

Dieta hiperproteica en la gestación. Efectos sobre el metabolismo neonatal*

P. Varela **, E. Muñoz-Martínez, A. Marcos, M. T. Unzaga y G. Varela

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense
28040 Madrid

(Recibido el 21 de febrero de 1985)

P. VARELA, E. MUÑOZ-MARTÍNEZ, A. MARCOS, M. T. UNZAGA and G. VARELA. *Effects of a High Protein Diet During Pregnancy on the Metabolism of Newborns*. Rev. esp. Fisiol., 42, 111-116. 1986.

The effect of a high protein diet (20 % casein + D,L-methionine) administered to Wistar rats during pregnancy on some aspects of cellular growth and RNA metabolism of progeny has been studied. Comparisons were made with well-nourished (10 % casein + D,L-methionine) controls. Newborns individual weight, litter weight and number of newborns per litter were unmodified. However, neonate protein content dropped significantly when compared with controls. Both rate of DNA and number of nuclei were unchanged. Protein/DNA ratio (cellular size relative to protein) decreased, which might have led to an atrophy phenomenon, even if the newborn weight/number of nuclei ratio was not modified. Acid DNase activity rose, bringing about DNA breakdown. Total RNA content together with RNase activity fell in newborn from rats suffering high protein diet. Moreover, protein synthesis capacity (RNA/protein ratio) did not change. These results suggest that the administration of a high protein diet to pregnant rats lead to changes in newborn protein rate and nucleic acid turnover by modulating specific nuclease activity.

Key words: High protein diet, DNA, RNA, Neonate.

El estado nutritivo de la madre, así como la dieta que ingiere durante el proceso gestacional, son factores que influyen en el desarrollo y crecimiento fetal.

La dieta condiciona la concentración de metabolitos individuales en la circulación materna, determinando así la disponibilidad de sustratos, entre los cuales las proteínas inciden básicamente sobre el crecimiento intrauterino.

La fuente principal de nitrógeno que puede satisfacer la alta tasa de síntesis proteica fetal, procede del *pool* de aminoácidos maternos, que vía placenta llegan al feto, siendo los mecanismos de

* Trabajo subvencionado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT) N.º 3875.

** A quien debe dirigirse la correspondencia.

transferencia placentaria los que arbitran lo que es disponible para éste (2, 19).

Por lo tanto, la estructura y función del concepto dependen de un aporte adecuado de nutrientes, por lo que cualquier variación en la tasa proteica de la dieta materna puede afectar al desarrollo fetal.

Así, CHURCHILL (3) y DOBBING (4) señalan que la existencia de un estado de malnutrición proteica materna antes o durante el proceso gestacional, o bien, en ambos períodos de tiempo, conduce al deterioro del crecimiento intrauterino.

Por otra parte, se ha observado que una suplementación dietaria de proteínas a madres malnutridas, puede mejorar sensiblemente el crecimiento del feto (9, 14).

Sin embargo, actualmente se considera que la deficiencia en el desarrollo fetal está condicionada, no ya a un defecto de proteína dietaria, sino al aporte excesivo de este sustrato durante gestación.

Así, SUSSER (24) señala que el incremento proteico en la dieta puede tener consecuencias adversas para la madre y el concepto, lo que pone en duda la idea, hasta ahora predominante, de que el exceso de proteína podría ejercer efectos beneficiosos adicionales.

A fin de profundizar en las posibles alteraciones que las dietas hiperproteicas determinan sobre el desarrollo del recién nacido, se considera de interés conocer su influencia sobre el crecimiento celular y el metabolismo del RNA, de neonatos procedentes de ratas gestantes, sometidas a una dieta con un contenido proteico superior al control (18).

Material y Métodos

Se utilizan los neonatos procedentes de 20 ratas Wistar, con un peso inicial de 160 ± 10 g, repartidas en dos grupos: a) *Control*, alimentado con una dieta basal (10 % caseína + D,L-metioni-

na) (18), y b) *Hiperproteico*, al que se le administra una dieta moderadamente alta en proteína, que contiene 19,80 % de caseína, 0,20 % de metionina, 33,02 % de azúcar y 33,02 % de almidón. De esta manera se consigue que las dos dietas utilizadas sean isocalóricas entre sí.

Transcurrida una semana de adaptación a las dos dietas suministradas se procede al cruce, para lo cual se aloja un macho con dos hembras, comprobando la fecundación por aparición de espermatozoides en la vagina.

A lo largo del período gestacional, los animales son instalados en células individuales de metabolismo, ubicadas en una habitación iluminada de 08 a 20 h, mantenida a temperatura (23 °C) y humedad constantes.

Durante todo el experimento se les suministró alimento y agua *ad libitum*, controlando la ingesta cada día. Los neonatos se recogen inmediatamente después del parto, se pesan y se congelan mediante su introducción en nitrógeno líquido, almacenándolos a -18 °C.

