



LA IRREGULARIDAD DEL RÉGIMEN ALIMENTICIO DESAJUSTA EL CICLO ESTRAL DE LA RATA WISTAR

Karina Uriostegui-Ortega¹, A. Cortés-Sol¹, T. Molina-Jiménez², C. Juárez-Portilla^{1,3}, Elvira Morgado¹

¹Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, karycandy4@hotmail.com; alcortes@uv.mx; elmorvi@hotmail.com

²Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana, tmolina@uv.mx

³Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, cjuarez@uv.mx

RESUMEN

Estudios recientes reportan que el desajuste circadiano incrementa el riesgo de desarrollar padecimientos como enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer e inclusive problemas reproductivos. Una alimentación irregular puede provocar desajustes en la ritmicidad de la liberación de diferentes hormonas, incluyendo a las hormonas esteroides. En este trabajo se exploró el posible desajuste en el ciclo reproductivo femenino ocasionado por el régimen alimenticio. Para esto se analizó la regularidad del ciclo estral en ratas Wistar hembra, las cuales fueron distribuidas en tres grupos experimentales bajo diferentes condiciones de alimentación: grupo AL (n=6) con alimentación *ad libitum*; grupo AF (n=6) con disponibilidad de alimento de 08:00 a 11:00 h; y grupo Alr (n=6) con acceso al alimento diario pero en diferentes horarios, durante tres horas (a las 10:00, 06:00, 18:00, 14:00, 22:00, 02:00 h reiniciando el ciclo hasta el final del experimento). Los sujetos fueron mantenidos en condiciones de bioterio con ciclo de luz-oscuridad 12:12 (encendido a las 04:00 h) y agua *ad libitum*. El ciclo estral fue monitoreado a través de frotis vaginales realizados dos horas posteriores al apagado de la luz durante 26 días de experimentación. Los resultados indican que las hembras de los grupos AF y Alr mostraron un marcado desajuste en la ritmicidad del ciclo estral sin ciclos regulares y presentando un diestro continuo. En contraste, las hembras del grupo AL presentaron cinco ciclos regulares de cuatro días, a lo largo del periodo de experimentación. Estos resultados sugieren que la irregularidad del régimen alimenticio afecta la liberación de hormonas esteroides, viéndose reflejada en el desajuste de la ritmicidad del ciclo estral de las ratas hembra Wistar.

1. INTRODUCCIÓN

Los horarios de alimentación son un importante indicador de tiempo para sincronizar la ritmicidad circadiana de órganos periféricos, la secreción de hormonas reguladoras de la ingestión de alimento y el peso corporal así como de metabolitos circulantes (Krieger, 1974; Escobar *et al.*, 1998; Damiola *et al.*, 2000; Díaz-Muñoz *et al.*, 2000). El modo de vida actual condiciona a las personas a perder los horarios establecidos de comida, debido a que se realizan actividades laborales o de entretenimiento sin importar si es de día o de noche, afectando negativamente la sincronización interna que los horarios de alimentación proveen a los organismos.

En los últimos años se ha estudiado ampliamente el efecto que tiene la alteración de la ritmicidad biológica causada por el trabajo nocturno o la rotación de turnos así como por el efecto de los viajes transmeridionales. Bajo estas situaciones se mantiene actividad y se ingiere alimento en horas no habituales, causando una desincronización interna. Esta desincronización ha sido vinculada a perturbaciones metabólicas como obesidad, síndrome metabólico y diabetes (Knutsson, 2007; Salgado-Delgado *et al.*, 2010) así como predisposición al cáncer (Davis y Mirik, 2006) y afecciones cardiovasculares y renales (Martino *et al.*, 2008; Scheer *et al.*, 2009). En hembras, se ha demostrado que la desincronización interna a causa del trabajo nocturno o turnos

rotatorios, incrementan el riesgo de presentar ciclos menstruales irregulares (Lawson *et al.*, 2011), endometriosis (Marino *et al.*, 2008) aborto involuntario (Cone *et al.*, 1998) y bajo peso de recién nacidos (Bonzini *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha reportado que la irregularidad temporal en la ingestión de alimento sugiere la consecución de una desincronización interna similar a la generada por el trabajo nocturno, que predispone a la aparición del síndrome metabólico (Sierra-Johnson *et al.*, 2008). Sin embargo, poco se ha explorado sobre los efectos de la desincronización interna a causa de la ingestión de alimento sin regularidad temporal sobre la biología reproductiva de las hembras. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la alimentación con horarios irregulares sobre el ciclo estral de la rata Wistar.

