

Subnutrición durante la lactancia: estudio en modelo experimental

Feliu, María Susana; Slobodianik, Nora H.

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

RESUMEN: Se analiza el efecto de la desnutrición precoz a través del contenido de DNA y actividad de las enzimas Adenosina deaminasa (ADA), Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP) y 5' Nucleotidasa (5'NT)-enzimas relacionadas con los linfocitos T-, en timo de rata.

Para estudiar el efecto de la desnutrición precoz se duplicó la camada (14-16 crías por madre), siendo sacrificados los animales en diferentes rangos de edad. Como controles se utilizaron animales bien nutridos durante la lactancia (6-8 crías por madre).

Al finalizar la experiencia, los animales fueron pesados y sacrificados, se les extrajo el timo; se prepararon suspensiones de timocitos, sobre las cuales se determinó el contenido de DNA, la actividad de las enzimas ADA, PNP y 5'NT.

Los resultados demuestran que la desnutrición precoz afecta sólo el peso corporal y del timo, hasta el momento del destete. Al administrar a partir de dicho momento dieta stock, no se observan diferencias en los parámetros estudiados.

Palabras claves: Subnutrición- Timo- DNA- Enzimas tímicas.

SUMMARY: Undernutrition: study in experimental model. Feliu, María Susana; Slobodianik, Nora H. It is known that the thymus is severely affected by nutritional disorders. The present paper studies the effect of undernutrition on the DNA content and the activity of Adenosine deaminase (ADA), Purine Nucleoside Phosphorilase (PNP) and 5'Nucleotidase (5' NT)- enzymes involved with T lymphocytes- on rats thymus. Weanling Wistar rats (14-16 pups per dam) were sacrificed at different ages. Control groups (6-8 pups per dam) were run simultaneously. At the end of the experimental period, body weight was determined, thymus was removed and its weight was determined. Cell suspensions were prepared and DNA content, ADA, PNP and 5' NT activities were determined.

The results show that undernutrition produce at weaning, loss of body and thymus' weight. On the other hand, DNA content and the activity of ADA, PNP and 5'NT were not modified.

Key Words: Undernutrition- Thymus- DNA- Thymic enzymes.

Introducción

Durante los últimos años se han realizado avances significativos en el conocimiento de los aspectos bioquímicos y clínicos que resultan de los desequilibrios nutricionales. La malnutrición es la resultante del desequilibrio producido entre las necesidades específicas de nutrientes indispensables y energía que demanda el organismo, y su provisión por parte 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 (1-5).

Por otra parte, la malnutrición es un síndrome complejo causado por una ingesta inadecuada de energía, proteína, vitaminas y minerales que afectan en forma adversa el funcionamiento del sistema in-

Dirección postal:
Dra. María Susana Feliu
Cátedra de Nutrición,
Junín 956- Piso 2do. 1113 - Buenos Aires
Tel / FAX: 4 964-8243
e- mail: msfeliu@fbyb.uba.ar

mune; la depresión de éste *-humoral, secretorio y celular-* puede ser explicado como consecuencia de la deficiencia de nutrientes indispensables (hierro, Zn, Vit. A, Vit. B12, ácido fólico, piridoxina) o exceso de otras (grasas) sólo o en combinación con malnutrición energético-proteica(6-9).

Por otra parte, el tipo de respuesta y la vulnerabilidad de un tejido a los efectos del desequilibrio nutricional dependen de la velocidad fisiológica de recambio celular. La cinética de proliferación en los órganos linfoides y en particular en *timo*, sugiere que éstos son altamente susceptibles a los efectos de la malnutrición (2,10-12).

Algunos investigadores señalan la estrecha interrelación entre el desarrollo y funcionamiento de los timocitos con Adenosina Deaminasa(ADA), Purina Nucleósido Fosforilasa(PNP) y 5' Nucleotidasa (5'NT); estas enzimas se encuentran involucradas en el metabolismo de las purinas. Estudios en individuos con deficiencia congénita de ADA y PNP mostraron aumento de desoxyATP y desoxyGTP respectivamente; éstos son tóxicos para los timocitos, ya que no son degradados. Estas observaciones demuestran la íntima relación existente entre la actividad de ADA y PNP con el funcionamiento de los linfocitos T(13,14).

Los múltiples desequilibrios nutricionales presentes en niños con malnutrición calórico-proteica así como las infecciones coexistentes, hacen difícil definir los efectos de cada uno sobre el timo. Por este motivo es necesario recurrir a modelos experimentales en animales que permitan fijar una única variable; estos modelos permitirían, además, dilucidar cuales son los procesos intratímicos que llevan a la depresión de la inmunidad celular(10,11). El modelo experimental en rata posibilitaría además, la extrapolación al hombre, pues la atrofia tímica descrita en el humano es similar a la observada en modelos murinos(15,16).

