

TABLA V
Actividad coagulante de los cuajos que habían sido utilizados en la fabricación de los quesos estudiados.

	Tiempo de coagulación* segundos	U.C. ¹ /ml *	U.F. ² /ml *
Artesanos	727,78	3,91	857,93
Comerciales	285	36,88	8072,28

* Valores medios de los cuajos sometidos a estudio.

¹ Unidades de Cuajo.

² Unidades de Fuerza

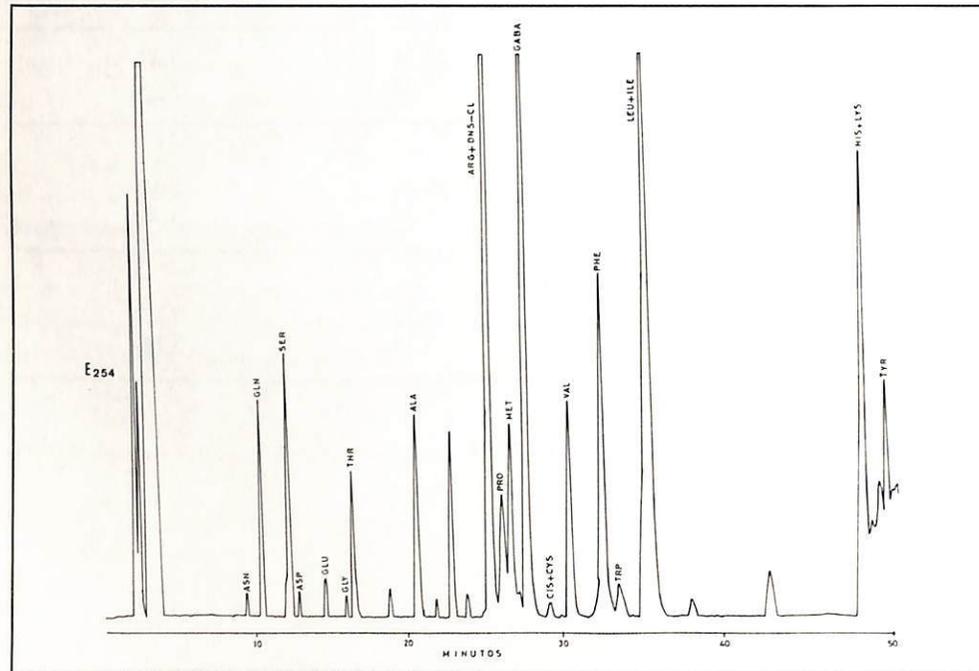


Fig. 1.- Cromatograma característico de los aminoácidos libres del "Queso de vaca de León". Cantidad de muestra inyectada 20 µl, correspondiente a 1 µg de queso. Condiciones del desarrollo cromatográfico las señaladas por Wiedmeier y col., 1982.

EFFECTO DEL ESTRES DE INMOVILIZACION EN VARIOS PARAMETROS DE LA GESTACION Y POSTERIOR DESARROLLO CORPORAL DE LA RATA.

(THE EFFECT OF IMMOBILIZATION STRESS ON VARIOUS PREGNANCY PARAMETERS AND SUBSEQUENT CORPORAL DEVELOPMENT OF THE RAT).

M. Carbajo,*
 J.C. Domínguez,*
 A. Armario,**
 L. Anel,*
 y C. García **

Palabras claves: estrés, inmovilización, gestación, crecimiento.

Key words: stress, immobilization, pregnancy, growth.

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el efecto del estrés de inmovilización en la rata, aplicado durante la gestación. Se ha controlado la duración de la gestación, el número de crías/camada, el sex ratio y el desarrollo corporal de la descendencia desde el nacimiento hasta el destete.

Las ratas se someten a 2 horas de estrés de inmovilización (de las 9:00 h a las 11:00 h). Se aplica en diferentes momentos de la gestación: del día 1 al 6 de gestación (Grupo I), del día 17 al 21 de gestación (Grupo II) y durante toda la gestación (Grupo III).

No se obtienen diferencias significativas en cuanto a la duración de la gestación, número de crías/camada y sex ratio. El estrés aplicado parece influir ($p < 0,05$) en el % de mortalidad perinatal, en el peso de las crías al nacimiento y su posterior desarrollo hasta el destete. Así determina un menor peso de las crías nacidas en los grupos II y III y un mayor peso en las crías nacidas en el grupo I, todo ello con respecto al grupo control y demás grupos experimentales.

