



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

Estudio del Efecto de la Desnutrición Intrauterina sobre la Carbonilación de Proteínas de Hígado, Corazón y Cerebro de Ratas Neonatas Wistar Producto de Dos Generaciones Inmediatas Anteriores Sometidas a una Dieta Baja en Aporte de Nutrientes.

T E S I S

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN NUTRICIÓN

P r e s e n t a

ROCÍO BAÑOS GÓMEZ

Bajo la Dirección de:

Dr. Luis Delgado Olivares

Profesor Investigador de tiempo completo UAEEH-ICSa



PACHUCA, HGO.

2013

## INDICE

Índice de figuras .....	III
Índice de tablas .....	IV
Abreviaturas .....	V
1. Resumen .....	1
Abstract .....	2
2. Marco teórico.....	3
2.1 Desnutrición.....	3
2.1.1 Desnutrición en el embarazo y recién nacido.....	4
2.2 Órganos implicados en el desarrollo de enfermedades asociadas a desnutrición intrauterina .....	6
2.3 Marcador biológico de desnutrición .....	9
2.4 Estrés oxidativo y su efecto sobre las biomoléculas .....	11
2.5 Carbonilación de proteínas .....	14
2.6 Defensa antioxidante .....	17
2.7 Relación de estrés oxidativo con desnutrición .....	20
3. Problema de investigación .....	24
4. Justificación.....	25
5. Objetivo general .....	26
6. Hipótesis.....	26
7. Material y métodos .....	27
7.1 Animales y dietas.....	27
7.2 Sacrificio y extracción de órganos .....	29
7.3 Cuantificación de albúmina.....	30
7.4 Preparación de extractos proteicos.....	30
7.5 Cuantificación de proteínas .....	31
7.6 Preparación de las muestras para SDS-PAGE.....	31
7.7 Electroforesis desnaturante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	31
7.8 Tinción con azul de Coomassie.....	31
7.9 Derivatización de proteínas .....	32

7.10 Electrotransferencia de proteínas.....	32
7.11 Inmunodetección.....	32
7.12 Determinación de actividad enzimática de la catalasa.....	32
7.13 Tratamiento estadístico.....	33
8. Resultados .....	34
9. Discusión.....	43
10. Conclusiones.....	49
11. Referencias bibliográficas .....	50

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de albúmina .....	10
Figura 2. Carbonilación y derivatización de una proteína de aminoácido de cadena lateral.....	17
Figura 3. AO endógenos y exógenos .....	18
Figura 4. Orígenes y papel del EO en el desarrollo de las enfermedades .....	22
Figura 5. Secuencia experimental .....	28
Figura 6. A) Incremento de peso en ratas Wistar parentales .....	36
Figura 6. B) Porcentaje de la diferencia en peso.....	36
Figura 7. SDS-PAGE de los extractos proteicos de hígado, corazón y cerebro de ratas neonatas Wistar.....	37
Figura 8. SDS-PAGE de los extractos proteicos de hígado, corazón y cerebro de ratas Wistar parentales.....	37
Figura 9. Carbonilación de proteínas en hígado, corazón y cerebro de neonatos ....	39
Figura 10. Análisis densitométrico de las proteínas carboniladas de los neonatos...39	
Figura 11. Carbonilación de proteínas de hígado, corazón y cerebro de ratas Wistar parentales.....	41
Figura 12. Análisis densitométrico de las proteínas carboniladas en ratas Wistar parentales.....	41
Figura 13. Actividad de catalasa en hígado, corazón y cerebro de ratas neonatas Wistar .....	42
Figura 14. Actividad de la enzima catalasa en hígado, corazón y cerebro de ratas Wistar parentales.....	42

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades humanas relacionadas a EO .....	23
Tabla 2. Distribución de las dietas formuladas .....	29
Tabla 3. Consumo de alimento/rata/día .....	29
Tabla 4. Diferencia general por grupo .....	34
Tabla 5. Diferencia en peso, talla, albúmina y peso de órganos de ratas Wistar neonatas evaluadas por género y estado nutricio.....	35

## ABREVIATURAS

AO	Antioxidante(s)
BN	Baja en aporte de nutrientes
C	Control
CAT	Catalasa
GC	Grupo control
GD	Grupo desnutrido
GO	Grupo obeso
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EO	Estrés oxidativo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HC	Hembra control
HD	Hembra desnutrida
HO	Hembra obesa
MC	Macho control
MD	Macho desnutrido
MO	Macho obeso
OCM	Oxidación catalizada por un metal
RL	Radicales libres

## 1 RESUMEN

La desnutrición es una patología resultado de la deficiente incorporación de los nutrientes a las células del organismo, está determinada por la intensidad y el momento biológico en que se presente, suele tener su origen desde la gestación y lactancia, ocasiona desbalances en el metabolismo que se ven reflejados en la excesiva producción de radicales libres (RL) en el cuerpo y disminución en la respuesta antioxidante, esta acumulación de RL ocasiona carbonilación de proteínas en el organismo, lo cual genera un daño en numerosos órganos y tejidos, que son la causa del progreso y desarrollo de enfermedades como: cáncer, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares (ECV), enfermedades neuronales (Alzheimer y Parkinson, entre otras) que deterioran la calidad de vida de la población. La presente tesis tuvo como objetivo la determinación de proteínas carboniladas de hígado, corazón y cerebro de ratas neonatas Wistar, producto de dos generaciones inmediatas anteriores sometidos a una dieta baja en aporte de nutrientes, con el fin de determinar la relación de la desnutrición con el incremento en los niveles de estrés oxidativo (EO). Los resultados de esta tesis indicaron que los neonatos con desnutrición presentaron una disminución en los parámetros estudiados con respecto al control, lo cual se observó con la  $p < 0.05$  en peso ( $4.84 \pm 1.00$  vs.  $7.65 \pm 0.48$ ), talla ( $6.19 \pm 0.44$  vs.  $7.55 \pm 0.32$ ), albúmina sanguínea ( $1.60 \pm 0.58$  vs.  $2.92 \pm 0.84$ ), así como del peso de hígado ( $195.38 \pm 39.99$  vs.  $295.72 \pm 43.02$ ), corazón ( $37.88 \pm 9.11$  vs.  $51.88 \pm 5.29$ ) y cerebro ( $240.65 \pm 30.36$  vs.  $336.92 \pm 16.50$ ), también se observó incremento de la expresión proteica en hígado y corazón, además aumento en los niveles de carbonilación proteica en el hígado, corazón de hembras desnutridas y cerebro de machos desnutridos. En conclusión, la exposición de dos generaciones inmediatas anteriores a desnutrición conlleva a daño oxidativo en los órganos del cuerpo, lo cual contribuye a la disfunción de los mismos y predisposición a numerosas enfermedades, que afectarán la vida adulta del individuo.

Palabras clave: desnutrición, carbonilación, estrés oxidativo

## **ABSTRACT**

Undernutrition is an important pathology result of poor incorporation of nutrients to the body's cells, it is determined by the biological moment and intensity in which it occurs, it usually has its origin from the gestation and lactation, it causes imbalances in metabolism which are reflected in the excessive production of free radicals (FR) in the body and decreases in antioxidant response, this accumulation of free radicals causes protein carbonylation in the body, which results in damage to numerous organs and tissues, that is the cause of progress and development of diseases such as cancer, diabetes, hypertension, cardiovascular disease (CVD), neuronal diseases (Alzheimer's, Parkinson's, etc.) that impair the quality of life of the population. The present thesis was aimed at determining carbonylated proteins from liver, heart and brain in neonatal Wistar rats, whose parents were subjected to a low nutrients diet, in order to determine the relationship between undernutrition and increase of oxidative stress (OS) levels. The results indicated that neonates with undernutrition showed a decrease in the studied parameters which could be observed by the  $p < 0.05$  in weight ( $4.84 \pm 1.00$  vs.  $7.65 \pm 0.48$ ), height ( $6.19 \pm 0.44$  vs.  $7.55 \pm 0.32$ ), serum albumin ( $1.60 \pm 0.58$  vs.  $2.92 \pm 0.84$ ), such as the weight of the liver ( $195.38 \pm 39.99$  vs.  $295.72 \pm 43.02$ ), heart ( $37.88 \pm 9.11$  vs.  $51.88 \pm 5.29$ ) and brain ( $240.65 \pm 30.36$  vs.  $336.92 \pm 16.50$ ), also it was possible to observe an increase in protein expression in liver and heart, as well as an increase in levels of protein carbonylation in liver, while the carbonyl proteins increase in heart of the undernourished female and in the brain of the undernourished male. In conclusion, the exposure of undernutrition of two generations immediate, leads to oxidative damage in the organs of the body, which contributes to the dysfunction of these and predisposition to many diseases which will affect in the adulthood.

Key Words: undernutrition, carbonylation, oxidative stress

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Desnutrición

La desnutrición se define como el estado patológico, inespecífico, sistémico y potencialmente reversible que se origina como resultado de la deficiente incorporación de los nutrientes a las células del organismo, se debe a la falta de ingestión de alimentos, al aumento de los requerimientos, al gasto excesivo de energía o a la combinación de los tres. La desnutrición está determinada por factores ambientales, genéticos y neuroendócrinos; así como por el momento biológico en el que se encuentra el individuo (Parra-Gómez *et al.*, 2003; Toussaint-Martínez y García-Aranda, 2008).

La desnutrición se puede clasificar en base a los factores que la causan, como primaria, secundaria y mixta.

- **Desnutrición primaria:** se debe a la ingesta de una dieta baja en aporte de nutrientes en relación con las necesidades nutricias básicas, ya sea porque éstos no se encuentren disponibles o porque aunque existan no se consumen. Por lo general tiene origen socioeconómico y cultural, así mismo se relaciona con un insuficiente poder adquisitivo.
- **Desnutrición secundaria:** se produce cuando el alimento no es consumido o no es debidamente utilizado por el organismo. Se origina en alteraciones fisiopatológicas que interfieren con la ingestión, digestión, absorción o utilización de nutrientes, que elevan anormalmente los requerimientos energéticos, de regeneración tisular y/o que producen un catabolismo excesivo.
- **Desnutrición Mixta:** La desnutrición mixta se presenta cuando existen tanto factores primarios como secundarios, que se adicionan o potencian (Calzada-León, 1998).

La desnutrición energético proteica es una enfermedad de proporciones mundiales, cerca del 15% de los niños recién nacidos presentan bajo peso al nacer, mientras que 27% no alcanzan la talla normal. Por otro lado, tan solo el 37% de los niños menores de 6 meses reciben lactancia materna exclusiva, la ausencia de esta práctica en México eleva la probabilidad de que el recién nacido padezca desnutrición, que es responsable de más de un tercio de las muertes infantiles en el mundo (UNICEF, 2012).

En México alrededor del 7% de los recién nacidos presentan peso bajo, la prevalencia de desnutrición crónica medida por el retraso en el crecimiento (talla para la edad) es del 12.7%, lo que equivale a 1, 200,000 niñas y niños menores de cinco años en esta condición, mientras que en las zonas rurales alcanza más del doble con un 25.6% (UNICEF, 2011 y 2012).

Durante cada momento de la existencia, la nutrición está ligada con el fenómeno biológico del crecimiento en un equilibrio que puede manifestarse por el aumento, mantenimiento o disminución de la masa y del volumen que forman al organismo en relación con el momento previo, así como por la adecuación a los requerimientos nutricios y energéticos del cambio de forma, función y composición corporal (Casanueva y Flores-Quijano, 2008).

### **2.1.1 Desnutrición en el embarazo y recién nacido**

El embarazo es un periodo de relevancia nutricia, ya que la mujer gestante requiere una cantidad adicional de nutrientes para cubrir sus necesidades nutricias de mantenimiento, las del feto para la formación de nuevas estructuras y para la producción de leche materna, que deberá ser el único alimento del recién nacido durante los primeros meses de vida, de no cumplirse se convierte en uno de los principales factores que fomentan la desnutrición, además de la ablactación tardía y el uso de alimentos con escasa proporción de energía y proteínas.

Una dieta baja en aporte de nutrientes durante el embarazo compromete la salud del feto, pues éste se alimenta de los nutrientes que ingiere la madre gestante a través

de la dieta, en caso de que los nutrientes ingeridos sean insuficientes para cubrir las necesidades de crecimiento y desarrollo, se genera la movilidad y utilización de reservas maternas, sin embargo si el estado nutricional pre-gestacional era inadecuado, la consecuencia final es una afección en la maduración y desarrollo del feto (Casanueva y Flores-Quijano, 2008).

En este sentido, los estudios experimentales en ratas gestantes a las cuales se les manipula nutricionalmente, han reportado más detalladamente los efectos de la desnutrición intrauterina, las investigaciones sugieren que cuando el suministro de nutrientes materno-placental no coincide con la demanda de nutrientes fetal, se desencadena una “programación fetal” como mecanismo de respuesta permanente o adaptación ante la restricción a la que se somete el organismo. El problema inmediato para el feto es la supervivencia y para asegurarla puede dar lugar a cambios permanentes tales como:

- La morfología de órganos
- Modificación de las funciones metabólicas, endocrinas y la fisiología
- Aumenta el número de abortos y nacimientos prematuros
- Disminuye el número de individuos en la camada
- Se presenta retardo en el crecimiento y bajo peso al nacer

Todo lo anterior tiene implicaciones en el desarrollo y progreso de enfermedades en la vida adulta, tales como la enfermedad coronaria, la hipertensión, la diabetes tipo 2, el síndrome de resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares (Godfrey y Barker, 2000; Kwong et al., 2000; Langley-Evans, 2001). Estos estudios han establecido que la gestación y lactancia son periodos de particular importancia, pues las consecuencias de la desnutrición son irreversibles para el niño aún con una adecuada nutrición posnatal (Langley-Evans, 1996 y 2001; Lizarraga-Mollinedo *et al.*, 2012).

Los niños que fueron víctimas de desnutrición durante la gestación y/o lactancia son más vulnerables a infecciones, lo que los lleva a enfermarse con frecuencia y como resultado a desarrollar una serie de problemas que afectan progresivamente su salud

física y mental. Un niño con desnutrición en primera instancia disminuye su capacidad cognitiva e intelectual, desarrolla trastornos de la coordinación muscular y del lenguaje, y de esta forma presenta bajo rendimiento escolar, reducción del aprendizaje y de habilidades para la vida (Parra-Gómez *et al.*, 2003), lo cual limita la capacidad del niño de convertirse en un adulto capaz de contribuir (a través de su evolución humana y profesional) al progreso de su comunidad y de su país. Finalmente el ciclo de la pobreza, desnutrición y enfermedad se perpetúa de generación en generación. (UNICEF, 2009).

La desnutrición ocasiona cambios bioquímicos, fisiológicos y anatómicos en el cerebro como en otros órganos y tejidos, comprometiendo de esta manera el funcionamiento del organismo, lo cual puede afectar de tal manera que lleve al sujeto que la padece a desarrollar un sin número de enfermedades (Szitányi *et al.*, 2003; Joannette *et al.*, 2004).

## **2.2 Órganos implicados en el desarrollo de enfermedades asociadas a desnutrición intrauterina**

Los efectos de la desnutrición en los diferentes órganos y sistemas son múltiples, es conocido que órganos como el corazón y el hígado pueden perder hasta un 30% de su peso habitual, también es posible que órganos como riñones, páncreas o bazo presenten reducción de tamaño, aunque el impacto es de menor intensidad (Gil-Hernández, 2010). Además se ha reportado que a nivel neurológico la desnutrición afecta severamente la función cerebral (Leiva-Plaza *et al.*, 2001). Es por ello que entre los órganos más afectados durante la desnutrición intrauterina, son los siguientes:

- **El hígado**

Cumple con más de 1,500 funciones químicas en el organismo, entre las más importantes se considera la formación y secreción de bilis, el metabolismo de vitaminas, aminoácidos, glucosa, lípidos (ácidos grasos, colesterol y lipoproteínas) y proteínas plasmáticas (albúmina, globulinas, protrombina, fibrinógeno), la

inactivación de hormonas, tóxicos y esteroides, así como el almacenamiento de glucógeno, vitaminas (A, D, E, K, B12) y minerales (hierro y cobre) (Segarra, 2006).

