

Caracterización de un modelo en ratas, útil en el estudio de las consecuencias nutricionales de la diarrea

Olga Carolina Aristimuño, Anna María Cioccia, Marlén Gutiérrez, Diamela Carías y Patricio Hevia

Laboratorio de Nutrición. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela

RESUMEN. La mortalidad por diarrea ocurre casi en su totalidad en los países subdesarrollados. Esto, se debe fundamentalmente a las malas condiciones sanitarias que los caracterizan. En consecuencia, mientras estas condiciones no cambien, en estos países, el enfoque en el caso de las enfermedades diarreicas, debe concentrarse en el tratamiento. Un aspecto importante del tratamiento de la diarrea infantil es evitar la desnutrición que causa y en consecuencia, la alimentación apropiada durante la diarrea es de vital importancia. De acuerdo con esto, se estudió un modelo de diarrea en ratas que se basa en reemplazar parte del almidón de la dieta por lactosa lo cual permite obtener diarreas de severidad variable, que reproducen los efectos nutricionales de la diarrea infantil. Se estudiaron 5 niveles de reemplazo: 0, 30, 50, 70 y 90% y se realizaron colecciones fecales entre los días 1-3, 4-6, 11-13 y 18-20 del experimento. El reemplazo causó un aumento en la masa fecal que fue proporcional al nivel de sustitución. La masa fecal fue máxima durante la primera semana y disminuyó en las semanas subsiguientes. Se observó una reducción en la digestibilidad aparente de la proteína, grasa, carbohidratos y energía que fue proporcional a la severidad. La diarrea además estuvo asociada con una reducción en el consumo de alimento que en conjunto con la disminución en la absorción causaron un importante déficit de crecimiento. Este modelo reproduce los efectos negativos de la diarrea sobre la nutrición infantil y puede ser servir en la preselección de los alimentos más apropiados para la alimentación durante la diarrea.

Palabras clave: Severidad diarrea, ratas, concentración de lactosa, consumo alimento, crecimiento, absorción macronutrientes y energía.

SUMMARY. *Characterization of a rat model useful for studying the nutritional consequences of diarrhea.* Due to poor sanitary conditions, total global diarrhea mortality occurs almost exclusively in underdeveloped countries. Since, in these countries, sanitation is greatly overlooked, in the case of diarrheal disease, the emphasis must be oriented to treatment rather than prevention. An important aspect in the treatment of diarrheal disease is to avoid the malnutrition it causes and therefore, proper feeding during and after the diarrheal episode is a crucial issue. Accordingly, we studied a diarrhea rat model, based on the replacement of part of the dietary corn starch by lactose which produces diarrhea of increasing severity that reproduces the negative nutritional effects of diarrhea. Five levels of replacement (0, 30, 50, 70 y 90%) were studied and feces were collected on day 1-3, 4-6, 11-13 and 18-20 of the experiment. This resulted in an increment in fecal mass (diarrhea) which was proportional to the replacement level; it reached its maximum during the first week and declined thereafter. During the same period, reductions on the apparent digestibility of the dietary protein, fat, carbohydrates and energy were detected. These reductions were proportional to the severity of diarrhea and occurred in conjunction with a reduction in food intake. These two conditions resulted in a deficient growth which was also proportional to the severity of the lactose induced diarrhea. This model reproduces the negative effects that diarrhea has on infantile nutrition and it may be useful in pre-selecting the most appropriated foods to be tested in human studies. **Key words:** Diarrheal severity, rats, lactose concentration, food intake, growth, macronutrients and energy absorption.

INTRODUCCION

A partir de los años 70, la tasa de mortalidad asociada con la diarrea, empezó a declinar progresivamente y actualmente la mortalidad infantil asociada con este problema gastrointestinal se ha reducido en un 50% a 70%. (1-3). Esta reducción se ha debido esencialmente a la difusión del uso de las soluciones de rehidratación oral (4) y a un cambio notable en el tratamiento nutricional, que reemplazó la popularizada práctica de eliminar la alimentación durante el episodio diarreico por la inclusión de

alimentos hipotónicos (5), inmediatamente después de corregir los desbalances hídricos y electrolíticos.

Sin embargo, a pesar de que las soluciones de rehidratación oral por su demostrada efectividad en corregir los problemas de deshidratación y su fácil administración al paciente diarreico, se consideran como uno de los avances más importantes en la medicina del siglo XX (1,4), su aplicación sólo evita la deshidratación, que es la causante de la mortalidad asociada con la diarrea, pero no afecta las causas que predisponen a la diarrea. Estas causas, de acuerdo con la OMS están relacionadas en aproximadamente un 94% a factores de riesgo ambiental, como son el consumo de agua no potable, así como el saneamiento y la higiene insuficientes (6). Por esta razón, a pesar del descenso en mortalidad, la morbilidad

Financiado por el Grupo de Nutrición y Bioquímica del Decanato de Investigación y Desarrollo de la Universidad Simón Bolívar.

asociada con la diarrea no ha decrecido sustancialmente, (2,3) manteniéndose en promedio en el mundo, entre 2.6 a 3.5 millones de episodios por año, en niños menores de 5 años (2,7).

Las enfermedades diarreicas están estrechamente vinculadas con la desnutrición ya que producen respuestas metabólicas que pueden aumentar los requerimientos de nutrientes en un momento en el que su disponibilidad se encuentra limitada principalmente por una reducción en el consumo de alimentos y una disminución en su absorción y retención. (8-10). Por otra parte, la desnutrición, aumenta la duración de los episodios diarreicos así como la intensidad de los mismos y predispone a que la diarrea aguda evolucione hacia formas de diarrea más difíciles de tratar como es la diarrea persistente (11). Esto ocurre debido a que la desnutrición reduce la capacidad inmunitaria y modifica negativamente la mucosa intestinal con lo que disminuye la capacidad de absorber los nutrientes consumidos, agravando la desnutrición (11). Por esta razón se ha propuesto, que la diarrea y la malnutrición ejercen efectos sinérgicos uno sobre el otro (3, 8,11-13) y que esta sinergia, transforma a la diarrea en la principal causa de desnutrición.

El hecho de que la diarrea cause desnutrición, es importante porque se ha establecido que los niños desnutridos tienen un peor pronóstico para todas las enfermedades infecciosas y al mismo tiempo, se estima que la desnutrición es responsable de la mitad de la mortalidad infantil en el mundo; en consecuencia, es el factor de riesgo más importante de mortalidad infantil (6,14).

Las consideraciones anteriores, señalan por una parte, que mientras no se corrijan las condiciones sanitarias, los episodios de diarrea no van a disminuir. Por otra parte indican, que aunque la utilización de las soluciones de rehidratación oral logran evitar la mortalidad en estos niños, su uso no reduce el riesgo de desnutrición, que es lo que predispone al niño que logró superar los problemas de deshidratación, a una alta mortalidad por enfermedades infecciosas en general (14). Estos argumentos señalan que en las condiciones actuales, el tratamiento del niño con diarrea debe considerar como uno de sus objetivos más importantes evitar la desnutrición. Para ello es fundamental determinar cual es la alimentación más apropiada para este niño tanto durante el episodio diarreico como durante el período de recuperación.

