

Estudio comparativo entre dos fuentes alimentarias aportadoras de ácidos grasos poliinsaturados n-3 y su efecto sobre el timo y el perfil lipídico de ratas

Inés Fernandez, Anabel N. Pallaro y Nora H. Slobodianik

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

RESUMEN. En este trabajo se estudia el efecto que diferentes dietas de recuperación enriquecidas en ácidos grasos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) producen sobre el timo y el perfil lipídico sérico. Ratas Wistar con desnutrición proteica severa al destete (grupo D) fueron divididas en tres grupos que recibieron durante 10 días dieta a base de caseína al 20% suplementada con EPA+DHA (grupo Cas), dieta al 20% de proteína preparada usando una leche en polvo parcialmente descremada enriquecida en ácidos linoleico y linolénico (grupo L) y dieta a base de caseína al 20% (grupo control C). Cas y L aportan cada una 24 mg/día de AGPI n-3 siendo la relación n-6/n-3 de 8.1/1 y 7.6/1, respectivamente. Se extrajo y pesó el timo, determinándose el recuento de timocitos; se extrajo sangre midiéndose en suero: colesterol, triglicéridos, HDL y LDL-colesterol y los ácidos: mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, araquidónico, EPA y DHA. La información se analizó aplicando test de Anova. El recuento de timocitos de Cas (44.48 ± 8.20) y L (56.45 ± 14.72) fue superior ($p < 0.01$) al de los grupos D (1.80 ± 0.70) y C (23.70 ± 4.04). L presentó concentraciones séricas de colesterol, HDL y LDL-colesterol menores ($p < 0.01$) y triglicéridos mayores ($p < 0.05$) que Cas, siendo EPA ($p < 0.05$) y DHA ($p < 0.01$) superiores en Cas. A igual aporte de AGPI n-3, ambas dietas lograron revertir la atrofia tímica presentando un efecto hipolipemiante diferente condicionado a las fuentes de AGPI n-3 utilizadas.

Palabras clave: AGPI n-3, timo, recuperación nutricional, perfil lipídico, EPA, DHA, ácido linolénico.

SUMMARY. Comparative study between two different sources of n-3 polyunsaturated fatty acids and its effect on thymus and lipid profile in rats. In the present paper we analyzed the effect caused by different recovery diets enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA n-3) on thymus and serum lipid pattern. Severe depleted weanling Wistar rats (D) were divided in three groups that received during 10 days a 20% casein diet supplemented with EPA+DHA (group Cas), a 20% protein milk diet prepared using a commercial reduced-fat product enriched with linolenic and linoleic acids (group L) and a 20% casein diet as control group C. Cas and L gave each other 24 mg/day of PUFA n-3 being the ratio n-6/n-3 8.1/1 and 7.6/1, respectively. Thymus was removed and weighted and cell number were determined; blood was recollected and Total cholesterol, triacylglycerol, HDL and LDL-cholesterol fractions and myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, araquidonic, EPA and DHA fatty acid concentrations were measured in serum. Statistical analysis was performed using Anova test. Cell number were higher ($p < 0.01$) in Cas (44.48 ± 8.20) and in L (56.45 ± 14.72) when compared to group D (1.80 ± 0.70) and group C (23.70 ± 4.04). L presented lower values of cholesterol, HDL and LDL-cholesterol ($p < 0.01$) and higher values of triacylglycerol ($p < 0.05$) when compared to Cas, being EPA ($p < 0.05$) and DHA ($p < 0.01$) higher in Cas. Being PUFA n-3 contribution the same in Cas and L, both diets were able to reverse the thymic atrophy presenting a different lipopemic behavior due to the different sources of PUFA n-3 used in the diets.

Key words: PUFA n-3, thymus, nutritional recovery, lipid profile, EPA, DHA, linoleic acid.

INTRODUCCION

La malnutrición proteica severa al destete interfiere con el adecuado desarrollo y funcionamiento de las células del sistema inmune, aumentando el riesgo y la severidad de las infecciones (1-3). Así, el tejido linfoide y en especial el timo, es uno de los órganos más comprometidos experimentando cambios en su tamaño y peso y alteraciones en su diferenciación córticomédular.

Este órgano es considerado como un verdadero barómetro de la malnutrición comprobándose que la atrofia que experimenta en el humano, es similar a la observada en modelos murinos. De esta manera, la utilización del modelo experimental en rata, nos permitirá posteriormente extrapolar la información obtenida al hombre (3).

Trabajos previos en ratas en período de crecimiento activo, alimentadas desde el destete con dietas carentes de proteínas mostraron un frenado en la proliferación, retraso importante en la maduración y alteración en la diferenciación celular del timo, evaluado a partir de una disminución en el recuento celular y en el número absoluto de células CD5+, marcador

* Estudio financiado por la Universidad de Buenos Aires (B-060 y B-120).

de la población celular T total. Se ha demostrado que la administración oral de una dieta de recuperación al 20% de caseína durante 10 días suplementada con 24 mg/día de ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) logró revertir dicho efecto, hecho no observado al administrarse solamente la dieta de recuperación con caseína al 20% (4-8).

En la dieta humana, el ácido graso saturado más característico es el palmítico, seguido por el ácido esteárico y el ácido mirístico. En dietas mixtas, el ácido mirístico y el ácido palmítico representan juntos el 50-60% de todos los ácidos grasos saturados consumidos y son considerados además responsables del aumento en los niveles séricos del colesterol total y de la fracción LDL-colesterol, incrementando el riesgo coronario, a diferencia de los ácidos grasos poliinsaturados (9,10).

