

Calidad proteica y timo. Estudio en modelo experimental

Feliu, María Susana *; Slobodianik, Nora H.

*Becaria, Universidad de Buenos Aires.

Laboratorio de Nutrición Experimental. Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Dirección postal: Prof.Dra. Nora H. Slobodianik Lab. Nutrición Experimental. Cátedra de Nutrición. Junín 956- Piso 2do.

(1113) - Buenos Aires - Tel / FAX: 964-8243

RESUMEN: Se estudia el efecto de la administración de dietas aportadoras de harina de maíz (baja calidad proteica) o Caseína (alta calidad proteica) a igual concentración y como única fuente de proteína, al destete, sobre el contenido de DNA -*indicador de proliferación celular*- y la actividad de las enzimas ADA y PNP en timo de ratas bien nutridas. Ratas de la cepa Wistar (6-8 crías por madre) recibieron a partir del destete (22 días de edad) dieta al 6.5% de proteína de maíz (M) o Caseína (Cas) durante 18 días. Como control se utilizó ratas de igual edad que recibieron desde el destete dieta stock de vivero (C). Al finalizar la experiencia se extrajo y pesó el timo, determinándose el contenido de DNA y la actividad de las enzimas ADA y PNP. El contenido de DNA disminuye y la actividad de ADA aumenta en timo tanto por el efecto de la baja calidad como por la baja concentración de la proteína de la dieta, siendo más marcado el efecto provocado por la baja calidad proteica.

Por otra parte, la actividad de PNP muestra aumento sólo por efecto de la baja calidad proteica.

Estos hallazgos junto con investigaciones previas avalan la hipótesis relacionada con la dieta como un factor capaz de modificar el camino del desarrollo celular tímico.

SUMMARY: It is known that the thymus is severely affected by nutritional deficiency. The present paper studies the effect of administration of a low quality and low concentration dietary protein on the DNA content and the activity of Adenosine deaminase (ADA) and Purine Nucleoside Phosphorilase (PNP) - enzymes involved with T lymphocytes- on thymus rats. Weanling Wistar rats (21-23 days old) were fed "ad libitum" diet containing pre-cooked maize flour (M) or Casein (Cas) as the only source of protein (6.5%) during 18 days. Well-nourished group receiving a stock diet was run simultaneously (C). At the end of the experimental period, body weight (Bw) was determined, thymus was removed and its weight was determined (Tw). Cell suspensions were prepared and DNA content (mg/organ), ADA and PNP activities ($\mu\text{mol uric acid/W}$; $W = \text{Tw}(\text{mg}) / \text{Bw}^{0.75}$) were determined.

The results show that low quality dietary protein at weaning provokes the arrest in cellular proliferation with concomitant increase in ADA and PNP activities; this fact would be an alternative mechanism to avoid the accumulation of high levels of deoxynucleotides, which would be toxic for T lymphocytes.

Introducción

La malnutrición, desde el punto de vista fisiológico, es la resultante del desequilibrio producido entre las necesidades específicas de energía y nutrientes indispensables que plantea el organismo, y su aporte a través de los alimentos. Esta distorsión lleva a una capacidad funcional alterada, siendo de vital importancia la depresión de los mecanismos de defensa que conduce a un aumento significativo de la susceptibilidad a la infección (1); es de interés señalar que la inmunodeficiencia provocada por la malnutrición es uno de los factores responsables

del elevado índice de morbomorbilidad infantil(2,3). Estudios post-mortem en niños malnutridos así como aquéllos realizados en modelos experimentales en animales, muestran atrofia de los tejidos linfoides, siendo el timo -*órgano de fundamental importancia en la inmunidad celular*- el más afectado. La atrofia tímica observada, precede al retardo en el crecimiento, así como a las manifestaciones clínicas de la infección. El daño tímico puede ser detectado mediante ecografía del órgano y es necesario dilucidar cuales son los pasos celulares alterados dentro del mismo, que llevan a la depresión de los mecanismos de defensa (1,3,4).

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado en modelo experimental, que desequilibrios nutricionales -subnutrición durante la lactancia, malnutrición severa al destete, así como la administración de dietas aportadoras de proteínas de baja calidad y en baja concentración al destete- provocan alteración en las etapas de diferenciación y maduración evaluadas a través de la caracterización

Este trabajo fue presentado parcialmente en las siguientes reuniones científicas:

-Experimental Biology '97, New Orleans, USA, Abril 1997.

-16th, International Congress of Nutrition, Montreal, Canadá, Agosto 1997.

de las subpoblaciones T (supresora- citotóxica y colaboradora) (5,6).

Por otra parte, algunos investigadores señalan la estrecha interrelación entre el desarrollo y funcionamiento de los linfocitos T con la actividad de Adenosina Deaminasa (ADA) y Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP), enzimas involucradas en el metabolismo de las purinas (7,8).

