

ESTUDIO FUNCIONAL E HISTOLOGICO DEL TIROIDES DE RATAS ALIMENTADAS CON HARINA DE COLZA (RAPS) DETOXIFICADA

Digna Ballester,¹ Santiago Muzzo² y Oscar Brunser²

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos,
Universidad de Chile, Santiago, Chile

RESUMEN

Se midió la histología y capacidad funcional del tiroides en tres grupos de ratas macho, cepa Wistar, de 60 días de edad, alimentadas durante 60 días con dietas al 10% de proteína proveniente de harina de raps extraída con agua (DRSM). Esta harina contenía 0.2% del bociígeno tioxazolidona (VTO), y harina de colza (raps) sin tratar (RSM) con 5.5% VTO, usándose caseína para el grupo control. Se determinaron los niveles plasmáticos de triyodotironina (T-3), tiroxina (T-4) y hormona tiroestimulante (TSH), así como el peso e histología del tiroides a los 10, 30 y 60 días. El tiroides de animales alimentados con DRSM acusó un peso normal; con la dieta de RSM se producía siempre aumento significativo del peso de la glándula, histología sugerente de intensa estimulación y la T-4 estaba disminuida. En el día 30 se observó un alza de T-3 en los grupos que recibían RSM y DRSM. Los valores

Manuscrito modificado recibido: 21-4-81.

- 1 Profesor Investigador, División de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Casilla 15138, Santiago 11, Chile.
- 2 Profesores Investigadores de la División de Nutrición Humana del mismo Instituto.

fueron normales a los 10 y 60 días. El TSH acusó normalidad en cada período en los tres grupos de ratas que incluyó el estudio. Se observó también normalidad del peso y de la función tiroidea (niveles de T-4 plasmático) con cambios histológicos muy leves en las ratas alimentadas con DRSM. Este hallazgo constituye un nuevo argumento en favor del uso de la harina de raps tratada mediante extracción acuosa. Dicho producto podría usarse en la alimentación animal en mayores concentraciones que las utilizadas en la actualidad y, eventualmente, en la alimentación humana.

INTRODUCCION

La harina desgrasada de distintas variedades de raps (*Brassica napus*) es una fuente potencial de proteína, tanto para el hombre como para animales (1-3). Su uso, sin embargo, está limitado por la presencia de glucosinolatos y sus productos de descomposición isotiocionatos (ITC) y tiooxazolidona (VTO) de carácter bocígeno (4, 5). Se han propuesto diversos procesos para eliminar estas sustancias tóxicas con resultados bastante promisorios (6-8). Nuestro grupo (9), mediante extracción acuosa continua de la harina de raps, ha logrado un producto con escaso contenido de VTO, de buena calidad biológica, que no provoca agrandamiento de la glándula tiroidea como en la harina no extraída, pero que histológicamente sí incluye algunas alteraciones en la glándula (5). A fin de clarificar este daño histológico, se realizó la presente investigación en la cual se estudió la capacidad funcional de la glándula tiroidea en ratas cepa Wistar, alimentadas con harina de raps "detoxificada" a través de la medición de las hormonas tiroideas, triyodotironina (T-3), tirosina (T-4) y TSH.

MATERIAL Y METODOS

Material

Harina de raps (RSM): Se empleó harina de raps, desgrasada proveniente de una industria aceitera local.

Harina de raps "detoxificada" (DRSM): Para su obtención se empleó harina de raps y se detoxificó mediante extracción acuosa continua según el método propuesto por Ballester *et al.* (9).

Métodos

Composición química: Se realizó un análisis proximal que incluyó determinaciones de humedad, cenizas, proteína y fibra cruda por los métodos de la AOAC (10) y determinaciones de VTO e ITC por el método de Appelqvist y Joseffson (11).

Ensayo biológico: El experimento se llevó a cabo con tres grupos de 30 ratas macho de cepa Wistar, según se dijo, y de aproximadamente 60 días de edad y 140 g de peso. Estas se alojaron en jaulas individuales y se alimentaron durante 60 días con las dietas experimentales al 10% de proteína. El peso se controló semanalmente y la ingesta, durante las cuatro primeras semanas. A los 10, 30 y 60 días se sacrificaron 10 animales de cada grupo por inhalación de éter.