Concientes de esta situación, así como de las dificultades, técnicas, éticas y económicas asociadas con la realización de estudios en niños con diarrea (9), en el Laboratorio de Nutrición de la Universidad Simón Bolívar, se han venido estudiando modelos de diarrea no infecciosa en ratas, útiles para estudiar los efectos negativos que tiene la diarrea sobre la nutrición. De éstos, el uso de lactosa como agente promotor de diarrea en ratas es uno de los que ha tenido más éxito.

La diarrea inducida con lactosa en ratas reproduce muchos de los efectos nutricionales negativos, que provoca la diarrea en

los niños. Así, cuando la lactosa contenida en la dieta, reemplaza aproximadamente la mitad de los carbohidratos dietarios, se logra una diarrea cuya severidad se asemeja a la de una diarrea persistente en niños (9). De acuerdo con esto, la diarrea producida con lactosa en estas condiciones, resulta en reducciones en la absorción de los macronutrientes que fluctúan entre un 20% a 25% tal como ocurre en la diarrea persistente infantil, mientras que en los dos primeros días de un episodio de diarrea aguda esta reducción puede alcanzar a un 40% (9).

En base a lo anterior, el objetivo del presente estudio, fue determinar en ratas con diarrea producida con lactosa si la severidad de la diarrea, así como sus efectos sobre la disponibilidad de los macronutrientes y de la energía dietaria dependían de la concentración de lactosa en la dieta y en consecuencia, si aumentando la concentración de lactosa se podían alcanzar reducciones en la absorción de los macronutrientes dietarios similares a las observadas en la diarrea aguda infantil. Para lograr este objetivo, se prepararon dietas en las cuales se reemplazó el 30%, 50%, 70% y 90% del almidón por lactosa. Estas dietas se les ofrecieron a ratas durante 21 días, con determinaciones de consumo y crecimiento interdiarios y colecciones de heces seriadas que permitieron determinar la severidad de la diarrea así como la disponibilidad de los macronutrientes consumidos a medida que transcurría el tiempo de experimentación.

MATERIALES Y METODOS

Para lograr el objetivo de este estudio, se utilizaron cuarenta ratas machos de la cepa "Sprague Dawley", con un peso comprendido entre 69 y 78 gramos. Luego de tres días de acondicionamiento con una dieta control que cubría todos los requerimientos de la rata (15), estos animales se distribuyeron al azar en cinco grupos de ocho ratas cada uno. El primer grupo se alimentó con dieta control, que contenía 73,7g de almidón de maíz (Pandock CA. Caracas Venezuela) por 100g de dieta (16), mientras que a los cuatro grupos restantes se les ofreció la misma dieta, pero parte del almidón de maíz fue reemplazado por lactosa (a-lactose monohydrate, USP.Harlan-Teklad Madison Wisconsin USA. Catálogo No. 50640), de manera que la proporción de lactosa y almidón en los grupos 2, 3, 4 y 5 fue de (lactosa:almidón) 30:70, 50:50, 70:30 y 90:10 respectivamente.

Los cinco grupos de ratas consumieron las dietas asignadas así como el agua "ad libitum" por un período de 21 días. Se realizaron colecciones de heces y orina de tres días en los periodos comprendidos entre los días 1-3, 4-6, 11-13 y 18-20 del experimento, para determinar la severidad de la diarrea, así como la absorción aparente y neta de la energía, y los macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteína) contenidos en la dieta. Al mismo tiempo se registró el peso corporal y el

consumo de alimento en los diferentes períodos de recolección. Durante todo el experimento, las ratas se mantuvieron individualmente en jaulas metabólicas que permitieron la separación de las heces y la orina. Para facilitar esta separación, a las jaulas se les adaptó una rejilla fina (20 mallas) de acero inoxidable. Estas rejillas se pesaron antes y después de la recolección para la determinación del peso fecal húmedo. Luego, las rejillas con las heces húmedas, se secaron en una estufa a 80°C hasta peso constante para la determinación del peso fecal seco.

Se determinó el contenido proteico (Nx6.25) en las dietas y heces utilizando un método colorimétrico (17). La grasa total se determinó en dietas y heces por el método de Blight y Dyer modificado (18). La energía bruta en dietas, y heces se determinó utilizando un calorímetro adiabático Parr-124. Los carbohidratos en dieta y heces fueron estimados por diferencia como se indica a continuación: A la energía bruta contenida en la dieta y las heces se le restó la energía de las proteínas y las grasas. La energía presente en las proteínas de las dietas o heces se calculó como su contenido de nitrógeno ($g \times 6,25$) y esto se multiplicó por 5,56 Kcal/g que representa el valor calórico bruto de las proteínas. En el caso de las grasas, los gramos de grasa contenidos en las dietas y las heces se multiplicaron por el valor energético bruto de las grasas que es 9,34 Kcal/g. Al restar de la energía bruta total contenida en las dietas o las heces, las energías presentes en las proteínas y grasas de las mismas, queda un remanente que corresponde a la energía presente en los carbohidratos. Dividiendo este remanente energético por la energía bruta de los carbohidratos (4,15 Kcal/g), se obtienen los gramos de carbohidratos presentes en las dietas o las heces.

Absorción aparente. Se calculó aplicando la siguiente fórmula

$$\text{Absorción aparente (\%)} = \frac{\text{Consumo} - \text{Pérdida (heces)} \times 100}{\text{Consumo}}$$

Absorción neta. Se calculó usando la siguiente formula.

$$\text{Absorción neta (g)} = \text{Consumo (g)} - \text{Pérdida en heces (g)}$$

En ambas ecuaciones el consumo y las pérdidas fecales se refieren a los medidos en cada recolección de tres días en cada una de las ratas.

Análisis estadístico

Para la interpretación de los resultados se utilizó el análisis de varianza y para algunas variables se aplicó un análisis de correlación y regresión. En el caso en que las variables eran independientes del tiempo experimental, como las obtenidas al finalizar el experimento se utilizó análisis de varianza de una vía. Sin embargo, en el caso de variables medidas a

diferentes tiempos (Figuras 1-6) se utilizó el análisis de varianza de dos vías. En todos los casos el nivel para significancia estadística se fijó en 5% y cuando hubo efectos significativos se utilizó el método de los rangos múltiples de Duncan para detectar diferencias entre las medias. El análisis se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 12.