Cuando una mujer presenta desnutrición durante la gestación, el hígado del recién nacido desarrolla alteraciones metabólicas que se pueden presentar de forma tardía o temprana y que dejan su organismo vulnerable a infecciones, dichas alteraciones pueden ser la reducción en la síntesis de proteínas, elaboración de metabolitos anormales de aminoácidos, disminución de la gluconeogénesis y menor secreción de sales biliares, además de la ineficiente degradación de sustancias tóxicas y de desecho, todas estas afecciones hepáticas contribuyen al aumento de los niveles de estrés oxidativo (EO) y lipoperoxidación. La desnutrición energético proteica ha sido asociada a hígado graso y resistencia a la insulina, esta última es considerada como el origen del síndrome metabólico y diabetes tipo 2, incluyendo sus complicaciones (Parra-Gómez *et al.*, 2003; Szitányi *et al.*, 2003; Toussaint-Martínez y García-Aranda, 2008).

- **El corazón**

Es el órgano principal del sistema circulatorio, irriga sangre a todos los tejidos del cuerpo a través de los vasos sanguíneos. La sangre circula por capilares, venas y arterias, transportando nutrientes, oxígeno, dióxido de carbono y hormonas, además recoge residuos y desechos para ser eliminados (Guyton, 1975).

El organismo de una mujer embarazada en condiciones de desnutrición puede modificar el desarrollo del feto adaptándolo a sobrevivir en un ambiente en escases de recursos, de ésta forma el peso corporal y el de su corazón se reduce, la fibra muscular es más pequeña y se atrofia, se disminuye el gasto cardíaco (cantidad de sangre que es capaz de bombear el corazón en un tiempo determinado) y la fuerza con la que expulsa la sangre hacia los tejidos, la circulación se altera bloqueando el paso de sangre por los vasos sanguíneos, lo que impide el transporte de nutrientes y ocasiona la acumulación de tóxicos en el torrente sanguíneo y el cerebro (Touchette, 2001; Toussaint-Martínez y García-Aranda, 2008).

Las lesiones cardíacas dadas por desnutrición representan uno de los principales factores que contribuyen al desarrollo y progreso de enfermedades cardiovasculares (ECV) (Ribarič, 2012). De acuerdo a la OMS (2012), las ECV son la principal causa de defunción en el mundo, siendo la población de medianos y bajos ingresos los más afectados, como consecuencia de la desnutrición a la que están expuestos. Se ha documentado que las enfermedades de éste tipo relacionadas con desnutrición se desarrollan desde el embarazo y entre ellas se encuentran:

- Cardiopatía coronaria: enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco (miocardio), estudios epidemiológicos vinculan la talla baja y el bajo peso al nacer como factor de riesgo de desarrollar esta enfermedad (OMS, 2012).
- Hipertensión o hipotensión: se han reportado como consecuencia de desnutrición intrauterina (Langley-Evans, 1996 y 2001).

- **El cerebro**

El cerebro procesa la información sensorial (oído, gusto, tacto, vista, olfato), controla y coordina las habilidades motoras (movimiento de músculos y esqueleto), las funciones corticales superiores (inteligencia, aprendizaje, lenguaje, memoria, conducta, razonamiento, sueños, sentimientos y emociones) y es responsable de llevar a cabo funciones corporales homeostáticas (los latidos del corazón, la presión sanguínea, el balance de fluidos y la temperatura corporal) (Morrison *et al.*, 1970).

Las agresiones por desnutrición en el cerebro dependen del momento en que ésta se presente, así como de la duración e intensidad. La desnutrición en la etapa prenatal y en la infancia provocan los estragos más lamentados por una sociedad, ya que debido a la inmadurez funcional y metabólica del niño al momento del nacimiento, su cerebro sufre un gran impacto en el crecimiento y maduración, así como en la conducción de estímulos nerviosos, además de presentar menor diámetro craneal, atrofia del cerebro y de las funciones cerebrales relacionadas con el desarrollo motor, intelectual y aprendizaje. Si el niño no recibe una adecuada ingesta de nutrientes y estimulación sensorial desde la etapa fetal se afecta en general el desarrollo

neuronal y del sistema nervioso central (Leiva-Plaza *et al.*, 2001; Ortiz-Andrellucchi *et al.*, 2006).

En resumen, durante el crecimiento del feto el organismo pasa por un llamado periodo crítico de crecimiento de tejidos con mayor división celular, el cual puede verse afectado ante la restricción nutricia y el organismo recibe daños irreparables (Szitányi *et al.*, 2003), además de inducir un incremento de la susceptibilidad fetal a sufrir cambios morfológicos y funcionales de las células beta del páncreas, en adición con una resistencia a la insulina, generando un evidente factor de riesgo para el neonato en su vida adulta, así como en su descendencia de padecer enfermedades crónicas no trasmisibles (ECNT) tales como diabetes tipo 2, hipertensión, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico, desordenes en el metabolismo del colesterol, obesidad entre otras. Es por ello que se sugiere que el deficiente aporte calórico y proteico de la dieta durante el embarazo está relacionada con el futuro estado de salud del individuo (Parra-Gómez *et al.*, 2003; Szitányi *et al.*, 2003; Joannette *et al.*, 2004; Laborie *et al.*, 2011).

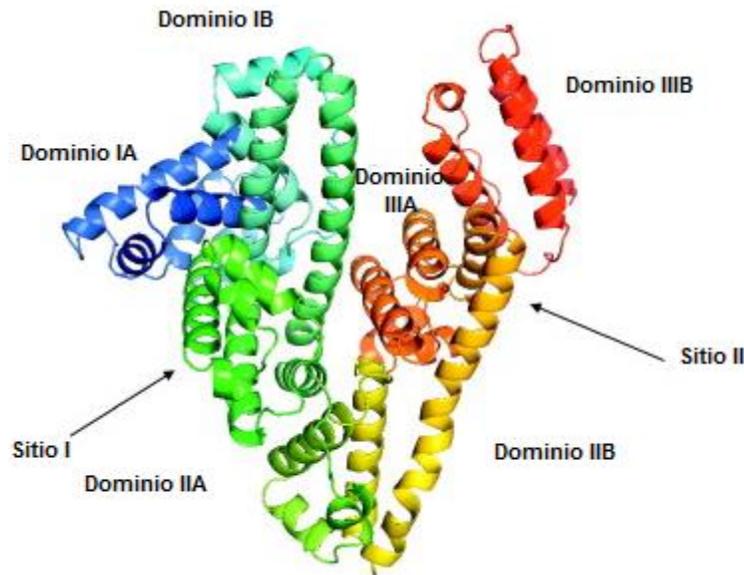
### **2.3 Marcador biológico de desnutrición**

El grado de desnutrición de un individuo puede ser determinado mediante la evaluación de la albúmina en suero, ésta es una proteína formada por 610 aminoácidos organizados en una cadena polipeptídica simple, doblada sobre sí misma en varias capas y con peso molecular de 66.248 kDa (figura 1).

La albúmina sanguínea representa la mayor fracción proteica del plasma, es aproximadamente el 60% del total de proteínas séricas. En un recién nacido los valores normales de esta proteína en suero sanguíneo oscilan entre los 2.9 y 5.5 g/dL (Traber, 1992; Mora, 2002; Garrido *et al.*, 2006), mientras en una rata el rango de normalidad se considera alrededor de los 3.4 g/dL (González-Mendoza y Vicuña-Fernández, 2003).

El sitio de síntesis de la albúmina es el hígado, a una tasa de 12 gramos/día, es una proteína muy estable de carácter ácido y muy soluble que carece de carbohidratos.

La albúmina tiene varias funciones esenciales en el organismo, contribuye en un 80% a mantener la presión osmótica, la cual proporciona la fuerza para mantener los fluidos en el interior vascular; otra función es el transporte de nutrientes (aminoácidos, ácidos grasos) y mensajeros en células (bilirrubinas, enzimas y hormonas) y proteger el medio interno de sustancias tóxicas.



**Figura 1.** Molécula de albúmina, presenta diferentes sitios de unión para moléculas activas, por medio de los cuales lleva a cabo la función de transporte de nutrientes y medicamentos (Modificado de Banerjee *et al.*, 2012).

El examen de albúmina sanguínea mide la concentración de esta proteína en suero (la porción líquida y transparente de la sangre), la hipoalbuminemia es una situación frecuente en la práctica clínica y puede ser causada por la reducción en la absorción de aminoácidos como resultado de la desnutrición (Traber, 1992; Mora, 2002; Garrido *et al.*, 2006). Este examen para determinar hipoalbuminemia ha sido reconocido como una medida válida para evaluar desnutrición cuando se descarta síndrome nefrótico o enfermedad hepática (Dusingize *et al.*, 2012).

## 2.4 Estrés oxidativo y su efecto sobre las biomoléculas

Se entiende por EO como la exposición de un ser vivo al desequilibrio entre sustancias pro-oxidantes y mecanismos AO, este desequilibrio tiene lugar ya sea por un déficit de defensas AO o un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Éstas últimas son moléculas radicales y no radicales generadas durante el metabolismo celular del oxígeno, principalmente en la mitocondria (Venereo-Gutiérrez, 2002; Dalle-Donne *et al.*, 2003b; Moldovan *et al.*, 2006; Andrezza *et al.*, 2009).

De manera habitual el oxígeno se encuentra en su forma más estable ( $O_2$ ), y es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja ( $<35^\circ C$ ), es un elemento imprescindible para el metabolismo de nutrientes y función del organismo. En la mitocondria de las células durante la fosforilación oxidativa se metaboliza la mayor parte del oxígeno con la formación de agua, mientras que un pequeño porcentaje forma las ERO, que son considerados intermediarios altamente tóxicos (Avello y Suwualsky, 2006), pero que juegan un importante papel en procesos celulares tan fundamentales como la proliferación (Burdon, 1996), la señalización intracelular (Finkel, 2001), y la expresión de genes (Brandes, 2003).

Las principales ERO o sustancias pro-oxidantes son:

- **Radicales primarios:** directamente derivados del oxígeno, se caracterizan por tener una vida media muy corta, por lo que deben reaccionar enseguida de formarse, y son: el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el óxido nítrico (NO) y el más reactivo el radical hidróxilo ( $HO\cdot$ ).
- **Radicales secundarios:** derivados de la reacción de 2 primarios entre sí o de los primarios con otras moléculas orgánicas (lípidos, sacáridos o proteínas). Poseen una vida media un tanto más larga que los primarios, por lo cual son mucho más estables. Son el radical peroxilo ( $ROO\cdot$ ) y alcoxilo ( $RO\cdot$ ).

- **Intermediarios estables relacionados con ERO:** Son especies químicas generadoras de RL o que resultan de la reducción o metabolismo de ellos, entre estos intermediarios se consideran: el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, hidroperóxidos orgánicos y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Roche-Collado y Romero-Alvira, 1994; Venereo-Gutiérrez, 2002).

Como ya se mencionó las ERO son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos en RL (átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre), por lo que son muy reactivos, tienden a captar un electrón de moléculas estables para alcanzar la estabilidad bioquímica propia, transformando o inhabilitando de esta forma a la molécula que le cedió el electrón. A éste proceso de pérdida de electrones se le conoce como oxidación (Rodríguez-Perón, 2001; Duarte-Díaz *et al.*, 2003; Halliwell, 2006).

Los RL se pueden generar a nivel extracelular e intracelular:

- **RL que proceden del interior:** tienen la función fisiológica de participar en la defensa frente a infecciones, desactivando y eliminando bacterias, hongos, parásitos y antígenos; en condiciones normales estos radicales no dañan a las células mientras la defensa AO de éstas funcionen correctamente.
- **RL que proceden del exterior:** se generan por el metabolismo de ciertas sustancias, por radiaciones, contaminación, shock térmico, por el humo de cigarrillos, realizar ejercicio extenuante, llevar una dieta hipercalórica o una dieta insuficiente en AO, entre otros.

Cuando el aumento del contenido intracelular de RL sobrepasa la defensa AO de la célula, se produce el EO, que conduce a una respuesta inflamatoria, que puede dañar todos los tipos de biomoléculas celulares: DNA, lípidos y proteínas (Delgado-Olivares *et al.*, 2010; Dimitrova-Shumkovska *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2010).

- **Oxidación ADN**

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es el material genético de todos los organismos celulares, está constituido por dos cadenas de nucleótidos, se encuentra en el núcleo de la célula (en los eucariotas) y contiene la información necesaria para dirigir la síntesis de proteínas y la replicación (Berg *et al.*, 2008). Cualquier daño por inactivación o pérdida de algunos genes supresores de tumores, pueden conducir a la producción de bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, o la pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001).

- **Oxidación de Lípidos**

Los lípidos están formados por unidades estructurales más pequeñas llamadas ácidos grasos, muchos de ellos se sintetizan en nuestro organismo, pero existen otros que denominados esenciales (AGEs) que el organismo no puede sintetizar, por lo que deben obtenerse por medio de la dieta; su función es fundamentalmente la formación de membranas celular y energética. Éstos son la reserva de combustible más importante del cuerpo (Kew *et al.*, 2004).

El daño en lípidos se conoce como peroxidación lipídica, que afecta estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), componentes esenciales de la membrana celular. Al haber oxidación de éstos, se afecta la permeabilidad de la membrana produciéndose edema y muerte celular (Venereo-Gutiérrez, 2002; Tsaluchidu *et al.*, 2008).

- **Oxidación de Proteínas**

Las proteínas son el componente básico de todas las células vivas. Representan las tres cuartas partes del peso seco de la mayoría de las células del organismo. Las proteínas intervienen en la formación de hormonas, enzimas, anticuerpos, neurotransmisores, transportadores de nutrientes y otras sustancias esenciales para la vida. Su función en primer lugar es estructural y en último lugar energética. Son

moléculas de enorme tamaño formadas por la unión de moléculas más sencillas llamadas aminoácidos (aa) (Buttriss, 2000). La degradación de proteínas es un proceso metabólico básico en la célula viva, que consiste en la fragmentación de la proteína en sus unidades básicas los aa y formación de grupos carbonilo en residuos de aa. (Roche-Collado y Romero-Alvira, 1994; Tamarit *et al.*, 1998).

Aunque la investigación de biomoléculas se había centrado principalmente en DNA y lípidos, en los últimos años diversos estudios han mostrado la importancia de la oxidación de proteínas en procesos celulares como envejecimiento y ciertas patologías, es por ello que resulta importante profundizar acerca de la oxidación proteica y su papel en el desarrollo de diversas enfermedades (Berlett y Stadtman, 1997; Dalle-Donne *et al.*, 2003b; Dalle-Donne *et al.*, 2006; Tomic *et al.*, 2012).

## 2.5 Carbonilación de proteínas

En general cualquier factor que ocasione EO puede causar oxidación proteica, por ejemplo la disminución en la eficiencia de los sistemas AO de defensa, el aumento en la producción de ERO, disminución en la capacidad de reciclar las proteínas oxidadas o un aumento en la susceptibilidad de las proteínas por ser oxidadas. Aunque en ocasiones esta oxidación constituye una forma de activar o desactivar proteínas que tienen una función en la regulación redox (Glutacionilación y S-nitrosilación). La oxidación de las proteínas puede causar una modificación de su estructura o actividad, y puede ser clasificada en:

- **Reversible:** donde los mecanismos de reparación pueden revertir el daño.
- **Irreversible:** donde no existen mecanismo de reparación. El daño ocasionado por la reacción de proteínas con ERO, algunos de los cuales son RL generados por radiación ionizante o por oxidación catalizada por un metal (OCM). Este tipo de daño se produce por 4 mecanismos: carbonilación, nitración, formación de enlaces proteína-proteína y ruptura de enlaces peptídico (Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006).

La carbonilación es un indicador de oxidación no específico, analíticamente es el más factible de medición pues ocurre con mayor frecuencia en varios órdenes de magnitud comparado con otros marcadores de oxidación. Además de que la carbonilación representa un marcador de oxidación proteica más severo y estable (Beal, 2002; Tomic *et al.*, 2012).

