

## **Efectos de la desnutricion proteica gestacional en el desarrollo renal**

MARIA E. MACAGNO<sup>1</sup>, CECILIA COURREGES<sup>2</sup>, ALBERTO J. MONSERRAT<sup>3†</sup>

### RESUMEN

Aunque la etiología de la hipertensión arterial esencial es incierta, se consideraron diversos factores contribuyentes a su patogénesis, entre los que se incluyen alteraciones renales, como disminución del área filtrante glomerular por un número menor de glomerulos por riñón, debido a factores genéticos, ambientales y nutricionales. La disminución de nefrones condicionaría la evolución hacia la enfermedad renal crónica. El presente trabajo se llevó a cabo con el objetivo de determinar la influencia de la desnutrición proteica gestacional sobre el desarrollo renal. Se alimentaron ratas Wistar con dietas isocalóricas que contenían 4%, 8% o 20% de proteína durante toda la gestación y con dieta comercial durante la lactancia. Las crías de los tres grupos fueron destetadas a los 21 días de vida y mantenidas con dieta comercial hasta el sacrificio, el día 28. Los resultados obtenidos indicaron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el número de glomerulos en los grupos hipoproteicos *versus* el normoproteico. Las crías de las ratas del grupo 4% mostraron un peso corporal al nacimiento significativamente menor que las provenientes del grupo 20% de proteínas, no así las del grupo de 8%. No se hallaron diferencias morfológicas significativas entre los distintos grupos. Esto indica que la restricción proteica gestacional es capaz de influir permanentemente en el desarrollo renal determinando una disminución del número de glomerulos, lo que favorecería la aparición de efectos deletéreos en los riñones y en el organismo en general durante la vida extrauterina. REV ARGENT CARDIOL 2001; 69: 94-98.

*Palabras clave* Hipertensión arterial - Glomerulos - Desnutrición proteica gestacional - Desarrollo renal

### INTRODUCCION

Estudios recientes indican que existe una gran variabilidad en el número de glomerulos de la población humana sana, siguiendo una distribución gaussiana. (1) Este número está determinado desde el nacimiento, dado que no se forman nuevos nefrones en la vida extrauterina. (2) El valor de la media es de aproximadamente 600.000 y oscila entre 300.000 y 1.200.000 glomerulos. En la rata, a diferencia de los seres humanos, la nefrogenesis continúa en los primeros días de vida extrauterina. (3)

El déficit de glomerulos predispondría a la aparición de enfermedad renal y de hipertensión arterial

(HTA) sistémica; (4, 5) es así que individuos con oligomeganefronia congénita eventualmente desarrollan glomeruloesclerosis y enfermedad renal terminal. (6) En los seres humanos este déficit podría estar dado por retardo del crecimiento intrauterino; (7, 8) En crías de rata puede ser inducido por isquemia uterina, por deficiencia gestacional de proteínas o de vitamina A o por drogas. (9)

En los seres humanos, luego de que el volumen de filtrado glomerular cae por debajo del 50% de los valores normales, sobreviene una pérdida progresiva de la función renal, aun cuando la enfermedad original cese. (5) En ratas, este fenómeno se eviden-

---

Fuentes de apoyo: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad de Buenos Aires

<sup>1</sup> Estudiante de Medicina. Universidad de Buenos Aires

<sup>2</sup> Doctora en Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires

<sup>3</sup> Doctor en Medicina. Universidad de Buenos Aires

† Miembro de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Trabajo recibido para su publicación: 8/00. Aceptado: 10/00

Dirección para separatas: Dr. Alberto J. Monserrat - Patología Experimental, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. - J. E. Uriburu 950, 5° piso - Tel.: 4508-3602 - [E-mail: ajmonserrat@aol.com](mailto:ajmonserrat@aol.com)

cia cuando se realiza la ablacion parcial de la masa renal, lo que lleva a la aparicion de HTA, proteinuria, glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial. En respuesta a la reduccion de la masa renal, en los nefrones remanentes se suceden cambios en la estructura y la funcion, que incluyen hipertrofia glomerular y aumento del filtrado por parte de los glomerulos remanentes en un intento de cumplir con las demandas excretorias del organismo. (10) Las consecuencias en el largo plazo de la adaptacion renal compensatoria en animales que experimentan perdida de nefrones en la infancia no se estudio extensamente, en particular cuando la disminucion es leve.