RESULTADOS

Consumo y crecimiento

La Tabla 1 muestra el consumo de alimento y lactosa así como el crecimiento acumulado total, observado en las ratas estudiadas durante los 21 días que duró el experimento. La Tabla señala que las ratas que consumieron la dieta en la que el nivel de reemplazo de los carbohidratos dietarios por lactosa fue de 30%, consumieron y crecieron tanto como las ratas asignadas a la dieta sin lactosa. Sin embargo, reemplazos mayores al 30%, estuvieron asociados con una disminución progresiva e importante del consumo y del crecimiento. La Tabla 1 también muestra que en los grupos de ratas que consumieron las dietas con los más altos niveles de reemplazo (70 y 90%) hubo una mortalidad que alcanzó a un 25%. Asimismo, se observa que el consumo neto de lactosa en estos dos grupos fue similar pero el crecimiento fue menor en las ratas con un 90% de reemplazo.

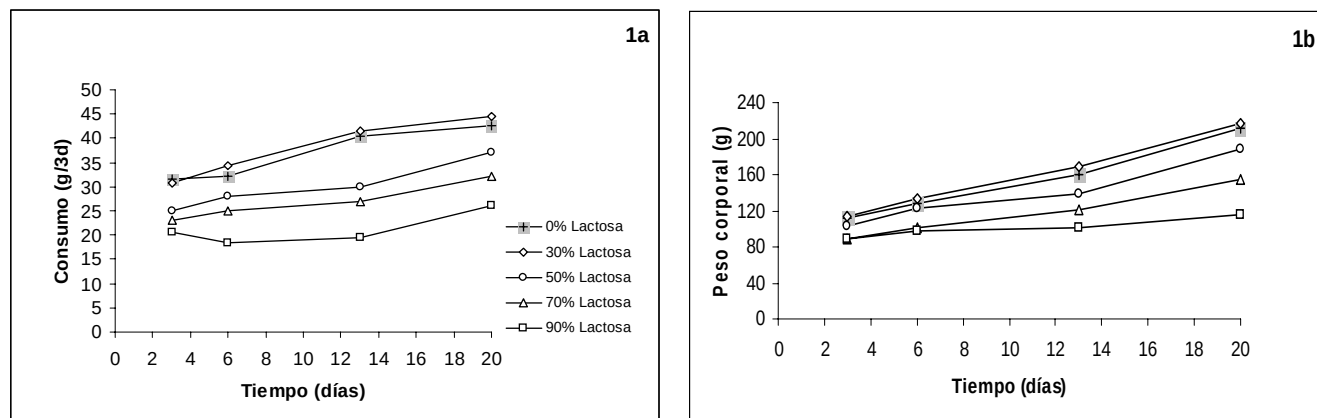
La Figura 1 muestra las variaciones temporales del consumo (1a) y crecimiento (1b) en las ratas estudiadas. Se observa que en las ratas que consumieron las dietas sin lactosa (control) o con un 30% de reemplazo, tanto la ingesta de alimento como el crecimiento no alcanzaron diferencias significativas y aumentan linealmente con el tiempo experimental, mientras que en las ratas asignadas a las dietas con mayores niveles de lactosa, el consumo y el crecimiento fueron menores, y se mantuvieron más o menos constantes hasta el día 13 para luego aumentar ligeramente a partir de ese día. El análisis de varianza mostró un efecto significativo tanto de la lactosa como del tiempo sobre las variables independientes consumo y crecimiento. Esto significa que la inclusión de lactosa en la dieta redujo el consumo y el crecimiento mientras que con el progreso del tiempo experimental, aumentaron ambas variables. Sin embargo, el análisis de varianza, detectó una interacción lactosa-tiempo significativa, indicando que el efecto negativo de la lactosa sobre el consumo y el crecimiento se atenúa progresivamente con el tiempo experimental y eventualmente podría anularse. Esto ocurriría más rápidamente en las ratas asignadas a las dietas con menores niveles de reemplazo. Sin embargo, a pesar de esta tendencia, la Figura 1 muestra que, durante todo el periodo experimental, las ratas asignadas a las dietas con niveles de reemplazo mayores al 30% mantuvieron un déficit importante del consumo y el crecimiento.

TABLA 1
Consumo, crecimiento y mortalidad en ratas que consumieron dietas con concentraciones crecientes de lactosa durante 21 días

	Lactosa dietaria (%) ¹				
	0	30	50	70	90
Peso inicial(g)	75.7±6.1 ^a	77.1±9.4 ^a	73.8±11.0 ^a	70.8±10.1 ^a	76.7±8.4 ^a
Peso final(g)	212.1±12.9 ^a	216.3±35.4 ^a	187.9±29.2 ^b	154.5±20.1 ^{bc}	116.3±23.2 ^c
Crecimiento	136.4±13.1 ^a	139.2±28.3 ^a	114.1±21.0 ^b	83.7±13.3 ^c	39.6±15.8 ^d
Consumo alimento(g)	303.9±23.3 ^a	294.1±45.6 ^a	242.8±31.2 ^b	207.1±25.9 ^{bc}	168.1±22.6 ^c
Consumo lactosa(g)	0	88.2±13.3 ^a	121.4±14.8 ^b	145.0±17.5 ^c	151.3±19.8 ^{cd}
Mortalidad (n)	0	0	0	2	2
Número ratas (n)	8	8	8	6	6

1. Porcentaje de reemplazo de los carbohidratos de la dieta (almidón de maíz) por lactosa. Ver Tabla 1. La tabla muestra la media ± la desviación estándar del número de ratas mostradas en la tabla. Los resultados se analizaron usando ANOVA de una vía. Las medias con letras (superíndices) diferentes son diferentes ($p < 0.05$). La mortalidad detectada en las ratas que consumieron las dietas con 70% y 90% lactosa ocurrió durante la segunda y tercera semana del experimento. Sin embargo, los registros de crecimiento y consumo de estas ratas no se incluyeron en la tabla.

FIGURA 1
Consumo de alimento y peso corporal al final de cada período de recolección en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes del almidón dietario por lactosa



Los símbolos muestran el consumo (1a) y el peso corporal (1b) medidos al finalizar cada una de las cuatro recolecciones fecales de tres días y que terminaron los días 3, 6, 13 y 20. Cada símbolo representa el promedio de 8 ratas a excepción de los grupos asignados a las dietas con 70% y 90% de reemplazo que debido a la mortalidad que produjeron, tenían sólo 6 ratas. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo así como una interacción tiempo x lactosa significativa en ambos casos. La comparación de las medias indicó que los consumos y pesos corporales de las ratas que consumieron la dieta con 30% de reemplazo fueron iguales a los de las que consumieron la dieta sin lactosa mientras que reemplazos mayores resultaron en consumos y pesos corporales progresivamente menores ($p < 0.05$).

