

## EFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS n-3 PUFA SOBRE EL TIMO DE RATAS CON DEPLECION PROTEICA SEVERA

INES FERNANDEZ, MARIA S. FELIU, ANABEL N. PALLARO, NORA H. SLOBODIANIK

*Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*

**Resumen** Se estudia el efecto de la malnutrición proteica severa y la posterior recuperación nutricional sin y con el agregado de (n-3) PUFA, sobre el timo de ratas en período de crecimiento activo. Se determina recuento celular, población T total y actividad de adenosina deaminasa (ADA) y purina nucleósido fosforilasa (PNP). La deprivación proteica severa al destete provoca un frenado en la proliferación y maduración celular del timo junto con el aumento de la actividad de las enzimas ADA y PNP. La administración de la dieta de caseína al 20% durante 9 días, sólo fue suficiente para revertir el efecto observado sobre la actividad de las enzimas estudiadas. La suplementación con 24mg/d de n-3 PUFA permite restablecer la proliferación y la maduración celular tímica.

**Palabras clave:** n-3 PUFA, timo, depleción proteica, recuperación nutricional

La asociación existente entre desnutrición y susceptibilidad a las infecciones puede explicarse como consecuencia de alteraciones funcionales; entre estas alteraciones resulta de vital importancia la depresión de los mecanismos de defensa, depresión que podría deberse a la deficiencia o exceso de nutrientes específicos en combinación o no con malnutrición calórico-proteica<sup>1,2</sup>.

Uno de los campos más estudiados en relación a los ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 es el correspondiente al proceso de la inmunidad celular, existiendo evidencias de su importante papel inmunoregulador. Las investigaciones desarrolladas establecieron la función de estos ácidos grasos en la reducción del proceso inflamatorio, como consecuencia de su incorporación a las células del sistema inmune<sup>3-5</sup>.

El timo y otros tejidos linfoides —caracterizados por una alta velocidad de recambio celular— son severamente afectados por desequilibrios nutricionales; la atrofia tímica, observada en los últimos años mediante ecografía, precede a las

manifestaciones clínicas de infecciones y al retraso en el crecimiento, siendo aún necesario dilucidar cuáles son los pasos celulares alterados dentro del órgano que llevan a la depresión del sistema inmune<sup>6</sup>.

Trabajos previos de nuestro grupo, realizados en ratas en período de crecimiento activo, han demostrado que la malnutrición proteica al destete (severa, moderada, leve) provoca disminución en el tamaño del timo, en el recuento de timocitos y alteración en las etapas de diferenciación y maduración evaluadas a través de la caracterización de las subpoblaciones T<sup>7,8</sup>. Por otra parte, algunos investigadores señalan la estrecha relación entre la actividad de Adenosina Deaminasa (ADA) y Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP) y el desarrollo y funcionamiento de los linfocitos T<sup>9</sup>.

El objetivo de este trabajo preliminar es analizar el efecto de la depleción proteica severa al destete y la posterior realimentación con y sin el agregado de n-3 PUFA, sobre el timo de rata.

Ratas de la Cepa Wistar de colonia cerrada provenientes del Bioterio de la Cátedra de Nutrición, se destetaron a los 22 días y se sometieron a una dieta libre de proteínas hasta la pérdida del 25% de su peso inicial (Po) (cuadro de deficiencia proteica severa). Un grupo fue sacrificado (LP25) y el resto de los animales fue separado

Recibido 2/VIII/1996

Aceptado: 6/XI/1996

Dirección postal: Bioq. Inés Fernandez, Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

en 3 lotes a los cuales se les suministró durante nueve días una dieta de Caseína al 20% con (en cantidades variables) y sin el agregado de un suplemento de aceite de pescado (salmón) de origen comercial como única fuente de n-3 PUFA. El lote 1 recibió 39,3 mg/día (L1), el lote 2 recibió 77,8 mg/día (L2) de aceite, aportando 12 y 24 mg/día de n-3 PUFA respectivamente; el lote 3 recibió sólo Caseína al 20% (L).

Las dietas experimentales fueron isocalóricas y aportaron 4,05 Kcal/g siendo la única variable el contenido proteico (0% y 20%) y completas en todos los otros nutrientes esenciales, según recomendaciones del American Institute of Nutrition<sup>8, 10</sup>.

Como control (C) se utilizaron ratas bien nutridas de igual edad alimentadas desde el destete con dieta Stock (Cargill, 24,7% de Proteínas).

