

DESARROLLO DE NEFROCALCINOSIS EN RATAS ALIMENTADAS CON LEVADURAS. UN MODELO EXPERIMENTAL

F. Hernández Rosales, J. Illnaít y M. Noa

Dpto. de Bioquímica Clínica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 24 de diciembre de 1985

Recibido: 8 de mayo de 1986

ABSTRACT. The effect of diet with high yeast, calcium and phosphorus concentration on the development of nephrocalcinosis in rats was evaluated. The followings diets per group were provided: Commercial feed (CF) 100%; *Candida utilis* yeast (CU) 80% + CF 20%; CU 80% + phosphorus (P) 1,25% + CF 18,75%; CU 80% + calcium (Ca) 1,98% + CF 18,02%; CU 80% + P 1,25% + Ca 1,98% + CF 16,77%; *Kluyveromyces fragilis* yeast 80% + CF 20%. The experimental period was 21 d. Animals of groups 4, 5 and 6 developed calcium deposits in the renal tissue, with hypercalciuria, hyperphosphaturia, urine pH increase and structural alterations of the kidney. This experimental model is useful for evaluating, studying or making prognosis of the possible nephrocalcinogenic effect on yeast toxicological trial for human consumption.

RESUMEN. Se evaluó el efecto de dietas con altas concentraciones de levadura, calcio y fósforo, sobre el desarrollo de nefrocalcinosis en ratas. Se suministraron las dietas siguientes por grupo: pienso comercial (PC) 100%; levadura *Candida utilis* (CU) 80% + PC 20%; CU 80% + Fósforo (P) 1,25% + PC 18,75%; CU 80% + calcio (Ca) 1,98% + PC 18,02%; CU 80% + P 1,25% + Ca 1,98% + PC 16,77%. Levadura *Kluyveromyces fragilis* 80% + PC 20%. El período experimental fue de 21 d. Los animales de los grupos 4; 5 y 6 desarrollaron depósitos de calcio en el tejido renal, con hipercalciuria, hiperfosfatúria, incremento del pH de la orina y alteraciones estructurales de los riñones. Este modelo experimental es útil para la evaluación, estudio y pronóstico de posibles efectos nefrocalcinogénicos en los ensayos toxicológicos de las levaduras para consumo humano.

INTRODUCCION

En estudios previos de toxicología nutricional, se encontró presencia de deposiciones calcáreas en los riñones de ratones y ratas alimentadas con dietas confeccionadas con levadura *Candida utilis* y alimentados durante 60 y 90 d respectivamente^{1,2}. Resultados similares han sido informados por otros autores que trabajaron con diferentes cepas de levadura en períodos de alimentación más o menos largos^{3,4}.

En este estudio se presenta el desarrollo de un modelo experimental de nefrocalcinosis a corto plazo, mediante el empleo de alta concentración de levadura, calcio y fósforo en la dieta de ratas. Los resultados obtenidos hacen suponer la obtención de dicho modelo.

MATERIALES Y METODOS

Se distribuyeron 40 ratas Wistar hembras, de 140 a 200 g de peso en 6 grupos experimentales, colocadas en jaulas plásticas con acceso *ad libitum* al agua y alimento. A cada grupo se le suministró una dieta diferente confeccionada de la manera siguiente: dieta 1, pienso comercial (PC) 100%; dieta 2, levadura industrial *Candida utilis* (CU) 80% y PC 20%; dieta 3, CU 80%, fósforo (P) 1,25% y PC 18,75%; dieta 4, CU 80%, calcio (Ca) 1,98% y PC 18,02%; dieta 5, CU 80%, P 1,25%, Ca 1,98% y PC 16,77%; dieta 6, levadura *Kluyveromyces fragilis* tratada para disminuir nucleicos (Kf) y PC 20%.

La composición del PC por cada 100 g de dieta, es la siguiente: trigo 36,95 g; cebada 28,92 g; torula seca 7,30 g; harina de girasol 15,00 g; harina de pescado 4,20 g; carbonato de calcio 0,70 g; sal común 0,93 g;

miel 3,00 g; premezcla mineral-vitaminica 3,00 g. La premezcla mineral-vitaminica por cada 100 g, tiene la composición siguiente: vitamina A 170 000 UI; vitamina D3 45 400 UI; tocoferol 0,254 g; tiamina 0,169; menadina 0,381 g; riboflavina 0,761; colina 67,678; piridoxina 0,127; cianocobalamina 0,170; niacina 2,542; antioxidante 1,059; D-L metionina 8,475; L-lisina 16,951; cobalto 0,004; cobre 0,034; hierro 0,508; iodo 0,010; manganeso 0,508; zinc 0,424.