La carbonilación resulta en la formación de grupos carbonilo (aldehído y cetona) en algunos residuos de aminoácidos (Rajesh *et al.*, 2004), principalmente en prolina, arginina, lisina y treonina (Dalle-Donne *et al.*, 2003a; Nyström, 2006). La introducción o formación de estos grupos carbonilo dentro de una proteína puede ser resultado de una variedad de reacciones de oxidación, pero la OCM parece ser la principal causa, la cual se produce por la reacción de Fenton, en ella el intermediario peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) reacciona en presencia de metales de transición tales como hierro ( $Fe^{+2}$ ) y cobre ( $Cu^{+2}$ ), produciendo al radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), responsable de las oxidaciones de aminoácidos en las proteínas, etapa previa a su degradación *in vivo* (Rajesh *et al.*, 2004; Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006; Dowling *et al.*, 2006).

Mientras que las proteínas moderadamente carboniladas son degradadas por el proteasoma, las proteínas fuertemente carboniladas tienden a formar agregados de alto peso molecular, que son resistentes a la degradación y se acumulan como proteínas dañadas o desplegadas. Tales agregados pueden inhibir la actividad del proteasoma y acumularse en los tejidos, esto último se encuentra directamente asociado con el envejecimiento y condiciones patológicas (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006).

El aumento gradual en la formación de grupos carbonilo en las proteínas es un proceso que ocurre en los seres vivos como parte natural del envejecimiento, pues las células más jóvenes parecen ser menos susceptibles de carbonilación. El envejecimiento comprende un fenómeno que afecta a los órganos y los sistemas y resulta en un aumento de la vulnerabilidad de padecer enfermedades. Sin embargo, los niveles elevados de grupos carbonilo de las proteínas incluso en la juventud ha

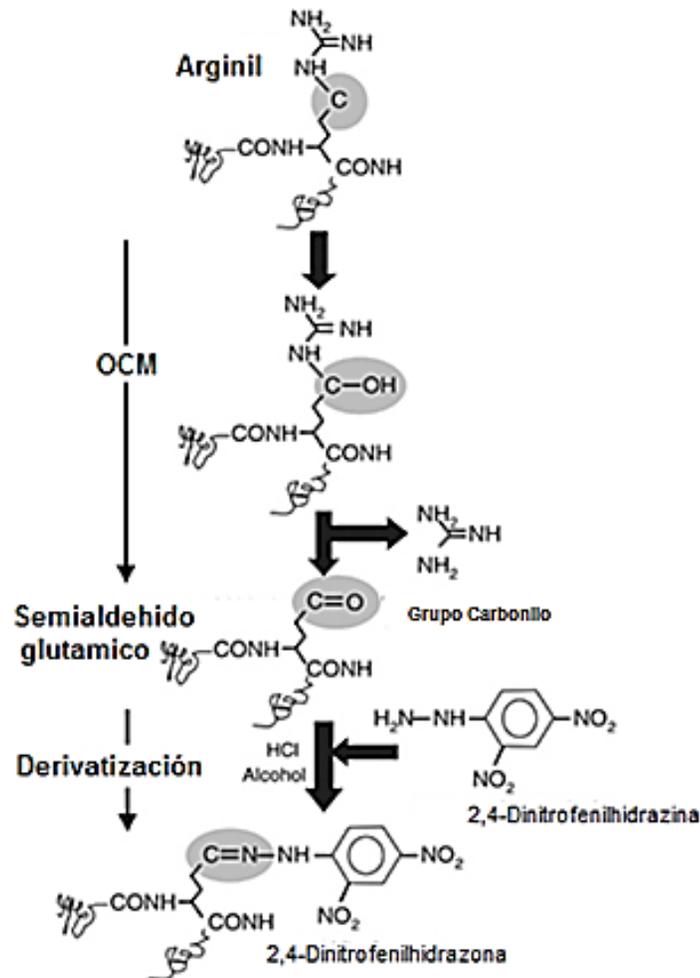
sido asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas Alzheimer, Parkinson, diabetes, artritis reumatoide, distrofia muscular, cataractogénesis, tumor renal, uremia, displasia broncopulmonar y esclerosis lateral amiotrópica entre otras (Berlett y Stadtman, 1997; Dalle-Donne *et al.*, 2003b; Rajesh *et al.*, 2004; Nyström, 2006; Mendoza-Núñez *et al.*, 2009)

La determinación de proteínas carboniladas puede servir como un biomarcador para monitorear la magnitud del daño por EO, ya que las proteínas dañadas pueden ser detectadas mediante técnicas de inmunodetección aprovechando el hecho de que los grupos carbonilo generados pueden reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidrazona y este grupo puede ser reconocido por el anticuerpo anti-2,4-dinitrofenol (Tamarit *et al.*, 1998; Dowling *et al.*, 2006).

En la figura 2 se presenta la formación de semialdehído glutámico a partir de un residuo de arginina como consecuencia de un OCM. Para la detección del grupo carbonil, en este caso semialdehído glutámico se derivatiza con 2,4-dinitrofenilhidrazina. El grupo resultante, 2,4-dinitrofenilhidrazona puede ser detectado por anticuerpos monoclonales y policlonales.

La etiología y riesgo de desarrollar alguna enfermedad se encuentra en la excesiva y descontrolada producción de RL en los distintos tejidos y órganos, causada precisamente por la deficiencia de AO endógenos y el consumo de los nutrientes fundamentales para que el organismo realice sus funciones biológicas vitales (Dalle-Donne *et al.*, 2003b; Tarry-Adkins *et al.*, 2008).

El estado nutricional influye en la producción de EO y tiene repercusiones en la salud durante el desarrollo de diversas enfermedades y el envejecimiento. En términos de influencia ejercida por el estado nutricional, se ha demostrado que la deficiencia de algunos macronutrientes (proteínas) y micronutrientes (selenio, zinc, cobre, magnesio, así como vitaminas A, C y E) afectan significativamente el sistema antioxidante (AO) y por consiguiente favorecen el EO (Mendoza-Núñez *et al.*, 2009).



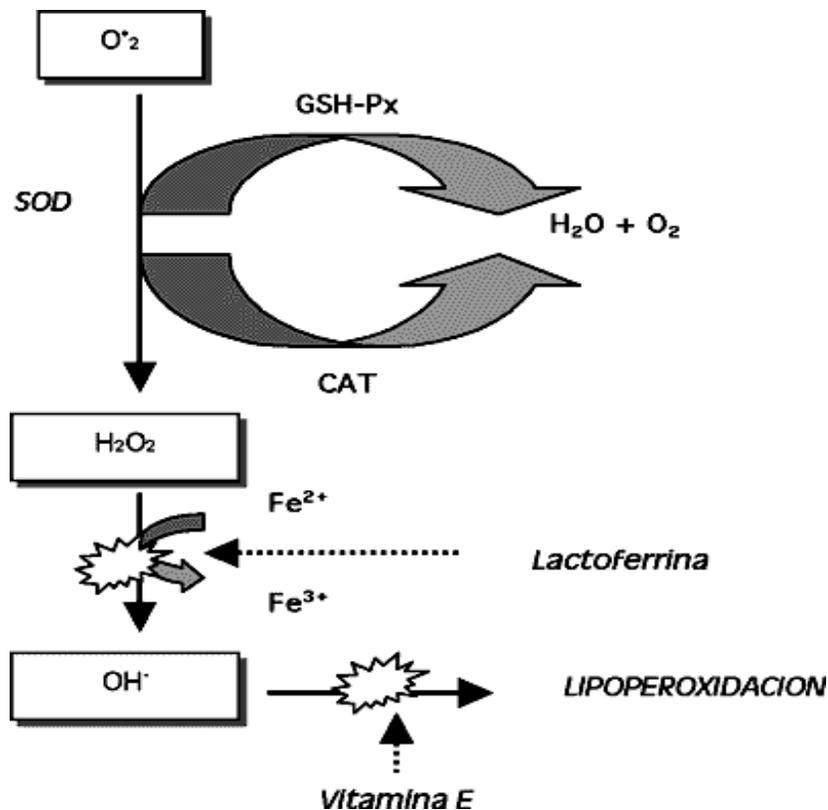
**Figura 2.** Carbonilación y derivatización de una proteína de aminoácido de cadena lateral (Modificado de Nyström, 2006).

## 2.6 Defensa antioxidante

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una elevada defensa contra las ERO que cumpla con dos funciones básicas, impedir la formación de RL y/o neutralizarlos una vez que han sido formados (Figura 3). Este sistema de defensa está integrado por AO, que son un grupo de moléculas que al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación.

Los AO neutralizan la acción oxidante de los RL y otras ERO mediante la liberación de electrones en un determinado microambiente (membrana plasmática, citosol,

núcleo, líquido extracelular), los AO se transforman en un RL débil no tóxico que en algunos casos puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros AO, de esta manera sacrifican su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas como lípidos, proteínas y ADN (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001; Venereo-Gutiérrez, 2002; Avello y Suwualsky, 2006).



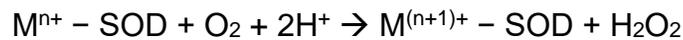
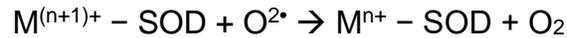
**Figura 3.** AO endógenos y exógenos. Son mecanismos de defensa contra los daños producidos por las ERO (Tomado de Castillo *et al.*, 2001).

- **Antioxidantes Endógenos**

Son producidos por el organismo y forman parte del mecanismo AO de defensa. Entre las principales enzimas AO se encuentran:

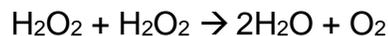
- **La superóxido dismutasa (SOD):** se encuentra en el citosol, en el espacio inter-membranoso mitocondrial y en la matriz mitocondrial, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 31-32 kDa, formada por un grupo de enzimas metaloides Zn-SOD, Cu-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD; contienen zinc, cobre, manganeso y hierro

respectivamente. Ésta enzima se especializa en captar el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y descomponerlo en productos inofensivos (oxígeno molecular y  $H_2O_2$ ) (García-Triana *et al.*, 1995).



Donde M =es el mineral Zn, Cu, Mn, Fe

- **La catalasa (CAT):** es una de las enzimas más abundantes y de amplia distribución en el organismo humano, se localiza a nivel celular en mitocondrias, peroxisomas y citosol, su peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kDa. Se encarga de neutralizar grandes cantidades de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), por lo que se esperaría que tuviese efecto protector sobre las proteínas frente a la OCM, sin embargo se ha reportado que ante la excesiva formación de  $H_2O_2$  (intermediario ERO), como en el EO se inhibe su actividad (Céspedes-Miranda *et al.*, 1996). Se ha reportado que la desnutrición intrauterina modifica la actividad enzimática de la CAT en en el cordón umbilical, placenta, corazón, riñones y suero sanguíneo (Biri *et al.*, 2006; Thompson y Al-Hasan, 2012).



Donde  $H_2O_2$ = peróxido de hidrógeno

- **La glutatión-peroxidasa (GPx):** se puede localizar en la mitocondria y el citosol de la célula hepática, su peso molecular oscila entre los 22-25 kDa, cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a lipoperóxido (L-OOH) usa como agente reductor al glutatión reducido (Cisneros-Prego *et al.*, 1997).



Donde GSH= glutatión reducido

- **Antioxidantes Exógenos**

Se trata de moléculas no sintetizadas por el propio organismo sino que son aportados por la dieta, que actúan como moléculas de defensa, ya que se oxidan al

neutralizar al radical libre. Se encuentran principalmente en frutas y verduras, estos AO incluyen vitaminas (E, C y carotenoides) y minerales (zinc, cobre, magnesio y selenio). El radical hidroxilo puede ser neutralizado por la vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, que es un AO efectivo y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente importante. También la vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical  $\text{OH}\cdot$  (Céspedes-Cabrera y Sánchez-Serrano, 2000; Venereo-Gutiérrez, 2002; Avello y Suwualsky, 2006).

La desnutrición puede tener una influencia en la función enzimática, provocando una deficiente eliminación de radicales libres (RL), programando negativamente la defensa AO de órganos y tejidos y dando como resultado el desarrollo de alguna patología causada por EO en edad prematura, pero que tendrá repercusiones en toda su vida (Szitányi *et al.*, 2003; Mendoza-Núñez *et al.*, 2009).

## **2.7 Relación de estrés oxidativo con la desnutrición en neonatos**

Durante el periodo intrauterino el feto obtiene los nutrientes requeridos en una forma inmediatamente utilizable a través de la placenta, debido a este mecanismo el feto no tiene que metabolizar alimentos ni tampoco requiere de un sistema excretor. Sin embargo al nacer el niño debe cubrir sus requerimientos nutrimentales por medio de la alimentación con leche materna, los nutrientes ingeridos en la leche son metabolizados en el tubo digestivo y transportados por la sangre en forma de moléculas más sencillas a las células del cuerpo, ahí liberan energía por medio de reacciones químicas que tienen lugar principalmente en la mitocondria (catabolismo) en presencia de oxígeno, parte de la energía se utiliza para la propia actividad celular y otra parte se disipa en forma de calor. El catabolismo de estos nutrientes también produce desechos como agua, dióxido de carbono, ácido úrico y ERO que son excretadas del organismo. Las células utilizan una parte de la energía liberada para la síntesis de nuevas moléculas (anabolismo) tales como ADN y proteínas, a partir de aminoácidos que se utilizan para el crecimiento y renovación de células muertas (Belart-Rodríguez, 2007).

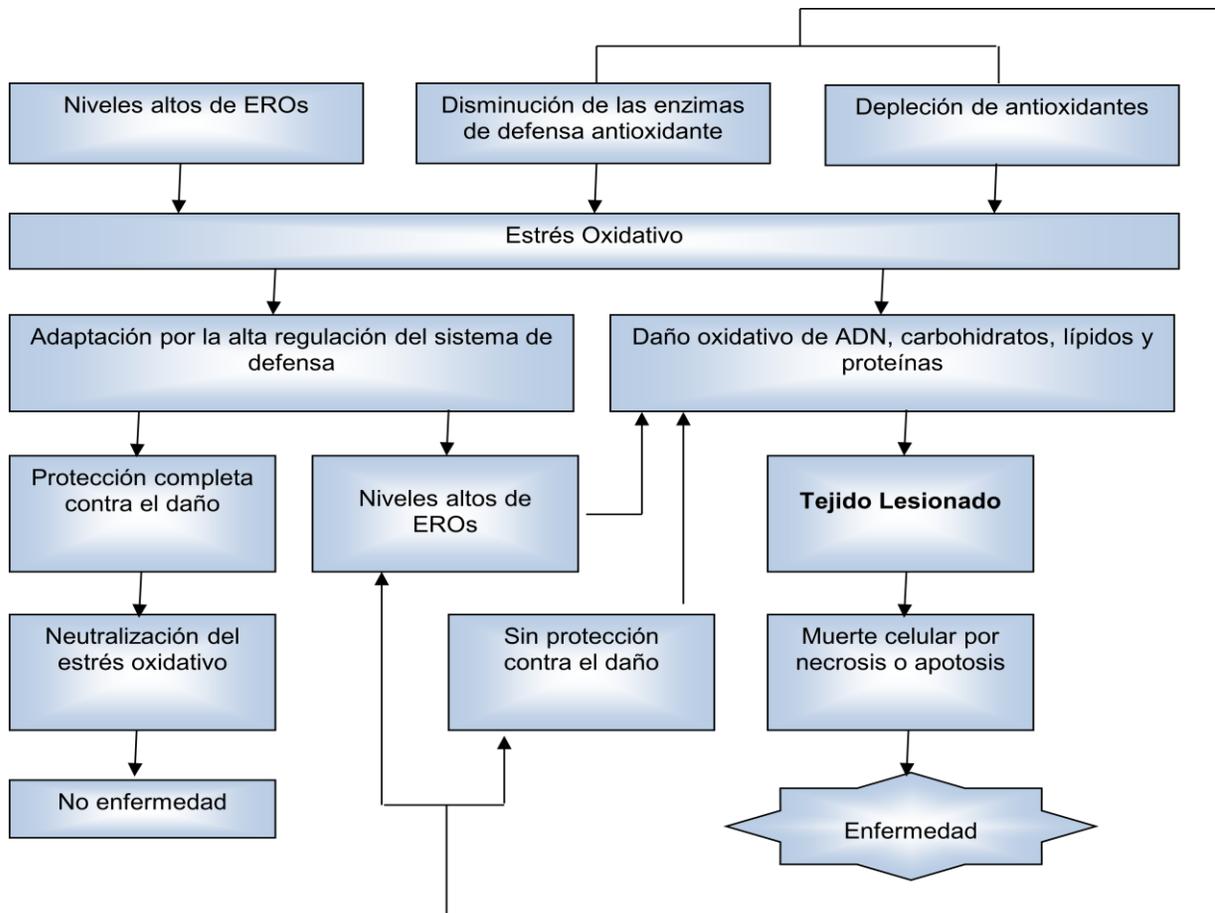
La leche materna es el único alimento capaz de satisfacer todos los requerimientos nutricios durante los primeros 6 meses de vida, sin requerir otros alimentos agregados, aporta los AO necesarios que intervienen en varios procesos metabólicos, fundamentalmente bloqueando el efecto dañino de los RL que se generan en determinadas situaciones. El recién nacido sano al ser agredido por un agente infectante, hace uso de sus mecanismos defensivos (aparato inmunológico), pero en condiciones de desnutrición uno de los parámetros más severamente afectados es la respuesta inmune debido a la falta de vitaminas y minerales (Schlesinger y Stekel, 1973; Castellanos-Puerto, 2008).

