

La diarrea inducida con lactosa es mas severa, prolongada y produce mayores pérdidas fecales de macronutrientes en ratas cecotomizadas que en ratas intactas.

Miryan Montbrun, Marlén Gutiérrez, Anna M. Cioccia, Patricio Hevia

Facultad de Medicina, Escuela “José María Vargas”. Universidad Central de Venezuela.
Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela

RESUMEN. La diarrea inducida con lactosa en ratas ha servido para estudiar la alimentación durante la diarrea. Sin embargo, las ratas se adaptan al consumo de lactosa por lo que la diarrea dura aproximadamente una semana. Para establecer si la remoción del ciego podría prolongarla, aquí se comparó esta diarrea en ratas intactas y cecotomizadas. El experimento incluyó 16 ratas intactas y 16 cecotomizadas. A la mitad de las ratas en cada grupo se les ofreció una dieta con 45% de lactosa (grupo diarrea) y a la otra mitad una dieta sin lactosa (grupo control). El experimento duró 21 días con 3 recolecciones de heces de 48 h (días 2-4, 9-11 y 17-19). Los resultados mostraron que durante la primera recolección hubo diarreas similares tanto en los grupos de ratas intactas como cecotomizadas, pero en las próximas, sólo las cecotomizadas tenían una diarrea cuya severidad aumentó (3,5 veces) con el tiempo. Adicionalmente, en los dos tipos de ratas, las pérdidas fecales de proteína y grasa fueron proporcionales a la masa fecal húmeda excretada, pero fueron 2 veces más altas en las cecotomizadas. Se concluye que la cecotomía previene la adaptación, aumenta la severidad y prolonga la diarrea inducida con lactosa e incrementa notablemente las pérdidas fecales de los macronutrientes y reduce la eficiencia del alimento.

Palabras clave: Diarrea, lactosa, ratas intactas, cecotomizadas, severidad, pérdidas fecales, proteína, grasa.

SUMMARY. Lactose-induced diarrhea is more severe, last longer and produces more fecal macronutrient losses in cecectomized than in intact rats.. Lactose induced diarrhea in rats has been used for studying the appropriated feeding during diarrhea. However, rats adapt to lactose and this diarrhea last approximately one week. In order to establish if cecum removal could prolong it, here lactose induced diarrhea was produced in intact and cecectomized rats. In the experiment there were 16 intact and 16 cecectomized rats. Halve of the rats in each group were fed a diet with 45% lactose (Diarrhea group) and the other halve a lactose free diet (Control group). The experiment lasted 21 days and included three 48h fecal collections (days 2-4, 9-11 and 17-19). The results showed that during the first collection both groups had diarrheas of similar severity but thereafter, only the cecectomized had a diarrhea whose severity increased (3.5 times) with time. Additionally, in both groups of rats, protein and fat fecal losses were proportional to fecal output but they were higher (2 times) in the cecectomized group. In conclusion, cecectomy prevents lactose adaptation and results in a diarrhea that last longer and it is more severe (3.5 times). Also in these rats fecal losses of macronutrients are higher whereas feed efficiency is lower.

Key words: Diarrhea, lactose, rats, intact, cecectomized, severity, fecal losses, protein, fat.

INTRODUCCIÓN

La diarrea está catalogada dentro de las primeras 10 causas de muerte a nivel global (1), afecta principalmente a los países más pobres (1) y es una patología típicamente infantil (2). En estos países, los niños menores de 5 años presentan un promedio de 3 episodios diarreicos por año (2) y, en ellos, es la primera causa de desnutrición (2,3,4), ya que estos episodios van acompañados de una disminución en el consumo de alimento, así como de su disponibilidad biológica y, en algunos casos, de un aumento en los requerimientos

nutricionales (4). Esto, favorece la desnutrición, la insuficiencia inmunológica y hace a estos niños más propensos a nuevos episodios diarreicos más difíciles de tratar (3,4,5). Este lamentable cuadro, justifica el estudio de la alimentación durante la diarrea (5).

Una herramienta útil en este tipo de estudios ha sido la inducción de diarrea en ratas, utilizando una dieta alta en lactosa. Con esta metodología ya descrita previamente (6), se logra producir una diarrea osmótica que tiene un efecto inflamatorio sobre la mucosa intestinal (7) y que reduce tanto el consumo de alimento, el crecimiento y la capacidad absorbente de los macro (6-

11) y de los micronutrientes (12,13). Con este método se ha demostrado que esta diarrea afecta más a la mucosa intestinal que la diarrea secretora (7), pero sus consecuencias sobre la función absorptiva son menores, sugiriendo que la capacidad de absorber depende más de la velocidad de tránsito intestinal que de los cambios morfológicos asociados con la diarrea (5,7). Asimismo, utilizando este método se ha podido estudiar el efecto de la diarrea en ratas desnutridas y sus consecuencias sobre la disponibilidad de los nutrientes dietarios (8-10) y se ha demostrado que este tipo de diarrea aumenta el estrés oxidativo (13), afecta negativamente al estado nutricional de la vitamina E y es más severa en ratas deficientes en esta vitamina (13). Una observación importante en relación con este tipo de diarrea en ratas es que produce resultados similares a los obtenidos con niños con diarrea aguda en cuanto a la capacidad de utilizar la proteína dietaria (10,14) y reproduce observaciones generales sobre la alimentación durante la diarrea aguda en niños (5,15), como es el hecho que la excreción fecal de los macronutrientes es proporcional a la severidad de la diarrea, mientras que su digestibilidad y retención es inversamente proporcional a la masa fecal excretada. Asimismo, tanto los estudios en niños como en ratas con esta diarrea (5,15) señalan que la cantidad neta de los macronutrientes absorbidos y retenidos es proporcional a su consumo, observación que justifica la alimentación durante el episodio diarreico con nutrientes de fácil absorción y retención. En relación con esta alimentación, tanto los estudios con niños como con ratas (5,11,15) han permitido concluir que el factor que más compromete el estado nutricional durante la diarrea es la reducción en el consumo de alimento y la brecha energética que esto genera. Desde este punto de vista, la grasa (11) que es bien absorbida y tiene un alto valor calórico, es un nutriente importante para reducir esta brecha y un ingrediente atractivo para incluir en la alimentación durante el episodio diarreico, así como en el período de recuperación, ya que un buen aporte energético favorece la retención de la proteína (5,11,15).

