



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EFECTO DE LA RESTRICCIÓN PROTEICO-CALÓRICA
PRENATAL Y POSTNATAL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y
NITROSATIVO A NIVEL MITOCONDRIAL”.**

PRESENTA: Q.F.B. SACNITÉ ALBARRÁN BRAVO

ASESORES DE TESIS:

DR. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

DR. ROSALIO MERCADO CAMARGO

MORELIA, MICHOACÁN. FEBRERO 2009

ÍNDICE	Pag.
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	7
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	14
I.1 NUTRICIÓN	14
I.2 DESNUTRICIÓN.....	15
I.2.1 DESNUTRICIÓN PROTEICO-CALÓRICA (DPC)	17
I.3 EL HÍGADO	20
I.4 HIPÓTESIS DE LA PROGRAMACIÓN FETAL DE LA ENFERMEDAD.	25
I.4.1 El estrés oxidativo y la programación fetal	29
I.5 LA MITOCONDRIA.....	31
I.6 ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO	35
I.6.1 Especies reactivas de oxígeno	37
I.6.2 Especies reactivas de nitrógeno.....	40
I.7 DEFENSAS ANTIOXIDANTES	45
I.7.1 La glutatión reductasa	47
I.7.2 El glutatión (GSH).....	49
I.7.3 EL GSH Y LA MALNUTRICIÓN	53
II. JUSTIFICACIÓN.....	55
III. HIPÓTESIS	56
IV. OBJETIVOS.....	56
IV.1 Objetivo General	56

IV.2 Objetivos Específicos.....	56
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
V.1 Material Biológico.....	57
V.2 Esquema de la restricción proteico-calórica (RPC)	57
V.3 Aislamiento mitocondrial.....	58
V.4 Determinación de la concentración de proteína mitocondrial	59
V.5 Determinación de los niveles de óxido nítrico mitocondrial.....	61
V.6 Determinación de la lipoperoxidación por el método de TBARS.....	63
V.7 Determinación de la actividad de la glutatión reductasa mitocondrial.....	65
V.8 Cuantificación del glutatión reducido (GSH).....	67
V.9 Análisis por Western blot.....	69
V.9.1 Electroforesis	69
V.9.2 Transferencia	70
V.9.3 Bloqueo de las membranas.....	70
V.9.4 Inmunodetección con anticuerpos	70
V.9.5 Reacción quimioluminiscente.....	71
V.10 Análisis Estadístico	71
VI. RESULTADOS.....	72
VI.1 Peso corporal de los animales.....	72
VI.2 Índice de masa corporal (IMC).....	73
VI.3 Peso del hígado.....	74
VI.4 Fracción mitocondrial enriquecida.....	75
VI.5 Mitocondrias libres de contaminantes citosólicos.....	76
VI.6 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre los niveles del óxido nítrico mitocondrial.....	77
VI.7 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre el perfil de nitrosilación de proteínas mitocondriales.....	79

VI.8 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre la oxidación de lípidos en la mitocondria.	80
VI.9 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre la actividad de la glutatión reductasa mitocondrial (GRd).....	82
VI.10 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre los niveles de glutatión reducido mitocondrial.	83
VII. DISCUSIÓN	84
VIII. RESUMEN DE RESULTADOS.....	91
IX. CONCLUSIONES	91
X. REFERENCIAS.....	92

DEDICATORIA

A mi FAMILIA PRINCIPALMENTE, mis papas Francisco y Maricela por todo el apoyo incondicional y cariño que me han brindado en el transcurso de este nuevo reto. A mis hermanos Tzitziki, Xóchitl y Paco, por compartir esta nueva experiencia conmigo y apoyarme siempre.

A Dios.

¡GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

Al programa de Maestría en ciencias en biología experimental.

A mi asesor el D.C. Alfredo Saavedra Molina. Por su paciencia y amistad.

A mi coasesor el D.C. Rosalio Mercado Camargo, por todo su apoyo, dedicación a este trabajo y sus buenos consejos.

A mis sinodales:

D.C. Salvador Manzo Ávalos

D.C. Rafael Salgado Garciglia

M.C. Héctor Urquiza Marín

Por su aporte a esta tesis, que fue enriquecida por su experiencia y conocimientos.

A la M.V.Z. Madeleine y Don Efra por su apoyo en el bioterio y su amistad.

A mis compañeros del laboratorio, a Mony Clemente por sus grandes consejos, a mis compañeros y amigos de la maestría y principalmente a mi amiga Viry.

A mis siempre AMIGOS:

Lupita, Arturo, Beto, Esther, Héctor, Violeta, Orlando y Alex que me han apoyado de una manera excepcional.

A JAVIER, por que gracias a ti amor he mantenido la fuerza necesaria para seguir adelante. Te amo. Tú haces la diferencia.

A Pato por todos estos años de gran amistad.

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Localización anatómica del hígado.....	21
Fig. 2 Diagrama de la regulación materna durante el desarrollo fetal.	26
Fig. 3 Efectos de la nutrición alterada sobre el crecimiento y la maduración fetal.	27
Fig. 4 Diagrama de los mecanismos de la hipótesis de Barker.	29
Fig. 5 Estructura fundamental de la mitocondria.	31
Fig. 6 Producción de especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial.	34
Fig. 7 Modelo de daño oxidativo mitocondrial.....	35
Fig. 8 Esquema de las reacciones de los radicales libres en los sistemas biológicos.	36
Fig. 9 Mecanismo de lipoperoxidación en ácidos grasos insaturados.....	39
Fig. 10 Reacción general de la enzima óxido nítrico sintasa.	40
Fig. 11 Efectos biológicos del óxido nítrico.	42
Fig. 12 Reacciones fisiológicas relevantes del óxido nítrico.....	44
Fig. 13 Ciclo de óxido-reducción del glutatión.	48
Fig. 14 Esquema del glutatión reducido.	50
Fig. 15 El metabolismo básico del glutatión.	50
Fig. 16 Síntesis del glutatión.....	52
Fig. 17 Determinación indirecta del óxido nítrico por el método de Griess.....	61
Fig. 18 Reacción en cadena de la lipoperoxidación	64
Fig. 19 Reacción de la enzima glutatión reductasa	66
Fig. 20 Peso corporal de los animales.....	72
Fig. 21 Índice de la masa corporal.....	73, 74
Fig. 22 Peso del hígado.....	75
Fig. 23 Fracción mitocondrial enriquecida.....	76
Fig. 24 Mitocondrias libres de contaminantes citosólicos	77

Fig. 25 Efecto de la RPC sobre los niveles de óxido nítrico mitocondrial. 78

Fig. 26 Efecto de la RPC sobre el perfil general de nitrosilación de proteínas mitocondriales.....79,80

Fig. 27 Efecto de la RPC sobre la oxidación de lípidos de membranas mitocondriales. 81

Fig. 28 Efecto de la RPC sobre la actividad de la glutatión reductasa mitocondrial 82

Fig. 29 Efecto de la RPC sobre los niveles de glutatión reducido mitocondrial..... 83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Concentración de glutatión en el organismo. 51

Tabla II. Composición del Medio I para aislamiento de las mitocondrias de hígado de rata. 59

Tabla III. Composición del Medio II para resuspensión de las mitocondrias de hígado de rata 59

Tabla IV. Composición del Medio base para la determinación del óxido nítrico. ... 62

Tabla V. Composición del Medio base para determinación de TBARS. 64

Tabla VI. Componentes necesarios para la determinación de la actividad de la GRd. 66

Tabla VII. Componentes necesarios para la determinación de los niveles de glutatión reducido..... 68

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

➤ RPC	Restricción proteico-calórica
➤ ERO	Especies reactivas de oxígeno
➤ ERN	Especies reactivas de nitrógeno
➤ NO• _m	Óxido nítrico mitocondrial
➤ OMS	Organización mundial de la salud
➤ FAO	Food and Agriculture Organization

➤ SSA	Secretaría de Salud y Asistencia
➤ DPC	Desnutrición proteico-calórica
➤ Å	Amstrong
➤ FMN	Flavín mononucleótido
➤ H ⁺	Hidrógeno
➤ ATP	Adenosín trifosfato
➤ NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
➤ ADP	Adenosín difosfato
➤ O ₂	Oxígeno molecular
➤ NO•	Óxido nítrico
➤ ·OH	Radical hidroxilo
➤ H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
➤ NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
➤ nM	Nanomolar
➤ μM	Micromolar
➤ mM	Milimolar
➤ ONOO-	Anión peroxinitrito
➤ NOS	Óxido nítrico sintasa
➤ iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
➤ eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
➤ mitNOS	Óxido nítrico sintasa mitocondrial
➤ FAD	Flavín adenín dinucleótido
➤ cNOS	Óxido nítrico sintasa constitutiva
➤ GRd	Glutación reductasa
➤ GSSG	Glutación oxidado
➤ GPx	Glutación peroxidasa
➤ SOD/CAT	Superóxido dismutasa/Catalasa

➤ -SH	Radical sulfidrilo
➤ γ GCS	Gamma-glutamil cisteinil sintetasa
➤ γ GCT	Gamma-glutamil carboxil transferasa
➤ γ GT	Gamma-glutamil transpeptidasa
➤ γ GS	Gamma-glutámico sintetasa
➤ GSH	Glutati3n reducido
➤ h	Horas
➤ °C	Grados centígrados o celsius
➤ g	Gramos
➤ R.C.	Restricci3n cal3rica
➤ pH	Potencial de hidrógeno
➤ l	Litros
➤ ml	Mililitros
➤ rpm	Revoluciones por minuto
➤ mg	Miligramos
➤ P.M.	Peso molecular
➤ TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
➤ TBA	Ácido tiobarbitúrico
➤ DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico)

RESUMEN

La nutrición en los últimos años ha tomado un gran interés como un factor determinante en el desarrollo de las enfermedades crónicas y existe evidencia científica de que las alteraciones en la dieta (desnutrición u obesidad) tienen influencia en la salud a lo largo de la vida. Estudios epidemiológicos en humanos relacionan la incidencia de una variedad de enfermedades en el adulto, tales como la diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y la hipertensión con la pobre nutrición prenatal y el bajo peso al nacer. Este grupo de enfermedades es comúnmente conocido bajo el término de Síndrome Metabólico o Síndrome X. Está bien establecido en diversas especies animales que las alteraciones producidas por la restricción proteico-calórica (RPC) o desnutrición pueden tener efectos permanentes si ésta ocurre en un periodo crítico durante la etapa del desarrollo fetal. Por otro lado, el estrés oxidativo es una de las posibles causas, asociada con el crecimiento fetal adverso o parto prematuro; este puede ser un factor común entre la programación fetal y la asociación con el riesgo elevado de padecer enfermedades en la etapa adulta. Dentro de la célula el principal orgánulo generador de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) es la mitocondria, en la cual, al existir un desbalance entre la producción ERO y/o ERN y las defensas antioxidantes se genera el estrés oxidativo y/o nitrosativo. Probablemente este orgánulo puede estar jugando un papel importante en la regulación del estrés oxidativo y/o nitrosativo durante la restricción proteico-calórica y tener influencia en la posible programación fetal de la enfermedad.

Es importante, poder determinar el impacto que puede generar un cambio nutricional (RPC) sobre el estrés oxidativo y nitrosativo a nivel mitocondrial durante el desarrollo en etapas prenatales y postnatales, por lo que en el presente trabajo sometimos a un grupo de ratas tanto hembras como machos a RPC y determinamos parámetros indicativos de el estrés oxidativo y nitrosativo en las mitocondrias de hígado de rata. Los resultados mostraron variaciones

dependientes de la etapa del desarrollo de la rata, observándose un incremento por arriba del 200% en la producción de óxido nítrico mitocondrial ($\text{NO}\bullet_m$), valores disminuidos en los niveles de lipoperoxidación del 200% menos, así como también en el perfil de nitrosilación de proteínas un incremento de aproximadamente el 15%, en cuanto al efecto de la RPC sobre las defensas antioxidantes, la actividad de la enzima glutatión reductasa y los niveles de glutatión reducido al interior de la mitocondria, se observaron valores menores de hasta el 50% en la actividad enzimática y los niveles de glutatión reducido se encontraron disminuidos aproximadamente un 10% en las etapas cercanas al nacimiento (recién nacidas), contrariamente en etapas posteriores al desarrollo completo del animal (15, 23 y 31 semanas) se observaron valores similares al control en las determinaciones antes mencionadas.

Estos resultados sugieren que la RPC tiene un efecto negativo sobre el control del estrés oxidativo y nitrosativo en la etapa perinatal en contraste con lo observado en la etapa postnatal, donde se observaron valores similares al control.

Palabras clave: *Desnutrición, Síndrome Metabólico, Modelo de restricción proteico-calórica, Estrés oxidativo y nitrosativo, Mitocondria.*

ABSTRACT

Over the last years, nutrition became an important and determinant factor for the development of chronic diseases, there is scientific evidence about the influence in health during life because alterations in the diet (desnutrition or obesity). Human epidemiological studies link the incidence of a number of adult diseases, such as type 2 diabetes, cardiovascular disease (CVD) and hypertension with poor nutrition and low birth weight. This group of diseases is often referred as Metabolic Syndrome or Syndrome X. It is well established in a wide variety of animal species that alterations produced for protein-caloric restriction may have permanent effects if this occurs during a critical period of development. On the other hand, oxidative stress could be a possible cause for the adverse foetal development or premature childbirth; this can be a common factor between foetal programming and the elevated risk of pathological events in the adult. A great number of animal studies confirm the association between events during foetal life and subsequent adult disease.

In the cell, the mitochondria is the principal organelle generator of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), unbalance between the ROS or RNS and antioxidant defences generate oxidative or nitrosative stress. Probably, the mitochondria plays an important role in the regulation of oxidative and nitrosative stress during the protein-caloric restriction and influences programming during foetal life.

It is important to determine the impact of the protein-caloric restriction during foetal life and the influence on the oxidative and nitrosative stress in rat liver mitochondria, in the present work in animals under protein and calorie restriction of both sex (females and males) we determined the indicative parameters of oxidative and nitrosative stress. The results showed dependent variations of the stage of development in the rat, showing an increase of the 200% in the production of mitochondrial nitric oxide, decreased values of lipoperoxidation about 200% less, an increase in the profile of nitrosylation of 15%, for the antioxidant defences, the

glutathione reductase activity and the reduced glutathione levels were diminished in the newborn and 3 weeks old offspring under protein-caloric restriction, in contrast, animals of 15, 23 and 31 weeks of age showed similar levels to control group in these determinations.

These results suggest the possible implication of the protein-caloric restriction in the negative control of the mitochondrial oxidative and nitrosative stress during early stages of development, in contrast with the adult stage.

Key words: *Desnutrition, Metabolic Syndrome, Protein-caloric restriction model, Oxidative and nitrosative stress, Mitochondria.*

I. INTRODUCCIÓN

I.1 NUTRICIÓN

La nutrición es el proceso biológico a partir del cual el organismo asimila los alimentos y los líquidos necesarios para el funcionamiento, el crecimiento y el mantenimiento de sus funciones vitales (OMS, 2007).

Aunque alimentación y nutrición se utilizan frecuentemente como sinónimos, son términos diferentes ya que:

- La nutrición hace referencia a los nutrientes que componen los alimentos y comprende los procesos involuntarios que suceden tras la ingestión de los alimentos, tales como, la digestión, la absorción o el paso de los nutrientes a la sangre a través del tracto digestivo, su metabolismo o transformación química dentro de las células y excreción o eliminación del organismo.
- La alimentación comprende un conjunto de actos voluntarios y conscientes que van dirigidos a la elección, preparación e ingestión de los alimentos, fenómenos muy relacionados con el medio sociocultural y económico (medio ambiente) y determinan al menos en gran parte, los hábitos dietéticos y estilos de vida (Kasper *et al.*, 2006).

Una nutrición adecuada es la que cubre los siguientes requerimientos:

1. De energía, a través del metabolismo de nutrientes como los carbohidratos, proteínas y grasas. Estos requerimientos energéticos están relacionados con el gasto metabólico basal, el gasto por la actividad física y el gasto inducido por la dieta.
2. Las necesidades de micronutrientes como las vitaminas y los minerales.
3. La correcta hidratación basada en el consumo de bebidas, en especial de agua.
4. La ingesta suficiente de fibra dietética.

Los *nutrientes*, o *nutrimentos*, son sustancias que el organismo no sintetiza en cantidades suficientes, por lo que deben ser aportadas por la alimentación. Para una buena salud, el ser humano necesita nutrientes que le proporcionen energía (proteínas, grasas e hidratos de carbono), vitaminas, minerales y agua. Las cantidades necesarias de nutrientes esenciales difieren con la edad y el estado fisiológico. El crecimiento, la actividad física extenuante, el embarazo y la lactancia aumentan las necesidades de energía y de varios elementos nutritivos esenciales. Durante el embarazo las necesidades de energía aumentan debido a las demandas del crecimiento fetal y, durante la lactancia, a causa del incremento energético necesario para la producción de leche (Kasper *et al.*, 2006).

Alteraciones en la salud pueden ser causadas por un desbalance en la administración de nutrientes y de energía, ya sea por una deficiencia (desnutrición) o un exceso (obesidad) de estos. Ambas condiciones son el resultado de un desequilibrio entre las necesidades corporales y el consumo de nutrientes esenciales (Kasper *et al.*, 2006).

I.2 DESNUTRICIÓN

DEFINICIÓN

La OMS define a la desnutrición como el desbalance entre la administración de nutrientes y energía y la demanda del organismo para su seguro crecimiento y mantenimiento de las funciones principales. Es un estado de carencia producido por una insuficiente ingesta de calorías, proteínas o ambas (OMS, 2007).

La desnutrición sigue representando hoy en día un problema en la mayoría de los países en desarrollo. La OMS (2007) incluye a la desnutrición en la categoría de “enfermedades de rezago epidemiológico”. Se le considera de “rezago” porque es prevenible; también, porque estas enfermedades se asocian a poblaciones marginadas y pobres que no tienen acceso a servicios básicos de salud.

INCIDENCIA

A nivel mundial, la cifra de población desnutrida en el mundo en 2007 se elevó a 923 millones de personas desnutridas y las perspectivas de reducir en el futuro estas cifras son sombrías (FAO, 2008). En México, la Secretaría de Salud (SSA) dio a conocer los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición-ENSANU (2006), los datos revelan que uno de cada 5 niños mexicanos tiene un cierto grado de desnutrición o algún grado de anemia. Si nos enfocamos al territorio mexicano, los estados en donde se presenta con mayor frecuencia son: Guerrero, Puebla, Yucatán, Campeche, Chiapas, Oaxaca, Veracruz y el Estado de México (Ávila-Curiel *et al.*, 1998).