Durante todo el período experimental los animales se expusieron a un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (7,00 AM - 7,00 PM); la temperatura del bioriterio se mantuvo en 21 ± 1°C; el suministro de agua y dieta fue proporcionado «ad libitum». En los lotes L1, L2 y L, se determinó periódicamente el consumo y a partir de ese dato se calculó la ingesta proteica y calórica diaria expresándose los resultados en función de la masa metabólicamente activa ( $P^{0.75} = [(Po + Pf)/2]^{0.75}$ ). Al final de cada período experimental los animales se mantuvieron 3-4 horas en ayuno; luego fueron pesados y sacrificados, previa anestesia con éter, extrayéndoseles el timo; el órgano se colocó en RPMI 1640 o buffer fosfato de potasio y se prepararon suspensiones celulares monodispersas, trabajándose siempre a 4°C y habiéndoselo pesado previamente. Se realizó el recuento celular utilizando la cámara de Newbauer y se determinó la población T total usando el anticuerpo monoclonal W3/13 por la técnica de

inmunofluorescencia indirecta, expresándose los resultados en  $\text{cel} \times 10^7/\text{órgano}^{11}$ .

La actividad de ADA y PNP se determinó por el método descripto en trabajo anterior, expresándose los resultados como  $\mu\text{mol} \times 10^{-1}$  de ácido úrico/Peso timo (mg)/Peso corporal<sup>0.75</sup> (g) producidos en 5 minutos<sup>12</sup>.

La información obtenida fue analizada utilizando el Test de Student<sup>13</sup>.

La administración de dieta libre de proteína provoca en el lote experimental (LP25) aumento estadísticamente significativo, con respecto al control de igual edad, en la actividad de ADA ( $17,5 \pm 2,6$  vs  $9,1 \pm 3,0$ ) y PNP ( $11,5 \pm 4,2$  vs.  $3,9 \pm 1,0$ ); por otra parte, se ha demostrado que el número total de timocitos y el número absoluto de células T W3/13+ se encuentran disminuidos ( $1,8 \pm 0,7$  vs  $48,0 \pm 9,4$ ;  $0,09 \pm 0,05$  vs  $38,9 \pm 0,2$ , respectivamente)<sup>7</sup>.

Luego de la administración de la dieta de recuperación, con o sin agregado de n-3 PUFA, no se observan diferencias en los consumos de dieta, proteína total y de energía entre los grupos estudiados (Tabla 1).

No se observan diferencias significativas en la actividad de ADA y PNP en L al ser comparado con su respectivo control ( $7,4 \pm 2,5$  vs  $9,3 \pm 1,8$ ;  $3,6 \pm 0,6$  vs  $3,9 \pm 0,6$ , respectivamente). Por el contrario, el número total de timocitos y el número absoluto de células T W3/13+ se encuentran disminuidos (Tabla 2). Al suplementar con cantidades variables de n-3 PUFA, sólo el grupo L2 no presenta diferencias significativas con respecto a su control (Tabla 2).

Los hallazgos de este estudio preliminar muestran que el stress nutricional causado por el desequilibrio de nutrientes y específicamente la carencia de proteína en la dieta provoca el incre-

TABLA 1.— Consumo total de dieta, proteína total y energía de los grupos experimentales

Grupo	Consumo de dieta g/día	Proteínas Total g/día	Proteínas Total mg/día/ $P^{0.75}$	Energía kcal/día	Energía kcal/día/ $P^{0.75}$
L	$7,9 \pm 0,7 @$	$1,6 \pm 0,1$	$80,7 \pm 2,2$	$29,9 \pm 2,3$	$1,5 \pm 0,1$
L1	$9,1 \pm 1,6$	$1,8 \pm 0,3$	$87,1 \pm 15,5$	$34,6 \pm 6,0$	$1,7 \pm 0,3$
L2	$8,0 \pm 1,6$	$1,6 \pm 0,3$	$75,9 \pm 10,3$	$30,9 \pm 5,9$	$1,5 \pm 0,2$

@  $\bar{X} \pm \text{DE}$ ; 7-11 ratas por grupo.

TABLA 2.— N° de timocitos y N° absoluto de células T W3/13\*

Grupo	N° de células 10 <sup>-7</sup> /org	N° Absoluto de células 10 <sup>-7</sup> /org #
L	23,7 ± 4,2 @*	13,4 ± 2,1*
L1	20,0 ± 1,6*	10,2 ± 2,2*
L2	43,7 ± 7,3	29,2 ± 0,3
C	36,7 ± 3,8	32,1 ± 3,4

@  $\bar{X} \pm$  DE; 7-11 ratas por grupo.

