

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA ALIMENTICIA Y LA DIGESTIBILIDAD DE ALIMENTOS PARA RATONES CON ALTO CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS W-3 DISEÑADOS EN LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Patricia Ruth Romero Vidomlansky¹, Narella Antonina Colussi¹,
Belén Andrea Acevedo², Guadalupe Chaves², Juan Santiago Todaro¹, María Victoria Aguirre¹

1.Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina – UNNE,

2.Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas - UNNE

RESUMEN

El método de digestibilidad mide la fracción nitrogenada de alimento consumido que es absorbida intestinalmente, analizando el aprovechamiento de la dieta y su influencia en la salud del animal de laboratorio. Normalmente se estudia por Colección Total de Heces (CTH) e incluye los aportes de la microbiota y otros metabolitos. **Objetivo:** Comparar calidad nutricional y digestibilidad aparente de dos alimentos para ratones ricos en ácidos grasos w-3 diseñados en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas-UNNE (LIBiM). **Metodología:** Se definieron y elaboraron dietas para ratones en crecimiento. Muestreo: al azar simple, sobre ratones Balb/c del Bioterio Facultad de Medicina-UNNE, según dieta: Ch, L y Control. Los animales fueron alojados n=5 por caja y alimentados *ad libitum*. Se comparó el desarrollo de los ratones (PR) y consumo de alimento (CA) por peso. Se calcularon Tasas de Cambio de Peso (TCP) y Eficiencia Alimenticia (EA) de dietas. Se realizó CTH 24 hs, analizando contenido de nitrógeno de alimentos y heces (Kjeldhal). Se estimó Digestibilidad Aparente (DA) de los alimentos. **Resultados:** PR finales entre lotes sin variaciones significativas, con CA mayor en L. La TCP, EA y DA fueron mayores con Ch. **Conclusiones:** Los alimentos diseñados en el LIBiM se ajustan a los requerimientos nutricionales diarios para ratones en crecimiento. Este estudio muestra mayor EA y DA de la Dieta Ch comparada con L, lo que tiene mejor significancia para la salud y bienestar de los animales. Esta investigación sienta bases para el diseño de dietas experimentales ricas en w-3 de aplicabilidad en investigaciones biomédicas. **Palabras clave:** Nutrición animal, Calidad nutricional de dieta, Digestibilidad aparente, Compuestos bioactivos, Bioterio de producción

SUMMARY

The digestibility method measures the nitrogen fraction of consumed food that is absorbed intestinally, analyzing the performance of the diet and its influence on the health of the laboratory animal. Normally it is studied by Total Stool Collection (TSC) and includes contributions of the microbiote and others metabolites. **Objective:** To compare the nutritional quality of two foods for mice rich in w-3 fatty acids designed in the Laboratory of Biochemical Investigations-UNNE (LIBiM). **Methodology:** Diets for growing mice were defined and developed. Sampling: simple randomization, on Balb/c mice of the Animal House of the Medicine Faculty-UNNE, according to diet: Ch, L and Control. The animals were housed n=5 per box and fed *ad libitum*. Mice growth (MG) and food consumption (FC) were determined by weighting. Weight Change Rates (WCR) and Dietary Efficiency (DE) of diets were calculated. TSC was performed for 24 hours, analyzing nitrogen content of food and feces by Kjeldhal. Apparent Digestibility (AD) of diets was estimated. **Results:** Final PR between batches without significant variations, with FC greater in L. There was higher WCR, DE and AD in Ch compared to L. **Conclusions:** The foods designed in LIBiM supply the daily nutritional requirements for growing mice. This study shows greater DE and DA of the Ch Diet compared to L, which has better significance for the health and welfare of animals. This research lays the foundation for the design of experimental diets rich in w-3 applicability in biomedical research. **Keywords:** Animal Nutrition, Diet nutritional quality, Apparent digestibility, Bioactive compounds, Production Bioterium.

INTRODUCCIÓN

La experimentación animal es un elemento imprescindible en las investigaciones biomédicas. El ratón es uno de los roedores más utilizados, por su pequeño tamaño, corto tiempo de generación, facilidad de reproducción y mantenimiento en el laboratorio, así como las valiosas posibilidades de extrapolación de los resultados alcanzados a otros mamíferos, incluido el ser humano ⁽¹⁾.