CLASIFICACIÓN

Dependiendo del tipo de nutriente faltante, la desnutrición puede ser calórica, proteica o mixta (McClave *et al.*, 1992). La desnutrición calórica, se caracteriza por un balance calórico negativo de evolución prolongada (semanas a meses), la desnutrición proteica se desarrolla por un balance negativo nitrogenado, también se denomina Kwashiorkor del adulto y la desnutrición mixta se caracteriza por la presencia de balances negativos tanto calóricos como proteicos en grados variables de intensidad.

La desnutrición en general se presenta y manifiesta en cuatro formas diferentes denominadas *Kwashiorkor*, *Marasmática*, *Kwashiorkor marasmática mixta* y *sugar baby*. En el primer caso, los niños presentan inflamación; en el segundo, delgadez extrema (piel pegada al hueso); en el tercero, una combinación de las dos anteriores y en el cuarto, lucen sanos y "gorditos", pero cuando son sometidos a análisis sanguíneos se revela la insuficiencia de nutrientes, esto se debe a que perdieron grasa y nutrientes, pero acumularon agua y su peso aparentemente está dentro de los parámetros normales. En los cuatro tipos de desnutrición, los niños presentan palidez, caída de cabello y disminución en el crecimiento (McClave, 1992; Ávila-Curiel *et al.*, 1998).

Para diagnosticar desnutrición y su grado de avance se realizan exámenes de sangre con los cuales se determina si existe deficiencia de vitaminas, proteínas y minerales. El dato de laboratorio que sirve de apoyo para determinar si un paciente tiene desnutrición, es la cuantificación de proteínas en sangre por ejemplo la albúmina, un niño sano debe tener 4g por cada 100 ml de fluido, y un niño con desnutrición tiene hasta 2.5g (Ávila-Curiel *et al.*, 1998).

La desnutrición se induce por diferentes déficits de nutrientes, sus síntomas no son los mismos en todos los casos y no se presenta en la misma etapa. Esto indica que cada ser humano la puede presentar en cualquier etapa de su vida, ya sea en época temprana y/o en época tardía, es decir, la desnutrición se puede presentar durante la etapa prenatal, perinatal y/o postnatal. Dependiendo de la etapa en que se presente, tendremos la severidad de sus consecuencias, pudiendo ser éstas de naturaleza reversible o irreversible (Parra-Gómez *et al.*, 2003).

El organismo necesita más nutrientes durante ciertas etapas de la vida, particularmente en la infancia, en la niñez temprana y en la adolescencia, así como también durante el embarazo y durante la lactancia. En la vejez, las necesidades nutricionales son menores, pero la capacidad para absorber los nutrientes está también reducida. Por lo tanto, el riesgo de desnutrición es mayor en estas etapas de la vida (Kasper *et al.*, 2006).

I.2.1 DESNUTRICIÓN PROTEICO-CALÓRICA (DPC)

DEFINICIÓN

Es un estado clínico-patológico que se presenta cuando una dieta no es capaz de satisfacer las necesidades corporales de proteínas, energía o ambas. Incluye una amplia variedad de manifestaciones clínicas, condicionadas por la intensidad relativa de la deficiencia de proteínas o de energía, la severidad y duración de las deficiencias, edad del paciente, causas de la deficiencia y asociación con otras enfermedades nutricionales o infecciosas. La severidad de la desnutrición va

desde la pérdida de peso o retardo del crecimiento, hasta distintos síndromes clínicos frecuentemente asociados con deficiencias de vitaminas o minerales (Olson, 2005).

INCIDENCIA

La desnutrición proteico-calórica (DPC) en la población pediátrica es, en la actualidad, el problema de nutrición más importante de los países no industrializados. No existen cifras exactas sobre su prevalencia en el mundo y es incluso difícil hacer cálculos sobre ello (Jiménez-Guerra, 2003).

CLASIFICACIÓN

Las deficiencias dietéticas de fuentes calóricas y de proteínas suelen presentarse al mismo tiempo, pero a veces una predomina y, si tiene la suficiente gravedad, puede conducir al síndrome clínico del *kwashiorkor* (predomina la deficiencia de proteínas) o de *marasmo* (predomina la deficiencia de calorías).

La DPC puede clasificarse como *primaria*, los casos en que ocurre como consecuencia de una ingesta inadecuada de alimentos, o *secundaria*, cuando es el resultado de otras enfermedades que conducen a ingesta baja de alimentos, absorción o aprovechamiento inadecuados de nutrimentos, incremento de los requerimientos nutricionales, mayor pérdida de nutrimentos o ambos. Su inicio puede ser rápido, como en el caso de la inanición que se debe a la suspensión abrupta o gradual de la alimentación (Jiménez-Guerra, 2003).

Uno de los principales factores de la desnutrición infantil es la desnutrición materna, antes o durante el embarazo, con el riesgo de presentar bajo peso al nacer. Otros son las enfermedades infecciosas, virales, bacterianas, protozoarias y parasitarias. La enfermedad diarreica y las infecciones respiratorias son también otros factores biológicos responsables de la desnutrición infantil, porque se acompañan generalmente de anorexia, vómitos, disminución de la absorción intestinal y aumento del catabolismo corporal. Las dietas inadecuadas tanto en

calidad como en cantidad, las anomalías metabólicas, estrés, etc, también contribuyen a una absorción defectuosa o insuficiente de alimentos (Olson, 2005).

La DPC es más frecuente en infantes y en los niños preescolares, especialmente en prematuros o con peso al nacer menor de 2,500 g, posteriormente siguen las mujeres embarazadas o en etapa de lactancia y por último los ancianos y adolescentes (Pérez-García y Castañeda-Orellana, 2000).

Las etapas en donde se observan efectos adversos de mayor intensidad corresponden a etapas críticas del desarrollo y maduración del organismo, ya que el desarrollo del individuo depende de manera directa de las condiciones nutricionales durante la gestación y el periodo postnatal temprano, debido a que la baja y/o deficiente calidad de la dieta en estas etapas puede provocar alteraciones tanto en la organización de los sistemas como en la constitución de diversos órganos, que pueden persistir hasta la edad adulta (Parra-Gómez *et al.*, 2003).

Los niños desnutridos padecen retraso del desarrollo motor, trastornos de la coordinación muscular y del lenguaje, disminución en la capacidad cognoscitiva y bajo rendimiento escolar (Onis *et al.*, 1999).

Una forma de evaluar cómo se desarrolló el individuo durante la gestación, es considerar la nutrición materna durante el embarazo y el peso al nacimiento del individuo. El crecimiento fetal muestra fuerte relación con una amplia variedad de factores dependientes del estado nutricional. Éstos incluyen pobre dieta materna, escasas reservas nutricionales en la madre, inadecuado flujo sanguíneo uterino incluyendo defectos en la permeabilidad de nutrientes a través de la placenta, y la influencia hormonal materna, la talla y el peso al nacimiento reflejan la trayectoria y condición del crecimiento fetal. Lo anterior encuentra apoyo en diversas investigaciones con modelos animales en donde la dieta materna desbalanceada (desnutrición) durante periodos tempranos de la gestación provoca bajo peso de la camada al nacimiento (desnutrición fetal), mientras la desnutrición en periodos

tardíos de la gestación provoca efectos en la proporción corporal y poco efecto sobre el peso al nacimiento de las crías (Godfrey y Barker, 2000).

Utilizando estos modelos de desnutrición se ha llegado a concluir que una dieta baja en proteína y/o calorías durante la gestación y la lactancia ocasiona:

a) Retraso permanente del crecimiento de la camada (Anderson *et al.*, 1980; Lederman y Rosse, 1981; Valiente *et al.*, 1999).

b) Cambios permanentes y selectivos en el crecimiento de los órganos. Órganos esenciales como el cerebro y los pulmones mantienen su desarrollo casi sin alteración, a diferencia de órganos viscerales como el hígado, páncreas, músculo y bazo, los cuales presentan una disminución en el tamaño y en su desarrollo adecuado (Winick y Noble, 1966; Desai *et al.*, 1996; Gosby *et al.*, 2003).

c) Actividad metabólica del hígado permanentemente alterada. La actividad de enzimas clave de la vía de glucólisis y gluconeogénesis se encuentra incrementadas (glucocinasa y fosfoenol piruvato carboxilasa) de lo cual resulta que el hígado funcione en un estado de ayuno permanente (Desai y Hales, 1997; Gosby *et al.*, 2003).

El hígado es uno de los principales órganos alterados por la desnutrición proteico-calórica, debido al importante papel que juega en el funcionamiento adecuado del metabolismo, el peso y tamaño del hígado se reducen significativamente debido a la desnutrición (Desai *et al.*, 1997; Hales *et al.*, 1997, Burns *et al.*, 2000).

I.3 EL HÍGADO

El hígado es el primer órgano que tiene contacto con la sangre proveniente del intestino. Esto implica que la superficie hepática absorba nutrientes, toxinas y microorganismos derivados del intestino, y también compuestos de la luz intestinal, por lo que se puede afirmar que el hígado actúa como una planta preparadora de lo que se va a liberar a otros órganos. La forma del hígado es semiovoidea, su color es rojo pardo, tiene un peso de entre 1.5 a 2 kg en el adulto

y se localiza en el hipocondrio derecho o cuadrante superior derecho, por debajo del diafragma y por arriba del estomago y del intestino delgado (fig. 1) (Gayton y Hall, 2001; Simon, 2005).

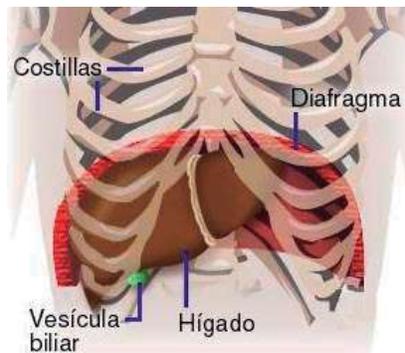


Fig. 1. Localización anatómica del hígado. Tomada de:
www.facmed.unam.mx/.../imagenes/FIGURA16.jpg

Este órgano tiene tres tipos de funciones básicas que son: 1) Funciones vasculares (almacenamiento y filtración), 2) Funciones metabólicas y 3) Funciones secretoras y excretoras encargadas de formar la bilis.

1. Funciones vasculares.

Las características vasculares del hígado, hacen posible que se comporte como un reservorio importante de sangre y además, que actúe como un filtro para la sangre procedente del intestino.

Función de almacenamiento.

El sistema vascular hepático funciona ofreciendo muy baja resistencia al flujo de sangre, especialmente cuando consideramos que 1.45 l de sangre siguen este camino cada minuto. No obstante, hay ocasiones en que la resistencia al flujo de la sangre por el hígado se incrementa, como ocurre en la cirrosis hepática. Así como también es secundario a afecciones virales hepáticas, desnutrición y procesos infecciosos de los conductos biliares (Gayton y Hall, 2001; Simon, 2005).

Entre otras características vasculares, el hecho de que el hígado sea un órgano grande, venoso, con gran capacidad de almacenamiento, le permite formar parte de los reservorios de sangre del organismo; ya que es capaz de almacenar el 10% del volumen total de sangre (Gayton y Hall, 2001; Simon, 2005).

Función de filtración.

Las superficies internas de los sinusoides hepáticos están cubiertas por un elevado número de células de Kupffer o macrófagos residentes en el hígado, cuya función consiste en fagocitar parásitos, virus, bacterias y macromoléculas (como inmunocomplejos y endotoxinas bacterianas) por endocitosis mediada por receptores. Por tanto, estas células constituyen una poderosa e importante barrera fagocítica para toxinas y microorganismos provenientes del intestino (Gayton y Hall, 2001; Simon, 2005).

2. Funciones metabólicas.

Las funciones metabólicas hepáticas son llevadas a cabo por los hepatocitos, o sea por las células parenquimatosas, las cuales participan en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, de la siguiente manera:

Metabolismo de los carbohidratos.

Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los carbohidratos son:

1. Almacenamiento de glucógeno.
2. Conversión de galactosa y fructosa a glucosa.
3. Gluconeogénesis.
4. Formación de compuestos químicos importantes a partir de productos intermedios del metabolismo de los carbohidratos.

El hígado es un órgano de particular importancia en el mantenimiento de concentraciones normales de glucosa en sangre. Cuando la concentración de

glucosa se incrementa por encima de los valores normales, el exceso es removido por la vía de la síntesis de glucógeno, glicólisis y lipogénesis. Cuando se produce un déficit de glucosa en sangre, el hígado la libera por la vía de la glucógenolisis y gluconeogénesis (Gayton y Hall, 2001; Simon, 2005).

Metabolismo de los lípidos.

Aunque el metabolismo de las grasas puede ocurrir en casi todas las células, algunos aspectos del mismo se producen con mayor rapidez en el hígado que en las demás células. Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los lípidos son las siguientes:

1. Se realiza la mayor parte de la β -oxidación de ácidos grasos y formación de ácido acetoacético.
2. Formación de la mayor parte de las lipoproteínas.
3. Formación de cantidades considerables de colesterol y fosfolípidos.
4. Conversión de grandes cantidades de carbohidratos y proteínas en grasas.

Metabolismo de proteínas.

A pesar de que gran parte de los procesos metabólicos de carbohidratos y grasas ocurren en el hígado, el cuerpo probablemente pudiera prescindir de tales funciones hepáticas y sobrevivir. Por otra parte, el cuerpo no puede prescindir de las funciones del hígado en el metabolismo de proteínas por más de unos días, sin que se produzca la muerte (Gayton y Hall, 2001; Simon, 2005).

Las funciones más importantes del hígado en dicho metabolismo son:

1. Desaminación de aminoácidos.
2. Formación de urea para suprimir el amoníaco de los líquidos corporales.
3. Formación de aproximadamente el 90% de todas las proteínas plasmáticas.

4. Interconversiones entre los diferentes aminoácidos y otros compuestos importantes para los procesos metabólicos de la economía celular.

El hígado también tiene otras funciones metabólicas como son: almacenamiento de vitaminas, formación de sustancias que intervienen en el proceso de coagulación, tales como el fibrinógeno, protrombina, factores VII, IX y X, almacenamiento de hierro y eliminación o excreción de fármacos, hormonas y otras sustancias (Gayton y Hall, 2001; Simon, 2005).

3. Funciones excretoras y secretoras encargadas de formar bilis.

Una de las tantas funciones hepáticas es la formación y secreción de bilis. La bilis es una secreción acuosa que posee componentes orgánicos e inorgánicos cuya osmolaridad es semejante a la del plasma y normalmente un humano adulto secreta entre 600 y 1,200 ml diarios. El hígado secreta bilis en dos etapas, en la etapa inicial los hepatocitos producen una secreción que contiene grandes cantidades de ácidos biliares, colesterol y otros constituyentes orgánicos que se vierten al canal biliar. En el curso que sigue la bilis por estos conductos se produce la segunda etapa de la secreción, en la cual se añade una secreción adicional que consiste en una solución acuosa de sodio y bicarbonato secretada por las células epiteliales del sistema de drenaje biliar (Gayton y Hall, 2001; Simon, 2005).

Almacenamiento y concentración de bilis en la vesícula biliar.

La bilis es secretada continuamente por los hepatocitos y se almacena en la vesícula, se mantiene almacenada hasta que se necesita en el duodeno. Se pueden secretar hasta 1200 ml por día de bilis y la vesícula posee un volumen máximo entre 30 y 60 ml. (Gayton y Hall, 2001; Simon, 2005).

I.4 HIPÓTESIS DE LA PROGRAMACIÓN FETAL DE LA ENFERMEDAD.

Desde el punto de vista biológico, cada organismo que sobrevive y se reproduce está, por definición, adaptado a su ambiente. Pero una vez adaptado, la estrategia de sobrevivencia exige condiciones sostenibles para que esta adaptación represente un beneficio real tanto al individuo como a la especie (Parra-Gómez et al., 2003).

El individuo desnutrido se adapta a su ambiente restringido en nutrientes mediante un lento aumento del peso corporal, sobre todo en los periodos tempranos del desarrollo, además de ajustar su metabolismo a la deficiente disponibilidad de nutrientes (Parra-Gómez et al., 2003). Estudios epidemiológicos demuestran que existe una relación entre los efectos causados por las deficiencias nutricionales durante el desarrollo temprano y con las diferentes enfermedades en la vida adulta, principalmente las relacionadas con el uso y tolerancia de la glucosa, la resistencia a la insulina (Flanagan et al., 2000; Velho et al., 2000; Arends et al., 2002), con la hipertensión y daño vascular (Hales et al., 1997; Ozanne y Hales, 1999) y otras más vinculadas con el Síndrome Metabólico.

De estas evidencias ha surgido la hipótesis de la “programación fetal de la enfermedad” la cual propone que la desnutrición fetal desencadena adaptaciones endocrinas o metabólicas que cambian permanentemente la morfología, fisiología y el metabolismo del feto. Las adaptaciones que permiten la supervivencia ante una dieta deficiente de nutrientes, resultan perjudiciales cuando el individuo adulto lleva una dieta rica en nutrientes, principalmente carbohidratos y grasas, predisponiéndolo a enfermedades cardiovasculares, metabólicas y endocrinas (fig. 2) (Phillips et al., 1994; Ozanne y Hales, 1999; Godfrey y Barker, 2000; Duran, 2004).

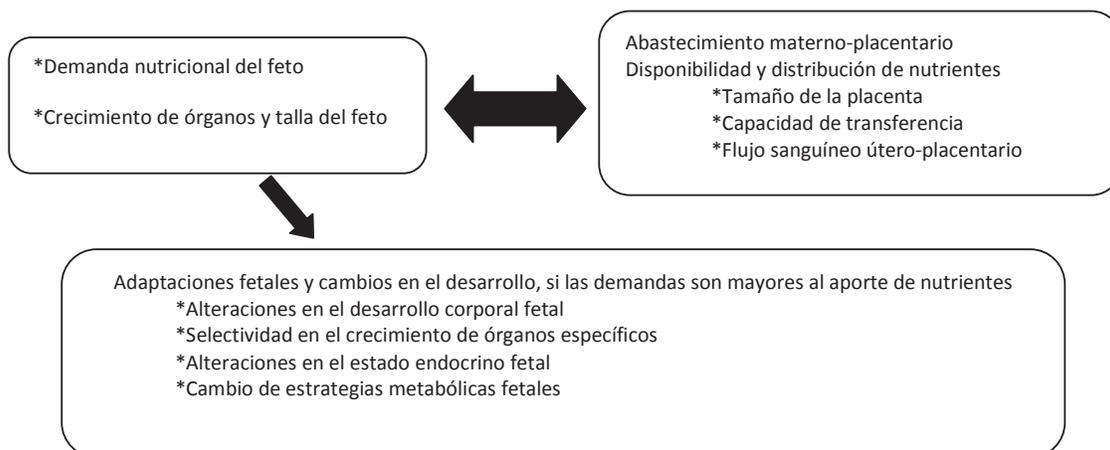


Fig. 2. Diagrama de la regulación materna durante el desarrollo fetal y la consecuente respuesta fetal de adaptación ante una nutrición deficiente (Parra-Gómez et al., 2003).