Una observación recurrente en el caso de la diarrea inducida con lactosa en ratas es que la diarrea es intensa durante los primeros días y luego disminuye progresivamente, de manera que, después de unos 7-9 días, la masa fecal del grupo con diarrea se aproxima al grupo control sin lactosa (6-14), señalando que las ratas se adaptan al consumo de este carbohidrato. Esta

adaptación se ha asociado con una inducción de la lactasa en la mucosa intestinal estimulada por la lactosa (9,10), que resulta en una mayor capacidad de desdoblar la lactosa en glucosa y galactosa. Con esto, disminuye la concentración de lactosa y su efecto osmótico en el lumen del intestino. Otro argumento que se utiliza para explicar esta adaptación es a través del crecimiento de la flora intestinal que utiliza lactosa como sustrato, lo que reduce la presión osmótica y así la diarrea, en un proceso conocido en humanos como adaptación colónica (16).

En relación con la adaptación de las ratas a una dieta alta en lactosa, en trabajos anteriores (7,9,10), se observó que, al comparar el intestino grueso de las ratas adaptadas, ya sin diarrea, con las controles, el ciego de las adaptadas se encontraba marcadamente hipertrofiado, con un aspecto de globo que debido a la distensión, se había tornado transparente y permitía ver que su interior estaba lleno de gas y mucho líquido mezclado con una pequeña proporción de dieta no digerida. Esto sugirió que la carencia de diarrea en las ratas adaptadas podría deberse a que el exceso de líquido secretado en el intestino por el efecto osmótico de la lactosa, era retenido en el ciego y no se excretaba en las heces, razón por la cual, no se manifestaba una diarrea visible en las ratas adaptadas. Para probar esta hipótesis, se diseñó el presente experimento en el que se comparó la evolución temporal de la diarrea inducida con lactosa en ratas con su ciego intacto (ratas intactas) y en ratas a las que se les removió quirúrgicamente el ciego (ratas cecotomizadas). La expectativa fue que si la hipótesis resultara verdadera, las ratas cecotomizadas no se adaptarían al consumo de lactosa y la diarrea se mantendría en el tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolo Experimental.

El estudio incluyó cuatro grupos con 8 ratas por grupo. Dos lo conformaron ratas intactas, mientras que los otros eran ratas cecotomizadas. Tanto en los grupos de ratas intactas como en los de cecotomizadas, la mitad consumió una dieta control y la otra una dieta que contenía lactosa agregada a expensa de los carbohidratos, con el fin de provocar diarrea. La formulación de la dieta control se basó en la dieta AIN 93 (17) y contenía: 16,7% de aislado de soya (Supro 900. Protein Technology International), 5% aceite de maíz, 3,5% de

mezcla de minerales AIN-MinMix93 (17), 1% de mezcla vitamínica AIN-VitMX93 (17), 0,2% Bitartrato de Colina, 0,3% DL-Metionina y 73,30% Almidón de Maíz. La dieta con lactosa era idéntica a la anterior pero tenía 28,30% Almidón de maíz y 45% de lactosa (6). Estas dietas se ofrecieron ad libitum a las ratas durante los 21 días que duró el experimento. Se utilizaron jaulas individuales de acero inoxidable que permitían recolectar separadamente las heces de la orina. Para la recolección de las heces diarreicas, sobre la rejilla que permite la separación de las heces de la orina, se colocó una malla de acero inoxidable con orificios más pequeños (20 mallas o 20 orificios por pulgada cuadrada). El agua también se ofreció ad libitum y se realizaron recolecciones de heces y orina de 48 h de duración entre los días 2-4, 9-11 y 17-19. El consumo de alimento, el peso de las ratas y el consumo de agua se midieron día por medio, incluyendo los días de recolección.

Ratas: Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley provenientes del Bioterio de Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (Caracas-Venezuela). El estudio incluyó 32 ratas de las cuales 16 eran ratas a las que se les removió el ciego mediante una cecotomía quirúrgica.

Cecotomía: Se realizó esencialmente como recomendación Singleton y Wishmayer (18). Las ratas fueron anestesiadas por vía intramuscular, inoculando una de sus patas traseras con una combinación de ketamina (Keton, Laboratorios Reveex de Venezuela C.A.) y xilacina (Seton, Laboratorios Calier S.A. Venezuela) a una dosis de 75 y 10 mg/g peso corporal, respectivamente. Una vez anestesiadas, se realizó una incisión de 2 cm de longitud en la pared abdominal y se expuso el ciego. Una vez expuesto, se procedió a ligar el ciego en su porción proximal con una sutura Vicryl 4-0 (Ethicon), cuidando no comprometer la válvula íleo-cecal. Después de una aplicación de Iodo-Povínipirrolidona al 1,1% (Povidine, Pharmacia Corporation de Venezuela), los planos muscular y de piel fueron suturados con Vicryl 3-0 y Prolene 3-0, (ambas Ethicon), respectivamente. Todo el material quirúrgico fue previamente esterilizado con una solución de Gerdex. Todas las ratas cecotomizadas fueron privadas de alimento por 18 y 24 h antes y después de la cirugía, respectivamente. Las ratas intactas igualmente fueron sometidas al mismo período de ayuno con el fin de mantener pesos corporales similares. Después de la operación, todas las ratas se mantuvieron con la dieta control y

agua ad libitum por un período de 10 a 14 días con el fin de asegurar su completa recuperación. Una vez terminado el postoperatorio, las ratas intactas se distribuyeron al azar en dos grupos de 8 ratas cada uno y las cecotomizadas se seleccionaron para conformar dos grupos de 8 ratas con pesos similares a los de las ratas intactas. Una vez seleccionadas los grupos se realizó el experimento tal como ya se describió.