Se extrajo sangre para la determinación en el suero de las hormonas T-3, T-4 y TSH; se extrajeron y pesaron rápidamente el hígado, corazón, riñones, bazo y suprarrenales. Después de una cuidadosa disección de las estructuras del cuello se identificó y extrajo el tiroides que fue pesado y fijado en formol neutro y teñido con hematoxilina-eosina (9). Los preparados histológicos fueron identificados mediante un número para que el histólogo desconociera a qué grupo pertenecía el tejido en cuestión. Una vez completadas las observaciones, se procedió a identificar a qué grupo pertenecía cada preparado histológico. Las técnicas histológicas fueron descritas en un trabajo anterior (9).

Las hormonas tiroideas T-3 y T-4 se midieron por técnicas de radioinmuno-análisis de acuerdo al método de Mitsuma *et al.* (12), y la hormona hipofisiaria tirotropina (TSH) se determinó con reactivos aportados por NIAMDD, mediante el método de Odell, Wilker y Utiger (13). Se obtuvo suero de ratas sin TSH inyectando vía intraperitoneal 60 μ g de T-4/día durante 7 días a ratas macho adultas. Se certificó la producción de hipertiroidismo mediante la determinación de frecuencia cardíaca por osciloscopio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Composición Química

La composición química de los materiales sometidos a estudio se presenta en la Tabla 1. El análisis químico del RSM y DRSM dio valores semejantes a los obtenidos en trabajos anteriores, espe-

TABLA 1

COMPOSICION QUIMICA DE HARINA DE RAPS ORIGINAL (RSM)
Y "DETOXIFICADO" CON AGUA (DRSM)
(Expresada en g/100 g)

| | RSM | DRSM |
|--------------------|------|------|
| Humedad | 6.0 | 4.2 |
| Cenizas | 6.0 | 6.3 |
| Proteínas (Nx6.25) | 38.6 | 37.4 |
| Extracto etéreo | 2.5 | 1.4 |
| Fibra cruda | 13.2 | 20.6 |
| VTO* | 5.55 | 0.19 |
| ITC** | 0.38 | 0 |

* 5-vinil-2-tiooxazolidona.

** 2-hidroxi-3-butenil isotiocianato.

cialmente en lo que se refiere a VTO e ITC en el DRSM, corroborando una vez más que la extracción acuosa deja un remanente de tóxicos determinados como VTO. La composición y el análisis químico de las dietas experimentales se muestran en la Tabla 2. Según se observa, los resultados confirman los hallazgos esperados para las dietas preparadas siguiendo la metodología de trabajos anteriores (9).

Ensayo Biológico

Crecimiento: La Figura 1 expone el crecimiento de los animales durante el estudio, apreciándose que aquéllos que recibieron afrecho de raps detoxificado mostraron un crecimiento similar a los animales controles (caseína). Sin embargo, se observó cierta tendencia a un menor crecimiento a partir de la 3a. semana de experiencia. Como era de esperar, el crecimiento de los animales alimentados con el raps sin detoxificar, fue significativamente menor.

Ingesta: En la Tabla 3 se detalla la ingesta promedio de los animales durante las cuatro primeras semanas. Las ratas con DRSM mostraron una ingesta mayor que los controles, pero similar durante las cuatro primeras semanas de observación, que alcanzó a un promedio de 16.5 g/rata/día. En cambio, las ratas que recibieron

TABLA 2

COMPOSICION Y ANALISIS QUIMICO DE LAS DIETAS
EXPERIMENTALES
(Expresados en g/100 g)

| Ingredientes | Control | RSM | DRSM |
|-------------------------|---------|------|------|
| Caseína* | 11.5 | — | — |
| RSM | — | 26 | — |
| DRSM | — | — | 26.7 |
| Aceite de maíz | 10 | 10 | 10 |
| Vitaminas** | 1 | 1 | 1 |
| Minerales** | 4 | 4 | 4 |
| Alfacel | 5 | 1.6 | — |
| Maicena | 68.5 | 57.4 | 58.3 |
| <i>Análisis químico</i> | | | |
| Humedad | 10.5 | 9.9 | 11.1 |
| Cenizas | 4.7 | 4.0 | 4.3 |
| Extracto etéreo | 10.4 | 10.6 | 10.6 |
| Proteína (N x 6.25) | 10.1 | 10.4 | 9.9 |
| VTO | — | 1.4 | 0.05 |

* Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio, EUA.

** Chapman *et al.* *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 679, 1959.

RSM ingirieron una cantidad de alimento significativamente menor, el cual se mantuvo durante las dos primeras semanas, y luego bajó. Las diferencias entre la 3a. y 4a. semana fueron significativas.