* Dpto. Producción Animal-Sanidad. Universidad de León.

** Dpto. Biología Celular y Anatomía. Universidad de León.

*** Dpto. Biología Celular y Fisiología Animal. Universidad Autónoma de Barcelona.

SUMMARY

In this study we have examined the effects of immobilization stress in the rat during gestation. The duration of the pregnancy period, the number of pups, the sex ratio and the corporal development of the offspring from birth until weaning was monitored.

The rats are subjected to two hours of immobilization stress (from 9:00 to 11:00) at different stages of gestation: from day 1 to day 6 of pregnancy (Group I), from day 17 to day 21 of pregnancy (Group II) and during the entire pregnancy period (Group III).

No significant differences were obtained in the length of the gestation period, the size of the litter or the sex ratio. The stress applied seems to influence ($p < 0,05$) the perinatal mortality percentage, the weight of the pups at birth and their later development until weaning. A lower weight was determined in the pups born in groups II and III and a higher weight in the pups born in group I, all of this with regard to the control group and other experimental groups.

INTRODUCCION

Los estudios realizados por numerosos grupos de investigación indican que el estrés puede influir en todas las fases del proceso reproductivo, aunque los mecanismos aún permanecen oscuros. Durante la gestación la hembra puede verse sometida a los mismos agentes estresantes que los que afectan al ciclo sexual, pero en el caso de la gestación actúan sobre unas condiciones más extremas derivadas del propio estado gestacional, tales como las deficiencias nutricionales, el incremento de las demandas físicas, y las alteraciones metabólicas, debido todo ello al incremento de las necesidades generales que determina la propia gestación (12).

En este sentido, diferentes tipos de estrés aplicados durante la gestación, tales como desnutrición, inmovilización, temperaturas extremas..., producen una reducción del peso materno y alteraciones en el desarrollo de la camada. El estrés o el incremento de los niveles sanguíneos de corticoides adrenales se ha asociado en la rata con el incremento de pérdidas embrionarias después de la implantación (3), camadas de menor tamaño (17), retraso en el crecimiento fetal y alta mortalidad al nacimiento (15).

En este trabajo se estudia el efecto del estrés de inmovilización aplicado durante la gestación, sobre la descendencia en la rata. Así mismo se analizan los efectos en el número y peso de los neonatos y en la posterior evolución de su peso corporal.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas de la variedad Sprague-Dawley (70-90 días de edad) con pesos comprendidos entre los 204-300 g. En todos los grupos los animales se mantuvieron bajo condiciones idénticas de luz (12L-12O), temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) y humedad relativa (50-60 %), en grupos de cuatro hembras por jaula con alimento y agua "ad libitum".

Las cubriciones se realizaron durante la noche colocando cuatro hembras y un macho (180 días de edad) en la misma jaula -cubrición en Grupo o en Harén. A la mañana siguiente se comprueba la cubrición mediante frotis vaginal, en base a la presencia de espermatozoides, considerándose como el primer día de gestación. Las hembras preñadas eran separadas al azar en dos grupos: control (7 animales) y tres grupos experimen-

tales, según el momento de la gestación en que se aplica el estímulo estresante: Grupo I, aplicado durante los seis primeros días de gestación (7 animales), Grupo II, durante los seis últimos días de gestación (6 animales) y Grupo III, durante toda la gestación (8 animales).

Las hembras de los grupos experimentales fueron sometidas a un estrés de tipo inmovilización que se conseguía colocando el animal en decúbito externo-abdominal sobre una plancha de madera con las extremidades anteriores y posteriores sujetas (9, 18). Este estrés les era impuesto durante dos horas diarias comenzando siempre a las 9:00 h.

Se controló la duración de la gestación, el número de crías en el momento de nacer, así como el número de crías muertas y el de gestaciones a término. A lo largo de la gestación se realizaron controles periódicos de la ingestión de alimento, estableciéndose el consumo medio en la primera, en la segunda y en la tercera semana de gestación.

Las crías se sexaron y pesaron en el nacimiento. Todas las camadas se igualaron a ocho ó nueve animales y se controló la evolución de su peso corporal a intervalos semanales hasta el momento del destete (21 días posnacimiento).