Se utilizan 8 neonatos tomados al azar procedentes de cada una de las veinte camadas. Cada muestra se obtiene a partir de un *pool* procedente de cuatro neonatos por camada.

Veinte muestras correspondientes a ambos grupos experimentales se destinan a la determinación de proteína soluble y actividades enzimáticas, para lo cual se homogenizan en un homogenizador ultraturrax con solución tampón (ClNa 0,1 M y CO_3HNa 0,05 M) a pH 7,4 en una proporción del 20 % (P/V). Posteriormente, se centrifuga a $550 \times g$ durante 10 min a 0-4 °C. Alícuotas de los sobrenadantes se utilizan para los análisis ya indicados.

Las otras veinte muestras se emplean para la determinación de los ácidos nucleicos, que se lleva a cabo previa extracción de los mismos con ácido tricloroacético.

Las actividades de DNasa y RNasa ácidas se determinan respectivamente por los métodos de McDONALD (12) y KALNITSKY *et al.* (7) modificados. Dicha modificación consiste, en variar los períodos de incubación de la muestra. Así para la DNasa ácida se fija en 45 min y para la RNasa ácida en 60 min. La actividad enzimática se expresa por mg de proteína, por neonato total y por célula.

Las proteínas se determinan por el método de LOWRY *et al.* (10). La cuantificación de DNA y RNA se realizan mediante el método de SCHMIDT y THANNHAUSER (22) con modificación de MUNRO y FLECK (15).

La evaluación del número de núcleos y el tamaño celular se determinan de acuerdo con las fórmulas de ENESCO y LEBLOND (5).

Los resultados son expresados como valores medios $\pm$ SEM. Las diferencias significativas obtenidas comparando los datos del grupo hiperproteico frente al control, se determinan mediante el test de la *t* de Student (23). La probabilidad menor de 0,05 se considera significativa.

Resultados y Discusión

La dieta experimental utilizada conduce a modificaciones que afectan tanto a las ratas gestantes, como al desarrollo fetal.

La dieta hiperproteica condiciona en las madres una ganancia de peso durante la gestación, un 8,8 % mayor que en controles. Para NAISMITH *et al.* (17) este incremento es consecutivo al depósito de grasa en la carcasa, ovarios y zonas lumbar y subcutánea. También SUSSEY (24) encuentra una ganancia de peso superior en mujeres gestantes sometidas a dietas ricas en proteínas (tabla I).

No obstante, la cantidad de dieta ingerida diariamente es un 17 % menor que en controles. A este respecto, PRESTON-MERCIER *et al.* (20) señalan que este efecto podría estar provocado por algún factor, relacionado con la mayor o menor facilidad del animal para almacenar o disipar energía, limitándose así la capacidad de la rata para incrementar su ingesta.

En estos animales se observa también una disminución en la pérdida de peso

Tabla I. Efecto de la dieta hiperproteica sobre la ingesta y parámetros ponderales de las ratas gestantes y sus neonatos.

Parámetros (g)	Control	Hiperproteico
Ingesta (s.s.) (rata/día)	18,04 $\pm$ 0,65	14,97 $\pm$ 0,45**
Peso inicial	161,11 $\pm$ 1,60	163,97 $\pm$ 1,79
Peso pre-parto	268,80 $\pm$ 2,75	281,15 $\pm$ 3,38*
Peso post-parto	199,11 $\pm$ 5,09	224,86 $\pm$ 3,87***
Ganancia peso	107,69 $\pm$ 1,13	117,18 $\pm$ 1,20***
Pérdida peso por parto	69,68 $\pm$ 4,11	56,29 $\pm$ 2,75*
Tejidos Intrauterinos maternos	13,74 $\pm$ 1,46	6,16 $\pm$ 0,44***
Peso Individual neonato	5,37 $\pm$ 0,53	5,25 $\pm$ 0,04
Peso camada	55,97 $\pm$ 2,75	50,12 $\pm$ 3,07
Número neonatos/camada	10,50 $\pm$ 0,84	9,46 $\pm$ 0,67

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control.

Tabla II. Efecto de la dieta hiperproteica sobre el crecimiento celular de los neonatos.