Peso de órganos. En la Tabla 4 se da a conocer el peso de los órganos seleccionados para tal efecto a los 10, 30 y 60 días. Se encontraron diferencias en hígado y tiroides sólo en las ratas que se alimentaron con RSM.

Hígado. A los 10 días, el hígado fue significativamente mayor que en los animales controles. A los 30 y 60 días se observó una tendencia a la disminución, pero siempre superior al control. El DRSM no produjo cambios ponderales en el hígado.

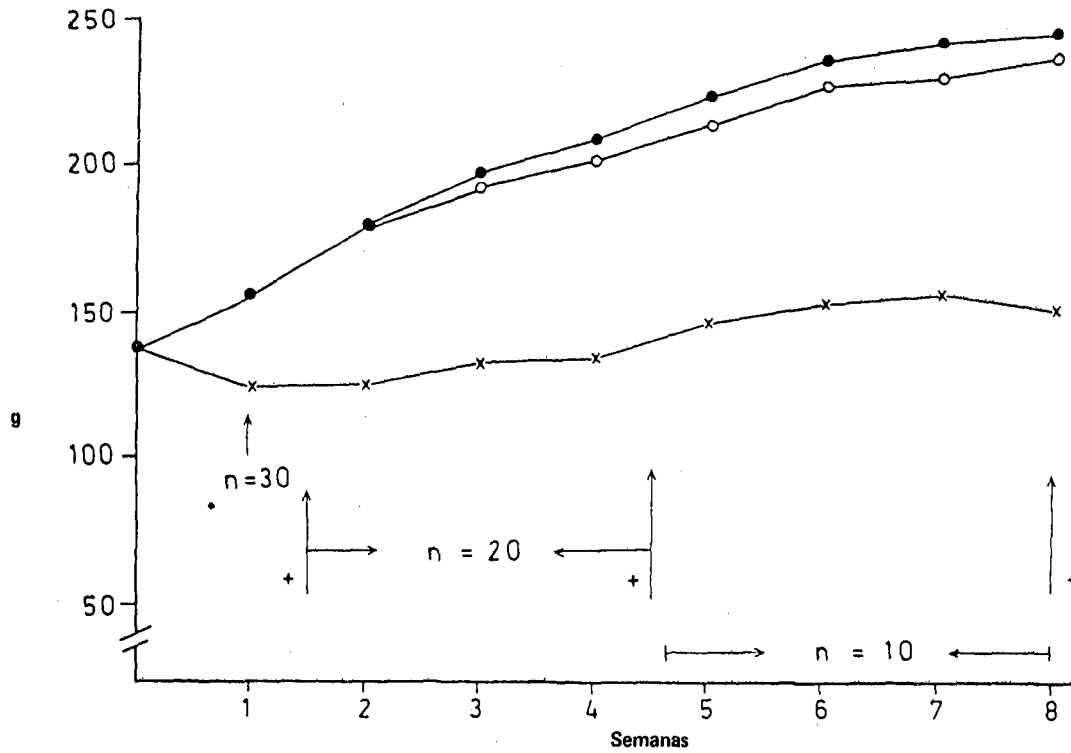


FIGURA 1

Crecimiento de los animales alimentados con DRSM ○—○ ; RSM x—x y dieta control ●—●

TABLA 3

INGESTA PROMEDIO DE LOS ANIMALES DURANTE LAS CUATRO
PRIMERAS SEMANAS DE EXPERIMENTO
(Expresada en g/rata/día)

| Dieta | Semanas | | | | \bar{x} |
|---------|---------|------|------|------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Control | 14.7 | 14.7 | 14.2 | 14.3 | 14.5 |
| DRSM | 16.5 | 16.4 | 16.2 | 16.7 | 16.4 |
| RSM | 9.8 | 9.1 | 8.5 | 7.1 | 8.6 |

Tiroides. El RSM produjo un aumento significativo del tiroides a los 10 días y fue de igual magnitud a los 30 y 60 días. El tiroides de las ratas con DRSM fue semejante en peso al de las ratas control a los 10, 30 y 60 días.

Estudio histológico del tiroides. La severidad de las alteraciones histológicas del tiroides con los materiales en ensayo se presentan en la Tabla 5.

