

## La diarrea inducida con lactosa estimula la condición oxidativa y es más severa en ratas deficientes en vitamina E

Graciela Dellán, Diamela Carías, Anna M. Cioccia, Eduardo González y Patricio Hevia

Decanato de Medicina. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Venezuela.  
Laboratorio de Nutrición. Universidad Simón Bolívar. Caracas Venezuela

**RESUMEN.** La diarrea es una enfermedad con alta frecuencia en el mundo y es causa de mortalidad y desnutrición en los niños de países en desarrollo. Esto justifica el estudio de la alimentación durante la diarrea. Debido a las dificultades económicas y éticas del estudio de la diarrea infantil, es conveniente usar modelos de diarrea en animales. En estudios previos, se demostró que la diarrea inducida con lactosa en ratas, está asociada con una reducción de los niveles tisulares de vitamina E y también con evidencias de una respuesta inflamatoria a nivel intestinal. En consecuencia, en este estudio se produjo esta diarrea en ratas suficientes y deficientes en vitamina E, con el fin de establecer su efecto en los niveles de estrés oxidativo. Los resultados mostraron que en un lapso de 23 días la concentración de vitamina E tisular disminuyó en todas las ratas con diarrea, pero esta disminución fue sustancialmente mayor en las ratas deficientes en esta vitamina. Al mismo tiempo se observó que la severidad de la diarrea en las ratas deficientes en vitamina E fue un 60% mayor que en las ratas con diarrea pero suficientes en vitamina E. Tanto la diarrea como la deficiencia de vitamina E se asociaron con cambios en las concentraciones de malonaldehído y en la actividad de la superóxido dismutasa en varios tejidos. Sin embargo, los cambios más resaltantes asociados con la diarrea estuvieron relacionados a un aumento en los niveles plasmáticos de malonaldehído de casi 100% y una actividad de la superóxido dismutasa en los eritrocitos de las ratas con diarrea, que fue entre 8 y 11 veces mayor que la detectada en las ratas controles. Estos cambios no invasivos correlacionaron directamente con la severidad de la diarrea. El estudio muestra que la diarrea inducida con lactosa aumenta los niveles de estrés oxidativo y que la deficiencia de vitamina E se asocia con diarreas más severas.

**Palabras clave:** Diarrea, ratas, vitamina E, estrés oxidativo, malonaldehído, superóxido dismutasa, eritrocitos.

### INTRODUCCION

En estudios recientes se ha reportado que en ratas, el emplazo de parte de los carbohidratos dietarios por lactosa,

**SUMMARY.** Lactose-induced diarrhea increases oxidative stress and it is more severe in rats deficient in vitamin E. Diarrhea is the disease with high incidence in the world and causes infant mortality and malnutrition in the developing world. This justifies the study of nutrition and diarrhea. Due to ethical and financial considerations it is difficult to study nutrition and diarrhea in children thus animal models have become a convenient alternative. In previous studies it was shown that lactose induced diarrhea in rats was associated with a reduction in tissue levels of vitamin E and also with evidence of an inflammatory response of the intestine. Accordingly, in this study, in order to determine the effect of this type of diarrhea on the level of oxidative stress, diarrhea was induced in vitamin E sufficient and deficient rats. The results showed that after 23 days the tissue concentration of vitamin E decreased in all the rats with diarrhea but this reduction was substantially greater in the vitamin E deficient group. Moreover, diarrhea was 60% more severe in the vitamin E deficient rats than in the vitamin E sufficient group that also had diarrhea. Both diarrhea and vitamin E deficiency altered malonaldehyde and superoxide dismutase levels in various tissues. However, the most outstanding changes associated with diarrhea were a 100% increment in plasma malonaldehyde and erythrocyte superoxide dismutase activities which were 8 to 11 times higher than those seen in the rats without diarrhea. These non-invasive changes correlated well with the severity of diarrhea. The study shows that vitamin E deficiency results in diarrheas which are more severe and that lactose induced diarrhea is associated with higher levels of oxidative stress.

**Key words:** Diarrhea, rats, vitamin E deficiency, severity of diarrhea, oxidative stress, plasmatic malonaldehyde, erythrocyte superoxide dismutase.

produce diarrea (1). Esta diarrea se asemeja a la diarrea infantil (2,3) y cursa con alteraciones tanto de la morfología como la función absorbente del intestino. Así, ratas con diarrea inducida por lactosa, presentan intestinos de mayor peso y longitud sin alteraciones en la altura de las vellosidades, cuando se comparan con animales que reciben igual cantidad de alimento, pero que no tienen diarrea. Este efecto trófico de la diarrea inducida por lactosa, también se manifiesta en un aumento de la actividad de la lactasa y la sacarasa en las ratas con diarrea,

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

con relación a las ratas que consumen la dieta control libre de lactosa *ad libitum* (4,5). En contraste con este efecto que pudiera considerarse como ventajoso, en el yeyuno de estas ratas se observan indicios de una respuesta inflamatoria caracterizada por una infiltración celular, principalmente linfocitos, tanto en la mucosa, la submucosa y el epitelio de revestimiento. Además, se observó rompimiento de la chapa estriada y un aumento importante en el número de figuras mitóticas y en el número de células caliciformes. Esto último, es un hallazgo frecuente cuando el intestino está expuesto a sustancias irritantes que producen inflamación (4,5).