Muestras: Una vez terminado el experimento y obtenidas las muestras de heces y orina se procedió a anestesiarse a los animales en un desecador con éter para luego sacrificarlos por decapitación. Se diseccionó el intestino delgado (desde el píloro hasta la válvula íleo-cecal), el ciego (sólo en las ratas intactas), y el colon (desde la válvula íleo-cecal hasta su unión con el recto). El peso de cada segmento intestinal se determinó después de lavar con una solución salina al 0,9%. En el caso del ciego, se registró el peso del contenido cecal.

Las muestras de heces se dispusieron en tubos previamente pesados y se determinó su peso (peso húmedo). Luego se secaron en una estufa a 90°C hasta peso constante y se determinó su peso seco (sólidos fecales). En las muestras de heces secas se determinó el contenido de nitrógeno (19) y grasa (20). La orina se recolectó en tubos plásticos que contenían 1 ml de HCl 6N y se midió el volumen en un cilindro graduado.

Cuidado y manejo de las ratas: Se realizó de acuerdo a los lineamientos recomendados por el National Research Council (21).

Análisis estadístico de los resultados:

Los resultados se expresaron como medias y su desviación estándar. Para determinar los efectos de la lactosa y la cirugía se utilizó el análisis de varianza de 2 vías y para establecer a posteriori las diferencias entre las medias se utilizó el método de los rangos múltiples de Duncan. Los análisis se realizaron usando el paquete estadístico SPSS versión 17 y el nivel de significancia se fijó en 5%.

RESULTADOS

Las ratas cecotomizadas se recuperaron en general dentro de las 24 h posteriores a la cirugía y mostraron patrones de consumo y crecimiento similares a las intactas. La tasa de mortalidad asociada con la cirugía fue relativamente baja (10,53%) y de las ratas que murieron, aproximadamente, la mitad lo hizo en las primeras 24 h siguientes a la operación y la otra mitad,

dentro de los 4 días posteriores a la misma.

La Tabla 1 muestra que la diarrea inducida con lactosa estuvo asociada con una disminución en el consumo de alimento. Así, las ratas intactas con diarrea, consumieron el 81,22% de lo que consumieron sus controles sin diarrea. Las ratas cecotomizadas con diarrea también redujeron su consumo pero esta disminución fue menor y no alcanzó significancia estadística. Asimismo, la Tabla 1 muestra que las ratas cecotomizadas con diarrea tuvieron un consumo de alimento similar al de las ratas intactas sin diarrea. Esta diferencia en la respuesta al consumo de alimento asociado con la diarrea, también afectó el consumo de lactosa. La Tabla 1 también muestra que tanto el peso final como el crecimiento de las ratas con diarrea fueron significativamente menores al medido en las ratas sin diarrea. Adicionalmente, se observa que la cecotomía no afectó el crecimiento, ya que tanto las ratas intactas como las

cecotomizadas mostraron crecimientos similares cuando recibieron la dieta control o la dieta que indujo diarrea. Por último, la Tabla 1 muestra que en las ratas sin diarrea, la cecotomía no afectó la capacidad de las ratas para transformar el alimento en nuevos tejidos (crecimiento) que es lo que determina la eficiencia del alimento. Sin embargo, esta eficiencia fue menor en los dos grupos con diarrea, pero la disminución fue significativamente mayor en las ratas cecotomizadas.

La Tabla 2 muestra que, en general, la diarrea tuvo un efecto trófico tanto en el intestino delgado, como en el ciego y el colon. Debido a las diferencias en peso corporal entre las ratas con y sin diarrea, este efecto se aprecia mejor cuando el peso de cada segmento intestinal se expresa en relación al peso corporal (peso segmento/peso corporal). El efecto más notable fue el aumento del tamaño y del contenido del ciego en las ratas intactas con diarrea con respecto a las ratas intactas

TABLA 1. Consumo de alimento y lactosa, peso inicial y final, crecimiento y eficiencia alimentaria en ratas intactas y cecotomizadas alimentadas con dieta control o con lactosa durante 21 días.

	Intactas		Cecotomizadas	
	Control	Diarrea	Control	Diarrea
Consumo Alimento (g)	339,19±33,61 ^b	275,50±34,20 ^a	374,51±57,30 ^b	351,98±82,51 ^b
Consumo Lactosa (g)	-	123,98±15,39 ^a	-	153,89±37,13 ^b
Peso Inicial (g)	166,59±14,11 ^a	166,58±14,29 ^a	168,43±12,60 ^a	168,03±13,54 ^a
Peso Final 1 (g)	260,55±24,81 ^{bc}	228,04±21,98 ^a	280,33±32,69 ^c	234,10±23,8 ^{ab}
Crecimiento 1 (g)	93,97±14,16 ^b	60,69±10,26 ^a	111,90±27,93 ^b	61,66±21,61 ^a
Eficiencia Alimentaria (%)	27,59±1,94 ^c	21,32±2,77 ^b	29,63±4,35 ^c	16,61±5,55 ^a
N	8	8	8	8

La tabla muestra las medias ± SD de 8 ratas. Las medias con letras diferentes (a-c) son estadísticamente diferentes (p<0,05). 1. En el caso de las ratas intactas, el peso final y el crecimiento se midió después de remover el ciego.

TABLA 2. Dimensiones del intestino delgado, ciego y colon de ratas intactas y cecotomizadas después de consumir dieta control o con lactosa durante 21 días.

