



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**PROGRAMACIÓN FETAL INDUCIDA POR DEFICIENCIA Y
SUPLEMENTACIÓN DE HIERRO EN LA MORFOLOGÍA RENAL EN
MODELO MURINO**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOTECNOLÓGÍA

PRESENTA:

JOSUÉ UBALDO GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSELE RICARDO FLORES SANTÍN

CODIRECTORA:

DRA. PATRICIA VIEYRA REYES

INDICE

I. RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
II. INTRODUCCIÓN	4
III. ANTECEDENTES	4
3.1 Programación fetal	4
3.2 Origen la influencia biológica del hierro	5
3.3 Hierro en el organismo	5
3.4 Absorción, metabolismo y homeostasis del hierro	6
3.5 Diferencias en la distribución del hierro en cuanto al sexo	9
3.6 Función de riñón y su desarrollo gestacional	9
3.7 Papel del riñón en la homeostasis del hierro	11
3.8 Deficiencia de hierro	11
3.9 Implicaciones de la ID en la programación de la morfología renal	12
3.10 Importancia de un modelo animal, roedores como modelo de estudio	13
IV. JUSTIFICACIÓN	15
V. OBJETIVO	16
VI. HIPÓTESIS	16
VII. MÉTODO	17
7.1 Mantenimiento y cuidado de Ratas Wistar	17
7.2 Diseño de grupos experimentales	17
7.3 Obtención de los tejidos de estudio	17
7.4 Evaluación externa de los riñones	18
7.5 Procesamiento de muestras para análisis histológico	18
7.6 Inclusión en parafina	19
7.7 Cortes histológicos	20
7.8 Tinción Hematoxilina-Eosina	21
7.9 Análisis morfológicos e histológicos	21
7.10 Análisis de Datos	22
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
8.1 Efecto de ID y suplementación de Fe en morfología renal adulta de hembras y machos	24
8.1.1 Variables externas (pretratamiento histológico)	24
8.1.2 Variables internas (postratamiento histológico)	29
IX. CONCLUSIONES	36
X. BIBLIOGRAFIA	37
XI. ANEXOS	40

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 ABSORCIÓN Y METABOLISMO DEL HIERRO.	8
FIGURA 2 FISIOLÓGÍA Y DESARROLLO RENAL.	10
FIGURA 3 ANÁLISIS EXTERNO DEL RIÑÓN.	18
FIGURA 4 MATRIZ DE CORTE.	18
FIGURA 5 FIJACIÓN EN PARAFINA DE TEJIDO MUESTRA.	19
FIGURA 6 CORTES HISTOLÓGICOS.	20
FIGURA 7 TINCIÓN HISTOLÓGICA DE SECCIONES DE 5MM.	21
FIGURA 8 CUADRO COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA RENAL ADULTA DE RATAS MACHO Y HEMBRA. GRUPOS CONTROL, ID E ID + S.	34
FIGURA 8 CUADRO COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA RENAL ADULTA DE RATAS MACHO Y HEMBRA. GRUPOS CONTROL, ID E ID + S.	34
GRÁFICA 1. MEDIAS DE LOS PESOS RENALES PRETRATAMIENTO HISTOLÓGICO.	25
GRÁFICA 2. INTERACCIÓN ENTRE MEDIAS DEL PESO DEL RIÑÓN.	25
GRÁFICA 3. MEDIAS DE ÁREAS RENALES PRETRATAMIENTO.	26
GRÁFICA 4. INTERACCIÓN ENTRE MEDIAS DE ÁREA RENAL.	26
GRÁFICA 5. MEDIAS DE LONGITUD RENAL PRETRATAMIENTO HISTOLÓGICO.	27
GRÁFICA 6. INTERACCIÓN ENTRE MEDIAS DE LONGITUD RENAL.	27
GRÁFICA 7. MEDIAS DEL ÁREA DEL CÓRTEX CON RESPECTO ÁREA DE LA SECCIÓN.	29
GRÁFICA 8. INTERACCIÓN ENTRE MEDIAS DEL ÁREA DEL CÓRTEX CON RESPECTO ÁREA DE LA SECCIÓN.	30
GRÁFICA 9. MEDIAS DE ÁREA DE MEDULA CON RESPECTO ÁREA DE LA SECCIÓN.	30
GRÁFICA 10. INTERACCIÓN ENTRE MEDIAS DE ÁREA DE LA MEDULA CON RESPECTO ÁREA DE LA SECCIÓN.	31
GRÁFICA 11. MEDIAS DEL NÚMERO DE GLOMÉRULOS CON RESPECTO ÁREA DEL CÓRTEX.	32
GRÁFICA 12. INTERACCIÓN ENTRE MEDIAS DE NUMERO DE GLOMÉRULOS CON RESPECTO ÁREA DEL CÓRTEX.	32
GRÁFICA 13. GRADO DE CAMBIO QUE MÁS SE REPITE EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.	35
TABLA 1. AJUSTE DE DATOS CENSURADO Y ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN.	40

I. INTRODUCCIÓN

Últimamente, el desarrollo fetal y neonatal ha sobresalido como períodos decisivos del desarrollo cuando el ambiente puede interactuar con el genotipo del individuo en desarrollo, y tener un efecto perpetuo en el fenotipo (Fernandez-Twinn, Constância, & Ozanne, 2015)(Rosenquist et al., 2015). En el desarrollo intrauterino, existen varios factores a los cuales el feto es sensible y está expuesto, principalmente a través del tejido materno, entre estos esta los hábitos alimentarios de la madre, que tendrá una gran implicación en la salud y estado físico del feto durante el desarrollo (Marciniak et al., 2017)(Fernandez-Twinn et al., 2015). La escasez de nutrientes durante el embarazo conlleva a la restricción del crecimiento intrauterino y enciende mecanismos de adaptación que permiten la administración selectiva de nutrientes a órganos vitales, (como corazón y cerebro) (Marciniak et al., 2017).

El hierro (Fe) es un elemento traza esencial para todo organismo vivo (a excepción de los virus), ya que interviene en funciones mitocondriales, síntesis y reparación de ADN, así como diversas funciones enzimáticas para la supervivencia celular (Muckenthaler, Rivella, Hentze, & Galy, 2017) , además de la eritropoyesis (R. Daher & Karim, 2017). Durante el embarazo, el hierro va a ser primordialmente destinado a la formación de médula ósea, músculos (corazón principalmente) y cerebro (Waldvogel-Abramowski *et al.*, 2014). Ante su deficiencia puede dejar a un lado su participación en el desarrollo y función de otros órganos como el riñón. La deficiencia de hierro (ID) es la carencia más común de micronutrientes en todo el mundo (Percy, Mansour, & Fraser, 2017).Cerca de 2000 millones de personas , más del 30% de la población mundial, padecen anemia, debido principalmente a la deficiencia de hierro, un problema que en las regiones de escasos recursos con frecuencia se ve agravado por diversas enfermedades infecciosas («OMS | Carencia de micronutrientes», 2015). En México, según los datos más actuales con respecto a ID, existe una prevalencia de ID del 24.8% en mujeres de 20 a 49 años. (S.Villalpando,*et al*, 2015) (T. Shamah-Levy, *et al*, 2018).

II. ANTECEDENTES

2.1 Programación fetal.

El termino programación fetal apareció por primera vez hace 20 años, introducido por el epidemiólogo británico David Baker, quien investigaba la relación entre el bajo peso al nacer y el incremento del riesgo de padecer enfermedad coronaria en la adultez (Marciniak et al., 2017). La programación fetal se da cuando el ambiente optimo en el cual el feto crece es interrumpido por factores hostiles, especialmente durante periodos críticos para el desarrollo de órganos esenciales (Perrone, Santacroce, Picardi, & Buonocore, 2016). Las investigaciones sobre epigenética evalúan la procedencia del desarrollo de enfermedades, que se presumen están asociadas a los factores ambientales intrauterinos como la disponibilidad de nutrientes, desarrollo de obesidad etc (Hales & Barker, 2001). Los trastornos

metabólicos y las alteraciones de la alimentación adecuada durante el embarazo pueden desencadenar modificaciones en la expresión génica fetal, lo cual ocasiona una vulnerabilidad a enfermedades crónicas en el futuro (Marciniak et al., 2017). La escasez de nutrientes durante el embarazo conlleva a la restricción del crecimiento intrauterino y alteraciones en la fisiología, como en el caso de niveles bajos de hierro en el suero materno predisponen a la descendencia a un bajo peso al nacer y elevada presión sanguínea más tarde en su vida. Un abastecimiento insuficiente de elementos esenciales para el desarrollo da como resultado insuficiencia placentaria, como posibles razones esta la preeclampsia, hipertensión o una dieta inadecuada durante el embarazo. La desnutrición intrauterina, enciende mecanismos de adaptación que permiten la administración selectiva de los nutrientes a órganos vitales, (como lo son corazón y cerebro). Resultando en alteraciones que preservan la vida del feto a costa de una restricción en el crecimiento, así como secuelas el desarrollo y eficiencia de otros órganos (Marciniak et al., 2017)(Miranda, Ramalho, Henriques-Coelho, & Areias, 2017).

2.2 Origen la influencia biológica del hierro.

El hierro también conocido como fierro, número atómico 26, símbolo Fe (de latín *ferrum*) (Parry, 1973). Es un elemento protagónico en la formación de vida en la tierra (Abbaspour, Hurrell, & Kelishadi, 2014). Según corrientes cosmológicas actuales la tierra tiene 4.6 billones de años. Durante la creación de la Tierra, el Fe tuvo un papel esencial, formando parte de la corteza terrestre (5%) y el núcleo del planeta (70%, en forma de hierro nativo) (Parry, 1973). Este núcleo de Fe giratorio generó un campo magnético que repele los vientos solares y de la radiación, esto promovió condiciones favorables para la vida que comenzó hace 3.5 billones de años aproximadamente (Sheftel, Mason, & Ponka, 2012). La hipótesis hierro y azufre, comenta que la química primitiva de la vida se produjo en superficies minerales, como la piritita de hierro cerca de fuentes hidrotermales profundas. El hierro ferroso (Fe II o Fe^{2+}) era tan abundante y fácilmente disponible, que las primeras formas de vida lo aprovecharon y lo convirtieron en parte fundamental de su metabolismo anaeróbico, más tarde este “paraíso ferroso” comenzó a disminuir lentamente hace unos tres mil millones de años, debido a la adición de oxígeno a la atmósfera por parte de las primeras cianobacterias productoras de oxígeno. El aumento de oxígeno (21%) en la atmósfera, y la oxidación del hierro ferroso a hierro férrico (Fe III o Fe^{3+}) insoluble por el incremento de oxígeno oceánico, afectó la vida en la tierra de forma dramática, teniendo la proliferación de organismos mejor adaptados al oxígeno y a todos los organismos aeróbicos luchando por adquirir, transferir y almacenar tan preciado metal, el hierro (Sheftel et al., 2012).

2.3 Hierro en el organismo.

La respuesta a la utilidad biológica del Fe es su habilidad de existir e intercambiarse en dos estados de oxidación Fe^{2+} y Fe^{3+} . Aunque esta misma propiedad redox es la base de su toxicidad, ya que puede unirse

e interactuar con especies reactivas de oxígeno, produciendo radicales libres (moléculas inestables y altamente reactivas) los cuales son extremadamente dañinas para las membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos. (Raed Daher, Manceau, & Karim, 2017; Forrellat, 2016). A pesar de esto sus características como aceptar y donar electrones reversiblemente, lo hacen crucial para procesos y funciones biológicas, tales como respiración, producción de energía, síntesis de DNA, y proliferación celular (Camaschella, 2015a)(Hentze, Muckenthaler, Galy, & Camaschella, 2010). Ejemplos de esto es su participación con las proteínas que componen la cadena de transporte de electrones (Forrellat, 2016), proceso da como resultado moneda energética la molécula trifosfato de adenosina (ATP), que utilizan los seres vivos (Campbell, Urry, & Reece, 2007), así como en la eritropoyesis (proliferación y diferenciación eritroide) (Muckenthaler et al., 2017)(Waldvogel-Abramowski et al., 2014)(Raed Daher et al., 2017)

El contenido de hierro en el cuerpo humano es aproximadamente de 3 a 5 g en adultos, esto dependiendo de la nutrición, el sexo y estado de salud (Raed Daher et al., 2017). Una dieta regular provee aproximadamente de 10 a 20 mg de Fe, solo el 10% es absorbido, compensando las pérdidas diarias de este mineral en el organismo (R. Daher & Karim, 2017). Una diversidad de factores dietéticos influye en el control de la absorción de hierro. (Thévenod & Wolff, 2016)(Muckenthaler et al., 2017). Los mecanismos de adquisición, metabolismo y homeostasis son probablemente idénticos en los mamíferos y sus células (R. Daher & Karim, 2017).

Durante el embarazo, las cantidades requeridas de hierro aumentan hasta 1200 mg por cada 55 kg de peso, este hierro es usado principalmente para incrementar la masa eritrocitaria (450mg), placenta (90-100 mg), desarrollo del feto (250-300 mg), pérdidas generales (200-250 mg) y pérdida de sangre (150mg).