Adicionalmente a estos cambios en la morfología intestinal, la diarrea inducida por lactosa también afecta su función absorbente. Así, tal como ocurre en la diarrea infantil (6), esta diarrea en ratas, está asociada con una reducción en la digestibilidad tanto de los macronutrientes como de algunos micronutrientes y esta disminución es proporcional a la severidad de la diarrea (1,2). Según Liuzzi y col. (1) la diarrea disminuyó la absorción aparente de la vitamina A por un período más prolongado que en el caso de la absorción aparente de la vitamina E. Sin embargo, el estado nutricional respecto de la vitamina E, resultó más afectado por lo que estos autores sugieren que en el caso de esta vitamina, la diarrea no solo causó una disminución de la digestibilidad, sino que además, estimuló su utilización probablemente debido a un aumento en el estrés oxidativo, que ocurre en respuesta al proceso inflamatorio que causa (1).

La relación entre los procesos infecciosos e inflamatorios y el estrés oxidativo, se sustenta en la observación que las células fagocitarias del sistema inmune, producen radicales libres derivados del superóxido y óxido nítrico para neutralizar la acción de las células invasoras y la eliminación de los tejidos afectados del huésped (7). Además, tal como se indicó anteriormente (1) existen numerosos estudios que han relacionado la diarrea y otros problemas inflamatorios del intestino con un aumento en el estrés oxidativo y una disminución en los niveles de antioxidantes. También se ha demostrado que compuestos con propiedades antiinflamatorias, como es el caso de los aceites de pescado, tienen un efecto benéfico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino que pueden cursar con diarrea como son la enfermedad de Crohns, la enfermedad celíaca y las diarreas inflamatorias (8). Existe también evidencia que señala que la vitamina E además de sus propiedades antioxidantes puede tener una función directa en la regulación del proceso inflamatorio, ya que inhibe tanto a la enzima 5-lipoxigenasa como a la ruta de señalización mediada por la proteína quinasa C y que está involucrada en la producción de superóxido en algunas células del sistema inmune (9,10). Toda esta evidencia sugiere que la Vitamina E puede jugar un papel importante en el curso de la diarrea, ya sea inhibiendo directamente el proceso inflamatorio del epitelio intestinal o actuando sobre los radi-

cales libres que genera la respuesta inflamatoria.

La concentración de aldehídos es uno de los indicadores más utilizados en la determinación del daño oxidativo y se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico con aldehídos producidos de la descomposición de los hidroperóxidos generados en el proceso de oxidación de los lípidos (7). La enzima superóxido dismutasa actúa sobre el superóxido que es uno de los iniciadores del proceso oxidativo y que puede originarse por la reducción parcial del oxígeno en la cadena respiratoria o en las propias células inflamatorias fagocitarias en el proceso conocido como estallido respiratorio (11). Esta enzima genera peróxido de hidrógeno a partir del superóxido, compuesto que es menos reactivo y además puede ser convertido a agua por la acción de la catalasa. Así, esta enzima que se encuentra en el citosol, mitocondria y en el espacio extracelular, es una enzima determinante en la regulación de la respuesta inflamatoria (12).

En consecuencia, se diseñó un experimento que incluyó ratas sin diarrea y ratas con diarrea inducida con lactosa, que consumieron dietas suficientes y deficientes en vitamina E por un período de 23 días. Los parámetros más importantes que se midieron en este experimento, fueron el efecto de la deficiencia de esta vitamina sobre la severidad de la diarrea y el estado nutricional respecto de la vitamina E, así como el grado de estrés oxidativo medidos como niveles de malonaldehído en suero y la actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos. Esta enzima, se midió en los glóbulos rojos, ya que estas células son muy susceptibles al estrés oxidativo debido a que manejan altas concentraciones de oxígeno.

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas machos, de la cepa "Sprague-Dawley", con un peso promedio inicial de  $95,80 \pm 1,16$  g. Las ratas fueron colocadas individualmente en jaulas metabólicas de acero inoxidable, y mantenidas en períodos alternos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se acondicionaron a este ambiente experimental por un período de 4 días con la dieta (13) control (Tabla 1). Al final de este período, se distribuyeron al azar en 6 grupos de 7 ratas cada uno. El experimento fue un diseño 2x2 factorial que incluyó un grupo que recibió una dieta control que satisfacía todos los requerimientos nutricionales de la rata, otro que recibió una dieta idéntica a la anterior pero deficiente en vitamina E, un grupo que consumió una dieta similar a la control pero en la que un 68% del almidón se reemplazó por lactosa para inducir diarrea, y un grupo que se alimentó con una dieta idéntica a la anterior, pero deficiente en vitamina E (Tabla 1). Sin embargo, como la diarrea produce una reducción voluntaria del consumo, se incluyeron dos grupos adicionales para descartar los efectos producidos por esta reducción de consumo. De estos, uno re-

cibió la dieta control y el otro la deficiente en vitamina E, ambos sin lactosa pero cuya ingesta de alimento se restringió de manera que consumieran lo mismo que los grupos asignados a estas mismas dietas pero con lactosa (con diarrea). Para lograrlo, a estos grupos (restringidos) se les ofreció diariamente el promedio de la cantidad de alimento consumida por

los grupos con diarrea (suficientes o deficientes en vitamina E), el día anterior. Con el fin de mantener la descripción de los resultados lo más simple posible, estos grupos no se incluyeron en las tablas ni gráficos sino que se hace referencia a ellos sólo en el texto.