Los resultados fueron comparados utilizando un análisis de varianza diseñado a tal fin, utilizando el sistema BMDP (2). La comparación entre cada grupo de medias se efectúa mediante el Test de comparaciones a posteriori de Student-Newman-Keuls (21).

RESULTADOS

Todas las hembras llevan a término su gestación y no se observan, en cuanto a su duración, diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales (Grupo I, $22,14 \pm 0,37$ días; Grupo II, $22,00 \pm 0,00$ días; Grupo III, $22,25 \pm 0,46$ días) y el grupo Control ($22,14 \pm 0,37$ días) (Cuadro 1).

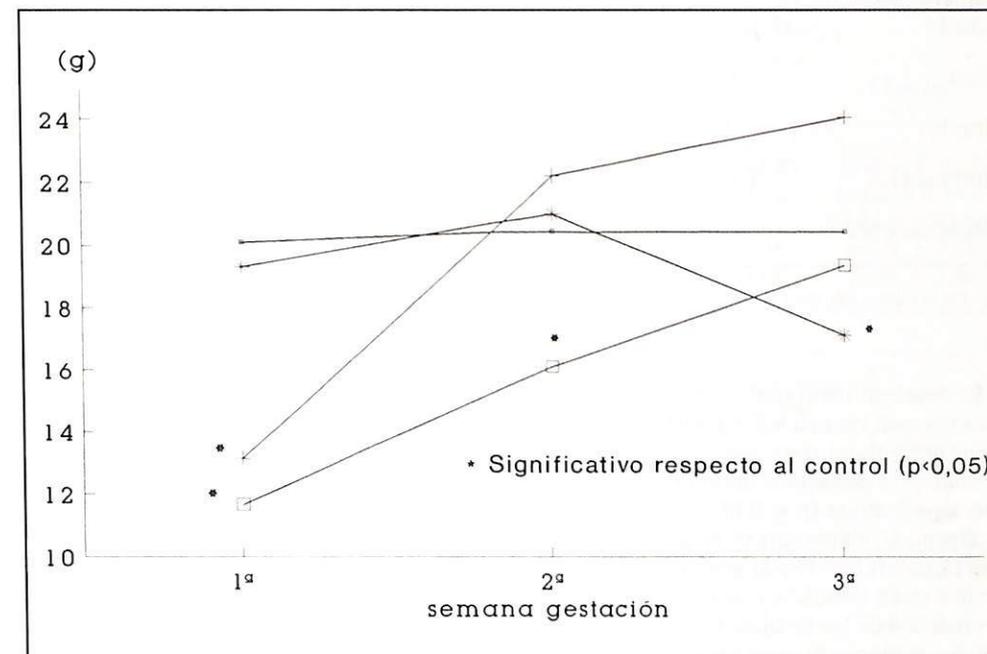


Fig. 1.- Ingesta de alimento durante la gestación.

La ingestión de alimento (Fig.1) a lo largo de la gestación es significativamente ($p < 0,05$) menor en las hembras sometidas a estrés (durante los días en que se aplica el estímulo estresante) con respecto al Grupo Control.

El número medio de crías nacidas por camada (Cuadro 1) es de $13,57 \pm 2,44$ en el Grupo Control, de $12,57 \pm 1,71$ en el Grupo I, de $14,00 \pm 2,19$ en el Grupo II y de $10,87 \pm 4,73$ en el Grupo III, no observándose diferencias significativas entre los distintos grupos, aunque en el Grupo I (estrés aplicado al principio de la gestación) y el Grupo III (estrés aplicado durante toda la gestación) se obtienen camadas más pequeñas.

El porcentaje de mortalidad perinatal se refleja en el Cuadro 1, observándose en el Grupo III una mayor mortandad (12%) estadísticamente significativa, frente al Grupo Control (0%), al Grupo I (1,13%) y al Grupo II (0%).

El sex ratio (relación machos:hembras) (Cuadro 1) no difiere significativamente ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales y el Grupo Control.

CUADRO 1
Efectos del estrés de inmovilización durante la gestación

	Grupos experimentales			
	I	II	III	Control
Duración de la gestación	$22,14 \pm 0,37$	$22,00 \pm 0,00$	$22,25 \pm 0,46$	$22,14 \pm 0,37$
Número de crías/camada	$12,57 \pm 1,71$	$14,00 \pm 2,19$	$10,87 \pm 4,73$	$13,57 \pm 2,44$
Vivos	87	84	76	95
Muertos	1	0	11	0
Mortandad %	1,13 b	0 b	12,64 a	0 b
Macho:hembra	1:1	1:1,04	1:1,07	1:0,72

a,b En la misma fila, los valores con distinta letra difieren significativamente ($p < 0,05$).