La formulación de dietas para animales de laboratorio tiene como objetivo fundamental alcanzar las concentraciones ideales de nutrientes, que permitan cubrir los requerimientos del animal ⁽¹⁾. De esta manera, la calidad de un alimento se evalúa considerando su composición química y nutricional, así como los efectos de los procesos de digestión, absorción y metabolismo, o la capacidad del animal de digerir y utilizar esos nutrientes ⁽²⁾.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPL) son nutrientes de probada relevancia biológica. Las familias w-6 y w-3 son además esenciales, por lo que deben ser aportados por la dieta, en una determinada cantidad y proporción entre ellos ⁽³⁾. En la Tabla 1 se muestran las características requeridas en una dieta para ratones.

Tabla 1: Características de una dieta para ratones

NUTRIENTE	UNIDAD
Volumen diario	5 g de alimento / día
Calorías	4250 kcal / kg de dieta
Carbohidratos	750 g de CHO: 720 a 690 g / kg de dieta
Fibra	30 a 60 g / kg de dieta
Proteínas	200 g de proteína bruta / kg de dieta
Grasas totales	50 g / kg de dieta
Grasas saturadas	41,8 g / kg de dieta
Omega 6	6,8 g / kg de dieta
Omega 3	1,36 g / kg de dieta
Relación w-6 / w-3	5:1

Fuente: Romero Vidomlansky et al, 2018 ⁽⁴⁾

Además de la carne de pescado de mar, existen en la naturaleza alimentos de origen vegetal que reflejan en su composición altos contenidos de w-3 (Ver Tabla 2). Se ha demostrado en diversos estudios *in vivo* en ratas el poder anti-inflamatorio de los ácidos grasos w-3 provenientes de algunos de estos ingredientes, como las harinas de semillas. Por esto, su empleo en la composición de alimento para ratones constituye una fuente innovadora de AGPL ⁽⁵⁾.

Tabla 2: Contenido de ácidos grasos w-3 y w-6 en diversas semillas y frutos secos en mg /100 g de producto puro, sin aditivos ni cocción

Especie vegetal	w-6	w-3
Semillas de linaza	5911	22813
Semillas de rosa mosqueta	4155	2748
Pipas de calabaza	8759	77
Quinoa	2977	307
Anacardos	7782	62
Pipas de girasol	32785	69
Semillas de Chía	6060	18510
Semillas de cáñamo (R 1:3)	17000	6000
Semillas de Soja (R 1:5)	8000	1500

Fuente: Valenzuela et al., 2009 ⁽⁵⁾

Mientras la calidad nutricional de un alimento está determinada por los tipos y cantidades de nutrientes que contiene, la calidad de la dieta está dada por la habilidad del animal para digerir y utilizar esos nutrientes ⁽⁶⁾. Así, la digestibilidad es la base de las metodologías de evaluación de los alimentos ⁽⁷⁾, sirve como medida de calidad de la dieta y sus componentes, así como de la disponibilidad de los nutrientes y su influencia en la salud y bienestar de los animales ⁽⁸⁾.

Por definición, la digestibilidad es la fracción nitrogenada de alimento consumido que no aparece en las heces, absorbido como tal en el intestino delgado, y por último utilizado para la síntesis de proteínas ^(7,9). Es una propiedad inherente al alimento y está relacionada con su constitución física y química, concentración de nutrientes y factores limitantes y antinutricionales ⁽⁹⁾.

La digestibilidad (D) se expresa en porcentaje: $D = (N \text{ absorbido} / N \text{ ingerido}) * 100 \%$. Mientras mayor sea el valor obtenido, mejor será el aprovechamiento de los nutrientes del alimento. La puntuación de D de una proteína refleja su contenido en aminoácidos (AA) en comparación con la "proteína ideal" ⁽⁹⁾.

Normalmente los valores de D que se obtienen son valores aparentes, es decir incluyen en las heces los aportes metabólicos y endógenos provenientes de enzimas, células epiteliales, microorganismos y otros metabolitos que llegan a la luz intestinal ⁽⁷⁾.