Masa fecal y diarrea

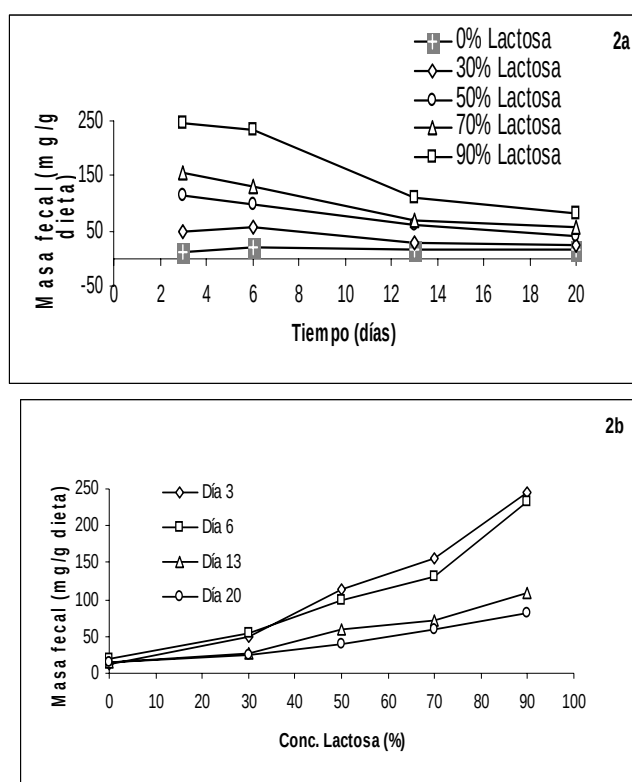
La Figura 2a muestra la masa fecal excretada por las ratas controles (0% Lactosa) y por las ratas que consumieron las dietas con concentraciones crecientes de lactosa, durante los cuatro períodos de recolección fecal realizados durante el experimento. Debido a que la producción fecal depende del consumo de alimento, y que la inclusión de lactosa en la dieta produjo una reducción en el consumo de la misma, la masa fecal se expresó en función de la dieta consumida (mg heces/

g dieta consumida) durante el correspondiente período de recolección. La figura señala que comparadas con las ratas que no consumieron lactosa (0% Lactosa), la cantidad de heces de las que consumieron este disacárido, fueron mayores en todos los períodos de recolección indicando que tenían diarrea. Adicionalmente, la misma figura muestra que la severidad de la diarrea aumentó con el nivel de reemplazo del almidón por lactosa y que en todos los grupos que consumieron las dietas con lactosa, la diarrea disminuyó a medida que aumentaba el

tiempo de exposición a estas dietas. Así, las excreciones fecales medidas, durante los primeros tres días de recolección (días 1,2 y 3 del experimento), en las ratas que consumieron las dietas con 30%, 50%, 70% y 90% de reemplazo del almidón por lactosa fueron acuosas y 4, 9, 13 y 19 veces mayores que la medida en las ratas controles respectivamente. En contraste, durante el último período de recolección (días 18,19 y 20 del experimento), la severidad de la diarrea se redujo, con lo cual, la diferencia entre el grupo control y los experimentales alcanzó a sólo 1.7, 2.7, 4.1 y 5.8 respectivamente.

FIGURA 2

Efecto del tiempo y de la concentración de lactosa sobre la severidad de la diarrea producida por el reemplazo de parte de los carbohidratos dietarios por lactosa



Las Figura 2a y 2b muestran las variaciones en la severidad de la diarrea con el progreso del tiempo y con el nivel de reemplazo respectivamente. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo así como una interacción tiempo x lactosa significativa. La comparación de las medias indicó que con excepción de las recolecciones de las ratas que consumieron la dieta con 30% de reemplazo realizadas durante las semanas 2 y 3 del experimento, las masas fecales de las ratas que consumieron lactosa siempre fue mayor a las de las ratas que no la consumieron (0% lactosa).

La Figura 2b, ilustra mejor el efecto del tiempo sobre la magnitud de la masa fecal medida en las ratas estudiadas. La figura confirma que al aumentar la concentración de lactosa en la dieta aumenta progresivamente la masa fecal excretada durante todos los períodos de recolección fecal. Sin embargo, este aumento fue substancialmente mayor durante la primera semana del experimento (curvas correspondientes a las recolecciones que terminaron los días 3 y 6) que durante la segunda semana (curvas correspondientes a las recolecciones que terminaron los días 13 y 20). Así, durante esta segunda semana, la masa fecal excretada por las ratas asignadas a la dieta con 30% de reemplazo de almidón por lactosa fue similar a las del grupo sin lactosa y las heces de las ratas del grupo con 50% de reemplazo ya no eran acuosas sino pastosas. Este cambio en la consistencia fecal estuvo asociado con un menor contenido de humedad de las heces. Durante este período, se observaron heces acuosas sólo en algunas ratas del grupo con 70% de reemplazo y en la mayoría de las ratas del grupo con 90% de reemplazo. La disminución en la severidad de la diarrea con el tiempo de exposición a las dietas con lactosa se hizo aun más evidente al finalizar la tercera semana del experimento. El análisis estadístico mostró resultados significativos para los dos efectos principales estudiados: lactosa y tiempo experimental así como una interacción entre ellos. Los datos mostrados en la Figura 2, indican que la lactosa dietaria produce una diarrea dosis dependiente cuya severidad disminuye con el tiempo. La interacción lactosa-tiempo indica que el tiempo modifica el efecto de la lactosa de tal manera que si el experimento se prolongara más allá de 20 días, probablemente la lactosa perdería completamente su efectividad en producir diarrea.

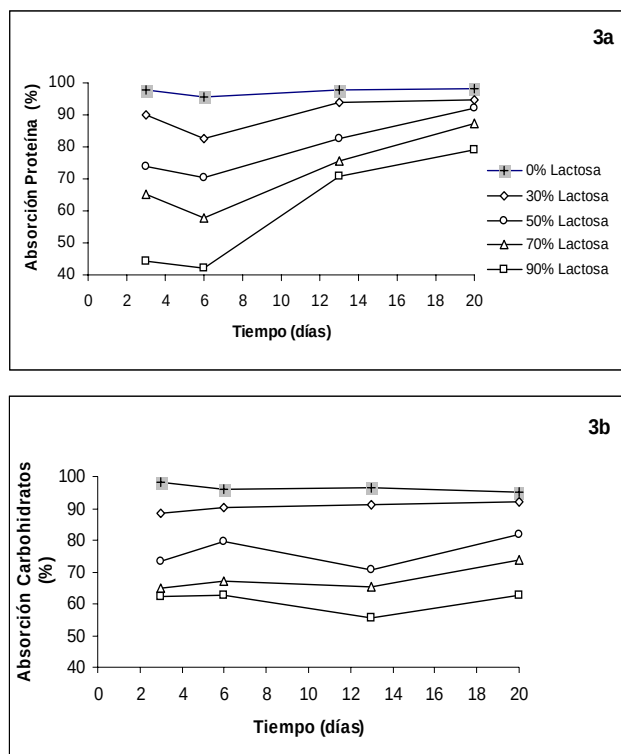
Absorción aparente de los macronutrientes y de la energía de la dieta