El desarrollo corporal de la descendencia se recoge en el Cuadro 2, Figs. 2 y 3. Se observa que los machos nacidos en el Grupo I (estrés prenatal al principio de la gestación) presentan mayor peso al nacimiento y los nacidos en el Grupo II (estrés prenatal al final de la gestación) tienen un menor peso corporal, diferencias que en ambos casos son significativas ($p < 0,05$) con respecto a los demás grupos. Las hembras nacidas en el Grupo II, tienen en el primer día de vida un peso significativamente menor ($p < 0,05$) que en los demás grupos. A los cinco y a los once días de edad se observa un menor peso, estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en las hembras del Grupo II y en los machos de los Grupos II y III con respecto al Control y demás grupos experimentales. A los dieciocho y veintiún días de edad no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) en los pesos de las crías.

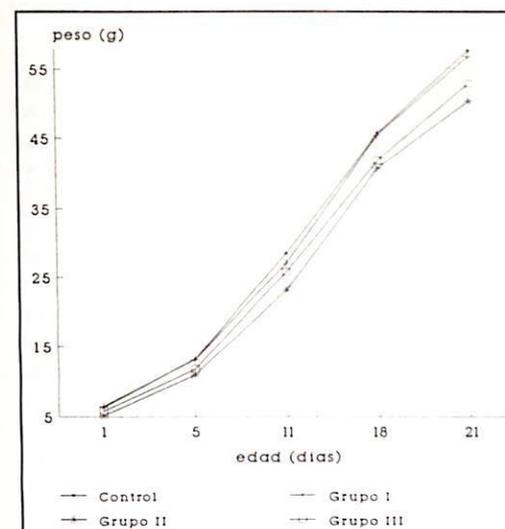


Fig. 2.- Evolución del peso corporal de las crías hembra.

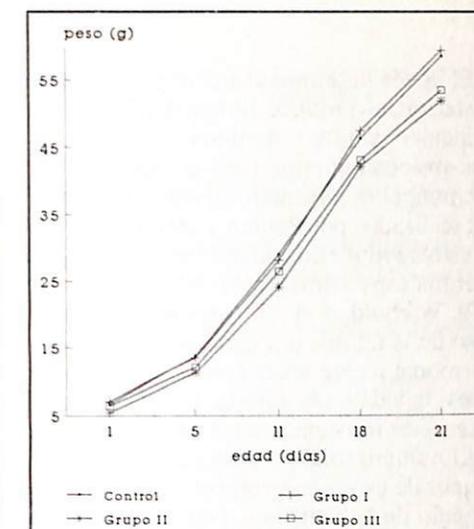


Fig. 3.- Evolución del peso corporal de las crías macho.

CUADRO 2
Efecto del estrés prenatal en el desarrollo corporal de la descendencia

Edad	Grupos Experimentales peso (g) machos			
	I	II	III	Control
Nacimiento	$7,07 \pm 0,61$ b	$5,45 \pm 0,27$ a	$6,40 \pm 0,70$ d	$6,68 \pm 0,32$ d
5 días	$13,53 \pm 1,10$ b	$11,11 \pm 0,96$ a	$11,98 \pm 1,22$ ac	$13,68 \pm 0,79$ b
11 días	$28,17 \pm 2,35$ bc	$24,13 \pm 2,28$ a	$26,47 \pm 2,80$ ac	$29,04 \pm 0,93$ bd
18 días	$47,35 \pm 2,91$	$42,13 \pm 3,92$	$42,99 \pm 4,74$	$46,29 \pm 2,25$
21 días	$59,45 \pm 4,59$	$51,78 \pm 3,82$	$53,40 \pm 6,45$	$58,56 \pm 2,90$

Edad	Grupos Experimentales peso (g) hembras			
	I	II	III	Control
Nacimiento	$6,49 \pm 0,60$ b	$5,16 \pm 0,41$ a	$5,81 \pm 0,50$ b	$6,35 \pm 0,39$ b
5 días	$12,96 \pm 1,06$ bc	$10,86 \pm 1,20$ a	$11,64 \pm 0,86$ ac	$13,05 \pm 0,68$ bc
11 días	$27,03 \pm 2,01$ b	$23,04 \pm 1,89$ a	$25,74 \pm 2,13$ b	$28,47 \pm 1,32$ b
18 días	$45,35 \pm 2,73$	$40,73 \pm 3,21$	$41,83 \pm 3,65$	$45,62 \pm 2,71$
21 días	$56,72 \pm 3,57$	$50,19 \pm 3,47$	$52,73 \pm 5,10$	$57,58 \pm 2,56$

a,b,c,d En la misma fila, los valores con distinta letra difieren significativamente ($p < 0,05$).