Debido a la importancia de la digestibilidad en la nutrición, fueron desarrollados diversos métodos para evaluar una dieta o un ingrediente en particular, el nivel de aprovechamiento y el efecto en la salud del animal ⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

La obtención de muestras fecales es relativamente simple y poco costosa ⁽¹¹⁾; por lo tanto, el procedimiento más utilizado para estudiar calidad de la dieta es la medición del contenido de nitrógeno en la Colección Total de Heces (CTH) ⁽¹²⁻¹³⁾. Este análisis requiere de medidas directas (observaciones) e indirectas (análisis fecal), en forma simultánea con determinaciones nutricionales de los componentes del alimento ⁽¹¹⁾.

Primero, se establecen los requerimientos nutricionales del animal según la raza, fase de desarrollo y estado fisiológico ⁽¹⁴⁾. Luego se procede a formular las dietas -con las materias primas que se van a evaluar- y se suministran a los animales durante al menos cinco días como período de adaptación, antes de iniciar la fase experimental ⁽¹⁵⁾.

De acuerdo a lo anterior, en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina, se formularon y elaboraron dos alimentos para ratones en etapa de crecimiento, con alto contenido de w-3.

Debido a que la información de calidad nutricional y digestibilidad no se encuentra disponible para los alimentos diseñados, el presente trabajo se enfoca en estudios de calidad de dieta.

Objetivo general

Comparar la calidad nutricional y la digestibilidad aparente de dos alimentos para ratones, diseñados y elaborados en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina-UNNE (LIBiM).

Objetivos específicos:

Comparar el desarrollo de los ratones a partir del consumo de dos alimentos de diseño contra un alimento comercial tomado como control.

Analizar la composición porcentual de los alimentos.

Medir el porcentaje de proteínas en la materia fecal de los animales de estudio bajo diferentes dietas.

Comparar la digestibilidad aparente y la eficiencia alimenticia de los alimentos diseñados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Formulación y elaboración de los alimentos

Se definió una dieta teórica para ratones en etapa de crecimiento, tomando como base las estimaciones de requerimientos nutricionales diarios para estos animales, de las Normas Técnicas para Alimentos de Ratas y Ratones del Instituto "Dr. Carlos G. Malbrán" (Ver Tabla 3) y resultados de experiencias con rendimiento aceptable para calcio (Ca) y fósforo (P), así como las tablas de composición química de los ingredientes.

Tabla 3: Cantidad de macronutrientes, Fe y energía en alimentos balanceados para ratas y ratones.

NUTRIENTE	CANTIDAD
Proteínas (%)	20-25
Grasa (%)	4-6
Fibras (%)	4-5
Humedad max. (%)	11
Energía (kcal / kg)	4.200-4.300
Fe (ppm)	50-220

Fuente: Administración de Laboratorios e Institutos de Salud, Instituto "Dr. Carlos G. Malbrán"

Las cantidades Ca y P en los alimentos diseñados se establecieron en base a los resultados de la experiencia de Morris et al (1941), quienes fijaron los valores de 4 g/kg dieta para el calcio y de 3 a 12 g/kg dieta para el fosforo ⁽¹⁶⁾.

La secuencia metodológica de obtención del alimento fue la siguiente: se prepararon los ingredientes, según el tratamiento más adecuado para cada material, siguiendo formulaciones comunicadas previamente ⁽⁴⁾. Seguidamente se pesaron y se mezclaron con agua (25°C) hasta homogeneización. La masa obtenida se porcionó manualmente en forma de pellets que luego se secaron a 55°C

durante 20 hs. y se esterilizaron mediante luz UV. Los mismos se almacenaron hasta su uso en bolsas selladas al vacío de 0,5 kg.