2. Parte Experimental

Sujetos experimentales

Se utilizaron 18 hembras intactas de la cepa Wistar de 3 meses de edad, las cuales fueron mantenidas en un ciclo de luz-oscuridad de 12/12h (con encendido de luz a las 4:00 h), con alimento (Purina Rodent Chow) y agua *ad libitum* durante dos semanas de adecuación. Posteriormente fueron divididas en tres grupos experimentales, con diferentes horarios de alimentación.

Grupos experimentales

Las hembras fueron asignadas aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales: 1) Grupo AL (n=6) con alimentación *ad libitum*, 2) Grupo AF (n=6) con disponibilidad al alimento de 08:00 a 11:00 h durante la fase de luz, y 3) Grupo AIR (n=6) con alimentación diaria en diferentes horarios durante tres horas (10:00, 06:00, 18:00, 14:00, 22:00, 02:00 h, reiniciando el ciclo hasta finalizar el experimento).

Toma y análisis de muestras (frotis)

El análisis de la citología vaginal fue realizado durante 26 días consecutivos, 2 h después del inicio de la fase de oscuridad. Con un gotero de punta roma, se introdujo solución salina estéril en la entrada vaginal e inmediatamente las células del epitelio vaginal fueron succionadas con el mismo. Las muestras recolectadas se colocaron sobre un portaobjetos y observadas con un microscopio de luz (Velaquin) con cámara de video integrada. La clasificación de las fases del ciclo estral se realizó mediante la identificación del tipo celular dominante en cada muestra, considerando: a) Proestro temprano cuando el 80% de las células epiteliales fueron esféricas y sólo un 20% fueron células epiteliales ovaladas nucleadas; b) Proestro cuando el 100% de las células fueron ovalada nucleadas; c) Proestro tardío/Estro temprano cuando el 80% de las células de la muestra estuvo constituido por células ovalada nucleadas y el 20% restante por células poliédricas cornificadas; d) Estro cuando el 100% fueron células poliédricas cornificadas; e) Estro tardío cuando el 80% de las células fueron poliédricas cornificadas y el 20% células ovaladas nucleadas; f) Diestro 1 cuando se encontraron los tres tipos celulares (ovaladas nucleadas, poliédricas cornificadas y leucocitos); y g) Diestro 2 cuando el 100% de las células de la muestra fueron leucocitos.

3. Resultados

Como se muestra en la figura 1, la citología de las muestras analizadas del grupo AL presentaron de forma regular el ciclo estral a lo largo de los 26 días de registro, manifestado por la presencia consecutiva las fases de proestro (temprano o tardío) seguido por un estro (temprano o tardío) y ésta a la vez fue seguida por la fase de diestro, con un total de 6 ciclos regulares durante todo el tiempo de experimentación. Por su parte, en las muestras de las hembras de los grupos AF y grupo Alr, la citología vaginal únicamente indicó la fase diestro 1 y diestro 2 durante más de 5 días consecutivos, es decir, mostraron diestro continuo. Además, nuestras hembras AF y Alr no presentaron la fase de receptividad a diferencia de las AL, cuya fase proestro fue presentada cada 4-5 días y en el último ciclo del experimento, sólo las AL fueron sometidas a pruebas de conducta sexual, mostrando receptividad al macho a diferencia de AF y Alr. Asimismo, es importante mencionar que durante la toma de muestras las hembras del grupo Alr se encontraban más reactivas al momento de ser manipuladas que las pertenecientes al grupo AL.

4. Discusión

Las hembras pertenecientes a nuestros grupos AL y AF presentaron una interrupción de las fases del ciclo estral y comportamiento reproductivo similar a lo reportado en ratas expuestas a un estrés prolongado (Marcondes *et al.*, 1998). Del mismo modo, nuestros resultados coinciden con los reportes de Mariani y cols. (2003) quienes observaron que el ciclo estral fue interrumpido cuando los animales adultos fueron sometidos a altos niveles de estrés causado por calor y frío. Sin embargo, nuestros sujetos AF y Alr únicamente tuvieron un desajuste del ciclo estral, presentando únicamente dos fases: diestro 1 y diestro 2. Es probable que dicho desajuste en la ritmicidad del ciclo se deba a lo reportado por l'Anson y cols. (2000), donde sugieren que al estar limitada la disponibilidad de alimento, la frecuencia del pulso de la hormona luteinizante es reducida además de la lenta frecuencia de liberación de la GnRH. Dichas secreciones se presentan en la fase de proestro, afectando de manera importante la presencia de las células epiteliales características de cada fase (Maeda, 2000; Marcondes *et al.*, 2002). Otro indicativo que nos proporciona la citología vaginal, es el despliegue de la conducta receptiva de la hembra frente al macho, estableciendo que en la fase proestro (predominancia de células nucleadas ovaladas) las hembras están receptivas para la cópula, teniendo un incremento en la secreción de hormona luteinizante y foliculo estimulante (l'Anson *et al.*, 2000). Nuestros resultados indican que en los grupos AF y Alr dicha fase de receptividad es inhibida, por lo tanto, podemos suponer que su éxito reproductor se ve afectado.