El deficiente aporte de nutrientes puede comprometer la salud del organismo, pues cuando el anabolismo es superior que el catabolismo se daña de forma progresiva la función celular:

- Afecta el depósito de energía de reserva.
- Pérdida de masa corporal.
- Daño en la reproducción y el crecimiento celular.
- Disminuye el metabolismo energético.
- Incapacidad de eliminación de sustancias de desecho.
- Ineficiencia de respuesta al EO.
- Deficiencia en el sistema de reparación (hormonas, enzimas, proteínas) y células del sistema inmune.
- Discapacidad de los mecanismos de comunicación y de regulación intra e intercelular.
- Problemas en la generación de temperatura.

Al afectarse negativamente los sistemas endógenos de reparación celular y eliminación de desechos se produce una toxicidad, y así se genera un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad del organismo de eliminarlas, esto produce un daño devastador y destructor de las células. De no corregirse la desnutrición puede llevar a la destrucción total del individuo (Good *et al.*, 1982; Calzada-León, 1998).

En la desnutrición, la disminución de los niveles de AO endógenos inhibe la eliminación de RL e incrementa la producción natural de los mismos en el organismo, lo que contribuye a un daño en las diferentes biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos y subsecuente disfunción de los distintos órganos y tejidos (figura 4) (Venereo-Gutiérrez, 2002; Dalle-Donne *et al.*, 2003b).



**Figura 4.** Orígenes y papel del EO en el desarrollo de las enfermedades (Modificado de Dalle-Donne *et al.*, 2003b).

La disfunción mitocondrial, el aumento constante de EO y la modificación oxidativa de enzimas y proteínas se producen en una etapa temprana en todas las enfermedades neurodegenerativas más importantes, y existen reportes de que esta disfunción tiene un importante papel en la etiología y progreso en la patogénesis de las mismas (ver tabla 1) (Lee *et al.*, 2012).

**Tabla 1. Enfermedades humanas relacionadas a EO**

Enfermedad	Relación con EO
Diabetes	Se han detectado niveles elevados de proteínas carboniladas en pacientes con diabetes, los cuales pueden resultar en hiperglicemia, uremia y aterosclerosis.
Enfermedad pulmonar crónica	Se ha reportado que infantes con bajo peso al nacer corren un elevado riesgo de desarrollar displasia bronqueo-pulmonar. Disminuye la habilidad AO en pulmones.
Insuficiencia renal crónica	Los RL producen la activación de la enzima xantina-oxidasa y de los neutrófilos, mecanismos importantes del daño renal por isquemia/reperfusión.
Hipertensión	Se ha encontrado aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como aumento de lípidos y una disminución de la capacidad AO.
Aterosclerosis	En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se fragmentan y se alteran determinados residuos de aa. Estas LDL oxidadas estimulan la proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica.
Cáncer de Pulmón	Los RL estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la neovascularización tumoral o angiogénesis.

Tomado de Elejalde-Guerra, 2001; Dalle-Donne *et al.*, 2003b

### 3 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La desnutrición es un estado patológico resultado de la deficiente incorporación de nutrientes al organismo, su importancia está en función de la duración y de la condición fisiológica en la que se presente, generalmente tiene su origen desde la etapa fetal pero las consecuencias son irreversibles para el resto de la vida del sujeto (Calzada-León, 1998; Parra-Gómez *et al.*, 2003). Las consecuencias de la inadecuada nutrición materna han sido estudiadas previamente a través de la manipulación de animales de laboratorio, y reportaron efectos como el retardo en el crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer y prematurez, estas condiciones se asocian a un riesgo elevado de mortalidad, discapacidad por daño neurológico, deterioro del sistema cardiovascular (Langley-Evans, 1996 y 2001; Lizarraga-Mollinedo *et al.*, 2012). En México la prevalencia de bajo peso al nacer es alrededor del 7% y está relacionado con el 60% de las muertes infantiles (UNICEF, 2012), los bebés con bajo peso al nacer tienen mayor probabilidad de desarrollar problemas de aprendizaje y déficit de atención, coordinación muscular y del lenguaje, disminución de capacidad cognitiva y bajo rendimiento escolar; esto tan solo en los primeros años de vida, sin embargo a largo plazo tienen menos oportunidades de terminar una carrera profesional o de encontrar un buen trabajo, lo que limitaría el crecimiento y desarrollo de nuestro país (UNICEF, 2009). Adicionalmente, la desnutrición ha sido vinculada con la disminución de la respuesta AO, lo cual deja el organismo vulnerable a la acumulación de EO y como consecuencia al desarrollo en la edad adulta de alguna ECNT como Alzheimer, Parkinson, ECV, entre otras (Mendoza-Núñez y Sánchez-Rodríguez, 2009), que en la actualidad representan uno de los grandes retos a vencer por el sector salud, debido a su creciente contribución a la mortalidad en general y por la complejidad y costo de su tratamiento. Es por todo lo anterior que la presente investigación se enfocó en analizar la influencia de la desnutrición intrauterina en ratas neonatas Wistar sobre el incremento de EO, a través de la determinación de proteínas carboniladas en órganos como hígado, corazón y cerebro.

#### 4 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las investigaciones realizadas alrededor del incremento de EO y desarrollo de ECNT son más frecuentemente asociadas a sobrepeso y obesidad (Bondía-Pons *et al.*, 2012), por lo que la información que relaciona desnutrición y daño por EO es deficiente para entender la magnitud del problema. La presente investigación es una de las primeras en analizar a través de un modelo con ratas Wistar el efecto de la desnutrición intrauterina en la carbonilación de proteínas de distintos órganos que constituyen importantes tejidos durante el desarrollo del feto (Godfrey y Barker, 2000), además de ser de las únicas en apearse a un modelo real, pues los neonatos en estudio constituyen una segunda generación de desnutrición, esto el panorama que se vive en México, la desnutrición viene desde generaciones anteriores y afecta a ambos padres durante la gestación y en la etapa posnatal. El conocimiento generado ayudara a comprender la gravedad del daño producido en los niños por desnutrición materna, contribuirá a detectar si el daño oxidativo es selectivo por género, así como las tendencias a desarrollar patologías relacionadas con la oxidación de un órgano en específico. La desnutrición y las consecuencias que trae consigo se pueden prevenir si se logra la enseñanza básica del tema para que la población sea capaz de llevar una correcta alimentación aunada a un estilo de vida saludable, iniciando desde las primeras etapas de la vida (embarazo, lactancia, ablactación), lo cual constituye una herramienta para reducir la mortalidad infantil (Ortiz-Andrellucchi *et al.*, 2006).

## **5 OBJETIVO GENERAL**

Determinar cambios en los niveles de proteínas carboniladas en hígado, corazón y cerebro de ratas Wistar neonatas producto de dos generaciones inmediatas anteriores sometidas a desnutrición.

### **Objetivos específicos**

- Administrar una dieta baja en aporte de nutrientes a las ratas parentales (P) y posteriormente a sus crías (F1) para inducirles desnutrición y monitorear su ganancia de peso.
- Obtener ratas Wistar neonatas (F2) y subdividir las por género para determinar los parámetros peso, talla, albúmina en suero y peso de sus órganos hígado, corazón y cerebro.
- Extraer órganos (hígado, corazón y cerebro) de ratas Wistar neonatas para su análisis electroforético, inmunodetección de proteínas carboniladas y determinación de la actividad de la catalasa.

## **6 HIPÓTESIS**

La ingesta generacional de una dieta baja en aporte de nutrientes ocasiona daños por desnutrición en las ratas Wistar (F2) desde su nacimiento (neonatos), que se refleja en el aumento de proteínas carboniladas en órganos como hígado, corazón y cerebro, independientemente de su género.

## 7 MATERIAL Y MÉTODOS

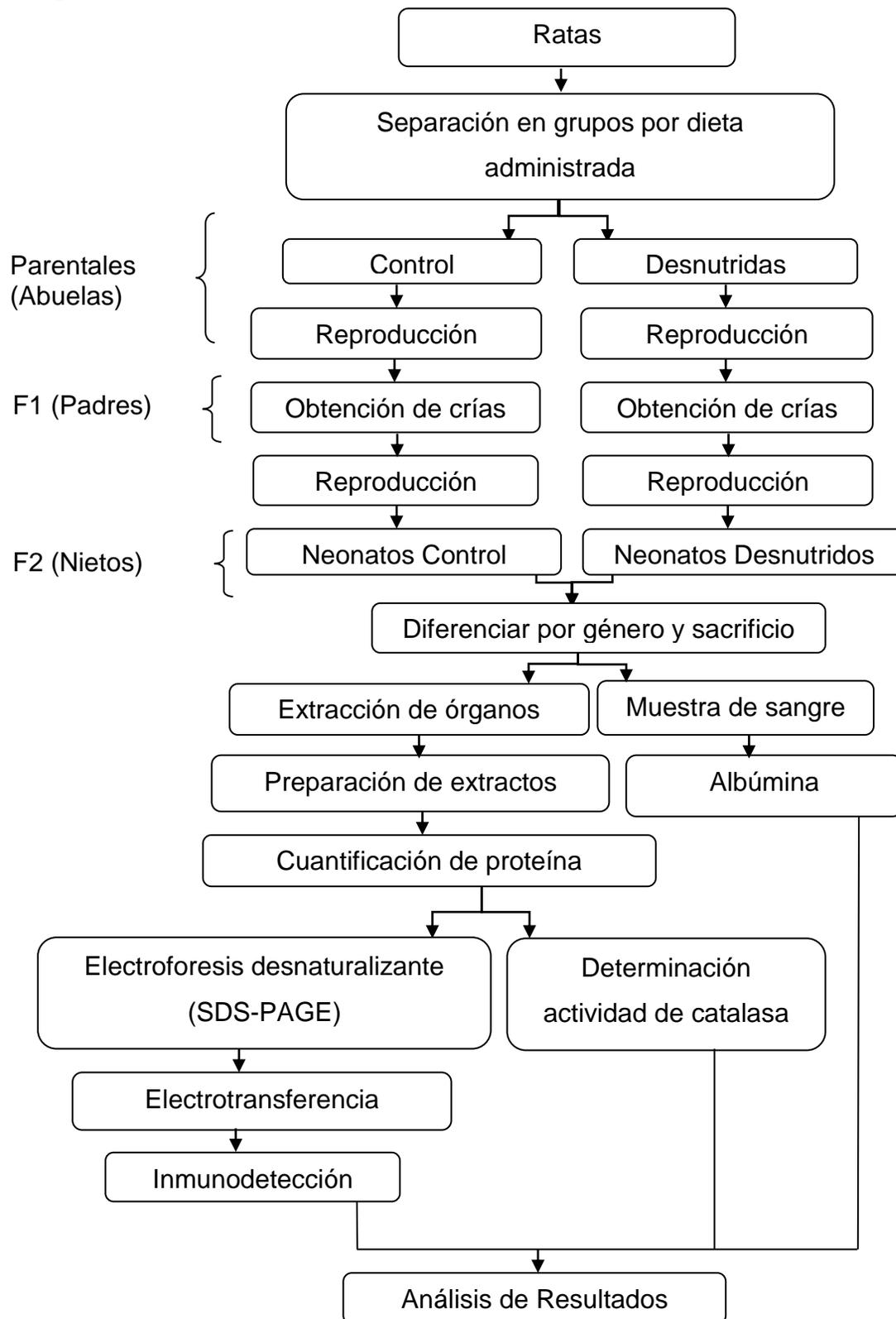
La metodología de la presente investigación se encuentra resumida en la figura 5, donde se puede observar de manera cronológica el procedimiento de trabajo que va desde la obtención del grupo de estudio (neonatos desnutridos), la extracción de órganos y preparación de extractos a partir de un buffer TES (Tris, EDTA, SDS), la cuantificación de proteínas en los extractos (por medio de lecturas de absorbancia espectrofotométrica), que fueron empleados para determinar la actividad de la enzima catalasa y para hacer una electroforesis desnaturizante en SDS-PAGE, con la posterior electrotransferencia de proteínas en una membrana PVDF (Di-fluoruro de polivinilideno) y análisis de inmunodetección de grupos carbonilo. Para finalmente analizar los resultados obtenidos.

### 7.1 Animales y dietas

Se trabajó con 2 grupos de ratas neonatas Wistar (F2, nietas), que incluían hembras y machos. El primer grupo se mantuvo en condiciones estándar de alimentación [dieta control (C)], mientras el segundo grupo de neonatos fue expuesto a desnutrición intrauterina, pues sus padres (F1) y abuelos (parentales) fueron sometidos a una dieta baja en aporte de nutrientes (BN), a partir de las 4 semanas de edad y hasta el momento del sacrificio (66 semanas). Adicionalmente se realizó el análisis de los órganos de las ratas adultas parentales (abuelas).

Los animales se mantuvieron en jaulas a temperatura y ciclos de luz controlados (12 horas luz y 12 horas oscuridad), además se aseguró la provisión diaria de agua *ad libitum* de cada lote de ratas. La dieta basal empleada para alimentar los especímenes, fue la proporcionada por el bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la UAEH, la cual lleva los ingredientes en la formulación que a continuación se describen y es vendida comercialmente como "Alimento Teklad Global para Roedores 18", a partir de la cual se formularon las dietas a utilizar en la presente investigación (Tabla 2).

**Figura 5.** Secuencia experimental



**Tabla 2. Distribución de las dietas formuladas**

Nutrientes por 100g de alimento	Dietas empleadas	
	Control (C)	Baja en aporte (BN)
Fibra (g)	18.2	21.4
Energía (Kcal)	310	279
Hidratos de carbono (g)	44.2	39.8
Proteínas (g)	18.6	16.7
Grasas Totales (g)	6.2	5.6
Ceniza (g)	5.3	4.7
Otros (g)	7.5	6.7

**Tabla 3. Consumo de alimento/rata/día**

	Dietas empleadas	
	Control (C)	Baja en aporte (BN)
Consumo (g)	30	10
Fibra (g)	5.5	2.1
Energía (Kcal)	93	28
Hidratos de carbono (g)	13.3	4
Proteínas (g)	5.6	1.7
Grasas Totales (g)	1.9	0.6
Ceniza (g)	1.6	0.5
Otros (g)	2.2	0.7

## 7.2 Sacrificio, extracción de órganos y muestra de sangre

Se registró el peso y talla de los neonatos y se procedió al sacrificio dentro de las primeras horas después del nacimiento por medio de decapitación. En el caso de las ratas generación parental también se llevó registro del peso y fueron sacrificadas a las 66 semanas de edad por medio de la cámara de CO<sub>2</sub>. En ambos casos (neonatos F2 y ratas Wistar parentales) se extrajo completamente el hígado, el corazón y el cerebro empleando pinzas de disección, tijeras rectas y bisturí. Posterior a la extracción se registró el peso de cada órgano (mg). También se tomó una muestra

de sangre la cual se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos a 4 °C para recuperar el suero. Los órganos y el suero inmediatamente después de ser extraídos fueron congelados a -86 °C, hasta su utilización para la posterior preparación de extractos.