TABLA 1  
Composición de las dietas (g/100g dieta)

Ingredientes	Dieta Control (+ vitamina E)	Dieta Control (- vitamina E)	Dieta Diarrea (+ vitamina E)	Dieta Diarrea (- vitamina E)
Caseína	16.3	16.3	16.3	16.3
Aceite de maíz	5	0	5	0
Aceite de maíz sin vitamina E	0	5	0	5
Mezcla vitaminas <sup>1</sup>	1	0	1	0
Mezcla vitaminas <sup>1</sup> sin vitamina E	0	1	0	1
Minerales				
AIN-76 <sup>1</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5
Colina bitartrato	0.2	0.2	0.2	0.2
L-Metionina	0.3	0.3	0.3	0.3
Almidón de maíz	73.7	23.7	73.7	23.7
Lactosa	0	50	0	50

Las dietas se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del American Institute of Nutrition (13).

1. Las mezclas de vitaminas tanto con vitamina E como sin vitamina E, se prepararon en el laboratorio en base a la fórmula de la mezcla vitamínica AIN-76 (13) y la vitamina E presente en el aceite de maíz se eliminó extrayéndola con hexano en presencia de carbón activado (14). La mezcla mineral, caseína, bitartrato de colina y la metionina se compraron en Harlan Teklad (Madison WI) y la lactosa de ICN (Cleveland OH).

En el caso de las dietas deficientes en vitamina E, al aceite de maíz utilizado en la formulación se le redujo el contenido de esta vitamina, extrayéndola con hexano en presencia de carbón activo tal como recomiendan Mohr y colaboradores (14). Con este sistema, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol del aceite de maíz se redujo de 11.45 mg/100ml a 1.45 mg/100 ml.

Se mantuvo un registro diario de consumo de alimento y crecimiento de los animales y se realizaron dos recolecciones de heces de 48 horas, la primera durante los días 10-11 y la segunda durante los días 21-22 del experimento, para la determinación de la masa fecal y severidad de diarrea. Para la colección de heces, se utilizaron rejillas y embudos y a las jaulas se les adaptó una rejilla adicional que permite coleccionar heces diarreicas (1).

El experimento duró 23 días, durante los cuales, las ratas con excepción de las asignadas a los grupos restringidos, recibieron las dietas y agua *ad libitum*. Al día 23 del experimento, y después de una noche de ayuno, las ratas se anestesiaron con éter y se sacrificaron por decapitación. Se tomaron muestras de sangre en tubos heparinizados, y a continuación se disecó el hígado, riñón y testículos y se mantuvieron congela-

dos a -20°C. El plasma y los glóbulos rojos se separaron por centrifugación, a 2500 r.p.m. por 15 minutos, entre 0-4°C. Los glóbulos rojos se lavaron 3 veces con solución salina isotónica y el plasma y los glóbulos rojos así obtenidos se guardaron congelados.

La concentración de Vitamina E en el aceite de maíz, en el plasma y los tejidos, se determinó por HPLC usando el método de Chow y Omaye con las modificaciones descritas por Liuzzi (1). La actividad de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos, hígado, riñón y testículos se midió usando el método de McCord and Fridovich (15) y los niveles de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico se midieron usando el método de Ohkawa y colaboradores (16) y se expresaron en unidades de malonaldehído. Los niveles de proteína y hemoglobina presentes en los tejidos en que se midieron los niveles de este aldehído o la superóxido dismutasa, se determinaron usando los métodos de Lowry (17) y Drabkin (18) respectivamente. Tanto el manejo, la alimentación como la toma de las muestras de las ratas utilizadas, se hizo conforme a los lineamientos recomendados por el National Research Council para el uso y cuidado de animales de laboratorio (19).

Los resultados obtenidos se analizaron usando análisis de varianza de dos vías y las medias se compararon usando el test de los rangos múltiples de Duncan. En estos análisis el nivel de significancia se mantuvo en un 5%. Para estos análisis se utilizó el programa SPSS versión 7.5.

### RESULTADOS

La Tabla 2 muestra que independientemente del consumo de vitamina E, las ratas sin diarrea consumieron entre un 30% y un 40% más que las con diarrea, y crecieron casi el doble. Este mismo comportamiento se observó en las ratas a las que se les restringió el consumo de la dieta control con vitamina E y en aquellas deficientes en vitamina E (no se muestra en la Tabla). Asimismo, la tabla muestra que el consumo de lactosa fue similar en los dos grupos con diarrea y que el consumo de

vitamina E de las ratas asignadas a las dietas deficientes en vitamina E fue sustancialmente menor que el de las ratas asignadas a las dietas con vitamina E. Esto lo confirman los resultados que se muestran en la Tabla 3 que señalan que las ratas asignadas a las dietas sin vitamina E tenían al final del experimento menos vitamina E tanto en el plasma, como en el hígado y el riñón. En la Tabla 3 se observa además, que las ratas con diarrea tenían una concentración menor de vitamina E en el hígado y el riñón que las sin diarrea. Es importante indicar que los grupos asignados a las dietas exentas del laxante (lactosa) pero cuya ingesta se igualó al medido en las ratas con diarrea (grupos restringidos), también redujeron los niveles de vitamina E en el hígado y el riñón pero estas reducciones fueron menos severas que las detectadas en las ratas con diarrea.