El presente trabajo se llev6 a cabo con el objetivo de determinar en ratas el efecto de la desnutricion proteica durante la gestacion sobre el desarrollo renal, en particular sobre el numero de glomerulos de las crias.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas Wistar hembras de 200 a 300 g de peso y entre 2 y 4 meses de edad (Bioterio del Departamento de Patologia, Facultad de Medicina), las cuales, a partir del primer dia de preñez detectado por la presencia de tapon mucoso, se dividieron en tres grupos: el primero fue alimentado con una dieta con contenido proteico de 4%; el segundo, con una dieta con contenido proteico de 8% y el tercero, con una dieta con contenido proteico de 20% o grupo normoproteico (Tabla 1). Todas las dietas eran isocaloricas. (Estas tres dietas fueron adquiridas a ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, California, USA.) Los tres grupos tuvieron libre acceso a la ingesta de agua y alimento durante toda la preñez.

Las ratas de los tres grupos, a partir del nacimiento de las crias (de las cuales se conservaron hasta 10 por camada) y durante toda la lactancia fueron alimentadas con dieta comercial estandar (Cooperación, Argentina). El peso corporal al nacimiento es un promedio "ponderado" de las distintas camadas. Luego del destete, a los 21 dias, las crias de los gru-

pos fueron alimentadas con la misma dieta comercial estandar, con control diario de peso y de ingesta de alimento hasta el momento del sacrificio.

Los animales provenientes de todos los grupos se sacrificaron el dia 28 de vida. Se extrajeron los rinones y se utilizo el izquierdo para estudios anatomicopatologicos. Se fijo en formol buffer, se incluy6 en Histoplast y los cortes se colorearon con hematoxilina-eosina y PAS (*periodic acid of Schiff*). El grado de esclerosis glomerular se analizo mediante el indice de Raij (1) y el de fibrosis intersticial mediante el indice de Shih. (12)

El rinon derecho se utilizo para recuento del numero de glomerulos, para lo cual se utiliz6 el metodo de Damadian y colaboradores, (13) que se describe brevemente: se descapsulo el organo y se prosiguió con su digestion acida en acido clorhidrico al 50% V/V en un baño a 37°C durante 90 minutos. Luego se realizo la centrifugacion a 2.000 rpm durante 10 minutos, se decanto el sobrenadante y se resuspendio el sedimento en 200 ml de agua destilada a 4°C durante 120 minutos. Se homogeneiz6 la muestra y se tomaron 10 alicuotas de 50 µl, que se colocaron en sendos portaobjetos. Utilizando un microscopio optico invertido y un objetivo de x 40 se realizo el recuento de glomerulos por alicuota, se tom6 el promedio de las 10 y se calcul6 el numero de glomerulos. El numero de glomerulos totales por rata se calculo mediante la formula: [(N° de glomerulos rin6n derecho/peso rin6n derecho) x I peso ambos rinones].

## Estadística

El analisis estadistico se realiz6 mediante una prueba de ANOVA para dos factores seguida de una prueba de Tukey-Kramer. Se consider6 que la diferencia era significativa cuando  $p < 0,05$ . Todos los resultados se expresaron como media  $\pm$  desvio estandar (DS).

## RESULTADOS

En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos de las crias provenientes de los diferentes grupos analizados, separados por sexo. Los animales provenientes de una gestacion con dieta de 4% de proteinas nacieron con el peso corporal disminuido. En el momento del sacrificio dicha diferencia no se habia compensado ( $p < 0,05$ ).

Las crias provenientes de una gestacion con dieta de 8% de proteinas no presentaron disminucion del peso corporal al nacimiento respecto del grupo proveniente de una gestacion con dieta con 20% de proteinas y sus pesos eran similares en el momento del sacrificio.

El peso de los rinones no mostro diferencias significativas entre los grupos.

**Tabla 1**  
Composicion de las dietas utilizadas (g/100 g)

	Protefna 4%"	Protefna 8%"	Protefna 20%"
Casefna	4,59771	9,19541	22,98881
Aceite de maiz	4,95403	4,90805	4,77011
Sacarosa	63,10345	59,10345	47,10345
Celulosa	7,34481	6,79309	5,13793
Mezcla de vitaminas	1,00000	1,00000	1,00000
Mezcla de sales	4,00000	4,00000	4,00000
176cula de maiz	15,00000	15,00000	15,00000

Dieta ICN USA, N° de catilogo 960254.