1. *Dieta control.* La histología del tiroides fue, en general, normal. Sin embargo, uno que otro animal presentó una imagen histológica compatible con el diagnóstico de hiperfunción moderada, hecho que ya habíamos observado anteriormente. No se encontraron diferencias al comparar los tiroides de animales sacrificados a los 10, 30 y 60 días.
2. *RSM.* A medida que transcurría el tiempo se observó que había un aumento paulatino del número de órganos que presentaban una imagen compatible con una intensa estimulación tiroidea. Así por ejemplo, a los 10 días sólo un tiroides era de aspecto normal y tres tenían aspectos de estimulación leve, acusando el resto un aspecto de estimulación moderada. A los 30 días los signos de estimulación tiroidea eran ya más intensos (Tabla 5), y a los 60 días la mayoría de los animales tenían signos severos de hiperfunción.
3. *DRSM.* Se observó la aparición paulatina de signos leves

TABLA 4

PESO DE LOS ORGANOS (g/100 g) DE ANIMALES ALIMENTADOS CON CASEINA (control) DRSM Y RSM AL 10% DE PROTEINA A LOS 10, 30, y 60 DIAS DE INICIADO EL EXPERIMENTO

| | Control* | DRSM | RSM |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>10 Días</i> | | | |
| Hígado | 3.77 ^a ± 0.12 | 3.67 ^a ± 0.06 | 4.17 ^b ± 0.22 |
| Tiroides (mg/100 g) | 3.43 ^a ± 0.42 | 3.34 ^a ± 0.32 | 4.40 ^b ± 0.62 |
| Corazón | 0.32 ± 0.01 | 0.32 ± 0.008 | 0.32 ± 0.007 |
| Riñón | 0.69 ± 0.02 | 0.71 ± 0.02 | 0.76 ± 0.028 |
| Bazo | 0.19 ± 0.01 | 0.18 ± 0.04 | 0.19 ± 0.007 |
| Suprarrenales (mg/100 g) | 14.6 ± 1.00 | 14.6 ± 1.02 | 15.7 ± 1.13 |
| <i>30 Días</i> | | | |
| Hígado | 3.03 ^a ± 0.20 | 3.14 ^a ± 0.02 | 3.84 ^b ± 0.19 |
| Tiroides (mg/100 g) | 2.74 ^a ± 0.13 | 2.92 ^a ± 0.02 | 4.76 ^b ± 0.22 |
| Corazón | 0.29 ± 0.01 | 0.31 ± 0.01 | 0.34 ± 0.03 |
| Riñón | 0.62 ± 0.02 | 0.62 ± 0.01 | 0.80 ± 0.02 |
| Bazo | 0.16 ± 0.003 | 0.17 ± 0.004 | 0.25 ± 0.04 |
| Suprarrenales (mg/100 g) | 11.6 ± 0.7 | 11.7 ± 1.00 | 17.4 ± 0.74 |
| <i>60 Días</i> | | | |
| Hígado | 3.01 ^a ± 0.12 | 2.99 ^a ± 0.06 | 3.39 ^b ± 0.26 |
| Tiroides (mg/100 g) | 2.64 ^a ± 0.17 | 2.91 ^a ± 0.17 | 4.40 ^b ± 0.28 |
| Corazón | 0.28 ± 0.004 | 0.30 ± 0.004 | 0.35 ± 0.009 |
| Riñón | 0.59 ± 0.006 | 0.62 ± 0.007 | 0.78 ± 0.02 |
| Bazo | 0.16 ± 0.002 | 0.16 ± 0.003 | 0.23 ± 0.01 |
| Suprarrenales (mg/100 g) | 10.8 ± 0.55 | 11.4 ± 0.27 | 17.3 ± 0.59 |

* Promedio ± E.E. Promedios con la misma letra en línea horizontal no son estadísticamente diferentes al nivel de 0.05 de probabilidad basado en el test de rango múltiple de Duncan (*Biometrics*, 11: 1, 1965).

pero definidos de estimulación tiroidea entre los 10 y los 60 días. Sin embargo, estos cambios nunca alcanzaron la intensidad de los observados en animales que consumieron raps no tratado.