Algunos estudios han demostrado que la capacidad que el ácido esteárico posee para elevar las concentraciones séricas de colesterol total y la fracción LDL-colesterol, es mucho menor a la que presentan los ácidos mirístico y palmítico, pero más cercana a la del ácido oleico, componente habitual de la dieta del mediterráneo. Por otra parte, el ácido oleico es responsable de elevar los niveles de HDL-colesterol en una forma comparable a las grasas insaturadas pero no así al ácido esteárico (9,10).

Los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (AGPI n-3) son conocidos por su capacidad de prevenir la enfermedad coronaria a través de diferentes acciones: son antiarrítmicos, poseen propiedades antiinflamatorias, inhiben la síntesis de citocinas y mitógenos, son antitrombóticos, tienen propiedades hipolipemiantes e inhiben la aterosclerosis (11,12).

Los aceites de pescado, ricos en AGPI n-3, reducen la absorción de colesterol tanto en humanos como en monos y disminuye la concentración de colesterol y triglicéridos (TG) a través de la inhibición de la síntesis de TG y VLDL en el hígado (11). Estos hallazgos podrían ser explicados por diferentes mecanismos: a) una reducción en la disponibilidad de ácidos grasos libres lo cual contribuye a una menor síntesis de TG; b) un incremento en la oxidación de los ácidos grasos a través de los peroxisomas; c) una inhibición de la enzima diacilglicerol-aciltransferasa (13-22).

Otros reportes sugieren que bajos niveles séricos de VLDL son el resultado del incremento en el aclaramiento (clearance) de esta lipoproteína, debido a la elevada actividad de la enzima lipoprotein lipasa, sin embargo, algunas publicaciones remarcan que esta enzima no se encontraría afectada en los humanos como consecuencia del consumo de aceite de pescado (22).

El efecto de los aceites de pescado sobre el metabolismo de la LDL-colesterol y HDL-colesterol es controversial. Algunos autores afirman que los niveles de LDL-colesterol se incrementan en respuesta a la disminución que las concentraciones de VLDL y TG experimentan ante la ingesta de pescado. Sin embargo, otros han reportado que la síntesis

de LDL-colesterol y sus niveles plasmáticos se reducen después de la administración de altas concentraciones de EPA y DHA (11,19,23).

El efecto sobre el metabolismo de la HDL-colesterol depende de la enzima llamada proteína transportadora de colesterol esterificado (CEPT), encargada de transferir ésteres de colesterol desde la HDL-colesterol a la VLDL y LDL-colesterol. Muchos reportes describen un comportamiento favorable de los AGPI n-3 sobre la HDL-colesterol. Sin embargo, otros trabajos afirman que ingestas elevadas de pescado o su aceite pueden disminuir las concentraciones de HDL-colesterol (20,22). Podemos concluir que las diferencias observadas dependerán de la cantidad de aceite de pescado administrada como suplemento, de la duración del período de administración así como de la fuente de ácidos grasos utilizada (24,25).

Actualmente, muchos trabajos sugieren que la dieta más adecuada para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular debería ser aquella con bajos niveles de ácidos grasos saturados y altas concentraciones de EPA y DHA provenientes del pescado o de sus aceites (10,11,26,27).

La existencia en el mercado de una leche comercial en polvo parcialmente descremada y modificada en el perfil de sus ácidos grasos poliinsaturados por el agregado de aceite de maíz y canola, como fuente de ácido linoleico y linolénico, motivó la realización del siguiente estudio destinado a evaluar: a) la posibilidad de que una dieta preparada a partir de esta leche comercial con estas características logre la recuperación nutricional a nivel del timo b) comparar el efecto final que ambas dietas (caseína al 20% suplementada con 24 mg/día de EPA + DHA y la leche comercial enriquecida en ácidos linoleico y linolénico) provocan sobre el perfil lipídico y de ácidos grasos séricos (7,8,28).

MATERIALES Y METODOS

Animales

Ratas Wistar, (6-8 por grupo), provenientes del Bioterio de la Cátedra de Nutrición de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires), se destetaron a los 21-23 días de edad (35-45 gramos).

Las ratas fueron alimentadas desde el nacimiento con dieta libre de proteína hasta la pérdida del 25% del peso corporal inicial (aproximadamente 10 días), provocando así un cuadro de malnutrición proteica severo (grupo D). Seguidamente, los animales fueron divididos en tres grupos que recibieron durante 10 días dieta de caseína al 20% suplementada con EPA + DHA (grupo Cas), dieta al 20% de proteína preparada a partir de una leche comercial en polvo parcialmente descremada y modificada en el patrón de ácidos grasos (grupo L) y dieta a base de caseína al 20% (grupo control C).

Los animales fueron alojados en jaulas individuales en forma

vertical para independizar el consumo de alimento de la influencia de la temperatura a las diferentes alturas de las jaulas. Durante el experimento los animales fueron expuestos a un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (7.00 AM – 7.00 PM), la temperatura de la habitación fue de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y la humedad relativa registrada fue de aproximadamente 65-70%.

El protocolo de trabajo fue aprobado por la Universidad de Buenos Aires (B060-B120) y todos los procedimientos siguen las normas internacionales y de la Cátedra de Nutrición para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Dietas experimentales

a) Preparación y composición

La composición de cada una de las dietas experimentales se presenta en la Tabla 1 expresando las cantidades en gramos por kilo de dieta.

La dieta libre de proteínas (D) que recibieron los animales al destete y que fue utilizada para provocar el cuadro de malnutrición proteica severo, es completa en todos los nutrientes con excepción de la proteína la cual fue reemplazada por dextrina (Tabla 1).