### 7.3 Cuantificación de albúmina

Para la medición de albúmina se utilizaron 0.01 mL de suero de sangre mezclados con 1 mL de solución de verde de bromocresol (0.188 mg/mL) disueltos en buffer de succinato a un pH de  $4.2 \pm 0.05$ , se determinó la absorbancia a 550 nm en cubetas de plástico de 1 cm a través de un espectrofotómetro (UV-Visible Spectrophotometric Shimadzu® UV-1601). La reacción fue estable durante 30 minutos. Como estándar se emplearon 0.01 mL de albúmina de suero bovino (BSA Sigma-Aldrich Chemical CO. Missouri. U.S.A), disuelta en agua (60 mg/mL) necesarios para el cálculo de resultados, que por medio de una ecuación correlaciona absorbancia de la muestra con la absorbancia del estándar.

$$\text{Albúmina (g/dL)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times \text{Concentración de estándar}$$

### 7.4 Preparación de los extractos proteicos

Cada órgano fue triturado por medio de tijeras rectas y bisturí, se colocó en tubos de 1.5 mL, se agregó buffer TES (500 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 mM EDTA, 5% SDS) en una relación 200 mg de órgano por 0.5 mL de buffer; el tejido se homogeneizó por medio de un sonicador Transsonic 460 Elma®, dando 4 pulsos (de 20 segundos) con un descanso intermedio (de 20 segundos) entre cada pulso y posteriormente se centrifugó 30 minutos a 12,000 rpm a 4 °C, para bajar el debris celular, y recuperar el sobrenadante, al cual se le agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 10 mM, posteriormente se conservó en congelación (-36 °C) hasta la cuantificación de proteínas.

## **7.5 Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976). Se tomaron 2 µl de la muestra y se llevaron a un volumen de 10 µl con agua destilada, se adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford (Bio-rad®). Se determinó la absorbancia a 595 nm por medio de un lector de micoplaca Vis-UV de la marca Biotek® Power Wave XS. La reacción fue estable durante 1 h. Como referencia se utilizaron concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1 mg/mL (Sigma-Aldrich Chemical CO. Missouri. U.S.A.).

## **7.6 Preparación de las muestras para el SDS-PAGE (gel 1)**

Se transfirieron 20 µg de proteína de cada muestra en tubos de 1.5 mL y se agregó Buffer 2X de tratamiento (Tris 0.125 M, HCl pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, Azul de bromofenol 0.02%) como marcador de corrimiento, después se sumergieron los tubos en agua a punto de ebullición durante 5 minutos. Posteriormente se mantuvieron en hielo, hasta su uso.

## **7.7 Electroforesis desnaturalizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

Las muestras de proteína (20 µg) fueron analizadas en geles de poliacrilamida (acrilamida, 30% Tris, 2.7% bisacrilamida) a la concentración que se indica en cada experimento siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970). Los geles se corrieron a 100 V. Se utilizaron marcadores preteñidos de amplio rango de peso molecular.

## **7.8 Tinción con azul de Coomassie.**

El gel 1 se tiñó con una solución azul de Coomassie (0.125% R-250, 50% metanol y 10% ácido acético) durante 30 min y se destiñó con la solución desteñidora (7% ácido acético y 5% metanol) durante toda la noche.

## **7.9 Derivatización de Proteínas (gel 2)**

Para el análisis de carbonilación de proteínas se transfirieron 20 µg de proteína de cada muestra en tubos de 1.5 mL. Se desnaturalizó cada muestra con una alícuota de SDS 12% para una concentración final de 6%. Se derivatizó agregando 1X DNPH (2,4 Dinitro-fenil-hidrazona), solución neutralizadora y 2-mercaptoetanol (0.74 M concentración final), de acuerdo a lo descrito en el manual OxyBlot™ Oxidized Protein Detection Kit.

## **7.10 Electrotransferencia de proteínas.**

Después de la electroforésis de las muestras, el gel 2 se equilibró durante 1h en buffer de transferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina y 20% metanol) y las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting; Bio-rad), empleando una cámara de electrotransferencia semiseca (Trans-Blot® Semi-Dry; Bio-Rad) durante 80 min a 15 V.

## **7.11 Inmunodetección**

Para el ensayo de inmunodetección se siguió el protocolo descrito en el OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit, se bloqueó la membrana en buffer 2% BSA/PBS-T (Buffer de fosfato salino pH 7.2, 0.05% Tween-20, 2% de leche descremada) durante una hora, después se incubó en una dilución 1:150 de anticuerpo primario en buffer 2% BSA/PBS-T, después se incubó en una dilución 1:300 de anticuerpo secundario en buffer 2% BSA/PBS-T, se lavó 5 minutos en 1X PBS-T, posteriormente se incubó por un minuto en Chemiluminescent Reagent (Amershan™ Pharmacia, Biotech) a un volumen de 0.125 mL/cm<sup>2</sup>, finalmente en un cuarto totalmente oscuro se expuso la membrana 5 minutos ante una película autoradiográfica Kodak.

## **7.12 Determinación de actividad enzimática de la catalasa**

La actividad de CAT fue estimada por el método de Aebi (1974). Se diluyeron 20 µl del extracto del órgano por analizar, en un medio que contenía 580 µl de sustrato (Peróxido de hidrógeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] 0.34% en buffer de fosfatos 0.5 M pH 7). Se determinó

la descomposición enzimática del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por decremento de la absorbancia a 240 nm durante 1 minuto, por medio de un espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453.

### **7.13 Tratamiento Estadístico**

Todos los valores fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El criterio estadístico para evaluar los datos por género y estado nutricional se realizó por medio de un análisis ANOVA de un factor, incluyendo una prueba Tukey posthoc alfa. La prueba estadística t de Student se empleó para la evaluación general de los datos por grupo (Control y Desnutrido). Se definió un intervalo de confianza para la media del 95% por lo cual un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Todas las pruebas fueron realizadas usando el software SPSS Statistics 15.0 (SPSS Inc., 2006).

## 8 RESULTADOS

Para evaluar el grado de desnutrición provocado por la dieta de los neonatos en estudio, se determinó el peso (g) y la talla (cm) de los mismos, así como la concentración de albúmina (g/dL) en suero sanguíneo y el peso de los diferentes órganos (hígado, corazón y cerebro) (Tabla 4). Estableciendo una  $p \leq 0.05$  se observó reducción de las variables evaluadas en los neonatos con desnutrición con respecto al grupo control (GC).

El peso general posnatal de los especímenes del grupo desnutrido (GD) representa un 63% con respecto al control, mientras la talla fue un 18% menor comparado con el control. Para el GD la disminución del peso con respecto a la talla fue de un 22%, mientras para el GC el peso y talla guardan la misma proporción. Por otra parte, la concentración de albúmina en suero estuvo disminuida un 45% con respecto al GC. En cuanto al peso de los órganos, en el GD se observó que el hígado fue 34% inferior en peso, mientras que el corazón presentó una disminución del 30% y el cerebro se redujo un 28.5% en relación con el GC.

**Tabla 4. Diferencia general por grupo**

	Estado Nutricio	
	Grupo Control	Grupo Desnutrido
Peso (g)	7.65 ± 0.48	4.84 ± 1.00*
Talla (cm)	7.55 ± 0.32	6.19 ± 0.44*
Albúmina (g/dL)	2.92 ± 0.84	1.60 ± 0.58*
Hígado (mg)	295.72 ± 43.02	195.38 ± 39.99*
Corazón (mg)	51.88 ± 5.29	37.88 ± 9.11*
Cerebro (mg)	336.92 ± 16.50	240.65 ± 30.36*

Los valores se expresan media ± desviación estándar

\* $p \leq 0.05$  indicando diferencia con respecto al GC

Por otro lado, se compararon los indicadores peso, talla, concentración de albúmina en suero y peso de los órganos extraídos (Tabla 5), haciendo una separación por género (hembra y macho) y grupo de estudio (control y desnutrido), para detectar si

éste marcaba alguna diferencia en el desarrollo de desnutrición. Los resultados indicaron que a pesar de que las hembras presentaron en algunos casos valores ligeramente más bajos que los machos de su respectivo grupo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. En ambos géneros existe una notable disminución de los parámetros evaluados en el GD con respecto al GC.

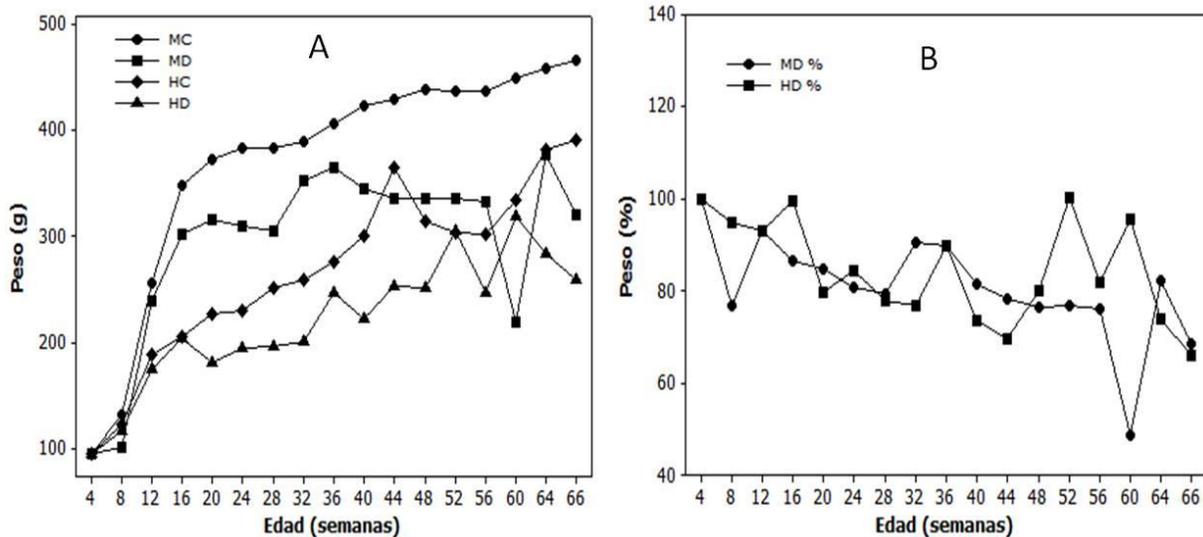
**Tabla 5. Diferencia en peso, talla, albúmina y peso de órganos de ratas Wistar neonatas (F2) evaluadas por género y estado nutricional**

	Hembras		Machos	
	Control	Desnutridas	Control	Desnutridos
Peso (g)	7.43 ± 0.51	4.41 ± 0.76*	8.00 ± 0.00	5.31 ± 1.05*
Talla (cm)	7.50 ± 0.36	6.12 ± 0.52*	7.65 ± 0.24	6.27 ± 0.34*
Albúmina (g/dL)	2.94 ± 0.98	1.56 ± 0.80*	2.90 ± 0.72	1.64 ± 0.25*
Hígado (mg)	296.95±44.07	200.17±48.55*	293.88±43.67	189.72±27.99*
Corazón (mg)	52.40±4.75	38.07±10.26*	51.09±6.19	37.66±8.04*
Cerebro (mg)	334.62±17.79	237.72±36.99*	340.38±14.56	244.10±21.30*

Los valores se expresan media ± desviación estándar

\* $p \leq 0.05$  indicando diferencia con respecto al GC

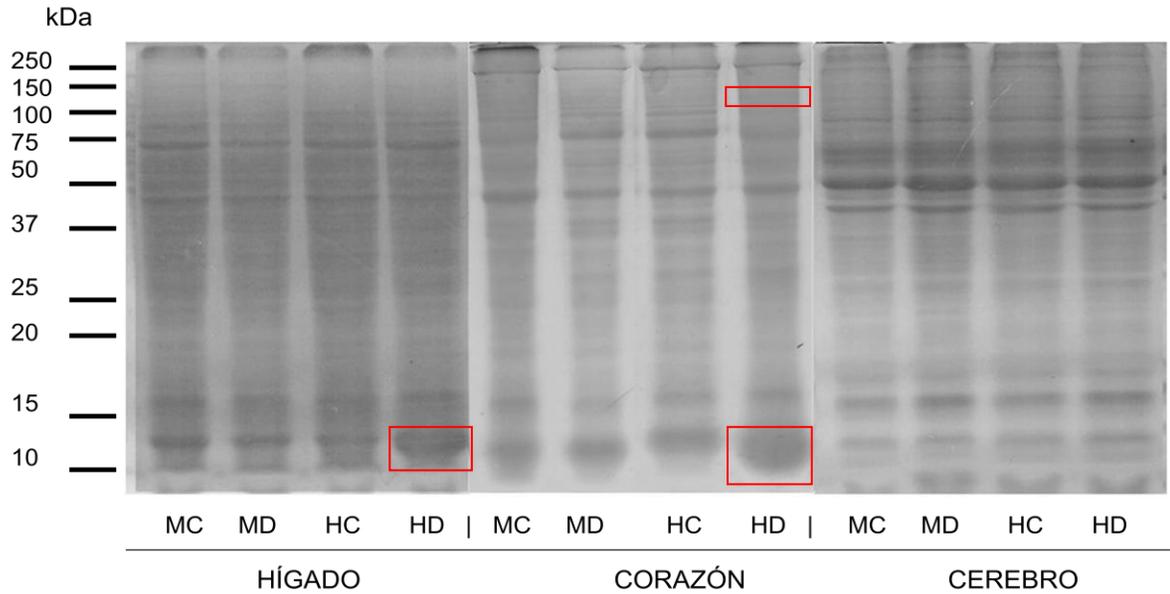
En cuanto al análisis de la ganancia de peso durante el crecimiento de las ratas Wistar parentales (sometidas a una dieta específica desde las 4 semanas y hasta que fueron sacrificadas a las 66 semanas de edad), se observó que los machos presentaron mayor incremento de peso que las hembras de su mismo grupo (figura 6A), independientemente de la dieta suministrada. Por otra parte, en la figura 6B se puede observar que la reducción de peso en los animales tratados con la dieta BN fue de alrededor del 20% con relación a los tratados con la dieta C, sin verse afectada esta diferencia por el género de los mismos.



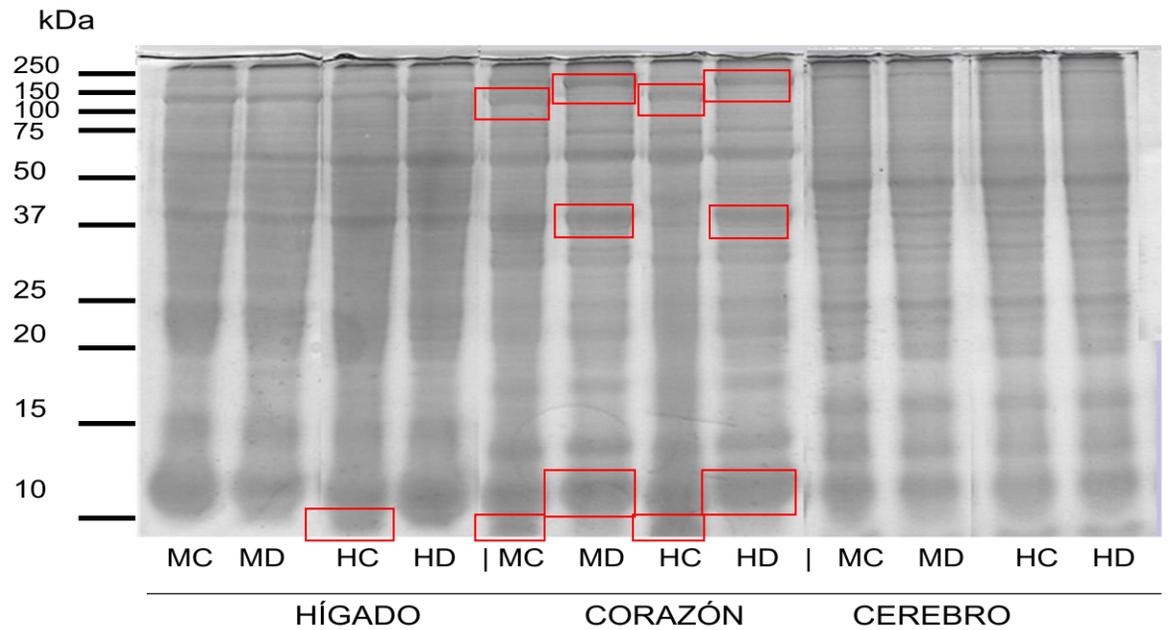
**Figura 6. A)** Incremento de peso en ratas Wistar parentales y, **B)** Porcentaje de la diferencia en peso, donde MC= macho control, MD= macho desnutrido, HC= hembra control y HD= hembra desnutrida.