TABLA 2  
Peso inicial, consumo de dieta, lactosa, vitamina E y crecimiento en ratas que recibieron dietas con lactosa (Diarrea) o sin lactosa (Controles), suficientes (+E) o deficientes en vitamina E (-E) durante 23 días

Dieta	Peso Inicial	Consumo Dieta	Consumo Vit E	Consumo Lactosa	Crecimiento
	g	g/23 días	g/23 días	g/23 días	g/23 días
Control + E	95.53±10.0 <sup>a</sup>	301.3±25.2 <sup>a</sup>	12.6±1.1 <sup>a</sup>	0	144.6±11.8 <sup>a</sup>
Diarrea + E	94.91±10.8 <sup>a</sup>	211.8±19.4 <sup>b</sup>	8.36±0.8 <sup>b</sup>	105.9±9.3 <sup>a</sup>	69.25±15.6 <sup>b</sup>
Control - E	96.43±10.6 <sup>a</sup>	285.7±26.2 <sup>a</sup>	1.46±0.13 <sup>c</sup>	0	128.83±12.1 <sup>a</sup>
Diarrea - E	97.52±10.3 <sup>a</sup>	213.0±25.4 <sup>b</sup>	1.22±0.12 <sup>c</sup>	106.5±12.7 <sup>a</sup>	68.16±13.5 <sup>b</sup>

Las cifras muestran medias± la desviación standard de 7 ratas. Medias con letras distintas son diferentes ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de los rangos múltiples de Duncan. Las ratas suficientes en vitamina E recibieron una mezcla vitamínica que satisfacía todos sus requerimientos vitamínicos (AIN-76). Las deficientes en E recibieron una mezcla idéntica pero deficiente en vitamina E tanto en la mezcla como en el aceite de maíz. La diarrea se indujo reemplazando parte del almidón de maíz por lactosa. El experimento duró 23 días. Las dietas utilizadas se muestran en la Tabla 1.

TABLA 3  
Concentración de vitamina E en plasma, hígado y riñón en ratas que recibieron dietas con lactosa (Diarrea) o sin lactosa (Controles), suficientes (+E) o deficientes (-E) en vitamina E durante 23 días

Dieta	Concentración de $\alpha$ -Tocoferol		
	Plasma $\mu$ /dl	Hígado $\mu$ g/g	Riñón $\mu$ g/g
Control + E	1149.8±275.2 <sup>a</sup>	19.54±3.51 <sup>a</sup>	4.18±1.33 <sup>a</sup>
Diarrea + E	1011.2±192.7 <sup>a</sup>	7.01±1.94 <sup>b</sup>	2.55±0.81 <sup>b</sup>
Control - E	87.5±4.9 <sup>b</sup>	0.83±0.32 <sup>c</sup>	1.00±0.15 <sup>c</sup>
Diarrea - E	75.7±12.2 <sup>b</sup>	0.56±0.04 <sup>d</sup>	0.97±0.12 <sup>d</sup>

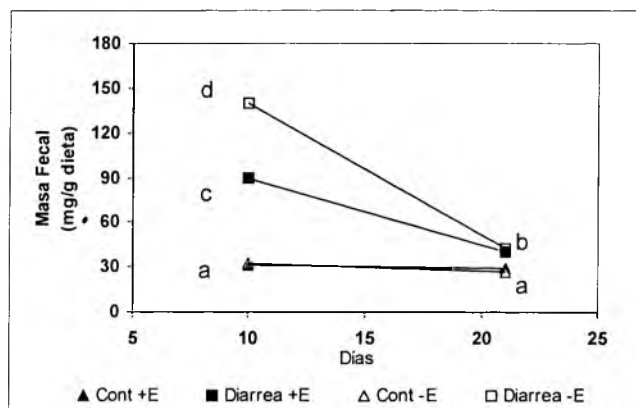
Las cifras muestran medias ± la desviación estándar de 7 ratas. Medias con letras distintas son diferentes ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de los rangos múltiples de Duncan.

Para más detalles ver las notas al pie de la Tabla 2.

La Figura 1 muestra la masa fecal excretada entre los días 10-11 y 21-22 en los cuatro grupos de ratas estudiadas. Se observa que las ratas sin diarrea ( $\Delta$  vacíos y llenos) mantuvieron una producción fecal uniforme y baja ( $\approx 30$  mg/ g dieta consumida), tanto en la primera como en la segunda recolección. Sin embargo, las ratas con diarrea mostraron excreciones fecales sustancialmente mayores en la primera recolección y estas disminuyeron hasta que casi alcanzaron a las medidas en las ratas controles durante la segunda recolección. Destaca en la figura que durante la primera recolección, las ratas con diarrea pero deficientes en Vitamina E tuvieron diarreas mucho más severas ( $\approx 60\%$ ) que las suficientes en vitamina E ( $p < 0.05$ ).

FIGURA 1

Masa fecal<sup>1</sup> medida en ratas que recibieron dietas con lactosa (Diarrea) o sin lactosa (Controles) suficientes (+E) o deficientes (-E) en vitamina E durante 23 días



Las colecciones fecales se realizaron entre los días 10-11 y 21-22 del experimento que duró 23 días. Los símbolos muestran la masa fecal promedio de 7 ratas y símbolos con letras diferentes son diferentes ( $p < 0.05$ ). La diarrea se indujo reemplazando parte del almidón dietario por lactosa. Las ratas (+E) recibieron una mezcla vitamínica que satisfacía todos sus requerimientos vitamínicos y las (-E) recibieron una mezcla idéntica pero sin vitamina E ni en la mezcla ni en el aceite de maíz. La composición de las dietas se muestra en la Tabla 1.

