F. Oestrogens and insulin secretion. *Diabetologia* **2005**, *48*, 2213-20.
- [44] Nadal, A.; Alonso-Magdalena, P.; Soriano, S.; Quesada, I.; Ropero, A. B. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* **2009**, *304*, 63-8.
- [45] Gonzalez, C.; Alonso, A.; Diaz, F.; Patterson, A. M. Dose- and time-dependent effects of 17beta-oestradiol on insulin sensitivity in insulin-dependent tissues of rat: implications of IRS-1. *J Endocrinol* **2003**, *176*, 367-79.
- [46] Liddle, R. A.; Goldfine, I. D.; Rosen, M. S.; Taplitz, R. A.; Williams, J. A. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest* **1985**, *75*, 1144-52.
- [47] Kissileff, H. R.; Pi-Sunyer, F. X.; Thornton, J.; Smith, G. P. C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *Am J Clin Nutr* **1981**, *34*, 154-60.
- [48] Gibbs, J.; Young, R. C.; Smith, G. P. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* **1973**, *84*, 488-95.
- [49] Dulawa, S. C.; Vanderweele, D. A. Cholecystokinin and estradiol synergistically potentiate satiety in rats. *Peptides* **1994**, *15*, 913-8.
- [50] Butera, P. C.; Bradway, D. M.; Cataldo, N. J. Modulation of the satiety effect of cholecystokinin by estradiol. *Physiol Behav* **1993**, *53*, 1235-8.
- [51] Wager-Srdar, S. A.; Gannon, M.; Levine, A. S. The effect of cholecystokinin on food intake in gonadectomized and intact rats: the influence of sex hormones. *Physiol Behav* **1987**, *40*, 25-8.
- [52] Asarian, L.; Geary, N. Cyclic estradiol treatment phasically potentiates endogenous cholecystokinin's satiating action in ovariectomized rats. *Peptides* **1999**, *20*, 445-50.
- [53] Geary, N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides* **2001**, *22*, 1251-63.
- [54] Date, Y.; Kojima, M.; Hosoda, H.; Sawaguchi, A.; Mondal, M. S.; Suganuma, T.; Matsukura, S.; Kangawa, K.; Nakazato, M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* **2000**, *141*, 4255-61.
- [55] Sakata, I.; Nakamura, K.; Yamazaki, M.; Matsubara, M.; Hayashi, Y.; Kangawa, K.; Sakai, T. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* **2002**, *23*, 531-6.
- [56] Gale, S. M.; Castracane, V. D.; Mantzoros, C. S. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr* **2004**, *134*, 295-8.
- [57] Muller, E. E.; Locatelli, V.; Cocchi, D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* **1999**, *79*, 511-607.
- [58] Cummings, D. E.; Weigle, D. S.; Frayo, R. S.; Breen, P. A.; Ma, M. K.; Dellinger, E. P.; Purnell, J. Q. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* **2002**, *346*, 1623-30.
- [59] Chen, H. Y.; Trumbauer, M. E.; Chen, A. S.; Weingarth, D. T.; Adams, J. R.; Frazier, E. G.; Shen, Z.; Marsh, D. J.; Feighner, S. D.; Guan, X. M.; Ye, Z.; Nargund, R. P.; Smith, R. G.; Van der Ploeg, L. H.; Howard, A. D.; MacNeil, D. J.; Qian, S. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* **2004**, *145*, 2607-12.
- [60] Tschöp, M.; Smiley, D. L.; Heiman, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **2000**, *407*, 908-13.
- [61] Budak, E.; Fernandez Sanchez, M.; Bellver, J.; Cervero, A.; Simon, C.; Pellicer, A. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil Steril* **2006**, *85*, 1563-81.
- [62] Otto, B.; Cuntz, U.; Fruehauf, E.; Wawarta, R.; Folwaczny, C.; Riepl, R. L.; Heiman, M. L.; Lehnert, P.; Fichter, M.; Tschöp, M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* **2001**, *145*, 669-73.
- [63] Caminos, J. E.; Tena-Sempere, M.; Gaytan, F.; Sanchez-Criado, J. E.; Barreiro, M. L.; Nogueiras, R.; Casanueva, F. F.; Aguilar, E.; Dieguez, C. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* **2003**, *144*, 1594-602.
- [64] Tena-Sempere, M.; Barreiro, M. L.; Gonzalez, L. C.; Gaytan, F.; Zhang, F. P.; Caminos, J. E.; Pinilla, L.; Casanueva, F. F.; Dieguez, C.; Aguilar, E. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* **2002**, *143*, 717-25.
