

## CRECIMIENTO CELULAR DE UTERO, PLACENTA Y FETOS DURANTE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA MATERNA CRÓNICA EN RATAS

*Julia Araya,<sup>1</sup> M. Cristina Reyes,<sup>2</sup> Cristina M. Baginsky<sup>2</sup>  
y Manuel Ruz<sup>2</sup>*

Facultad de Medicina, División de Ciencias Médicas Norte,  
Universidad de Chile, Santiago, Chile

### RESUMEN

Se cruzaron ratas hembras vírgenes, crónicamente desnutridas por restricción de una dieta balanceada, por el término de 24 horas. Estas fueron sacrificadas a los 14, 16, 18 y 20 días post-concepción; se extrajo útero, placentas y fetos, cuantificando en ellos el contenido de ácidos nucleicos y proteínas. Según se determinó, la restricción dietética crónica disminuyó el número de crías, la ganancia de peso materno, el peso del útero, las placentas y los fetos. La división celular se vio dramáticamente disminuida en los tejidos estudiados, siendo esta diferencia significativa en útero a los 14 y 20 días post-concepción ( $P \ll 0.001$ ). Se observó que el descenso en el contenido total de ARN y proteína en el grupo con restricción dietética fue menos importante que la disminución constatada en el contenido de ADN; de ahí que la relación ARN/ADN y de proteína/ADN estuviese significativamente aumentada al final de la preñez en los tejidos analizados.

---

Manuscrito modificado recibido: 29-11-82.

1 Directora del Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas Norte, Universidad de Chile, Independencia 1027, 3o. P., Santiago, Chile.

2 Miembros del citado Departamento.

Se comenta la menor celularidad, el mayor tamaño celular, y el contenido de ARN intracelular aumentado en los órganos de la reproducción de ratas desnutridas, en relación a crecimiento fetal disminuido.

## INTRODUCCION

En las primeras etapas del crecimiento normal de un órgano o animal el número de células aumenta linealmente, luego la velocidad de división celular comienza a disminuir continuando casi imperceptiblemente, hasta que el órgano ha alcanzado su máximo tamaño (1). Como resultado del descenso en la velocidad de síntesis del ácido desoxiribonucleico (ADN), el crecimiento celular posterior se caracteriza por una acumulación de proteína y, presumiblemente, de cantidades proporcionales de agua (2).

Al igual que los órganos fetales, el útero y la placenta tienen un crecimiento proliferativo durante la gestación; de ahí que podrían ser susceptibles a daños ocasionados por factores adversos, por ejemplo, la desnutrición materna (3-6).

Se ha informado (7) que la desnutrición materna es uno de los factores que contribuyen al bajo peso del recién nacido, siendo más evidente y dramático el efecto en el producto de la concepción si la gestante inicia su vida reproductiva con desnutrición preconcepcional (8). En experiencias anteriores hemos comunicado que una desnutrición proteínico-calórica impuesta precozmente desde los primeros días de vida de la futura gestante, ratarda la aparición de la pubertad en la rata. Además, ello provoca un alto grado de infertilidad y un retraso en el crecimiento de tal magnitud que necesita 160 días de vida para lograr el peso con que las ratas control de 60 días de edad habitualmente inician el proceso de la reproducción en nuestro bioterio.

Con estos antecedentes, nos pareció importante establecer si una restricción calórica materna impuesta sólo antes de la pubertad y durante la preñez, altera el crecimiento celular normal del útero y placenta y su posible relación con el retardo del crecimiento fetal.

## MATERIAL Y METODOS

### *Dieta*

Se utilizó caseína al 25% (9NDpCal<sup>0</sup>/o) preparada según Araya y Ruz (8).

### *Animales*

Cien ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar, de 45 días de edad, cuyo peso inicial promedio era de 100 g, se dividieron en dos grupos. El grupo control (C) recibió alimentación *ad libitum* durante toda la experiencia, consistente en la dieta de caseína al 250/o. Al grupo con alimentación restringida (R) se le ofreció sólo el 750/o de la misma dieta consumida por el grupo C, para lo cual se midió diariamente en el grupo C la ingesta promedio del día anterior.