La Figura 3a muestra las variaciones en la absorción aparente de la proteína dietaria asociadas con el incremento en el nivel de reemplazo del almidón dietario por lactosa, medida en la primera semana de recolección (días 3 y 6 en el gráfico), así como al finalizar la segunda (día 13) y la tercera semana (día 20) del experimento. El gráfico señala que en general, comparadas con las absorciones medidas en las ratas asignadas a la dieta sin lactosa, las de las ratas que consumieron lactosa fueron menores y que las absorciones más bajas ocurrieron durante la primera semana del experimento y luego aumentaron en las semanas siguientes. Así, en el caso de la absorción de la proteína, se aprecia que en el grupo de ratas asignadas a la dieta con 90% de reemplazo, la absorción aparente del nitrógeno medido durante la primera semana fue de aproximadamente 40% mientras que al finalizar la segunda llegó casi a 70% y superó al 70% durante la tercera semana. El análisis estadístico detectó un efecto significativo para la lactosa y el tiempo y también una interacción significativa

entre estas dos variables. Esto señala, que la lactosa dietaria y la diarrea que causa, provocan una reducción en la absorción aparente de la proteína, que es proporcional al nivel de reemplazo del almidón por lactosa y que esta reducción disminuye con el tiempo. La interacción indica que el tiempo experimental modifica el efecto de la lactosa, de manera que podría eventualmente anularlo, si el experimento se prolongara. Como el principal efecto de la lactosa fue producir diarrea y el del tiempo, disminuir su severidad, las variaciones temporales en la digestibilidad aparente de la proteína detectada en estas ratas, se atribuyen a diferencias en la severidad de la diarrea que experimentaron.

FIGURA 3

Absorción aparente de la proteína y de los carbohidratos dietarios en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes del almidón por lactosa



Las Figuras 3a y 3b muestran las variaciones en la absorción aparente de la proteína y de los carbohidratos dietarios respectivamente. El ANOVA de dos vías en el caso de la proteína mostró efectos significativos para la lactosa, para el tiempo y una interacción lactosa x tiempo significativa. En el caso de los carbohidratos hubo un efecto significativo sólo para la lactosa. La comparación de medias indicó que las absorciones de la proteína o los carbohidratos medidas en las ratas que consumieron la dieta sin lactosa fueron mayores que las de las ratas que consumieron este carbohidrato en todos los períodos de recolección. Para más detalles ver las notas al pie de la Figura 1.

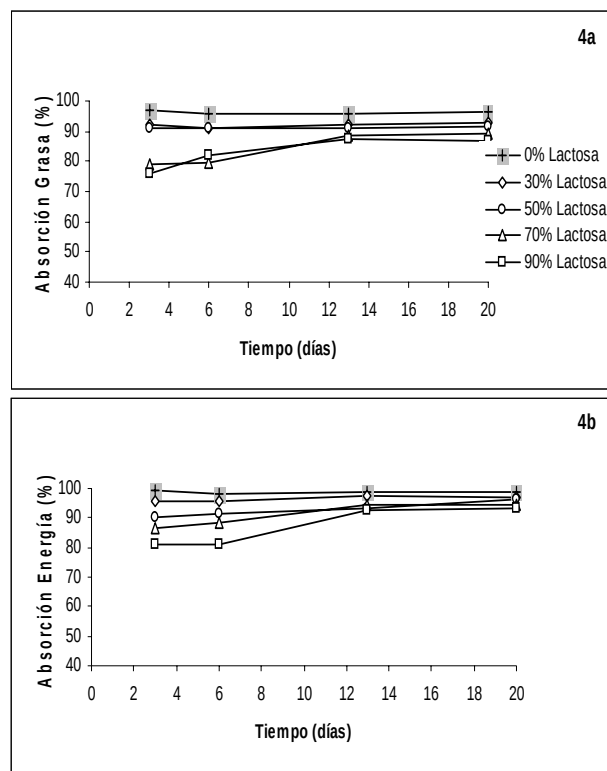
La Figura 3b es similar a la figura 3a, pero muestra la absorción aparente de los carbohidratos dietarios. En este caso, se aprecia que las ratas asignadas a las dietas con lactosa absorbieron menos carbohidratos que las ratas asignadas a la dieta sin lactosa y que esta reducción se incrementó a medida que aumentaba el nivel de reemplazo del almidón por lactosa. La figura también muestra que en contraste con lo que ocurrió con la absorción de la proteína, la absorción de los carbohidratos no mejoró con el tiempo de exposición a las dietas con lactosa. Esto lo demostró el análisis estadístico que detectó un efecto significativo sólo para la lactosa.

La Figura 4a muestra el efecto de incluir concentraciones crecientes de lactosa en la dieta sobre la absorción aparente de la grasa dietaria. Se observa que el reemplazo de almidón por lactosa redujo la absorción de la grasa en todas las ratas estudiadas. Sin embargo, en las ratas asignadas a las dietas con 30% y 50% de reemplazo las reducciones en la absorción de la grasa fueron significativamente menores y se mantuvieron constantes durante todo el experimento. En contraste, en las ratas que consumieron las dietas con 70% y 90% estas reducciones fueron significativamente mayores durante la primera semana del experimento, luego disminuyeron y se estabilizaron sin alcanzar los niveles de absorción observados en las ratas con niveles de reemplazo menores. El análisis estadístico mostró un efecto significativo de la lactosa y del tiempo. Esto indica que la inclusión de lactosa a la dieta redujo la absorción de la grasa mientras que con el progreso del tiempo esta absorción mejoró sólo en los grupos con mayor nivel de reemplazo. En este caso no hubo una interacción significativa, indicando que la mejora en la absorción de la grasa asociada con el tiempo ocurre hasta el día 13 pero no se pueden pronosticar mejoras mayores si se prolonga el experimento ya que las curvas de absorción se hacen paralelas a partir de ese día.

En la a Figura 4b se observan las variaciones en la absorción de la energía presente en la dieta en respuesta a la lactosa y al tiempo experimental. La figura muestra que la inclusión de lactosa en la dieta produjo una reducción, dosis dependiente, en la absorción aparente de la energía que alcanza sus valores máximos durante la primera semana del experimento y que luego se atenúa durante la segunda semana. Además, la figura sugiere que esta reducción podría anularse completamente si el experimento se prolonga. En este caso, el análisis de varianza detectó efectos significativos para la lactosa y el tiempo así como una interacción significativa entre estas variables.