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la administración de dietas aportadoras de harina de maíz (baja calidad proteica) o caseína (alta calidad proteica) a igual concentración y como única fuente de proteína, al destete, sobre el contenido de DNA -indicador de proliferación celular- y la actividad de las enzimas ADA y PNP en timo de ratas bien nutridas.

Materiales y Métodos

Ratas de la cepa Wistar de colonia cerrada, provenientes del vivero de la Cátedra de Nutrición Experimental de la Facultad de Farmacia y Bioquímica recibieron a partir del destete (22 días de edad) y durante 18 días, dieta isocalórica (4.05 Kcal/g) conteniendo como única fuente proteica harina de maíz (M) o caseína (Cas) en una concentración de 6.5 g de proteína/100g de dieta y completa en todos los otros nutrientes (colina 0.7ml%, Vitaminas Hidrosolubles 0.25%, Minerales 5%, Vitaminas Liposolubles + Aceite 5%) según recomendaciones del American Institute of Nutrition (9).

Para la evaluación de la calidad de las proteínas utilizadas se aplicó el método de la Utilización Proteica Neta (UPN), habiéndose obtenido 79.7 para la caseína y 51.1 para la harina de maíz (10).

Como control se utilizaron ratas de igual edad que recibieron desde el destete dieta stock de biterio (C).

Los animales en experimentación fueron alojados individualmente en jaulas de piso de malla ofreciéndoseles agua y dieta "ad libitum". La temperatura del cuarto se mantuvo entre 18-20°C, mediante equipos de aire acondicionado.

En los lotes experimentales se determinó periódicamente el consumo de dieta; a partir de ese dato se calculó la ingesta calórica y proteica total y completa diarias.

Al finalizar el período experimental los anima-

les se mantuvieron durante 3-4 horas en ayuno, luego fueron pesados y posteriormente sacrificados previa anestesia con éter, extrayéndoseles el timo. En este mismo -luego de pesado- se prepararon suspensiones monodispersas sobre las que se hicieron las determinaciones.

La determinación de DNA (mg/órgano) se realizó por el método de Burton (11). La actividad de ADA y PNP se determinó por el método descrito en un trabajo anterior (12), expresándose los resultados como $\mu\text{mol de ácido úrico} \times 10^{-1} / \text{Peso timo (mg) / Peso corporal}^{0.75} \text{ (g)}$ producidos en 5 minutos.

El análisis estadístico de la información obtenida se realizó utilizando el test "t" de Student (13).

Resultados y Discusión

Los datos de consumo de dieta, proteínas y energía de los lotes experimentales -expresados en g/día, mg/ $P^{0.75}$ /día y kcal/ $P^{0.75}$ /día, respectivamente- se presentan en la tabla 1. Para el cálculo de peso en función de masa metabólicamente activa ($P^{0.75}$) se utilizó el promedio entre el peso al comienzo (Po) y al final del período experimental (Pf).

No hubo diferencias significativas en el consumo de dieta, energía y proteína total entre los lotes experimentales; sin embargo el consumo de proteína completa -calculada como proteína total x valor biológico/ 100 - se encontró significativamente disminuido en M con respecto a Cas ($p < 0.01$).

En la tabla 2 se presentan los resultados correspondientes al contenido de DNA y la actividad de las enzimas ADA y PNP en los lotes M, Cas y C.

Los resultados correspondientes al contenido de DNA en M y Cas son significativamente menores que el de C ($p < 0.01$); es de interés señalar que M presenta valores estadísticamente inferiores a Cas ($p < 0.01$).

Analizando la actividad de las enzimas ADA y PNP, se observan valores significativamente mayores en la actividad de las mismas al comparar el lote M con el lote Cas ($p < 0.01$). Un comportamiento similar en la actividad de ambas enzimas se observa al comparar M con su control de igual edad (C). Al analizar los resultados obtenidos entre Cas y C se halla aumento significativo en la actividad de ADA ($p < 0.01$) y no en la actividad de PNP.

Tabla 1. Consumo de dieta, proteína y energía de los grupos experimentales.

LOTE	CONSUMO DE DIETA (g/día)	ENERGIA Kcal/P ^{0.75} /día	PROTEINA TOTAL mg/P ^{0.75} /día	PROTEINA COMPLETA mg/P ^{0.75} /día
M	6.7 ± 0.7 ^α	1.6 ± 0.1	24.9 ± 2.0	12.7 ± 1.0*
Cas	7.8 ± 0.8	1.6 ± 0.1	25.6 ± 2.0	20.4 ± 1.6

^α X ± DE

*p < 0.01 con respecto a Cas.

Tabla 2. Contenido de DNA y actividad de las enzimas Adenosina Deaminasa(ADA) y Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP) en lotes experimentales y control.