2.4 Absorción, metabolismo y homeostasis del hierro

La absorción de Fe de la dieta ocurre a nivel intestinal, en el duodeno, en los enterocitos. El Fe llega al duodeno en su forma Fe III. Una vez en el lumen, es reducido a Fe II por el Dcyt B (citocromo B duodenal, enzima reductasa). Fe II es acarreada al interior del enterocito DMT1 (Transportador de metales divalente 1 dependiente de protones de Fe), (Raed Daher et al., 2017). Donde el Fe debe cruzar la membrana baso lateral a través de la FPN (ferroportina), único transportador de hierro conocido hasta ahora. Ya en el torrente sanguíneo el Fe II es oxidado a Fe III por una HEPH (ferroperoxidasa de membrana llamada hefestina), una vez hecho se une rápidamente a la Tf (transferrina, glucoproteína monomérica), formando el complejo Tf-Fe III/TfR1 (R. Daher & Karim, 2017; Raed Daher et al., 2017) (Figura 1). El hierro libre y no unido a Tf es incompatible con el transporte de Fe plasmático y citosólico, por lo que debe unirse a ligandos apropiados como: Ferritina, albumina, NGAL (lipocalina asociada a gelatinosa de neutrófilos) y lactoferrina. Estas formas de hierro sérico se denomina hierro no truncado (NTBI) presente en menor medida, a excepción de la ferritina (Thévenod & Wolff, 2016). Una vez el Fe está en el torrente sanguíneo

puede ser transportado a varios órganos y tejidos destino, tales como medula ósea, riñón, sistema nervioso central y musculo (Waldvogel-Abramowski et al., 2014).

El hierro también puede ser absorbido en su forma hemo proveniente de la carne, la adquisición de esta forma es aparentemente pasiva y no parece estar regulada por los mismos mecanismos. Sin embargo, se ha sugerido a la proteína transportadora hemo 1 (HCP1) como candidata potencial para el transporte de hierro hemo intestinal. Lo que si se conoce es que una vez adquirido el hierro hemo es catalizado por la enzima hemo-oxigenasa-1(HO-1) y es liberado (Raed Daher et al., 2017) (Figura 1).

En la medula ósea el destino primordial de hierro es la eritropoyesis, que requiere 25- 30 mg de hierro al día para la síntesis de hemoglobina y una producción diaria de 200×10^9 de células rojas (R. Daher & Karim, 2017). Para adquirir el Fe las células eritroides dependen principalmente de moléculas como Tf, TfR1(receptor de alta afinidad a Tf o TFRC, CD71), STEAP 3 (enzima metaloreductasa), DMT1 ,SNX3 (sortin nexin 3, proteína citosólica) EXOC 6 (componente del complejo de exocitosis 6) (Muckenthaler et al., 2017). Este hierro se utiliza principalmente para la biosíntesis de grupos hemo y hierro-azufre (Fe-S), que se producen en la mitocondria, la importancia de este último grupo, es que se puede encontrar en centros de diversas metaloproteinas, tales como: ferredoxina y NADH deshidrogenasa, la NADH deshidrogenasa cataliza electrones en la cadena de transporte de electrones o también conocida como cadena respiratoria (Raed Daher et al., 2017).

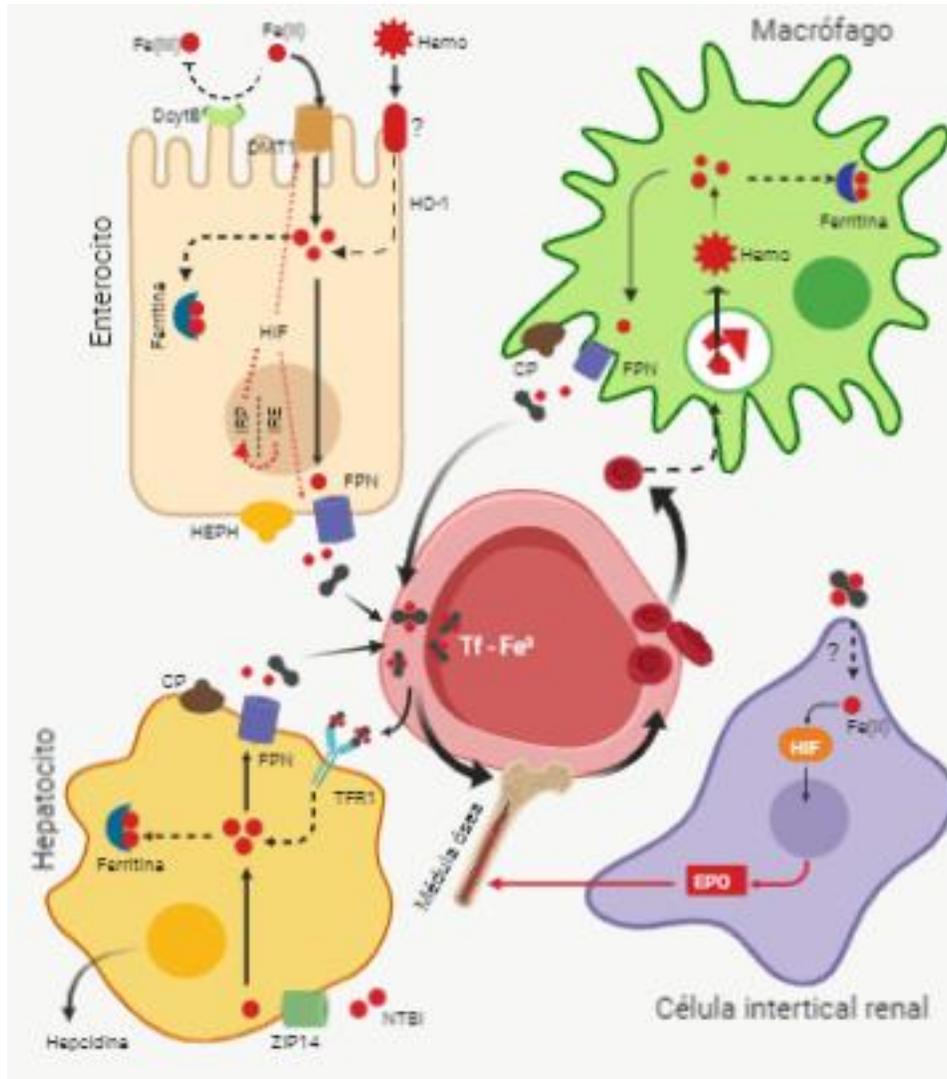


Figura 1 Absorción y metabolismo del hierro.

En el metabolismo del hierro el enterocito, macrófago, hepatocito y células intersticial renal son las principales unidades celulares implicadas.

Los macrófagos promueven el reciclaje y almacenamiento de Fe. Posteriormente de 120-140 días en humanos y ratones, los glóbulos rojos senescentes son fagocitados por macrófagos especializados, principalmente los que se encuentran en médula ósea, hígado y bazo. Dentro del macrófago el glóbulo rojo es degradado dejando libre el grupo hemo, para ser o almacenado en forma de ferritina. Así previene daños causados por la deposición incontrolada de hierro (Muckenthaler et al., 2017).

Cuando el hierro sérico no se usa para la eritropoyesis se almacena en el hígado (3000 mg y 1g) para su posterior uso. Si el reciclaje de hierro no puede satisfacer su demanda, se libera el hierro almacenado en hepatocitos en el hígado. la proteína transportadora de metales ZIP14, la CP (ferroxidasa ceruloplasmina), (Muckenthaler et al., 2017) (Figura 1). En el hígado también se da la síntesis de hepcidina, péptido con

actividad reguladora de exportación celular del Fe, así como antimicrobiana purificando el Fe en plasma y la orina. (Thévenod & Wolff, 2016) (Pantopoulos, Porwal, Tartakoff, & Devireddy, 2012)(Raed Daher et al., 2017).

Con el fin mantener la homeostasis de Fe, la expresión de proteínas involucradas en la absorción y metabolismo de Fe, tales como DMT1, ferroportina, TFR1 y ferritina, son reguladas postranscripcionalmente, en una forma dependiente de niveles intracelulares de Fe. Esta regulación es mediada por interacciones específicas entre las secuencias IRE (elemento de respuesta a hierro que se encuentra en los ARNm) con las proteínas citoplasmáticas reguladoras de hierro, IRPs: IRP1, IRP2 (Sermini, Acevedo, & Arredondo, 2017).

2.5 Diferencias en la distribución del hierro en cuanto al sexo

Pocos estudios ha desvelado las diferencias en cuanto la distribución de hierro entre hombres y mujeres, algunas de estas tienen que ver con las en el desarrollo que posee cada sexo. Ejemplo de esto, la hepcidina en suero es marcadamente más baja en los varones que en las mujeres cuando son bebés, en la infancia, los niños poseen concentraciones de ferritina sérica y niveles de hemoglobina considerablemente más bajos que las niñas, antes de la menopausia por lo general las mujeres poseen menos ferritina sérica y saturación de transferrina que los hombres, posiblemente debido a la menstruación, ya en la menopausia los niveles de ferritina sérica en las mujeres aumentan dos a tres veces en relación con los premenopáusicos. Algunos autores han propuesto que las diferencias del estado de hierro entre hombres y mujeres son resultado de diferencias biológicas aparte del sangrado menstrual. Sin embargo, los efectos que tiene el sexo en la distribución del hierro en órganos y tejidos no están bien establecidos (Kong et al., 2014).

2.6 Función de riñón y su desarrollo gestacional.

Los riñones junto con los pulmones y el intestino mantienen la homeostasis del fluido corporal en mamíferos mediante la eliminación selectiva de desechos metabólicos, solutos en exceso y agua, además de xenobióticos del cuerpo a la orina (Thévenod & Wolff, 2016). La función general del riñón se da de la siguiente forma: la sangre es bombeada constantemente a través de los riñones donde el plasma se filtra a través de una red capilar llamada glomérulo. Los glomérulos renales filtran diariamente grandes cantidades de plasma por vías secretoras a lo largo del epitelio del túbulo renal. El agua filtrada y solutos que aún pueden usarse se reciclan, reabsorbidos por las secciones tubulares de las nefronas, estructuras tubulares epiteliales de varios elementos interconectados con morfología y funciones específicas como; túbulo proximal (PT), bucle de Henle (LOH), túbulo distal (DT) y el conducto colector (CD) (Thévenod & Wolff, 2016). El PT es el responsable de la mayor reabsorción de fluido, esta se da principalmente por un impulso osmótico, moléculas como glucosa, bicarbonato y otras esenciales puede absorberse por

canales de Na⁺, así como receptores unidos a cubilina y megalina. El LOH es una estructura auxiliar al PT, mientras que el papel del CD es la regulación hormonal de la composición de la orina a través de aldosterona y hormona antidiurética. Por último el DT en conjunto con PT mantiene la homeostasis de Ca²⁺ y PO₄ (Thévenod & Wolff, 2016)(Muckenthaler et al., 2017).

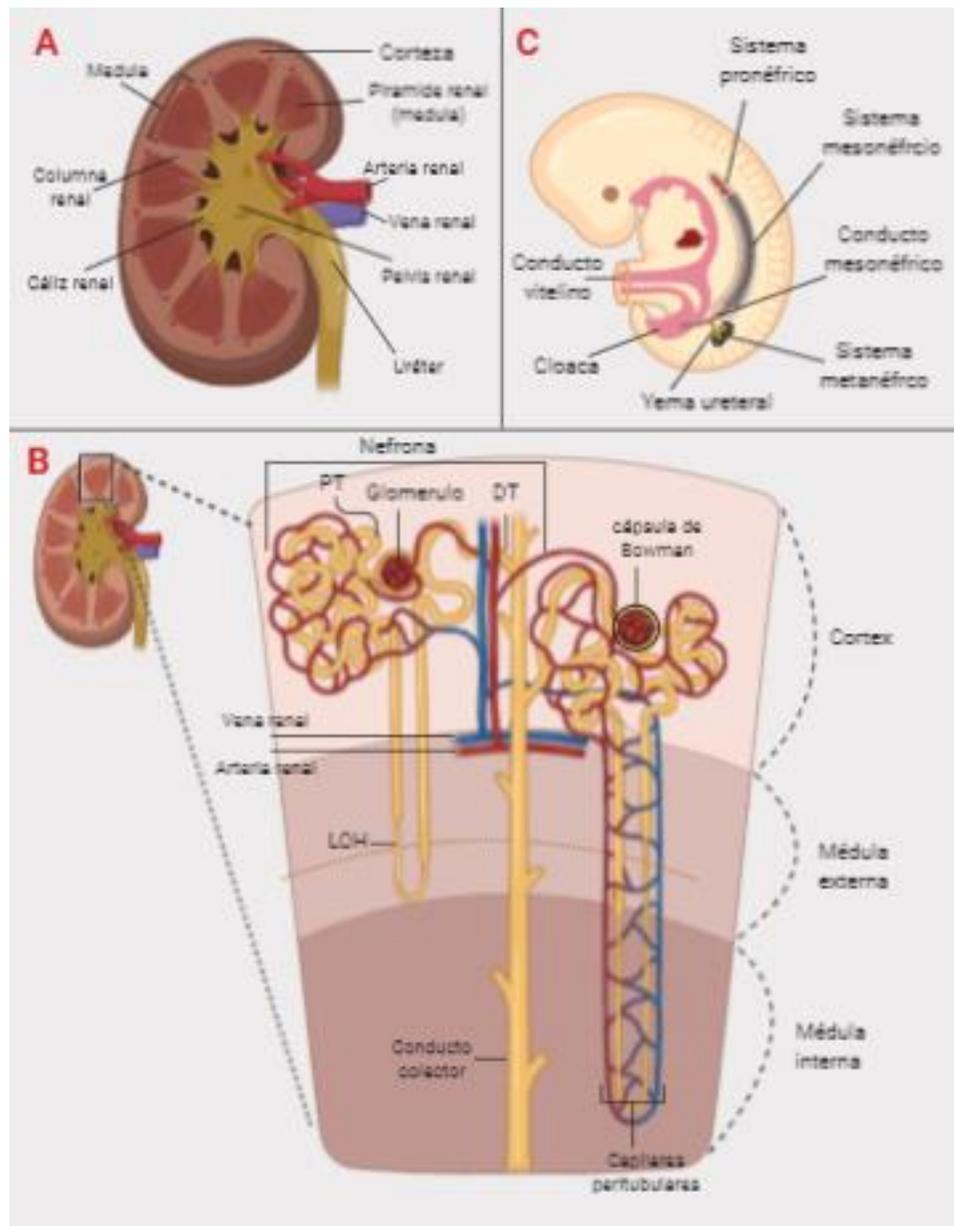


Figura 2 Fisiología y desarrollo renal.