- [65] Kawamura, K.; Sato, N.; Fukuda, J.; Kodama, H.; Kumagai, J.; Tanikawa, H.; Nakamura, A.; Honda, Y.; Sato, T.; Tanaka, T. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Endocrinology* **2003**, *144*, 2623-33.
- [66] Maeda, N.; Shimomura, I.; Kishida, K.; Nishizawa, H.; Matsuda, M.; Nagaretani, H.; Furuyama, N.; Kondo, H.; Takahashi, M.; Arita, Y.; Komuro, R.; Ouchi, N.; Kihara, S.; Tochimo, Y.; Okutomi, K.; Horie, M.; Takeda, S.; Aoyama, T.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* **2002**, *8*, 731-7.
- [67] Nakano, Y.; Tobe, T.; Choi-Miura, N. H.; Mazda, T.; Tomita, M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* **1996**, *120*, 803-12.
- [68] Vasseur, F.; Lepretre, F.; Lacquemant, C.; Froguel, P. The genetics of adiponectin. *Curr Diab Rep* **2003**, *3*, 151-8.
- [69] Nedavidkova, J.; Smitka, K.; Kopsky, V.; Hainer, V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res* **2005**, *54*, 133-40.
- [70] Yamauchi, T.; Kamon, J.; Ito, Y.; Tsuchida, A.; Yokomizo, T.; Kita, S.; Sugiyama, T.; Miyagishi, M.; Hara, K.; Tsunoda, M.; Murakami, K.; Ohteki, T.; Uchida, S.; Takekawa, S.; Waki, H.; Tsuno, N. H.; Shibata, Y.; Terauchi, Y.; Froguel, P.; Tobe, K.; Koyasu, S.; Taira, K.; Kitamura, T.; Shimizu, T.; Nagai, R.; Kadowaki, T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **2003**, *423*, 762-9.
- [71] Berk, E. S.; Kovera, A. J.; Boozer, C. N.; Pi-Sunyer, F. X.; Johnson, J. A.; Albu, J. B. Adiponectin levels during low- and high-fat eucaloric diets in lean and obese women. *Obes Res* **2005**, *13*, 1566-71.
- [72] Berg, A. H.; Combs, T. P.; Du, X.; Brownlee, M.; Scherer, P. E. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* **2001**, *7*, 947-53.
- [73] Diez, J. J.; Iglesias, P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* **2003**, *148*, 293-300.
- [74] Fruebis, J.; Tsao, T. S.; Javorschi, S.; Ebbets-Reed, D.; Erickson, M. R.; Yen, F. T.; Bihain, B. E.; Lodish, H. F. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 2005-10.
- [75] Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Takahashi, M.; Maeda, K.; Miyagawa, J.; Hotta, K.; Shimomura, I.; Nakamura, T.; Miyaoka, K.; Kuriyama, H.; Nishida, M.; Yamashita, S.; Okubo, K.; Matsubara, K.; Muraguchi, M.; Ohmoto, Y.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *257*, 79-83.
- [76] Haluzik, M.; Parizkova, J.; Haluzik, M. M. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol Res* **2004**, *53*, 123-9.
- [77] Ukkola, O.; Santaniemi, M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med* **2002**, *80*, 696-702.
- [78] Scherer, P. E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G.; Lodish, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 26746-9.
- [79] Hotta, K.; Funahashi, T.; Arita, Y.; Takahashi, M.; Matsuda, M.; Okamoto, Y.; Iwahashi, H.; Kuriyama, H.; Ouchi, N.; Maeda, K.; Nishida, M.; Kihara, S.; Sakai, N.; Nakajima, T.; Hasegawa, K.; Muraguchi, M.; Ohmoto, Y.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Hanafusa, T.; Matsuzawa, Y. Plasma concentrations of a novel,

- adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, *20*, 1595-9.
- [80] Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y.; Maeda, K.; Kuriyama, H.; Okamoto, Y.; Hotta, K.; Nishida, M.; Takahashi, M.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* **1999**, *100*, 2473-6.
- [81] Renaldi, O.; Pramono, B.; Sinorita, H.; Purnomo, L. B.; Asdie, R. H.; Asdie, A. H. Hypoadiponectinemia: a risk factor for metabolic syndrome. *Acta Med Indones* **2009**, *41*, 20-4.
- [82] Combs, T. P.; Berg, A. H.; Rajala, M. W.; Klebanov, S.; Iyengar, P.; Jimenez-Chillaron, J. C.; Patti, M. E.; Klein, S. L.; Weinstein, R. S.; Scherer, P. E. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* **2003**, *52*, 268-76.