\* Dieta ICN USA, N° de cat5logo 960256.

" Dieta ICN USA, N° de catAlogo 960260.

Tabla 2  
Pesos corporal y renal y número de glomerulos a los 28 días de vida

Sexo	Dieta	N	Peso nacimiento (g)	Peso final (g)	Peso ambos rinones (g)	Glomerulos N' total
Hembras	4%	4	4,4 ± 0,0'	56,5 ± 9,0*	0,7644 ± 0,0429	23.357 ± 3.006*
	8%	12	5,2 ± 0,7	79,4 ± 5,6	0,8238 ± 0,1040	48.142 ± 4.738*
	20%	10	5,4 ± 0,9	74,3 ± 0,9	0,7826 ± 0,0265	60.373 ± 5.571
Machos	4%	5	4,4 ± 0,0'	58,7 ± 4,8*	0,7388 ± 0,0753	25.590 ± 6.489*
	8%	8	5,7 ± 1,1	82,1 ± 8,2	0,8064 ± 0,0794	44.079 ± 8.886*
	20%	10	5,2 ± 1,0	82,4 ± 3,8	0,8134 ± 0,0167	57.881 ± 8.572

Media ± DS.

\*  $p < 0,05$  versus dieta 20%.

Solamente se indica significación de hembras 4% y 8% versus 20% y machos 4% y 8% versus 20%.

Tanto los machos como las hembras provenientes de los grupos de gestación con bajo contenido proteico presentaron un número menor ( $p < 0,05$ ) de glomerulos, diferencia esta que fue mayor en el grupo proveniente de una gestación con dieta con 4% de proteína (60%) que en el grupo con 8% (20%), respecto del grupo control.

En los estudios histopatológicos y en los índices de esclerosis glomerular y de fibrosis intersticial no se encontraron alteraciones significativas ni diferencias entre los grupos.

## DISCUSION

La etiología de la HTA esencial permanece incierta. Se consideraron diversos factores contribuyentes a la patogénesis de la HTA sistémica, entre los que se incluyen alteraciones en la circulación, disminución de receptores arteriolar, de la conducción de la información a estos receptores, de la actividad de los neurotransmisores inhibidores centrales simpático-tonicos por la disminución de agonistas o por bloqueo de receptores de los antagonistas. También se sugirió un aumento de la reacción vascular al impulso vasoconstrictor simpático, agentes neurohormonales paracrinos, desarreglos en la hemodinamia regional y sistémica, predisposición genética y racial, exceso de sodio y/o déficit de potasio en la dieta.

El riñón habitualmente se reconoce como un contribuyente en el desarrollo y la persistencia de hipertensión arterial esencial, mediante la alteración de la natriuresis, disminuyendo la secreción de aldosterona o aumentando el factor natriuretico que de otra manera tendría que restaurar la presión arterial a niveles normotensivos por su influencia en el volumen intravascular. (14,15) Es así que trabajos realizados sobre trasplantes renales entre ratas hipertensas y normotensas sugieren que la HTA sistémica es determinada por factores correspondientes al riñón del dador más que a factores propios del

receptor. (16) Se obtuvieron resultados similares en seres humanos. (17, 18)

En 1988, Brenner y colaboradores sugirieron, basados sobre varias asociaciones clínicas y experimentales, que la HTA esencial podría ser el resultado de una "disminución intrauterina del área de la superficie filtrante glomerular total, debida al déficit en el número de nefrones y/o en la superficie de filtración por glomerulo". (4) Esta situación traería aparejada la disminución de la capacidad de excreción de sodio, lo cual podría influir profundamente en la regulación de la presión arterial. Otros modelos experimentales que se relacionan con el desarrollo de HTA en el tiempo debida a la disminución de la masa renal y, por ende, de la superficie glomerular, son aquellos que utilizan la ablación renal parcial mediante 5/6 nefrectomía o mediante la ligadura de ramas de la arteria renal, produciendo infartos localizados. (19, 20)