FIGURA 4

Absorción aparente de la grasa y de la energía dietarias en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes del almidón por lactosa



Las Figuras 4a y 4b muestran las variaciones en la absorción aparente de la grasa y de la energía dietarias respectivamente. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo en el caso de la grasa mientras que en el caso de la energía mostró además una interacción lactosa tiempo significativa. La comparación de medias indicó que las absorciones de grasa y energía de las ratas que consumieron lactosa fueron menores que las que no la consumieron durante el período estudiado. Para detalles experimentales ver las notas al pie de las Figuras 1 y 2.

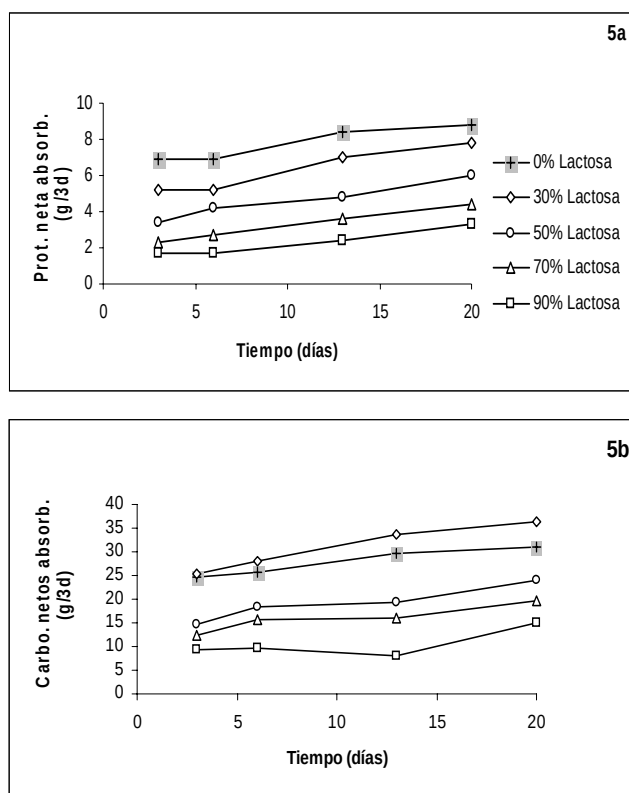
Debido a que las mayores reducciones en la absorción aparente de los macronutrientes coincidieron con los períodos en que la diarrea era más severa, se realizó un estudio de correlación y regresión entre la masa fecal excretada y los resultados de absorción aparente descritos. Este análisis mostró coeficientes de correlación altos y negativos entre estas variables (Coeficientes de correlación entre la absorción aparente de proteína, carbohidratos, grasa y energía vs masa fecal seca fueron -0.98; -0.85; -0.87 y -0.99 respectivamente), indicando que a mayor severidad de la diarrea (mayor masa fecal), menor fue la absorción aparente de los nutrientes consumidos.

Absorción neta

Los resultados de absorción neta de los macronutrientes y de energía se muestran en las Figuras 5 y 6 e indican que las cantidades netas absorbidas para todos estos componentes dietarios disminuyen a medida que aumenta el nivel de reemplazo del almidón por lactosa pero aumenta gradualmente con el tiempo experimental. Esto ocurre porque con el progreso del experimento e independientemente del nivel de reemplazo, las ratas consumieron más alimento, (Figura 1) sus diarreas fueron menos severas (Figura 2) y su eficiencia absorptiva aumentó (Figuras 3 y 4).

FIGURA 5

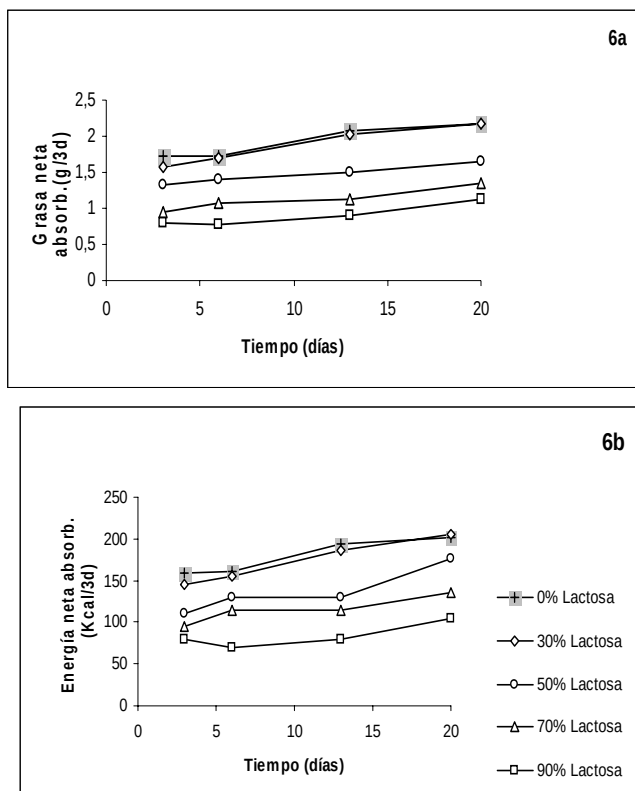
Proteína y carbohidratos netos absorbidos en cada período de recolección fecal en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes del almidón por lactosa



Las Figuras 5a y 5b muestran las variaciones en la proteína y los carbohidratos netos absorbidos respectivamente. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo tanto en el caso de la proteína como de los carbohidratos. La comparación de medias indicó que las absorciones netas de la proteína dietaria de las ratas que consumieron lactosa fueron menores que las que no la consumieron mientras que en el caso de los carbohidratos ocurrió lo mismo pero la absorción neta de las ratas que consumieron la dieta con 30% de reemplazo fue igual o mayor a la medida en las ratas que no consumieron lactosa. Para mayores detalles ver Figuras 1 y 2.

FIGURA 6

Grasa y energía netas absorbidas en cada período de recolección fecal en ratas que consumieron dietas con reemplazos crecientes de almidón por lactosa



Las Figuras 6a y 6b muestran las variaciones en la grasa y la energía netas absorbidas respectivamente. El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos para la lactosa y el tiempo tanto en el caso de la grasa como de la energía. La comparación de medias indicó que con excepción del grupo que consumió la dieta con 30% de reemplazo, las absorciones netas de la grasa y energía dietaria de las ratas que consumieron lactosa fueron menores que las que no la consumieron. Para mayores detalles ver las Figuras 1 y 2.

En las Figuras 5 y 6, también se observa que las cantidades de carbohidratos, grasa y energía absorbidos por las ratas asignadas al grupo con el menor nivel de reemplazo (30%) fue muy similar y en ocasiones mayor a las absorbidas por las ratas que no consumieron lactosa. Sin embargo, cuando los niveles de reemplazo fueron mayores, las absorciones fueron progresivamente menores. El análisis estadístico mostró efectos significativos para el tiempo y la lactosa y la comparación de medias indicó que la proteína neta absorbida por todas las ratas que consumieron lactosa fue menor a la absorbida por las ratas que no la consumieron mientras que en el caso de los carbohidratos, grasa y energía esto se cumplió sólo en las ratas que consumieron las dietas con reemplazos mayores al 30%.