El siguiente aspecto que se evaluó fueron los patrones de expresión proteica (figura 7) de los diferentes órganos a través de un SDS-PAGE, con la finalidad de determinar si la desnutrición ejercía algún efecto sobre éste aspecto. En las muestras pertenecientes a los neonatos, en el hígado y el corazón destaca la banda proteica de aproximadamente 12 kDa (señalada por un recuadro en la figura 7), la cual solo se incrementó en el grupo de HD. Por otra parte el análisis de las proteínas de cerebro no mostró diferencias en el patrón de expresión.

En lo que a la expresión de proteínas en las ratas Wistar parentales se refiere, los resultados revelaron que en hígado y en corazón había aumento o disminución de la expresión (señalada con recuadros) de algunas proteínas. En la figura 8 se puede observar que en corazón las bandas de proteína de aproximadamente 10 y 150 kDa no se manifestaron en el GD en comparación al GC, por otro lado las bandas de proteínas de aproximadamente 12 y 200 kDa se mostraron sobre expresadas en el GD con respecto al GC. En el hígado de la HD la banda de aproximadamente 10 kDa se observó disminuida al compararla con la HC, esta banda no se presentó en los machos. En cerebro no se observaron diferencias al igual que en los neonatos.



**Figura 7.** SDS-PAGE de los extractos proteicos de hígado, corazón y cerebro de ratas neonatas Wistar donde MC= macho control, MD= macho desnutrido, HC= hembra control y HD= hembra desnutrida. Los recuadros se utilizaron para señalar bandas de mayor intensidad.



**Figura 8.** SDS-PAGE de los extractos proteicos de hígado, corazón y cerebro de ratas Wistar donde MC= macho control, MD= macho desnutrido, HC= hembra control y HD= hembra desnutrida. Los recuadros se utilizaron para señalar bandas de mayor intensidad.

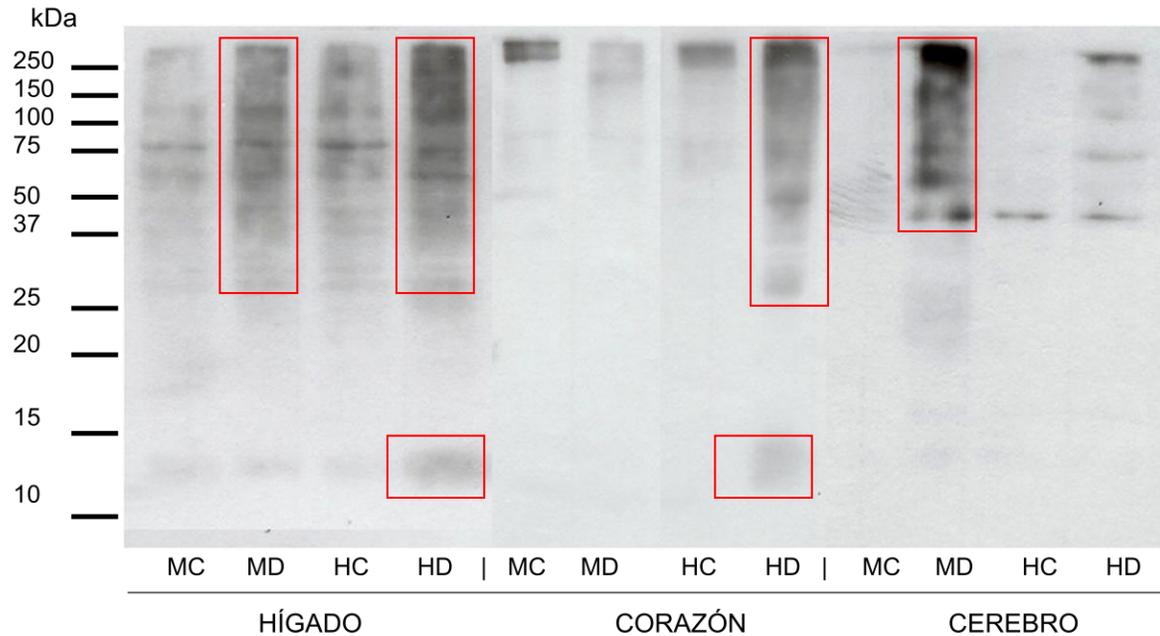
Posterior a la evaluación de la expresión proteica se procedió a la determinación de proteínas carboniladas en hígado, corazón y cerebro, para establecer si existe una relación entre la desnutrición y el incremento en los niveles de EO. Adicionalmente se realizó un análisis densitométrico para determinar la densidad de la carbonilación de proteínas.

La figura 9 corresponde al análisis de las muestras de los neonatos (F2), en ella se puede apreciar que el hígado de los organismos del GD presentó un incremento en el contenido de carbonilos en las proteínas de peso molecular superior a 25 kDa, mientras que la única banda proteica de bajo peso molecular que mostró aumento en la carbonilación es la de 12 kDa observada únicamente en las HD. El análisis densitométrico reveló que el incremento fue de 2.6 veces para las HD y 2.8 veces en los MD con respecto a sus controles como se muestra graficado en la figura 10.

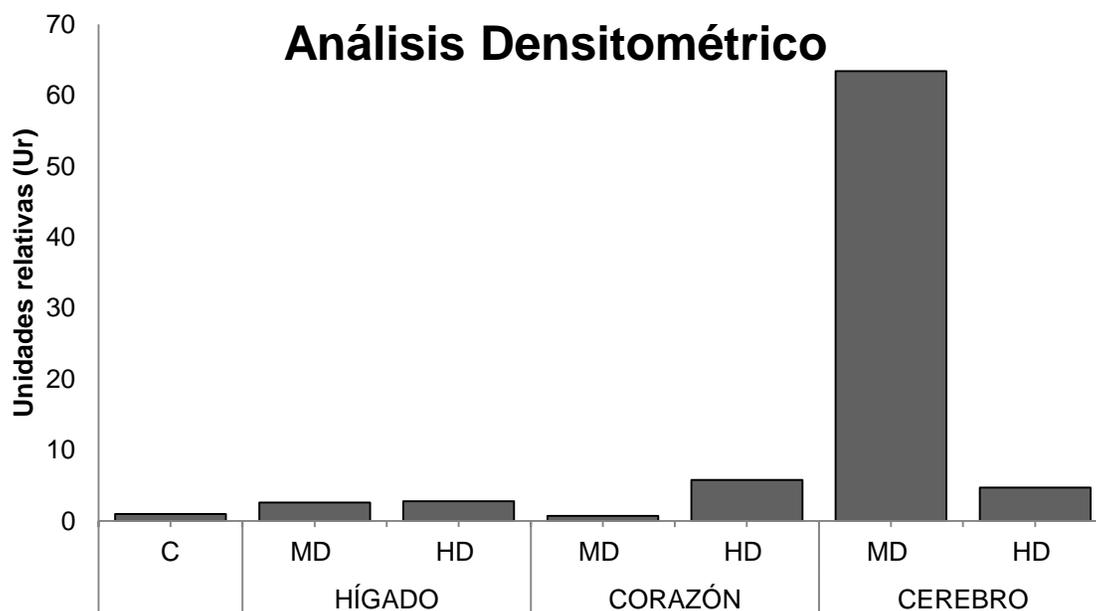
El análisis densitométrico de proteínas del corazón reveló que las muestras de HD presentan 5.8 veces mayor carbonilación en proteínas de más de 25 kDa en relación a las HC (figura 10), mientras en MD fue incluso menor que en los MC. Además se observó carbonilación en la banda de proteínas de aproximadamente 12 kDa, en la HD la cual no es visible en el resto de los grupos (figura 9).

Mientras que el análisis realizado en extractos proteicos del cerebro, mostró que las proteínas correspondientes al grupo MD presentaron mayor carbonilación en proteínas de más de 37 kDa con respecto a los MC (figura 9). Las muestras correspondientes a HD presentaron un incremento en carbonilación 4.7 veces superior con respecto a las HC (figura 10).

El análisis de los extractos de hígado indicó que los neonatos desnutridos, presentaron mayores niveles de carbonilación basal de proteínas, por lo que las diferencias entre HD y MD con respecto a su control fueron similares, mientras en corazón se evidenció un daño oxidativo en las HD, el perfil de carbonilación en el cerebro se invirtió con un mayor grado de carbonilación de proteínas en los MD.



**Figura 9.** Carbonilación de proteínas en hígado, corazón y cerebro de neonatos, donde MC= macho control, MD= macho desnutrido, HC= hembra control y HD= hembra desnutrida. Los recuadros se utilizaron para señalar bandas de mayor intensidad.



**Figura 10.** Análisis densitométrico de las proteínas carboniladas de los neonatos, donde C= control, MD= macho desnutrido y HD= hembra desnutrida.

El análisis realizado en ratas Wistar parentales, los resultados mostraron que el hígado de los especímenes del GD sufrieron un mayor daño oxidativo que los del GC. El incremento en carbonilación fue 10 veces superior en el MD, y 3 veces superior en la HD en relación a sus respectivos controles (figura 12). En la figura 11 se puede apreciar que el incremento fue evidente en proteínas entre 50 y 250 kDa (indicado por un recuadro).

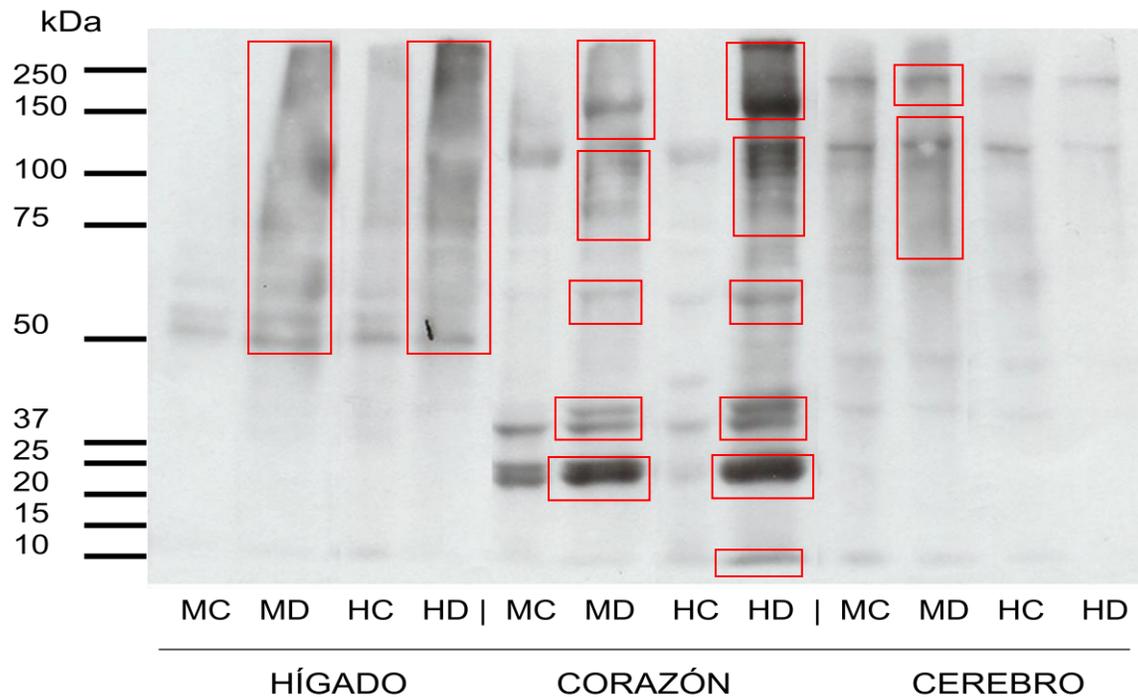
El análisis de las muestras de corazón reveló que las hembras presentaron mayor carbonilación de proteínas siendo la HD quien mostró ser más susceptible (8 veces) en comparación a la HC, especialmente en las proteínas de entre 100 y 250 kDa, pues se observó una serie de bandas que no fueron visibles en el resto de las muestras, también hubo incremento de carbonilación en proteínas de entre 20 y 40 kDa y una banda de aproximadamente 55 kDa (figura 11). En los organismo machos, el desnutrido tuvo un aumento en carbonilación de proteínas 4.4 veces (figura 12) en relación con el macho del grupo control, al igual que en las hembras en este órgano se observó un alto grado de carbonilación en proteínas de aproximadamente 20 a 40 kDa.

En los resultados obtenidos del cerebro el MD presentó un alto grado de daño oxidativo, 1.8 veces con respecto MC (figura 12), en proteínas entre 75 y 150 kDa (figura 11), en lo que respecta a las hembras se observó que la HD mostró una disminución del daño oxidativo 0.5 veces con respecto a la HC.

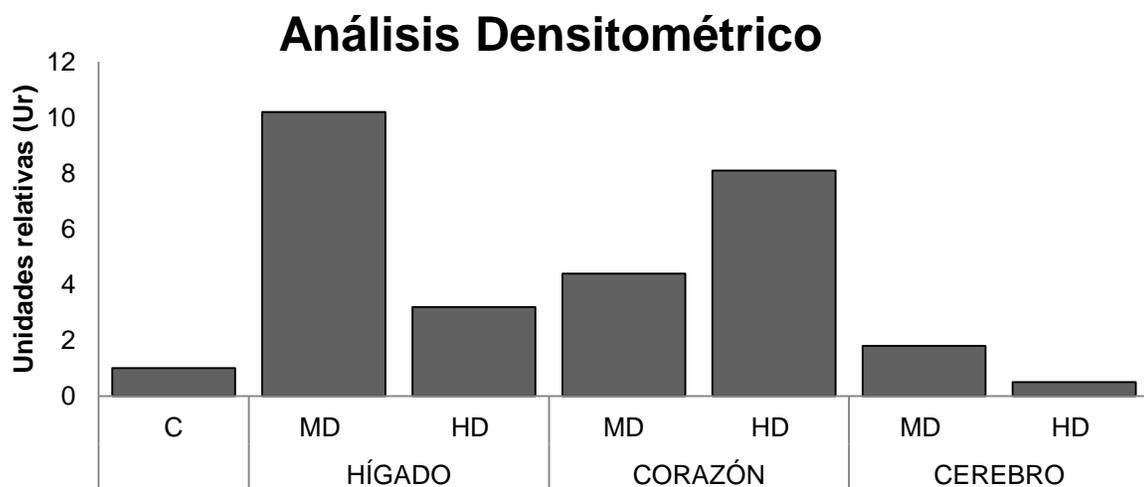
Por último se determinó la actividad de la enzima catalasa (CAT) con la finalidad de establecer si la desnutrición y el incremento en la carbonilación mantenían alguna relación con la actividad de dicha enzima.