	Intactas		Cecotomizadas	
	Control	Diarrea	Control	Diarrea
Intestino delgado Peso (g)	6,74±0,70 ^a	9,88±1,63 ^b	7,01±1,03 ^a	9,34±0,84 ^b
Peso/peso corporal (mg/g)	25,67±1,70 ^a	40,47±6,64 ^b	25,06±2,58 ^a	40,03±3,00 ^b
Longitud (cm)	101,41±8,29 ^a	129,71±7,20 ^c	110,86±3,76 ^b	136,4±11,07 ^c
Ciego Peso (g)	0,44±0,051 ^a	1,69±0,30 ^b	-	-
Peso/peso corporal (mg/g)	1,68±0,17 ^a	7,18±1,67 ^b	-	-
Contenido (g)	2,26±0,41 ^a	14,64±4,36 ^b	-	-
Contenido/peso corporal(mg/g)	8,61±1,34 ^a	65,38±17,51 ^b	-	-
Colon Peso (g)	1,18±0,19 ^a	1,53±0,20 ^b	1,27±0,23 ^a	2,00±0,36 ^c
Peso/peso corporal (mg/g)	4,50±0,58 ^a	6,53±1,37 ^b	4,55±0,94 ^a	8,59±1,44 ^c
Longitud (cm)	13,58±1,24 ^a	17,20±1,50 ^c	15,33±1,55 ^b	18,92±1,77 ^d
N	8	8	8	8

La tabla muestra las medias ± SD de 8 ratas. Las medias con letras diferentes (a-d) son estadísticamente diferentes (p<0,05).

tas sin diarrea (4,27 y 7,6 veces respectivamente). Por esta razón, tanto el peso final como el crecimiento de estas ratas se muestran en la Tabla 1 después de restar el peso del ciego con su contenido.

La Figura 1 muestra que la incorporación de lactosa en la dieta produjo diarrea, tanto en las ratas intactas como en las cecotomizadas. Así, en el primer período

de recolección la masa fecal húmeda excretada por las ratas intactas con diarrea fue ~ 6 veces mayor que la excretada por las ratas sin diarrea, mientras que, en las ratas cecotomizadas con diarrea, la masa fecal húmeda fue ~10 veces mayor. Sin embargo, esta situación cambió con el paso del tiempo y en la recolección realizada entre los días 9 y 11, sólo las ratas cecotomizadas te-

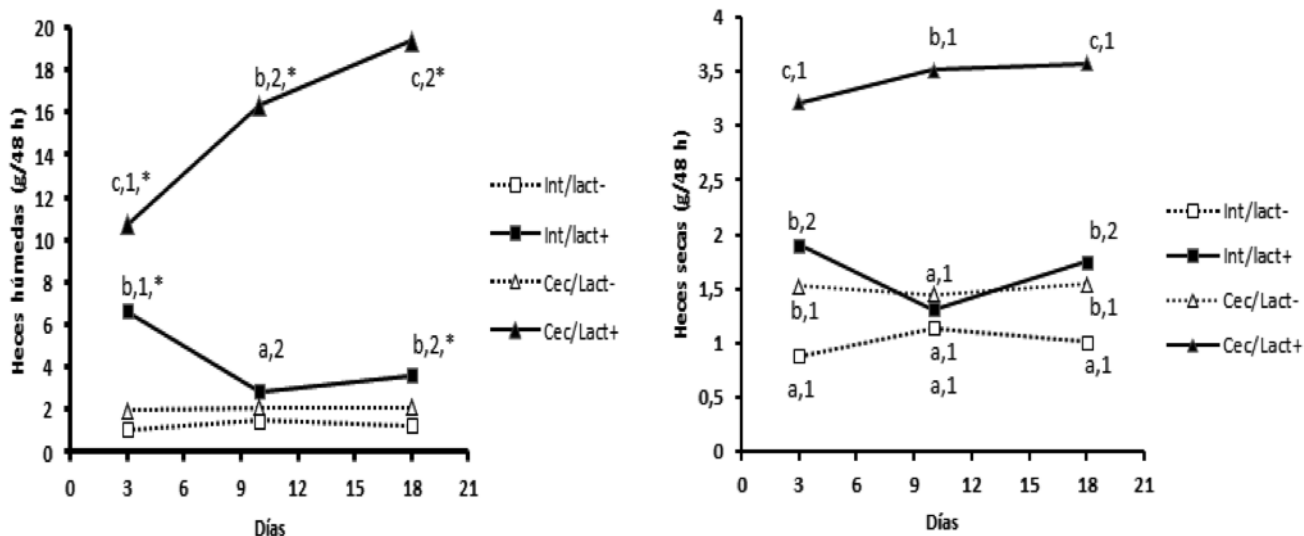


FIGURA 1. Masa fecal húmeda (izquierda) y seca (derecha) en ratas intactas o cecotomizadas que consumieron dietas con lactosa (diarrea) o sin lactosa (controles) durante

TABLA 3. Porcentaje de humedad y de sólidos en las heces, consumo de agua y volumen de orina en ratas intactas o cecotomizadas que consumieron dietas control o con lactosa, medidos a diferentes tiempos en un estudio que duró 21 días.

	Intactas Control	Diarrea	Cecotomizadas Control	Diarrea
Heces % Humedad				
2 - 4 días	14,76±3,20 ^{a,1}	69,52±5,17 ^{c,2}	25,77±7,64 ^{b,1}	69,57±5,12 ^{c,1}
9 - 11 días	19,69±4,34 ^{a,2}	62,33±11,94 ^{c,2}	35,67±7,08 ^{b,2}	77,78±3,63 ^{d,2}
17 - 19 días	14,62±2,18 ^{a,1}	49,80±11,88 ^{c,1}	26,02±5,53 ^{b,1}	79,58±3,47 ^{d,2}
% Sólidos				
2 - 4 días	83,17±6,57 ^{c,1}	30,48±5,17 ^{a,1}	73,23±10,72 ^{b,2}	30,43±5,12 ^{a,2}
9 - 11 días	78,04±7,59 ^{d,1}	37,67±11,94 ^{b,1}	64,33±7,07 ^{c,1}	22,22±3,63 ^{a,1}
17 - 19 días	82,10±6,70 ^{d,1}	50,21±11,88 ^{b,2}	73,98±5,53 ^{c,2}	20,42±3,47 ^{a,1}
Consumo H2O (ml)				
2 - 4 días	45,25±7,46 ^{a,1}	63,56±14,58 ^{b,1}	39,95±8,13 ^{a,1}	108,12±27,91 ^{c,1}
9 - 11 días	44,30±7,69 ^{a,1}	43,43±9,62 ^{a,1}	41,43±10,41 ^{a,1}	133,75±31,28 ^{b,1,2}
17 - 19 días	51,40±8,53 ^{a,1}	49,90±10,57 ^{a,1,2}	43,98±11,41 ^{a,1}	152,67±35,56 ^{b,2}
Volumen Orina (ml)				
2 - 4 días	19,93±5,07 ^{a,1}	21,36±7,19 ^{a,1}	15,63±4,76 ^{a,1}	54,42±11,58 ^{b,1}
9 - 11 días	22,70±5,61 ^{a,1}	30,42±9,63 ^{a,1}	17,60±3,01 ^{a,1}	61,33±14,65 ^{b,1}
17 - 19 días	22,00±4,43 ^{a,1}	25,83±9,30 ^{a,1}	20,75±5,07 ^{a,1}	63,10±14,34 ^{b,1}
N	8	8	8	8