TABLA 5

RECUESTO DE ALTERACIONES HISTOLOGICAS EN EL
TIROIDES DE RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA DE
CASEINA, DRSM O RSM A LOS 10, 30 y 60 DIAS

| Histología | Caseína | | | DRSM | | | RSM | | |
|------------|---------|----|----|------|----|----|-----|----|----|
| | 10 | 30 | 60 | 10 | 30 | 60 | 10 | 30 | 60 |
| Normal | 5* | 6 | 6 | 3 | 2 | 6 | 1 | — | — |
| Leve | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1 | 3 | 1 | — |
| Moderado | — | 2 | — | 4 | 3 | — | 6 | 6 | 1 |
| Severo | — | — | — | — | — | — | — | 2 | 5 |
| N.I.** | 4 | 1 | — | 1 | 1 | 3 | — | 1 | 4 |

* Número de casos estudiados.

** N.I. no interpretable.

Radioinmuno análisis. Los niveles plasmáticos de las hormonas T-3, T-4 y TSH se muestran en la Tabla 6. Como lo revelan los datos, los niveles de T-4 mostraron una disminución significativa en el grupo RSM (raps sin tratar) comenzando a los 30 días y manteniéndose hasta los 60 días del experimento sin que se encontraran diferencias significativas en el grupo DRSM con respecto al control en ninguna de las etapas de este experimento. Ello demuestra que el raps produce una hipofunción tiroidea desde etapas tempranas de su administración, y que la detoxificación mediante extracción acuosa continua, evita esta alteración. Con respecto a T-3, se observó una alza transitoria a los 30 días en los grupos RSM y DRSM, siendo normal estos valores a los 10 y 60 días. La causa de esta elevación no es del todo clara. Papas, Ingalls y Campbell (14), en un experimento con terneros, demostraron un hecho similar al emplear harina de raps con alto contenido de glucosinolatos. La insuficiencia de I₂ en la dieta, que podría ser un factor descrito que eleva los valores de T-3 como mecanismo de compensación tiroidea para mantener la función tiroidea normal, puede descartarse. El hecho de no encontrar diferencias en los valores plasmáticos de los grupos experimentales a los 10 y 60 días es difícil de explicar. En efecto, sería lógico esperar por lo menos un alza en el grupo RSM, dado que se conoce que los antitiroideos que

TABLA 6

EFFECTO DE LA HARINA DE RAPS "DETOXIFICADA" (DRSM) SOBRE EL TAMANO DEL TIROIDES, HORMONAS TIROIDEAS Y SU COMPARACION CON HARINA DE RAPS SIN TRATAR Y CASEINA*

| | Tiroides** mg/100 g | T-3 µg/100 ml | T-4 µg/100 ml | TSH µg/ml |
|----------------|------------------------|------------------|------------------|--------------|
| <i>10 Días</i> | | | | |
| Caseína | 3.43 ± 0.4 | 42.6 ± 24.9 | 3.6 ± 0.4 | 853 ± 256 |
| DRSM | 3.34 ± 0.3 | 51.2 ± 17.1 | 3.4 ± 0.7 | 1,134 ± 486 |
| RSM | 4.40 ± 0.6 | 54.0 ± 17.5 | 3.2 ± 0.6 | 877 ± 346 |
| <i>30 Días</i> | | | | |
| Caseína | 2.74 ± 0.1 | 34.6 ± 11.7 | 4.0 ± 0.6 | 1,096 ± 335 |
| DRSM | 2.92 ± 0.02 | 66.3 ± 17.3 | 3.0 ± 0.5 | 1,046 ± 594 |
| RSM | 4.76 ± 0.2 | 46.3 ± 12.5 | 2.4 ± 0.3 | 991 ± 435 |
| <i>60 Días</i> | | | | |
| Caseína | 2.64 ± 0.2 | 36.8 ± 8.0 | 3.4 ± 0.8 | 839 ± 357 |
| DRSM | 2.91 ± 0.2 | 44.4 ± 12.8 | 3.7 ± 0.9 | 776 ± 170 |
| RSM | 4.40 ± 0.3 | 39.2 ± 14.3 | 2.2 ± 0.0 | 1,062 ± 516 |

* Promedio ± DE.

** Promedio ± EE.

presenta el raps tienen acción directa sobre la glándula y, en caso de producir hipofunción con niveles de T-4 como los descritos en este experimento, cabría esperar una elevación de TSH. Una posible explicación podría ser la gran variabilidad de los resultados al medir esta hormona.

Como conclusión, podríamos manifestar que la función tiroidea se normaliza al lavar el raps con agua: T-4 normal y TSH normal. Debemos dejar claramente establecido, sin embargo, que este hecho no concuerda en el caso de raps no lavado, en el que debería haberse encontrado una elevación de TSH.