Estudio experimental

Esta investigación se realizó con la aprobación del protocolo del estudio por parte del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación Res. CICUAL-Med-UNNE N° 0001/17. El muestreo se efectuó al azar simple, de ratones de la cepa Balb/c del Bioterio de la Facultad de Medicina, a partir de los nacimientos de animales machos derivados de 4 madres. La experiencia se llevó a cabo sobre tres grupos de tratamiento, según dieta: 1) Ch, 2) L y Control. El tamaño de muestra, de 30 animales, se obtuvo según calculador "Panel Book" on-line (error del 10% y nivel de confianza de 95%). A las jaulas con madres y ratones lactantes se les proveyó de los alimentos a estudiar *ad libitum* a partir de los 14 días de nacidos. A los 28 días se realizó el destete y se los separó en los grupos experimentales.

Los ratones fueron alojados colectivamente en cajas de plástico (n=5/caja) durante el ciclo día/noche y alimentados *ad libitum* según lote de estudio. La provisión de agua, previamente autoclavada, se realizó con el mismo régimen. Se comparó el desarrollo de cada grupo y el consumo de alimento por peso, durante 70 días.

A las 8 semanas de comenzada la experiencia, se realizó la CTH por recolección en mallas metálicas colocadas en cada caja durante 24 hs.

Se determinaron las curvas de crecimiento de los tres grupos, a partir del consumo de alimento vs el desarrollo de los animales y se calcularon las Tasas de cambio de peso (TCP= Peso final - Peso inicial) y las Eficiencias Alimenticias (EA = Consumo de alimento / Tasa de cambio de peso).

Se midieron las cantidades de nitrógeno en los alimentos y las heces colectadas por el método Kjeldhal y se calculó la corrección por tipo de proteína con un factor de 6,5, en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas-UNNE. Con estos resultados se estimó la digestibilidad aparente de cada alimento.

RESULTADOS

Composición nutricional de los alimentos

Como se puede observar en las Tablas 3 y 4, las dietas diseñadas en el LIBiM, cumplen con los requisitos de composición de macronutrientes y de energía, según las Normas Técnicas para Alimentos de Ratas y Ratones del Instituto "Dr. Carlos G. Malbrán" y experiencias con resultados aceptables para Ca y P.

Tabla 3: Comparación entre composición macronutrientes y energía de dieta teórica para ratas y ratones y los alimentos diseñados en el LIBiM.

NUTRIENTE	Dieta Teórica	Dieta Ch	Dieta L
Proteínas (%)	20 – 25	19,92	20,11
Grasa (%)	4 – 6	5,47	5,70
Fibras (%)	3 - 6	4,57	2,71
Humedad (max.)	11	9,66	10,78
Energía (kcal / kg)	4.200 – 4.300	3627,9	3639,7

Tabla 4: Comparación entre composición en Ca, P y Fe de dieta teórica para ratas y ratones y las dietas diseñadas en la Facultad de Medicina- UNNE.

NUTRIENTE	Dieta Teórica	Dieta Ch	Dieta L
Ca (%)	4	4,35	4,12
P (%)	3-12	6,9	6,98
Fe (ppm)	50-200	206,3	206,3

Consumo de alimento y desarrollo de los ratones

Según se muestra en la Tabla 5, los pesos de los animales al final de la experiencia no variaron en forma significativa en los tres lotes, a pesar de que el consumo de alimento fue mayor en el lote L.

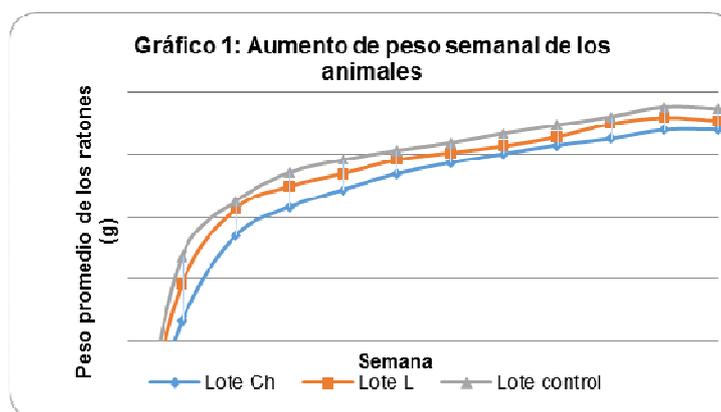
Tabla 5: Consumo de alimento y desarrollo de los ratones

	Alimento Ch	Alimento L	Alimento control
Consumo promedio de alimento (g/día)	2,8	3,7	3,18
Peso promedio final de los ratones (g)	29,74	29,03	30,70
Tasa de cambio de peso	2,18	1,74	1,63
Aumento de peso promedio (g)	16,11	12,42	11,86

De acuerdo a los resultados hallados, el Consumo promedio de alimento de los ratones mostró valores semejantes entre grupos y menor a los 5 g/día estipulados para la especie.