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la subnutrición durante la lactancia a través del contenido de DNA y actividad de las enzimas ADA, PNP y 5'NT en timo de rata.

Materiales y Métodos

En todas las experiencias se utilizaron ratas de la cepa Wistar, de colonia cerrada del bioterio de las

Cátedras de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Se controlaron las condiciones ambientales del bioterio a lo largo de todo el período experimental; la temperatura del cuarto se mantuvo a $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ mediante equipos de aire acondicionado y estufas, se proporcionó un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad mediante interruptor automático y la humedad promedio registrada fue de aproximadamente 65-70%.

Las ratas en experiencia se alojaron individualmente en jaulas de acero galvanizado de piso de malla. El agua y las dietas se administraron "ad libitum".

Para estudiar el efecto de la **subnutrición durante la lactancia** (desnutrición precoz) se duplicó la camada (14-16 crías por madre) (17) que a partir del destete recibieron dieta stock (pellet, Cargill 24.6% de proteína), siendo sacrificados los animales en los siguientes rangos de edad : 11-13 días (S12), 21-23 días (S21), 41-43 días (S42), 60-65 días (S65).

Como **controles bien nutridos** se utilizaron ratas (6-8 crías por madre) que desde el destete recibieron dieta stock y fueron sacrificadas en rangos de edad semejantes (C12, C21, C42, C65).

Al comienzo y al final de cada período experimental, los animales fueron pesados, calculándose el aumento de peso diario, que fue posteriormente expresado como velocidad de ganancia ponderal (VGP)(10).

$$\text{VGP(g/100g rata/día)} = \frac{(\text{Pf}-\text{Pi})\times 100}{\frac{1}{2}(\text{Pi} + \text{Pf})\times \text{día}}$$

Al finalizar cada período experimental los animales se mantuvieron 3-4 horas en ayuno; luego fueron pesados y sacrificados, previa anestesia con éter. Se les extrajo el timo, el que fue pesado expresándose los resultados en mg y en función de masa metabólicamente activa (Peso^{0.75}).

Se prepararon suspensiones celulares mono-dispersas del órgano, trabajándose siempre a 4°C. Para su preparación, las células del timo fueron extraídas mediante el uso de pinzas especiales de cirugía desmenuzando con ellas en forma muy suave el tejido, luego fueron lavadas dos veces en el medio que correspondía para cada determinación.

Se determinó el contenido de DNA por método de Burton, la actividad de las enzimas ADA y PNP

según técnica de Wu & Marliss modificada, la actividad de la enzima 5' Nucleotidasa según técnica de Wiener modificada y el contenido de proteína por método de Kjeldahl (18-21).

Expresión de los resultados

Los resultados de la actividad de ADA y PNP se expresaron como μmol de ácido úrico $\times 10^{-1}/\text{P}$, $[\text{P} = \text{Peso timo (mg)} / \text{Peso corporal}^{0.75} (\text{g})]$ y como μmol de ácido úrico/ mg de proteína de timo, producidos en 5 minutos.

Los resultados de la actividad de 5' NT se expresaron como UI/P , $[\text{P} = \text{Peso timo (mg)} / \text{Peso corporal}^{0.75} (\text{g})]$ y UI/mg de proteína de timo.

Los resultados se expresan como $\text{X} \pm \text{D.E.}$

El análisis de la información obtenida se realizó utilizando test de Student y Análisis de Varianza, considerando significativas las diferencias de medias con un $p < 0.01$ (22).

Resultados y Discusión

a- Evolución del peso corporal, peso del timo y velocidad de ganancia ponderal

La Tabla 1 muestra el peso corporal (g) (Pc), el peso del timo -expresado en mg y $\text{mg}/\text{Pc}(\text{g})^{0.75}$ - y la velocidad de ganancia ponderal (VGP) (g/100g rata/día) entre los 11 y 67 días de vida en lotes con subnutrición durante la lactancia y controles de igual edad.