Quando las ratas de ambos grupos lograron un peso promedio de 152 g —el control lo alcanzó a los 60 días de edad, y el restringido a los 75 días de edad— se les practicó un frotis vaginal y sólo al detectar la fase proestro, se cruzaron por 24 horas. Se consideró como día 0 el momento de separar al macho. Las ratas preñadas se ubicaron en jaulas individuales, siendo la temperatura del bioterio de 25°C, humedad 750/o, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. A los 14, 16, 18 y 20 días post-concepción se sacrificaron ocho ratas de cada grupo, a las que se les extrajo por cesárea el útero, las placentas y los fetos. Los tejidos fueron homogenizados en agua destilada fría (0-4°C) separadamente (útero, todas las placentas y todos los fetos de la camada) a concentraciones de 100/o peso/volumen. En cada homogenizado se determinó el contenido de ADN según Burton (9), ARN según Schmidt y Thanhauser, modificado por Fleck y Munro (10) y proteína, de acuerdo al procedimiento de Lowry *et al.* (11).

En el análisis estadístico se utilizó la prueba de "t" de Student para obtener la diferencia de promedios, considerándose como significativo un  $P < 0.05$ .

### RESULTADOS

La ingesta energética (Kcal/día), ganancia de peso materno (g/20 días), peso promedio final del útero, placentas y fetos de los grupos C y R se exponen en la Tabla 1. Según puede observarse, la restricción de la dieta balanceada afectó la ganancia ponderal materna ( $P \ll 0.001$ ); el número de crías de la camada también se vio disminuido aun cuando la diferencia no alcanzó significación estadística ( $P > 0.05$ ).

En el grupo desnutrido el peso del útero al final de la experiencia disminuyó en un 140/o, la placenta en un 80/o y el feto un 60/o en relación a las ratas control.

TABLA 1

INGESTA DE ENERGIA METABOLIZABLE PROMEDIO (Kcal/día),  
GANANCIA DE PESO MATERNO DURANTE 20 DIAS, Y PESO  
DEL UTERO, PLACENTA Y FETO A LOS 20 DIAS DE EDAD  
GESTACIONAL EN RATAS PREÑADAS CONTROL Y  
EN RESTRINGIDAS CALORICAS

Grupo	Control <sup>a</sup>	Restringido <sup>a</sup>	P
Ingesta (Kcal/día)	45.3* ± 3.11	34.0 ± 2.35	≤ 0.001
Ganancia de peso materno (g)	105.8 ± 12.2	41.9 ± 11.7	≤ 0.001
Peso útero (g)	2.9 ± 0.36	2.5 ± 0.30	< 0.05
Peso placenta (g)	0.404 ± 0.064	0.371 ± 0.034	> 0.20
Peso feto (g)	1.96 ± 0.38	1.84 ± 0.06	> 0.30
Número de fetos por camada	9.5 ± 1.87	7.9 ± 1.36	> 0.05
Rango	8 - 13	6 - 9	

\* Valores promedio ± desviación estándar.

<sup>a</sup> En cada determinación se utilizaron ocho ratas de cada grupo.

En la Tabla 2 se informa el contenido de ADN a los 14, 16, 18 y 20 días postconcepcionales en órganos de la reproducción y fetos. Puede apreciarse un contenido menor en útero, placenta y feto del grupo R en relación al grupo C, diferencias que se magnifican al día 20. El órgano más afectado dicho día fue el útero ( $P \leq 0.001$ ).

Al cuantificar el contenido total e intracelular de ARN en los tejidos estudiados de ratas preñadas control y restringidas calóricas, se observa (Figura 1) que al 14° día no hubo diferencias en cuanto al contenido total de ARN entre los grupos, siendo la única excepción el útero. No obstante, a los 18 días postconcepcionales, cuando el contenido total de ARN alcanzó un valor máximo en el útero y placentas de las ratas control, en contraste con los animales desnutridos, en los que éste fue significativamente menor ( $P \leq 0.001$ ).