En el cuadro A, se ve las diferentes áreas funcionales del riñón, mientras que en B se hace un acercamiento a unidad funcional base llamada nefrona. Por otro lado, en C apreciamos las estructuras embrionarias relacionadas con desarrollo renal.

El riñón proviene del mesodermo (una de las capas celulares que forman el embrión), a través de tres etapas surge tejido derivado de este. El pronefros que da resultado al riñón intermediario, el mesonefros (con funciones filtradoras) que posteriormente dará lugar al metanefros. El pronefros se origina desde la tercera semana de gestación, con el tiempo se transforma en conducto mesonefrico. La formación de

estructuras mesonéfricas semejantes a los glomérulos filtrantes, forma la primera unidad funcional en un embrión humano, se origina entre la tercera y cuarta semana, pero incluso 40 estructuras mesonéfricas filtran durante la quinta semana de gestación, etapa en la que el metanefros ve la luz (Daniel R. Chernaŵsky, *et al*, 2002) .El desarrollo metanefrónico se da con interacción de la yema ureteral (UB, estructura precursora del uréter) y el mesénquima metanéfrico (MM, tejido conjuntivo que forma la estructura del metanefrio, caracterizado por células con abundante matriz extracelular y gran diversidad celular), llamada inducción metanéfrica, donde la UB aparece como respuesta a señales (moleculares, transcripcionales, genéticas) del mesénquima, luego las células mesenquimatosas en contacto con la UB surgen una transformación en células epiteliales, estromales y vasculares. A través de estos pasos inductivos se produce la neurogénesis y da como resultado el desarrollo del glomérulo, túbulo y sistema colector renal, que conducen a la estructura final (Daniel R. Chernaŵsky, *et al*, 2002)(Saint-Faust, Boubred, & Simeoni, 2014).

2.7 Papel del riñón en la homeostasis del hierro

El riñón es regulador de la liberación de eritropoyetina (EPO), encargada de la proliferación de glóbulos rojos y la diferenciación terminal. En condiciones de hipoxia, la transcripción de EPO se aumenta en fibroblastos peritubulares de la corteza renal, mediante mecanismos activados por HIF (Factor inducible por hipoxia) (Muckenthaler *et al.*, 2017). Entre menos hierro y oxígeno, hay mayor acumulación de HIF y estimulación de la transcripción de EPO (Muckenthaler *et al.*, 2017; Sermini *et al.*, 2017). Además de este papel del riñón, se ha sugerido recientemente que tiene un papel significativo en la homeostasis sistémica del Fe, por medio de filtración y reabsorción de cantidades esenciales de hierro, así prevenir la deficiencia de este elemento traza.

Los mecanismos por los cuales regula la absorción de Fe son aún poco conocidos. En células renales de PT, se ha atribuido la absorción de TBI (Tf unido a Fe) a la megalina dependiente cubilina., principalmente porque Tf se tiene afinidad a cubilina, así mismo moléculas como lactoferrina y hepcidina puede unirse a la megalina. Otra forma en que el TBI puede ser recuperado en PT es por medio de TFR1. En cuanto al hierro libre se ha postulado al DMT1 para su recuperación por medio de células de la membrana luminal de PT. La FPN1 se menciona con posible rol protector ante la sobrecarga de Fe. En cuanto a otras estructuras se ha visto la expresión de DMT1 y FPN1 en LOH y CD, TRPV5Ca²⁺ (canal de Ca²⁺ epitelial) y DMT1 en DT, sugeridas para la recaptación de Fe en dichas estructuras. (Thévenod & Wolff, 2016).

2.8 Deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro (ID; iron deficiency), es un déficit de los niveles de hierro corporal total que, cuando es grave puede conducir a la anemia (Low & Grigoriadis, 2017). ID es la deficiencia más común de micronutrientes en todo el mundo (Percy *et al.*, 2017). Cerca de 2000 millones de personas, más del

30% de la población mundial, padecen anemia, principalmente por ID, y con frecuencia se ve agravado por diversas enfermedades infecciosas («OMS | Carencia de micronutrientes», 2015). La ID afecta a la salud de un gran número de mujeres (edad reproductiva, embarazadas en especial) y niños de países en desarrollo (Martínez-Salgado, Casanueva, Rivera-Dommarco, Viteri, & Bourges-Rodríguez, 2008), con 15% de prevalencia en los países industrializados (Polin et al., 2013). Algunos estudios como la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 sobre el estado nutricional de minerales y vitaminas en México, mostraron una prevalencia de ID del 26% (Dommarco, 2012). En los países en desarrollo, la ID es causada por la ingesta insuficiente de hierro y / o la infección parasitaria, mientras que la elección de dietas vegetarianas, la baja absorción de hierro y la pérdida crónica de sangre son causas comunes en los países de desarrollados (Camaschella, 2015b).

La deficiencia de hierro con o sin anemia, daña la calidad de vida en diversas maneras. Debido a que en todas las células (cerebro, músculo, etc.) el hierro es indispensable para sus procesos fisiológicos, la ID da como resultado deterioro en el transporte de oxígeno y en reacciones enzimáticas involucradas en vías metabólicas (Percy et al., 2017). La ID se manifiesta como: menor capacidad física o mental y en menor termorregulación en ambientes fríos (Martínez-Salgado et al., 2008), cambios de comportamiento (como pica: es el deseo y consumo de artículos no comestibles), síndrome de la pierna inquieta, disfagia (dificultad o imposibilidad para tragar), disminución de la función cognitiva en adultos mayores (Polin et al., 2013). La ID está asociada a enfermedades inflamatorias crónicas como: la insuficiencia cardíaca crónica (ICC), la enfermedad renal crónica (ERC) y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Musallam & Taher, 2018).

2.9 Implicaciones de la ID en la programación de la morfología renal

Las implicaciones que tiene la ID en el riñón han sido investigadas no han sido tan abordadas a pesar de la importancia de este órgano en la homeostasis del hierro y el organismo en general. Las primeras investigaciones mencionan el aumento del tamaño/peso del riñón en proporción con el tamaño/peso corporal de ratas descendiente de madres con dieta de restricción de hierro (Lewis, Forhead, Petry, Ozanne, & Hales, 2002). Datos similares a los hallados más tarde por Lisle *et al.*, 2003, con modelo de restricción de hierro (IR; iron restriction). En esta misma investigación se encontró un déficit en el número de nefronas en machos descendientes de madres IR. Cabe destacar que los machos de dicho estudio poseían un menor número de glomérulos a comparación que las hembras independientemente del tratamiento, sin embargo, ya se había descrito con anterioridad que los machos poseen una menor densidad glomerular en la corteza renal. En cual, al incremento proporcional del riñón en las ratas descendientes con IR, se sugiere que puede haber crecimiento renal compensatorio, debido a hipertrofia glomerular por el bajo número de nefronas. Por último se observó un mayor grado de daño tubulointersticial en ratas

macho en comparación con hembras, que sugiere que los animales machos pueden ser susceptibles al desarrollo de hipertensión en la adultez (Lisle et al., 2003).

Bajo otro estudio posterior con modelo de ID con anemia (IDA) inducida por la administración de una fórmula artificial baja en hierro por gastrostomía a partir del día post-natal 4. Los animales IDA poseían un peso renal similar al de los animales control, contrastando con los hallazgos anteriores por Lewis et al, 2002 y Leslie et al, 2003. Así como un desarrollo renal anormal con menos generaciones glomerulares, reducción en la densidad de nefronas y disminución del área total de la superficie glomerular, no existiendo diferencias entre sexos en cuanto los cambios provocados por la dita IDA (Drake, Sauerbry, Blohowiak, Repyak, & Kling, 2009).

Investigadores realizaron un estudio con ratas Belgrado, las cuales se les poseen una sustitución de glicina a arginina (G185R) encontrada en la cuarta región transómbrenla de DMT1 (b). Las ratas que poseían la mutación (G185R) (b/b), sufrieron ID que evoluciona a anemia. Por lo que se ha sugerido a DMT1 como uno de los transportadores principales en la filtración y reabsorción de hierro por parte de los glomérulos y los túbulos renales respectivamente. Además, se encontró que los niveles de hematocrito (Prueba donde se evalúa la cantidad de sangre compuesta por glóbulos rojos) y hierro corporal total bajos, además de disminución en la generación de glomérulos en ratas (b/b) a los PND9 (Día Post-natal) en comparación con las ratas control (hembras +/b). Se sugirió que esto con el tiempo genera una sobrecarga funcional aumentando la presión glomerular, lo que promueve la fibrosis y la esclerosis observada en los análisis histológicos, estas alteraciones inducen pérdida de nefronas, lo que en formar de círculo vicioso disminuye la filtración glomerular, que a su vez termina en daño renal y función renal deficiente (Veuthey, Hoffmann, Vaidya, & Wessling-Resnick, 2014).

Recientemente se investigó sobre la deficiencia de hierro gestacional, confirmando que esta puede alterar la programación del desarrollo renal a través de dotación de nefronas deterioradas. Comparando ratas con ID gestacional (6mg de Fe por 1Kg en la dieta desde el día 2 gestación hasta el PND7) con ratas control (198mg de Fe por 1Kg en la dieta), se descubrió que las ratas ID fueron más pequeñas. El tamaño de glomérulo, la densidad glomerular y el área superficial glomerular fueron inferiores a las del control a PND15, reforzando los datos reportados anteriormente sobre estos parámetros, sin embargo, regresaron a los valores del control a PND30. Aun así, este último estudio resalta como la maduración renal alterada, puede contribuir al tamaño y número de glomérulos, así como la función renal (Sun et al., 2016).

2.10 Importancia de un modelo animal, roedores como modelo de estudio.

Una de las piezas fundamentales para las ciencias es el animal de laboratorio. Este es usado como modelo para investigar y comprender enfermedades transmisibles y no transmisibles que afectan a humanos y

animales, las causas, diagnóstico y tratamiento de estas. Además, posee importancia en la docencia biológica, en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos e insumos, donde hasta la fecha es indispensable su uso (Hernández, 2006).

El alto grado de similitud entre el genoma de ratón y rata con el humano que permite el entendimiento de procesos biológicos normales a nivel genético, molecular y celular, su pequeño tamaño, rentabilidad y período corto de gestación (~ 19-20 días) (Peters et al., 2007), en adición a los años de experiencia y gran cantidad de información que existe en las ciencias biomédicas, los ha hecho el modelo predilecto para comprender la base genética de la enfermedad humana (Ly, Onay, & Quaggin, 2011). La rata Wistar de cepa albina híbrida, fue la primera cepa de rata desarrollada para servir como modelo animal. Las características por la cual esta rata es un modelo animal muy utilizado son por su carácter dócil y su marcada inteligencia. Entre sus usos están Fisiología, Oncología, Toxicología, Nutrición y propósitos generales («Animales de Experimentación», s. f.)

III.JUSTIFICACIÓN

Debido que en México al igual que otros países en vías de desarrollo, la prevalencia de la deficiencia de hierro sigue siendo un problema grave de salud, las investigaciones de las consecuencias de esta deficiencia nutricional son de vital importancia. Los modelos animales con roedores son una gran herramienta para poder hacer investigaciones biomédicas, que puedan dar como resultado conocimientos aplicables a la mejora de tratamientos y diagnósticos médicos, con el fin de aumentar la calidad vida y salud humana. El riñón es un órgano con un papel en la homeostasis del hierro poco estudiado. Durante el desarrollo del riñón el hierro es necesario para su correcta maduración. Durante la gestación con deficiencia de hierro, este último es destinado para la eritropoyesis dejando en segundo plano el desarrollo de los tejidos renales. Un mal desarrollo renal en fetos e infantes puede desencadenar disfunciones renales en la adultez. En este estudio queremos explorar las implicaciones de la deficiencia de hierro en la morfología renal de ratas adultas programados por la deficiencia de hierro gestacional, en adición a una vida carente de hierro posnatalmente hasta la adultez, así mismo abordar las implicaciones del sexo como una variable que predispone o limita cambios morfológicos renales ante una deficiencia de hierro. De esta manera aumentar el conocimiento sobre la deficiencia de hierro y sus consecuencias en la salud renal, tema de vital importancia, pero poco abordado.

IV. OBJETIVO

Determinar los cambios morfológicos renales inducidos por la programación fetal por deficiencia de hierro durante la gestación y su remediación por suplementación con hierro en la etapa adulta de ratas Wistar.