Como la cantidad de macronutrientes absorbidos es un factor determinante en el aumento de peso logrado durante el crecimiento, se calcularon los coeficientes de correlación entre la absorción neta de proteína, carbohidratos, grasa y energía sobre el peso corporal de las ratas estudiadas. Los resultados mostraron coeficientes de correlación altos y positivos (Coeficientes de correlación entre la absorción neta de proteína, carbohidratos, grasa y energía vs peso corporal fueron 0.81; 0.80; 0.82 y 0.86 respectivamente) indicando que, durante el proceso diarreico, las ratas que más absorbieron fueron las que más crecieron.

DISCUSION

Mientras las condiciones sanitarias de los países en desarrollo no sean adecuadamente atendidas, no se puede esperar que la incidencia de diarrea disminuya y en consecuencia, el esfuerzo debe concentrarse en su tratamiento. Además de la rehidratación, que representa la primera línea de acción, otro aspecto crucial del tratamiento es una adecuada alimentación durante el episodio diarreico así como durante la fase de recuperación (19). Por esta razón, el estudio de los alimentos más apropiados para el tratamiento nutricional de la diarrea es especialmente importante en estos países.

Los resultados de este estudio indican que la concentración de lactosa en la dieta determina la severidad de la diarrea obtenida así como sus consecuencias nutricionales. Esto lo demuestra muy claramente la observación de que a niveles de reemplazo de almidón por lactosa del 30%, prácticamente no hubo diarrea, no se afectó el consumo ni la absorción de los macronutrientes dietarios y en consecuencia, se mantuvo un crecimiento similar al observado en las ratas controles. En contraste, niveles mayores de reemplazo produjeron diarreas y reducciones en la absorción y el crecimiento que fueron proporcionales a la concentración de lactosa en la dieta. Asimismo, se observó que la concentración de lactosa en la dieta, fue más importante que la cantidad total de lactosa consumida. Esto encuentra apoyo en la observación de que los grupos con los niveles más altos de reemplazo (70% y 90%) mostraron consumos similares de lactosa, pero la severidad de la diarrea, así como sus consecuencias, fueron más notables en el grupo de ratas que consumieron la dieta con 90% de reemplazo del almidón por lactosa.

Los efectos de diarreas de diferente severidad sobre el consumo y disponibilidad de los nutrientes dietarios observados en este experimento, muestran claramente que tanto la severidad de la diarrea como su duración son factores determinantes en la disminución de crecimiento que produce. Así, a los más altos niveles de reemplazo en que tanto la severidad de la diarrea como su duración fueron mayores, se observaron las reducciones de crecimiento más notables, indicando un mayor grado de desnutrición. Es probable que

la mortalidad observada en estos grupos (70% y 90% de reemplazo) haya estado asociada al menos parcialmente a la desnutrición que causaron.

Un problema nutricional que se presenta durante el episodio diarreico es el déficit tanto en el consumo como en la disponibilidad energética (9). Esto es importante ya que en condiciones en las que el aporte energético es insuficiente, la proteína dietaria no se retiene adecuadamente (20) y sus aminoácidos se oxidan para producir energía, con lo que aumenta la producción de compuestos nitrogenados en la orina (10) y en consecuencia la carga renal. Por esta razón, durante el episodio diarreico es importante mantener un adecuado consumo y disponibilidad de los componentes energéticos de la fórmula (carbohidratos y grasa) y al mismo tiempo mantener la proteína estrictamente dentro de los requerimientos del niño y de la mejor calidad posible para favorecer su incorporación en los tejidos, reduciendo así su conversión a energía.

De acuerdo con lo anterior, en este estudio se determinó la importancia relativa tanto de la disminución del consumo de alimento como de la disminución de la digestibilidad de la energía sobre la energía a la que realmente tuvieron acceso estas ratas y que se describió como energía neta en la figura 6. Concentrándose en las ratas con las diarreas más severas, que fueron las asignadas a los grupos que consumieron las dietas con 70% y 90% de reemplazo, durante la primera recolección fecal, se observa en la figura 1 que consumieron aproximadamente 10g menos que las controles, lo que indica que consumieron unas 40 Kcal menos. Como de la figura 6 se desprende que el déficit en la energía neta a la que tuvieron acceso estas ratas con respecto a las controles fue de aproximadamente 80 Kcal, se puede concluir que del déficit total en la energía neta, aproximadamente la mitad se explica por una reducción en el consumo y la otra mitad fue atribuible a la reducción en la digestibilidad energética. En otras palabras, cuando la diarrea es severa, las ratas experimentan un déficit energético que se produce tanto por una disminución del consumo de alimento como por una disminución en la digestibilidad energética del alimento consumido, y estos dos componentes del déficit, fueron igualmente importantes en magnitud. Esta situación cambia cuando disminuye la severidad de la diarrea ya que como muestra la Figura 4 la digestibilidad de la energía aumenta más rápido que el consumo (Figura 1) a medida que la severidad de la diarrea disminuye. En consecuencia, la importancia de la digestibilidad en el déficit energético se hace cada vez menor.

Comparando los resultados del análisis anterior con los obtenidos en estudios realizados en niños con diarrea aguda (9), se observa que en los niños, durante las primeras 48 hr de hospitalización, la contribución de la disminución del consumo y de la digestibilidad en el déficit energético fue de 80% y 20% respectivamente. Sin embargo, hay que destacar que la mayor importancia del consumo detectada en los estudios con

niños probablemente esté asociada con la eliminación total de la ingesta a la que se somete a los niños durante las primeras horas de hospitalización con el fin de estabilizar su condición hídrica. Como en el presente estudio no se restringió el consumo, se pudo ver con más claridad la importancia relativa del consumo de alimento y la digestibilidad energética en el déficit energético que acompaña a la diarrea sugiriendo que son igualmente importantes. Lo anterior, que por razones éticas no sería posible determinarlo en niños, si se pudo evaluar en este modelo animal e indica, que para minimizar los riesgos de desnutrición durante el episodio diarreico, es tan importante mantener un consumo de adecuado como seleccionar alimentos que aporten nutrientes ricos en energía digestible.

Algo que vale la pena resaltar es que el modelo de diarrea que se propone aquí, es no infeccioso. Sin embargo, como su objetivo es exclusivamente nutricional, esto no es una limitación importante. Esta afirmación se basa en observaciones realizadas en niños con diarrea aguda provocadas por rotavirus así como por otros agentes etiológicos no identificados (21). En ese estudio se observó que las pérdidas de macronutrientes fecales, así como la reducción en la ingesta de fórmula fue igual en ambos grupos indicando que los efectos del agente etiológico no alteran los efectos nutricionales producidos por la diarrea.