TABLA 2

CONTENIDO DE ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO DURANTE EL CRECIMIENTO DEL UTERO, PLACENTA  
Y FETOS EN RATAS PREÑADAS CONTROL Y EN RESTRINGIDAS CALORICAS

Grupo	Control				Restringidas				P	
	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	14	20
Edad gestacional (días)	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	14	20
<i>Utero</i>										
ADN (mg/útero)	7.2* ± 1.28	7.2 ± 1.40	7.3 ± 0.44	8.3 ± 0.77	4.5* ± 0.32	4.9 ± 0.50	5.0 ± 0.51	5.9 ± 0.43	< 0.001	≪ 0.001
<i>Placenta</i>										
ADN (mg/placenta)	0.446* ± 0.041	1.140 ± 0.36	1.250 ± 0.088	1.310 ± 0.12	0.364* ± 0.071	0.788 ± 0.11	0.890 ± 0.071	1.056 <sup>o</sup> ± 0.13	< 0.02	< 0.01
<i>Feto</i>										
ADN (mg/feto)	0.608* ± 0.16	2.29 ± 0.31	5.71 ± 0.46	13.63 ± 1.91	0.422* ± 0.074	1.600 ± 0.23	4.13 ± 0.37	10.56 ± 0.56	< 0.02	< 0.01

\* Valor promedio ± desviación estandar.

<sup>a</sup> En cada determinación se utilizaron ocho ratas preñadas de cada grupo.

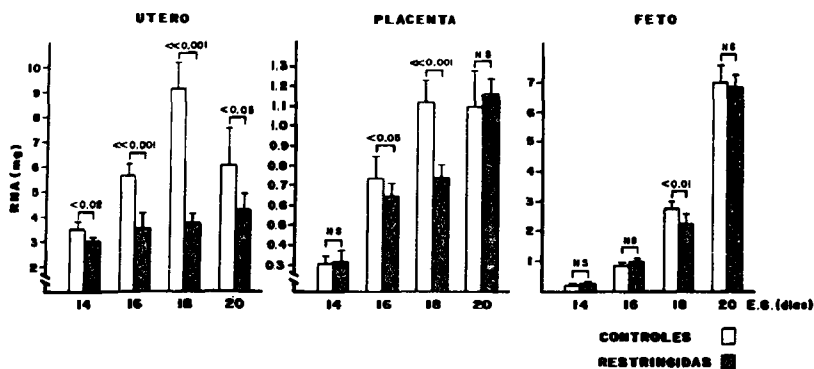


FIGURA 1

Contenido total de ácido ribonucleico durante el crecimiento del útero, placenta y fetos de ratas preñadas control y restringidas calóricas

En la Tabla 3 se da cuenta del contenido total de proteína desde el 14° al 20° día después de la concepción, en útero, placenta y feto de ratas preñadas control y de restringidas calóricas. Los datos revelan que la proteína total en las ratas restringidas estuvo disminuida con respecto al control al 20° día, sólo en útero y placenta.

La relación ARN/ADN y prot/ADN se ilustra gráficamente en la Figura 2, pudiendo advertirse que la relación ARN/ADN a los 14° y 20° días en fetos y placenta ( $P \ll 0.001$ ) y en útero ( $P < 0.05$ ) estaban significativamente elevadas en las sometidas a restricción calórica. La relación prot/ADN fue siempre mayor en los tres tejidos estudiados correspondientes a ratas desnutridas; al 20° día de edad gestacional todas las diferencias fueron significativas, a excepción de la placenta.

## DISCUSION

El estudio descrito indica que la restricción de una dieta con 25% de caseína —impuesta a la hembra desde antes de la pubertad

TABLA 3

CONTENIDO DE PROTEINA DURANTE EL CRECIMIENTO DEL UTERO, PLACENTA Y FETOS  
EN RATAS PREÑADAS CONTROL Y EN RESTRINGIDAS CALORICAS

Grupo	Control				Restringidas				P	
	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	14	20
Edad gestacional (días)										
<i>Utero</i>										
Proteína (mg/útero)	125* ± 13.8	156 ± 30.0	242 ± 13.2	216* ± 26.5	95.9 ± 20.4	100 ± 15.2	124 ± 9.7	168 ± 15.4	< 0.01	< 0.01
<i>Placenta</i>										
Proteína (mg/placenta)	7.21 ± 0.74	18.91 ± 4.06	27.31 ± 2.39	37.8 ± 5.70	6.9 ± 1.78	14.6 ± 1.59	19.4 ± 0.43	29.8 ± 2.1	NS	< 0.01
<i>Feto</i>										
Proteína (mg/feto)	3.7 ± 0.56	13.7 ± 1.51	43.8 ± 4.13	129.5 ± 23.3	2.7 ± 0.50	12.7 ± 0.87	31.5 ± 3.17	119.3 ± 9.45	< 0.01	NS

\* Valor promedio ± desviación estándar.