6. Conclusión

Nuestros resultados sugieren que la irregularidad temporal del régimen alimenticio afecta de manera importante la liberación de las hormonas esteroides, viéndose reflejada en el desajuste de la ritmicidad del ciclo estral de las ratas hembra Wistar, inhibiendo las fases donde la hembra se encuentra receptiva al macho. Asimismo, sugerimos que se afecta el éxito reproductivo dado que la facilitación de la sexual de la hembra no se lleva a cabo. Es importante continuar con estudios para comprender los posibles desórdenes que desencadena la alimentación con horarios temporalmente irregulares y la consecuente restricción calórica sobre la biología reproductiva de las hembras.

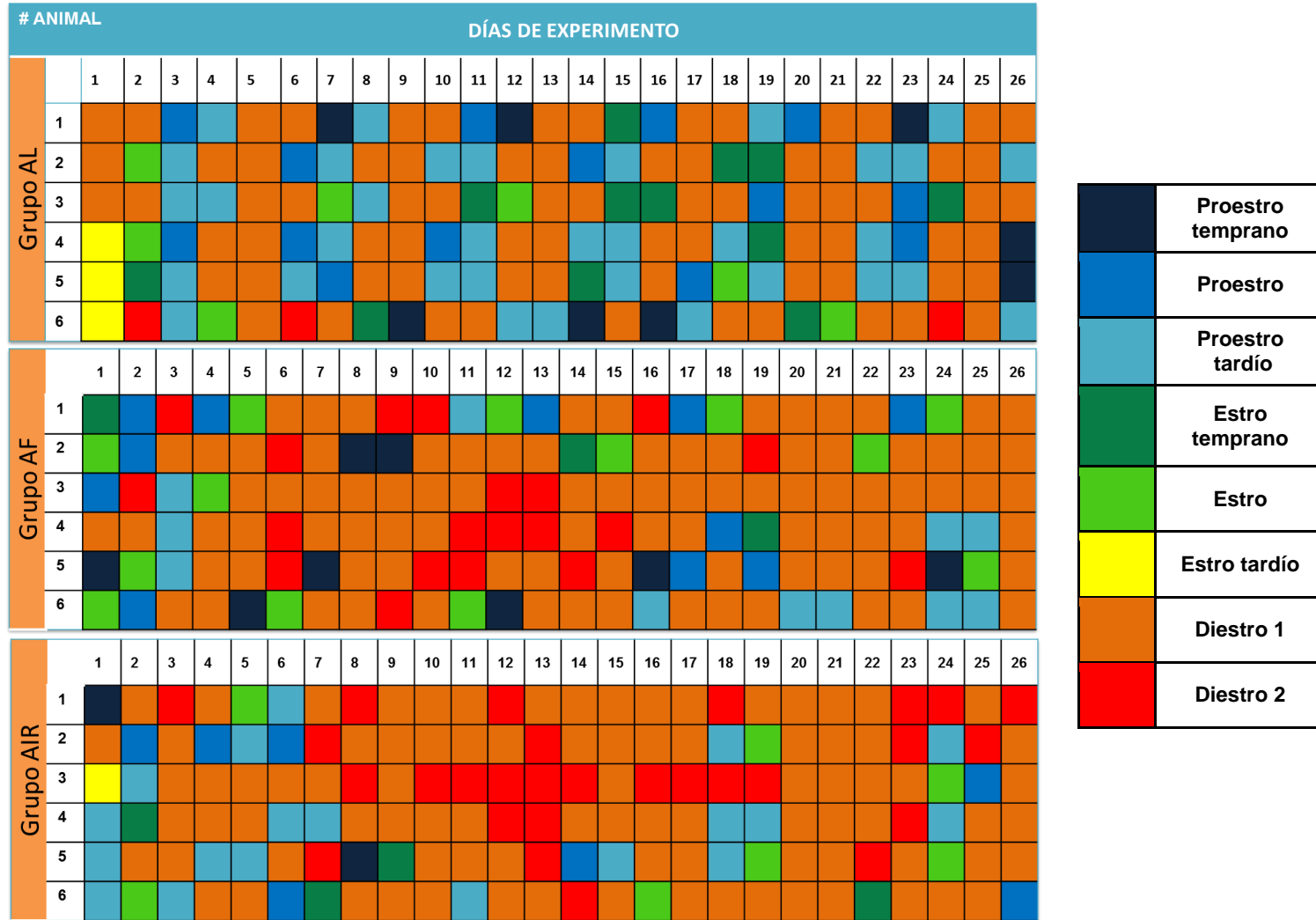


Figura 1. Colorímetro del ciclo estral de las hembras de los grupos AL, AF y AIR. En la figura se muestra el desajuste del ciclo del ciclo de las hembras de los grupos AF y AIR, mientras que las hembras del grupo AL presenta ciclo regular de 4-5 días. El cuadro de la esquina superior derecha indica color asignado para cada fase del ciclo estral.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonzini M., Palmer K. T., Coggon D., Carugno M., Cromi A., Ferrario M. M., "Shift work and pregnancy outcomes: a systematic review with meta-analysis of currently available epidemiological studies", *BJOG*, Vol. 118(12), 2011, pp. 1429–37.
2. Cone J. E., Vaughan L. M., Huete A., Samuels S. J., "Reproductive health outcomes among female flight attendants: an exploratory study", *J Occup Environ Med* Vol. 40(3), 1998, pp. 210–6.
3. Damiola F., Minh N. L., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F. y Schibler U., "Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus", *Genes and Devel*, Vol. 14, 2000, pp. 2950-2961.
4. Davis S. y Mirick D. K., "Circadian disruption shift work and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle", *Cancer Causes Control*, Vol. 17, 2006, pp. 539-545.
5. Díaz-Muñoz M., Vázquez-Martínez O., Aguilar-Roblero R. y Escobar C., "anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon and corticosterone in food-restricted rats", *Am J. Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Vol. 279, 2000, pp. R2048-R2056.
6. Escobar C., Díaz-Muñoz M., Encinas F. y Aguilar-Roblero R., "Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats", *Am J Physiol* Vol. 274, 1998, pp.1309-1316.