La tabla muestra las medias ± SD de 8 ratas. Las medias con letras diferentes (a-d) muestran diferencias en una misma fila ($p < 0,05$). Las medias con números diferentes (1-2) muestran diferencias entre períodos de recolección ($p < 0,05$).

nían diarrea y esta era más severa que la mostrada en la recolección anterior y, así, al compararla con las ratas controles intactas, la masa fecal de las cecotomizadas fue ~16 veces mayor. Durante la última recolección (días 17-19), las ratas cecotomizadas continuaron presentando una diarrea de severidad similar a la detectada en la recolección anterior. En contraste, la masa fecal de las ratas intactas, durante esta recolección, fue sólo ligeramente mayor al medido en las ratas controles. Estos resultados indican que las ratas intactas presentaron una diarrea severa al inicio del experimento, pero luego se adaptaron al consumo de lactosa y dejaron de tener diarrea. En cambio, en las ratas cecotomizadas, la diarrea mostró una mayor severidad al inicio y se hizo aún más severa con el paso del tiempo. Esto también lo muestra la suma de la masa fecal húmeda excretada en las tres recolecciones. Así, en las ratas intactas la masa fecal excretada durante la primera recolección (días 2-4 y mostrada como día 3 en la figura) fue de 6,64 g/48h, la excretada durante la segunda re-

colección (días 9-11 y mostrada como día 10 en la figura) fue de 2,84 g/48h y la excretada durante la tercera y última recolección (días 17-19 y mostrada como día 18 en la figura) fue de 3,63 g/48h. Con esto, la masa fecal húmeda total excretada en las tres recolecciones alcanzó a 13,11g en las ratas intactas con diarrea. En contraste en las ratas cecotomizadas, la masa fecal húmeda excretada durante estos mismos periodos de recolección fue de 10,73 g/48h; 16,32 g/48h y 19,35 g/48h, lo que hace un total de 46,4g, indicando que, en estas ratas, la diarrea fue 3,54 veces mayor.

La Figura 1 (panel derecho) muestra los sólidos fecales o la masa fecal seca. En la figura se observa que el comportamiento de los sólidos fecales fue muy similar a lo recién descrito y confirma la adaptación al consumo de lactosa en las ratas intactas y la mayor severidad y prolongación de la diarrea en el tiempo de las ratas cecotomizadas. Esto señala, además, que durante el proceso diarreico no sólo se pierde agua sino también residuos sólidos provenientes de la dieta consumida.

TABLA 4. Excreción neta de proteína y grasa, relaciones entre la excreción de proteína o de grasa versus la masa fecal húmeda excretada y digestibilidades aparentes de la proteína o la grasa dietarias en ratas intactas o cecotomizadas que consumieron dietas control o con lactosa, medidos a diferentes tiempos en un estudio que duró 21 días.

	Intactas		Cecotomizadas	
	Control	Diarrea	Control	Diarrea
Excreción Proteína (g/48 h)				
2 - 4 días	0,26±0,065 ^{a,1}	0,49±0,970 ^{b,1}	0,42±0,093 ^{b,1}	0,79±0,14 ^{c,1}
9 -11 días	0,36±0,033 ^{a,2}	0,46±0,160 ^{a,1}	0,43±0,095 ^{a,1}	0,90±0,14 ^{b,1}
Excr. Prot. vs Heces Húmedas	Y = 4,65x10 ⁻² X + 0,189 (r = 0,92)		Y = 4,32x10 ⁻² X + 0,333 (r = 0,81)	
Digest. Prot. (%)				
2 - 4 días	94,95±1,23 ^{c,2}	87,77 4,00 ^{b,1}	91,83 2,88 ^{c,1}	82,92 3,40 ^{a,1}
9 -11 días	93,44±0,31 ^{b,1}	90,04 3,17 ^{b,1}	92,65 1,58 ^{b,1}	81,53 6,80 ^{a,1}
Excreción Grasa (g/48 h)				
2 - 4 días	0,16±0,093 ^{a,1}	0,24±0,040 ^{b,1}	0,26±0,061 ^{b,1}	0,44±0,12 ^{c,1}
9 -11 días	0,19±0,021 ^{a,1}	0,20±0,053 ^{a,1}	0,22±0,053 ^{a,1}	0,45±0,084 ^{b,1}
Excr. Grasa. vs Heces Húmedas Digest. Grasa (%)	Y = 1,91x10 ⁻² X + 0,117 (r = 0,86)		Y = 2,76x10 ⁻² X + 0,173 (r = 0,89)	
2 - 4 días	87,16 3,11 ^{d,1}	75,38 7,73 ^{b,1}	81,52 5,77 ^{c,1}	61,80 3,78 ^{a,1}
9 -11 días	85,48 1,60 ^{b,1}	84,61 4,66 ^{b,2}	83,92 2,99 ^{b,1}	62,97 7,69 ^{a,1}
N	8	8	8	8

La tabla muestra las medias ± SD de 8 ratas. Las medias con letras diferentes (a-d) muestran diferencias en una misma fila (p<0,05). Las medias con números diferentes (1-2) muestran diferencias entre periodos de recolección fecal (p<0,05).