	Control	Hiperproteico
Proteína (mg/neonato)	493,64 ± 33,49	294,58 ± 15,24***
DNA (mg/neonato)	10,34 ± 0,94	9,01 ± 0,44
Número núcleos (millones) ^a	1669,00 ± 152,00	1454,00 ± 72,00
Proteína/DNA	51,44 ± 5,14	34,40 ± 2,61**
Tamaño celular (ng) ^b	3,42 ± 0,30	3,62 ± 0,17
DNasa (U.I.)/neonato	165,00 ± 16,88	260,90 ± 4,16***
DNasa/mg proteína	0,38 ± 0,03	0,89 ± 0,05***
DNasa/DNA	15,95 ± 1,63	28,95 ± 1,57***

^a (DNA/6,2)×10²; ^b (Peso neonato/número núcleos)×10²; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 en comparación con el grupo control.

por parto, que llega a ser de un 19,22 % respecto a los controles. De ello se deduce que los tejidos relacionados con la concepción y el desarrollo fetal están comprometidos, al incrementar la tasa de proteína en la dieta. Sin embargo, el número de neonatos por camada, así como los parámetros ponderales de los recién nacidos, no se modifican (tabla I), lo que coincide con la invariabilidad en el crecimiento celular, a consecuencia de la constancia en la tasa de DNA total y del número de núcleos (tabla II).

Este resultado significa que son los tejidos reproductores maternos los más afectados por la dieta hiperproteica. De acuerdo con esto, el peso de los tejidos intrauterinos maternos decrece un 55 % respecto a control (tabla I), lo que puede comprometer la transferencia de sustratos al feto. La proteína soluble del neonato aparece seriamente dañada cuando la madre ingiere la dieta problema, alcanzando un descenso del 40 % (tabla II).

Esta caída proteica condiciona la disminución de la razón proteína/DNA, que implicaría la existencia de un proceso de atrofia en los neonatos originado, probablemente, por el escaso desarrollo de los tejidos placentarios.

Sin embargo, el hecho de que no se modifique el tamaño celular, relacionado con el peso total de las crías, parece indicar, que el lugar de la proteína en la célula estaría reemplazado por otros componentes intracitoplasmáticos, manteniendo así invariable el peso del neonato.

Los mismos resultados aparecen en neonatos procedentes de madres malnutridas, a consecuencia de la escasez de sustratos ingeridos por la madre, lo que también influiría en un menor tamaño y funcionalidad de la placenta (8, 21).

Por otra parte, el aumento de la degradación del DNA, deducido de la elevada actividad específica de DNasa ácida (tabla II), sugiere que el mantenimiento de la tasa de DNA, podría producirse a través de un incremento en su síntesis. Ello parece señalar la existencia de un mecanismo de modulación enzimática por efecto de la dieta hiperproteica, al igual que se ha encontrado previamente en situaciones de malnutrición (16).

A este respecto CASTRO y SEVALL (1), indican que el porcentaje de DNA, susceptible de digestión por nucleasa microcócica *in vitro*, varía en función de la dieta.

Tabla III. Efecto de la dieta hiperproteica sobre el metabolismo del RNA en neonatos.

	Control	Hiperproteico
RNA (mg/neonato)	28,27 $\pm$ 2,52	21,81 $\pm$ 0,890*
RNA/proteína	0,06 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,006
RNasa (U.I.)/neonato	3,77 $\pm$ 0,50	N.D.
RNasa/mg proteína	7,63 $\pm$ 0,73	—
RNasa/RNA	0,17 $\pm$ 0,03	—
RNasa/DNA	0,36 $\pm$ 0,05	—

N.D. = no detectado; * $p < 0,05$ en comparación con el grupo control.

Además, la dieta utilizada (20 %) da lugar a una disminución del 23 % en la tasa de RNA total del neonato (tabla III). Este decrecimiento coincide con una pérdida de la actividad específica del enzima RNasa ácida, que llega a hacerse indetectable, lo que conlleva la desaparición de su capacidad degradativa. De estos datos se deducen que el metabolismo del RNA neonatal se encuentra disminuido en estas circunstancias.

A este respecto, GOLDBERG (6) señala que el aporte excesivo de aminoácidos provoca una disminución del catabolismo del RNA muscular en ratas. A los mismos resultados se ha llegado previamente en hígado de ratas sometidas a malnutrición proteico-calórica (16).

Estas modificaciones determinan por otra parte, el mantenimiento de la razón RNA/proteína, lo que señala de acuerdo con MILLWARD *et al.* (13) que la capacidad de síntesis proteica no presenta alteración alguna bajo estas condiciones.

A pesar de este resultado, se puede pensar, sin embargo, en la existencia de un factor limitante de dicha síntesis, derivado del notable déficit de la transferencia materno-fetal de aminoácidos, lo que condicionaría la depleción proteica ya mencionada.

Por consiguiente, la dieta hiperproteica ingerida por la rata gestante conduce a una alteración, tanto en el contenido proteico celular, como en el metabolismo de los ácidos nucleicos DNA y RNA de

los neonatos, mediante un mecanismo de modulación en la actividad de las nucleasas específicas.