Tabla 1: Evolución del peso corporal, peso del timo y velocidad de ganancia ponderal en lotes subnutridos durante la lactancia y controles de igual edad

Lote (Edad)	Peso corporal (g)	Peso del timo		Velocidad de Ganancia Ponderal (g/100g rata/día)
		mg	$\text{mg}/\text{Pc}^{0.75}$	
S12	$16.5 \pm 2.7^{\text{a}}$	$71.11 \pm 17.42^{\text{a}}$	$8.29 \pm 2.65^{\text{a}}$	$8.79 \pm 1.60^{\text{a}}$
C12	$23.0 \pm 3.4^{\text{b}}$	$88.43 \pm 27.80^{\text{b}}$	$6.99 \pm 1.79^{\text{b}}$	$13.2 \pm 3.30^{\text{b}}$
S21	$40.1 \pm 7.3^{\text{a}}$	$135.57 \pm 53.83^{\text{a}}$	$8.26 \pm 2.68^{\text{a}}$	8.62 ± 0.61
C21	$52.1 \pm 3.9^{\text{b}}$	$176.94 \pm 46.51^{\text{b}}$	$9.26 \pm 2.47^{\text{b}}$	8.27 ± 1.32
S42	118.9 ± 21.4	335.06 ± 59.30	10.56 ± 2.17	4.78 ± 0.36
C42	126.9 ± 20.5	332.65 ± 54.46	8.85 ± 1.37	4.83 ± 0.50
S65	224.8 ± 57.9	389.60 ± 79.40	7.96 ± 1.57	3.18 ± 0.23
C65	$215. \pm 44.6$	380.79 ± 65.79	7.00 ± 1.26	2.59 ± 0.25

$\text{X} \pm \text{D.E.}$: 6-8 animales por lote.

Las medias que no presentan una letra ^a ^b en común son diferentes a $p < 0.01$.

Se observó disminución estadísticamente significativa en el peso corporal y en el peso del timo de los lotes subnutridos durante la lactancia, cuadro obtenido por duplicación de la camada y descripto por Widdowson (17), con respecto a los controles de igual edad, hasta el momento del destete. A partir de aproximadamente los 42 días de edad no se observan en estos parámetros diferencias significativas entre ambos grupos. Es interesante remarcar que a partir del destete el peso del timo en función de la

masa metabólicamente activa tiene un comportamiento similar al de animales bien nutridos, pero desfasado en un período de tiempo equivalente al período de subnutrición; el timo mostró su involuación normal entre los 40 y 67 días de edad.

La velocidad de ganancia ponderal en el lote subnutrido es estadísticamente menor hasta el momento del destete, momento a partir del cual al recibir dieta stock de bioterio recuperan la velocidad de

crecimiento normal y compensan el retardo generado por la subnutrición durante la lactancia.

b- Contenido de DNA, Número de Núcleos y Tamaño celular en timo

En la tabla 2 se muestran los resultados correspondientes al contenido de DNA (mg/órgano), Número de núcleos (millones) y tamaño celular [Peso del timo (mg)/Número de núcleos (millones)] en timo de los lotes subnutridos durante la lactancia y sus controles de igual edad.

Se observó en los lotes subnutridos aumento en el contenido de DNA y número de núcleos concomitantemente con el aumento de la edad, manteniéndose constante a partir de los 41 días, comportamiento semejante al de los animales controles. El tamaño celular no mostró variaciones durante el período estudiado.

c- Actividad de las enzimas ADA, PNP y 5'NT en timo

En la Tabla 3 se muestran los resultados correspondientes a la actividad de las enzimas ADA, PNP y 5'NT en timo en los lotes subnutridos durante la lactancia y controles de igual edad.

Tabla 2: Contenido de dna, número de núcleos y tamaño celular en timo de lotes subnutridos durante la lactancia

Lote	DNA (mg/órgano)	Número de núcleos (millones)	Tamaño Celular
S12	2.1±0.4 ^a	335.8± 58.9 ^a	0.24±0.07
C12	2.4±0.5 ^a	389.7±78.9 ^a	0.19±0.04
S21	4.3±0.6 ^b	690.0±103.4 ^b	0.27±0.06
C21	5.3±0.9 ^b	857.0±131.1 ^b	0.28±0.09
S42	9.6±2.1 ^c	1540.0±315.6 ^c	0.27±0.04
C42	9.2±1.7 ^c	1484.2±263.6 ^c	0.23±0.02
S65	10.6±4.2 ^c	2201.6±898.0 ^c	0.23±0.05
C65	7.3±1.0 ^c	1181.3±147.5 ^c	0.28±0.01

X = D.E. (6-8 animales por grupo)

Las medias que no presentan una letra ^{a, b, c} en común son diferentes a $p < 0.01$.