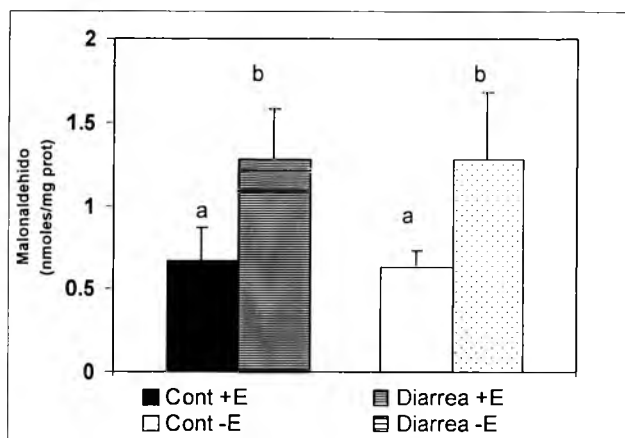
La Figura 2 muestra el efecto de la diarrea y la vitamina E dietaria sobre los niveles de malonaldehído en plasma. Se observa que independientemente de la vitamina E dietaria, las ratas con diarrea tenían concentraciones de malonaldehído circulantes que eran casi el doble de las sin diarrea. Sin embargo, la concentración de malonaldehído en suero también aumentó en el caso de las ratas sin diarrea a las que se les restringió el consumo, pero este aumento fue menor que en las con diarrea y consumos similares; sugiriendo que el consumo de alimento también fue importante en relación con los niveles de malonaldehído circulante. Los niveles de malonaldehído en hígado no variaron ni en respuesta a la diarrea ni al consumo de vitamina E, pero en testículos y riñón se detectó una relación inversa entre la concentración de malonaldehído y el consumo de vitamina E con coeficientes de correlación lineal de  $r = -0.72$  y  $r = -0.37$  respectivamente.

La Tabla 4 muestra el efecto de la diarrea y del contenido de vitamina E en la dieta sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa en los eritrocitos, el hígado y los testículos de las ratas estudiadas. Los resultados señalan que la diarrea estuvo asociada con un aumento sustancial en la actividad de esta enzima en los eritrocitos (8-10 veces) y que este fue más pronunciado en las ratas deficientes en vitamina E ( $p < 0.05$ ). En las ratas con consumos restringidos no se estimuló la actividad de la superóxido dismutasa, lo que demues-

tra que este efecto se debió exclusivamente a la diarrea. En el caso de la actividad de la superóxido dismutasa en testículos, se observó que aumentó en el caso de las ratas que consumieron las dietas deficientes en vitamina E y dentro de este grupo, el mayor aumento se detectó en las ratas que eran deficientes en E y al mismo tiempo tenían diarrea. En el caso del hígado se observó lo contrario, ya que la actividad disminuyó en las ratas deficientes en vitamina E y esta disminución fue más evidente en las ratas deficientes en vitamina E con diarrea.

FIGURA 2

Concentración de malonaldehído plasmático en ratas que recibieron dietas con lactosa (Diarrea) o sin lactosa (Controles), suficientes (+E) y deficientes (-E) en vitamina E durante 23 días



Ver detalles en la Figura 1.

TABLA 4

Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa en eritrocitos, hígado y testículos, en ratas que recibieron dietas con lactosa (Diarrea) o sin lactosa (Controles), suficientes (+E) o deficientes (-E) en vitamina E durante 23 días

Dieta	Actividad Superóxido Dismutasa		
	Eritrocitos U/mg Hb	Hígado U/mg prot	Testículos U/mg prot
Control + E	1848.8±337.7 <sup>c</sup>	379.3±65.4 <sup>a</sup>	388.0±98.0 <sup>c</sup>
Diarrea + E	7925.2±1476.3 <sup>b</sup>	451.7±82.8 <sup>a</sup>	324.9±13.7 <sup>c</sup>
Control - E	1725.4±215.9 <sup>c</sup>	239.5±100.9 <sup>b</sup>	591.7±80.9 <sup>b</sup>
Diarrea - E	11849.6±2526.8 <sup>a</sup>	173.6±96.2 <sup>c</sup>	713.9±264.7 <sup>a</sup>

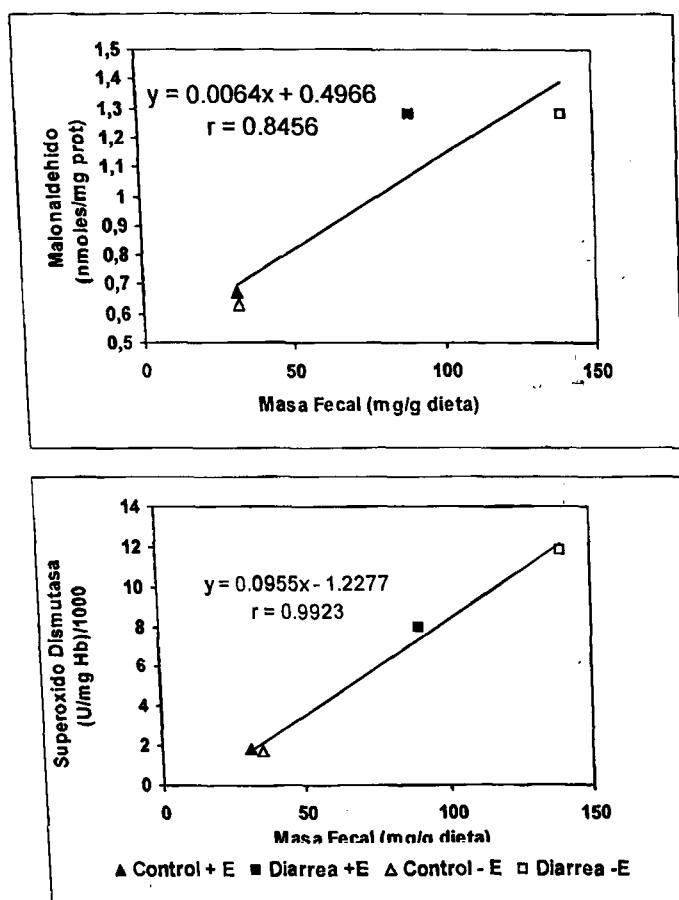
Las cifras muestran medias ± desviación estándar de 7 ratas. Medias con letras distintas son diferentes ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de los rangos múltiples de Duncan.