Las Tasas de cambio de peso (TCP) de los animales variaron según la dieta, siendo mayor la TCP del lote Ch con respecto al lote L y al control.

En el Gráfico 1, se puede observar que las curvas de crecimiento de los tres grupos de tratamiento fueron semejantes.



Eficiencia Alimenticia (EA)

EA = Consumo de alimento / Tasa de cambio de peso.

$$EA_{Ch} = 2,8 / 0,24 = 0,08 \text{ g ratón / g alimento}$$

$$EA_L = 3,7 / 0,21 = 0,05 \text{ g ratón / g alimento}$$

$$EA_{Control} = 3,18 / 0,19 = 0,06 \text{ g ratón / g alimento}$$

Según lo observado, la EA_{Ch} resultó mayor, lo que significa que por gramo de alimento Ch consumido, el animal ganó más peso que en los otros tratamientos.

Digestibilidad aparente

Los análisis de contenido (Kjeldhal) mostraron que la Dieta L contiene mayor cantidad de proteínas, seguido por el Control y luego por la Dieta Ch. Asimismo, el contenido de proteínas en la materia fecal colectada estuvo en consonancia con el porcentaje hallado en cada alimento (Ver Tabla 6).

Tabla 6: Resultados de análisis (método Kjeldhal)

	Alimento % Proteína (g/100g)	Materia Fecal % Proteína (g/100g)
Dieta Ch	23,53 ± 1,62	9,84 ± 0,17
Dieta L	25,13 ± 1,47	11,41 ± 0,26
Dieta control	24,94 ± 1,54	7,72 ± 0,42

Fuente: Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas-UNNE

Como se puede observar en la Tabla 7, en la comparación con la Dieta Ch presentó una Digestibilidad Aparente mayor.

Tabla 7: Cálculo de digestibilidad por fórmula

	Digestibilidad %
Dieta Ch	58,15
Dieta L	54,56
Dieta control	69,01

Fuente: Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas-UNNE

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Los alimentos diseñados en el LIBiM se ajustan a los requerimientos diarios de macronutrientes y energía del ratón, tanto en etapa reproductiva como de crecimiento según normativas del National Research Council Committee⁽¹⁴⁾ y recomendaciones para requerimientos de Ca y P⁽¹⁶⁾.

La colección fecal se realizó de acuerdo a Osorio Carmona y col., los que expresan en su investigación que el método de CTH requiere jaulas de colección e implica medir el consumo del alimento y realizar la colección fecal adecuadamente⁽¹⁵⁾. Los animales tuvieron un tiempo de adaptación suficiente a los alimentos antes de proceder a la CTH, como recomiendan distintos trabajos de investigación^(12,14-15).

Como muestran los trabajos de Cedeño Noblecilla⁽¹⁴⁾, Osorio-Carbona⁽¹⁵⁾ y el estudio de revisión realizado por Harmon⁽⁷⁾, estos resultados postulan que el alimento Ch (con mayor EA y DA) es mejor en su calidad nutricional y disponibilidad de nutrientes, y por lo tanto tiene mayor significancia en la salud y bienestar de los animales.

Según García y col., la digestibilidad *in vivo* se ve alterada, entre otras cosas, por la capacidad de selección del animal en función de la oferta de material, la disponibilidad de agua, la tasa de pasaje del alimento y la eficiencia metabólica animal⁽¹⁶⁾.

Si bien este estudio de digestibilidad aparente *in vivo* presenta conclusiones novedosas, sería deseable su complementación con evaluaciones de digestibilidad en el tubo digestivo *in vitro*, tal como las implementadas por Ramos Talma en 1995 en conejos⁽¹⁷⁾.