SUMMARY

THYROID FUNCTION IN RATS FED WATER-DETOXIFIED RAPESEED MEAL (*Brassica napus*)

Thyroid function was measured in 60 day-old male Wistar rats fed one of the following diets at the 10% protein level: water-extracted rapeseed meal (DRSM) that contained 0.2% of the goitrogen VTO; untreated rapeseed meal (RSM) containing 5.5% VTO and a casein control diet. Plasma levels of TSH, T-3 and T-4 were measured after 10, 30 and 60 days when the groups of animals were killed and their thyroid was dissected, weighed and processed for histologic studies. Weights of the gland of animals fed DRSM was always normal, with mild histologic signs of stimulation. Plasma T-4 levels were also normal; RSM increased the gland weight and induced histologic changes suggestive of strong stimulation. T-4 levels decreased at all time intervals. Animals fed DRSM and RSM showed an increase of T-3 on day 30, while values were normal on day 60. There is no clear explanation for this observation. Plasma TSH was always normal in all animals. The expected increase of TSH in RSM-fed animals was not detected. The normalcy of plasma T-4 and thyroid weight and histology in animals fed DRSM further supports previous evidence about the possibilities of using it in animal husbandry in concentrations higher than those used thus far. It may even have applications in human diets.

BIBLIOGRAFIA

1. Bowland, J.P., D.R. Clandinin & L.R. Welter. Rapeseed meal for livestock and poultry - a review. Can Dept. Agr. Publ. No. 1257, 1965, p. 69-80.

2. El Nockashy, A.S., M. Kiewitt, H.K. Mangol & K.D. Mukherjee. Nutritive value of rapeseed meals and rapeseed protein isolates. *Nutr. Metabol.*, **19**: 145-152, 1975.
3. Clandinin, D.R. & A.R. Robblee. Canadian experience with the use of rapeseed meal in rations for poultry. En: **Proceedings of the International Conference on the Sciences Technology and Marketing of Rapeseed Products**. Ottawa, Canada, 1970, p. 267-280.
4. Clandinin, D.R., L. Bayly, & A. Caballero. Rapeseed meal studies. 5. Effects of (+)-5-vinyl-2-oxazolidinethione, a goitrogen in rapeseed meal, on the rate of growth and thyroid function of chicks. *Poultry Sci.*, **45**: 833-837, 1966.
5. Ballester, D., J. King, P. Vera, O. Brunser, E. Yáñez & F. Monckeberg. Toxicity of water extracted rapeseed meal in the rat. *J. Sci. Food Agr.*, **28**: 855-862, 1977.
6. Tape, N.W., Z.I. Sabry & K.E. Eapen. Production of rapeseed flour for human consumption. *J. Inst. Can. Technol. Aliment.*, **3**: 78-81, 1970.
7. Lo, M.T. & D.C. Hill. Composition of the aqueous extracts of rapeseed meals. *J. Sci. Food Agr.*, **23**: 823-830, 1972.
8. Rauchberger, Y., S. Mokady & U. Cogan. The effect of aqueous leaching of glucosinolates on the nutritive quality of rapeseed meal. *J. Sci. Food Agr.*, **30**: 31-39, 1979.
9. Ballester, D., B. Rodríguez, B. Rojas, O. Brunser, A. Reid, E. Yáñez & F. Monckeberg. Rapeseed meal. IV. Continuous water extraction and short-term feeding studies in rats with the detoxified product. *J. Sci. Food Agr.*, **24**: 127-138, 1973.
10. Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 12th. ed. Washington, D.C. The Association, 1975.
11. Appelqvist, L.A. & E. Jossefson. Method for quantitative determination of isothiocyanates and oxazolidinethiones in digests of seed meals of rape and turnip rape. *J. Sci. Food Agr.*, **18**: 510-519, 1967.
12. Mitsuma, T., J. Colucci, J. Shenkman & C. S. Hollander. Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **46**: 2107-2113, 1972.
13. Odell, W.D., J.F. Wilker & R.D. Utiger. Studies of thyrotropin physiology by means of radioimmunoassay. *Recent Progr. Horm. Res.*, **23**: 47-86, 1967.
14. Papas, A., J.R. Ingalls & L.D. Campbell. Studies on the effects of rapeseed meal on thyroid status of cattle, glucosinolate and iodine content of milk and other parameters. *J. Nutr.*, **109**: 1129-1139, 1979.