<sup>a</sup> En cada determinación se utilizaron ocho ratas preñadas de cada grupo.

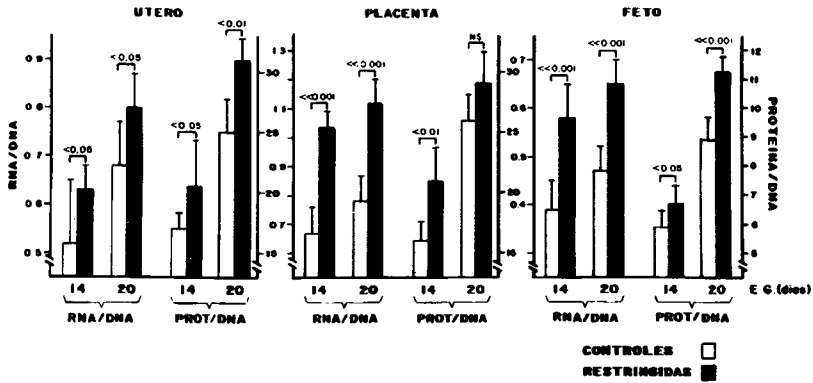


FIGURA 2

Relación RNA/DNA y proteína/DNA en útero, placenta y fetos a los 14 y 20 días de edad gestacional, en ratas control y en restringidas calóricas

y durante la preñez— disminuye el número y tamaño de fetos, el tamaño del útero y el de la placenta. Las características del crecimiento celular de los tejidos analizados muestra que el daño es predominantemente hiperplástico, acompañado de una leve disminución del contenido total de ARN y proteína. Ello da como resultado menor número de células, mayor tamaño celular, y aumento del contenido intracelular de ARN.

Winick (12) y Zamenhof, Van Marthens y Margolis (13), han comunicado una menor celularidad en diversas áreas del cerebro de ratas con desnutrición proteínica neonatal. Winick (14) informa el mismo efecto en la placenta de mujeres embarazadas desnutridas. Un estudio realizado en ratas preñadas a las cuales se ligó la arteria uterina de uno de los cuernos del útero, demostró que la velocidad de división celular de los fetos anidados en ese cuerno se detuvo (15). Lo que es más, se ha demostrado que la proliferación celular se detiene sólo si la interrupción de la circulación uterina se hace antes del 17º día post-concepcional (12).

Este estudio hace evidente que la restricción energética moderada preconcepcional frenó la síntesis de ADN asociada a la división celular en útero, placenta y feto, detectada 14 días después de la concepción. Esta reducción en el útero fue de 28.90/o

de lo observado en el útero de ratas controles; en los fetos de madres desnutridas se evidenció una reducción de 22.60/o, y en la placenta, una disminución de 19.40/o con respecto a las ratas control.

Dallman y Mahies (16) al medir el efecto de la desnutrición proteínico-calórica en la síntesis de ADN en hígado, muestra que la incorporación de  $H^3$  timidina en el ADN nuclear y la actividad de timidina kinasa, están notoriamente deprimidas, atribuyendo esta disminución a la baja disponibilidad de sustratos energéticos originada por descenso del aporte dietético.

Existe suficiente evidencia que permite responsabilizar a la unidad fetoplacentaria de la síntesis de progesterona y estrógeno durante el embarazo (17), y a la placenta de la síntesis de hormonas peptídicas como son el lactógeno placentario cuya secreción aumenta, y la gonadotrofina coriónica cuya síntesis disminuye a medida que progresa la preñez (18). Simultáneamente, se ha demostrado que entre el peso placentario y la producción de lactógeno placentario existe una buena correlación (19), así como entre ARN placentario y la síntesis de esta hormona al final de la preñez (18).