Tabla 3: Actividad de ADA, PNP Y 5'NT en timo de lotes subnutridos durante la lactancia y controles de igual edad

Lote (Edad)	ADA (μmol ác. úrico $\times 10^{-1}/P$) (μmol ác. úrico/mg prot.)	PNP (μmol ác. úrico $\times 10^{-1}/P$) (μmol ác. úrico/mg prot.)	5'NT (UI/P) (UI/mg prot.)
S12	5.2 \pm 1.5 ^a	1.9 \pm 0.4 ^a	1.27 \pm 0.23 ^a
(11-13 días)	36.8\pm9.5^c	14.3\pm5.8	8.19\pm2.07
C12	6.5 \pm 1.4 ^a	2.3 \pm 0.5 ^a	1.24 \pm 0.74 ^a
(11-13 días)	36.0\pm6.0^c	13.1\pm3.3	5.66\pm1.44
S21	12.5 \pm 2.7 ^b	2.8 \pm 1.0 ^b	2.53 \pm 0.82 ^a
(21-23 días)	25.9\pm3.6^c	11.6\pm5.2	11.70\pm5.72
C21	13.6 \pm 4.6 ^b	3.4 \pm 1.0 ^b	1.71 \pm 0.67 ^a
(21-23 días)	35.5\pm12.3^c	10.2\pm2.9	6.56\pm2.67
S42	9.2 \pm 2.1 ^b	3.0 \pm 0.9 ^b	3.26 \pm 1.05 ^b
(41-43 días)	12.8\pm3.2^d	5.6\pm0.4	8.48\pm1.11
C42	9.8 \pm 1.5 ^b	4.3 \pm 1.5 ^b	2.58 \pm 0.80 ^b
(39-45 días)	15.4\pm3.8^d	7.4\pm3.0	6.36\pm1.25
S65	11.9 \pm 3.4 ^b	4.5 \pm 1.5 ^b	6.93 \pm 1.73 ^c
(60-65 días)	16.4\pm5.6^d	5.9\pm2.3	8.42\pm2.43
C65	12.8 \pm 1.1 ^b	5.4 \pm 1.7 ^b	8.08 \pm 1.00 ^c
(63-67 días)	14.6\pm1.1^d	6.4\pm1.8	8.72\pm3.34

X \pm D.E.; 6-8 animales por lote; (P= Peso timo/ Pc ⁰⁷⁵)

Las medias que no presentan una letra ^{a, b, c, d} en común son diferentes a p<0.01.

La actividad de ADA y PNP expresada como mmol ác. úrico $\times 10^{-1}/P$ no presentó diferencias significativas a partir del destete (S21); los grupos predestete (S12 y C12) presentaron los menores valores. La actividad de 5' NT en los lotes subnutridos se mantuvo constante hasta aproximadamente los 43 días de edad momento a partir del cual aumentó significativamente ($p < 0.01$), no observándose diferencias con los animales bien nutridos.

La actividad de PNP (mmol ác. úrico/mg proteína) y 5' NT (UI/mg de proteína) en los grupos S y C, se mantuvo constante durante todo el intervalo de vida estudiado. Por otra parte, la actividad de ADA (mmol ác. úrico/mg de proteína) presentó disminución significativa a partir de los 42 días de edad.

Trabajos previos demostraron a lo largo del mismo período experimental, que el porcentaje de la población celular T caracterizada por el anticuerpo

monoclonal W3/13 –marcador de células T totales– se encuentra disminuido como consecuencia de la desnutrición precoz (23).

Conclusiones

De lo expuesto surge que la subnutrición durante la lactancia, -etapa de la vida en que la alimentación desempeña un importante papel para la evolución de la misma (24,25)-afecta hasta el momento del destete sólo el peso corporal y peso del timo; estos hallazgos corroboran observaciones reportadas por otros autores (23,26,27). Al administrar a partir del destete, dieta stock diseñada para cubrir las necesidades de nutrientes indispensables de la rata, no se observan diferencias en el resto de los parámetros estudiados.

Agradecimiento

Los autores agradecen a la Sra. Lia de Calafat la preparación de la dieta experimental. Este trabajo fue parcialmente financiado por la Universidad de Buenos Aires B-003 y Laboratorios Wiener.