Para más detalles ver las notas al pie de la Tabla 2

La Figura 3 muestra la relación entre la masa fecal recolectada entre los días 10 y 11 y la concentración de malonaldehído plasmático y la superóxido dismutasa en eritrocitos. En ambos casos hubo buenas correlaciones entre estas variables, pero en el caso de la superóxido dismutasa, se observaron aumentos en su actividad que presentaron mayor correlación ( $r = 0.99$ ) con la excreción fecal.

FIGURA 3

Relación entre la concentración de malonaldehído plasmático o la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos con la masa fecal excretada en ratas que recibieron dietas con lactosa (Diarrea) o sin lactosa (Controles), suficientes (+E) o deficientes (-E) en vitamina E durante 23 días



La masa fecal corresponde a la colección realizada entre los días 10 y 11 del experimento.

## DISCUSION

El propósito de lograr una deficiencia de vitamina E, eliminándola de la mezcla vitamínica y del aceite de maíz se logró, ya que al finalizar el experimento, las concentraciones

de vitamina E en las ratas asignadas a las dietas deficientes en esta vitamina, fueron muy bajas comparadas con las de las ratas suficientes. Es importante indicar que esta reducción se logró en 23 días y no tuvo consecuencias significativas ni en el consumo de alimento ni en el crecimiento de las ratas estudiadas. Así, las ratas que consumieron las dietas deficientes en vitamina E crecieron lo mismo que las suficientes en esta vitamina, aun cuando sus reservas endógenas se consumieron hasta el punto que al finalizar el experimento, tenían respectivamente unas 13, 18 y 3 veces menos vitamina E en el plasma, el hígado y riñón que las suficientes.

Una observación importante de este estudio fue que la diarrea a pesar que no tuvo efectos en los niveles circulantes de la vitamina E ni en las ratas suficientes ni en las deficientes, si causó una reducción significativa en la concentración tisular de esta vitamina. Esto confirma observaciones anteriores (1) y señala que durante la diarrea, es importante aportar una fuente exógena de vitamina E con el fin de mantener niveles tisulares adecuados.

Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio fue que la deficiencia de vitamina E estuvo asociada con diarreas más severas. Esto se detectó en la primera recolección fecal, realizada entre los días 10 y 11 del experimento, pero no en la segunda recolección que se hizo entre los días 21 y 22 del experimento. Esto se explica, ya que la diarrea inducida con lactosa es severa en los primeros días de exposición a este disacárido, pero luego las ratas se adaptan al consumo de lactosa y dejan de tener diarrea (1,4,20), probablemente por acción de la microflora del ciego y colon, que fermenta la lactosa. Así, durante el período en el que la lactosa fue efectiva como laxante, las ratas asignadas a las dietas deficientes en vitamina E tuvieron diarreas más severas que las que consumieron dietas suficientes en esta vitamina. Como el consumo de lactosa en las ratas suficientes y deficientes en vitamina E fue similar, se puede suponer que el efecto osmótico que ejerció este disacárido en el intestino, debió haber sido similar en ambos grupos y en consecuencia las severidades de las diarreas también deberían haber sido parecidas. Como esto no fue así y las ratas deficientes en Vitamina E tuvieron diarreas más severas, se puede concluir que la vitamina E por sus conocidas funciones antioxidantes y antiinflamatorias reduce la severidad de la diarrea. Esto puede tener aplicaciones prácticas en lo que se refiere a la alimentación durante la diarrea y coincide con observaciones anteriores en las que se reportó que en ratas con diarrea inducida con lactosa, el aporte de aceite de maíz, se asoció con diarreas menos severas que la registrada en animales que recibieron una alimentación con grasa de leche o de cochino (20). Aunque estos tres tipos de lípidos dietarios son diferentes en muchos aspectos, el aceite de maíz es el que aporta más vitamina E de los tres.

Los elevados niveles de malonaldehído plasmáticos detectados en las ratas con diarrea, refuerzan la idea de que este

tipo de gastroenteritis puede estar asociado con un aumento en el daño oxidativo. Se debe destacar sin embargo, que este aumento en los niveles de malonaldehído en respuesta a la diarrea se observó sólo en el plasma. De los demás tejidos estudiados, los niveles de malonaldehído aumentaron en el riñón y testículos pero el aumento se debió principalmente a la deficiencia de vitamina E más que a la diarrea. Sólo en el riñón se observó que las ratas que tenían diarrea y al mismo tiempo eran deficientes en vitamina E tenían los niveles más elevados de este aldehído comparado con los demás grupos ( $\approx 70\% \uparrow$ ). Sin embargo, el hecho de haber encontrado una asociación entre la diarrea y niveles elevados de malonaldehído en el plasma y riñón, es indicativo de que la diarrea redujo la capacidad antioxidante en estos animales, ya que la formación de aldehídos es una consecuencia de la oxidación peroxidativa de los lípidos (7,11).