Una diferencia entre una diarrea infecciosa y una no infecciosa como la producida en este estudio, es que, en las diarreas infecciosas pueden aumentar los requerimientos energéticos debido a un aumento en la velocidad metabólica asociado al estado febril, que caracteriza a este tipo de diarrea. Esto aumentaría aun más el déficit energético y el riesgo de desnutrición. Sin embargo, ese aumento o factor de stress en el caso de fiebres tratables y moderadas como las que se producen en niños con diarrea, no son tan importante en magnitud (22).

Una característica de la diarrea producida con lactosa y que coincide con la diarrea infantil, es que disminuye con el tiempo tal como se muestra en la Figura 2. Debido a que esta disminución en la severidad de la diarrea ocurre a pesar de que la concentración de la lactosa dietaria no varía, señala que con el tiempo, las ratas se adaptan al consumo de este carbohidrato. En este experimento, la adaptación se observó con todas las concentraciones de lactosa estudiadas, indicando que la concentración de lactosa en la dieta no es una limitación con respecto a este proceso adaptativo.

En conclusión, este estudio muestra que el reemplazo del almidón por lactosa en la dieta de ratas en crecimiento, produce una diarrea no infecciosa, cuya severidad depende del nivel de reemplazo y que reproduce los efectos negativos de la diarrea sobre el estado nutricional. Los resultados muestran que a los más altos niveles de reemplazo se logran reducciones en la digestibilidad de los macronutrientes similares a los medidos en niños hospitalizados con diarrea aguda.

Adicionalmente, muestran que la diarrea se instala muy rápidamente y que las diarreas más severas y las digestibilidades más bajas, se obtienen durante la primera semana de exposición a las dietas con lactosa. Estas observaciones señalan que este es el período ideal para evaluar la digestibilidad de los alimentos durante la diarrea. En contraste, las reducciones de consumo y crecimiento asociadas con el proceso diarreico permanecen por un lapso de tiempo mayor, a pesar que la severidad de la diarrea sea menor, por esta razón, para la estimación de los efectos de la diarrea sobre el crecimiento y la composición corporal el estudio puede prolongarse unas semanas adicionales. También es importante señalar que si se utilizan niveles de reemplazo mayores al 50% puede haber una mortalidad moderada que en este experimento llegó a niveles del 25% y que debe considerarse al momento de planificar estudios orientados a aportar información sobre el tema de la alimentación durante el proceso diarreico o su recuperación. Es posible que en la búsqueda de los alimentos más apropiados para el tratamiento nutricional de la diarrea, la combinación de estudios con animales y humanos, resulte tan exitosa como lo fue en el caso del desarrollo de las soluciones de rehidratación oral (4).

REFERENCIAS

- Duggan C, Fontaine O, Pierce NF, Glass RI, Mahalanabis D, Alam NH, et al. Scientific rationale for a change in the composition of oral rehydration solution. *J Amer Med Assoc* 2004; 291: 2628-2631.
- Keusch GT, Fontaine O, Bhargava A, Boschi-Pinto C, Bhutta ZA, Gotuzzo E. et al. Diarrheal diseases. In : Jamison DT, Brennan JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB et al. Editors. *Disease control priorities in developing countries*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2006. p.371-388.
- Guerrant RL, Oriá RB, Moore SR, Oriá MO, Lima AA. Malnutrition as an enteric infection disease with long-term effects on child development. *Nutr Rev* 2008; 66: 487-505.
- Ruxin JN. Magic bullet: The history of oral rehydration therapy. *Medical History* 1994; 38:363-397.
- Hirschhorn N. Oral rehydration therapy for diarrhea in children. A Basic primer. *Nutr Rev* 1982; 40:97-104.
- Pruss-Ustun A, Corvalan C. Preventing disease through healthy environments. Toward an estimate of the environment burden of disease. Geneva: WHO Press; 2006.
- Kaler SG. Diseases of poverty with high mortality in infants and children. Malaria, mézales, lower respiratory infections and diarrheal illnesses. *Annals New York Academy of Sciences* 2008; 1136: 28-31.
- Brunser O, Espinoza J, Araya M. Estado nutricional y prácticas dietarias en la alimentación del infante como factores de riesgo en las enfermedades diarreicas. *Arch Latinoam Nutr* 1992; 42 2S: 39-41.
- Hevia P, Carías D, Cioccia AM, González E. Diarrea y nutrición. Experiencias en niños y ratas. *An Venez Nutr* 1998; 11(1) 28-36.
- Carías D, Cioccia AM, Hevia P, Romer H, Guerra M, Brito O. Utilización de nutrientes en niños con diarrea aguda alimentados con fórmulas a base de pollo y soya. *Arch Latinoam Nutr* 1999; 49: 130-137.
- Guerrant RL, Schorling JB, Mc Auliffe JF, de Souza MA. Diarrea as a cause and effect of malnutrition: diarrea prevents match-up growth and malnutrition incres diarrea frequency and duration. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47:28-35.
- Mata L. Diarrheal disease as a cause of malnutrition. *Amer J Trop Med Hyg* 1992; 47: 16-27.
- Gracey M. Diarrhea and malnutrition: A challenge for pediatricians. *Journal of Pediatric Gastroenterol and Nutr* 1996; 22: 6-16.
- Pelletier DL, Frongillo EA, Schroeder DG, Habicht JP. The effect of malnutrition on child mortality in developing countries. *Bulletin World Health Organ* 1995; 73: 443-448.
- American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition Ad-Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 1997; 107: 1340-1348.
- Liuzzi JP, Cioccia A, Hevia P. In well-fed young rats, lactose-induced chronic diarrhea reduces the apparent absorption of vitamins A and E and affects preferentially vitamin E status. *J Nutr* 1998; 128:2467-2472.
- Hevia P, Cioccia A. Application of a colorimetric method to the determination of nitrogen in nutritional studies with rats and humans. *Nutr Rep Int* 1988; 38:1129-1136.
- Blight EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-917.
- Centres for Disease Control and Human Services (CDC). Directrices para el tratamiento de la diarrea aguda. 2008. USA Gov. Department of Health and Human Services.
- Pereira, M., Cioccia, A.M., Brito, O. y Hevia, P. (1990). Protein quality evaluation at reduced food intakes. *Italian Journal of Food Science. Special Issue* 264-267. (Proceedings of the Third International Conference on Leaf Protein Research).
- Romer H, Paéz M, Hevia P, Piña JM, Urrestarazu MI, Pérez Schael I. Estudio comparativo de las pérdidas fecales de nitrógeno, lípidos y energía en niños deshidratados con diarrea debida a rotavirus y otros agentes. *GEN* 1989;43:23-27.
- McIntyre J, Hull D. Metabolic rate in febrile infants. *Arch Dis Child* 1996; 74: 206-209.

Recibido: 18-03-2009

Aceptado: 29-06-2009