TABLA 1
Composición de las dietas experimentales

Componentes	D (g / kg)	Cas (g / kg)	L (g / kg)	C (g / kg)
Proteína	—	238.4 ¹	655.7 ²	238.4 ¹
Lípidos	70.0 ³	70.0 ³	94.5 ²	70.0 ³
Vitaminas totales ⁴	10.0	10.0	10.0	10.0
Minerales ⁴	35.0	35.0	35.0	35.0
Cloruro de Colina ⁵	7.1	7.1	7.1	7.1
Dextrina	877.9	639.5	292.2	639.5
Energía metabolizable (kcal/kg)	4141.6	3988.0	3996.2	3988.0
Concentración Proteica (g/kg)	—	200.0	200.0	200.0
Acidos grasos poliinsaturados n-3		24 mg/día ⁶	24 mg/día ⁷	—
Relación n-6 / n-3		8.1/1	7.6/1	>>>10/1

¹ Caseinato de calcio.

² Aportado por la leche en polvo.

³ Aceite de Maíz (Molinos Río de La Plata, Buenos Aires, Argentina).

⁴ Recomendaciones AIN 93 para vitaminas y minerales para ratas en crecimiento.

⁵ 7.1 mililitros de cloruro de colina aportan 1.5 gramos de colina.

⁶ Aportados por el Regulip® como EPA + DHA.

⁷ Aportados por la leche en polvo como ácido linoléico.

mg (miligramos), g (gramos), kg (kilogramos), Kcal (kilocalorías).

La dieta experimental que recibió el grupo Cas se preparó a base de caseína al 20 % suplementada con 24 mg/día de EPA + DHA (Tabla 1). La fuente de ácidos grasos utilizada como suplemento, es un producto de origen comercial REGULIP® (Laboratorios Raffo). Este se presenta en cápsulas

de 1 gramo de concentrado de salmón marino, con no menos de un 30% de AGPI n-3 (según rótulo comercial EPA=17% y DHA =13%) (Tabla 2).

TABLA 2
Composición en ácidos grasos del aceite de salmón expresado como porcentaje de ácidos grasos totales¹

Acidos grasos	Regulip® %
Mirístico	7.46
Palmítico	16.25
Estearico	4.10
Oléico	13.05
Linoleico	1.67
Linolénico	0.69
Araquidónico	1.15
Eicosapentaenoico	17.14
Docosahexaenoico	12.21

¹ Determinado por cromatografía gaseosa (Laboratorio Proanálisis).

La cantidad de aceite incorporada en este trabajo por día por animal, se basó en experiencias previas realizadas en ratas adultas (29). Esa cantidad, 100 µl de aceite de salmón, fue dispensada con pipeta automática y corresponde en promedio a 77.8 mg de aceite que equivale a 24 mg de EPA + DHA. La incorporación del suplemento a la dieta, se realizó en el momento de ofertar el recipiente de comida al animal, para evitar el posible deterioro del aceite.

La dieta experimental que recibió el grupo L se preparó al 20% de proteína utilizando como fuente la leche comercial en polvo parcialmente descremada y modificada en el patrón de ácidos grasos. Esta leche utiliza aceite de maíz y de canola como fuentes de ácido linoleico y linoléico y contiene un 14.4% de materia grasa distribuida de la siguiente manera: 4.6% ácidos grasos saturados, 3.7 % de ácidos grasos poliinsaturados (n-6 = 3.25% y n-3 = 0.43%), correspondiendo el resto a ácidos grasos monoinsaturados. En consecuencia, la dieta así preparada presentó un aporte de AGPI n-3 similar de 24 mg/día, siendo la relación n-6/n-3 de 7.6/1 mientras que la dieta Cas posee un valor comparable de 8.1/1.

Como la fuente láctea aporta una cantidad de grasa y proteína según rótulo comercial de 14.4 y 30.5 gramos cada 100 g de leche en polvo, respectivamente, al preparar la dieta al 20% de proteína, la concentración final de grasa en la misma fue de 9.45 gramos de lípidos cada 100 gramos de dieta.

La dieta experimental que recibió el grupo control C se preparó al 20% de proteína utilizando como fuente caseína.

Las dietas experimentales fueron isocalóricas y completas en todos los nutrientes indispensables de acuerdo a las recomendaciones del American Institute of Nutrition de 1993

(AIN 93) (30). El diseño de las dietas experimentales y el tiempo de administración de las mismas, fue fijado en base a experiencias previas, es por ello que en lugar de utilizar aceite de soja se utilizó aceite de maíz como fuente de lípidos para diseñar las dietas de los grupos D, Cas y C (5,31). Recordemos que tal como se mencionó previamente, en la dieta del grupo L la fuente de lípidos es aportada directamente por la leche en polvo.

b) Formas de alimentación

El agua y las dietas fueron administradas “ad libitum”, forma de alimentación utilizada comúnmente en Nutrición Experimental; se ofrece a los animales una cantidad de dieta superior a la que pueden consumir y se determina la ingesta voluntaria después de un lapso determinado, por pesada remanente.

En todos los lotes experimentales, se determinó periódicamente el consumo de dieta y a partir de ese dato se calculó la ingesta de proteínas, energía y lípidos diarias, expresándose los resultados en función de la masa metabólicamente activa: mg de proteína/peso^{0.75}/día y Kcal/Peso^{0.75}/día, respectivamente. Para el cálculo de Peso se utilizó el promedio entre el peso al inicio (Po) y al final del período experimental (Pf) $\{ \text{Peso}^{0.75} = [(\text{Po} + \text{Pf}) / 2]^{0.75} \}$.