Un factor importante para mantener un apropiado equilibrio antioxidante, lo constituyen sistemas enzimáticos capaces de neutralizar especies reactivas de oxígeno antes de que ellas puedan ejercer su ataque oxidativo. Dentro de estos sistemas enzimáticos, la superóxida dismutasa (SOD) juega un papel primordial ya que actúa sobre uno de los primeros oxidantes que se producen en el organismo como es el superóxido, que es el generador de prácticamente todas las especies reactivas de oxígeno que amenazan las estructuras celulares (21). Adicionalmente, el superóxido tiene una función estimuladora de la transcripción de citoquinas en las células inflamatorias y esta especie reactiva de oxígeno se ha asociado con el daño de varios órganos como el riñón, estómago, intestino, y corazón en condiciones de isquemia-reperusión (21). La superóxida dismutasa juega un papel muy importante en aliviar patologías asociadas con inflamación y estrés oxidativo. Animales transgénicos que sobreexpresan esta enzima se han visto protegidos de patologías pulmonares mediadas por radicales libres (22), y compuestos que inducen su actividad (23), son efectivas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino. Además, la enzima de bovino se ha utilizado con cierto éxito en el tratamiento de la enfermedad de Crohns (24) y miméticos no proteicos de la enzima capaces de neutralizar el superóxido, se han usado para prevenir daños pulmonares (25) y se los ha propuestos como fármacos importantes en el tratamiento del paciente crítico (21). En el organismo existen tres formas de esta enzima, una esta ubicada en el citosol y contiene cobre y cinc, otra en la mitocondria que contiene manganeso y recientemente se ha identificado una forma extracelular que también tiene cobre y cinc, que está presente en la mayoría de los órganos y a la que se le atribuye un papel compensatorio al estrés oxidativo en el ambiente extracelular (21-26). Las tres formas conocidas de esta enzima aumentan su actividad en casos de inflamación y estrés oxidativo, pero la que contiene manganeso y la extracelular son las más sensibles (27-28).

En este estudio no se discriminó entre las diferentes isoenzimas de la superóxida dismutasa, pero su actividad estuvo fuertemente influenciada tanto por la diarrea como por el estado nutricional de la vitamina E. Así, la actividad de esta enzima en eritrocitos, aumentó sustancialmente (8 a 10 veces) en respuesta a la diarrea, en los grupos suficientes y deficientes en vitamina E, y aumentó en testículos, sólo en los grupos con diarrea y deficiencia de vitamina E. Sorprendentemente en el hígado la deficiencia de vitamina E estuvo asociada con actividades menores, particularmente en el grupo deficiente en vitamina E con diarrea.

En otros estudios que han discriminado entre los diferentes tipos de SOD, han encontrado que una de las isoformas responde más a la respuesta inflamatoria que otras en diferentes tejidos (27). Así, como aquí no se hizo la discriminación entre isoenzimas, se vio la resultante de los cambios en todas las formas. Sin embargo, el hecho que haya aumentado tan claramente en los eritrocitos y la importancia que se le da a esta enzima en el control de la inflamación y el estrés oxidativo (21-28), es sugestivo que en este estudio la diarrea y particularmente la diarrea con deficiencia de E causó un proceso inflamatorio que estimuló la actividad de la SOD como respuesta compensatoria. Las altas correlaciones entre la severidad de la diarrea y la actividad de la SOD en eritrocitos y los niveles de malonaldehído en plasma apoyan esta hipótesis. Estos resultados están de acuerdo con los de Laskowska-Klita y Chelchowska (29) que detectaron altas actividades de superóxida dismutasa en pacientes con fibrosis quística y bajos niveles de vitamina E en estas mismas células y sugieren que tanto los niveles de malonaldehído en plasma como la actividad de la superóxida dismutasa en eritrocitos, pudieran ser indicadores no invasivos, útiles en establecer los niveles de inflamación y estrés oxidativo asociados con la diarrea.

En general, este estudio indica que la diarrea inducida con lactosa es sensible al estado nutricional de la vitamina E y que consumos adecuados de esta vitamina resultan en diarreas menos severas. Además, los resultados sugieren que el efecto favorable de la vitamina E en el manejo de este tipo de gastroenteritis puede estar asociado con un mejor control del daño oxidativo que produce la inflamación del tracto gastrointestinal en respuesta al proceso diarreico y que difunde a otros tejidos y se detecta tanto en el plasma como en los eritrocitos. Estos hallazgos están de acuerdo con las observaciones de Nieto y colaboradores (21) que señalaron que la diarrea inducida por lactosa reduce la capacidad antioxidante a nivel intestinal.

Desde un punto de vista práctico, los resultados sugieren que la vitamina E debería considerarse como un nutriente importante en la alimentación durante la diarrea y su eficacia debería estudiarse en la diarrea infantil. Es posible que así como la suplementación con vitamina A ha demostrado ser eficaz en reducir la incidencia de diarrea (31), la vitamina E pudiera ser útil en el control de su severidad.