Otro factor en esta programación es una condición genéticamente determinada de algunos grupos humanos, donde la expresión de “genes ahorradores” favorece el almacenamiento de excedentes de energía expresado de grasa abdominal. Este genotipo de almacén de energía en un entorno abundante puede resultar nocivo, propiciando la presencia de diferentes enfermedades como la resistencia a la insulina o la diabetes tipo 2 (no dependiente de insulina). Esta condición constituye sólo un factor, ya que existen otros factores epigenéticos, como el bajo peso al nacer, la desnutrición temprana pre y/o postnatal, que a largo plazo favorecen el origen de disfunciones metabólicas y funcionales (Hales et al., 1997; Burdge et al., 2007).

Esta teoría más comúnmente conocida como la hipótesis de Barker (Barker y Osmond, 1986; Hales y Barker, 2001), establece que una alteración *in útero* sería capaz de producir una programación anormal de diversos sistemas relacionados entre sí, la cual se manifestaría en la etapa adulta bajo condiciones específicas de crecimiento (Moreno y Serra, 2001; Sallout y Walker, 2003). El bajo peso al nacimiento no sólo se asocia a un riesgo aumentado de padecer complicaciones en el periodo neonatal, y a un aumento en la mortalidad perinatal, sino que

además se asocia a mayor riesgo de enfermedades en la vida adulta. El papel que juega la nutrición materna durante el desarrollo fetal, es un punto clave para el desarrollo normal del feto, alteraciones (desnutrición materna) durante la gestación y/o la lactación conllevan a cambios metabólicos en la edad adulta de la cría (programación fetal) (Fig. 3) (Barker et al., 1993; Gosby et al., 2003).

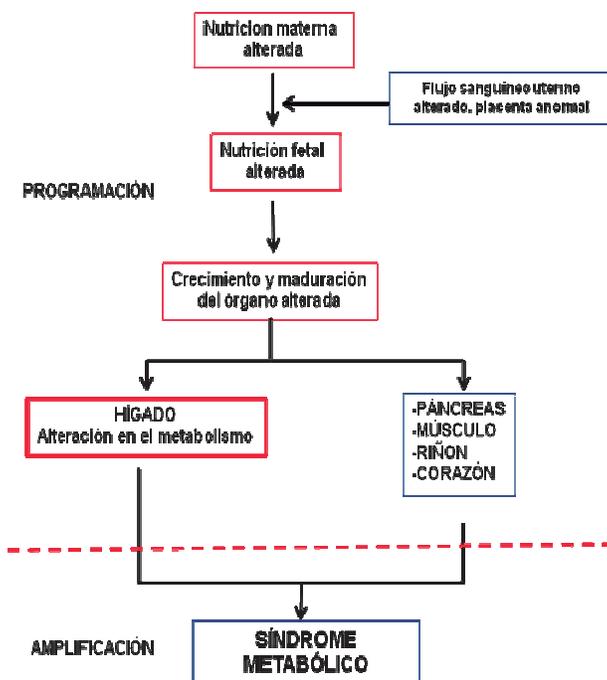


Fig. 3. Descripción de los efectos de una nutrición alterada sobre el crecimiento y maduración fetal de órganos y sistemas y su relación con enfermedades en la edad adulta (Modificado de De Boo y Harding, 2006).

Aunque los mecanismos por los cuales se logra esta programación son desconocidos, existen evidencias en modelos animales y estudios en humanos que sugieren que eventos adversos en la vida fetal pueden influir en el desarrollo neuroendocrino temprano. El resultado a largo plazo es la alteración de la capacidad de regulación de los diferentes ejes hormonales hipotálamo-adenohipofisarios (De Boo y Harding, 2006).

En el desarrollo de los mamíferos, las madres transmiten la información del entorno (como el estado nutricional) a su embrión o feto a través de la placenta, o a su hijo, a través de la lactancia. En general, el crecimiento fetal tiene que ver con el tamaño corporal de la madre, así como también con el potencial genético, lo cual se conoce como limitación materna. Esta limitación puede ser mediada, en parte, por los efectos limitantes del tamaño de la placenta en el útero o de la perfusión sobre la nutrición fetal, los genes presentes, en particular los relacionados con la expresión de factores de crecimiento pueden también intervenir en la distribución de los recursos nutricionales. Más allá de estos mecanismos, el desarrollo fetal puede alterar más la mala función placentaria o una enfermedad materna, cada una de las cuales puede influir en varios puntos sobre el aporte de nutrientes de la madre hacia los tejidos fetales. (Hales, 1997; Fall et al., 1998; Fowden et al., 2008).

Debido a una o a varias de estas causas, el feto resulta desnutrido *in útero*, lo que desencadena en él uno o varios de los siguientes mecanismos adaptativos (Fig. 4):

- El reflejo llamado “selectividad”, que mantiene el flujo sanguíneo cerebral a costa de la reducción del aporte a las vísceras abdominales (hígado, riñones, páncreas y los vasos sanguíneos que los alimentan); es una adaptación comprobada del feto cuyo crecimiento está retardado (Desai et al., 1996; Winick y Noble, 1966).
- La reducción de la tasa de crecimiento fetal, con el objetivo de ahorrar nutrientes; para esto, disminuye la secreción de insulina e IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) y aumenta la resistencia a la acción de estas sustancias, que son las principales hormonas del crecimiento fetal (Arends et al., 2002).
- Se libera cortisol, el cual inhibe el crecimiento (Bloomfield et al., 2003).

- Por último, se sabe que el feto adapta su composición corporal, probablemente como una forma de sacrificar tejidos innecesarios para preservar el crecimiento de tejidos más esenciales; en particular, la masa muscular queda comprometida (Gicquel y Le Bouc, 2006).

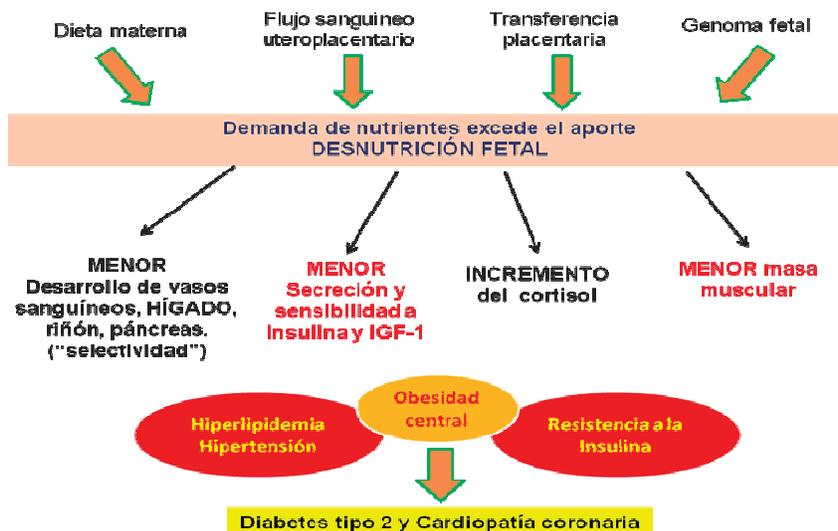


Fig. 4. Diagrama de los mecanismos adaptativos del feto debido a la desnutrición fetal. Hipótesis de Barker. (Tomada de Fall, 2005).

Este fenómeno se ha llamado “*programación*”, lo que significa que un episodio transitorio que ocurre en un período crucial del desarrollo temprano, como es la desnutrición fetal, conduce a una alteración permanente de la estructura o de la fisiología del feto. Esto puede ocurrir durante la vida fetal porque se trata de un período crítico del desarrollo; si la misma alteración se produjera más adelante en la vida, no tendría forzosamente el mismo efecto (Fall et al., 1998; Vuguin, 2007).

1.4.1 El estrés oxidativo y la programación fetal

El estrés oxidativo es una de las causas o trastornos, conocidas o probables, asociado con el crecimiento fetal adverso (disminución o exceso) o parto pretérmino; éste pudiera ser un factor común de la programación, relacionado con

la asociación de dichas condiciones (crecimiento fetal adverso, parto pretérmino) y el riesgo elevado de padecer enfermedades en la etapa adulta (Martínez, 2008).

Estudios recientes comprueban que la función de la insulina (Peterside et al., 2003; Selak et al., 2003) y la tensión arterial (Wang y Walsh, 1998; Bowen et al., 2001) son blancos sensibles de programación por estrés oxidativo. Diversos experimentos han mostrado la adaptación clave que realiza el feto para sobrevivir en un ambiente limitado de energía y que probablemente existe una reprogramación en la función mitocondrial. Estas alteraciones en la función mitocondrial pueden tener efectos deletéreos, especialmente en células que tienen un requerimiento alto de energía (Martínez, 2008).

El estrés oxidativo se modifica fácilmente durante el embarazo y en los períodos postnatales tempranos (que son ventanas críticas del desarrollo). Estudios sobre desnutrición realizados en modelos animales han demostrado que existe un incremento en el estrés oxidativo (incremento en la lipoperoxidación) y una disminución de las actividades antioxidantes en tejidos de ratas (Huang y Fwu, 1993).

El estrés pro-oxidativo es una característica en común de varios factores de riesgo o condiciones conocidas como la preeclampsia, diabetes, malnutrición y/o desnutrición las cuales relacionadas con el desarrollo fetal adverso (pobre o excesivo) (Block et al., 2002; Roberts y Lain, 2002; Peuchant et al., 2004).

Aparentemente, el estrés oxidativo puede tener un efecto asociado con la programación fetal, relacionado con el crecimiento fetal adverso y el riesgo elevado de padecer enfermedades propias del Síndrome Metabólico en la edad adulta. La programación influenciada por el estrés oxidativo pudiera ser debida, de manera directa, por la modulación de la expresión de ciertos genes o indirectamente a través de los efectos adversos de la oxidación de lípidos o de otras biomoléculas en etapas críticas del desarrollo, teniendo consecuencias en etapas futuras. Posiblemente, las etapas pre y postnatales tempranas son las

principales “ventanas” críticas del desarrollo influenciadas por el estrés oxidativo. (Luo et al., 2006).

Actualmente se estudia la prescripción de antioxidantes durante el embarazo para prevenir la preeclampsia y otras enfermedades relacionadas con el embarazo. Es importante continuar con un seguimiento a largo plazo de las madres tratadas y los infantes nacidos bajo este tratamiento para probar la hipótesis de la programación fetal por el estrés oxidativo (Martínez, 2008).

I.5 LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares presentes en todas las células eucariontes, encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular; actúan como centrales energéticas de la célula y sintetizan ATP por medio de la fosforilación oxidativa (Mitchell, 1993).

La morfología de la mitocondria es difícil de describir puesto que son estructuras muy plásticas que se deforman, se dividen y fusionan (Attardi y Schatz, 1988; Kelly y Scarpulla, 2004). Normalmente se las representa en forma alargada. Su tamaño oscila entre 0,5 y 1 μm de diámetro y hasta 7 μm de longitud. Su número depende de las necesidades energéticas de la célula.

Las mitocondrias están rodeadas de dos membranas (externa e interna) claramente diferentes en sus funciones y actividades enzimáticas, que separan tres espacios: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (fig. 5).

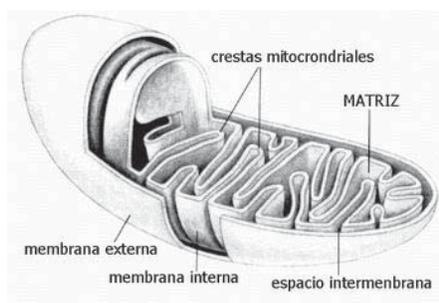


Fig. 5. Estructura fundamental de la mitocondria. Tomada de www.ecogenesis.com.ar/imprimir.php?sec=articu...

Membrana externa

Es una bicapa lipídica exterior permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos. Contiene proteínas que forman poros, llamadas porinas o VDAC (de *canal aniónico dependiente de voltaje*) que permiten el paso de grandes moléculas de hasta 10,000 daltones y un diámetro aproximado de 20 Å. La membrana externa realiza relativamente pocas funciones enzimáticas o de transporte. Contiene entre un 60 y un 70% de proteínas (Chen, 1988; Bereiter-Hahn y Voth, 1994, Monsalve, et al., 2007).

Membrana interna.

La membrana interna contiene más proteínas que la membrana externa, carece de poros y es altamente selectiva; contiene complejos enzimáticos y sistemas de transporte transmembranales, implicados en la translocación de moléculas. Esta membrana forma invaginaciones o pliegues llamadas crestas mitocondriales, que aumentan mucho la superficie para el asentamiento de dichas enzimas. En la mayoría de los eucariontes, las crestas forman tabiques aplanados perpendiculares al eje de la mitocondria, pero en algunos protistas tienen forma tubular o discoidal. En la composición de la membrana interna hay una gran abundancia de proteínas exclusivas de este orgánulo (un 80%) (Chen, 1988; Bereiter-Hahn y Voth, 1994, Monsalve, et al., 2007):

1. La cadena transportadora de electrones: Compuesta por cuatro complejos enzimáticos fijos y dos transportadores de electrones móviles: el complejo I o NADH deshidrogenasa que contiene flavina mononucleótido (FMN), el complejo II o succinato deshidrogenasa; ambos ceden electrones a la coenzima Q o ubiquinona; el complejo III o citocromo bc_1 que cede electrones al citocromo c y el complejo IV o citocromo c oxidasa que cede electrones al O_2 para producir dos moléculas de agua.
2. Un complejo enzimático, el canal de H^+ ATP-sintasa que cataliza la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa).

3. Proteínas transportadoras que permiten el paso de iones y moléculas, como ácidos grasos, ácido pirúvico, ADP, ATP y agua.

Espacio intermembranal.

Entre ambas membranas queda delimitado un espacio intermembranal, compuesto de un líquido similar al citosol; tienen una alta concentración de protones como resultado del bombeo de los mismos por los complejos enzimáticos I, III y IV de la cadena respiratoria. En él se localizan diversas enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP, como la adenilato cinasa o la creatina cinasa (Chen, 1988; Bereiter-Hahn y Voth, 1994, Monsalve, et al., 2007).

Matriz mitocondrial

La matriz mitocondrial contiene menos moléculas que el citosol, aunque contiene iones, metabolitos, ADN circular bicatenario muy parecido al de las bacterias, ribosomas tipo 70S similares a los de bacterias, llamados mitorribosomas, que realizan la síntesis de algunas proteínas mitocondriales, y contiene ARN mitocondrial; es decir, tienen los orgánulos que tendría una célula procariota de vida libre. En la matriz mitocondrial tienen lugar diversas rutas metabólicas claves para la vida, como el ciclo de Krebs y la β -oxidación de los ácidos grasos; también se oxidan los aminoácidos y se localizan algunas reacciones de la síntesis de la urea y los grupos hemo (Chen, 1988; Bereiter-Hahn y Voth, 1994, Monsalve, et al., 2007).

La mitocondria no solamente provee a la célula de energía, también esta involucrada en la producción y/o generación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) (Turrens, 2003).

La mitocondria es el sitio de mayor producción de las ERO en los órganos metabólicamente activos de los mamíferos. Se estima que aproximadamente entre el 2-4% del oxígeno tomado por las mitocondrias es convertido en ERO (fig. 6) (Tuma, 2001).

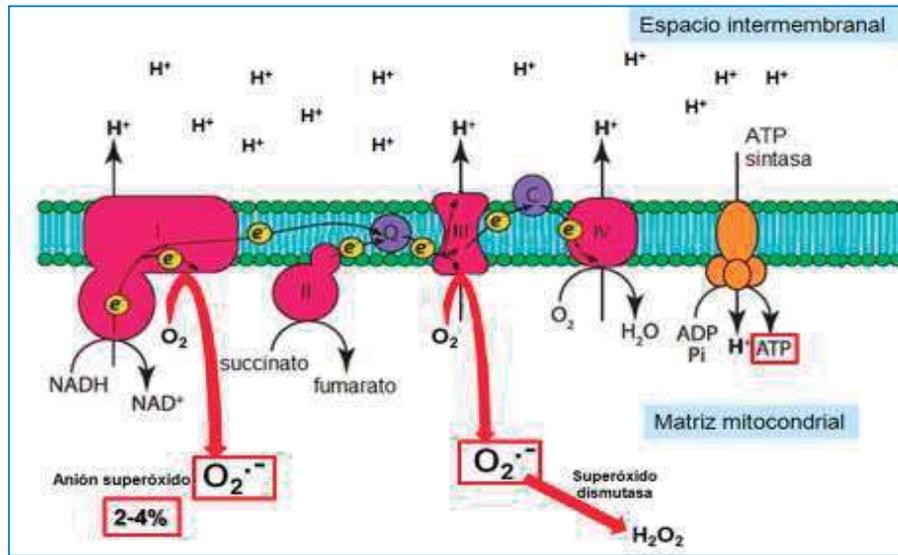


Fig. 6. Producción de ERO a nivel mitocondrial. (Adaptada de Monsalve et al., 2007).

La cadena respiratoria es la principal fuente generadora de las ERO en las mitocondrias a nivel de los complejos I y III (Hagopian et al., 2004). Durante el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) se lleva a cabo la reducción total del oxígeno molecular a agua, en el complejo IV, donde los electrones son donados por el equivalente reductor NADH o por el succinato a los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa), respectivamente.

Sin embargo, el funcionamiento de la CRM no es 100% eficiente ya que se puede llevar a cabo la reducción parcial del oxígeno, dando como resultado la formación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Del oxígeno total consumido por la mitocondria, del 2-4% es convertido en anión superóxido de manera basal, aunque este porcentaje varía de manera significativa en situaciones patológicas. (Duchen, 2004; Martínez et al., 2005).

Debido a los efectos adversos que puede tener el estrés oxidativo y/o nitrosativo al interior de la mitocondria, se propuso un modelo de daño a oxidativo en la mitocondria (Green et al., 2004) (Fig. 7).