V. HIPÓTESIS

La dieta materna deficiente en hierro programa una morfología renal negativa en el adulto; que será remediada con la suplementación de hierro al nacimiento.

VI. MÉTODO

6.1 Mantenimiento y cuidado de Ratas Wistar

Las ratas de la cepa Wistar utilizadas para modelo animal fueron mantenidas en condiciones estándar del bioterio: ciclos de luz/oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 5:00 am), con temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), comida y agua ad libitum en las instalaciones del Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. Todos los estudios estuvieron bajo los principios y procedimientos descritos por los Institutos Nacionales de Salud y de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y el Comité Local de la Universidad Autónoma del Estado de México, además de cumplir lo estipulado en NOM-062-ZOO-1999 .

6.2 Diseño de grupos experimentales

Se utilizó como pie de cría diez ratas (*Rattus norvegicus*) hembra de la cepa Wistar con un peso de 250-300 gramos o 3 meses de edad. Catorce días antes de gestarlas, ocho de ellas fueron alimentadas con dieta deficiente en hierro (10 ppm de sulfato ferroso), y a las dos ratas restantes se les administró una dieta no deficiente (100 ppm de sulfato ferroso). Se utilizarán 5 machos de la misma cepa, colocando 1 macho con 2 hembras durante un periodo de 5 días, para asegurar la gestación. 21 días postnatales (PND), se destetaron a las crías y se dividieron en los siguientes grupos según el tipo de alimento (a partir del destete y hasta los 70 PND):

- Grupo 1: Grupo control. 10 ratas (5-6 machos/ hembras) no deficientes en hierro (100 ppm de sulfato ferroso en el alimento).
- Grupo 2: ID. 10 ratas (5-6 machos/ hembras) deficientes en hierro (10 ppm de sulfato ferroso en el alimento) de por vida.
- Grupo 3: ID + suplemento al destete. 10 ratas (5-6 machos/ hembras) deficientes en hierro (10 ppm de sulfato ferroso en el alimento) hasta el destete, con posterior suplementó de dieta no deficiente en hierro (100 ppm de sulfato ferroso en el alimento).

6.3 Obtención de los tejidos de estudio

A los 70 PND se realizó la eutanasia de los animales miembros de los diferentes grupos experimentales. Inmediato al deceso se procedió a una disección para la obtención en el caso de este estudio del riñón, y otros tejidos de interés para otras posibles investigaciones, se depositaron las muestras en tubos con paraformaldehído al 4% y se almacenaron a 4°C para su posterior uso.

6.4 Evaluación externa de los riñones

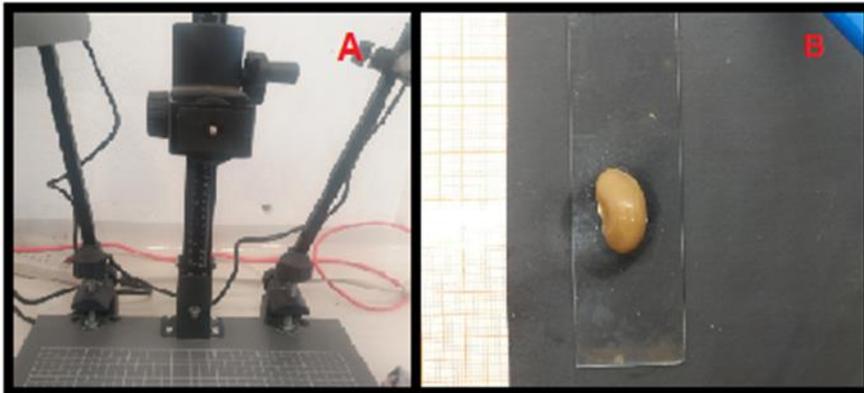


Figura 3 Análisis externo del riñón.

En A plataforma iluminada utilizada para toma de fotografías de las muestras renales. En B una de las muestras renales en un fondo oscuro con una escala de referencia en mm a su lado.

Se obtuvo el peso de las muestras (riñones izquierdos de los sujetos pertenecientes a cada grupo experimental) como variable de interés por medio de una balanza analítica. Se colocaron las muestras un espacio delimitado, con fondo obscuro y escala de referencia cuadrículada en la cual el cuadro más pequeño representa 1mm, continuando con captura de fotografías para la obtención los parámetros longitud y área de superficie horizontal del riñón, por medio del Software ImageJ.

6.5 Procesamiento de muestras para análisis histológico.

Secciones transversales de 5 mm de grosor se obtuvieron por medio de 2 diseños de matrices de madera, con dos líneas de guía para la inserción de cuchillas para microtomo Leica (diseño con el respaldo del Dr. Josele Ricardo Flores Santín).

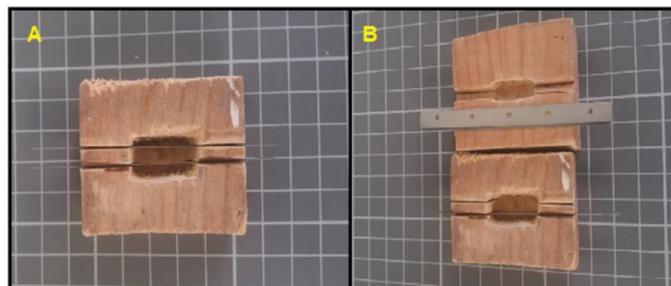


Figura 4 Matriz de corte.

En A matriz para corte transversal de riñón de rata diseñada en madera. En B dos matrices de corte, una para muestras grandes y otra para pequeñas ambas con líneas de guía para chuchillas de microtomo y un espacio de 5mm entre las líneas.

6.6 Inclusión en parafina

Posteriormente se etiquetó e introdujeron las secciones en casets histológicos para la inclusión en parafina con ayuda del equipo automatizado Histoquinette LEICA TP 1020 dentro de las instalaciones del Laboratorio de Patología de Facultad de Ciencias de Universidad Autónoma del Estado de México para, con la siguiente secuencia programada:

- Formol 10% (1 hora), Alcohol 96% (1 hora), Alcohol 96% (1 hora), Alcohol 96% (1 hora), Alcohol 96% (1 hora), Alcohol Absoluto (1 hora), Alcohol Absoluto (1 hora), Alcohol/Xilol (1 hora), Xileno (1 hora), Xileno (1 hora), Parafina (1 hora), Parafina (1 hora).

Con el uso de un dispensador de parafina LEICA EG 1120 con placa de calefacción se hizo la completa inclusión de las secciones de riñón en parafina, usando moldes de acero inoxidable, depositando las secciones y, rociando parafina en él, colocando los casets como tapa del molde. Al dejar reposar y enfriar se obtuvieron bloques de parafina dura con nuestras secciones dentro.

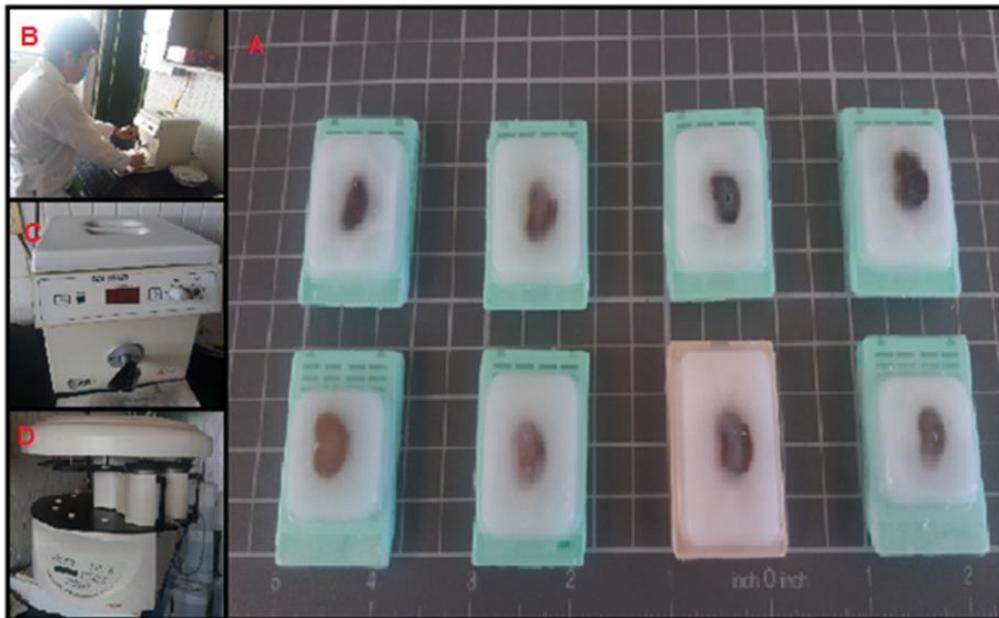


Figura 5 Fijación en parafina de tejido muestra.

En A muestras renales fijadas en caset con parafina. En B proceso de inclusión en parafina. En C dispensadora de parafina LEICA EG 1120. En D histoquinette LEICA TP 1020 para el tren de deshidratación y fijación.

6.7 Cortes histológicos

Se seleccionaron 3 bloques de parafina por género (macho/hembra) de cada grupo experimental cuya inclusión fue la más adecuada para obtener cortes de calidad a escala de 5µm. Al comenzar se aseguró que los bloques de parafina estuvieran fríos introduciéndolos 1 hora al congelador a 4°C antes de su disección en el Microtomo rotatorio LEICA, para evitar cortes rotos y dobleces. Se descartaron todos aquellos primeros cortes en los cuales la sección transversal del riñón no salía completa, una vez obtenido el primer corte integro, se guardó un corte cada 10 cortes para análisis, con un total de 15 a 20 cortes (o rebanadas) por bloque cortado. Durante la disección se tuvo los cuidados necesarios para la hidratación del tejido y limpieza del equipo, para evitar cortes astillados o rotos.

La fijación de los cortes se realizó por medio de baño de flotación, introduciendo los cortes en agua preparada con 3 gotas por litro de una solución de gelatina y glicerina (100ml agua destilada, 15 ml y 5g de gretina,



Figura 6 Cortes histológicos.

En A microtomo rotatorio Leica . En B proceso de corte histológico.

en base a la experiencia técnica del Laboratorio de patología, así como los protocolos de los adhesivos de Haupt y Glicerogelatina), 40 a 45 °C, capturándolos con laminillas tratadas con la solución de sacarosa antes mencionada, colocando los portaobjetos los cortes en una placa caliente (o estufa) a 35 a 40° C, para la fijación y desparafinación. Como producto final por cada bloque cortado se obtuvieron 3 portaobjetos con 3 cortes fijados, para tinción histológica.

6.8 Tinción Hematoxilina-Eosina

Se realizo de acuerdo con el protocolo estandarizado por el Laboratorio de Patología de Facultad de Medicina de Universidad Autónoma del Estado de México. Conformado por los Siguietes paso:

- Xilol 5 min, Xilol 5 min, 10 lavados de alcohol xilol, 10 lavados de alcohol absoluto, 10 lavados de alcohol 96%, 10 lavados de alcohol 96%, lavar en agua corriente, 3 min en Hematoxilina, 2 lavados de agua, 3 lavados en alcohol acido, lavar con agua, 3 min en Eosina, 10 lavados de alcohol 96%, 10 lavados de alcohol 96%, 10 lavados de alcohol absoluto, 10 lavados de alcohol xilol, 10 lavados de alcohol xilol, 10 lavados de alcohol xilol, montar en resina.



Figura 7 Tinción histológica de secciones de 5µm

En A tren de tinción hematoxilina - eosina. B proceso de tinción en campana de extracción. En C muestras teñidas.

6.9 Análisis morfológicos e histológicos

Se seleccionaron 4 secciones teñidas por riñón de cada grupo, la cuales poseían la mejor y más adecuada calidad para los siguientes procesos. Por medio de un microscopio estereoscópico Cole Parmer con cámara Infinity 1 Lumninera, a 3.2x (objetivo 0.8x incorporar a cámara y aumento 4x del microscopio) se observaron las muestras y dividiendo la seccion de riñón en tres áreas, delantera (Tomando como inicio la parte superior del riñón donde se encontraba la glándula suprarrenal), media (abarcando la pelvis renal y donde se ubicaba el sistema de vascularización renal) y posterior, con 10 a 15 cuadrantes cada área, para la para captura de fotografías de los diversos cuadrantes y la posterior reconstrucción de todo el corte del riñón, con la superposición de imágenes por medio del software Image Compositor Editor es avanzado es un cual generador de imágenes panorámicas de Microsoft. Una vez obtenidas las reconstrucciones, se sometieron a análisis por medio del software ImageJ versión 1.5 para obtención de las variables, longitud del corte, área de la sección (o corte), área del córtex renal, área de la medula renal, numero glomérulos totales, numero de pirámides renales.

Para análisis cualitativo, en un microscopio Velab VE-B15 con cámara Infinity 1 Lumminera se tomaron microfotografías a 4x de la parte superior de las mismas secciones riñón que fueron reconstruidas, iniciando donde se ubicaba antes la glándula suprarrenal hasta el inicio de la medula renal, para observar los posibles cambios a las principales estructuras funcionales del córtex renal, como PT, DT, capsula de Bowman y glomérulo.