El tiempo de tratamiento con las diferentes dietas fue de 3 semanas. Al final de este período los animales fueron colocados en jaulas metabólicas durante 24 h para la recolección de orina y posteriormente, extracción de sangre de los riñones bajo anestesia con éter. Se registró el peso corporal final de cada rata y el peso, contenido de calcio y análisis histológico de los riñones. En la orina y el suero se determinó urea (U), creatinina (Cre), calcio (Ca) y fósforo (P); además de la medición del pH y el volumen de orina en 24 h.

Todos los datos fueron sometidos a técnicas de análisis de varianza⁵ y de rango múltiple de Duncan⁶ para determinación de diferencias estadísticas entre las medias.

RESULTADOS

La ganancia en peso fue aproximadamente igual en los diferentes grupos de ratas. La Tabla I muestra el efecto de los distintos tipos de dietas sobre los riñones de las ratas. El peso de los riñones aparece incrementado en las dietas experimentales de la 2 a la 6 con respecto a la dieta control 1; observándose el mayor incremento con la dieta 5.

TABLA I
Efecto de la dieta sobre los riñones de la rata

Dietas	Peso (A)	Calcio (B)	Incidencia (C)	Severidad (D)	Probabilidad (%)	Alteraciones estructurales
1	2,56 ^a ± 0,10	2,11 ^a ± 0,50	0/6	0,0	0,0	No
2	3,34 ^b ± 0,09	4,80 ^a ± 1,60	2/10	0,3	20,0	No
3	3,38 ^{bc} ± 0,25	12,83 ^c ± 1,62	5/6	1,3	83,3	Dilatación tubular
4	3,41 ^{bc} ± 0,18	9,75 ^c ± 3,20	5/5	1,2	100,0	Dilatación tubular riñón esponjoso
5	3,76 ^c ± 0,11	8,29 ^c ± 1,99	6/6	2,1	100,0	Dilatación tubular riñón esponjoso
6	3,08 ^b ± 0,06	3,84 ^a ± 1,10	1/6	0,3	16,6	No

(A) g/kg de peso corporal

(B) μmol/g de peso

(C) ratas con nefrocalcinosis/ratas totales

(D) escala desde 0 para ningún daño hasta 4 para el daño más severo

M ± ES, p < 0,01 para letras diferentes

El contenido del calcio aumentó significativamente en los grupos alimentados con las dietas 3; 4 y 5.

La incidencia de la aparición de depósitos de calcio en el riñón puede ser expresada en forma de probabilidad, y en la tabla se observa que las dietas con cambios en la composición de los minerales (3; 4 y 5) arrojaron valores altos que llegaron hasta el 100 % con las dietas 4 y 5. La severidad de la lesión nefrocalcinosa se midió contando el número de piedras de 4 campos visuales en cada animal con nefrocalcinosis y dividiendo entre 4, lo cual aporta una escala que va desde 0 para ninguna lesión hasta 4 para la lesión más severa. Las severidades relevantes a considerar aparecieron con las dietas 3; 4 y 5 (1,3; 1,2 y 2,1 respectivamente); pudiéndose asumir que para las dietas 3 y 4 es de discreta y para la dieta 5 moderada. De las alteraciones estructurales encontradas, sobresale la dilatación tubular que se manifestó con

las dietas 3; 4 y 5. En la literatura está descrito que esta condición aparece estrechamente asociada a las deposiciones de calcio en los riñones de las ratas.⁷

El efecto de la dieta sobre la excreción urinaria de algunos indicadores bioquímicos está reflejado en la Tabla II.

El pH de la orina en los grupos con las dietas 4 y 5 se elevó hacia la zona alcalina. El volumen de la orina de 24 h y la concentración de urea y de ácido mostraron variaciones no significativas. La creatinina disminuyó significativamente con las dietas 3; 4 y 5. El calcio aumentó estadísticamente con las dietas 4 y 5, y el fósforo con las dietas 3; 4 y 5. Estos resultados son totalmente esperados como respuesta fisiológica a la naturaleza, composición y cambios de contenido de minerales en la dieta.