Cuando se produce una reducción de la masa renal ocurre una disminución de la excreción de sodio, lo que ocasiona un aumento de la presión arterial sistémica y de la presión capilar glomerular. Esto incrementa el filtrado glomerular en los nefrones remanentes, de manera proporcional a la pérdida renal. Concisamente, cuando se realiza la reducción de la masa renal, se produce la caída de la resistencia vascular en la arteriola aferente ( $R_A$ ) y en la eferente ( $R_E$ ) del ovillo capilar glomerular y es mucho más notoria en la primera. Así, el flujo plasmático ( $Q_A$ ) dentro del glomerulo aumenta, y dada la diferencia entre la arteriola aferente y eferente en la caída de la resistencia vascular, la presión hidráulica del capilar glomerular ( $P_{GC}$ ) también se incrementa. De esta manera, aumenta el filtrado glomerular por nefrón (SNGFR), lo que trae aparejadas adaptaciones morfológicas y funcionales en el glomerulo:

$$R_A \downarrow \text{ y } R_E \downarrow \rightarrow TQAYTPGC = \rightarrow TSNGFR. (10)$$

Así, la HTA desarrollada en la vida posnatal se

postula como un factor contribuyente al desarrollo de hipertension capilar glomerular y eventualmente de glomerulosclerosis focal y segmentaria, reduciendose asi aun mas la superficie de filtration glomerular y perpetuandose de esta forma un circulo vicioso de mal pronostico. (10)

Estas alteraciones, en el tiempo, devendrian en el desarrollo de un dano renal progresivo, que llevarla a la insuficiencia renal cronica.

Mackenzie, Lawler y Brenner, en 1996, sugirieron que la deficiencia congenita en el numero total de nefrones podria actuar en la historia natural de la HTA, en dos niveles: en primer lugar, a traves de la restriccion de la excretion de sodio; en segundo lugar, al colocar a los individuos en un punto mas avanzado y susceptible de desarrollo de insuficiencia renal cronica con incremento en la perdida de nefrones, lo que se acompaña de HTA sistémica. (21)

Como ya se dijo, en la poblacion humana existe una gran variabilidad en el numero de glomerulos por rin6n. Esto podria ser un factor condicionante, no solo en el desarrollo de enfermedades renales cronicas en la vida adulta sino tambien en el desarrollo de otras entidades, como la HTA. Trastornos nutricionales intrauterinos predisponen al desarrollo de diversas patologias en la vida extrauterina, entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares e HTA. (22,23) Sin embargo, se realizaron muy pocos trabajos en lo que concierne a la desnutricion proteica gestacional sobre el desarrollo renal (24-26) y son menos aun los que investigan la evolucion en el largo plazo de las alteraciones morfológicas y funcionales generadas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran el hecho de que la deficiencia proteica gestacional afecta el desarrollo renal, reduciendo significativamente el numero de nefrones de manera irreversible, a pesar de la nefrogenesis extrauterina que se produce en las ratas en sus primeros dias de vida. Esta disminuci6n de nefrones estaria asociada con retardo del crecimiento intrauterino que se manifestarfa en el grupo proveniente de gestacion con dieta con 4% de proteinas y no en el grupo 8%, considerando el peso al nacimiento en relación con el grupo 20% o normoproteico.

En trabajos recientes de nuestro laboratorio, siguiendo esta misma linea experimental durante periodos prolongados, se encontr6 en ratas el desarrollo de proteinuria asociada con la desnutricion proteica gestacional y con la disminucion del numero de nefrones a los 4 meses de vida. (27) Cabe entonces inferir que, siguiendo la evolucion de estos animales con desnutricion proteica intrauterina durante mas tiempo, seria posible detectar alteraciones renales y sistémicas.

## SUMMARY

### GESTATIONAL DIETARY RESTRICTION ON RENAL DEVELOPMENT

**Although the etiology of essential arterial hypertension remains unsolved, several factors have been considered to be contributors to its pathogenesis, including renal alterations such as the diminution of the glomerular filtration surface area due to less than normal number of glomeruli per kidney, derived from genetic, environmental and nutritional factors. The retard in intrauterine growth achieved through gestational protein malnutrition, is an antecedent that may condition renal development. The diminution of nephrons might condition the evolution towards a chronic renal disease. The objective of this study was to determine the influence of gestational protein malnutrition over renal development. Wistar rats were fed with isocaloric diets containing 4%, 8% or 20% of protein, throughout their gestation, and with a commercial diet throughout their lactation. Offspring of the 3 groups were weaned on their twenty-first day of life, and maintained with a commercial diet until they were sacrificed, on the twenty-eighth day. The obtained results indicate a significant diminution ( $p < 0.05$ ) in the number of glomeruli in the pups to mothers fed low protein diets versus the normoproteic group. Pups of rats fed the 4% protein showed a lower body weight in relation to those born to 20% protein mothers; no differences were observed between pups born to mothers fed the 8% or 20% protein diets. No significant differences were found in the glomerular sclerosis or in the interstitial fibrosis index. These results indicate that gestational protein restriction is capable of permanently influence renal development, determining glomerular number diminution, which would favor the appearance of deleterious systemic and renal effects throughout post-natal life.**