6.10 Análisis de Datos

Factores:

- Factor sexo: individuos de la especie *Rattus norvegicus* cepa Wistar, cuyas cualidades que caracterizan los dividen en macho y hembra, haciendo posible una reproducción que se caracteriza por una diversificación genética.
- Factor tratamiento: 3 dietas diferentes basadas en el hierro disponible que poseen. 1(control): machos/ hembras no deficientes en hierro (100 ppm de sulfato ferroso en el alimento). 2 (ID): machos/ hembras deficientes en hierro (10 ppm de sulfato ferroso en el alimento) de por vida. 3 (ID+S): machos/ hembras deficientes en hierro (10 ppm de sulfato ferroso en el alimento) hasta el destete, con posterior suplementó de dieta no deficiente en hierro (100 ppm de sulfato ferroso en el alimento).

A los individuos del modelo murino cepa Wistar se les evaluó las siguientes variables:

- Externas (Pretratamiento histológico):
 - Área: espacio que ocupa la superficie horizontal del riñón en una posición longitudinal con respecto a una escala de referencia, medido en mm^2
 - Longitud: distancia que hay entre el extremo superior (con respecto a donde se ubicaba la glandula suprarrenal) e inferior del riñón una posición longitudinal con respecto a una escala de referencia, medido en mm.
 - Peso: masa del tejido del riñón medida en g.
- Internas (Post- tratamiento histológico):
 - Área del córtex renal con respecto el área de la sección: superficie que ocupa el Córtex renal con relación al total de la sección, excluyendo la medula y la pelvis renales.
 - Área de la medula rena con respecto el área de la sección: superficie que ocupa la medula renal dentro del corte del riñón con relación al total de la sección, excluyendo el córtex.
 - Numero de glomérulos con respecto el área del córtex: cantidad de las estructuras funcionales pertenecientes a las nefronas ubicadas el córtex renal.

Para empezar, sometimos los datos de las diferentes variables (Pretratamiento y Post-tratamiento histológico) a una prueba de bondad de ajuste y de normalidad (Chi-cuadrada), para determinar si poseían una distribución normal. De este modo poder realizar un análisis multifactorial de varianza, para determinar si los factores Sexo y Tratamiento, tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre las variables medidas. Se empleo intervalo de Tukey para determinar la diferencia máxima significativa (HSD), con 95% de confianza para disminuir del riesgo de llamar estadísticamente significativo a una interacción cuando no lo es. Estos análisis fueron realizados en el software STATGRAPHICS Centurion, versión XVI versión 16.1

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto de ID y suplementación de Fe en morfología renal adulta de hembras y machos.

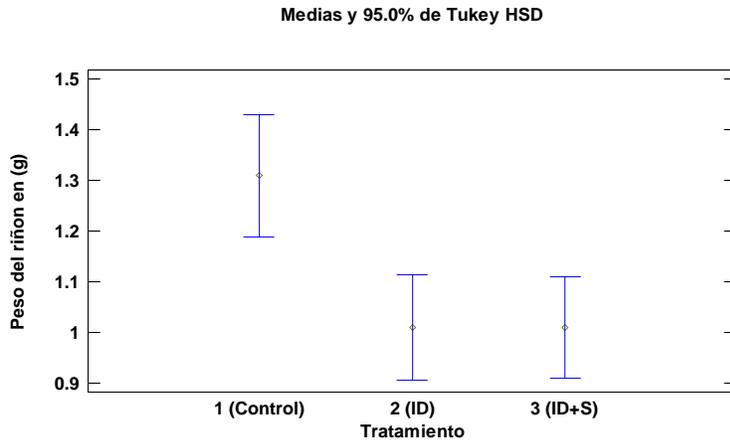
Las consecuencias de una baja nutrición durante el embarazo se ven reflejadas en una restricción de crecimiento del medio intrauterino (Marciniak et al., 2017)(Hales & Barker, 2001). Esta restricción de crecimiento ante la deficiencia de elementos esenciales como el Fe en este caso, desencadena mecanismos de ahorro nutricional y adaptativos que priorizan la distribución de este elemento para órganos vitales como el cerebro, corazón, pulmón entre otros. Consecuentemente estos cambios que salvan la vida del feto comprometen el desarrollo y eficiencia de otros órganos, dejando marca por medio la programación fetal de fenotipos permanentes observables en la vida posnatal y adulta de la descendencia (Lewis et al., 2002)(Miranda et al., 2017)(Perrone et al., 2016). Nuestro estudio tuvo hallazgos significativos en cuanto el efecto de la ID gestacional en el riñón de la descendencia, que complementan lo antes reportado, añadiendo también el factor de suplementación de Fe como tratamiento ante la programación fetal renal por ID.

7.1.1 Variables externas (pretratamiento histológico)

Puesto que todas nuestras variables poseen una distribución normal fueron aptas para el ANOVA multifactorial ver **Tabla 1**.

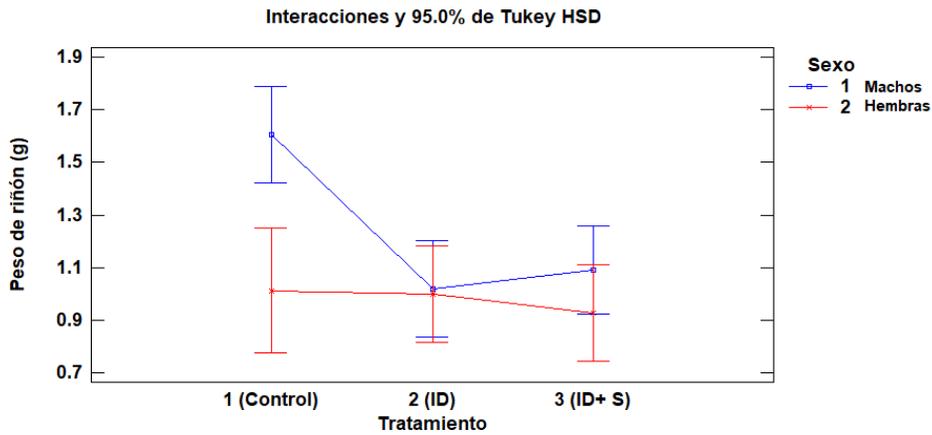
Peso: la deficiencia de hierro gestacional (hasta la adultez) y la suplementación de Fe (Postnatal) tuvieron un efecto estadísticamente significativo ($gl=$, $RF=7.19$ y $P=0.0038$) en el peso del riñón. Observando que hay una disminución de peso del riñón por parte de los individuos ID con respecto de los controles, cambio que la suplementación de hierro se mantiene sin presentar ningún retorno a su estado en el control.

Tomando en consideración el sexo, este último tuvo un papel significativo ($gl=1$, $F=13.34$ y $P=0.0013$), así mismo su interacción con el tratamiento de hierro fue igualmente significativa ($gl=2$, $F=5.32$ y $P=0.0126$). En la **Gráfica 2** podemos observar como las hembras control poseen un menor peso renal con respecto de los machos, ante la ID disminuye el peso renal en los machos, mientras que las hembras ID y suplementadas con Fe parecen mantener un peso similar al control.



Gráfica 1. Medias de los pesos renales pretratamiento histológico.

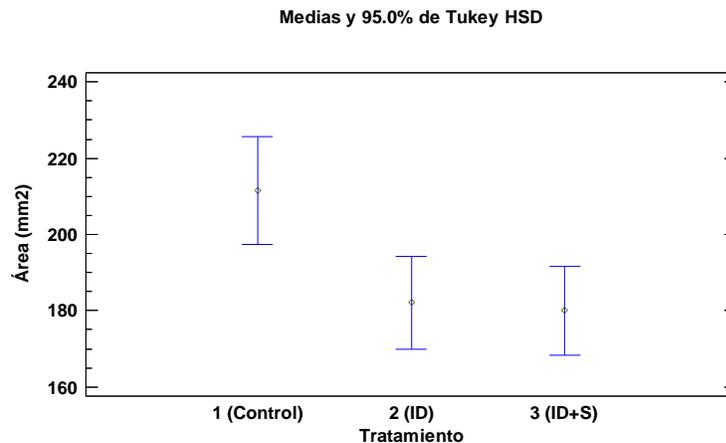
Gráfica de medias con un intervalo del 95% de confianza de Tukey donde se observa la variación de la variable peso renal entre los grupos experimentales.



Gráfica 2. Interacción entre medias del peso del riñón.

Grafica de interacciones entre medias de los grupos experimentales con un intervalo del 95% de confianza de Tukey. Donde se observa la variación de la variable peso de riñón tomando en cuenta el cofactor sexo.

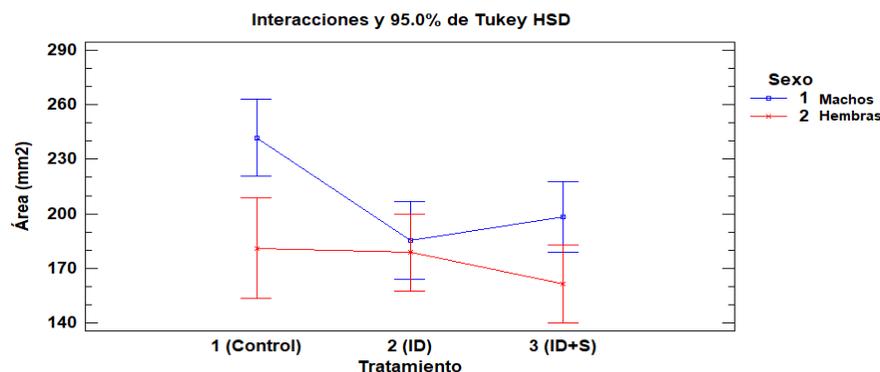
Área: la ID y la suplementación de Fe tuvieron efecto estadísticamente significativo ($gl=2$, $F=5.44$ y $P=0.0116$) en el área del riñón. En la **Gráfica 3** podemos observar cómo los individuos que sufrieron ID muestran una disminución del área significativa, la cual es similar a los suplementados con Fe.



Gráfica 3. Medias de Áreas renales pretratamiento.

Gráfica de medias con un intervalo del 95% de confianza de Tukey donde se observa la variación de la variable Área renal entre los grupos experimentales.

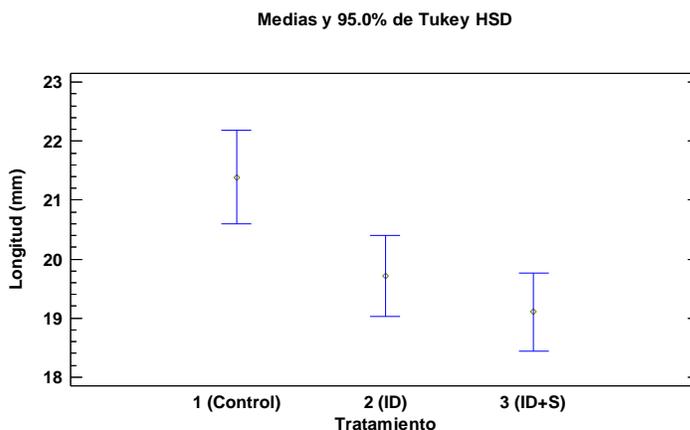
El sexo fue significativo ($gl=1$, $F=13.17.70$ y $P=0.0003$), pero su interacción con el tratamiento de Fe no fue significativa ($gl=2$, $F=3.39$ y $P=0.0515$). En la **Gráfica 4** podemos observar como las hembras control poseen una menor área renal con respecto los machos. Los machos ID disminuyen su área siendo similar a las hembras control, cambios que en la suplementación de Fe permanece constante. Mientras que en las hembras ID y suplementadas con Fe no presentan diferencias significativas con respecto el control.



Gráfica 4. Interacción entre medias de Área renal.

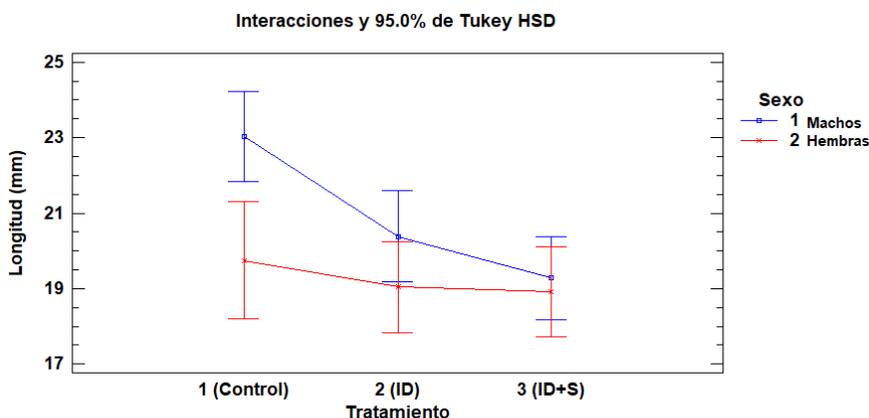
Gráfica de interacciones entre medias de los grupos experimentales con un intervalo del 95% de confianza de Tukey. Donde se observa la variación de la variable Área renal de riñón tomando en cuenta el cofactor sexo.

Longitud: La ID y la suplementación tuvieron un efecto significativo ($gl=2$, $F= 7.93$ y $P=0.0024$), disminuyendo la longitud de los individuos con ID (**Gráfica 5**) con respecto de los controles, cambio que con la suplementación resulta con valores similares a los ID.



Gráfica 5. Medias de Longitud renal pretratamiento histológico
 Grafica de medias con un intervalo del 95% de confianza de Tukey donde se observa la variación de la variable longitud renal entre los grupos experimentales.