Los resultados obtenidos en neonatos indican que la actividad de CAT en el hígado fue similar en el GC y en el GD (figura 13). Con lo que respecta al corazón, la actividad de la CAT fue similar para los MD con relación a su control, mientras que en las HD hubo un incremento en la actividad enzimática (30%). Por otra parte, en las muestras de cerebro la actividad de la enzima para las HD y los MD fue mayor con respecto a su grupo control, 0.6 y 0.4 veces respectivamente. A pesar de que los

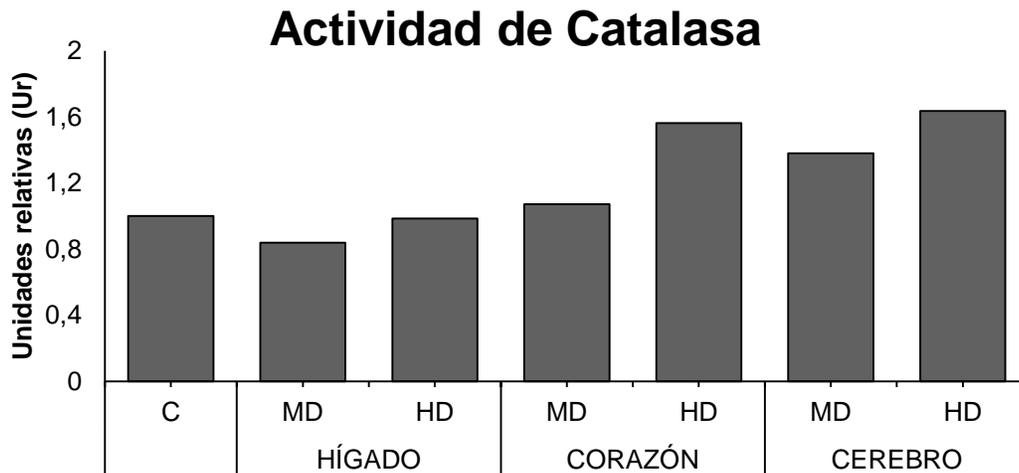
tres órganos presentaron aumento en la actividad de la CAT, ninguno de los valores alcanzó la significancia estadística.



**Figura 11.** Carbonilación de proteínas de hígado, corazón y cerebro de ratas Wistar parentales, donde MC= macho control, MD= macho desnutrido, HC= hembra control y HD= hembra desnutrida.

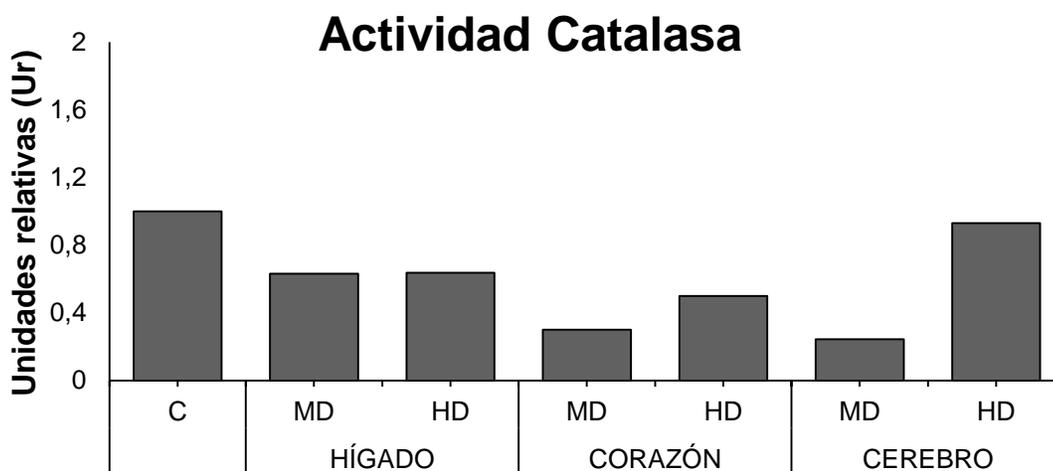


**Figura 12.** Análisis densitométrico de las proteínas carboniladas en ratas Wistar parentales, C= control, MD= macho desnutrido y HD= hembra desnutrida.



**Figura 13.** Actividad de catalasa en hígado, corazón y cerebro de ratas neonatas Wistar, donde C= control, MD= macho desnutrido y HD= hembra desnutrida.

El análisis de la actividad específica de la CAT en hígado, corazón y cerebro de las ratas Wistar parentales (figura 14), indicó una disminución de la actividad en los organismos desnutridos con relación a los controles. Por otra parte, se observó que la actividad enzimática en los tres órganos se encuentra disminuida en el macho desnutrido con respecto a la hembra de su mismo grupo, lo cual se observa más evidente en cerebro, quien parece ser el órgano más afectado en los machos.



**Figura 14.** Actividad de la enzima catalasa en hígado, corazón y cerebro de ratas Wistar parentales, donde C: control, MD: macho desnutrido y HD: hembra desnutrida.

## 9. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo analizar el EO ocasionado por desnutrición intrauterina en hígado, corazón y cerebro de ratas neonatas Wistar, mediante la detección de proteínas carboniladas. Se determinó el peso, talla, albúmina sanguínea, así como el peso de los 3 órganos, la expresión proteica y la actividad específica de la enzima catalasa de los extractos de los órganos ya mencionados, para detectar posibles alteraciones en ellos causadas por la desnutrición.

Si bien esta investigación fue realizada en ratas, puede ser tomada como un modelo que reproduce los posibles daños generados por EO durante la desnutrición intrauterina y el conocimiento generado podría dar pauta para explicar el comportamiento del organismo de humanos vulnerables a desnutrición.

En primera instancia se consideró desnutrición en ratas Wistar parentales (P) por la severa restricción calórica y proteica a la que fueron sometidas, que consistió en una disminución del 70% en la alimentación con respecto a los controles (figura 2 y 3), este método no es nuevo pues la restricción en la dieta materna durante la gestación ya ha sido usada previamente para causar desnutrición en el recién nacido, como Laborie *et al.*, (2011) quienes indujeron desnutrición en ratas neonatas Wistar por medio de la restricción en la dieta materna al 50%. Es importante mencionar que en las ratas Wistar F1 sometidas a desnutrición hubo un efecto negativo en el número de crías nacidas y la supervivencia de las mismas, sin embargo no puso en peligro la viabilidad del feto mediante la inducción de aborto (datos no mostrados), esto puede ser asociado a investigaciones previas como lo observado por Caron *et al.*, (2012) quienes reportaron que existe alteración en las función reproductiva después de someter a un modelo de ratón a desnutrición. Sin embargo, la posible relación o mecanismos por los que la desnutrición interfiere en la fertilidad y el ciclo reproductivo aún deben ser confirmados por otros estudios.

Después de la obtención de los neonatos sometidos a desnutrición intrauterina se evaluaron los indicadores peso, talla, medición de albúmina sanguínea y peso de órganos como hígado, corazón y cerebro. De acuerdo a los datos obtenidos la

desnutrición en los neonatos contribuyó a que presentaran talla baja al nacer y peso bajo para su talla (Tabla 4 y 5), esta situación ya ha sido reportada previamente en condiciones de desnutrición por Langley-Evans (1996) quién analizó el efecto de una dieta baja en proteínas en distintos puntos de la gestación de ratas Wistar y encontró que para el momento del nacimiento las crías solo habían aumentado el 70% de masa corporal y eran más cortos con respecto al control. En este aspecto, el bajo peso al nacer en neonatos de madres desnutridas ha sido frecuentemente asociado con un incremento en la producción de RL (Gupta *et al.*, 2004), así como aumento en los niveles de EO (Negi *et al.*, 2012). De la misma forma los neonatos desnutridos presentaron disminución de albúmina sanguínea (proteína en plasma que al encontrarse en menor cantidad afecta las defensas antioxidantes y aumenta el riesgo de EO) (Dalle-Donne *et al.*, 2003b), los resultados obtenidos al respecto de esta disminución es consistente con lo reportado con Gupta *et al.*, (2004) quien al desarrollar un estudio en neonatos severamente desnutridos observó disminución en niveles de albúmina en suero, pero resulta contrario a lo encontrado por Nwagwu *et al.*, (2000) quien al exponer a ratas Wistar gestantes a restricción proteica (50% caseína) registra niveles normales de albúmina en sus neonatos, aunque quizá esta diferencia se debió a que el periodo de implantación de la dieta fue a partir del primer día de embarazo y la restricción de caseína no llegó a causar desnutrición.

En cuanto a los resultados obtenidos en el peso de los órganos (hígado, corazón y cerebro) los neonatos se vieron afectados durante la desnutrición, pues presentaron una disminución de alrededor del 30% (Tabla 4 y 5) en el peso de sus órganos. Estudios como el realizado por Lizarraga -Mollinedo *et al.*, (2012) han reportado que durante desnutrición fetal se ve alterado el peso de distintos órganos, lo cual está relacionado con anomalías en la función de los mismos, en dicho estudio sometieron un grupo de ratas Wistar gestantes a desnutrición (restricción alimenticia al 65%) durante la última semana de gestación y lactancia y encontraron una disminución del 55% en el peso del hígado, del 18% en el peso del cerebro, disminución en la concentración de albúmina, glucagón en suero e insulina en plasma, además del aumento en sangre de cuerpos cetónicos. En la presente tesis la reducción del tamaño en los órganos no fue selectiva, pues el menor crecimiento de

los mismos en neonatos con desnutrición fue uniforme, mientras que en el estudio antes mencionado se reportó que el cerebro en desarrollo durante desnutrición intrauterina mantiene un “efecto ahorrador” con lo cual la disminución del peso del mismo es menor con respecto a otros órganos (Lizarraga-Mollinedo *et al.*, 2012), sin embargo, esta diferencia puede estar dada por factores como el periodo a partir del cual fueron sometidas las ratas a desnutrición, la gravedad de la misma y las diferencias en la dieta administrada.

Con respecto a la ganancia de peso de las ratas Wistar parentales, se observó que tanto las HD como los MD presentaron una disminución en el incremento de peso de acuerdo al control alrededor del 20%, en relación a esto Friedman *et al.*, (1997) realizó un estudio para evaluar el indicador peso para la edad en ratas de la cepa Wistar, al final de su estudio las ratas con desnutrición presentaron una disminución entre el 15 y 20% del peso con relación a las ratas control, sin embargo sería difícil hacer asociaciones pues las ratas presentadas en esta tesis alcanzaron las 66 semanas de edad y en la investigación ya mencionada solo se estudiaron ratas hasta las 10 semanas.

Al analizar los resultados obtenidos acerca de la expresión de proteínas en ratas neonatas Wistar, tanto en hígado como en corazón de la HD se estimuló la producción de una proteína de bajo peso molecular (aproximadamente 12 kDa), la cual se descartó fuera CAT (peso molecular 210-240 kDa), SOD (peso molecular 31-32 kDa) o GPx (peso molecular 22-25 kDa). El cerebro de los neonatos pareció tener mejor respuesta ante la dieta pues se mantuvo sin modificaciones (figura 7), resultados similares se obtuvieron en las ratas Wistar parentales, pues el cerebro no mostró cambios en expresión proteica, mientras en hígado se observaron diferencias en una proteína de bajo peso molecular y en corazón en proteínas de alto peso molecular (figura 8). Otros investigadores han informado que es suficiente con alterar una sola condición nutricia para causar sustanciales variaciones en proteínas hepáticas (Chanson *et al.*, 2005), o como Lan *et al.*, (2007), quienes al inducir una dieta con baja utilización de folato en ratas Sprague-Dawley adultas, identificaron incremento en los niveles de expresión de proteínas de hígado y en menor grado en

cerebro, como la GPx que está relacionada con el control del EO. En oposición con los resultados obtenidos, Chang *et al.*, (2007) reportaron también que la expresión de 2 proteínas disminuyó significativamente en corazón de ratas Fischer hembras adultas después de una restricción calórica entre 10-40%, sin embargo esta diferencia pudo estar dada por las diferencias en la dieta y la cepa de ratas con la que desarrollaron su investigación. En general no se han reportado informes que correlacionen desnutrición e incremento en los niveles de expresión de proteínas en hígado, corazón y cerebro, por ello es preciso decir que se requiere de más investigación al respecto para identificar las proteínas que se vieron afectadas en expresión durante desnutrición, así como para explorar las funciones biológicas de dichas proteínas.

Esta investigación muestra que los niveles de EO (proteínas carboniladas) se incrementaron durante la desnutrición en los neonatos, estos datos concuerdan con otros estudios como el realizado por Franco *et al.*, (2004), quienes al inducir desnutrición intrauterina en ratas Wistar mediante la restricción al 50% en la dieta, concluyeron que causa incremento en los niveles de EO y producción del anión superóxido, además de tener una implicación biológica en el desarrollo de hipertensión, también es coherente a lo reportado por Gupta *et al.*, (2004) que tras realizar un análisis en recién nacidos sometidos a desnutrición intrauterina, concluyeron que los neonatos con talla baja para la edad presentaron un significativo incremento de EO. El mayor grado de daño oxidativo en los neonatos se observó selectivo de acuerdo al género (en el corazón de HD, en cerebro de MD y en hígado en ambos sexos), sobre todo en proteínas de alto peso molecular (figura 9 y 10), estos resultados pueden ser asociados a lo reportado por Tarry-Adkins *et al.*, (2008 y 2013) quienes sugieren que la desnutrición materna tiene repercusiones en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en la descendencia, al encontrar que el bajo peso al nacer se relaciona con daño en ADN e incremento de EO en corazón. No obstante, no se encontraron reportes previos directamente relacionados a desnutrición en neonatos, como causa de EO en los órganos seleccionados en esta tesis, por lo cual es necesario un estudio adicional para reforzar los resultados

obtenidos, así como para determinar las proteínas que están sufriendo mayor daño en cada uno de los órganos.

En las ratas Wistar parentales se observó que la inducción de la dieta BN tuvo efecto sobre el incremento de los niveles de carbonilación (figura 11 y 12), siendo el cerebro el órgano menos afectado (contrario a lo observado en los neonatos), esto se puede correlacionar a lo obtenido por Lan *et al.*, (2007) quienes indujeron una deficiencia de folato al 60% en la dieta y reportaron que el hígado es más susceptible de oxidación en comparación con el cerebro en ratas Sprague-Dawley macho. La HD resulto más sensible daño oxidativo por carbonilación de proteínas en hígado y en corazón con relación al MD, mientras éste presentó mayor oxidación en cerebro. Existe muy poca información disponible que correlacione desnutrición como factor de incremento en niveles de EO en hígado, corazón y cerebro.

En lo que a la actividad específica de CAT respecta, se observó que la actividad en hígado de neonatos (figura 13) se mantuvo sin cambios en ambos grupos, el corazón las HD presentaron aumento en la actividad de la enzima, mientras en cerebro hubo un aumento del 30% de la actividad en los neonatos del GD, esto se puede contrastar con el estudio realizado por Gupta *et al.*, (2004) quienes midieron actividad de las enzimas CAT, SOD y GSH en cordón umbilical de neonatos expuestos a desnutrición intrauterina y encontraron disminución de la actividad de todas las enzimas AO, sin embargo la diferencia pudo radicar en que no se analizó en el mismo tejido que en la presente tesis. Es difícil hacer inferencias con los datos obtenidos en CAT en neonatos puesto que estos resultados no alcanzaron la significancia estadística, es por ello que se requieren de más estudios para analizar la actividad de CAT en hígado, corazón y cerebro de neonatos desnutridos.

Los resultados obtenidos de actividad de CAT en las ratas Wistar parentales, revelaron que la desnutrición tiene efecto negativo sobre la actividad de la enzima (figura 14), esto parece aclararse al realizar el siguiente análisis: Franco *et al.*, (2004) reportaron que durante la desnutrición se incrementan los niveles de EO y la producción del anión superóxido, mientras Koca *et al.*, (2004) reportaron que en EO

para contrarrestar o compactar los niveles crecientes de aniones superóxido, la SOD (enzima AO) se incrementa y los niveles de CAT se reducen. Por último, el cerebro de los machos fue el órgano con menor actividad enzimática de CAT durante el EO; estos resultados contrastan con una publicación previa (Iyyaswamy y Rathinasamy, 2012) donde se informa que los niveles de actividad de GPX, SOD y CAT se encuentran elevados en ratas albinas machos de la cepa Wistar, en condiciones de EO, pero nuevamente las diferencias podrían estar dadas por la cepa de ratas y dieta administrada.

Existen estudios que aseguran que el desarrollo de enfermedades y la gravedad de las mismas, está directamente relacionado con el periodo, duración y tipo de exposición a un desequilibrio en la dieta, si la desnutrición es impuesta desde las primeras etapas del embarazo o incluso antes, incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades y causar daño a la descendencia (Edwards et al., 2001; Gardner et al., 2005).