Resumen

Se compara el efecto de una dieta moderadamente hiperproteica (20 % caseína + D,L-metionina) e isocalórica con la control (10 % caseína + D,L-metionina), administrada a ratas durante la gestación, sobre algunos aspectos del crecimiento celular y el metabolismo del RNA de los neonatos. El peso individual de los recién nacidos, peso de la camada y el número de crías por camada no se modifican. Sin embargo, aparece una disminución del contenido proteico, aun cuando no varían ni la tasa de DNA ni el número de núcleos. Se observa un fenómeno de atrofia respecto a la proteína, debido al descenso en la razón proteína/DNA, aunque se mantiene el tamaño celular (peso neonato/número núcleos). El incremento en la actividad específica de DNasa ácida junto a la invariabilidad del DNA parece indicar una mayor síntesis y con ello, un turnover acelerado del nucleótido. La tasa de RNA disminuye paralelamente a la proteína, lo que origina el mantenimiento en la capacidad de síntesis proteica (razón RNA/proteína). La actividad específica de RNasa no se detecta en estas condiciones. Se puede concluir que la dieta hiperproteica administrada a la madre durante gestación, conduce a una alteración en el contenido proteico celular de los neonatos, así como en el metabolismo de los ácidos nucleicos estudiados, mediante la modulación de la actividad de las nucleasas específicas.

Bibliografía

1. Castro, C. E. y Sevall, J. S.: *J. Nutr.*, 110, 105-116, 1980.
2. Cornblath, M. y Schwartz, R.: En «Disorders of Carbohydrate Metabolism in Infancy» (2.^a edic.), Saunders, Philadelphia, 1976, pp. 29-71.
3. Churchill, J.: En «Nutritional Impacts on Women» (Moghissi, K. S. y Evans, T. N., eds.), Harper y Row, Hagerstown, 1977, p. 69.
4. Dobbing, J.: En «Malnutrition, Learning and Behaviour» (Scrimshaw, N. S. y Gordon, J. E., eds.), MIT Press, Cambridge, 1968, p. 181.
5. Enesco, M. y Leblond, C. P.: *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 10, 530-535, 1962.
6. Goldberg, A. L., Howell, E. M., Li, J. B., Martel, S. P. y Prouty, W. F.: *Fed. Proc.*, 33, 1112-1120, 1974.
7. Kalnitsky, G., Hummel, J. P., Resnick, H., Carter, J. R., Barnett, L. B. y Dierks, C.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 81, 542-566, 1959.
8. Laga, E. M., Driscoll, S. G. y Munro, H. N.: *Pediatrics*, 50, 24-32, 1972.
9. Lechtig, A., Delgado, H., Lasky, R. E., Yarbrough, C., Klein, R. E., Habich, J. P. y Behar, M.: *Am. J. Dis. Child.*, 129, 434-437, 1975.
10. Lowry, O. A., Rosebrough, N. J., Fair, A. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
11. Marcos, A., Muñoz-Martínez, E., Unzaga, M. T., Rey de Viñas, J. L. y Varela, G.: *Rev. esp. Fisiol.*, 40, 165-170, 1984.
12. McDonald, M. R.: En «Methods in Enzymology» (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.), Academic Press, Nueva York, 1955, Vol. II, pp. 437-447.
13. Millward, D. J., Garlick, P. J. y Nanyelugo, D. O.: *Proc. Nutr. Soc.*, 34, 33A, 1974.
14. Mora, J. O., De Paredes, D., Wagner, L., De Navarro, L., Suescun, J., Christiansen, N. y Herrera, M. G.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 455-462, 1979.
15. Munro, H. N. y Fleck, A.: *Analyst.*, 91, 78-88, 1966.
16. Muñoz-Martínez, E., Marcos, A., Unzaga, M. T. y Varela, G.: *Rev. esp. Fisiol.*, 38, Supl., 317-333, 1982.
17. Naismith, D. J., Richardson, D. P. y Pritchard, E.: *Br. J. Nutr.*, 48, 433-441, 1982.
18. Nutrition Research Council: «Nutrition Requirements of Laboratory Animals». National Academy Sciences, Washington, D.C., 1978, pp. 7-37.
19. Pedersen, J.: En «The Pregnant Diabetic and Her Newborn» (2.^a ed.), Williams y Wilkins, Baltimore, 1977, pp. 106-122.
20. Preston-Mercier, L., Watson, D. F. y Ramlet, J. S.: *J. Nutr.*, 111, 1117-1123, 1981.
21. Rosso, P.: *Fed. Proc.*, 39, 250-254, 1980.
22. Schmidt, G. y Thannhauser, S. J.: *J. Biol. Chem.*, 161, 83-89, 1945.
23. Sokal, R. R. y Rohef, F. J.: En «Biometría: Los Principios y la Práctica de la Estadística en la Investigación Biológica». H. Blume, Madrid, 1979, pp. 145-194.
24. Susser, M.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 784-803, 1981.