El sexo tuvo un valor significativo ($gl=1$, $F=12.73$ y $P=0.00016$), sin embargo, su interacción con el tratamiento de Fe no fue significativa ($gl=2$, $F=3.15$ y $P=0.0619$). En la **Gráfica 6** vemos como las hembras control poseen menor longitud del riñón con respecto machos control. La ID disminuye la longitud renal en los machos, y continúa disminuyendo aun en presencia de suplementación de Fe. Fenómeno que en las hembras no se presenta. Ante ID y suplementación de Fe no se ve modificada la longitud renal de ellas significativamente.



Gráfica 6. Interacción entre medias de Longitud renal.

Grafica de interacciones entre medias de los grupos experimentales con un intervalo del 95% de confianza de Tukey. Donde se observa la variación de la variable Longitud renal tomando en cuenta el cofactor sexo.

Uno de los primeros signos que deja la ID gestacional prolongada a la adultez, son cambios en la talla del riñón. En base a esto, en nuestra investigación se decidió tomar peso, área (en un plano horizontal) y longitud del riñón como parámetros en cuanto a la talla de este. Encontrando que el peso renal del grupo ID y los suplementados con Fe, a 70 PND tuvo una reducción considerable con respecto del control, similar a lo descrito por Mary Y. Sun, et al., 2017 en su modelo de ID gestacional, con promedio del peso de los riñones ID más ligeros que los controles a los días 10, 15 y 30 PND. Sin embargo, al tomar en cuenta el peso corporal, el peso de los riñones con respecto del cuerpo es similares entre ID y control en los días 10, 15 y 30 PND, mientras que a los 45 PND los ID son mayores que los del control.

Considerando el peso renal en relación al peso corporal, los hallazgos de Mary Y. Sun, et al., 2017, son semejantes a los reportados en experimentos con una dieta de restricción de hierro (3 mg de Fe como subcarbonato de hierro/kg), donde los riñones IR fueron más pesados con respecto a los controles a los 18 meses (Lewis et al., 2002; Lisle et al., 2003), sin diferencias entre sexos. Así mismo una investigación donde se alteró la funcionalidad de la proteína DMT1 (alelo /b), se observó que los machos b/b (que expresaban la alteración de DMT1) tuvieron riñones más pesados en relación al control (hembras +/b), teniendo como resultado morfología renal similar a la expresada en una ID (Veuthey et al., 2014).

Aunque en nuestro experimento las hembras control poseen riñones más pequeños a los machos control. Se ha mencionado que estas diferencias de la masa renal entre machos y hembras, solo existen cuando no se considera el peso corporal (Oudar et al., 1991). A pesar de esto vale la pena señalar que se ha observado en machos, un papel importante de la testosterona DHT con relación a la masa renal, donde el aumento de esta en una etapa juvenil (o prepuberada) dio como resultado un incremento en la masa renal (Shortliffe, Ye, Behr, & Wang, 2014). En cuanto a la DHT y la ID, solo hemos hallado un estudio que indica que la presencia de ID no tiene efecto en los niveles de testosterona (Intragumtornchai, Steiner, & Finch, 1988), sin embargo el tiempo de exposición a ID no fue tan prolongado.

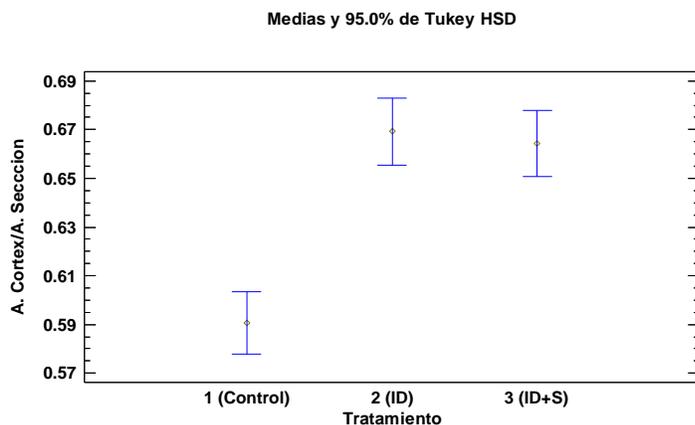
El aumento en peso de los riñones IR de Lewis et al., 2002, se presentó en compañía de una hipertrofia renal originada posiblemente durante una edad temprana, no está claro si el aumento en la talla del riñón es el resultado de la hipertrofia. En 2008, con una ID neonatal por medio de gastrostomía de una fórmula baja en Fe, se observó pesos similares de los riñones control, ID y ID + suplementación a los 12 PND. Se menciona que el desarrollo renal en neonatos continúa los días 7-10 PND, tomando en cuenta se aplicó la ID a 4 PND, pretendiendo aislar la variable ID, de los efectos globales que una restricción alimentaria genera, como la hipertrofia de tejidos, frecuentemente observada en diversos modelos de restricción de crecimiento (Drake et al., 2009).

Por último, en cuanto a nuestros resultados de los parámetros de área y longitud del riñón, los datos se comportan de manera muy similar al peso, con los individuos ID e ID+S reflejando un menor valor respecto del control.

7.1.2 Variables internas (postratamiento histológico)

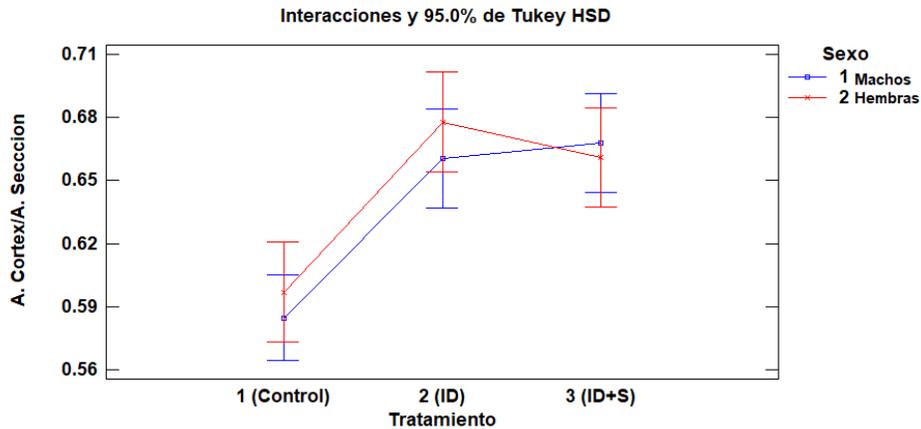
Puesto que todas nuestras variables poseen una distribución normal fueron aptas para el ANOVA multifactorial ver **Tabla 1**.

Área del córtex con respecto área de la sección: La ID y suplementación tuvieron un efecto significativo ($gl=2$, $F=32.98$ y $P=0.0000$) en el A. córtex/A. sección. Observando un incremento del área del córtex en los individuos miembros del grupo ID en comparación con el grupo control **Gráfica 7**, aumento que continúa presente en los suplementados con Fe. El sexo ($gl=1$, $F=0.70$ y $P=0.4052$) ni su interacción con el tratamiento ($gl=2$, $F=0.63$ y $P=0.5358$) muestran significancia. Por lo que en la **Gráfica 8**, podemos observar la interacción similar a la **Gráfica 7**.



Gráfica 7. Medias del Área del córtex con respecto área de la sección.

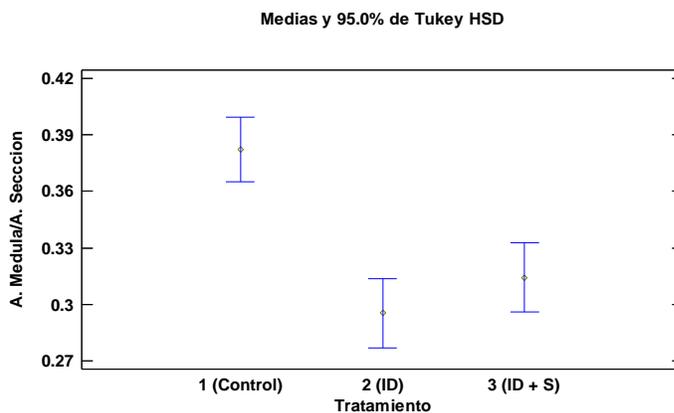
Gráfica de medias con un intervalo del 95% de confianza de Tukey donde se observa la variación de la variable área del córtex con respecto área de la sección, entre los grupos.



Gráfica 8. Interacción entre medias del Área del córtex con respecto área de la sección.

Gráfica de interacciones entre medias de los grupos experimentales con un intervalo del 95% de confianza de Tukey. Donde se observa la variación de la variable Área del córtex / Área de la sección tomando en cuenta el cofactor sexo.

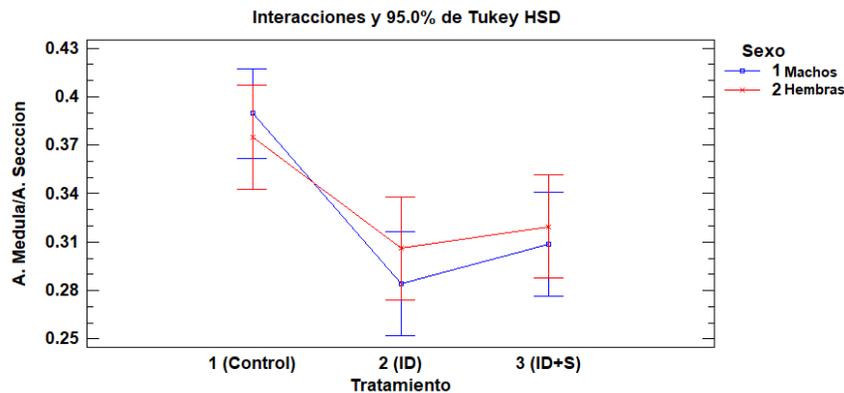
Área de la medula con respecto el área de la sección: La ID y la suplementación de Fe tuvieron un efecto significativo ($gl=2$, $F=19.38$ y $P=0.0000$) en el área de la medula, disminuyendo en los individuos ID a comparación del control, cambio que no se altera significativamente en los suplementados.



Gráfica 9. Medias de área de medula con respecto área de la sección.

Gráfica de medias con un intervalo del 95% de confianza de Tukey donde se observa la variación de la variable área del a medula con respecto área de la sección, entre los grupos.

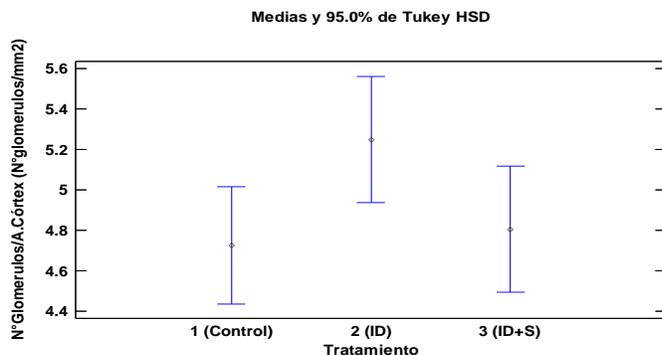
El sexo ($gl=1$, $F=0.24$ y $P=0.6251$) ni su interacción con el tratamiento ($gl=2$, $F=0.81$ y $P=0.4509$) muestran una importancia significativa. Por lo que en la **Gráfica 10**, podemos observar un comportamiento similar a la **Gráfica 9**.



Gráfica 10. Interacción entre medias de Área de la medula con respecto a área de la sección.

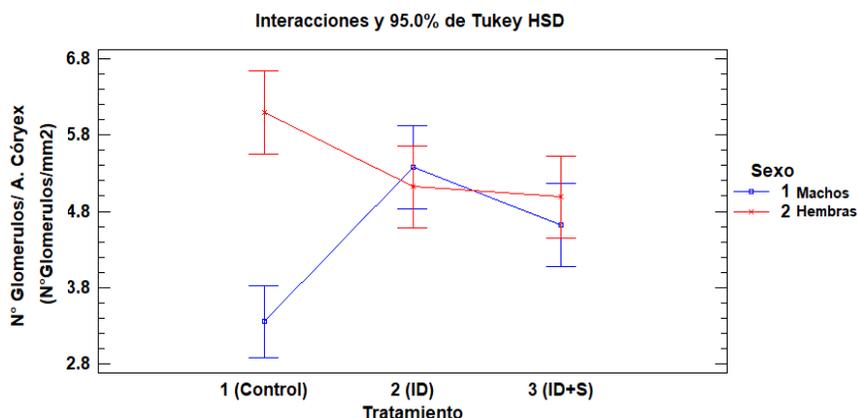
Grafica de interacciones entre medias de los grupos experimentales con un intervalo del 95% de confianza de Tukey. Donde se observa la variación de la variable Área de la medula/ Área de la sección tomando en cuenta el cofactor sexo.

Numero de glomérulos con respecto al área del córtex: Se puede observar un incremento en el número de glomérulos en los individuos ID en comparación con los controles, sin embargo, los datos nos dicen que la ID y suplementación de Fe no tuvieron un efecto significativo ($gl=2$, $F=2.48$ y $P=0.0937$). Cuando se toma en cuenta el sexo ($gl=1$, $F=21.14$ y $P=0.0000$) y su interacción con el tratamiento ($gl=2$, $F=20.40$ y $P=0.0000$) tenemos un efecto significativo sobre el N° de glomérulos. Las hembras control poseen más glomérulos que los machos, cuando la ID entra en juego estas diferencias parecen desaparecer, resultando en un número similar de glomérulos para ambos géneros con pérdida por parte de las hembras ID y ganancia por parte de los machos ID **Grafica 12**. Resultado que parece mantenerse similar. en ambos sexos frente a la suplementación de hierro.