- [83] Nishizawa, H.; Shimomura, I.; Kishida, K.; Maeda, N.; Kuriyama, H.; Nagaretani, H.; Matsuda, M.; Kondo, H.; Furuyama, N.; Kihara, S.; Nakamura, T.; Tochino, Y.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* **2002**, *51*, 2734-41.
- [84] Mazaki-Tovi, S.; Kanety, H.; Sivan, E. Adiponectin and human pregnancy. *Curr Diab Rep* **2005**, *5*, 278-81.
- [85] Tapan, S.; Dogru, T.; Sonmez, A.; Kurt, I.; Erbil, M. K. Circulating adiponectin levels in post-menopausal women with and without osteoporosis. *Clin Biochem* **43**, 705; author reply 706.
- [86] Flint, A.; Raben, A.; Astrup, A.; Holst, J. J. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest* **1998**, *101*, 515-20.
- [87] Kieffer, T. J.; Habener, J. F. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* **1999**, *20*, 876-913.
- [88] Gutzwiller, J. P.; Drewe, J.; Goke, B.; Schmidt, H.; Rohrer, B.; Lareida, J.; Beglinger, C. Glucagon like peptide 1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am J Physiol* **1999**, *276*, R1541-4.
- [89] Holst, J. J. Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol* **1997**, *59*, 257-71.
- [90] Wettergren, A.; Schjoldager, B.; Mortensen, P. E.; Myhre, J.; Christiansen, J.; Holst, J. J. Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci* **1993**, *38*, 665-73.
- [91] Geary, N.; Asarian, L. Estradiol increases glucagon's satiating potency in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2001**, *281*, R1290-4.
- [92] Dalvit-McPhillips, S. P. The effect of the human menstrual cycle on nutrient intake. *Physiol Behav* **1983**, *31*, 209-12.
- [93] Czaja, J. A.; Goy, R. W. Ovarian hormones and food intake in female guinea pigs and rhesus monkeys. *Horm Behav* **1975**, *6*, 329-49.
- [94] Tarttlin, M. F. Cyclical variations in food and water intakes in ewes. *J Physiol* **1968**, *195*, 29P-31P.
- [95] Blaustein, J. D.; Wade, G. N. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav* **1976**, *17*, 201-8.
- [96] ter Haar, M. B. Circadian and estrual rhythms in food intake in the rat. *Horm Behav* **1972**, *3*, 213-9.
- [97] Gong, E. J.; Garrel, D.; Calloway, D. H. Menstrual cycle and voluntary food intake. *Am J Clin Nutr* **1989**, *49*, 252-8.
- [98] Lyons, P. M.; Truswell, A. S.; Mira, M.; Vizzard, J.; Abraham, S. F. Reduction of food intake in the ovulatory phase of the menstrual cycle. *Am J Clin Nutr* **1989**, *49*, 1164-8.
- [99] Lissner, L.; Stevens, J.; Levitsky, D. A.; Rasmussen, K. M.; Strupp, B. J. Variation in energy intake during the menstrual cycle: implications for food-intake research. *Am J Clin Nutr* **1988**, *48*, 956-62.
- [100] Pelkman, C. L.; Chow, M.; Heimbach, R. A.; Rolls, B. J. Short-term effects of a progestational contraceptive drug on food intake, resting energy expenditure, and body weight in young women. *Am J Clin Nutr* **2001**, *73*, 19-26.
- [101] Quinton, N. D.; Smith, R. F.; Clayton, P. E.; Gill, M. S.; Shalet, S.; Justice, S. K.; Simon, S. A.; Walters, S.; Postel-Vinay, M. C.; Blakemore, A. I.; Ross, R. J. Leptin binding activity changes with age: the link between leptin and puberty. *J Clin Endocrinol Metab* **1999**, *84*, 2336-41.
- [102] Shi, H.; Clegg, D. J. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* **2009**, *97*, 199-204.
- [103] Geary, N.; Asarian, L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav* **1999**, *67*, 141-7.
- [104] Rock, C. L.; Gorenflo, D. W.; Drewnowski, A.; Demitrack, M. A. Nutritional characteristics, eating pathology, and hormonal status in young women. *Am J Clin Nutr* **1996**, *64*, 566-71.
- [105] Dye, L.; Blundell, J. E. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. *Hum Reprod* **1997**, *12*, 1142-51.
- [106] Nilsson, C.; Niklasson, M.; Eriksson, E.; Bjornorp, P.; Holmang, A. Imprinting of female offspring with testosterone results in insulin resistance and changes in body fat distribution at adult age in rats. *J Clin Invest* **1998**, *101*, 74-8.
- [107] Shi, H.; Seeley, R. J.; Clegg, D. J. Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol* **2009**, *30*, 396-404.