7. l'Anson H., Manning J. M., Herbosa C. G., Pelt J., Friedman C. R., Wood R. I. y Bucholtz D. L., "Central inhibition of gonadotropina-Releasin hormone secretion in the growth-restricted hypogonadotropic female sheep", *Endocrinology*, Vol. 141(2), 2000, pp. 520-527.
8. Krieger D. T., "Food and water restriction shifts corticosterone, temper- ature, activity and brain amine periodicity", *Endocrinology*, Vol. 95, 1974, pp. 1195–1201.
9. Knutsson K. L., Spiegel K., Penev P. y Van Cauter E., "The metabolic consequences of sleep deprivation", *Sleep Med Rev* Vol.11(3), 2007, pp.163-178.
10. Lawson C. C., Whelan E. A., Lividoti Hibert E. N., Spiegelman D., Schernhammer E. S., Rich-Edwards J. W., "Rotating shift work and menstrual cycle characteristics", *Epidemiology* Vol. 22, 2011, pp. 305-312
11. Maeda K., Ohkura S. y Tsukamura H., "Physiology of reproduction", En: *The laboratory rat*. Ed. Krinke. Academic Press, Cap. 9, 2000, pp. 145-162.
12. Mariani M. L., Ciocca D. R., González Jatuff A. S. y Souto M., "Effect of neonatal chronic stress on expression of Hsp70 and oestrogen receptor α in the rat oviduct during development and the oestrous cycle", *Reproduction*, Vol. 126, 2003, pp. 801-808
13. Marcondes F. K., Vanderlei L. C. M., Lanza L. B. y Spadari-Bratfisch R. C., "Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle", *Can. J. Physiol. Pharmacol.* Vol. 74, 1996, pp. 663-669.
14. Marcondes F. K., Bianchi F. J. y Tanno A. P., "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations", *Braz. J. Biol.*, Vol. 62, 4A, 2002, pp. 609-614.
15. Marino J.L., Holt V.L., Chen C., Davis S., "Shift work, hCLOCK T3111C polymorphism, and endometriosis risk", *Epidemiology*, Vol. 19(3), 2008, pp. 477–84.
16. Martino T. A., Oudit G. Y., Herzenberg A. M., Tata N., Koletar M. M., et al., "Circadian rhythm disorganization produces profound cardiovascular and renal disease in hamsters", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Vol. 294(5), 2008, pp. R1675-R1683.
17. Salgado-Delgado R., Angeles-Castellanos M., Saderi N., Bujis R. M., Escobar C., "Food intake during normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work" *Endocrinology*, Vol. 151 (3), 2010, pp. 1-11.
18. Scheer F. A., Hilton M. F., Mantzoros C. S. y Shea S. A., "Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment", *PNAS*, Vol. 106(11), 2009, pp.4453-4458.
19. Sierra-Johnson J., Undén A. L., Linstrand M., Rosell M., Sjogren P., Kolak M., De Faire U., Fisher R. M., Hellénus M. L., "Eating meals irregularly: a novel environmental risk factor for the metabolic syndrome", *Obesity* Vol.16 (6), 2008, pp. 1302–1307.