La mayor función del lactógeno placentario sería movilizar sustratos de las reservas maternas para transferir aminoácidos y glucosa hacia el feto cuando las exigencias de éste aumentan (20). Se podría postular que la placenta de ratas con restricción calórica, con un tamaño y un contenido de ARN placentario disminuidos exhibidos al 180 día, podría reducir la capacidad de síntesis de esta hormona, limitando así la disponibilidad de sustratos energéticos para el feto, cuyo peso y crecimiento celular se encontraron disminuidos.

El útero es un órgano cuyo crecimiento durante la preñez obedece intensamente a influencias hormonales (21). Anderson (22) observó que la restricción severa de alimento impuesta a cerdas hembra antes y durante la preñez, disminuye el crecimiento fetal y el tamaño del útero, efecto que se mitiga al inyectar progesterona y benzoato de estradiol. Por otra parte la desnutrición materna se ha asociado con bajos niveles de estríol. Un estudio de Iyengar (23), realizado en la India, muestra que madres embarazadas, desnutridas, elaboran menos estrógenos, detectado por la baja excreción urinaria de sus metabolitos, especialmente al final del embarazo.

Se ha demostrado que la producción de estrógeno influencia la síntesis de ARN ribosomal en el útero (24). Todas estas eviden-

cias, pues, nos permiten postular que la restricción calórica crónica pudo haber reprimido la síntesis de hormonas esteroidales sintetizadas por la unidad fetoplacentaria, disminuyendo así la cantidad de ácidos nucleicos y de proteína del útero, evidenciados en esta experiencia.

Como resultado del importante descenso observado en el contenido de ADN y, simultáneamente, la leve reducción en el contenido de ARN, es que la cantidad de ARN por célula se manifiesta significativamente aumentada un día antes del término de la preñez en los tejidos y fetos extraídos de ratas desnutridas.

Una relación ARN/ADN mayor de lo normal ha sido descrita en diversos tejidos, por ejemplo en placenta, debido a insuficiencia placentaria (14). Asimismo, como consecuencia de una interrupción de la circulación a nivel de arteria uterina (25), también se ha comunicado este hecho en el miocardio de animales después de ligar la aorta (26). Estos hallazgos sugieren una estrecha asociación entre el aumento de la relación ARN/ADN y la disminución del flujo o presión sanguínea en el tejido. Esta hipótesis la sustentan las observaciones de Rosso (27), quien postula que uno de los mecanismos que explicaría el retardo del crecimiento fetal y la reducción del tamaño placentario en animales desnutridos, sería la disminución del flujo sanguíneo placentario por un aumento inadecuado del débito cardíaco.

Como respuesta a la restricción crónica de alimento, la rata preñada responde disminuyendo su velocidad de crecimiento hiperplástico fetal y de los órganos de la reproducción, y elevando la relación ARN/ADN. Creemos que este efecto podría explicarse mejor con un mayor conocimiento de las alteraciones que pueden experimentar los sistemas endocrinos, al enfrentarse a una restricción exógena de energía y/o de nutrientes.

#### SUMMARY

##### CELLULAR GROWTH IN UTERI, PLACENTA AND FETUSES DURING MATERNAL CHRONIC RESTRICTION IN RATS

Wistar strain female rats were maintained with restricted amounts of 25% casein diet before and during pregnancy. Uteri, placentas and fetuses were removed from the rats beginning the 14th day of conception and continuing it up to the 20th day. Tissues were analyzed in regard to weight, nucleic acids and protein content.

A 25% food restriction decreased dramatically the uterine, placental and fetal size as well as DNA content. RNA and protein content were also found diminished, but it must be emphasized that these findings were less important than the DNA content reduction observed. This is the reason why RNA/DNA and protein/DNA ratios were markedly elevated in regard to control values.

Cellular changes observed in the reproductive organs and their relationships with fetal growth failure, induced by maternal dietary modification, are discussed.