LOTE	ADA@	PNP@	DNA ^
M	30.7 ± 2.0 ^{α#}	7.2 ± 1.2*	2.6 ± 0.5*#
Cas	22.2 ± 4.2*	3.9 ± 0.2	4.0 ± 0.9*
C	9.7 ± 1.5	4.3 ± 1.5	8.5 ± 1.7

^α X ± DE ; 6-8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental

@ μmol de ácido úrico

x 10⁻¹ / Peso timo (mg) / Peso corporal^{0.75} (g) producidos en 5 minutos ^ mg/órgano

*p < 0.01 con respecto a C

p < 0.01 con respecto a Cas

Conclusiones

Estos resultados sugieren que el contenido de DNA y la actividad de ADA en timo de ratas bien nutridas que reciben desde el destete y durante 18 días dietas aportadoras de proteína de distinta calidad, se encuentran afectados tanto por la calidad como por la concentración de la proteína de la dieta, siendo más marcado el efecto provocado por la baja calidad proteica.

La actividad de PNP tímica sólo se ve afectada en los animales que reciben la dieta aportadora de proteína de baja calidad.

El frenado en la proliferación celular evaluada a través del contenido de DNA demuestra la importancia del cuadro de aminoácidos indispensables de la proteína en el desarrollo tímico, hecho que concuerda con resultados de trabajos previos(14).

El aumento en la actividad de las enzimas ADA y PNP de los lotes alimentados a partir del destete con harina de maíz como única fuente proteica,

podría explicarse teniendo en cuenta el desequilibrio de aminoácidos indispensables de la proteína; este desequilibrio pondría en marcha un mecanismo alternativo que tendría a evitar la formación de deoxinucleótidos potencialmente tóxicos para los linfocitos T (8). El efecto sobre la actividad de las enzimas estudiadas es similar al observado al alimentar ratas bien nutridas desde el destete con dieta libre de proteína hasta asemejar cuadros de malnutrición severa, moderada o marginal (15).

El análisis global de estos hallazgos junto con investigaciones previas, avalan la hipótesis relacionada con la dieta como un factor capaz de modificar el camino del desarrollo celular tímico.

Agradecimiento

Los autores agradecen a la Sra. Lía de Calafat la preparación de la dieta experimental. Este trabajo fue parcialmente financiado por la Universidad de Buenos Aires FA-021 y B-077.

Bibliografía

- 1- Chandra RK. 1992. Protein- energy malnutrition and immunological responses. *J Nutr*; **122**:597-600.
- 2- Scrimshaw NS, Taylor CE, Gordon JE. -1968. Interaction of nutrition and infection. World Health Organisation (WHO) Monogr.Ser.; **57**:3-5.
- 3- Watson R.R. - 1984. "Nutrition disease resistance and immune function". Ed.Marcel Dekker Mc, New York; chapter: 1,3.
4. 1989. "Les carences nutritionnelles dans les pays en voie de développement" Karthala-ACCT Eds. Paris; 202-217.
- 5- Slobodianik NH, Pallaro AN, López MC, Roux ME, Río ME. -1989. Effect of short term refeeding on the thymus of growing rats after marginal and severe protein deprivation. *Nutr. Res.* **9** : 921-929.
- 6- Pallaro AN, Slobodianik NH, Roux ME, Río ME.- 1991. Short term feeding period of a low-quality dietary protein on the thymus of weanling rats. *Com. Biol. (Bs.As.)*; **9 (3)** : 227-234.
- 7- Barton R. and Goldschneider I. -1979. Nucleotide-metabolizing enzymes and lymphocyte differentiation. *Molecular & Cellular Biochem*; **28**:135-147.
- 8.- Ma. DDF, Sylwestrowicz T, Janossy G and Hoffbrand AV.- 1983. The role of purine metabolic enzymes and terminal deoxynucleotidyl transferase in intrathymic t-cell differentiation. *Immunol. Today*; **4(3)** : 65-67.
- 9- Report of American Institute of Nutrition Ad Hoc Comitée on Standards for Nutritional Studies. 1977. *J Nutr*; **107**:1340-1342.
- 10- "Aminoacid content of foods and biological data on proteins". Food and agriculture organization of the United Nations(FAO), Rome, 1968.
- 11- Winick M, Noble A.- 1965 Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Develop.Biol.*; **12**, 451-466.
- 12- Feliu MS, Slobodianik N.H. -1994.Activity of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase in wistar rats thymus. *Com.Biol.*; **12(2)** :97-104.
- 13- Schwartz D. -1963." Methods statistiques a l'usage des medecins et des biologistes". De. Medicales Flammarion, Paris.
- 14- Pallaro AN, Río ME, Roux ME, Slobodianik NH. -1997. Amino acid supplementation: its effect on the thymus in growing rats.*J.Nutr.Immunol.*, **5(2)** : 29-37.
- 15- Feliu MS, Slobodianik NH. -1997. Malnutrition and its relationship with the recovery of enzymatic activity in rat thymus. *J Nutr Immunol.* **5(2)**:3-8.