TABLA II
Efecto de la dieta sobre la excreción urinaria en ratas

	DIETAS					
	1	2	3	4	5	6
pH	6,58 ^a ± 0,16	6,61 ^a ± 0,20	6,68 ^a ± 0,18	7,80 ^b ± 0,28	7,78 ^b ± 0,30	6,71 ^a ± 0,06
Volumen (mL)	3,38 ± 0,34	3,62 ± 0,22	4,32 ± 1,25	3,35 ± 0,42	4,27 ± 0,48	3,48 ± 0,62
U (mmol/L)	549 ± 19	624 ± 55	741 ± 122	1022 ± 208	782 ± 89	682 ± 104
Cre (mmol/L)	13,8 ^a ± 1,6	12,1 ^a ± 2,2	7,7 ^b ± 0,7	9,4 ^b ± 1,4	6,8 ^c ± 0,6	11,1 ^a ± 1,0
Ca (μmol/Cre)	365 ^a ± 33	447 ^a ± 59	448 ^a ± 29	1 876 ^b ± 324	2 093 ^b ± 240	763 ^a ± 123
P (μmol/Cre)	5,89 ^a ± 0,65	6,00 ^a ± 0,91	45,31 ^b ± 2,77	9,49 ^c ± 1,78	19,35 ^d ± 2,40	6,89 ^a ± 0,88
AU (μmol/Cre)	110 ± 14	110 ± 10	138 ± 5	134 ± 16	159 ± 15	109 ± 7

M ± ES

Letras diferentes significación estadística para p < 0,01

TABLA III
Efecto de la dieta sobre algunos parámetros séricos

	DIETAS					
	1	2	3	4	5	6
AU (mmol/L)	79,1 ± 11,0	90,2 ± 8,2	91,5 ± 9,2	71,0 ± 6,8	85,1 ± 3,5	65,0 ± 5,5
U (mmol/L)	3,22 ± 0,35	3,30 ± 0,26	3,42 ± 0,34	3,54 ± 0,44	3,05 ± 0,23	3,22 ± 0,27
Cre (μmol/L)	61,6 ± 3,4	66,7 ± 4,4	59,5 ± 2,0	53,6 ± 2,7	54,7 ± 3,0	57,6 ± 3,2
Ca (μmol/L)	2,14 ^a ± 0,18	1,90 ^{ab} ± 0,22	1,70 ^b ± 0,11	1,47 ^b ± 0,12	1,42 ^b ± 0,05	1,70 ^b ± 0,09
P (μmol/L)	2,10 ^a ± 0,05	2,13 ^a ± 0,19	1,60 ^b ± 0,09	1,79 ^b ± 0,06	1,75 ^b ± 0,06	1,85 ^b ± 0,04
Ca/P	1,02 ± 0,12	0,89 ± 0,05	1,06 ± 0,15	0,82 ± 0,07	0,81 ± 0,08	0,92 ± 0,06

M ± ES

Letras diferentes significación estadística para p < 0,01

La Tabla III expone los índices químicos en el suero de las ratas alimentadas con las diferentes dietas. Los parámetros ácido úrico, urea, creatinina y la relación calcio/fósforo no experimentaron variaciones significativas, además de mostrar valores dentro de los rangos normales para esta especie. Sin embargo, con los parámetros calcio y fósforo se observó una disminución biológica y estadísticamente significativa con las dietas confeccionadas con *Candida utilis* con altos porcentajes de calcio y fósforo (dietas 3; 4 y 5) y con la dieta que contenía *Kluyveromyces fragilis* (dieta 6).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Hoy día se sabe, que la formación de piedras renales está caracterizada por varios factores urinarios y epidemiológicos bien establecidos⁹⁻¹¹. En el diseño del modelo experimental presentado se tuvieron en cuenta algunos de estos factores epidemiológicos como son: sexo, edad e ingestión de proteínas.

Además, el incremento urinario de pH, calcio y fósforo son factores que también favorecen el desarrollo de la lesión nefrocalcínica.

La nefrocalcínica es más frecuente en las ratas hembras entre 4 y 6 semanas de nacidas^{1,12}. En este trabajo se utilizaron animales de 8 a 10 semanas de nacidos en los cuales se produjo la lesión nefrocalcínica en el 100 % de las ratas alimentadas con las dietas de alta concentración de levadura, calcio y fósforo. La levadura *Candida utilis* por sí sola no provocó igual incidencia de desarrollo de la lesión en estas condiciones experimentales.

La elevación del pH en la orina de las ratas con gran por ciento de calcio en sus dietas, posiblemente se debió a que el exceso de calcio como activador de la anhidrasa carbónica, enzima que interviene en la formación de bicarbonato en el sistema amortiguador que regula el equilibrio ácido-básico a nivel renal, produjo una elevada eliminación de bicarbonato, lo que consecuentemente,

elevó el pH de la orina. De igual forma, la disminución sérica observada de calcio y fósforo con las dietas nefrocalcínicas (3; 4 y 5) y la dieta con *Kluyveromyces fragilis* (6) se debe al control de regulación homeostática ejercido principalmente por la hormona paratiroidea y la calcitonina, como se evidencia de los valores normales (0,80 a 1,04) encontrados para la relación calcio/fósforo.