Gráfica 11. Medias del número de glomérulos con respecto área del córtex.

Grafica de medias con un intervalo del 95% de confianza de Tukey donde se observa la variación de la variable número de glomérulos con respecto área del córtex, entre los grupos.



Gráfica 12. Interacción entre medias de numero de glomérulos con respecto área del córtex.

Grafica de interacciones entre medias de los grupos experimentales con un intervalo del 95% de confianza de Tukey. Donde se observa la variación de la variable número de glomérulos respecto al área del córtex tomando en cuenta el cofactor sexo.

Las hembras y machos control de nuestra investigación poseían una arquitectura similar en cuanto el área que posee el córtex renal, contrastando de manera curiosa con descrito por Oudar et al., 1991, donde se menciona que los machos poseen un córtex más amplio que las hembras, en relación a las dimensiones del riñón. La ID y suplementación de hierro provocaron un aumento de la corteza renal, mientras que en el modelo de Lisle et al., 2003, los tratamientos de restricción de hierro no tuvieron efecto sobre el tamaño relativo de la corteza renal.

Pudiera ser que este aumento de la corteza renal este relacionado con una hipertrofia del tejido, similar a la observa en los trabajos de Lisle et al., 2003, Sun et al., 2016 y Veuthey et al., 2014. Se sabe que estructuras de la corteza renal como los túbulo proximales PT crecen cuando la carga de trabajo aumenta (Oudar et al., 1991). Al existir una menor disposición de Fe durante el desarrollo gestacional y neonatal del riñón, el crecimiento de estas estructuras pudiera ser una respuesta para asegurar una mayor filtración y mejor absorción de este. Se ha descrito que los machos poseen un mayor desarrollo de PT que las hembras y que el aumento de DHT incrementa el volumen de PT en hembras (Oudar et al., 1991), aunque hemos mencionado que no se ha descrito relación de entre ID y niveles de DHT, no se puede descartar aun una interacción entre ellas.

Al obtener nosotros un aumento en la corteza renal era de esperarse que la medula se viera reducida, resultado que obtuvimos.

En cuanto al número de glomérulos, tuvimos que los machos poseen menor número de glomérulos con respecto a las hembras, como se ha ya descrito con anterioridad (Lisle et al., 2003; Murata, Yabuki, Matsumoto, Nishinakagawa, & Suzuki, 2006). En presencia de ID el numero de glomérulos parece disminuir al igual que en las otros investigación sobre ID y restricción de hierro (Drake et al., 2009; Lisle et al., 2003; Veuthey et al., 2014), solo en las hembras en nuestro caso, con respecto a los machos parece haber un incrementó en el número de glomérulos. Esto pudiera respaldar la idea de la hipertrofia en nuestro grupo ID junto con el aumento en la corteza renal que sufrieron. Otra posibilidad es que debido a la masiva división celular durante la glomerulogenesis, se incremente el numero de glomérulos, como en el caso de Sun et al., 2016, donde la densidad y tamaño de los glomérulos en los riñones ID fue menor a los 15 PND, pero volvieron a los valores del control a los 30 PND, aunque el desarrollo renal solo continua hasta los 10 PND, esto explica una posible glomerulogenesis prolongada. Con la suplementación pareciera ser que los machos tiene una ligera recuperación, regresando a los valor del control en cuanto el numero de glomérulos.

La disminución de la dotación de glomérulos en los diversos modelos de ID, se vio acompañada de daño túbulo intersticial, fibrosis y esclerosis, cambios que se sugiere compromete la funcionalidad renal, acortando la esperanza de vida (Drake et al., 2009; Lisle et al., 2003; Veuthey et al., 2014). Características como oclusión del lumen, y dilatación tubular descritas en estos daños y estadios mencionados, fueron observadas en nuestros resultados **Figura 8**, además de pérdida de capsula de Bowman y de forma del glomérulo, pese a no realizar la misma metodología. Estos daños, como lo es la fibrosis, también ocurren ante una hipoxia tisular a través de mecanismos con factores inducibles por hipoxia (Drake et al., 2009), un ejemplo de estos es el HIF cuya expresión está regulada de forma dependiente de Fe por interacciones entre secuencias IRE y proteína IRP (Sermini et al., 2017; Thévenod & Wolff, 2016). Estos también

regulan proteínas como DMT1, ferroportina, TFR1 y ferritina, por lo que una ID podría estar alterando la funcionalidad y expresión de estas proteínas dando resultado daños tisulares. Similar a lo que paso con las ratas Belgrado con alteraciones en la funcionalidad del DMT1, teniendo un fenómeno donde la alteraciones morfológicas inducen aún más cambios en la dotación de nefronas y glomérulos, continuando de este modo un ciclo vicioso que finalmente disminuye la filtración glomerular, terminando en daño renal y función renal deficiente (Veuthey et al., 2014)..

Los machos control parecen tuvieron túbulos más desarrollados que las hembras, como se ha descrito (Oudar et al., 1991). Durante una ID gestacional y prolongada durante la vida posnatal, tanto machos como hembras sufrieron de daño túbulo intersticial, los machos en mayor medida que las hembras, situación en los casos de Drake et al., 2009, Lisle et al., 2003 y Veuthey et al., 2014. La suplementación de hierro posnatal tiene efecto de recuperación en las hembras, mientras que los machos suplementado parecen tener el mismo estadio que los ID.

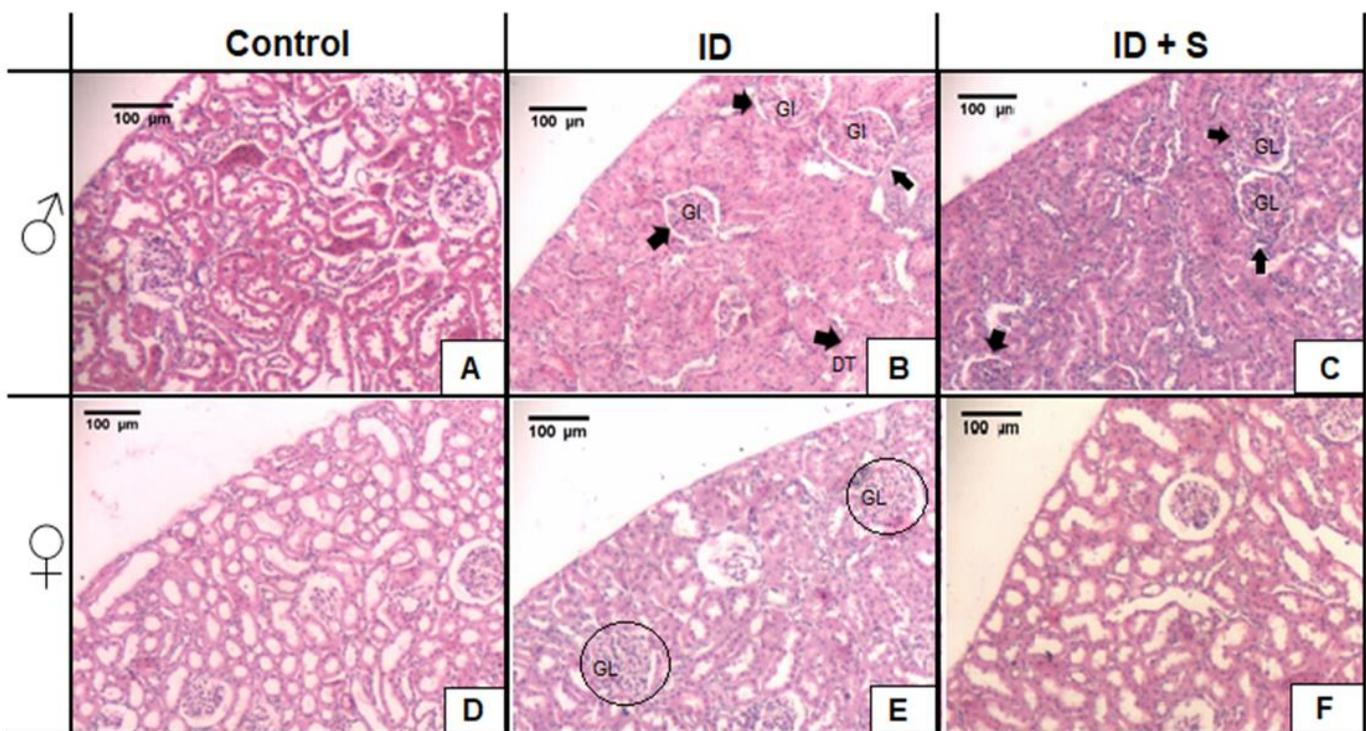
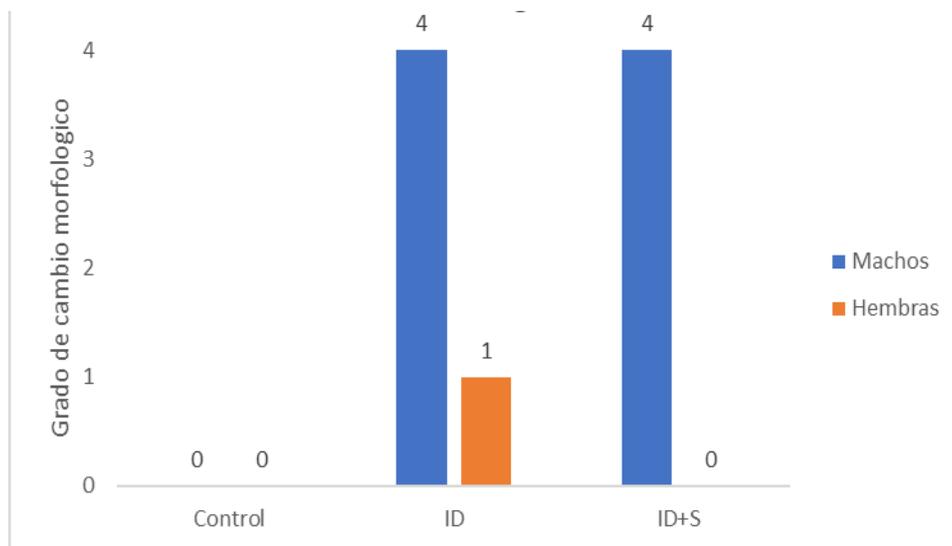


Figura 8 Cuadro comparativo de la morfología renal adulta de ratas macho y hembra. Grupos control, ID e ID + S. En el cuadro podemos observar los cambios en la morfología renal adulta provocados por la programación fetal bajo una ID gestacional y de por vida, así como una ID gestacional con suplementación de hierro al nacer y hasta la adultez. Además de comparar entre hembras y machos de los mismos grupos experimentales.

Asignando valores arbitrarios al daño túbulo intersticial de 0 a 4, se hizo un gráfico de máximos y mínimos con el valor del grado de daño que más repetía (moda) **Grafica 13**. Se puede apreciar al igual que en la **Figura 8** como los machos están mas predispuestos a sufrir cambios en la morfología renal. Estos cambios

parecen ser resultado principal de la programación fetal inducida por la ID, dando un fenotipo permanente que incluso la suplementación de Fe posnatalmente no cambian en lo mas mínimo, concordando con lo dicho en la “hipotesis del tercer fenotipo” por Hales & Barker, 2001, y otras descripciones de programación fetal (Marciniak et al., 2017; Miranda et al., 2017)



Gráfica 13. Grado de cambio que más se repite en los grupos experimentales.

En la gráfica podemos observar la diferencia entre machos y hembras en cuanto al grado de cambio que se presenta repetidamente entre cada sexo de los grupos experimentales. Las hembras ID presentan menor grado de cambio con respecto los machos ID comparándolos con los controles, así mismo la suplementación parece solo surtir efecto en las hembras mientras que en los machos el grado de cambio sigue constante.

En el caso de las hembras, se sugiere que su sexo juega un papel importante para la predisposición a cambios inducidos por la programación fetal. Respecto a la morfología renal, una posible explicación a la restauración en hembras, son las hormonas femeninas y su interacción con el desarrollo de la morfofisiología renal. Se ha sugerido que las mujeres ovulantes podrían tener cierta capacidad de recambio de células tubulares que les proporciona una capacidad de resistencia al daño renal, esto en base a un estudio sobre excreción de enzimas tubulares en la orina, analizando mujeres ovulantes, mujeres postmenopausicas y hombres. Las mujeres ovulantes tuvieron más expresión de enzimas 1,6-Bifosfatasa (F-1,6-BPase) y glutation-S-transferasa (GST α), con picos antes de la ovulación y a los 7 días posteriores, estas enzimas están implicadas en la desintoxicación renal, con un expresión específica en las células de PT por parte de GST α (Seppi et al., 2016).

F-1,6-BPase, esta propuesto como biomarcador para daño renal, incrementado en células afectas por diversas lesiones renales como isquemia y tratamiento nefrotóxicos, así mismo se descarta la F-1,6-BPase

proveniente de otros tejidos debido a que por su tamaño y peso molecular no se excretan en la orina (Pfaller et al., 1994; Seppi et al., 2016).