### BIBLIOGRAFIA

1. Dobbing, J., J. Sands & Ch. A. Gatrix. Cell size and cell number: a reconsideration of organ growth and catch-up potential. *Proc. Nutr. Soc.*, **38**: 99A, 1979.
2. Winick, M. & A. Noble. Quantitative changes in ribonucleic acids and protein during normal growth of rat placenta. *Nature*, **212**: 34-35, 1966.
3. Winick, M., A. Coscia & A. Noble. Cellular growth in human placenta. 1. Normal placental growth. *Pediatrics*, **39**: 248-251, 1967.
4. Rosso, P., M. Wasserman, J. Rosovski & E. Velasco. Effects of maternal undernutrition on placental metabolism and function. En: *The Neonate*. D. S. Young and J. M. Hicks (Eds.). New York, N. Y., John Wiley and Sons, 1976, p. 59-66.
5. Salvatore, C. A. A cytological examination of uterine growth during pregnancy. *Endocrinology*, **43**: 355-370, 1945.
6. Daniel, E. E. & D. A. Boyes. The electrolytes of the human uterus and their possible relations to functional activity. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **73**: 395-401, 1957.
7. Lechtig, A., J-P. Habicht, H. Delgado, R. E. Klein, Ch. Yarbrough & R. Martorell. Effect of food supplementation during pregnancy on birthweight. *Pediatrics*, **56**: 508-520, 1975.
8. Araya, J. & M. Ruz. Influencia de la situación nutricional preconcepcional materna sobre el crecimiento y desarrollo fetal en ratas. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **31**: 133-145, 1981.
9. Burton, K. A study of the conditions and mechanisms of diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62**: 315-322, 1956.
10. Fleck, A. & H. N. Muñoz. The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt Thanhauser procedure for nucleic acids estimation. *Biochem. Biophys. Acta*, **55**: 571-583, 1962.

11. Lowry, O. M., J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
12. Winick, M. Cellular growth in intrauterina malnutrition. *Pediatrics Clinics of North America*, **17**: 69-78, 1970.
13. Zamenhof, S., E. Van Marthens & F. L. Margolis. DNA (cell number) and protein in neonatal brain. Alteration by maternal dietary protein restriction. *Science*, **160**: 322-323, 1968.
14. Winick, M. Cellular growth of human placenta. Intrauterine growth failure. *J. Pediat.*, **71**: 390-395, 1967.
15. Wiggleworth, J. S. Experimental growth retardation in fetal rat. *J. Pathol. Bacteriol.*, **88**: 1-13, 1964.
16. Dallman, P. K. & E. C. Manies. Protein deficiency: Contrasting effects on DNA and RNA metabolism in rat liver. *J. Nutrition*, **103**: 1311-1318, 1973.
17. Diczfalusy, E. Endocrine function of the human fetoplacental unit. *Fed. Proc.*, **23**: 791-798, 1964.
18. Munro, H. N. Placental protein and peptide hormone synthesis. Impact of maternal nutrition. *Fed. Proc.*, **39**: 255-260, 1980.
19. Mulay, S., C. A. Browne, D. R. Varma & S. Solomon. Placental hormones, malnutrition and fetal development. *Fed. Proc.*, **39**: 261-265, 1980.
20. Naismith, D. J. Maternal nutrition and the outcome of pregnancy - a critical appraisal. *Proc. Nutr. Soc.*, **39**: 1-11, 1980.
21. Brody, S. Hormonal influence on the nucleic acid and protein contents of the human myometrium. *Exp. Cell Research*, **14**: 149-159, 1958.
22. Anderson, L.L. Embryonic and placental development during prolonged inanition in the pig. *Am. J. Physiol.*, **229**: 1687-1964, 1975.
23. Yyengar, L. Urinary estrogen excretion in undernourished pregnant Indian women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **102**: 834-838, 1968.
24. Moore, R. & T. H. Hamilton. Estrogen induced formation of uterine ribosomes. *Proc. Nutr. Soc.*, **52**: 439-446, 1964.
25. Winick, M. *Diagnosis and Treatment of Fetal Disorders*. New York, N. Y., Springer, Verlag, 1969, p. 83-101.
26. Gluck, L., N. S. Talner, H. Stern, T. H. Gardner & M. V. Kulovich. Experimental cardiac hypertrophy: concentration of RNA in the ventricles. *Science*, **144**: 1244-1245, 1964.
27. Rosso, P. Placental growth development and function in relation to maternal nutrition. *Fed. Proc.*, **39**: 250-254, 1980.