## 9 CONCLUSIONES

En ratas neonatas Wistar el desbalance de nutrientes en etapas críticas del desarrollo como la etapa gestacional, aunado a que representan la segunda generación de ratas sometidas a desnutrición, desencadena significativas alteraciones en el crecimiento y desarrollo del feto, esto se refleja en el deficiente incremento de peso, talla, así como también en la reducción de tamaño de órganos como el hígado, corazón y cerebro. La desnutrición intrauterina también se relaciona con los niveles bajos de albumina en el recién nacido.

La sobreexpresión o disminución en la expresión de proteínas no pareció relacionarse con desnutrición en neonatos, a excepción de una proteína de muy bajo peso molecular en hígado y corazón de las hembras desnutridas. Sin embargo en las ratas Wistar parentales las proteínas de alto peso molecular del corazón si parecen presentar modificaciones durante la desnutrición.

La desnutrición intrauterina es un factor que vuelve susceptibles los órganos del recién nacido a incrementar la carbonilación de proteínas en hígado, en corazón de hembras y en cerebro de machos neonatos desnutridos, sobre todo en proteínas de alto peso molecular, lo cual quiere decir que desarrollaron mayor EO en sus órganos.

El aumento en proteínas carboniladas también afecta el hígado, corazón y cerebro de adultos (parentales) con desnutrición.

La actividad enzimática de la CAT tiende a disminuir en ratas Wistar parentales con desnutrición y tiende a aumentar en neonatos con desnutrición materna, sin embargo por la falta de validez estadística se requieren de más estudios para confirmarlo.

## 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Gonçalves CA, Young LT, Yatham LN. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2009; 34(4): 263-271.
- Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 2006; 494(2): 161-172.
- Banerjee M, Pal U, Subudhhi A, Chakrabarti A, Basu S. Interaction of Merocyanine 540 with serum albumins: photophysical and binding studies. *J Photochem Photobiol B* 2012; 108: 23-33.
- Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 797–803.
- Belart-Rodríguez C (eds). Capítulo 3 El camino de los nutrientes. En: *Biología y geología*. 1a edición. Editorial editex. Madrid, España. 2007: 44-62.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (eds). Capítulo 4 DNA, RNA y el flujo de la información genética. En: *Bioquímica*. 6ta edición. Editorial Reverté. Barcelona, España. 2008: 107-133.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272(33): 20313-20316.
- Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu O, Durak I. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest* 2007; 64(4): 187-192.
- Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem* 2012; 68(4): 701-711.
- Brandes RP. Role of NADPH oxidases in the control of vascular gene expression. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5(6): 803–811.
- Burdon RH. Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 1028–1032.
- Buttriss J. Nutrient requirements and optimization of intakes. *Br Med Bull* 2000; 56(1): 18-33.

- Calzada-León R. Desnutrición. En: Crecimiento del niño: fundamentos Fisiopatológicos. 1a edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. 1998: 206.
- Caron E, Ciofi P, Prevot V, Bouret SG. Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function. *J Neurosci* 2012; 32(33): 11486-11494.
- Casanueva E, Flores-Quijano ME. Nutrición de la mujer adulta. En: Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, Arroyo P (eds). Nutriología Médica. 3a edición. Editorial Panamericana. México, México. 2008: 174-210.
- Castellanos-Puerto E. La nutrición, su relación con la respuesta inmunitaria y el estrés oxidativo. *Rev Haban Cienc Méd* 2008; 7(4): 1-12.
- Castillo C, Benedito JL, López-Alonso M, Miranda M, Hernández J. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch Med Vet* 2001; 33(1): 5-20.
- Céspedes-Cabrera T, Sánchez-Serrano D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol* 2000; 14(1): 55-60.
- Céspedes-Miranda EM, Hernández-Lantigua I, Llópiz-Janer N. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cubana Invest Bioméd* 1996; 15(2): 10-15.
- Chang J, Cornell JE, Van Remmen H, Hakala K, Ward WF, Richardson A. Effect of aging and caloric restriction on the mitochondrial proteome. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62(3): 223-234.
- Chanson A, Sayd T, Rock E, Chambon C, Santé-Lhoutellier V, Potier de Courcy G, Brachet P. Proteomic analysis reveals changes in the liver protein pattern of rats exposed to dietary folate deficiency. *J Nutr* 2005; 135(11): 2524-2529.
- Cisneros-Prego E, Pupo-Balboa J, Céspedes-Miranda E. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 1997; 16(1): 10-15.

- Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006; 10(2): 389-406.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003b; 9(4): 169-176.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003a; 329(1-2): 23-38.
- Delgado-Olivares L, Betanzos-Cabrera G, Sumaya-Martínez MT. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia* 2010; 50: 10-15.
- Díaz-Acosta AE, Membrillo-Hernández J. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de preteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 2006; 9(1): 34-44.
- Dimitrova-Shumkovska J, Veenman L, Ristoski T, Leschiner S, Gavish M. Chronic high fat, high cholesterol supplementation decreases 18 kDa Translocator Protein binding capacity in association with increased oxidative stress in rat liver and aorta. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(3): 910-921.
- Dowling V, Hoarau PC, Romeo M, O'Halloran J, van Pelt F, O'Brien N, Sheehan D. Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: a proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquat Toxicol* 2006; 77(1): 11-18.
- Duarte-Díaz MM, Crespo-Silva AM, León-Pérez D, Larrondo-Muguercia H, Herrera-Torres ML, Pérez-Assef H, Rivero Arias E. Nutrición y función respiratoria. *Acta Médica* 2003; 11(1): 26-37.
- Dusingize JC, Hoover DR, Shi Q, Mutimura E, Kiefer E, Cohen M, Anastos K. Association of Serum Albumin with Markers of Nutritional Status among HIV-Infected and Uninfected Rwandan Women. *PLoS One* 2012; 7(4): e35079.e.
- Elejalde-Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna (Madrid)* 2001; 18(6): 326-335.

- Edwards LJ, Coulter CL, Symonds ME, McMillen IC. Prenatal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28(11): 938-941.
- Finkel T. Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life* 2001; 52(1-2): 3-6.
- Franco Mdo C, Fortes ZB, Akamine EH, Kawamoto EM, Scavone C, de Britto LR, Muscara MN, Teixeira SA, Tostes RC, Carvalho MH, Nigro D. Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in microvessels of intrauterine undernourished rats. *J Physiol* 2004; 558(Pt 1): 239-248.
- Friedman SM, Boyer PM, Barrio-Rendo ME, Morasso MC, Gamba CA, Río ME. Evaluación del crecimiento normal en ratas a través del puntaje Z. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición* 1999; 49(2): 143-148.
- García-Triana BE, García-Morales OH, Clapés-Hernández S, Rodes-Fernández L, García-Piñeiro JC. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I Superóxido dismutasas. *Rev Cubana Invest Biomed* 1995; 14(1): 10-15.
- Gardner DS, Tingey K, Van Bon BW, Ozanne SE, Wilson V, Dandrea J, Keisler DH, Stephenson T, Symonds ME. Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289(4): R947-R954.
- Garrido PA, Teijón RJM, Blanco GD, Villaverde GC, Mendoza OC, Ramírez RJ (eds). Proteínas plasmáticas y coagulación sanguínea. En: *Fundamentos de Bioquímica estructural*. 2a. Edición. Editorial Tébar. Madrid, España. 2006: 162-179.
- Gil-Hernández A. Desnutrición y Enfermedad. En: Planas M, Álvarez J, Culebras JM, García de Lorenzo A, Maldonado J, Mesejo A, Montejo JC (eds). *Tratado de Nutrición: Nutrición Clínica*. 2a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 2010: 9-23.
- Godfrey KM, Barker DJP. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(suppl): 1344S–1352S.

- González-Mendoza M, Vicuña-Fernández N. Modificación de enzimas hepáticas en ratas desnutridas tratadas con acetaminofén. *Gac Méd Méx* 2003; 139(5): 429-433.
- Good RA, West A, Day NK, Dong ZW, Fernandes G. Effects of undernutrition of host cell and organ function. *Cancer Res* 1982; 42(2 Suppl): 737s-746s.
- Griffiths ER, Friehs I, Scherr E, Poutias D, McGowan FX, Del Nido PJ. Electron transport chain dysfunction in neonatal pressure-overload hypertrophy precedes cardiomyocyte apoptosis independent of oxidative stress. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 139(6): 1609-1617.
- Gupta P, Narang M, Banerjee BD, Basu S. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr* 2004; 4: 1-7.
- Guyton AC (ed). Sistema Circulatorio. En: Fisiología Humana. 4a Edición. Editorial Interamericana. México, México. 1975: 88-100.
- Halliwel B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97(6): 1634-1658.
- Iyyaswamy A, Rathinasamy S. Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in the brain of albino rats. *J Biosci* 2012; 37(4): 679-688.
- Joanette EA, Reusens B, Arany E, Thyssen S, Remacle RC, Hill DJ. Low-protein diet during early life causes a reduction in the frequency of cells immunopositive for nestin and CD34 in both pancreatic ducts and islets in the rat. *Endocrinology* 2004; 145(6): 3004-3013.
- Kew S, Mesa MD, Tricon S, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *AmJ Clin Nutr* 2004; 79(4): 674-681.
- Koca R, Armutcu F, Altinyazar HC, Gurel A. Oxidant-Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in generalized vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 406-409.
- Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000; 127(19): 4195-4202.

- Laborie C, Molendi-Coste O, Breton C, Montel V, Vandenbulcke F, Grumolato L, Anouar Y, Vieau D. Maternal perinatal undernutrition has long-term consequences on morphology, function and gene expression of the adrenal medulla in the adult male rat. *J Neuroendocrinol* 2011; 23(8): 711-724.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-685.
- Lan W, Guhaniyogi J, Horn MJ, Xia JQ, Graham B. A density-based proteomics sample fractionation technology: folate deficiency induced oxidative stress response in liver and brain. *J Biomol Tech* 2007; 18(4): 213-225.
- Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J Reprod Fertil* 1996; 106(2): 307-312.
- Langley-Evans SC. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc* 2001; 60(4): 505-513.
- Lee HP, Pancholi N, Esposito L, Previll LA, Wang X, Zhu X, Smith MA, Lee HG. Early induction of oxidative stress in mouse model of Alzheimer disease with reduced mitochondrial superoxide dismutase activity. *PLoS One* 2012; 7(1): IDe28033.
- Leiva-Plaza B, Inzunza-Brito N, Pérez-Torrejón H, Castro-Gloor V, Jansana-Medina JM, Toro-Díaz T, Almagiá-Flores A, Navarro-Díaz A, Urrutia-Cáceres MS, Cervilla-Oltremari J, Ivanovic-Marincovich D. Algunas consideraciones sobre el impacto de la desnutrición en el desarrollo cerebral, inteligencia y rendimiento escolar. *ALAN* 2001; 51(1-Supp51): 64-71.
- Lizarraga-Mollinedo E, Fernández-Millán E, de Toro Martín J, Martínez-Honduvilla C, Escrivá F, Álvarez C. Early undernutrition induces glucagon resistance and insulin hypersensitivity in the liver of suckling rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302: E1070–E1077.
- Mendoza-Núñez VM, Sánchez-Rodríguez MA, Correa-Muñoz E. Undernutrition and oxidative stress as risk factors for high blood pressure in older Mexican adults. *Ann Nutr Metab* 2009; 54(2): 119-123.

- Moldovan L, Mythreye K, Goldschmidt-Clermont PJ, Satterwhite LL. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD (P)H oxidase and Rac1. *Cardiovasc Res* 2006; 71(2): 236-46.
- Mora RJF. Albúmina. En: Mora RJF (ed). Soporte Nutricional Especial. 3a. Edición. Editorial Panamericana. México, México. 2002: 109-118.
- Morrison TF, Cornett FD, Tether JE, Gratz P (eds). El cerebro. En: Fisiología Humana. 1a Edición. Editorial Continental. México, México. 1970: 131-152.
- Negi R, Pande D, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD. Evaluation of biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in the cord blood of preterm low birth weight neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(8): 1338-1341.
- Nwagwu MO, Cook A, Langley-Evans SC. Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. *Br J Nutr* 2000; 83(1): 79-85.
- Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO Journal* 2005; 24(7): 1311-1317.
- OMS. Enfermedades Cardiovasculares. 2012 [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>]. [accesada en febrero 24, 2013].
- Ortiz-Andrellucchi A, Peña Quintana L, Albino Beñacar A, Mönckeberg Barros F, Serra-Majem L. Desnutrición infantil, salud y pobreza: intervención desde un programa integral. *Nutr Hosp* 2006; 21(4): 533-541.
- Parra-Gómez L, Téllez-Girón JR, Escobar-Briones C. La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. *Rev Fac Med UNAM* 2003; 46(1): 32-36.
- Rajesh M, Sulochana KN, Coral K, Punitham R, Biswas J, Babu K, Ramakrishnan S. Determination of carbonyl group content in plasma proteins as a useful marker to assess impairment in antioxidant defense in patients with Eales' disease. *Indian J Ophthalmol* 2004; 52(2): 139-144.
- Ribarič S. Diet and Aging. *Hindawi Publishing Corporation* 2012; 2012: 1-20.
- Roche Collado E, Romero Alvirab D. Estrés oxidativo y degradación de proteínas. *Med Clin (Barc)* 1994; 103: 189-196.

- Rodríguez-Perón JM, Menéndez-López JR, Trujillo-López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Mil* 2001; 30(1): 36-44.
- Schlesinger L, Stekel A. Alteraciones inmunológicas en la desnutrición. *Rev Chilena Pediatría* 1973; 44(5): 455-462.
- Segarra EE. Aparato digestivo. En: Segarra EE (ed). Fisiología de los aparatos y sistemas. 1a. Edición. Editorial 21 ediciones. 2006: 45-162.
- Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 191-208.
- Szitányi P, Janda J, Poledne R. Intrauterine undernutrition and programming as a new risk of cardiovascular disease in later life. *Physiol Res* 2003; 52(4): 389-395.
- Tamarit J, Cabiscol E, Ros J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem* 1998; 273(5): 3027-3032.
- Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Chen JH, Cripps RL, Ozanne SE. Maternal diet influences DNA damage, aortic telomere length, oxidative stress, and antioxidant defense capacity in rats. *FASEB J* 2008; 22(6): 2037-2044.
- Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Fernandez-Twinn DS, Hargreaves I, Alfaradhi MZ, Land JM, Aiken CE, Ozanne SE. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to alterations in DNA damage and repair, oxidative and nitrosative stress, and oxidative defense capacity in rat heart. *FASEB J* 2013; 27(1): 379-390.
- Tomic S, Brkic S, Maric D, Mikic AN. Lipid and protein oxidation in female patients with chronic fatigue syndrome. *Arch Med Sci* 2012; 8(5): 886–891.
- Thompson LP, Al-Hasan Y. Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming. *J Pregnancy* 2012; 2012: 582748.
- Touchette N. Capítulo 6 Soluciones a los problemas circulatorios. En: Todo y más sobre diabetes. 1a edición. Editorial Prentice-Hall. México, México. 2001. 161-195.
- Toussaint-Martínez de Castro G, García-Aranda JA. Desnutrición energético proteínica. En: Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, Arroyo P.

- Nutriología Médica. 3a edición. Editorial Panamericana. México, México. 2008: 264-295.
- Traber PG. Metabolismo Hepático. En: Kelley WN. Medicina Interna. 2a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1992: 459-472.
- Tsaluchidu S, Cocchi M, Tonello L, Puri BK. Fatty acids and oxidative stress in psychiatric disorders. *BMC Psychiatry* 2008; 8 (Suppl 1): S1-S5.
- UNICEF. Estado mundial de la infancia 2012: Niños y niñas en un mundo urbano. Fondo de las naciones unidas para la infancia. 2012; 1-142.
- UNICEF. Informe anual UNICEF México 2011. 2011; 1-35.
- UNICEF. Seguimiento de los progresos en la nutrición de los niños y las madres. Fondo de las naciones unidas para la infancia. 2009; 1-119.
- Venereo-Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil* 2002; 31(2): 126-133.