*Key words* Arterial hypertension - Glomeruli - Gestational protein malnutrition - Renal development

#### Agradecimientos

Al personal técnico de Patología Experimental por su colaboración en la realización del presente trabajo.

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires por el aporte de los fondos que posibilitaron esta investigación.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 1992; 232:194-201.

2. Beckwith JB. Pediatric kidney. SS Sternberg Lippincott. Histology for pathologist (2<sup>nd</sup> ed). Philadelphia, Raven Pub 1997; pp 789-797.
3. Larsson L, Aperia A, Wilson P. Effect of normal development on compensatory renal growth. *Kidney Int* 1980; 18: 29-35.
4. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more of the other? *Am J Hypertens* 1988; 1: 335-347.
5. Brenner BM, Mackenzie HS. Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int* 1997; 2: S124-S127.
6. McGraw M, Poucell S, Sweet J y col. The significance of focal segmental glomerulosclerosis in oligomeganephronia. *Int J Pediatr Nephrol* 1984; 5: 67-72.
7. Leroy B, Josset P, Morgan G y col. Intrauterin growth retardation (IUGR) and nephron deficit: Preliminary study in man. *Pediatric Nephrol* 1992; 6: 21c (abstract).
8. Hinchliffe SA, Lynch MRJ, Sargent PH y col. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Brit J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 296-301.
9. Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C. The number of nephrons in the mammalian kidney: Environmental influences play a determining role. *Exp Nephrol* 2000; 8: 63-65.
10. Rennke HG, Anderson S, Brenner BM. The progression of renal disease: Structural and functional correlations. *En: Tisher CC, Brenner BM. Renal pathology with clinical and functional correlations* (2<sup>nd</sup> ed). Philadelphia, JP Lippincott Co 1994; pp 116-142.
11. Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 1984; 26: 137-143.
12. Shih W, Hines WH, Neilson EG. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney Int* 1988; 33:113-118.
13. Damadian EV, Shawayri E, Bricher NS. On the existence of non urine forming nephrons in the diseased kidney of the dog. *J Lab Clin Med* 1965; 65: 26-39.
14. Agrest A. Reflexiones sobre la presión arterial y sus reins. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 657-661.
15. Brenner BM. The etiology of adult hypertension and progressive renal injury: An hypothesis. *Bull Mem Acad R Med Beig* 1994;149: 121-127.
16. Bianchi G, Fox U, DiFrancesco G y col. Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med* 1974; 47:448-453.
17. Guidi E, Bianchi G, Rivolta E y col. Hypertension in man with a kidney transplant: Role of familial vs other factors. *Nephron* 1985; 41; 14-21.
18. Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP y col. Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med* 1983; 309:1009-1015.
19. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG y col. Hyperfiltration in remnant nephrons: A potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981; 241: F85-F93.
20. Yoshida Y, Fogo A, Ichikaga I. Glomerular hemodynamics changes vs hypertrophy in experimental glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1989; 35: 654-660.
21. Mackenzie HS, Lawler EV, Brenner BM. Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? *Kidney Int* 1996; 49: S30-S34.
22. Barker DJP. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *British Med Bull* 1997; 53: 96-108.
23. Hoet JJ, Hanson MA. Intrauterine nutrition: Its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol* 1999; 514: 617-627.
24. Zeman FJ. Effect of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young of rats. *J Nutrition* 1968; 94: 111-116.
25. Merlet-Bénichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M y col. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatr Nephrol* 1994; 8: 175-180.
26. Mackenzie HS, Lyckx VA, Lawler EV y col. Reduced glomerular number in the offspring of female rats subjected to gestational dietary protein restriction is associated with increased glomerular volume. Abstracts: XVth International Congress of Nephrology, Buenos Aires, 1999; p 170 (abstract).
27. Courreges MC, Macagno ME, Lago N y col. Desnutrición proteica gestacional y progresión de la enfermedad renal. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 754 (abstract).