Análisis bioquímicos

Al finalizar el período experimental y luego de ayuno pertinente los animales fueron pesados y sacrificados utilizando cámara de dióxido de carbono. Se procedió entonces a la extracción del timo y a la recolección de sangre por punción venosa para la obtención de suero.

a) Determinaciones en timo

Los timos extraídos fueron pesados y procesados individualmente para la realización del recuento de timocitos. Para ello fueron colocados en una solución constituida por medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) y suero bovino fetal al 10%. Se prepararon suspensiones celulares monodispersas, trabajándose siempre a 4°C. El recuento celular se realizó utilizando la cámara de Neubauer, verificándose la viabilidad celular con una solución salina de azul trypan al 0.05%. Los resultados se expresaron en células $\times 10^{-7}$ / peso total del timo en miligramos (5).

b) Determinaciones en suero

i) Perfil de lípidos séricos: Las concentraciones de colesterol total (CT), triglicéridos (TG) y HDL-colesterol se midieron por métodos enzimáticos usando Reactivos Wiener

(Enzymatic Cholestat AA, Color Triacylglycerols GPO/PAP AA and Monofase Cholesterol HDL AA) en un equipo automatizado Alcyon / ISE Fase 0, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La fracción de LDL-colesterol se determinó utilizando la ecuación de Friedewald (32):

$$\text{LDL-colesterol} = \text{colesterol total} - (\text{triglicéridos}/5 + \text{HDL colesterol})$$

Los resultados se expresaron en mmol/L.

ii) Perfil de Ácidos Grasos: la fracción lipídica se extrajo en hexano y se trató con una mezcla metanol:sulfúrico para obtener los metil-ésteres de los ácidos grasos. Los extractos obtenidos se inyectaron en la columna cromatográfica y los ácidos grasos se identificaron de acuerdo a sus tiempos de retención (mirístico=5.30, palmítico=7.48, esteárico=10.99, oleico=11.55, linoleico=12.78, linolénico=14.78, araquidónico=18.78, EPA=19.79, DHA=23.98). El equipo utilizado fue un cromatógrafo gaseosos (Modelo 3398A GC; Hewlett Packard Co). Los resultados obtenidos fueron expresados en porcentajes de ácidos grasos totales, tomándose como límite de cuantificación un valor de 0.1% (33,34).

Análisis estadístico de los resultados

El análisis de la información se realizó utilizando el programa estadístico Instat aplicando: análisis de varianza (Anova) seguido por el “test” de las múltiples comparaciones de Student-Newman-Keuls. (35,36).

RESULTADOS

Ingesta de alimentos

Cabe destacar que los animales no rechazaron ninguna de las dietas experimentales, siendo el consumo diario de las mismas estadísticamente similar. Igual comportamiento se observó al analizar el consumo de proteína y energía en sus dos formas de expresión. Cas y L presentan un consumo de lípidos estadísticamente superior a C cuando los resultados se expresan en función de masa metabólicamente activa, sin que se modifique el consumo total de energía por día (Tabla 3).

Peso corporal, peso del timo y recuento celular

En la Tabla 4 se presentan los datos correspondientes a peso corporal, peso del timo y número total de timocitos de los lotes experimentales.

El peso corporal en gramos y el peso del timo, expresado en miligramos o en función de masa metabólicamente activa de los grupos Cas, L y C fueron mayores que los del grupo D, no siendo estadísticamente diferentes entre si. Sin embargo, no alcanzaron los valores correspondientes a un grupo bien nutrido de igual edad alimentado con pellet, citados en trabajos previos (Peso corporal en gramos = 119.40 ± 13.44 , Peso del timo en miligramos = 336.69 ± 67.31) (8).

El número total de timocitos de los grupos Cas, L y C fue significativamente mayor que el correspondiente al grupo D. Los valores obtenidos para los grupos Cas y L fueron mayores que los determinados en el grupo C y diferentes entre si (Tabla 4).

TABLA 3
Consumo de dieta, proteína, energía y lípidos de los grupos experimentales *

Lote	Consumo		Proteína		Energía		Lípidos	
	g/día		g/día	mg/P ^{0.75} /día	kcal/día	kcal/P ^{0.75} /día	kcal/día	kcal/P ^{0.75} /día
Cas	7.67	1.46	1.53 ± 0.29	75.94 ± 10.33	30.93 ± 5.94	1.61 ± 0.17	5.53 ± 0.92 ^a	0.30 ± 0.03 ^b
L	7.80 ± 0.49		1.56 ± 0.10	73.36 ± 5.34	31.22 ± 1.94	1.47 ± 0.11	6.64 ± 0.41	0.31 ± 0.02 ^b
C	8.69 ± 1.52		1.74 ± 0.30	79.32 ± 3.53	34.76 ± 6.06	1.53 ± 0.07	5.47 ± 0.95 ^a	0.25 ± 0.01

* Media ± desviación estándar (6-8 ratas por lote). Prueba estadística Student-Newman-Keuls.

^a p<0.05 con respecto a L. ^b p<0.01 con respecto a C.

g (gramos), mg (miligramos), Kcal (kilocalorías), P^{0.75} (masa metabólicamente activa).