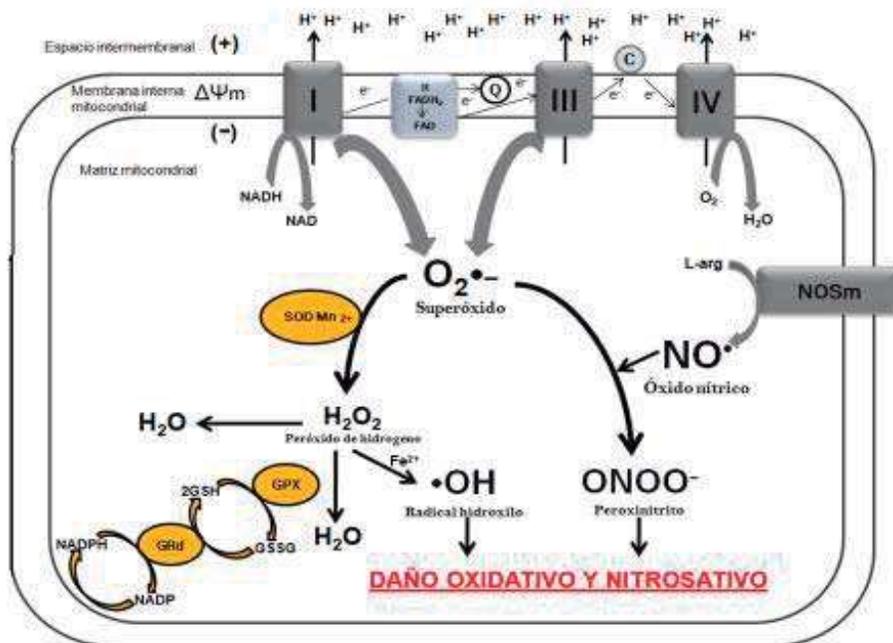


Fig. 7. Modelo propuesto del daño oxidativo a nivel mitocondrial. (Adaptada de Green et al., 2004).

El genoma mitocondrial es susceptible al ataque por radicales libres producidos en la propia mitocondria. Esto afecta de manera importante la producción de ATP, así como la respiración mitocondrial, la síntesis de proteínas y en general la función de toda la mitocondria. En los últimos años se ha investigado el daño que se produce en la mitocondria por los radicales libres, así como el funcionamiento y los procesos que se desarrollan en este orgánulo. Estos procesos se han propuesto como mecanismos patológicos y/o bioquímicos involucrados en las fases de inicio o progresión de varias enfermedades (Céspedes et al., 2000).

I.6 ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

En 1985 Sies propuso el término de estrés oxidativo, expresión que es utilizada para describir varios procesos dañinos que son resultado de un desbalance entre la excesiva producción de ERO y la limitada defensa antioxidante (Sies, 1985). El

término engloba también los efectos de otros oxidantes como las especies reactivas de nitrógeno (ERN), conocido por ello como estrés nitrosativo.

El estrés oxidativo y nitrosativo generado por las ERO y ERN, no solo impacta a la mitocondria, sino que también son capaces de difundir a través de la membrana externa mitocondrial y propagarse hacia el citosol, generando daño a estructuras extra-mitocondriales y sus efectos son observados en lípidos, proteínas y ADN de toda la célula. En la Fig. 8, se muestran las moléculas oxidantes cuyo aumento lleva a estrés oxidativo y nitrosativo (Boveris, 2005).

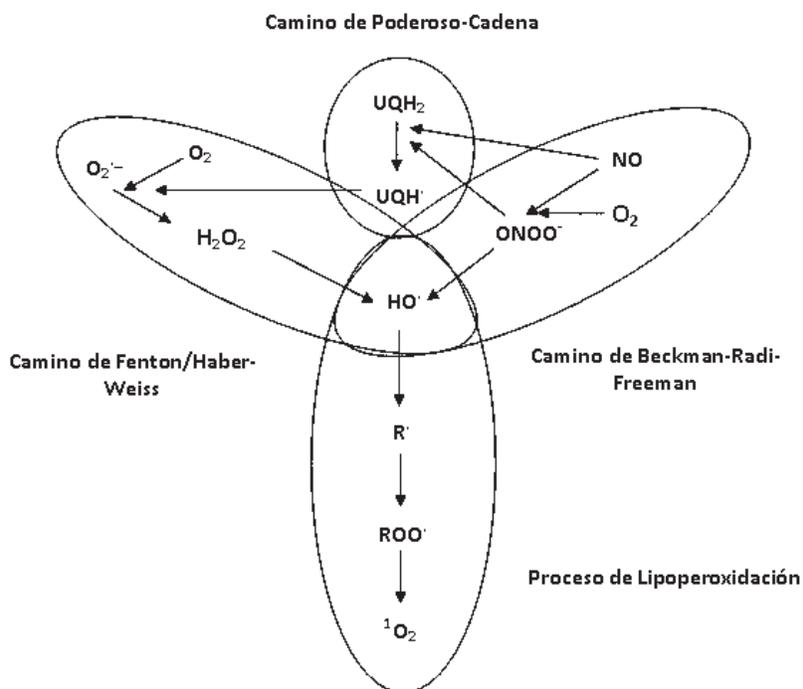


Fig. 8. Esquema de las reacciones entre los radicales libres en los sistemas biológicos. Obsérvese la confluencia de los caminos químicos iniciados con $O_2^{\cdot-}$ y con NO^{\cdot} en la formación del radical $^{\cdot}OH$ (Adaptado de Boveris, 2005).

La mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que la utilización del oxígeno por las células da lugar a la generación de radicales libres. Un radical libre es una molécula o átomo que posee un electrón desapareado en

su último nivel de energía (Barja, 2005). Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de especies de oxígeno reactivo, que incluyen los radicales libres.

1.6.1 Especies reactivas de oxígeno

Algunas de las especies reactivas de oxígeno (ERO) más relevantes son: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y los radicales peroxilo ($ROO\cdot$). Estas especies son derivados del O_2 que son más reactivos que éste. Son generados de manera natural durante procesos metabólicos en todos los seres consumidores de oxígeno. Los daños generados por las ERO incluyen modificaciones de las macromoléculas celulares, como proteínas, donde pudiera perderse la reactividad enzimática; lípidos, donde ocurre peroxidación modificando la estructura de la membrana; y daño al ADN, provocando mutaciones (Hansberg, 2002).

1.6.1.1 El anión superóxido

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se forma cuando el O_2 capta un electrón en la cadena respiratoria mitocondrial. Esto ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria sale de ésta y es captada por el O_2 . Esto ocurre principalmente a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y también del complejo I (NADH coenzima Q reductasa). La ubiquinona puede aceptar con facilidad uno o dos electrones y cederlos al O_2 . Alrededor del 2-4% del O_2 consumido en la respiración genera $O_2^{\cdot-}$. Además de la mitocondrial, las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear también pueden generar $O_2^{\cdot-}$. Los citocromos p450, una superfamilia de proteínas capaces de hidroxilar una gran variedad de xenobióticos, pueden generar $O_2^{\cdot-}$. Algunas oxidasas como la oxidasa del NADPH, la oxidasa de xantina y algunas peroxidasas inespecíficas producen $O_2^{\cdot-}$, este también se puede formar a partir de la autooxidación de compuestos como el gliceraldehído o de las flavinas y las tetrahydropterinas reducidas. Se ha

calculado que la concentración del $O_2^{\cdot-}$ en la célula está en el intervalo de pico (pM) a nanomolar (nM). La dismutación espontánea del $O_2^{\cdot-}$ ocurre sólo cuando uno de los $O_2^{\cdot-}$ se protona para formar el radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}), por lo que la velocidad de reacción es mayor mientras más ácido sea el medio (Hansberg, 2002; Turrens, 2003; Jones, 2008).

El H_2O_2 es poco reactivo y puede difundir a través de los compartimentos celulares aunque tiende a formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Reacciona poco con el ascorbato y no reacciona con compuestos como el NADPH, el ADN, los lípidos, o la mayoría de las proteínas, inclusive a concentraciones milimolares (mM). Algunas enzimas, como la deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato o la fosfatasa de la fructosa-1,6-difosfato, sí se inactivan con el H_2O_2 . El H_2O_2 reacciona lentamente con algunos cetoácidos, como el piruvato o el α -cetoglutarato (Hansberg, 2002).

El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 son compuestos que reaccionan fácilmente, ambos son tóxicos principalmente porque generan el radical hidroxilo ($\cdot OH$). El H_2O_2 es tóxico para la mayoría de las células a una concentración de 10 a 100 μM . Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^{+2} , entonces se fragmenta y forma el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el ión hidroxilo (HO^-) (reacción de Fenton). Este último es inocuo, se protona para formar agua; en cambio, el ($\cdot OH$) es uno de los compuestos más reactivos que existen. El ($\cdot OH$) casi no se puede difundir porque reacciona rápidamente ($10^9 M^{-1} s^{-1}$) y lo hace prácticamente con cualquier compuesto en el sitio en donde se produce (Turrens, 2003; Jones, 2008).

1.6.1.2 El Radical hidroxilo

El radical hidroxilo ($\cdot OH$), se forma a partir del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la reacción de Fenton en presencia de iones metálicos. Es el principal indicador del ataque por estrés oxidativo a todo tipo de macromoléculas. La alta reactividad de esta molécula impide su difusión a largas distancias a través de la

célula. De entre todas las biomoléculas presentes en los tejidos, los ácidos grasos poliinsaturados, son los más sensibles al ataque por estos radicales libres debido a que poseen dobles enlaces. La interacción del radical libre va dirigida al carbono adyacente, a un doble enlace, ocasionando un rompimiento homolítico al sustraer un hidrógeno que forma agua al unirse al radical, mientras que el ácido graso presenta un radical libre (electrón) en el carbono afectado por el hidroxilo. Una vez que a un fosfolípido se le quita un electrón, éste busca estabilizar su estructura química y toma el electrón de la molécula próxima, generándose así una reacción en cadena (fig. 9). Los productos de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, esteres y alcoholes. Este proceso repetitivo conduce a la membrana a perder sus propiedades fisicoquímicas y culmina con la muerte de la célula (Barja, 2005; Mercado y Ruiz, 2006).

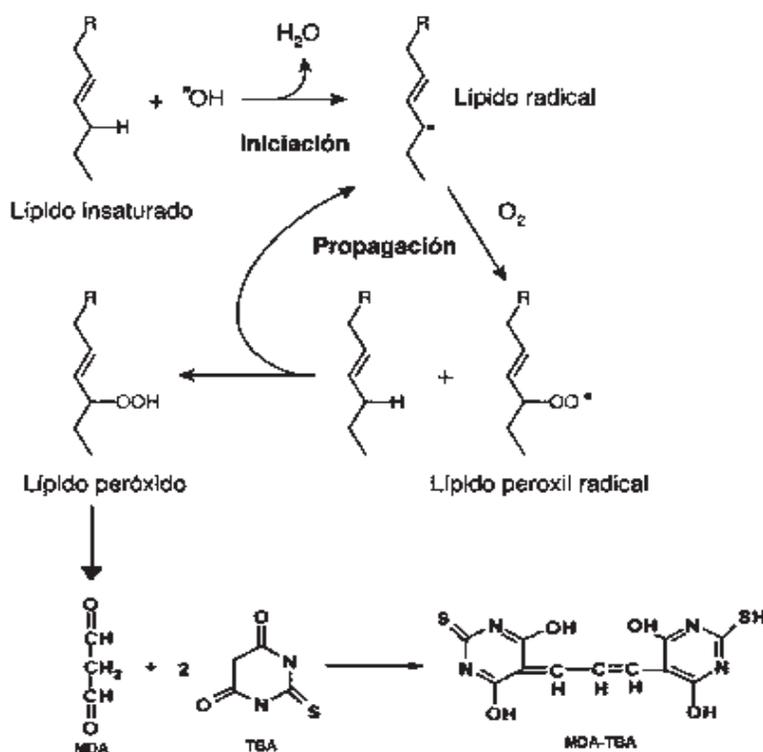


Fig. 9. Mecanismo de lipoperoxidación en ácidos grasos insaturados (Adaptada de Vargas et al., 2007).

A excepción de la iNOS, todas las enzimas óxido nítrico sintasas son constitutivas, es decir, se encuentran presentes en cantidades constantes en los tejidos y sus actividades dependen fundamentalmente de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} libre (Stuehr, 1997).

La concentración fisiológica del NO^\bullet es del orden nanomolar, aunque puede llegar a ser micromolar en el sitio en el que se produce. El NO^\bullet es un radical porque tiene un electrón desapareado (Saavedra-Molina et al., 2004; Guzmán et al., 2006).

Adicionalmente al efecto vasorrelajante, el óxido nítrico tiene otros efectos diversos, tanto fisiológicos como patológicos, los cuales dependerán de la reacción en que participe, de las moléculas con las que reacciona y del tipo celular en donde actúe. Por otro lado, el tipo de reacciones en las que el NO^\bullet participa, dependerá de sus concentraciones con respecto al tiempo en un ambiente químico específico, es decir, de sus velocidades de formación y de inactivación en un sitio determinado (Saavedra-Molina et al., 2004; Guzmán et al., 2006).

Es importante señalar que a diferencia de otras moléculas de señalización, la inactivación del NO^\bullet depende sólo de su reactividad química (estequiométrica no enzimática) con otras moléculas; estas reacciones son fundamentalmente de oxidación con el oxígeno, pero también con otras biomoléculas. Tomando en cuenta lo anterior, se clasifican los efectos biológicos del NO^\bullet en dos tipos: los efectos directos que son producidos por la reacción del NO^\bullet directamente con ciertas moléculas blanco, y los efectos indirectos, los cuales se producen por la interacción de compuestos reactivos derivados del NO^\bullet (comúnmente óxidos de nitrógeno) con otras moléculas (Guzmán et al., 2006).

Los efectos directos del NO^\bullet son producidos fundamentalmente por la reacción del NO^\bullet con el grupo hemo de diversas proteínas que lo poseen, formando el aducto nitrosil-hierro (Fe-NO). Este tipo de reacciones, conocidas como nitrosilaciones, son generalmente muy rápidas y son las responsables de la mayoría de los

efectos fisiológicos del NO[•], cuando éste es producido en pequeñas cantidades por las enzimas óxido nítrico sintasas constitutivas para generar concentraciones nanomolares de NO[•] por períodos cortos de tiempo. El ejemplo más conocido de este tipo de acción lo constituye la activación de la guanilil ciclasa soluble (una enzima formadora de GMP cíclico); sin embargo, existen otras proteínas capaces de ser modificadas mediante este tipo de reacción.

Los efectos indirectos del NO[•] se presentan cuando éste es producido en grandes cantidades (generalmente por la iNOS), alcanzando concentraciones locales del orden de hasta 10 μM por períodos prolongados. En estas condiciones, se propicia la formación considerable de otros productos reactivos, tales como las especies reactivas de óxidos de nitrógeno (ERN), los cuales participan en los procesos fisiopatológicos relacionados con la producción excesiva del NO[•] y/o de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Fig. 11) (Saavedra-Molina et al., 2004; Guzmán et al., 2006).

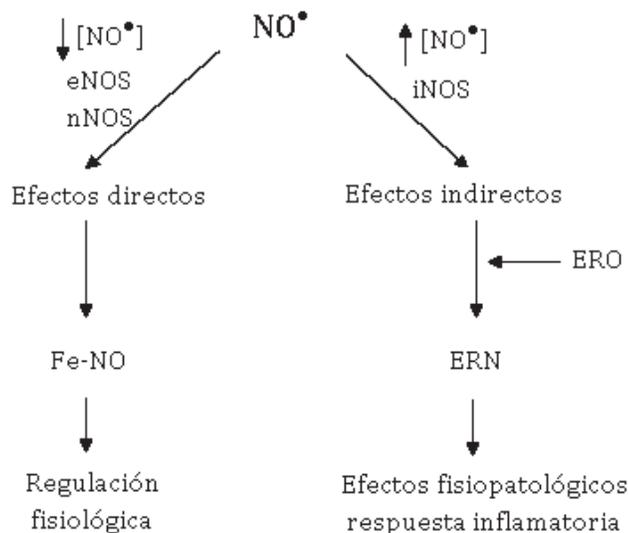


Fig. 11. Efectos biológicos del óxido nítrico. Los efectos directos se presentan a bajas concentraciones del óxido nítrico (\downarrow [NO[•]]) producidas por las óxido nítrico sintasas constitutivas (eNOS y nNOS); mientras que los efectos indirectos se manifiestan a concentraciones elevadas del óxido nítrico (\uparrow [NO[•]]) debidas a la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). En estas condiciones, las especies reactivas del oxígeno (ERO) reaccionan con el óxido nítrico para formar las especies reactivas de nitrógeno (ERN). (Modificada de Guzmán et al., 2006).

El NO^\bullet reacciona lentamente con los tioles formando tionitritos (nitrosotioles) o con los sulfhidrilos de algunas enzimas (deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato). En cambio, reacciona rápidamente con el O_2 , generando NO_2^\bullet y con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ generando peroxinitrito ($^-\text{ONOO}$). Ambos compuestos son más oxidantes que el propio NO^\bullet . También reacciona con radicales de aminoácidos, como el radical tirosina. Aún no está claro si éstas y otras especies de nitrógeno reactivo tienen algún papel *in vivo*, pero se piensa que, para que genere daño, el NO^\bullet se debe transformar primero en un compuesto más reactivo, como el NO_2^\bullet y/o el $^-\text{ONOO}$ (Hansberg, 2002).

El NO^\bullet se une a varios metales de transición como el hierro (Fe^{+2}) de las hemoproteínas, formando complejos que consisten del metal reducido y el NO^\bullet como ligando, o a los centros [Fe-S] de las enzimas mitocondriales. La inhibición de la oxidasa del citocromo c por el NO^\bullet puede tener un efecto metabólico importante. La mayor parte del NO^\bullet que se produce en los tejidos se une a la hemoglobina o a la mioglobina produciendo metahemoglobina o metamioglobina y nitrato (NO_3) (Fig. 12) (Hansberg, 2002).

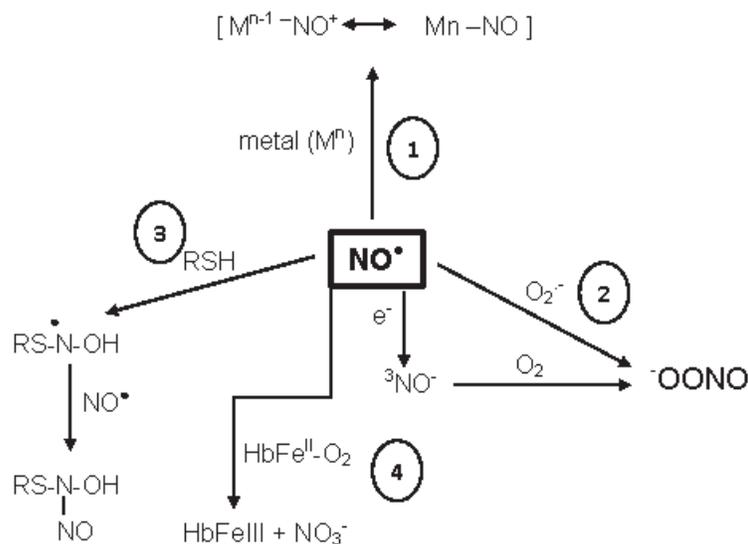


Fig. 12. Reacciones fisiológicas más relevantes del óxido nítrico (NO^\bullet). 1) Reacción con metales, formando complejos metal-NO, 2) Reacción con anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) genera el radical peroxinitrito (•OONO), 3) Reacción del NO^\bullet con el grupo tiol de las proteínas resultando en la formación de S-nitrosotiol 4) Unión al Fe II de la hemoglobina, produce metahemoglobina y el nitrato (NO_3^-). (Adaptada de Ignarro, 2000).