DISCUSION

El estrés de inmovilización en las condiciones descritas, no altera la duración de la gestación ni produce ninguna pérdida en el número de gestaciones. Nuestros datos coinciden con los obtenidos por Pollard (15, 16) en ratas Wistar aplicando un estrés de alta ansiedad durante toda la gestación. En ratonas, los trabajos realizados por Rhees y Fleming (19) constatan un alargamiento significativo de la duración de la gestación, y los realizados por Politch y Herrenkohl (13) y por Kinsley y Svare (18) demuestran que el estrés reduce considerablemente las gestaciones que llegan a término, efecto que se acentúa especialmente cuando el estrés se aplica en las primeras fases de la gestación (22). Wiebold et al. (22) señalan que este efecto podría estar mediado, al menos en el caso de la ratona, por cambios en la secreción luteal de progesterona, y esta alteración hormonal puede tener efectos deletéreos en el periodo de implantación y las primeras fases de vida embrionaria. En el caso de la rata, nuestra opinión es que ésta presenta una cierta resistencia a las pérdidas gestacionales.

El número total de crías/camada que se obtiene no difiere significativamente en los grupos de estrés con respecto al control. Esta falta de efecto del estrés prenatal sobre el tamaño de la camada concuerda con los resultados obtenidos en numerosos trabajos aunque utilizan diferentes modelos de estrés (5, 10, 11, 19, 1, 6, 15, 16).

Algunos de estos autores, como Harvey et al. (16), Pollard (15) y Rojo-Fernández (20) señalan un incremento significativo de la tasa de mortalidad perinatal. Nosotros hemos obtenido una mayor mortalidad perinatal en el grupo de estrés aplicado durante toda la gestación.

Por lo que se refiere a la relación machos:hembras, diversos trabajos (7, 8) señalan que las variaciones del sex ratio que ellos encuentran como consecuencia de la aplicación de un estrés prenatal, podrían estar mediadas a través de ciertas modificaciones hormonales inducidas por el propio estrés (ej.: la mayor proporción de hembras al nacimiento podría estar relacionada con unos altos niveles de gonadotropinas en el momento de la concepción). En caso de ser cierta esta hipótesis, en nuestro trabajo no se producirían por efecto del estrés, los cambios gonadotrópicos necesarios para determinar una alteración en el sex-ratio.

La influencia del estrés prenatal en el desarrollo corporal de las crías ha sido objeto de numerosos trabajos. En nuestro estudio hemos observado el nacimiento de crías con mayor peso corporal cuando el estímulo estresante se aplicaba en los seis primeros días de gestación. En este grupo también se aprecia (aunque sin ser significativo) una reducción del tamaño de la camada. Algunos autores (4) obtienen en sus experimentos camadas más pequeñas y un mayor peso de las crías, lo que podría explicarse por un alto porcentaje de muertes embrionarias durante el periodo de implantación (22), y un mayor desarrollo corporal de las crías que llegan a término. Como consecuencia de esa muerte embrionaria y la consiguiente disminución del tamaño de la camada in útero, aumentan las disponibilidades de los fetos supervivientes que explicaría, de esta forma, el aumento de peso de las crías nacidas.