- [108] Gao, Q.; Mezei, G.; Nie, Y.; Rao, Y.; Choi, C. S.; Bechmann, I.; Leranthe, C.; Toran-Allerand, D.; Priest, C. A.; Roberts, J. L.; Gao, X. B.; Mobbs, C.; Shulman, G. I.; Diano, S.; Horvath, T. L. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* **2007**, *13*, 89-94.
- [109] Diano, S.; Kalra, S. P.; Sakamoto, H.; Horvath, T. L. Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. *Brain Res* **1998**, *812*, 256-9.
- [110] Sjogren, J.; Li, M.; Bjornorp, P. Androgen hormone binding to adipose tissue in rats. *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1244*, 117-20.
- [111] Dieudonne, M. N.; Pecquery, R.; Boumediene, A.; Leneuve, M. C.; Giudicelli, Y. Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. *Am J Physiol* **1998**, *274*, C1645-52.
- [112] Rosenbaum, M.; Nicolson, M.; Hirsch, J.; Heymsfield, S. B.; Gallagher, D.; Chu, F.; Leibel, R. L. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* **1996**, *81*, 3424-7.
- [113] Franko, K. L.; Forhead, A. J.; Fowden, A. L. Differential effects of prenatal stress and glucocorticoid administration on postnatal growth and glucose metabolism in rats. *J Endocrinol* **2010**, *204*, 319-29.
- [114] Pinos, H.; Ortega, E.; Carrillo, B.; Perez-Izquierdo, M. A.; Collado, P. Differential effects of undernourishment and nutritional rehabilitation on serum leptin levels in male and female rats. *Neurochem Res* **2007**, *32*, 407-13.
- [115] Zambrano, E.; Bautista, C. J.; Deas, M.; Martinez-Samayoa, P. M.; Gonzalez-Zamorano, M.; Ledesma, H.; Morales, J.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W. 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*, 221-30.
- [116] Kristensen, K.; Pedersen, S. B.; Richelsen, B. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *259*, 624-30.
- [117] Wabitsch, M.; Blum, W. F.; Muehe, R.; Braun, M.; Hube, F.; Rascher, W.; Heinze, E.; Teller, W.; Hauner, H. Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* **1997**, *100*, 808-13.
- [118] Morley, J. E.; Perry, H. M., 3rd. Androgen deficiency in aging men: role of testosterone replacement therapy. *J Lab Clin Med* **2000**, *135*, 370-8.
- [119] Clegg, D. J.; Riedy, C. A.; Smith, K. A.; Benoit, S. C.; Woods, S. C. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* **2003**, *52*, 682-7.
- [120] Ainslie, D. A.; Morris, M. J.; Wittert, G.; Turnbull, H.; Proietto, J.; Thorburn, A. W. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2001**, *25*, 1680-8.
- [121] Okura, T.; Koda, M.; Ando, F.; Niino, N.; Ohta, S.; Shimokata, H. Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2003**, *27*, 1020-7.
- [122] Guzman, C.; Zambrano, E. [Endocrine disruptor compounds and their role in the developmental programming of the reproductive axis]. *Rev Invest Clin* **2007**, *59*, 73-81.
- [123] Schneider, J. E. Metabolic and hormonal control of the desire for food and sex: implications for obesity and eating disorders. *Horm Behav* **2006**, *50*, 562-71.

- [124] Guzman, C.; Cabrera, R.; Cardenas, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W.; Zambrano, E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* **2006**, *572*, 97-108.
- [125] Zambrano, E.; Rodriguez-Gonzalez, G. L.; Guzman, C.; Garcia-Becerra, R.; Boeck, L.; Diaz, L.; Menjivar, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* **2005**, *563*, 275-84.
- [126] Zambrano, E. [The transgenerational mechanisms in developmental programming of metabolic diseases]. *Rev Invest Clin* **2009**, *61*, 41-52.
- [127] Torres, N.; Bautista, C. J.; Tovar, A. R.; Ordaz, G.; Rodriguez-Cruz, M.; Ortiz, V.; Granados, O.; Nathanielsz, P. W.; Larrea, F.; Zambrano, E. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2009**.
- [128] Zambrano, E.; Martinez-Samayoa, P. M.; Bautista, C. J.; Deas, M.; Guillen, L.; Rodriguez-Gonzalez, G. L.; Guzman, C.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* **2005**, *566*, 225-36.
- [129] Zambrano, E.; Martinez-Samayoa, P. M.; Rodriguez-Gonzalez, G. L.; Nathanielsz, P. W. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol* **588**, 1791-9.

---

Received: February 25, 2011

Revised: May 23, 2011

Accepted: June 07, 2011