1.6.2.2 El anión peroxinitrito

Al comienzo de la década de los años noventa se observó que el producto de la reacción del NO^\bullet con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ rendía una serie de especies de alto poder oxidante, y se planteó una hipótesis sobre su potencial citotóxico a partir de sus reacciones con biomoléculas (Radi et al., 1991; 1991a). La reacción de combinación entre los radicales libres $\text{O}_2^{\cdot-}$ y NO^\bullet transcurre a muy altas velocidades, llevando a la formación del anión peroxinitrito (ONOO^-). El peroxinitrito se forma *in vitro* e *in vivo* cuando sus precursores coexisten temporal y espacialmente. Participa en una serie de procesos a nivel molecular y subcelular que pueden determinar disfunción y/o muerte celular, además contribuye a las bases moleculares de diferentes patologías (Radi, 2000).

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es producido continuamente como un subproducto de la respiración mitocondrial normal a través de la reducción del oxígeno molecular. Así, el $NO\cdot$ puede reaccionar fácilmente con el $O_2^{\cdot-}$ para formar el radical libre peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). El $ONOO^{\cdot}$ puede a su vez reaccionar con grupos $-SH$ de residuos de cisteína (S-nitrosilación) para formar 3-nitrotirosina y grupos $^{\cdot}OH$ de residuos de tirosina (nitración). Este hecho implica que el $NO\cdot$ también puede actuar a nivel mitocondrial a través de la formación de las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Estas moléculas pueden ser radicales (moléculas que contienen por lo menos un electrón desapareado, circunstancia que ocasiona que sean especies químicas extremadamente reactivas) o compuestos reactivos no-radicales, capaces de oxidar biomoléculas. Por ello, estos intermediarios son también llamados oxidantes o pro-oxidantes (Mercado y Ruiz, 2006).

La acción del $ONOO^{\cdot}$ es rápida e irreversible y no está confinada únicamente a blancos específicos de la cadena respiratoria, siendo capaz incluso de modificar enzimas del ciclo de Krebs como la aconitasa, entre otros blancos celulares. Se ha propuesto que este mecanismo de inhibición de la cadena respiratoria podría tener relevancia fisiopatológica en algunas enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Cleeter et al., 2001).

I.7 DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Los seres vivos han desarrollado sistemas de defensa frente a la agresión de los radicales libres. De hecho, el daño oxidativo y/o nitrosativo solamente se produce cuando los mecanismos oxidantes superan la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante (Sies, 1986).

Los sistemas de defensa frente a los radicales libres los podemos clasificar según su mecanismo de acción, o según su naturaleza.

A) SEGÚN EL MECANISMO DE ACCIÓN:

A su vez los podemos clasificar en primarios o secundarios.

PRIMARIOS o preventivos, evitan la formación del radical libre, es decir, actúan en la fase de iniciación. En este grupo debemos destacar aquellos que se encargan de detoxificar el hidroperóxido mediante la reducción del mismo a un alcohol, como la glutatión peroxidasa o la catalasa. El hidroperóxido, en presencia de fotoactivadores o de metales pesados, da lugar al inicio de la reacción en cadena. Por tanto, aquellos mecanismos que se encarguen de la detoxificación del hidroperóxido evitarán la iniciación de la cadena y por lo tanto, actuarán como un mecanismo preventivo (Monsalve et al., 2007).

SECUNDARIOS, evitan la propagación de la cadena de radicales. La mayoría de estos compuestos son di-aril-aminas y fenoles capaces de aceptar el electrón desapareado del radical libre y de estabilizarlo en su estructura, evitando así la propagación de la cadena de radicales (Monsalve et al., 2007).

B) SEGÚN LA NATURALEZA:

Por los mecanismos de defensa frente a los radicales libres los podemos dividir en:

Enzimáticos: la defensa enzimática a nivel intracelular frente a los radicales libres derivados del oxígeno está formada por la superóxido dismutasa y las peroxidases (glutatión peroxidasa y catalasa). La superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa y reductasa están localizadas tanto en el citosol como en la matriz mitocondrial (Chance y col., 1979). La catalasa se localiza predominantemente en los peroxisomas, donde el peróxido de hidrógeno se genera a una velocidad relativamente alta (Phung et al., 1994). Otras sustancias de naturaleza enzimática que tienen actividad antioxidante son la glutatión reductasa, glutatión S-transferasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Monsalve et al., 2007).

No enzimáticos: Que a su vez se pueden clasificar en:

- Liposolubles: dentro de este grupo se encuentran la vitamina E, los carotenoides, las quinonas y la bilirrubina entre otros.
- Hidrosolubles: dentro de este grupo se encuentran aquellos antioxidantes solubles en agua como la vitamina C, el ácido úrico, las proteínas secuestradoras de metales pesados como la ceruloplasmina o la transferrina, el glutatión y otros tioles no proteicos.

Dentro de la mitocondria las principales defensas antioxidantes que juegan un papel importante es el ciclo de óxido-reducción del glutatión y el sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa, así como también los niveles de glutatión reducido (Monsalve et al., 2007).

1.7.1 La glutatión reductasa

La glutatión reductasa (GRd, EC 1.6.4.2.) es una flavoenzima dependiente del nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de lipoperóxidos (L-OOH), los cuales son elementos tóxicos. Es decir, específicamente tiene una función de balance en el estrés oxidativo. Esta se encuentra en todos los organismos aeróbicos así como en algunas plantas superiores por lo que aparenta ser una enzima universal (Fig. 13) (Cisneros, 2000; Monsalve et al., 2007).

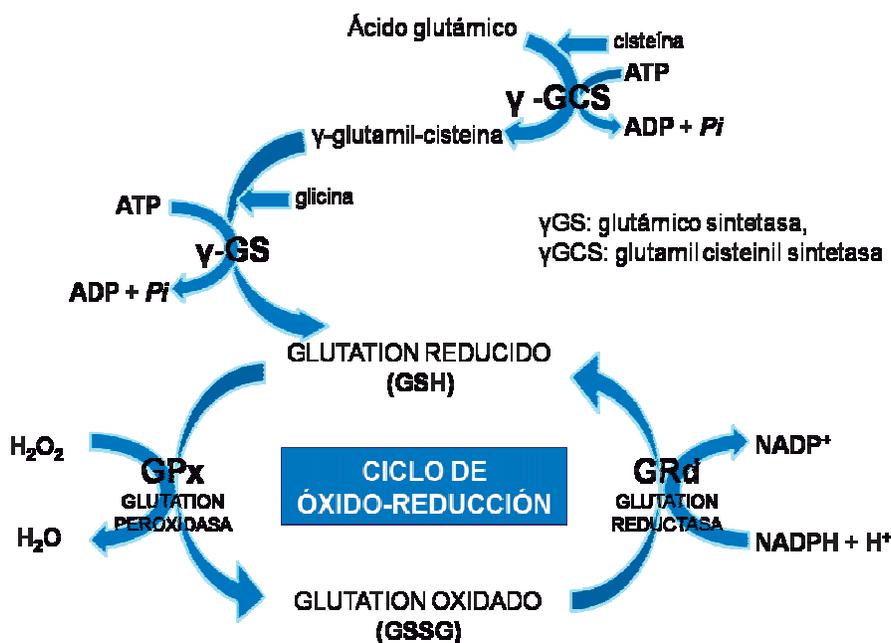


Fig. 13. Ciclo de óxido-reducción del glutatión. Sistema antioxidante de la Glutatión peroxidasa/ glutatión reductasa (Adaptada de Sarrasague et al., 2006).

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA ENZIMA GLUTATIÓN REDUCTASA.

La GRd es una enzima homodimérica compuesta por 2 subunidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro (cis 90-cis 90°); cada subunidad contiene 478 aminoácidos con un peso molecular de 51, 569 Daltones, y en su estructura presenta una extensión N-terminal flexible (residuos del 1-18) y 4 dominios estructurales bien definidos: 1) Dominio unido al flavín adenín dinucleótido (FAD) (residuos del 19-157), 2) Dominio de unión al NADPH (residuos del 158-293), 3) Dominio central (residuos del 294-364) y 4) Dominio de interfase (residuos del 365-478) (Knapen et al., 1999).

El sistema antioxidante GPx/GRd (glutatión peroxidasa/reductasa) está relacionado con otros sistemas antioxidantes como el de la superóxido

dismutasa/catalasa (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par, la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y a bajas concentraciones actúa la GPx. La actividad de la CAT y de la GPx están inversamente correlacionadas, mientras que la CAT y la GRd presentan correlación positiva (Nagaoka et al., 2004).

LA GLUTATION REDUCTASA EN LA SALUD Y LA ENFERMEDAD

La GRd permite mantener concentraciones de GSH en la célula no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H_2O_2 ; este GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol) luego de participar en la eliminación de radicales libres generados *in situ* o a distancia. Por tanto, la alteración de la actividad de la GRd provocará disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno. La alteración de la actividad de la GRd y de los niveles de GSH por esta consecuencia se ha reportado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo (Cisneros, 2000).

En nuestro organismo existen diferentes mecanismos para evitar la extensión del daño causada por los radicales libres, éstos incluyen a péptidos con grupos tiol, como el glutatión (GSH). La concentración intracelular de GSH se controla por la acción de la glutatión sintetasa, la peroxidasa y la reductasa. La última enzima es la que recicla el glutatión oxidado (GSSG) a su especie activa GSH. La actividad de la glutatión reductasa, una enzima dependiente del cofactor FAD (flavín adenín dinucleótido), es utilizada también como un marcador de desnutrición o hipovitaminosis B2, por la relación existente entre la riboflavina y el FAD (Knapen et al., 1999).

1.7.2 El glutatión (GSH)

Desde el punto de vista químico el glutatión (GSH) es el compuesto de bajo peso molecular con grupo sulfhidrilo (-SH) más importante en plantas y animales. Se

trata de un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys) (fig. 14) (Fernández-Checa y Kaplowitz, 2005).

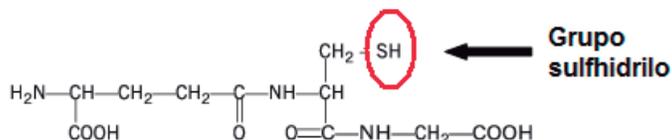


Fig. 14. El glutatión reducido se conoce químicamente como N-(N-L-gamma- glutamil-L-cisteinil) glicina, su fórmula molecular es $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ y su peso molecular 307.33 g/mol. El glutatión oxidado es el L-gamma-glutamyl-L-cisteinil-glicina disulfuro (GSSG), y su fórmula molecular es $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$. (Tomada de Fernández-Checa y Kaplowitz, 2005).

El GSH interviene en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula, el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la síntesis de los desoxirribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular. Con relación al metabolismo básico del GSH (Griffith, 1999), la síntesis ocurre en dos etapas y depende de la disponibilidad de sustratos y de los mecanismos regulatorios. El paso de regulación en la síntesis ocurre a nivel de la enzima gamma-glutamyl cisteinil sintetasa (γ GCS), donde el GSH ejerce el *feed back* negativo (fig. 15).

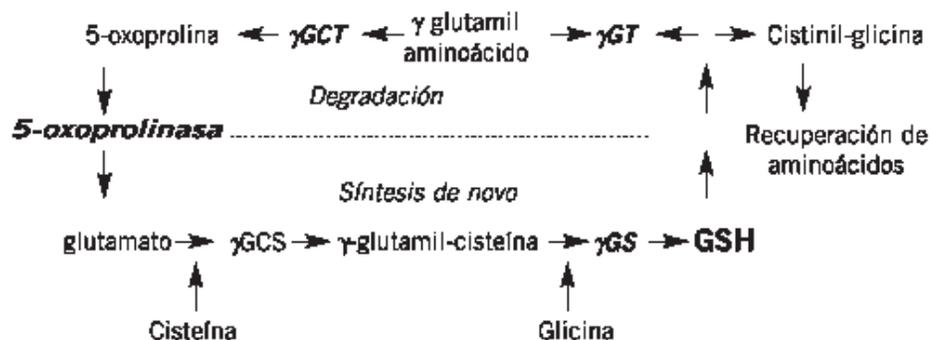


Fig. 15. El ciclo del GSH está compuesto por 5 reacciones enzimáticas interrelacionadas; las enzimas que intervienen son: γ GCT: glutamil carboxil transferasa; γ GT: glutamil transpeptidasa; γ GS: glutámico sintetasa y γ GCS: glutamil cisteinil sintetasa. (Tomada de Sarrasague et al., 2006).

El GSH está sujeto a un constante recambio en el organismo los principales órganos responsables de su homeostasis son, el hígado, riñones, pulmones, corazón, intestinos y músculos. La captación de cada órgano o tejido depende de la actividad de la enzima gamma glutamil transpeptidasa (γ GT o GGT) localizada en la membrana celular (Deneke y Fanburg, 1989; Sarrasague et al., 2006).

En el hígado, riñón y músculo el GSH se encuentra en mayor concentración (tabla I).

Dentro de las células el GSH se encuentra principalmente en las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el núcleo es aquí donde se observa un aumento de su concentración durante la apoptosis o muerte celular programada (Meister, 1995; Cho et al., 1999; Sarrasague et al., 2006).

Tabla I. Concentración de GSH en el organismo.

ÓRGANO	CONCENTRACIÓN	FUNCIÓN
Hígado	5-7mM	Principal órgano relacionado con la síntesis del GSH
Riñón	3mM	Donde más GSH plasmático se consume
Músculo	1-2mM	Su concentración varía según el tipo de fibra muscular

GSH Y EL ESTADO REDOX

El estado redox en la célula indica el balance entre las especies oxidadas y las reducidas; está influido por factores fisiológicos, ambientales y nutricionales. De este balance dependen la activación de enzimas, la síntesis de ADN, los mecanismos de regulación de la apoptosis o muerte celular programada, el plegamiento de proteínas y la activación de factores de transcripción, entre otros. El GSH y el estado redox de algunos tioles (compuestos con grupo -SH) regulan la expresión de genes involucrados en la patogénesis de diferentes enfermedades (cáncer, aterosclerosis, SIDA, diabetes, etc.) (Jones et al., 2000; Sarrasague et

al., 2006). Sus propiedades biológicas se deben a dos características estructurales:

1.- La presencia de un enlace γ -glutamilo, lo cual le confiere resistencia frente a las peptidasas presentes en las células.

2.- La presencia del grupo tiol de la cisteína, el cual se puede oxidar con otra molécula de GSH, dando lugar al glutatión disulfuro u oxidado (GSSG), o con los residuos de cisteína de las proteínas.

Por lo que se refiere al metabolismo del glutatión, debemos destacar que en su síntesis intervienen dos enzimas, que cataliza la siguiente reacción (Fig. 16):

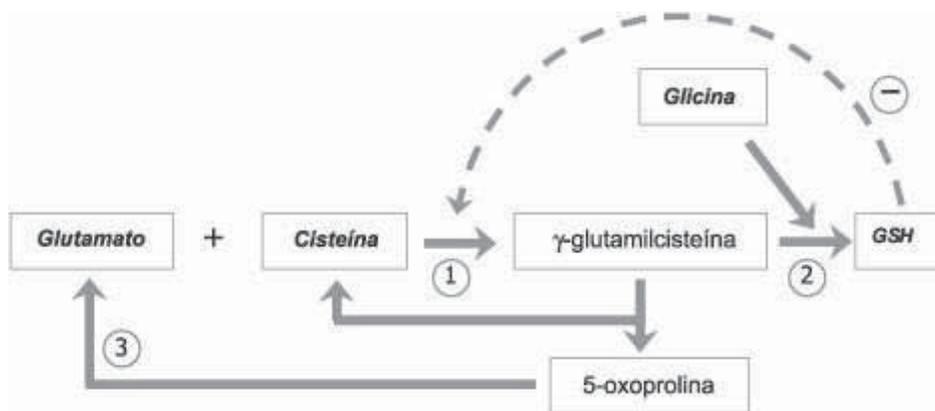


Fig. 16. Esquema de la síntesis del glutatión. El GSH es sintetizado en 2 etapas a partir de glutamato, cisteína y glicina; en un primer paso (1) interviene la enzima γ -glutamilcistein sintetasa (Cho et al., 1999), posteriormente (2) la GSH sintetasa. El GSH ejerce retroalimentación negativa en la reacción 1. La γ -glutamilcisteína que no es convertida en GSH sigue una ruta alternativa, produciendo cisteína y 5-oxoprolina; esta última es convertida en glutamato vía la (3) enzima 5-oxoprolinasa (Deneke y Fanburg, 1989) (Tomada de Sarrasague et al., 2006).

Debemos tener en cuenta que el GSH inhibe la γ -glutamilcistein sintetasa. Es un mecanismo que regula la concentración de glutatión en los tejidos. El segundo paso en la síntesis de glutatión está catalizado por la glutatión sintetasa. En condiciones fisiológicas, el paso limitante para la síntesis de glutatión es la disponibilidad de cisteína.

El glutatión presenta varias funciones fisiológicas entre las que destacan (Viña et al., 1986; Fernández-Checa y Kaplowitz, 2005; Lash, 2006; Sarrasague et al., 2006):

- 1.- Interviene en la síntesis de DNA.
2. - Participa en la detoxificación de xenobióticos.
3. - Actúa como protector frente a las radiaciones y al estrés oxidativo.
4. - Participa en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular.
5. - Interviene en la captación de aminoácidos en algunos tejidos.
6. - Actúa como reservorio de cisteína.
7. - Interviene en la regulación de la síntesis y de la degradación de proteínas.
8. - Participa en la modulación de las actividades enzimáticas.
9. - Interviene en la homeostasis del calcio.
10. - Participa en la regulación de la proliferación celular.