En cuanto a las hormonas masculinas frente a la morfología y función renal se ha visto que la DHT incrementa subunidades de acuaporinas en ductos colectores (CD), relacionadas con una posible hipertensión. (Loh, Giribabu, & Salleh, 2017), así mismo la DHT aumenta la masa renal como ya mencionamos, además de pérdida de glomérulos, por lo que se estos cambios renales se han asociado a hallazgos clínicos sobre mayor progresión de enfermedades renales en hombres que en mujeres durante la pubertad (Shortliffe et al., 2014). Dado estos datos, es indiscutible que el sexo tiene un papel muy importante ante los posibles efectos de ID, siendo el ambiente hormonal una posible respuesta a la susceptibilidad o resistencia a cambios renales por parte de machos y hembras respectivamente.

A pesar de existir investigaciones donde se agrega suplementación de hierro ante una ID. Nuestro estudio es el primero en considera una ID prolongada desde la gestación hasta la adultez y compararla con la suplementación posnatal. Como los fenotipos resultantes de la programación fetal se ha mencionado ser permanentes, es interesantes contrastar si realmente un acceso posnatal a suficiente hierro hace un cambio frente a seguir siendo deficiente, encontrando que la morfología renal adulta masculina de un individuo resultara muy similar con o sin acceso a hierro suficiente, siendo prioridad la etapa gestacional. Nuestro estudio se vio limitado en diversos aspectos, como en el análisis de la talla del riñón al no contrastar con el peso total del cuerpo, de este modo no fue posible hacer una completa comparación con lo ya reportado. De igual forma para futuros estudios queda en consideración agregar una mayor variedad de análisis histológicos como tinción Tricromo de Masson y PAS, útiles para observar mejor la fibrosis y esclerosis de tejidos. Nuestra “n” fue reducida, pero con resultados estadísticamente significativos.

VIII. CONCLUSIONES

El periodo de gestación es una etapa crítica para la programación fetal donde la ID dará lugar fenotipos anormales que pueden comprometer el desarrollo de tejidos y sus funciones en la etapa adulta. Un tratamiento oral contra los cambios morfológicos programados durante ID en la gestación tendrá una eficacia casi nula. El sexo de un individuo afectado por ID tendrá un rol significativo ante los resultados de la programación fetal, siendo las hembras mas flexibles y resistentes a estos cambios programados en su morfología renal debido a una posible capacidad de remodelación celular relacionada con la carga hormonal.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(2), 164-174. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778671>
- Animales de Experimentación. (s. f.). Recuperado 10 de septiembre de 2018, de https://www.uaeh.edu.mx/bioterio/animales_expe.html
- Camaschella, C. (2015a). Iron-Deficiency Anemia. *New England Journal of Medicine*, 372(19), 1832-1843. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401038>
- Camaschella, C. (2015b). Iron deficiency: new insights into diagnosis and treatment. *ASH Education Program Book*. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.8>
- Campbell, N. A., Urry, L., & Reece, J. B. (2007). *Biología*. Médica Panamericana. Recuperado de https://books.google.es/books?id=QcU0yde9PtkC&pg=PA170&dq=cadena+de+transporte+de+electrones++transportadores+de+electrones&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiBp7iE_8jZAhWfUwRQKHQi5CZ8Q6AEIJzAA#v=onepage&q=cadena+de+transporte+de+electrones+transportadores+de+electrones&f=false
- Daher, R., & Karim, Z. (2017). Iron metabolism: State of the art. *Transfusion Clinique et Biologique*, 24(3), 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2017.06.015>
- Daher, Raed, Manceau, H., & Karim, Z. (2017). Iron metabolism and the role of the iron-regulating hormone hepcidin in health and disease. *La Presse Médicale*, 46(12), e272-e278. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.10.006>
- Daniel R. Chernaŵsky, María Luisa S. Sequeira López, R. A. G. (2002). Bases moleculares del desarrollo renal. Recuperado 23 de octubre de 2019, de <https://studylib.es/doc/4601298/bases-moleculares-del-desarrollo-renal>
- Dommarco, J. Á. R. (2012). Deficiencias de micronutrientos en México: Un problema invisible de salud pública. *Salud Publica de Mexico*.
- Drake, K. A., Sauerbry, M. J., Blohowiak, S. E., Repyak, K. S., & Kling, P. J. (2009). Iron Deficiency and Renal Development in the Newborn Rat. *Pediatric Research*, 66(6), 619-624. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181be79c2>
- Fernandez-Twinn, D. S., Constância, M., & Ozanne, S. E. (2015). Intergenerational epigenetic inheritance in models of developmental programming of adult disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 43, 85-95. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2015.06.006>
- Forrellat. (2016). Regulación del metabolismo del hierro: dos sistemas, un mismo objetivo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*.
- Hales, C. N., & Barker, D. J. P. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, 60(1), 5-20. <https://doi.org/10.1093/bmb/60.1.5>
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., & Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*, 142(1), 24-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.028>
- Hernández, S. (2006). El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*.
- Intragumtornchai, T., Steiner, R. A., & Finch, C. A. (1988). Iron deficiency: Effect on plasma luteinizing hormone and testosterone levels in the adult male rat. *American Journal of Clinical*

Nutrition, 48(3), 641-644. <https://doi.org/10.1093/ajcn/48.3.641>

- Kong, W. N., Niu, Q. M., Ge, L., Zhang, N., Yan, S. F., Chen, W. Bin, ... Zhao, S. E. (2014). Sex differences in iron status and hepcidin expression in rats. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0051-3>
- Lewis, R. M., Forhead, A. J., Petry, C. J., Ozanne, S. E., & Hales, C. N. (2002). Long-term programming of blood pressure by maternal dietary iron restriction in the rat. *Br J Nutr*, 88(3), 283-290. <https://doi.org/10.1079/BJN2002656rS0007114502001666> [pii]
- Lisle, S. J., Lewis, R. M., Petry, C. J., Ozanne, S. E., Hales, C. N., & Forhead, A. J. (2003). Effect of maternal iron restriction during pregnancy on renal morphology in the adult rat offspring. *British Journal of Nutrition*, 90(1), 33-39. <https://doi.org/10.1079/BJN2003881>
- Loh, S. Y., Giribabu, N., & Salleh, N. (2017). Effects of gonadectomy and testosterone treatment on aquaporin expression in the kidney of normotensive and hypertensive rats. *Experimental Biology and Medicine*, 242(13), 1376-1386. <https://doi.org/10.1177/1535370217703360>
- Low, M. S. Y., & Grigoriadis, G. (2017). Iron deficiency and new insights into therapy. *Medical Journal of Australia*. <https://doi.org/10.5694/mja16.01304>
- Ly, J. P., Onay, T., & Quaggin, S. E. (2011). Mouse models to study kidney development, function and disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(4), 382-390. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328347cd4a>
- Marciniak, A., Patro-Malysza, J., Kimber-Trojnar, Ż., Marciniak, B., Oleszczuk, J., & Leszczyńska-Gorzela, B. (2017). Fetal programming of the metabolic syndrome. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(2), 133-138. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.01.001>
- Martínez-Salgado, H., Casanueva, E., Rivera-Dommarco, J., Viteri, F. E., & Bourges-Rodríguez, H. (2008). La deficiencia de hierro y la anemia en niños mexicanos . Acciones para prevenirlas y corregirlas. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*.
- Miranda, J. O., Ramalho, C., Henriques-Coelho, T., & Areias, J. C. (2017). Fetal programming as a predictor of adult health or disease: the need to reevaluate fetal heart function. *Heart Failure Reviews*, 22(6), 861-877. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9638-z>
- Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W., & Galy, B. (2017). A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.034>
- Murata, N., Yabuki, A., Matsumoto, M., Nishinakagawa, H., & Suzuki, S. (2006). Strain differences in morphometrical characteristics of rat kidneys. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(11), 1185-1189. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.1185>
- Musallam, K. M., & Taher, A. T. (2018). Iron deficiency beyond erythropoiesis: should we be concerned? *Current Medical Research and Opinion*, 34(1), 81-93. <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1394833>
- OMS | Carencia de micronutrientes. (2015). *WHO*. Recuperado de <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/es/>
- Oudar, O., Eiger, M., Bankir, L., Ganten, D., Ganten, U., & Kriz, W. (1991). Differences in rat kidney morphology between males, females and testosterone-treated females. *Kidney and Blood Pressure Research*. <https://doi.org/10.1159/000173392>
- Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., & Devireddy, L. (2012). Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, 51(29), 5705-5724. <https://doi.org/10.1021/bi300752r>

- Parry, R. W. (1973). *Química : fundamentos experimentales*. Reverté.
- Percy, L., Mansour, D., & Fraser, I. (2017). Iron deficiency and iron deficiency anaemia in women. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 40, 55-67. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.09.007>
- Perrone, S., Santacroce, A., Picardi, A., & Buonocore, G. (2016). Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases. *World Journal of Clinical Pediatrics*, 5(2), 172. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v5.i2.172>
- Peters, L. L., Robledo, R. F., Bult, C. J., Churchill, G. A., Paigen, B. J., & Svenson, K. L. (2007). The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nature Reviews Genetics*, 8(1), 58-69. <https://doi.org/10.1038/nrg2025>
- Pfaller, W., Thorwartl, U., Nevinny-Stickel, M., Krall, M., Schober, M., Joannidis, M., & Hobisch, A. (1994). Clinical value of fructose 1,6 biphosphatase in monitoring renal proximal tubular injury. *Kidney international. Supplement*, 47, S68-75. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532742>
- Polin, V., Coriat, R., Perkins, G., Dhooge, M., Abitbol, V., Leblanc, S., ... Chaussade, S. (2013). Iron deficiency: From diagnosis to treatment. *Digestive and Liver Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2013.02.019>
- Rosenquist, J. N., Lehrer, S. F., O'Malley, A. J., Zaslavsky, A. M., Smoller, J. W., & Christakis, N. A. (2015). Cohort of birth modifies the association between FTO genotype and BMI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(2), 354-359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411893111>
- Saint-Faust, M., Boubred, F., & Simeoni, U. (2014). Renal Development and Neonatal Adaptation. *American Journal of Perinatology*, 31(09), 773-780. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361831>
- Salvador Villalpando, MD, PhD, Vanessa de la Cruz, MsC Teresa Shamah-Levy, PhD, Rosario Rebollar, Tec Lab, Alejandra Contreras Manzano, P. (2015). Nutritional status of iron, vitamin B12, folate, retinol and anemia in children 1 to 11 years old. Results of the Ensanut 2012. *Salud Pública de México*, 57(5), 372-384.
- Seppi, T., Prajczner, S., Do rler, M.-M., Eiter, O., Hekl, D., Nevinny-Stickel, M., ... Lechner, J. (2016). Sex Differences in Renal Proximal Tubular Cell Homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(10), 3051-3062. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015080886>
- Sermini, C. G., Acevedo, M. J., & Arredondo, M. (2017). Biomarcadores del metabolismo y nutrición de hierro. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), 690. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.344.3182>
- Sheftel, A. D., Mason, A. B., & Ponka, P. (2012). The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(3), 161-187. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.002>
- Shortliffe, L. M. D., Ye, Y., Behr, B., & Wang, B. (2014). Testosterone changes bladder and kidney structure in juvenile male rats. *Journal of Urology*, 191(6), 1913-1919. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.01.012>
- Sun, M. Y., Woolley, J. C., Blohowiak, S. E., Smith, Z. R., Siddappa, A. M., Magness, R. R., & Kling, P. J. (2016). Dietary-induced gestational iron deficiency inhibits postnatal tissue iron delivery and postpones the cessation of active nephrogenesis in rats. *Reproduction, fertility, and development*. <https://doi.org/10.1071/RD15358>

- Teresa Shamah-Levy, MD, PhD, Fabiola Mejía-Rodríguez, MSc, I. M. G.-H., & Vanessa de la Cruz-Góngora, MSc, Verónica Mundo-Rosas, MSc, Salvador Villalpando-Hernández, MD, P. (2018). Tendencia en la prevalencia de anemia entre mujeres mexicanas en edad reproductiva 2006-2016. Ensanut MC 2016. *Salud Pública de México*, 60(3), 001-308. <https://doi.org/10.21149/8820>
- Thévenod, F., & Wolff, N. A. (2016). Iron transport in the kidney: implications for physiology and cadmium nephrotoxicity. *Metallomics : integrated biometal science*, 8(1), 17-42. <https://doi.org/10.1039/c5mt00215j>
- Veuthey, T., Hoffmann, D., Vaidya, V. S., & Wessling-Resnick, M. (2014). Impaired renal function and development in Belgrade rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 306(3), F333-F343. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00285.2013>
- Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., Buser, A., Frey, B. M., Favrat, B., & Tissot, J.-D. (2014). Physiology of Iron Metabolism. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 41(3), 213-221. <https://doi.org/10.1159/000362888>

X. ANEXOS

	Ajuste de datos no censurados (Chi-Cuadrada)			Prueba de normalidad (Chi-Cuadrada)
	G° de libertad	Media	D. estándar	Valor de P
Peso (g)	1.9573	1.1152	0.288307	0.376604
Área (mm ²)	190.571	192.164	32.4962	0.877442
Longitud(mm)	20.9765	20.0636	1.83975	0.305134
A. Cortex/A. Seccion	1.45463	0.63846	0.049978	0.286327
A. Medula/A. Seccion	1.06728	0.33663	0.0592773	0.549174
N° Glomerulos/A. Cortex	5.66932	4.84349	1.15767	0.286327

Tabla 1. Ajuste de datos censurado y análisis de distribución