1. Las ecuaciones de regresión lineal entre la excreción de proteína o grasa (y) y la masa fecal húmeda (x) incluyen todas las ratas intactas o cecotomizadas en los dos periodos de recolección.

La Tabla 3 muestra que, en las ratas con diarrea, las heces contenían más agua y menos sólidos que sus respectivos controles sin diarrea. Sin embargo, en las ratas intactas con diarrea, la humedad fecal se redujo mientras que la concentración de sólidos fecales aumentó con el tiempo de exposición a la dieta que contenía lactosa y producía diarrea. En contraste, en las ratas cecotomizadas con diarrea ocurrió lo contrario.

La Tabla 3 también muestra, que, en las ratas intactas, la diarrea estuvo asociada con un aumento en el consumo de agua sólo en el período correspondiente a la primera recolección (2-4 días), sin afectar el volumen de orina. Sin embargo, en las ratas cecotomizadas, la diarrea causó un aumento notable tanto en el consumo de agua (~3 veces) como en el volumen de orina (~3 veces). Adicionalmente, se observa que, en las ratas controles, la cecotomía no afectó ni el consumo de agua ni el volumen de orina.

La Tabla 4 muestra que la excreción fecal de la proteína y de la grasa dietaria aumentó con la diarrea tanto en las ratas intactas como en las cecotomizadas. Sin embargo, en las intactas, el aumento se observó sólo durante la primera recolección, mientras que, en las cecotomizadas, esto se mantuvo en el tiempo. La tabla también muestra que el aumento en la excreción fecal tanto de la proteína (y) como de la grasa (y) fue directamente proporcional a la masa fecal húmeda excretada (x) en las ratas intactas y en las cecotomizadas. En las ecuaciones que describen esta relación y que incluyen la masa fecal húmeda (x) de todas las intactas o cecotomizadas con y sin diarrea, se observa que, en el caso de la proteína, las mayores excreciones fecales en las ratas cecotomizadas se debieron a un mayor intercepto y un mayor valor de x (masa fecal húmeda) que en la ecuación que describe lo mismo en las ratas intactas. En el caso de las pérdidas fecales de grasa, la curva correspondiente a las ratas cecotomizadas muestra un mayor intercepto, una mayor masa fecal (x) y además una mayor pendiente ($2,76 \times 10^{-2}$) que la de la curva de las ratas intactas ($1,91 \times 10^{-2}$), justificando así la mayor excreción (pérdidas) fecal de grasa en las cecotomizadas que en las intactas.

Adicionalmente, la Tabla 4 muestra que el porcentaje de digestibilidad aparente de la proteína y la grasa, disminuyó con la severidad de la diarrea (masa fecal), tanto en las ratas intactas como en las cecotomizadas. Sin embargo, esta disminución, tal como se describió anteriormente en el caso de la excreción neta de estos

macronutrientes, en las ratas intactas, fue significativa sólo en la primera recolección, mientras que, en las cecotomizadas, se mantuvo en el tiempo. Adicionalmente, se observa que el grado de reducción de la digestibilidad de la grasa asociado con la diarrea fue mayor en las ratas cecotomizadas que en las intactas.

Por último, los resultados mostraron que, tanto en las ratas intactas como en las cecotomizadas, con o sin diarrea, la cantidad neta de proteína y grasa absorbidas fueron directamente proporcionales a las consumidas (Proteína: Intactas $r = 0,92$; Cecotomizadas $r = 0,81$). (Grasa: Intactas $r = 0,86$; Cecotomizadas $r = 0,89$), indicando que estas ratas mientras más consumían, más absorbían.

DISCUSIÓN

Una característica de la diarrea inducida con lactosa y que confirma este trabajo, es que su severidad disminuye con el tiempo, dura aproximadamente una semana y las pérdidas de nutrientes que produce son menores que las asociadas con la diarrea aguda infantil, asemejándose más a las que provoca la diarrea persistente (5-15). Aunque la magnitud de las pérdidas y su corta duración resultan apropiadas para el estudio de nutrientes cuyos depósitos cambian rápidamente, como es el caso de las grasas y proteínas, estas características pueden limitar la capacidad del modelo para evaluar los efectos de la diarrea sobre el estado nutricional de nutrientes que se caracterizan por tener grandes depósitos y pérdidas diarias bajas, como ocurre, por ejemplo en el caso de las vitaminas liposolubles (12,13). Por este motivo, es conveniente contar con un modelo en ratas que produzca diarreas que provoquen pérdidas de nutrientes de mayor cuantía y duración. Esto se logró en este estudio al remover quirúrgicamente el ciego de ratas con diarrea inducida con lactosa.

Así, comparando con las ratas controles, la masa fecal húmeda de las ratas intactas con diarrea fue alta durante la primera recolección fecal (los primeros 2-4 días), inexistente entre los días 9-11 y muy leve durante la última recolección (días 17-19). En contraste, en las ratas cecotomizadas, el incremento en la masa fecal con respecto a su control fue similar al observado en las intactas durante la primera recolección, pero se hizo cada vez mayor con el avance del experimento. Con esto, sumando las masas fecales de las tres reco-

lecciones, la excreción fecal de las ratas intactas con diarrea fue de 13,11 g, mientras que en las cecotomizadas fue 46,4 g, es decir, 3,54 veces mayor. Por esta razón, como las pérdidas de grasa y proteína fueron directamente proporcionales a la masa fecal excretada, la diarrea inducida con lactosa produjo pérdidas de grasa y proteína mayores en las ratas cecotomizadas que en las intactas y la consecuencia de esto fue que la digestibilidad de las proteínas y la grasa dietarias, medidas en estos dos tipos de ratas, resultó menor en las cecotomizadas.