1.7.3 EL GSH Y LA MALNUTRICIÓN

El estudio en niños con malnutrición permitió determinar que tienen disminuido tanto el GSH como la velocidad de síntesis del mismo; presentan, además, una baja concentración de cisteína extra e intracelular y niveles elevados de marcadores de peroxidación lipídica inducida. El edema es una de las manifestaciones que se producen como consecuencia del severo daño a la membrana celular por acción de los radicales libres (Reid et al., 2000). En los niños malnutridos también hay un menor aporte de cisteína a partir del metabolismo proteico; en el *kwashiorkor*, la velocidad de ruptura de las proteínas está disminuida por un déficit enzimático; pero no ocurre lo mismo en el marasmo. Las características del síndrome de *kwashiorkor* se asocian con el daño oxidativo

debido al desbalance entre la generación de radicales libres y la capacidad antioxidante; se produce el daño oxidativo con las consecuentes pérdidas de las funciones hepáticas e inmunes (Reid et al., 2000). En ensayos experimentales se observó que una dieta restringida en aminoácidos sulfurados disminuía la velocidad de síntesis del GSH y disminuía su recambio desde los tejidos. Una modificación en la disponibilidad en la dieta de cisteína y de su precursor metionina puede modular la velocidad de síntesis de GSH y sus niveles en sangre, disminuyéndolos en el caso de una dieta sin aminoácidos azufrados (Lyons et al., 2000). Una situación así podría presentarse en los casos de la alimentación parenteral de pacientes que pasaron por una situación de *stress*. Puede suceder, por ejemplo, que después de una cirugía abdominal disminuya la capacidad de síntesis del GSH en los tejidos, pero que se mantenga la concentración de GSH en sangre; la deficiente dieta de este, estaría afectando entonces el recambio del GSH entre tejidos y sangre (Lyons et al., 2000). Los aminoácidos glicina o cisteína son igualmente adecuados para evaluar *in vivo* la velocidad de síntesis del GSH. En pacientes pediátricos internados con sepsis y con alimentación parenteral, se determinó mediante el empleo de ¹³C-cisteína, que la velocidad de síntesis de GSH era muy inferior a la de los controles. Se observó que la suplementación con N-acetil cisteína llevó a un aumento significativo, en sólo 9 días de tratamiento, en la concentración de GSH, de cisteína y de la velocidad de síntesis del tripéptido. También se comprobó un efecto antiinflamatorio como consecuencia de la disminución de la concentración de interleucinas en plasma (Badaloon et al., 2000; Lyons et al., 2001).

Se pudo comprobar entonces que la terapia de suplementación con cisteína para restablecer el GSH durante las primeras etapas del tratamiento de la desnutrición disminuía la morbilidad y mortalidad infantil (Reid et al., 2000).

II. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento fetal reducido está asociado con la hipertensión arterial, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y diabetes, cardiopatía coronaria, accidente vascular encefálico y otras cardiopatías vasculares en la edad adulta. La hipótesis de la programación fetal plantea que estas enfermedades se originan debido a alteraciones en el desarrollo, en respuesta a la malnutrición durante la vida fetal y la infancia generando adaptaciones por parte del feto para su supervivencia (Sallout y Walter, 2003).

La hipótesis del origen fetal de las enfermedades propone que estas adaptaciones, que ocurren en respuesta a la desnutrición *in utero*, se tornan permanentes. Esto se debe a que las adaptaciones ocurren en una etapa crítica del desarrollo, en la que el feto es adaptable y es capaz de cambiar, pero persisten después del nacimiento hasta una etapa en que el individuo ya no es tan adaptable, por lo que se crean anomalías metabólicas que luego conducen a la diabetes tipo 2 y a la cardiopatía coronaria. Puede que estas anomalías no produzcan enfermedad de inmediato, pero al menos reducirán el umbral de ese individuo para desarrollar la enfermedad en la vida adulta, en presencia de obesidad u otros factores adversos del estilo de vida. Estudios recientes han mostrado la probable influencia que puede tener el estrés oxidativo y nitrosativo (Luo et al., 2006) en la posible programación de enfermedades propias del Síndrome Metabólico debido a la desnutrición materno-fetal (Langley-Evans, 2001; Vehaskari y Woods, 2005; Alexander, 2006).

Debido a la alta incidencia a nivel mundial de estas enfermedades propias del Síndrome Metabólico y a la posible influencia del estrés oxidativo y nitrosativo en la posible programación fetal de la enfermedad durante la desnutrición y además de que se conoce poco acerca de las alteraciones a nivel mitocondrial de la restricción proteico-calórica prenatal y postnatal en el estrés oxidativo y nitrosativo se propone la siguiente hipótesis:

III. HIPÓTESIS

La restricción proteico-calórica prenatal y postnatal promueve el estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias de hígado de rata.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la restricción proteico-calórica prenatal y postnatal sobre la generación de estrés oxidativo y nitrosativo en las mitocondrias de hígado de rata.

IV.2 Objetivos Específicos

- ❖ Analizar el estrés nitrosativo en las mitocondrias de hígado de rata durante la restricción proteico-calórica prenatal y postnatal.
- ❖ Examinar el estrés oxidativo en las mitocondrias de hígado de rata durante la restricción proteico-calórica prenatal y postnatal.
- ❖ Evaluar la participación de las defensas antioxidantes en las mitocondrias de hígado de rata durante la restricción proteico-calórica prenatal y postnatal.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Material Biológico

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Regulación Federal de Usos y Cuidados de los Animales (NOM-062-ZOO-1999, Ministerio de Agricultura, México) y fueron aprobados por el Comité Institucional de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para el uso de estos animales y sus tratamientos.

Los animales se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada 22°C, ciclos de luz-obscuridad de 12h/12h. Se emplearon ratas hembra Wistar de 200-250 g de peso con acceso *ad libitum* al alimento y agua. Las ratas hembras Wistar fueron colocadas en jaulas individuales y separadas en dos grupos: un grupo control (dieta *ad libitum*) y un grupo en restricción calórica (RC) al 50% (50% de la alimentación del grupo control).

V.2 Esquema de la restricción proteico-calórica (RPC)

Durante los 15 días previos a la cruce, los animales del grupo en RPC mantuvieron una dieta del 50% y el grupo control una alimentación *ad libitum*, pasado este tiempo las hembras de ambos grupos se sometieron a cruce por un tiempo de 5-6 días, durante el cual se revisaba a la hembra por las mañanas para confirmar la presencia del tapón vaginal y la probabilidad de preñez. Las dietas fueron llevadas en ambos grupos durante la gestación, lactación y vida adulta de las crías.

Durante la gestación se monitoreo el peso y consumo de alimento de las madres, posterior al nacimiento las crías se pesaron y midieron durante la etapa de lactación, al día 1, 7, 14 y 21; en fechas posteriores se sexaron las crías en hembras y machos y se mantuvieron en jaulas separadas, los grupos se mantuvieron bajo estas dietas (Control y RPC al 50%), se continuó con la

medición de los parámetros antes mencionados a las 3, 7, 15, 23 y 31 semanas de edad.

Tanto hembras y machos de ambos grupos (Control y RPC al 50%) fueron sacrificados por decapitación, en los siguientes periodos: lactación 1 y 21 días de edad, y periodo postnatal 7, 15, 23 y 31 semanas de edad. Posteriormente se extrajo el hígado completo, se pesó y colocó en un medio específico (medio I) para su adecuado mantenimiento, aislamiento y su uso para posteriores determinaciones.

V.3 Aislamiento mitocondrial

AISLAMIENTO DE LAS MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA.

Se realizó por centrifugación diferencial y purificación por medio de un gradiente de Percoll de acuerdo al método modificado por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Las mitocondrias fueron aisladas de tejido fresco, usando ratas Wistar hembras y machos de los grupos Control y RC a las diferentes fechas de determinación 1 y 7 días de edad, 7, 15, 23 y 31 semanas de edad.

PROCEDIMIENTO

Se sacrificó el animal por decapitación, se obtuvo el órgano de interés por medio de una incisión en el abdomen; el hígado se pesó y se colocó inmediatamente en 25 ml del medio I (tabla II) a pH de 7.4 para mantener viable el tejido durante el procedimiento de extracción. El hígado se cortó en trozos pequeños para su homogenización, se lavó 3 veces con el medio I para eliminar restos de sangre. Posteriormente el órgano fue homogenizado (en un tubo de vidrio Wheaton de 30 ml adicionando el medio I hasta alcanzar $\frac{3}{4}$ partes del volumen del tubo), con un vástago de teflón a 1500 rpm, el procedimiento se realizó a 4°C. El homogenado se colocó en un tubo para centrifugar a 2500 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) durante 10min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se colocó en otro tubo limpio y frío, se llevó a $\frac{3}{4}$ partes del volumen del tubo con el medio I. Se vuelve a

centrifugar a 7500 rpm durante 10min a 4°C. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 2ml de medio II (tabla III). Se agregó albúmina sérica bovina al 0.2% y se incubó por 10 min a 4°C. Se preparó el gradiente de Percoll al 20% (4ml de medio II y 1ml de Percoll), se agregaron las mitocondrias y se centrifugó a 19300 rpm por 12 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 7ml de medio II y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min a 4°C. Se desecha el sobrenadante y las mitocondrias se resuspendieron en 1ml de medio II y se mantuvieron a 4°C.

Tabla II. Composición del MEDIO I.

COMPUESTO	P.M.	[]mM	g/l
Manitol	182.2	220	40.084
Sacarosa	342.3	70	23.961
MOPS	209.3	2	0.4186
EGTA	380.4	1	0.3804

Tabla III. Composición del MEDIO II.

COMPUESTO	P.M.	[]mM	g/l
Manitol	182.2	220	40.084
Sacarosa	342.3	70	23.961
MOPS	209.3	2	0.4186

Disolver los compuestos en agua desionizada, y ajustar pH a 7.4 con NaOH 5N, mezclar y aforar a 1 l.

V.4 Determinación de la concentración de proteína mitocondrial

La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Biuret (Gornall et al., 1949). Se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el

volumen a una concentración de 1mg/ml, empleada para experimentos posteriores.

Preparación del reactivo de Biuret:

Reactivos y soluciones:

Tartrato de sodio y potasio.....6 g

Sulfato de cobre pentahidratado.....1.5 g

Hidróxido de sodio al 10%: disolver 30g en 300 ml de agua desionizada.

Se disolvió el tartrato de sodio y potasio en 500 ml de agua desionizada agitando, posteriormente se adicionó el sulfato de cobre y cuando ambas sales están disueltas se agregó el hidróxido de sodio al 10 %. Se completó el volumen a 1000 ml y se colocó en frasco color ámbar (desechar si forma precipitado).

DOC 1 % (Desoxicolato de sodio): se pesó 1 g y disolvió en 100 ml de agua desionizada.

Albúmina de suero bovina (estándar de proteína): 10 mg para cada ml.

Para la determinación de la concentración de proteína se preparó la siguiente batería de reacción:

Estándar de proteína (µl)	Reactivo de Biuret (ml)	Agua desionizada (µl)	DOC 1% (µl)	Mitocondrias (µl)
-----	2.0	800	200	---- (Blanco)
100	2.0	700	200	-----
200	2.0	600	200	-----
-----	2.0	780	200	20 (Muestras)

Mezclar la suspensión e incubar de 15 – 25 minutos a temperatura ambiente. Leer a 540 nm usando el blanco para ajustar el aparato.

Cálculos:

Lectura estándar -----2 mg

Lectura del problema -----X mg
 X mg -----Volumen en μl usados
 = mg/ml
 X₁mg ----- 1000 μl (1 ml)

V.5 Determinación de los niveles de óxido nítrico mitocondrial.

El óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) se determinó por el método de Griess modificado y reportado por Green et al., 1982. Este método cuantifica de manera indirecta las concentraciones de $\text{NO}\bullet$ mitocondrial por la reacción de diazotización originalmente descrita por Griess en 1879. El reactivo de Griess se basa en la reacción química de la sulfanilamida y el dihidrocloruro de N-1-naftiletilendiamina (NED) bajo condiciones ácidas para formar un compuesto azo colorido que se une a los nitritos formados por la oxidación espontánea del NO bajo condiciones fisiológicas presentes en la muestra (Fig. 17). La detección límite para éste método está entre 0.1 y 1 μM de nitritos. Se cuantifica el nitrito ya que es uno de los principales, productos estables y no volátiles del óxido nítrico.

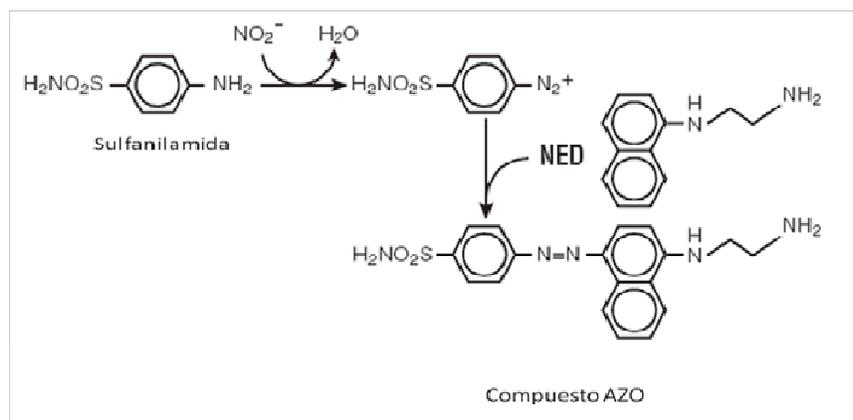


Fig. 17. Reacciones de determinación indirecta del óxido nítrico, mediante la cuantificación de nitritos por el método de Griess. (Green, 1982).

Tabla IV. Medio base para la determinación de óxido nítrico.

Compuesto	PM (g)	Concentración (mM)	g/100 ml
MOPS	209.3	75	1.5697
KH ₂ PO ₄	136.09	5	0.0680
KCl	74.55	15	0.1118
MgCl ₂	203.3	3	0.061
Manitol	182.2	220	4.0084
EGTA	342.3	1	0.038

Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 5N y aforar a 100 ml.

Reactivo de Griess para la determinación de óxido nítrico.

- Solución NED [N-(Nafthyl) Ethylenediamine Dihydrochloride] al 0.1 % en agua desionizada.
- Solución de sulfanilamida al 1% en 100 ml de H₃PO₄ al 5%.

Tomar igual cantidad de cada solución y mezclarla. Una vez hecha la mezcla dura 8 hrs.

PROCEDIMIENTO

Se agregó 1 mg, a los tubos de ensaye, de proteína mitocondrial y medio de incubación (medio base) (tabla IV) a un volumen final de 2 ml. Se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 20 µl de HClO₄ al 0.4 % y se dejaron permeabilizar por 10 minutos. Después se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos para romper membranas. Se tomaron 1400µl de sobrenadante y se agregaron 200 µl de reactivo de Griess, a continuación se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Al cabo de este tiempo se leyeron a una absorbencia de 540 nm. Para determinar

la concentración del óxido nítrico se preparó una curva patrón empleando estándares de NaNO₂ (1 mM y 1 μM) para obtener concentraciones en μM.

La concentración de Oxido Nítrico se obtiene de dos maneras: Una es mediante la grafica obtenida de la curva patrón; la otra es mediante la siguiente formula:

$$N = \frac{\text{(lectura del problema)} (\text{estándar } 8 \mu\text{M})}{\text{Lectura del estándar}} = \mu\text{Moles de NO}$$

Curva estándar de Oxido Nítrico.

Tubos	Medio	NaNO ₂ (1 mM)	NaNO (0.1 mM)	Reactivo de Griess (μl)
Blanco	1400 μl	-----	-----	100
1	1398.5 μl	1.5 μl 1(μM)	1.5μl 0.1(μM)	100
2	1397 μl	3.0 μl 2(μM)	3.0μl 0.3(μM)	100
3	1392.5 μl	7.5 μl 5(μM)	7.5μl 0.5(μM)	100
4	1388 μl	12 μl 8(μM)	12μl 0.8(μM)	100
5	1385 μl	15 μl 10(μM)	15μl 1.0(μM)	100

V.6 Determinación de la lipoperoxidación por el método de TBARS.

Durante el estrés oxidativo existe la sobre producción de radicales libre que dañan a moléculas biológicas importantes como por ejemplo el radical hidroxilo (•OH), que ataca a los ácidos grasos, constituyente de triacilgliceroles o fosfoacilgliceroles de membrana. Los productos de la lipoperoxidación son aldehídos (ejem. malondialdehído), cetonas, esterres, alcoholes (Fig. 18). Este proceso repetitivo conduce a la membrana a perder sus propiedades fisicoquímicas y culmina con la muerte de la célula.

Para ello evaluamos la lipoperoxidación de manera indirecta, como un indicativo de estrés oxidativo en mitocondrias de hígado de rata, monitoreando la presencia de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en animales control y animales sometidos a RC.

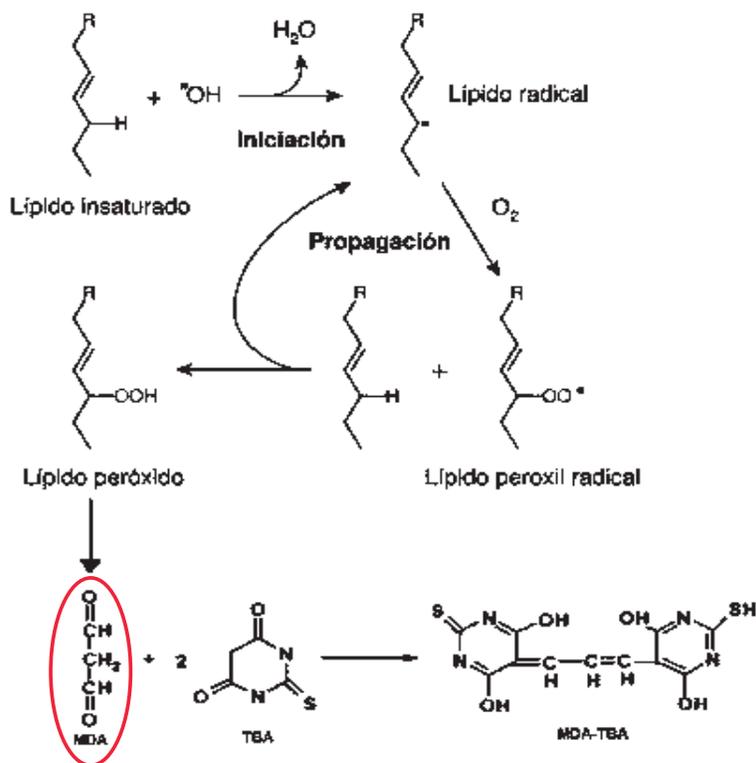


Fig. 18. Reacción en cadena de la lipoperoxidación, formación del producto malondialdehído (MDA) y su determinación por medio del TBA (ácido tiobarbitúrico).

Tabla V. Medio base para TBARS.

	Compuesto	PM (g)	Cantidad (g/100ml)
Solución A	Na_2HPO_4	141.56	2.12
Solución B	KH_2PO_4	136.09	2.04

Se disolvió en agua desionizada, se mezclaron 61.1 ml de la solución A y 38.9 ml de la solución B. Se ajustó a un pH de 7.0 y se afora al volumen final de 100ml.

PROCEDIMIENTO

Para determinar los niveles de la oxidación lipídica se utilizó una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) reportada por Buege y Aust (1978). Este método cuantifica la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés) entre las que se encuentra el malondialdehído, el principal producto de la oxidación de lípidos.