TABLA 4
Peso corporal, peso del timo y número total de timocitos de los lotes experimentales y control bien nutrido *

Lote	Peso corporal	Peso del timo		Número total de timocitos ¹
	g	mg	mg / P ^{0.75}	células.10 ⁻⁷ /timo
D (31-33 días)	28.90 ± 3.70	34.50 ± 24.70	2.80 ± 2.10	1.80 ± 0.70
Cas (41-43 días)	74.50 ± 7.29 ^a	265.03 ± 47.48 ^a	9.60 ± 2.64 ^a	44.48 ± 8.20 ^{abc}
L (41-43 días)	83.68 ± 8.85 ^a	238.11 ± 56.32 ^a	9.24 ± 1.70 ^a	56.45 ± 14.72 ^{ab}
C (41-43 días)	70.88 ± 7.48 ^a	226.92 ± 65.71 ^a	9.23 ± 2.16 ^a	23.70 ± 4.04 ^a

* Media ± desviación estándar (6-8 ratas por lote). Prueba estadística Student-Newman-Keuls.

¹ Fueron leídas 400-800 células. ^a p<0.01 con respecto a D.

^b p<0.01 con respecto a C. ^c p<0.05 con respecto de L.

g (gramos), mg (miligramos), P^{0.75} (masa metabólicamente activa).

Perfil lipídico

El grupo experimental de ratas alimentado con la dieta L presenta valores de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol menores (p<0.01) y de TG mayores (p<0.05) cuando se lo compara con Cas (Tabla 5).

La concentración de TG en Cas no fue estadísticamente diferente a la del lote C, sin embargo, los valores tendieron a cifras menores.

TABLA 5
Perfil lipídico de los lotes experimentales*

Lote	Colesterol total mmol/L	Triglicéridos mmol/L	HDL-colesterol mmol/L	LDL-colesterol mmol/L
Cas	4.26 ± 0.36 ^a	0.87 ± 0.20	2.16 ± 0.39 ^a	1.77 ± 0.38 ^{ac}
L	2.47 ± 0.30	1.16 ± 0.21 ^b	0.71 ± 0.12	1.07 ± 0.42
C	3.94 ± 0.21 ^{ab}	1.14 ± 0.53	2.27 ± 0.24 ^a	1.20 ± 0.30

* Media ± desviación estándar (6-8 ratas por lote). Prueba estadística Student-Newman-Keuls.

^a p<0.01 con respecto a L.

^b p<0.05 con respecto a D.

^c p<0.01 con respecto a C.

Perfil de ácidos grasos

No se observaron diferencias significativas a un nivel de significancia del 5% al comparar los niveles séricos de los ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linoléico entre los grupos experimentales.

Las concentraciones del ácido araquidónico tampoco fueron diferentes, sin embargo, Cas presentó una tendencia a cifras menores.

Los niveles séricos de EPA sólo fueron estadísticamente superiores en el grupo que recibió 24 mg/día de EPA+DHA (p<0.01), siendo las concentraciones de DHA mayores tanto en Cas (p<0.01) como en L (p<0.05) al compararlos con C (Tabla 6).

La relación n-6/n-3 en suero de los grupos Cas y L disminuyó significativamente con respecto a C (p<0.01).

TABLA 6
Composición en ácidos grasos séricos expresados
como porcentajes de ácidos grasos totales *

Acidos grasos	C	Cas %	L
Mirístico	1.12 ± 0.71	0.63 ± 0.10	0.51 ± 0.20
Palmítico	18.66 ± 0.97	18.85 ± 1.34	17.75 ± 0.66
Esteárico	16.27 ± 1.29	14.03 ± 0.83	14.22 ± 2.27
Oleico	12.29 ± 1.38	11.97 ± 0.45	10.92 ± 0.53
Linoleico	17.73 ± 0.01	17.82 ± 2.62	21.87 ± 4.61
Linolénico	0.19 ± 0.14	0.53 ± 0.34	0.80 ± 0.53
Araquidónico	13.92 ± 5.80	8.93 ± 1.74	15.16 ± 3.44
Eicosapentaenoico	0.29 ± 0.05 ^a	1.34 ± 0.17	0.54 ± 0.44 ^a
Docosahexaenoico	0.50 ± 0.24	2.02 ± 0.43 ^b	1.57 ± 0.52 ^c
Relación n-6/n-3	32.29	6.88	12.73

* Media ± Desviación Estándar (6-8 ratas por lote). Prueba estadística Student-Newman-Keuls.

^a p<0.05 con respecto de Cas.

^b p<0.01 con respecto de C.

^c p<0.05 con respecto de C.

DISCUSION

El tejido linfoide y en especial el timo de ratas en período de crecimiento activo, es uno de los órganos más afectados por la desnutrición proteica severa al destete, experimentando no sólo cambios en su tamaño y peso sino también alteraciones en su diferenciación córticomédular. Estas circunstancias convierten al timo en un verdadero barómetro de la malnutrición (3).

En trabajos previos, se ha observado que la administración oral durante 10 días de una dieta de recuperación al 20% de caseína no fue suficiente para revertir el efecto de la desnutrición proteica severa al destete sobre el timo (8).

En el presente estudio uno de nuestros objetivos fue analizar y comparar el efecto que diferentes dietas de recuperación enriquecidas en ácidos grasos poliinsaturados producen sobre el timo. Hemos comprobado que tanto la suplementación con 24 mg/día de EPA+DHA como la utilización de una leche en polvo de origen comercial parcialmente descremada y modificada en el perfil de sus ácidos grasos, permitieron estimular significativamente la proliferación celular en dicho órgano, siendo a pesar de ello insuficientes para recuperar el peso corporal de los animales (7,8,28). Esto podría ser consecuencia de que las ratas se encuentran retrasadas en su crecimiento por el efecto de la depleción proteica severa y sea necesario un período de recuperación mayor.

El otro punto a estudiar fue el efecto final que ambas dietas (caseína al 20% suplementada con 24 mg/día de EPA + DHA y la leche comercial enriquecida en ácidos linoleico y linolénico) tienen sobre el perfil lipídico y de ácidos grasos séricos.