Una observación recurrente en todos los estudios realizados con ratas intactas a las que se les produjo diarrea con lactosa fue un ciego hipertrofiado, lleno de gas, mucho líquido y restos de dieta. Esto lo ilustra el trabajo publicado por Atta Boakye y colaboradores (22) en el que se muestra fotografías de los ciegos de ratas con diarrea inducida con lactosa a las que se les administró varias concentraciones de un extracto del antidiarreico natural conocido como *Garcinia Buchannani* Bark. En el caso del presente estudio, los resultados mostraron que, al finalizar el experimento, en las ratas intactas a las que se les indujo diarrea con lactosa, el peso del ciego vacío era aproximadamente 4 veces mayor que en las ratas controles y el peso del material (líquido y residuos) contenido en el ciego fue entre 6 y 8 veces mayor. Esto se evidencio en ratas que ya prácticamente no tenían diarrea, mostrando la adaptación al consumo de lactosa. En contraste, en las ratas a las que se les removió el ciego antes de iniciar el experimento, esta adaptación no ocurrió, ya que la diarrea se mantuvo durante todo el experimento, aumentando en severidad con el transcurso del tiempo y generando una excreción fecal, que en su conjunto, fue unas tres y media veces mayor.

La adaptación al consumo de lactosa se ha demostrado en humanos intolerantes a la ingesta de este disacárido y se ha atribuido a cambios que ocurren en el colon (16). En estos pacientes, los principales síntomas de la intolerancia, como son las molestias estomacales así como la diarrea, desaparecen después de algunos días de mantener un consumo de lactosa (16). Esto se parece a lo observado aquí en las ratas intactas que consumieron lactosa. En humanos, esto se atribuye a cambios en la flora bacteriana (densidad y diversidad) que crean en el colon condiciones más propicias para digerir la lactosa y/o para eliminar los productos que se generan a partir de su metabolismo

y que están asociados con los síntomas de la intolerancia, como son CO₂, H₂ y metano (16). De acuerdo con los resultados de este experimento, esta adaptación que en humanos ocurre en el colon, en la rata ocurre en el ciego. La evidencia de esto es que la remoción del ciego eliminó la capacidad de la rata de adaptarse al consumo de lactosa. Esto también se ha visto en diarreas producidas con secretagogos intestinales como la prostaglandina E-2, la toxina del cólera y el carbacol (23,24).

El ciego es el sitio de unión entre la última porción del intestino delgado (íleo) y la más proximal del grueso (colon ascendente). Ambas estructuras se unen a través de la válvula ileocecal. En la rata el ciego tiene una apariencia tubular y conecta con el intestino grueso a través de la unión cecocólica. De esta manera, el ciego recibe el alimento parcialmente digerido (quimo) proveniente del íleo en porciones cuya magnitud depende del funcionamiento de la válvula ileocecal, lo procesa y lo conduce al colon ascendente. El ciego cumple funciones importantes en el proceso digestivo, entre estas se destacan: A) Reduce la velocidad de paso de los alimentos a través del intestino delgado y evita que el contenido del intestino grueso retorne al delgado. B) Sirve como un reservorio para los líquidos provenientes del intestino delgado. C) Participa en la absorción de las sales minerales y electrolitos disueltos en estos líquidos. D) Contiene bacterias que generan nutrientes útiles para el hospedador a partir de la fracción no digerida del quimo, principalmente la fibra y probablemente en este estudio la lactosa. E) Asiste en la formación de las heces, facilitando el paso del material sólido mezclado con bacterias y moco producido por el ciego al colon ascendente (25).

Aunque no fue el propósito de este estudio determinar como la remoción del ciego evita la adaptación al consumo de lactosa, es probable que una razón importante haya sido que los animales cecotomizados no pudieron retener líquido en el ciego y en consecuencia, el exceso de líquido producido por este tipo de diarrea osmótica pasó directamente a las heces. Evidencia de esto fue la gran cantidad de líquido claramente visible en un ciego cuyo contenido era entre 6 y 8 veces mayor que el de las ratas intactas sin diarrea. También apoya esta idea el hecho que las heces de las ratas cecotomizadas con diarrea tenían más agua que las intactas, especialmente en las dos últimas recolecciones

fecales que corresponden a los períodos en que las ratas intactas casi no mostraron diarrea ya que se habían adaptado al consumo de lactosa. Esto no descarta que otros cambios, como la inducción de la lactasa (9,10) o la estimulación de bacterias que cambian la microbiota intestinal, ya descrita en el caso de la adaptación colónica (16), también hayan contribuido con el proceso de adaptación al consumo de lactosa.

Aunque la principal diferencia entre la diarrea inducida con lactosa en ratas intactas y cecotomizadas fue que la cecotomía produjo diarreas más severas y prolongadas y heces más acuosas, también hubo otras diferencias. Por ejemplo, la diarrea en las ratas cecotomizadas no afectó el consumo de alimento, pero produjo una disminución mayor en la eficiencia alimenticia. Asimismo, aunque la diarrea inducida con lactosa estuvo asociada con un incremento en las pérdidas fecales tanto de la proteína como de la grasa dietaria, estas pérdidas fueron mayores en las ratas cecotomizadas. Igualmente, en los dos tipos de ratas, la diarrea produjo una disminución en la digestibilidad de ambos macronutrientes, pero esta disminución fue mayor en las ratas cecotomizadas y afectó más negativamente a la grasa, señalando que en la rata, el ciego tiene una participación importante en la absorción de este macronutriente. Es posible que la menor biodisponibilidad de los macronutrientes, así como la carencia de una acción digestiva por parte de las bacterias del ciego sobre el alimento no digerido incluyendo a la lactosa, contribuyan con la mayor disminución de la eficiencia alimenticia observada en las ratas cecotomizadas.

Otra diferencia notable observada en este estudio, fue que la diarrea inducida con lactosa en las ratas cecotomizadas estuvo asociada con un mayor consumo de agua y diuresis que en las ratas intactas. Es probable que esto ocurra debido a que, al no tener ciego, estas ratas no pudieron conservar agua, se perdió en las heces y tuvo que ser compensado con un mayor consumo.