La batería de ensayo se realizó de la siguiente manera: en tubos de ensayo se agregó 1 mg de proteína mitocondrial y el medio de fosfatos (tabla V) hasta completar un volumen de 1 ml. A otra batería de tubos utilizada como control positivo se adicionó además un sistema oxidante: hierro-ascorbato. Se dejaron incubar por 30 minutos con agitación suave (80 rpm). Después de la incubación se adicionó 2 ml de la solución ácida (Ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N). Posteriormente los tubos se calentaron en baño maría hirviendo, después de 15 minutos fueron enfriados en hielo y posteriormente centrifugados a 7500 rpm durante 5 minutos, se tomó 1 ml de sobrenadante el cual se leyó a una absorbancia de 535 nm. Los resultados fueron expresados en nmolas de TBARS/mg de proteína y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar del malondialdehído ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

V.7 Determinación de la actividad de la glutatión reductasa mitocondrial.

Esta enzima juega un importante papel en la defensa antioxidante, permite a la célula mantener niveles adecuados de GSH celular y debido a su presencia en los diferentes tejidos y órganos está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades. El glutatión reducido es sustrato para las enzimas glutatión peroxidasas, las cuales proveen un mecanismo de detoxificación de peróxidos y

de lipoperóxidos, los cuales son especies reactivas del oxígeno y de glutatión S-transferasas, las cuales están involucradas en la conjugación y eliminación de xenobióticos del organismo (Lash, 2006).

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA.

Se empleo el kit de Ensayo de Glutatión Reductasa de SIGMA, el cual permitió la medición espectrofotométrica de la actividad de esta enzima. Esta actividad fue medida por la disminución en la absorbencia causada por la reducción del DTNB [Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico)] a 412 nm el cual reacciona en presencia del glutatión reducido formado por la reducción del GSSG por NADPH en presencia de la glutatión reductasa (GR) (fig. 19). Una unidad puede causar la oxidación 1.0 μ mol de DTNB a TNB a 25°C a un pH de 7.5.



Fig. 19. Reacción de la enzima glutatión reductasa (GR) en presencia de GSSG y NADPH, generando GSH que se une al compuesto DTNB espontáneamente formando un compuesto colorido (GS-DTNB).
TNB= ácido 5-tio (2-nitrobenzoico).

Se equilibró el buffer para el ensayo de la Glutation Reductasa (100mM de fosfato de potasio, pH 7.5, con 1mM de EDTA) y 2mM de la solución de glutatión oxidado a 25°C por lo menos 10min antes de comenzar el ensayo. Se midió en el espectrofotómetro a una longitud de 412nm, con una medición por 1min tomando lecturas cada 10 seg.

Se corrió la reacción teniendo como volumen final 1ml de acuerdo a la siguiente tabla VI:

SOLUCIÓN	Cantidad
2mM de GSSG	500µl
Buffer de ensayo	350-450µl
Mitocondrias de hígado de rata	100µl
3mM de DTNB	250µl
2mM de NADPH	50µl
Volumen total	1.00ml

La reacción comienza cuando se agrega la solución de NADPH. Se mezcló por inversión y se leyó inmediatamente en el espectrofotómetro.

Se calculó la concentración de la enzima en la muestra por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) * (\text{factor de dilución})}{\epsilon^{\text{mM}} * (\text{volumen de la muestra en un ml})}$$

Para TNB $\epsilon^{\text{mM}} = 14.15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Abs: absorbencia

V.8 Cuantificación del glutatión reducido (GSH).

Está involucrado en el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula. El glutatión reducido es un tripéptido compuesto por tres aminoácidos (γ -glutamil-cisteinilglicina), que emplea el grupo tiol de la cisteína para actuar como antioxidante, reaccionando con los radicales libres y los peróxidos orgánicos. El glutatión se encuentra principalmente en su forma reducida (90-95% del glutatión total). Por tanto, la alteración de la actividad de la GR provocará disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno. La alteración de la actividad de la GR y de los niveles de GSH se ha reportado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo (Lash, 2006).

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GSH

Un cambio en los niveles de la relación GSH/GSSG es indicativo del estrés oxidativo (Lash, 2006). Se empleó el kit de SIGMA para el ensayo del glutatión reducido, el cual reacciona con el DTNB formando un compuesto colorido que se lee en un espectrofotómetro a 412 nm. Se pre-incubaron las muestras de mitocondrias con ácido sulfosalicílico (SSA) al 5% durante 5min para proteger al grupo –SH del GSH y romper las membranas de las muestras, se centrifugó a 9,900 rpm por 5min a 4°C. Se tomaron 200 µl del sobrenadante de cada muestra y se pasaron a una batería de tubos previamente preparada como se muestra en la tabla VII:

Tabla VII: Determinación de la concentración del GSH

SOLUCIÓN	CANTIDAD
Buffer	550 µl
Mitocondrias de hígado de rata	200 µl
DTNB	250 µl
Volumen total	1 ml

La reacción comienza en el momento que se agrega el DTNB, se incuban durante 10 min aproximadamente a temperatura ambiente y se lee en el espectrofotómetro a 412nm.

Se realizó una curva estándar de GSH para la determinación de los cálculos adecuados y obtención de los resultados.

La enzima glutatión reductasa es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). Este ensayo permite la medición espectrofotométrica de la actividad de la glutatión reductasa de manera

indirecta por el incremento en la absorbencia causado por la reducción del DTNB a 412nm.

V.9 Análisis por Western blot

El término “blotting” hace referencia a la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma. Este proceso es necesario ya que todas estas macromoléculas están embebidas dentro de la matriz que forma el gel, lo que imposibilita realizar su detección, mientras que en la membrana, se encuentran accesibles al estar adheridas sobre la superficie de la misma.

La electrotransferencia de proteínas de un gel a una membrana, mejor conocida como Western Blot, combina las capacidades de separación de proteínas por electroforesis con la identificación rápida y altamente sensible por medio de especificidad inmunológica. Para resultados óptimos, las macromoléculas deben ser transferidas eficientemente de un gel a una membrana. Las proteínas ahora inmobilizadas en la membrana pueden ser identificadas y visualizadas empleando técnicas de detección inmunobioquímicas sensibles y específicas.

V.9.1 Electroforesis

Se mezclaron alícuotas de las muestras (volumen correspondiente a 50 µg de proteína) con 6 µl de buffer de carga que contenía un 20% de 2-mercaptoetanol (un agente reductor), llevando a un volumen final de 20 µl con agua desionizada y se hirvieron a 95°C durante 10 minutos para desnaturalizar a las proteínas.

Se prepararon geles para SDS-PAGE (al 13%) se cargó la muestra (cantidad de proteína constante 50 µg), en un pozo se cargaron 10 µl de marcador de peso molecular (Rainbow; Amersham). La electroforesis se llevó a cabo durante 90 minutos a 100 V, para separar las proteínas en función de su peso molecular en un campo eléctrico.

V.9.2 Transferencia

Una vez completada la electroforesis, las proteínas separadas presentes en el gel se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinildieno) empleando un equipo de transferencia en semiseco (Bio-Rad) durante 60 minutos a 100 V.

V.9.3 Bloqueo de las membranas

Una vez realizada la transferencia, las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau para verificar una óptima transferencia, se continuó con el procedimiento después de desteñir con buffer de lavado (TBS-T).

Las membranas empleadas para la determinación de proteínas nitrosiladas fueron bloqueadas con una solución de buffer de lavado TBS-T con 1% de gelatina (Gelatin; USB), durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua. Y para las determinaciones de la fracción mitocondrial enriquecida y la ausencia de contaminantes citosólicos, se bloqueó con una solución de buffer TBS-T con 5% de leche baja en grasas.

V.9.4 Inmunodetección con anticuerpos

V.9.4.1 Fracción mitocondrial enriquecida (inmunodetección de la citocromo c oxidasa).

Para el análisis de las fracciones mitocondriales enriquecidas, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón contra una proteína mitocondrial constitutiva, la citocromo c oxidasa (anti-COX), diluido 1:2000 en TBS-T-leche 5% a temperatura ambiente por 1 hora con agitación continua. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 minutos y se incubaron con anticuerpo secundario (goat anti-rabbit; Southern Biotech) conjugado con peroxidasa de rábano, en una dilución 1:4000 en TBS-T-leche 5% a temperatura ambiente por 1 hora con agitación continua. Al concluir la incubación las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 minutos.

V.9.4.2 Mitocondrias libres de contaminantes citosólicos (inmunodetección de actina).

Para corroborar que las mitocondrias se encontraban libres de contaminantes citosólicos, se realizó por el mismo método anteriormente descrito. Se empleó un anticuerpo policlonal de conejo contra una proteína constitutiva citosólica, la actina (anti-actina), en una dilución 1:2000 en TBS-T-leche al 5%.

V.9.4.3 Perfil de nitrosilación de proteínas mitocondriales (inmunodetección de tirosina nitrosilada).

Para el análisis de nitrosilación de las proteínas las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal de conejo contra tirosinas nitrosiladas (anti-3-NT) en una dilución 1:2000 en TBS-T-gelatina 1% a temperatura ambiente por 1 hora con agitación continua.

V.9.5 Reacción quimioluminiscente

Las membranas se incubaron con sustrato quimioluminiscente (Western Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz Biotechnology), posteriormente se expusieron a una película. Las membranas incubadas con los anticuerpos expusieron durante 3 minutos. Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3400C (Hewlett Packard). La intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (ImageJ).

V.10 Análisis Estadístico

Se obtuvo la media aritmética y la desviación estándar de los datos experimentales. Se aplicó el análisis de "t" de student para comparar el grupo control contra el grupo experimental. Para los gráficos se empleó el programa Graph Pad Prism ver 4.0.

VI. RESULTADOS

VI.1 Peso corporal de los animales

En la figura 20 se muestra el seguimiento del peso corporal de las ratas hembras (A) y de las ratas machos (B) del grupo control y del grupo con RPC, para evaluar los efectos que tiene la implementación de la RPC al 50% sobre el peso corporal en etapas tempranas del desarrollo y su seguimiento a lo largo de la vida del animal, en la que se puede observar la reducción del peso corporal de los grupos con RPC (hembras y machos) en forma estadísticamente significativa ($***p<0.001$) comparados con su grupo control, teniendo un 25% (A) y un 55% (B) menor, encontrando un porcentaje de disminución mayor en el grupo de ratas machos en RPC, esto probablemente debido a que su desarrollo y crecimiento es mayor en comparación con las hembras.

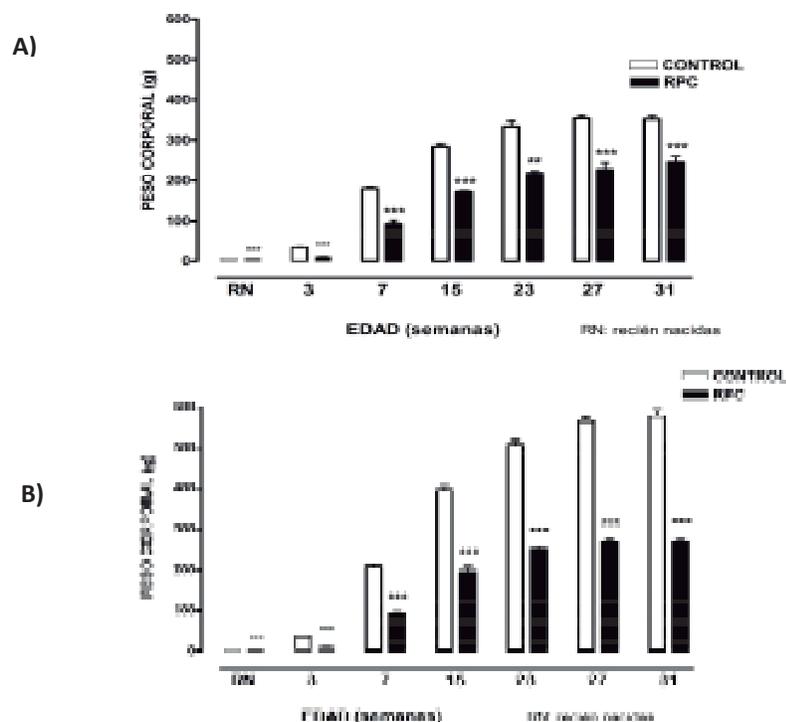


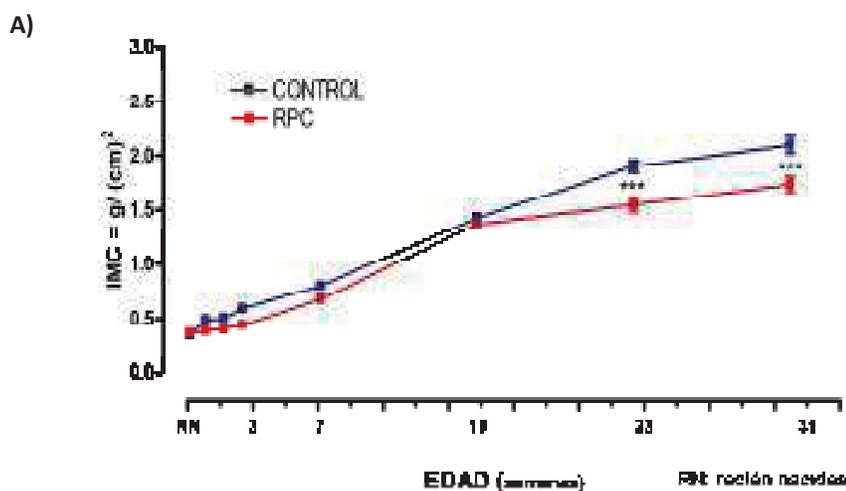
Fig. 20. Peso corporal en ratas hembras (A) y ratas machos (B) de los grupos control y con RPC durante la etapa de RN (recién nacidos), hasta la edad de 31 semanas. $X \pm D.E.$ de todos los grupos, $n=4-8$. $**p<0.01$ y $***p<0.001$ indican datos estadísticamente significativos.

VI.2 Índice de masa corporal (IMC)

La evaluación del índice de masa corporal (IMC) es un signo indicativo del estado nutricional del organismo. Es una medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo, también se conoce como índice de Quetelet. Se calcula según la expresión matemática:

$$IMC = \frac{\text{peso}(kg)}{\text{talla}^2(m^2)}$$

Se monitoreo la talla y el peso de los animales desde su nacimiento hasta la última etapa de la determinación (31 semanas), tanto en los animales control como en los animales sometidos a RPC (fig. 21). Se determinó el índice de masa corporal y se observó un patrón similar en animales en RPC desde la etapa de RN hasta las 31 semanas de edad en ratas hembras (A) y en ratas machos (B), la disminución fue estadísticamente significativa a partir de la semana 15 en machos y de las 23 semanas en hembras, en comparación con los grupos control. Estos datos nos sugieren el efecto negativo que tiene la RPC sobre el peso y talla y la relación entre estos (IMC) y que es independiente del género.



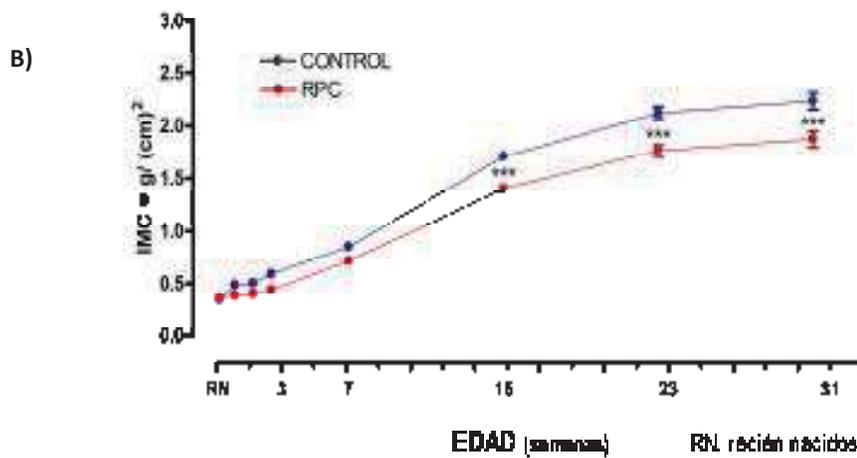


Fig. 21. Determinación del índice de masa corporal (IMC) en ratas control y en RPC en ambos géneros. Los valores muestran la media \pm D.E. de todos los grupos, n=4-8. ***p<0.001 indican significancia estadística.

VI.3 Peso del hígado

La desnutrición implementada en etapas críticas del desarrollo y crecimiento ocasiona efectos adversos en órganos metabólicamente activos, como el hígado. La desnutrición ocasiona una disminución en el desarrollo adecuado de este órgano, se observa una disminución del peso. Se monitoreó el peso del hígado para observar los efectos que tiene la RPC en el desarrollo y crecimiento de este órgano, animales sometidos a RPC tanto hembras como machos mostraron una disminución estadísticamente significativa (**p<0.001) del peso del hígado en comparación con animales control en todas las etapas de determinación (fig. 22). Los resultados muestran un 50% menos del peso del hígado de los animales en RPC en comparación con los del grupo control.

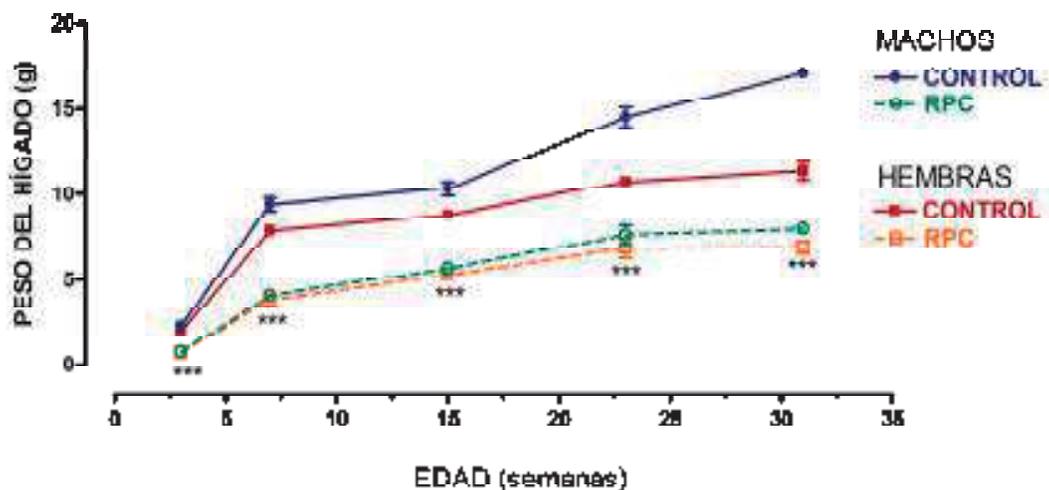


Fig. 22. Peso del hígado en ratas control y con RPC de ambos géneros. Los datos muestran la media \pm D.E. en todos los grupos, n=4-8, ***p<0.001 son datos estadísticamente significativos.