# fueron leídas entre 400-800 células.

\* (0,00005 < P < 0,0005) con respecto a C.

mento en la actividad de ADA y PNP en el timo. Este aumento podría explicarse como un mecanismo alternativo en la ruta metabólica de las purinas, que evitaría la formación de deoxinucleótidos, productos con potencial acción tóxica sobre los linfocitos T<sup>9, 14</sup>.

La administración oral de dieta de caseína al 20% durante 9 días es capaz de revertir el efecto provocado sobre la actividad de las enzimas ADA y PNP, no siendo suficiente para la total reversión de la proliferación y etapas de maduración celular del timo de ratas con depleción proteica severa al destete. Sólo la administración de dicha dieta durante el mismo período experimental y suplementada con 24 mg/día de ácidos grasos poliinsaturados (n-3 PUFA), es capaz de restablecer totalmente los procesos mencionados, sugiriendo que el efecto de estos nutrientes esenciales es dosis-dependiente. Este hecho podría explicarse como consecuencia de la incorporación de los n-3 PUFA durante la génesis celular en el timo, órgano de rápida velocidad de recambio<sup>3-5, 15</sup>.

**Agradecimientos:** Se agradece a la Sra. Lía C. de Calafat por su asistencia técnica en la elaboración de las dietas. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Universidad de Buenos Aires. (B-021).

## Summary

*Effect of n-3 PUFA polyunsaturated fatty acids on the thymus of rats submitted to severe protein depletion*

Severe protein deprivation at weaning provokes an arrest of cellular proliferation and maturation, and an increase of ADA and PNP activities in the

thymus of growing rats. A 20% casein diet fed during 9 days was enough to reverse the effect on ADA and PNP. The supplementation with 24 mg/d of n-3 PUFA, was able to recover thymus' cellular proliferation and maturation.

## Bibliografía

- Chandra RK. 1990 McCollum award lecture nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 1087-101.
- Chandra RK. Protein-energy malnutrition and immunological responses. *J Nutr* 1992; 122: 597-600.
- Maki PA, Newberne PM. Dietary lipids and immune function. *J Nutr* 1992; 122: 610-4.
- Sanders TAB. Marine oils: metabolic effect and role in human nutrition. *Proc Nutr Soc* 1993; 52: 457-72.
- Gibney MJ, Hunter B. The effect of short and long term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47: 255-9.
- Chevalier P, Sevilla R, Zalles L, Sejas E, Belmonte G, Parent G. Study of thymus and thymocytes in Bolivian preschool children during recovery from severe protein energy malnutrition. *J Nutr Immunol* 1994; 3: 27-39.
- Roux ME, Slobodianik NH, López MC, et al. Les carences nutritionnelles dans les pays en voie de développement. In: Karthala (Ed). Etude de la cinétique de récupération du thymus et des plaques de Peyer, chez des rats carencées en protéines au sevrage après l'administration de caséine. Paris: Acct, 1989; 241-50.
- Slobodianik NH, Pallaro AN, López MC, Roux ME, Río ME. Effect of short term protein refeeding on the thymus of growing rats after marginal and severe protein deficiency. *Nutr Res* 1989; 9: 921-9.
- Ma DDF, Sylwestrowicz T, Janossy G, Hoffbrand AV. The role of purine metabolic enzymes and terminal deoxynucleotidyl transferase in intrathymic T-cell differentiation. *Immunol Today* 1983; 4: 65-7.
- Report of American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr* 1977; 107: 1340-2.
- Roux ME, Río ME, Slobodianik NH, et al. Effect of severe protein deficiency on the expression of surface and intracellular markers of lymphoid organs in growing rats. *Com Biol (Buenos Aires)* 1983; 2: 175-81.
- Feliu MS, Slobodianik NH. Activity of adenosine deaminase and purine nucleoside fosforilase in wistar rats' thymus. *Com Biol (Buenos Aires)* 1994; 12: 97-104.
- Schwartz D. Méthodes statistiques. A l'usage des médecins et des biologistes. Paris. Ed. Médicales Flammarion: 1963.
- Barton R, Goldschneider Y. Nucleotide-metabolizing enzymes and lymphocyte differentiation. *Mol Cell Biochem* 1979; 28: 135-47.
- Hwang D. Essential fatty acids and immune response. *Faseb J* 1989; 3: 2052-61.