Se sabe que los alimentos que presentan incorporación de lípidos marinos suelen tener un olor típico generalmente

reconocido como “olor o sabor a pescado” que puede provocar el rechazo del mismo. En el caso particular del presente trabajo podemos afirmar que los animales no experimentaron rechazo hacia ninguna de las dietas, y en particular en el grupo Cas, siendo el consumo diario de las mismas estadísticamente similar (37).

El tipo y la cantidad de grasa que los humanos obtienen habitualmente de la dieta, tienen un efecto directo tanto en la concentración de los lípidos plasmáticos como de las distintas lipoproteínas. Así, elevados niveles de ciertas lipoproteínas como: VLDL, IDL, LDL, Apo B y Lp(a) incrementarán significativamente el riesgo coronario, mientras que altas concentraciones de HDL-colesterol y Apo AI serán responsables de disminuir dicho riesgo (9-11).

La Organización Mundial de la Salud en su informe sobre grasas y aceites en la nutrición humana ha recomendado una relación n-6/n-3 en la dieta de 5-10/1 como aconsejable para prevenir cuadros de aterosclerosis y riesgo cardiovascular (38). En el caso de las dietas analizadas en este reporte podemos afirmar que las mismas se encuentran dentro del rango de referencia propuesto por este organismo: L = 7.6/1 y Cas = 8.1/1.

Los aceites de pescado son ampliamente conocidos por sus propiedades hipolipemiantes. En el presente trabajo hemos observado que la administración oral de la dieta preparada a partir de la leche comercial con igual contenido de AGPI n-3, provocó una disminución significativa en los niveles séricos del Colesterol Total, mientras que la concentración de los TG se incrementó al compararlo con Cas.

La disminución en la concentración del colesterol total observada en el grupo L podría estar justificada por la presencia de fitoesteroles que son aportados por el aceite de canola. Estos esteroides pueden encontrarse tanto libres como esterificados y de ellos los hallados en mayor proporción son el campesterol y el sitosterol (27.6% y 52.3%, respectivamente). Pero además, se destaca la presencia del Brassicasterol (13.8%) que se caracteriza por encontrarse únicamente en el aceite de canola y colza, lo cual es utilizado para detectar la presencia de éstos en otros aceites de consumo habitual (39).

Al comparar el aceite de canola con otros aceites como el de soja se ha visto que la cantidad total de esteroides en la canola es un 50% mayor que en la soja.

Otro aceite rico en fitoesteroides pero con cantidades superiores a la canola es el aceite de maíz. Cabe destacar que durante los últimos años han sido numerosos los trabajos publicados a nivel internacional en los que se resalta el efecto beneficioso de los esteroides de las plantas y sus derivados sobre las concentraciones séricas del colesterol en humanos, sin que este comportamiento se hiciera extensivo a los TG (39).

En el presente estudio la dieta del grupo Cas se preparó utilizando aceite de maíz como fuente de lípidos, mientras

que la dieta del grupo L es a base de una leche comercial en polvo que fue enriquecida en aceite de maíz y de canola. Por lo tanto, teniendo en cuenta esta diferencia, podemos suponer que los fitoesteroles de la canola, presentes sólo en el grupo L, podrían ser responsables de ocasionar esa marcada disminución en la concentración sérica del colesterol.

Los mayores niveles de TG en el grupo L podrían ser explicados teniendo en cuenta lo siguiente. El consumo total de dieta y energía fue similar en ambos grupos experimentales (Cas y L). Sin embargo, la ingesta de lípidos fue mayor en L debido a los niveles de materia grasa en la matriz láctea. La leche comercial aporta 14.4 gramos de lípidos cada 100 gramos de producto de los cuales el 32% son ácidos grasos saturados. La dieta final aporta 3.02 gramos de grasa saturada cada 100 gramos de dieta. Además, en la fórmula fueron incluidos aceites de canola y maíz, fuentes de AGPI n-3 y n-6, con el objeto de mejorar el patrón de ácidos grasos esenciales (aceite de canola: 18.7% de ácido linoleico y 9.2% de ácido linolénico; aceite de maíz: 57.0% de ácido linoleico y 0.9% de ácido linolénico).

Por otra parte, la dieta experimental de caseína suplementada fue preparada usando solamente aceite de maíz y adicionada con aceite de salmón de origen comercial que contiene EPA (17.14%) y DHA (12.21%). La dieta final así preparada aporta 0.83 gramos de ácidos grasos saturados en 100 gramos de dieta.

La diferencia en el contenido de grasa saturada entre ambas dietas podría estar justificando la mayor concentración de TG en el grupo que recibe la leche modificada.

Por otra parte, los ácidos grasos de las familias n-6 y n-3 comparten las mismas enzimas involucradas en la ruta biosintética (elongasas y desaturasas) presentando los AGPI n-3 una mayor afinidad por ellas. Además, el EPA puede inhibir en forma efectiva a la enzima $\Delta 5$ -desaturasa bloqueando la transformación de ácido dihomogammalinolénico (obtenido a partir del ácido linoleico) en ácido araquidónico. Sin embargo, altos valores de ácido linoleico pueden inhibir la transformación de linolénico en EPA y DHA desplazando el equilibrio hacia la serie n-6 (40,41).

En el presente trabajo, las concentraciones séricas de los ácidos linoleico y linolénico tanto en L como en Cas no mostraron diferencias estadísticas significativas entre sí. Sin embargo, se observa que L presenta una tendencia a valores mayores.