La extensión de la nefrocalcínica alcanzada con las dietas 3; 4 y 5 no alteró la función renal.

Para muchos investigadores las diferencias en el contenido dietético de minerales y proteínas, son los principales factores en la aparición de la nefrocalcínica en ratas^{1,12,14}.

Los resultados obtenidos están en total acuerdo con esta suposición y demuestran que el diseño experimental utilizado es eficiente para producir nefrocalcínica en sólo 21 d en ratas hembras menores de 10 semanas de nacidas.

BIBLIOGRAFIA

- Hernández Rosales F., Sanabria J. G., Urbay C. M. e Illnait Ferrer J. Revista de Ciencias Biológicas 16, 193, 1985.
- Urbay C., Illnait J., Hernández F., Moisés T., Sanabria J. y Noa M. Revista de Ciencias Biológicas (en preparación).
- Agren G., Stenran U., Nodgren H., Eklund A., and Glass J. E. Nutr. Metabolism. 17, 20, 1974.
- Engel C. Symposium d'Aix en Prevence, Gounelle de Pontanel H. ed. Centre de Recherches Foch, Paris. 1972.
- Snedecor G. W. and Cochran W. G. The Iowa State University Press. Ames. Iowa, 1980.
- Duncan D. B. Biometric 11, 1, 1955.

7. Kaunitz H. and Johnson R. E. *Metabol.* 25, 69, 1976.
 8. Churchill D. N. *Nutr. Res.* 3, 761, 1983.
 9. Ahlstrand C. *Scand J. Urol. Neph. Supplementum* 81, 1984.
 10. Elomas I., Ala-Opas M., and Porka L. *J. Urol.* 1, 656, 1984.
 11. Cousin F. B. and Geary C. P. M. *Nature* 211, 980, 1966.

12. Goulding A. and Malthus R. S. *J. Nutr.* 97, 353, 1969.
 13. Kunkel M. E., López H., Punyasingh J. and Navia J. M. *Nutr. Rep. Inter.* 30, 339, 1984.
 14. Eklund A., Agren G., Nodgren H., and Stenram U. *Nutr. Metab.* 15, 348, 1973.

**revista
 cubana
 de
 ciencia
 agrícola**

**cuban
 journal
 of
 agricultural
 science**

Esta revista internacional se publica desde 1967 en dos ediciones: español e inglés por el Instituto de Ciencia Animal sito en La Habana, Cuba. LA REVISTA CUBANA DE CIENCIA AGRICOLA conjuga los diferentes aspectos de la nutrición y genética animal así como la producción de pastos y forrajes en una sola publicación. Trata sobre el estudio de estas ciencias útiles para la alimentación animal. Se incluyen los tópicos siguientes:

- Nutrición animal
 - Producción de leche
 - Producción de carne
 - Producción avícola
 - Producción porcina
- Genética animal
- Bioquímica rumiantes y monogástricos
- Biometría
 - Conservación de pastos
 - Establecimiento de pastos
 - Malas hierbas y enfermedades
 - Suelos y fertilizantes
 - Fisiología del pasto
 - Producción de semillas de pastos
 - Manejo y mecanización

La estructura y función de esta revista es de considerable interés para los mejoradores de pastos, nutricionistas en las diferentes disciplinas de la producción animal, agrónomos, fisiólogos agrícolas, genetistas de animales, químicos agrícolas, industrias relacionadas con el procesamiento de la producción de pastos y forraje y matemáticos.

Fecha de publicación: Tres veces al año (marzo, julio y noviembre).

Suscripciones al extranjero : Ediciones Cubanas, Apartado 605, Ciudad de La Habana, Cuba

Precio edición español: US dólares 23,00; libras esterlinas 21,00; marcos alemanes 73,00.

Precio edición inglés: US dólares 30; libras esterlinas 27,00; marcos alemanes 95,00.

Se aceptan cheques en cualquier moneda convertible, excepto en dólares norteamericanos o contra cheque bancario comprendidos en el sistema norteamericano de pago.

Las suscripciones en Cuba se formalizarán mediante giro postal u orden de compra por 10.50 pesos.

A: REVISTA CUBANA DE CIENCIA AGRICOLA

Tulipán No. 1011 e/ 47 y Loma, N. Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba

Fecha: _____

TITULO: _____

Por favor envíeme ___ ejemplar/ejemplares de la publicación arriba mencionada. El pago de ___ se acompaña

NOMBRE: _____

DIRECCION: _____

CIUDAD _____ APARTADO POSTAL _____ PAIS _____