Nuestros datos indican que cuando el agente estresante actúa durante toda la gestación o durante los seis últimos días de gestación, se produce el nacimiento de crías con menor peso y un retraso en el desarrollo corporal posterior hasta los 18 días posnacimiento, igualándose posteriormente el desarrollo corporal para todos los individuos de todos los grupos experimentales. Resultados similares se recogen en los trabajos de Pollard (14, 15), Anderson et al. (1), Rhees et al. (19), Kinsley et al. (8) aplicando diferentes estímulos estresantes. Hay que tener en cuenta que existe una estrecha relación madre-feto y que durante la gestación hay un metabolismo especial que puede verse modificado por el estrés, con una menor ingestión de alimento por parte de la madre que influye en la disponibilidad de nutrientes por parte del feto.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDERSON, D.K.; RHEES, R.W. and FLEMING, D.E. (1985). effects of prenatal stress on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) of the rat brain. *Brain Research.*, **332**: 113-118.
- 2) DIXON, W.R. (1983). BMDP Statistical Software University of California Press.
- 3) EUKER, J.S. and RIEGLE, G.D. (1973). Effects of stress on pregnancy in the rat. *J. Reprod. Fertil.*, **34**: 343-346.
- 4) FRIDE, E. and WEINSTOCK, M. (1984). The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat. *Developmental Psychobiology*, **17**: 651-660.
- 5) GUPTA, C.; SONAWAME, B.R. and YAFFE, S.J. (1980). Phenobarbital exposure in utero: alterations in female reproductive function in rats. *Science*, **208**: 508-510.
- 6) HARVEY, P.W. and CHEVINS, P.F.D. (1987). Deleterious effects of adrenocorticotrophic hormone administration during late pregnancy upon offspring somatic, neurological, and sexual development in mice. *Teratology*, **35**: 229-238.
- 7) JAMES, W.H. (1985). Sex-ratio, dominance status, and maternal hormone levels at the time of conception. *J. Theor. Biol.*, **114**: 505-510.
- 8) KINSLEY, C. and SVARE, B. (1988). Prenatal stress alters maternal aggression in mice. *Physiol. Behav.*, **42**: 7-13.
- 9) KVETNANSKY, R. and MIKULAJ, L. (1970). Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*, **87**: 738-743.
- 10) MENENDEZ PATTERSON, A.; FLOREZ LOZANO, J.A.; FERNANDEZ FERNANDEZ, S. y MARIN, B. (1980). Stress en útero y conducta sexual. *Anuario de Psicología*, **22**.
- 11) MENENDEZ PATTERSON, A.; FERNANDEZ, S. y MARIN, B. (1982). In utero immobilization stress and its effects on the development, behavior and sexual maturity of the rat. *Rev. Esp. de Fisiol.*, **38**: 433-440.
- 12) MOBERG, G.P. (1985). Influence of stress on reproduction: Measure of well-being. In: *Animal stress*. MOBERG, G.P. (ed.). Amer. Physiol. Soc., Maryland.
- 13) POLITCH, J.A. and HERRENKOHL, L.R. (1984). effects of prenatal stress on reproduction in male and female mice. *Physiology and Behavior*, **32**: 95-99.
- 14) POLLARD, I. and DYER, S.L. (1981). Effect of stress administered during pregnancy on the development of fetal testes and their subsequent function in the adult rat. *J. Endocr.*, **107**: 241-247.
- 15) POLLARD, I. (1984). Effects of stress administered during pregnancy on reproductive capacity and subsequent development of the offspring of rats: prolonged effects on the litters of a second pregnancy. *J. Endocr.*, **100**: 301-306.
- 16) POLLARD, I. (1988). Prenatal stress effects over two generations in rats. *J. Endocr.*, **109**: 239-244.
- 17) PRATT, C.N. (1989). Stress-related litter deficits in the golden hamster. *Theriogenology* **31**: 242.
- 18) RECEPKOVA, D. and MIKULAJ, J. (1977). Plasma testosterone of rats subjected to immobilization stress and or HCG administration. *Horm. Res.*, **8**: 51-57.
- 19) RHEES, R.W. and FLEMING, D.E. (1981). Effects of malnutrition, maternal stress, or ACTH injections during pregnancy on sexual behavior of male offspring. *Physiology and Behavior*, **27**: 879-882.
- 20) ROJO FERNANDEZ, M.; MARIN, B. and MENENDEZ-PATTERSON, A. (1985). Efectos del estrés de inmovilización en útero sobre la evolución de la preñez de la rata y varios parámetros de los neonatos. *Rev. Esp. fisiol.*, **41**: 29-36.
- 21) STEEL, R.D. and TORRIE, J.H. (1960). *Principles and procedures in statistics*. McGraw Hill (ed.). New York.
- 22) WIEBOLD, J.L.; STANFIELD, P.H.; BECKER, W.C. and HILLERS, J.K. (1986). The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. *J. Reprod. Fert.*, **78**: 185-192.