La concentración sérica de ácido araquidónico fue mayor aunque no estadísticamente diferente en L debido a la incorporación de aceites de canola y maíz (ricos en ácido linoleico) a la matriz dietaria, mientras que en Cas fueron menores pero no estadísticamente diferentes en respuesta a la suplementación con EPA y al efecto inhibitorio provocado por este ácido graso sobre la enzima $\Delta 5$ -desaturasa.

Los valores de EPA y DHA fueron mayores y

estadísticamente diferentes en Cas como consecuencia de la adición del aceite de salmón a la dieta experimental. El grupo L también presentó niveles séricos de DHA estadísticamente superiores a los de C y comparables a los de Cas. Podemos suponer que esta concentración se incrementó por síntesis a partir del ácido linolénico aportado por la matriz láctea, sin que esto se reflejara en mayores niveles séricos de EPA.

La disminución en la concentración sérica de los TG observado en el grupo Cas podría adjudicarse a los mayores niveles de EPA encontrados en suero como consecuencia de la suplementación con aceite de pescado.

Como se ha mencionado con anterioridad el efecto de los aceites de pescado sobre los niveles de LDL-colesterol y HDL-colesterol es controversial. Algunos autores afirman que los niveles de LDL-colesterol se incrementan en respuesta a la disminución que las concentraciones de los TG experimentan ante la ingesta de pescado, reportándose además un efecto favorable sobre las concentraciones de HDL. Sin embargo, otros declaran que la síntesis de ambas lipoproteínas se reduce luego de la administración de altas concentraciones de EPA y DHA.

En este trabajo, Cas presenta concentraciones séricas de HDL-colesterol y LDL-colesterol mayores ($p < 0.01$) que el grupo L. Esta diferencia en las concentraciones de las lipoproteínas podría ser el resultado de las diferentes fuentes de AGPI n-3 presentes en las dietas. El contenido de esteroides aportados por los aceites vegetales en el grupo L disminuiría los niveles séricos de la fracción LDL-colesterol y HDL-colesterol en concordancia con lo reportado por la bibliografía internacional (39). Esta disminución podría ser considerada un efecto promisorio para tratar de disminuir el riesgo coronario aún cuando debería también acompañarse de un aumento en la fracción de HDL-colesterol.

Es importante destacar que la relación n-6/n-3 sérica en los grupos Cas y L experimentó una disminución significativa con respecto al control C como consecuencia de la modificación en el perfil lipídico de la dieta administrada a cada grupo experimental.

En el presente trabajo puede observarse que el efecto hipocolesterolemico de la dieta preparada utilizando la leche comercial sería más efectivo que la utilización de un suplemento de pescado, sin que esto pueda explicarse por la mayor concentración de AGPI n-3 en suero o la menor relación n-6/n-3 sérica. Tal como se mencionó previamente, los fitoesteroides podrían tener efecto en este sentido.

Finalmente, los ácidos mirístico y especialmente palmítico son bien conocidos por sus propiedades hipercolesterolemicas (9). En el presente estudio, no se observaron diferencias estadísticas significativas en las concentraciones séricas de estos ácidos grasos saturados presentando incluso los grupos experimentales una tendencia a valores menores. Por otra parte, las concentraciones séricas de ácido esteárico y oleico

tampoco fueron estadísticamente diferentes.

El reporte del AIN 93 estableció los niveles de Vitamina E para la preparación de las dietas experimentales considerando los niveles de AGPI utilizados en la formulación de dichas dietas para proteger contra el estrés oxidativo. En este trabajo, las dietas experimentales L y Cas aportan cantidad suficiente de Vitamina E para prevenir este efecto (30).

En el caso de la dieta preparada con la leche comercial se utilizaron aceites de canola y maíz, fuentes naturales de vitamina E y además esta leche en polvo se encuentra fortificada en Vitamina E presentando un contenido de 13.1% según rótulo comercial.

En el caso de la dieta Cas el contenido de Vitamina E de acuerdo a AIN 93 cubre ampliamente la relación propuesta entre miligramos de Vitamina E y gramos de EPA y DHA, descripta en la bibliografía internacional (42).

El estudio realizado resalta los efectos favorables propios de la inclusión en la dieta habitual de los AGPI n-3 poniendo de relieve tanto su capacidad para actuar como nutrientes inmunomoduladores así como su rol hipolipemiante, el cual dependerá del tipo de ácidos grasos usados en la elaboración de la matriz alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

El estudio fue financiado por la Universidad de Buenos Aires (B-060 y B-120). Los autores quieren agradecer al Dr. Germán Valcarce por la realización de las corridas cromatográficas y su ayuda en la interpretación de los resultados; a la Sra. Lía C. De Calafat por su asistencia técnica en la elaboración de las dietas y cuidado de los animales y a los Laboratorios Wiener por su contribución con los reactivos de trabajo.