Bibliografía

- 1- Scrimshaw, N.S.; SanGiovanni, J.P., 1997. Synergism of nutrition, infection and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr.* **66**:464S-477S.
- 2- Chandra, R.K. , 1997. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr.* **66**:460S-463S.
- 3- Chandra, R.K. , 1999. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr Soc*, **58**:681-683.
- 4- Fraker, P.,2000. Impact of nutritional status on immune integrity. "Nutrition and immunology. Principles and practice". Gershwin M.E., German J.B., Keen C.L. Eds. Human Press Inc, (New Jersey).Cap.12: 147-156.
- 5- Jolly, C.A.; Fernandez, G. ,2000. Protein-energy malnutrition and infectious disease: Sinergistic interactions. "Nutrition and immunology.Principles and practice." Gershwin M.E., German J.B., Keen C.L. Eds. Human Press Inc, (New Jersey) Cap.16: 195-202.
- 6- Miles, E.A.; Calder, P.C., 1998. Modulation of immune function. *Proceedings of the Nutrition Society* **57**: 277-292.
- 7- Shankar, A.H.; Prasad, A.S., 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* **68**: 447-463.
- 8- Prasad, A.S. , 2000. Effects of zinc deficiency on immune functions. *J Trace elements Exp Med* **13**: 1-20.
- 9- Yaqoob, P. , 1998. Monounsaturated fats and immune function. *Proc Nutr Soc* **57**: 511-520.
- 10- Slobodianik, N.H., 1986. Estudio de las interrelaciones entre nutrición y respuesta inmune en modelo experimental, en ratas en crecimiento. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- 11- Pallaro, A.N. ,1997. Efecto de la calidad proteica sobre el timo de rata en período de crecimiento activo. (Tesis doctoral). Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- 12- Prentice, A.M. , 1999. The thymus: a barometer of malnutrition. *Br J Nutr* **81**: 49-51.
- 13- Barton R. and Goldschneider Y. Nucleotide-metabolizing enzymes and lymphocyte differentiation. *Mol Cel Biochem* **28**:135-147, 1979.
- 14- Ma D.D.F., Sylwestrowicz T., Janossy G., Hoffbrand A.V. The role of purine metabolic enzymes and terminal deoxynucleotidyl transferase in intrathymic T-cell differentiation. *Immunol Today* **4**(3): 65-67, 1983.
- 15- Jambon, B.;Zalles, L.; Sevilla, R.; Bustos, M.; Cuellar, E.; Chevallier P; Dhenin, J.M.; Parent, G., 1988. Inmunocompetencia y función hormonal linfodiferenciativa del timo del niño desnutrido. *Rev Chil Nutr* **16**(2): 147.
- 16- Roux, M.E.; Slobodianik, N.H.; López, M.C.; Melton, E.; Pallaro, A.N.; Rio, M.E.; Sanahuja, J.C., 1989. Etude de la cinétique de recuperation du thymus et des plaques de peyer chez des rats carences en proteines au sevrage apres l' administration de caseine. *Journées Scientifiques Internationales du GERM. "Les Carences nutritionnelles dans les pays en voie de developpement."* Eds. Karthala et CCT.(Paris) p.241-250.
- 17- Widdowson, E.M.; Mc Cance, R.A. ,1963. The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat.*Proc Roy Soc B.***158**:329.
- 18- Winick, M.; Noble A., 1966. Cellular responses in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr* **89**: 300-303.
- 19- Wu, G.; Marliss, E.B., 1991. Deficiency of Purine Nucleoside Phosphorylase activity in thymocytes from the immunodeficient diabetic BB rat. *Clin Exp Immunol* **86**:260-265.
- 20- Bergmeyer ,H.U., 1965. "Methods of enzymatic analysis"Academic Press, 2:871.
- 21- Official methods of analysis of the A.O.A.C., 1980. 13th Edition; Washington D.C., USA. Association of Official Analytical Chemists: 14.
- 22- Mendenhall, W.; Wackerly, D.; Sheaffer, R., 1994. Estadística matemática con aplicaciones, 2da. Edición.Grup Editorial Iberoamericana.
- 23- Slobodianik, N.; Pallaro, A.; Fernandez, I.; Roux, M.E.; Rio, M.E., 1991. Malnutrition induced during the suckling period: partial reversion of effects on thymus, after weaning. *Com.Biol. (Bs.As.)* **9**(4): 313.
- 24- Heird, N.C., 1997. Necesidades nutricionales del lactante. "Conocimientos actuales sobre Nutrición", 7ma. Edición-Cap.38 p.423-430.OPS-ILSI, Washigton.
- 25- Young, V.R. , 2000. Protein and aminoacids. "Nutrition and immunology. Principles and practice." Gershwin M.E., German J.B., Keen C.L. Eds. Human Press Inc, New Jersey. Cap.5:49-64.
- 26- Lau, H.C.; Ritchey, S.J., 1977 Effect of energy or protein deprivation and subsequent rehabilitation on protein and DNA content of several organs in rat pups. *J Nutr* **107**: 2091.
- 27- Pallaro, A.N.; Slobodianik, N.H.; Roux, M.E.; Rio, M.E., 1994. Protein undernutrition and cellular thymus development of growing rats. *Com Biol (Bs.As.):* **12**(1): 13-20.