Una observación importante fue que, a pesar de las diferencias entre estos dos modelos de diarrea, ambos mostraron, que tal como ocurre en la diarrea infantil, la fracción neta de los macronutrientes que se absorben es directamente proporcional al consumo, justificando la alimentación durante el episodio diarreico.

En conclusión, este trabajo aporta un nuevo modelo de diarrea inducida por lactosa que puede ser útil en

el estudio del efecto de esta patología sobre el estado nutricional y el tipo de alimentación más apropiado durante el episodio diarreico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Enrique Montbrun, médico cirujano del Centro Médico de Caracas, y Superintendente de Salud de la Alcaldía de Baruta del Estado Miranda, por su asesoría y adiestramiento en la cecotomía y a la Dra. Ángela Martínez, médico veterinario, Jefe del Bioterio de la Escuela de Medicina “José María Vargas” por su asesoría en el manejo y anestesia de las ratas.

REFERENCIAS

1. WHO. The top causes of death. Fact Sheet No 310. Updated May 2014. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/ (Visitado Mayo 9, 2016).
2. WHO. Children reducing mortality. Fact Sheet 178. Updated January 2016. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/ (Visitado Mayo 12, 2016).
3. Brown K H. Diarrhea and malnutrition. *J Nutr* 2003; 133: 328S-332S.
4. WHO. Diarrhoeal Disease. Fact Sheet 330. Updated April 2013. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/ (Visitado Abril 2016).
5. Hevia P, Carías D, Cioccia AM, González E. Diarrea y Nutrición: experiencias en niños y ratas. *Ann Venez Nutr* 1998; 11(1): 28-36.
6. Aristimuño O, Cioccia AM, Gutiérrez M, Carías D, Hevia P. Caracterización de un modelo en ratas, útil en el estudio de las consecuencias nutricionales de la diarrea. *Arch Latinoam Nutr* 2009; 59(3): 235-244.
7. De Lima M, González E, Cioccia AM, Hevia P. Efectos de la diarrea osmótica y secretora sobre la función y morfología del intestino en ratas. *Arch Latinoam Nutr* 2002; 52 (1): 20-28.
8. Arciniegas E, Cioccia AM, Hevia P. Efecto de la diarrea inducida con lactosa sobre la disponibilidad de los macronutrientes y la función inmune en ratas nutridas y desnutridas. *Arch Latinoam Nutr* 2000; 50(1): 48-54.
9. Gutierrez M, Carías D, Cioccia AM, Hevia P. Efectos de la diarrea sobre la utilización de nutrientes en ratas con desnutrición proteico-calórica o desnutrición proteica. *Arch Latinoam Nutr* 2006; 56 (1): 46-50.
10. Carías D, Gutierrez M, Cioccia AM, Hevia P. Utilidad de las proteínas de pollo y de soja en ratas nutridas o desnutridas con diarrea inducida con lactosa. *Acta Bio-*

- quim Clin Latinoam 2011; 45(1): 95-108.
11. González EG, Sánchez G, Cioccia AM, Hevia P. Absorción de grasa provenientes de tres fuentes dietarias en ratas con diarrea inducida con lactosa. Arch Latinoam Nutr 2001; 51 (3): 244-249.
12. Liuzzi JP, Cioccia AM, Hevia P. In well-fed young rats, lactose-induced chronic diarrhea reduces the apparent absorption of vitamins A and E and affects preferentially vitamin E status. J Nutr 1998; 128: 2467-2472.
13. Dellán G, Carías D, Cioccia A M, González E, Hevia, P. La diarrea inducida con lactosa estimula la condición oxidativa y es más severa en ratas deficientes en vitamina E. Arch Latinoam Nutr 2005; 55(1): 34-41.
14. Carías D, Cioccia AM, Hevia P, Romer H, Guerra M, Brito O. Utilización de nutrientes en niños con diarrea aguda alimentados con fórmulas en base a pollo y soja. Arch Latinoam Nutr 1999; 49: 130-137.
15. González E, Piñero D, Romer H, Guerra M, Hevia P. Alternativas para la alimentación durante la diarrea aguda. Arch Ven Puericul Ped 1992; 55(1): 16-19.
16. Savaiano DA, Ritter AJ, Todd RK, Gareth MJ, Longcore JR, Chandler JR, Walker WA, Howard LF. Improving lactose digestion and symptoms of lactose intolerance with a novel galactose oligosaccharide (RP-G28): a randomized double-blind clinical trial. Nutrition J 2013; 12: 160. DOI: 10.1186/1475-2891-12-160. Visitado 5 de Junio 2016.
17. Reeves PG, Forrest H, Nielsen H, Fahey GC. 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: 1939-1951.
18. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of cecum ligation influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. Eur Surgical Res 2003; 35 (6): 73-81.
19. Hevia P, Cioccia AM. Application of a colorimetric method to the determination of nitrogen in nutritional studies with rats and humans. Nutr Rep Int 1988; 38 (6) 1129-1136.
20. Blight E, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 1959; 37: 911-920.
21. National Research Council. Guide for care and use of laboratory animals. Eighth Edition. The National Academy Press. Washington DC. 2011.
22. Atta Boakye P, Brierley SM, Pasilis-Onesmo SP, Balembe OB. Garcinia buchananii bark extract is an effective anti-diarrheal remedy for lactose-induced diarrhea. J Ethnopharmacology 2012; 142 (2): 539-547.
23. Fondacaro JD, Kolpak DC, Bumham DB, McCaffery GP. Cecectomized rat. A model of experimental secretory diarrhea in conscious animals. J Pharmacol Methods 1990; 24 (1): 59-71.
24. Shimizu I, Kawashima K, Yoshida N, Ito T. Analysis of 16,16-dimethylprostaglandin E-2 induced diarrhea in cecectomized rats. Arch Int Pharmacodyn Ther 1994; 328 (3): 326-343.
25. Herdt TH, Sayegh AI. Physiology of the Gastrointestinal Tract. En "Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology". Ed. BG.Klein. Fifth Edition. Elsevier. P 263-342. 2013.

Recibido: 02-08-2016
Aceptado: 12-09-2016