REFERENCIAS

1. Scrimshaw NS and SanGiovanni JP. Synergism of nutrition, infection and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 464S-77S.
2. Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997; 66 :460S-63S.
3. 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.
4. Slobodianik NH, Pallaro AN, López MC, Roux ME and Rfo ME. Effect of short term protein refeeding on the thymus of growing rats after marginal and severe protein deficiency. *Nutr Res* 1989; 9 (8) : 921-29.
5. Pallaro A.N. Efecto de la calidad proteica sobre el timo de ratas en período de crecimiento activo. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. 1996.
6. Pallaro AN, Roux ME and Slobodianik NH. Nutrition Disorders and Immunological Parameters: Study of the Thymus in Growing Rats. *Nutrition* 2001; 17: 724-28.
7. Fernandez I, Feliu MS, Pallaro AN and Slobodianik NH. Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 PUFA sobre el timo de ratas con depleción proteica severa. *Medicina (Bs.As.)* 1997; 57: 72-4.
8. Fernandez I, Bermúdez MJN, Pallaro AN and Slobodianik NH. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (AGPI n-3) en la recuperación nutricional. *Arch Latinamer Nutr* 1999; 49(1):26-31.
9. Kris-Etherton PM, Harris WS and Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 2747– 57.
10. Kummrow E, Hussain M M, Pan M, Marsh JB and Fisher EA. Myristic acid increases dense lipoprotein secretion by inhibiting apoB degradation and triglyceride recruitment. *J. Lipid Res.* 2002; 43: 2155–63.
11. Connor WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1(S): 171S-75S.
12. von Schacky C. n-3 Fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 2000; 71; 1(S): 224S-27S.
13. Griffin BA. The effect of n-3 fatty acids on low density lipoprotein subfractions. *Lipids* 2001; 36(S): 91-7.
14. Ikeda I, Kumamaru J, Nakatani N, Sakono M, Murota I and Imaizumi k. Reduced Hepatic Triglyceride Secretion in Rats Fed Docosahexaenoic Acid-Rich Fish Oil Suppresses Postprandial Hypertriglyceridemia. *J. Nutr.* 2001; 131: 1159–64.
15. Buckley R, Shewring B, Turner R, Yaqoob P and Minihane AM. Circulating triacylglycerol and apoE levels in response to EPA and docosahexaenoic acid supplementation in adult human subjects. *Br. J Nutr.* 2004; 9(3): 477-83.
16. Park Y and Harris WS. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J. Lipid Res.* 2003; 44: 455–63.
17. Lombardo T YB and Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem.* 2006; 17: 1-13.
18. Harris WS. n-3 fatty acids and human lipoprotein metabolism: an update. *Lipids* 1999; 34(S): S257-58.
19. Laidlaw M and Holub BJ. Effects of supplementation with fish oil-derived n-3 fatty acids and γ -linolenic acid on circulating plasma lipids and fatty acid profiles in women. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 37–42.
20. Norum KR . Dietary fat and blood lipids. *Nutr Rev* 1992; 50(4): 30-7.
21. Din JN, Newby DE and Flapan AD. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease—fishing for a natural treatment. *BMJ* 2004; 328: 30– 5.
22. Nestel PJ. Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. *Am J Clin Nutr* 2000; 71; 1(S): 228S-31S.
23. Drevon CA. Marine Oils and Their Effects. *Nutr Rev* 1992; 50(4):38-45.
24. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Lipids* 2001; 36(9): 1007-24.
25. Harris WS. n-3 Fatty acids and lipoproteins: Comparison of results from human and animal studies. *Lipids* 1996; 31(3):243-52.
26. Connor WE. Fish oil in hipertriglyceridemia : safety and recommendations. *Lipids* 1999; 34(S): 271.

27. Simopoulos AP. n-3 fatty acids and human health: defining strategies for public policy. *Lipids* 2001; 36(S): 83-9.
28. Fernandez I, Feliu MS, Slobodianik NH and Pallaro AN. Oral Administration of Dipeptiven ® or a milk formula enriched with n-3 PUFA: Effect on thymus of growing rats [abstract]. *Ann. Nutr Metab.* 2001; 45(suppl 1): 291.
29. Introzzi A, Paglione AM, Slobodianik NH, López MC y col. Incorporación de ácidos grasos de aceite de calamar a lipoproteínas plasmáticas en ratas. *Medicina (Bs.As.)* 1991; 51 (2); 143-47.
30. Reeves P G, Forrest H. N, and Fahey G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-51.
31. Slobodianik NH. Estudios de las Interrelaciones entre Nutrición y Respuesta Inmune en modelo Experimental, en ratas en crecimiento. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. 1985.
32. Friedewald W.T., Levy R.I. and Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972; 18 (6): 499-502.
33. Shantha NC and Napolitano GE. Gas chromatography of fatty acids. *J Chromat* 1992; 624:37-51.
34. Welz W, Sattler W, Leis HJ and Malle E. Rapid analysis of non-esterified fatty acids as methyl esters from different biological specimens by gas chromatography after one-step esterification. *J Chromat* 1990; 526: 319-29.
35. Mendenhall W, Wackerly D, Sheaffer R. *Estadística matemática con aplicaciones*. 2da Edición. Grupo Editorial Iberoamericana, 1994.
36. Schwartz D. *Methods statistiques. a l' usage des medecins et des biologistes*. De. Medicales Flammarion Paris, 1963.
37. Ayerza, R (h) and Coates W. The omega-3 enriched eggs: the influence of dietary linolenic fatty acid source combination on egg production and composition. *Canadian J Animal Sci*, 2001; 81: 355-62.
38. World Health Organization. *Fats and oils in human nutrition: report of a joint expert consultation*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. *FAO Food Nutr Pap* 1995; 57: 1-147.
39. Hendriks HFJ, Weststrate JA, van Vliet T and Mijeer GW. Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Clinical Nutr.* 1999; 53: 319-27.
40. Borno S, Reymúndez ME and Bosch V. Essential fatty acid status in malnourished children. *Lipids* 1999; 34(S): 233.
41. Valenzuela BA. El ácido docosahexanoico (DHA): su esencialidad y requerimientos. *Rev Chil* 1999; 26(3): 279-87.
42. Allard JP, Kurian R, Aghdassi E, Muggli R and Royall D. Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans. *Lipids* 1997; 32 (5): 535-41.

Recibido: 29-03-2007

Aceptado:27-06-2007