## REFERENCIAS

1. Liuzzi JP, Cioccia AM, Hevia P. In well fed young rats lactose induced chronic diarrhea reduces the apparent absorption of vitamin A and E and affects preferentially vitamin E status. *Journal of Nutrition* 1998; 128: 2467-72.
2. Hevia P, Carías D, Cioccia AM, González E. Diarrea y Nutrición: experiencia en niños y ratas. *Anales Venezolanos de Nutrición* 1998; 11: 28-36.
3. Bueno J, Torres M, Almendros A, Carmona R, Núñez MC, Ríos A, Gil A. Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhoea. *Histological and ultrastructural changes. Gut* 1994; 33: 926-33.
4. De Lima M, González E, Cioccia AM, Hevia P. Efecto de la diarrea osmótica y secretora sobre la función y morfología del intestino en ratas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2002; 52: 20-8.
5. Carías D. Utilización de nutrientes y estado nutricional calórico proteico en niños y ratas con diarrea [tesis doctoral]. Caracas: Universidad Simón Bolívar; 2000.
6. Carías D, Cioccia AM, Hevia P, Romer H, Guerra M, Brito O. Utilización de nutrientes en niños con diarrea aguda alimentados con fórmula a base de pollo y de soya. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 1999; 49: 130-7.
7. Thomas JA. Oxidative stress and oxidant defense. En: Shills ME, Olson JA, Shike, M, Ross C, editors. *Modern Nutrition in Health and Disease. Ninth ed.* Philadelphia: Williams and Wilkins; 1999. p.751-60.
8. Teitelbaum JE, Walker WA. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2001; 12: 21-32.
9. Devaraj S, Traber MG. ?-Tocopherol, the new vitamin E. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 530.
10. Rimbach G, Minihane AM, Majewicz J, Fischer JP, Pallauf J, Virgli F, Weinberg P. Regulation of cell signaling by vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society* 2002; 61: 415-425
11. German JB, Traber MG. 2001 Nutrients and oxidation: Actions, Transport, and metabolism of dietary antioxidants. En: Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ, editors. *Handbook of Vitamins. Third ed.* New York: Marcel Decker p. 569-88.
12. Kruidenier L, Kuiper I, vanDuijn W, Mieremet-Ooms MAC, van Hogezaand Ra, Lamers CBHW, Verspaget H W. *The Journal of Pathology* 2003; 201: 17-27.
13. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 1977; 107:1340-48.
14. Mohri K, Dohmoto C, kesu H, Igarashi O. A simple elimination method of vitamin E from vegetable and fish oils for the preparation of vitamin E deficient diets. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 1983; 36:122-24.
15. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968; 243: 5753-60.
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-58.
17. Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
18. Drabkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies: spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. *J Biol Chem* 1932; 719- 35.
19. National Research Council 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press. Washington DC.
20. González E, Sánchez G, Cioccia AM, Hevia P. Absorción de grasa proveniente de tres fuentes dietarias en ratas con diarrea inducida con lactosa. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2001; 51: 244-49.
21. Salvemini D, Cuzzocrea S. Therapeutic potential of superoxide dismutase mimetics as therapeutic agents in critical care medicine. *Crit Care Med* 2003; S29-38.
22. Ahmed MN, Suliman HB, Folz RJ, Nozik-Grayck E, Golson ML, Mason SN, Auten RL. Extracellular superoxide dismutase protects lung development in hyperoxia-exposed newborn mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 400-5.
23. Valentine JF. Mesalamine induces manganese superoxide dismutase in rat intestinal epithelial cell lines and in vivo. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1044-1050.
24. Emerit J, Pelletier S, Tosoni-Verlignue D, Mollet M. Phase II trial of copper zinc superoxide dismutase (Cu-Zn SOD) in treatment of Crohn's disease. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 145-9.
25. Bowler RP, Arcaroli J, Abraham E, Patel M, Chang LY, Crapo JD. Evidence for extracellular superoxide dismutase as a mediator of hemorrhage-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L680-7.
26. Ookawara T, Imazeki N, Matsubara O, Kiozaki T, Oh-Ishi S, Nakao C, Sato Y, Ohno H. Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol* 1988; C840-7.
27. Sugino N, Telleria CM, Gibori G. Differential regulation of Copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in the rat corpus luteum: induction of manganese superoxide dismutase messenger ribonucleic acid by inflammatory cytokines. *Biol Reprod* 1988; 59: 208-15.
28. Ookawara T, Egushi H, Nishimura M, Kizaki T, Takayama E, Sayito D, Ohno H, Suzuki K. Effect of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 914-9.
29. Laskowska-Klita T, Chechowska M. Antioxidant status in erythrocytes of cystic fibrosis children. *Acta Biochimica Polonica* 2001; 48: 283-5.
30. Nieto N, López-Pedroza JM, Mesa MD, Torres MI, Fernández MI, Ríos A, Suarez MD, Gil A. Chronic diarrhea impairs intestinal antioxidant defense system in rats at weaning. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2044-50
31. Barreto ML, Santos LM, Assis AM, Araujo MP, Farenza GG, Santos PA, Fiaccone RL. Effect of vitamin A supplementation on diarrhoea and acute lower- respiratory tract infections in young children in Brazil. *Lancet* 1994; 344(8917): 228-31.

Recibido: 22-07-2004

Aceptado: 01-03-2005