De acuerdo a los resultados obtenidos, este estudio biológico muestra mayor eficiencia alimenticia de la dieta L comparada a la Ch, al utilizarla como alimentación de ratones machos en etapa de crecimiento.

Esta investigación sienta bases para el diseño de dietas experimentales ricas en ácidos grasos w-3 de amplia aplicabilidad en investigaciones biomédicas.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Navarro Hernández CJA, Ramírez Ojeda RA, Villagrán Vélez C. Manual de Procedimientos Recomendables para la Investigación con Animales. Editorial SAMSARA. México 2012.
2. Maturral JD, Forte CR. Valoración de la calidad nutritiva y microbiológica de tres específicos de alimentos balanceados para aves utilizadas en la experimentación. Volumen especial, IX Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos. 2007.
3. Rodríguez-Cruz M, Tovar A, del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. Rev Inv Clín. 2005,57(3):457-472.
4. Romero-V PR, Colussi NA, Acevedo BA, Melana Colavita JP, Todaro JS, Aguirre MV. Optimización de tratamientos tecnológicos en el desarrollo de un alimento rico en ácidos grasos esenciales para murinos de laboratorio. Libro de artículos científicos en salud, Ed 2018. Fac Med-UNNE.
5. Valenzuela R, Barrera C, Ayala J, Sanhueza J, Valenzuela A. Vegetable oils rich in alpha linolenic acid allow a higher accretion of n-3 LCPUFA in the plasma, liver and adipose tissue of the rat. Rev. Grasas y Aceites 2014,65(2), e026. ISSN-L:0017-3495.
6. Stein HH, Fuller MF, Moughan PJ et al. Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. Livestock science, v.109, p.282-285, 2007.
7. Harmon D. Experimental approaches to study the nutritional value of foods ingredients for dogs and cats. Revista Brasileira de Zootecnia. 2007,36:251-262.
8. Giraldo A, Velasco R, Villada Héctor. Digestibilidad aparente de una harina proveniente de hojas de Yuca. Cauca. Información Tecnológica, 2008,19(1):11-18
9. Benítez V, Borgnia M, Cassini MH. Ecología Nutricional de la Vicuña (Vicugna vicugna): Un caso de estudio en la Reserva Laguna Blanca, Catamarca. Editorial Científica Universitaria, Área Ecología. Univ Nac de Catamarca. Cap 5. 2006.
10. Borgnia, M. Estudios aplicados al manejo ambiental en la Reserva Laguna Blanca, Catamarca. Ed Científica Universitaria, Área Ecología. Univ Nac Catamarca. Cap 3. ISSN:1852-3013. 2009.
11. Weber M, Bissot T, Servet E et al. High-protein, high-fiber diet designed for weight loss improves satiety in dogs. J of veterinary internal medicine, 2017,21(6):1203-1208.
12. Giraud C, Villar L, Villagra S, Cohen L. El nitrógeno fecal como indicador del estado nutricional de ovinos en pastoreo en la norpatagonia. Rev Arg de Producción Animal. 2012,32(1):1-8.
13. Cavalari AP, et al. Determinação do valor nutritivo de alimentos energéticos e proteicos utilizados em rações para cães adultos. Revista Brasileira de Zootecnia, 2006,35(5):1985-1991.
14. Cedeño Noblecilla EL. Formulación, elaboración y control de calidad de un alimento balanceado para ratones de experimentación (Mus musculus) del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH. [Tesis de grado]. Riobamba, Ecuador. 2013.

15. Osorio-Carmona E, Giraldo-Carmona J, Varvárez-Solarte W. Metodologías para determinar la digestibilidad de los alimentos utilizados en la alimentación canina. *Vet Zootec*, 2012,6(1):87-97.
16. García D et al. Digestibilidad por el Método del Indicador en Rumiantes. [En línea] 2009 [Citado:02abr2019] https://www.u-cursos.cl/veterinaria/2009/1/PG062/1/material_docente/previsualizar?id_material=552030
17. Ramos Talma MA. Aplicación de técnicas enzimáticas de digestión in vitro a la valoración nutritiva de piensos de conejos. [Tesis doctoral]. Univ Complutense Madrid, Fac Vet, Madrid, 1995.