VI.4 Fracción mitocondrial enriquecida.

Para evaluar que las fracciones aisladas del hígado, se encuentran enriquecidas en mitocondrias, se determinó la presencia de una proteína constitutiva mitocondrial por inmunodetección la citocromo c oxidasa, en las muestras obtenidas de animales control y animales sometidos a RPC de ambos géneros (hembras y machos). En la Figura 23 se muestra la autorradiografía de las fracciones aisladas del hígado de ratas hembras (A) y ratas machos (B) del grupo control y el grupo en RPC, los carriles están divididos de la siguiente manera:

CARRIL	MUESTRA
1	Control RN
2	RPC RN
3	Control 3 semanas
4	RPC 3 semanas
5	Control 7 semanas
6	RPC 7 semanas
7	Control 31 semanas
8	RPC 31 semanas

Se observa la banda enriquecida en mitocondrias en todos los carriles (1-8) en ratas hembras y machos, así como también en los animales control y en RPC, por lo que se comprueba que la muestra es una fracción enriquecida en mitocondrias.



Fig. 23. Autorradiografía de la presencia de la proteína constitutiva citocromo c oxidasa en fracciones obtenidas de hígado de ratas hembras (A) y ratas machos (B).

VI.5 Mitocondrias libres de contaminantes citosólicos.

La purificación de mitocondrias de hígado de rata puede no ser 100% efectiva y mantener pequeñas cantidades de componentes citosólicos que generan interferencia y alteración en los resultados. Para corroborar que las muestras de mitocondrias obtenidas mediante el método de Percoll se encuentran libres de contaminación por componentes citosólicos, inmunodetectamos la presencia de una proteína constitutiva en el citosol (actina) y ausente en las mitocondrias. En la figura 24 se observa la autorradiografía de la inmunodetección de la proteína actina en fracciones mitocondriales de hígado de rata, se observa la presencia de actina solo en las fracciones del homogenado total carril 1 y 3 y ausencia de esta banda en los carriles que contiene solo fracción mitocondrial, tanto en ratas hembras (carriles 1 y 2) como en ratas macho (carriles 3 y 4). Estos resultados nos sugieren que las mitocondrias obtenidas se encuentran libres de contaminantes citosólicos y que su uso en los siguientes experimentos es adecuado y nos confirma que los resultados obtenidos son confiables.

CARRIL	MUESTRA	GÉNERO
1	HOMOGENADO TOTAL	HEMBRA
2	MITOCONDRIAS	HEMBRA
3	HOMOGENADO TOTAL	MACHO
4	MITOCONDRIAS	MACHO

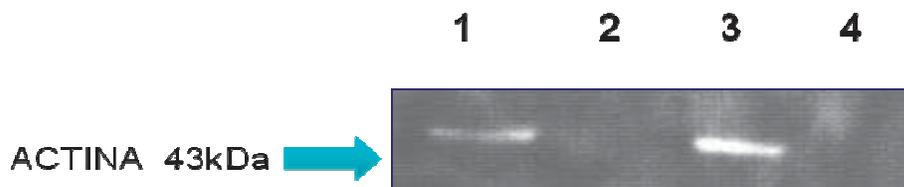
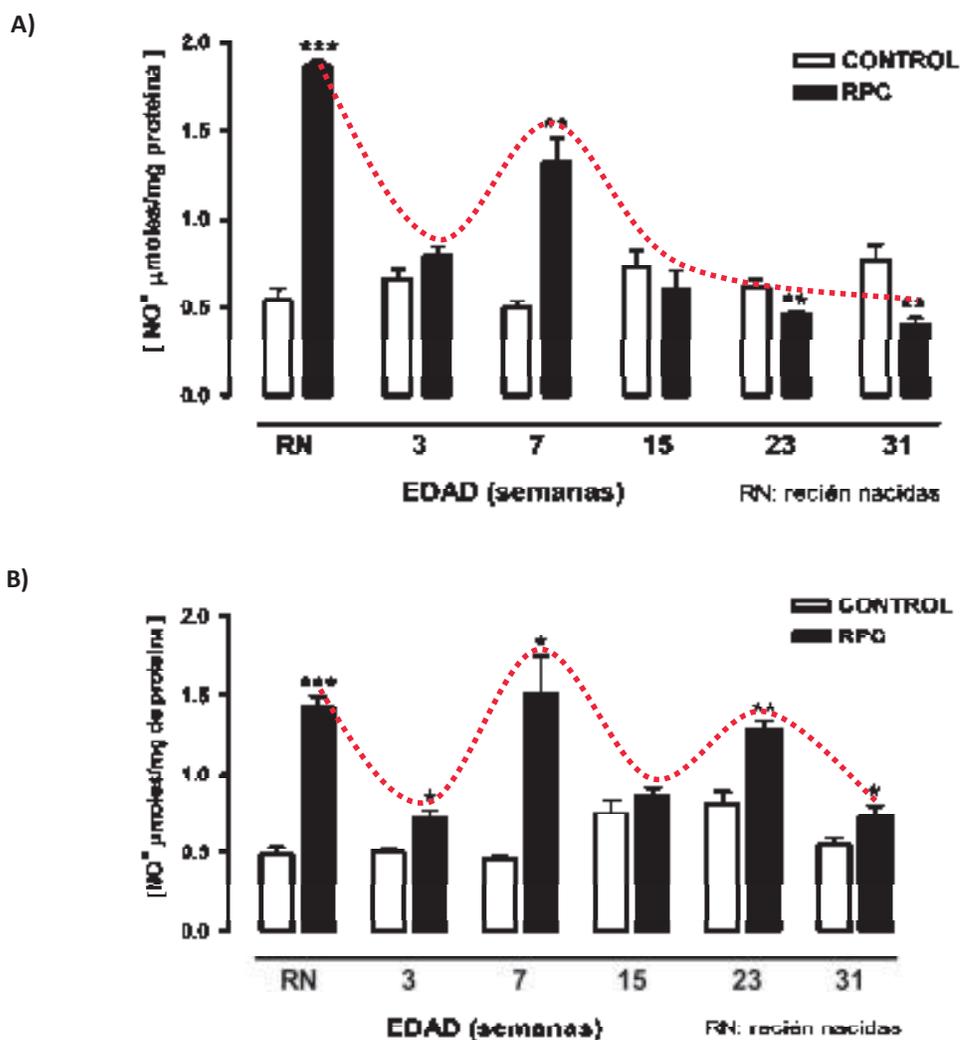


Fig. 24. Inmunodetección de la proteína citosólica actina en fracciones de homogenado total en ratas hembras (carril 1) y machos (carril 3); así como fracción mitocondrial en ratas hembras y machos, carril 2 y carril 4 respectivamente.

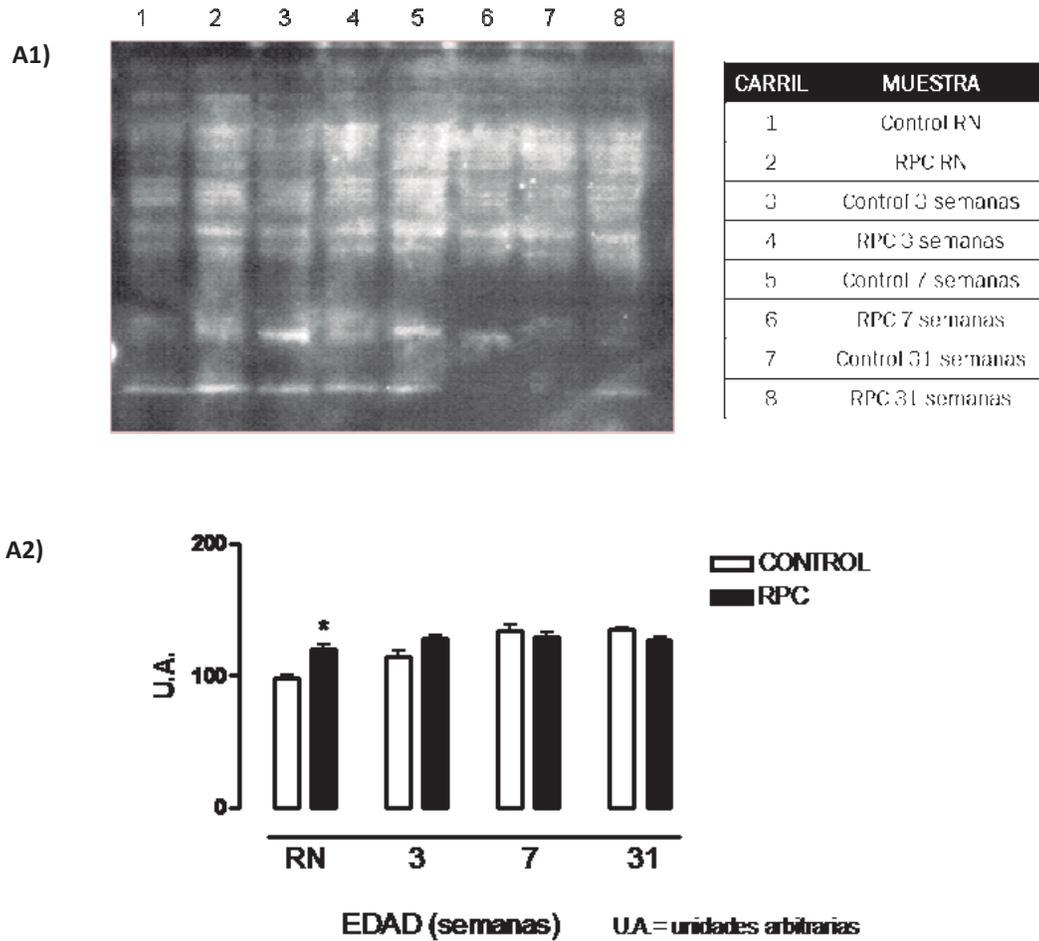
VI.6 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre los niveles del óxido nítrico mitocondrial.

El estrés nitrosativo se evaluó determinando por espectrofotometría la concentración de la principal especie reactiva de nitrógeno, el óxido nítrico (NO•), los resultados (fig. 25) muestran una variación dependiente de la etapa de determinación observándose tanto en ratas hembras (A) como en ratas machos (B) un incremento significativo de hasta un 200% mas en la etapa de RN (recién nacidos) en animales en RPC y posteriormente una tendencia a disminuir hasta valores similares a los control, disminuyendo de manera significativa un 10% en ratas hembra en RPC.



VI.7 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre el perfil de nitrosilación de proteínas mitocondriales.

El estrés nitrosativo se evaluó mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-nitrotirosina la cantidad de proteínas nitrosiladas por el anión peroxinitrito. En la fig. 26 se observan las autorradiografías (A2 y B2) y las densitometrias (A1 y B1) de los perfiles de nitrosilación de proteínas en mitocondrias de hígado de ratas hembras (A) y machos (B) en RPC con respecto a su control. Un dato interesante que arrojó esta determinación fue el incremento significativo en los niveles de nitrosilación solo en la etapa de RN en ambos géneros, posteriormente estos niveles se mantuvieron similares al control.



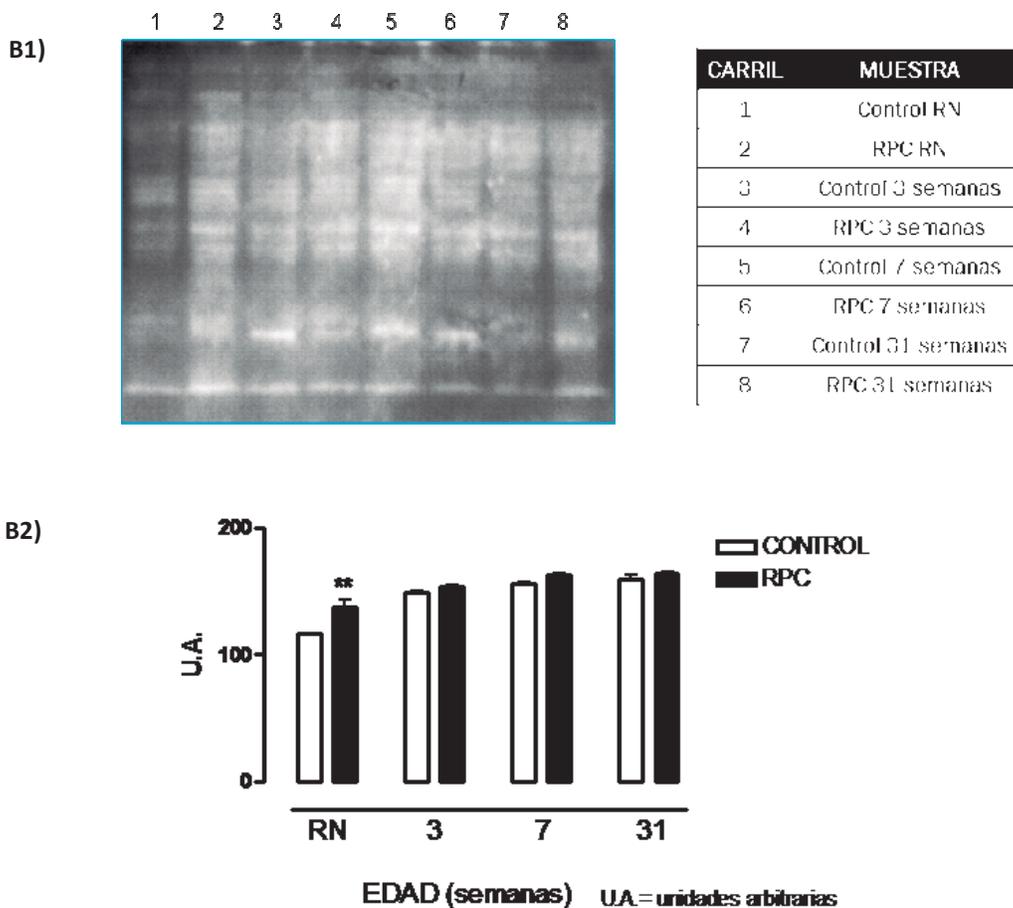


Fig. 26. Perfil de nitrosilación de proteínas mitocondriales de hígado de ratas hembras y machos (A2) y (B2) respectivamente. En la figura se muestra la densitometría de los perfiles de nitrosilación en ratas hembras y machos (A1) y (B1) respectivamente. Los datos muestran la media \pm D.E., n=3. *p<0.05 y **p<0.01 muestran resultados estadísticamente significativos.

VI.8 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre la oxidación de lípidos en la mitocondria.

La lipoperoxidación de lípidos de membrana es causada principalmente por el radical hidroxilo, uno de los principales productos de esta oxidación es el malondialdehído que reacciona con el ácido tiobarbitúrico y genera un compuesto

que es visible. En la figura 27 podemos observar la determinación de los niveles de lipoperoxidación a nivel mitocondrial en ratas hembras (A) y machos (B), se observa una tendencia a disminuir en los animales bajo RPC en comparación con el grupo control, en ambos géneros y en las diferentes etapas de determinación, un dato importante es el incremento significativo en los niveles de lipoperoxidación a las 7 semanas de edad en el grupo sometido a RPC en ambos géneros. Estos resultados sugieren que probablemente la RPC tiene un efecto negativo sobre la producción de ERO y como consecuencia la disminución en la lipoperoxidación.

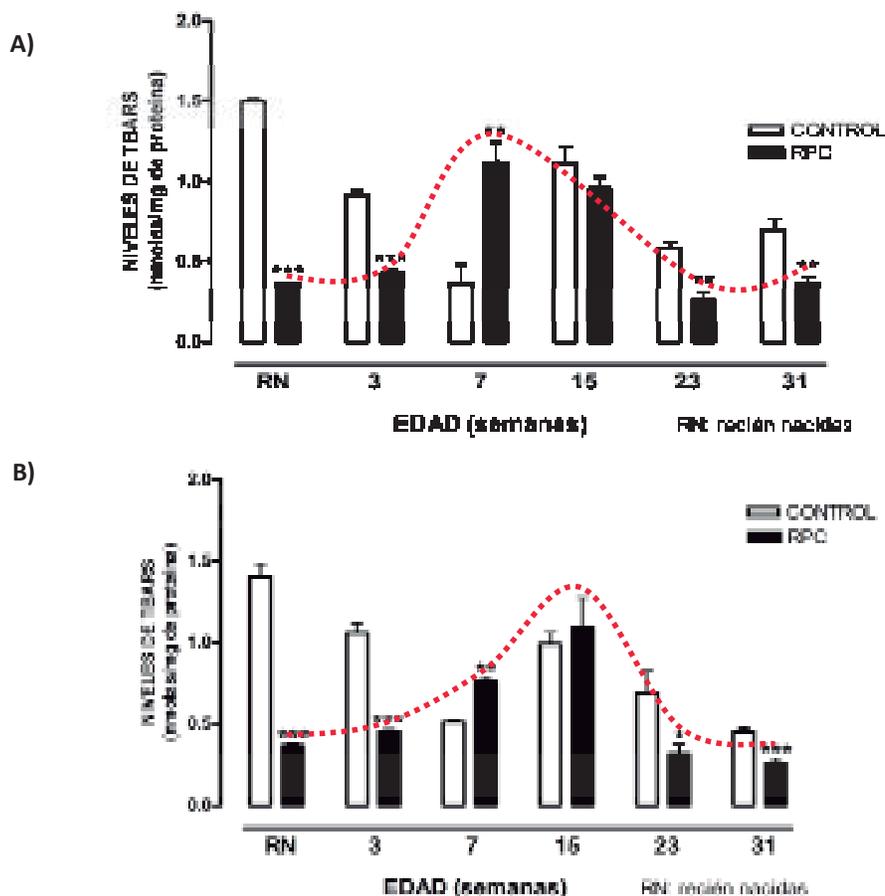


Fig. 27. Niveles de lipoperoxidación en las mitocondrias de hígado de ratas hembras (A) y machos (B) en RPC y control. Los datos muestran la media \pm D.E. , n=4-8. Los resultados estadísticamente significativos se representan así *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

VI.9 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre la actividad de la glutatión reductasa mitocondrial (GRd).

La capacidad antioxidante a nivel mitocondrial fue analizada determinando la actividad de la enzima glutatión reductasa con el kit de SIGMA, mediante la reacción del ácido sulfosalicílico (SSA) con el producto de la actividad enzimática, el glutatión reducido. En la fig. 28 podemos observar un patrón dependiente de la etapa de determinación, etapas tempranas del desarrollo mostraron una disminución de la actividad enzimática en ratas bajo RPC en ambos géneros y en etapas posteriores, consideradas como edad adulta del animal (después de la semana 7 de edad), observamos una tendencia a incrementar la actividad de la GRd en ratas hembras (A) y machos (B) hasta llegar a niveles similares al control.

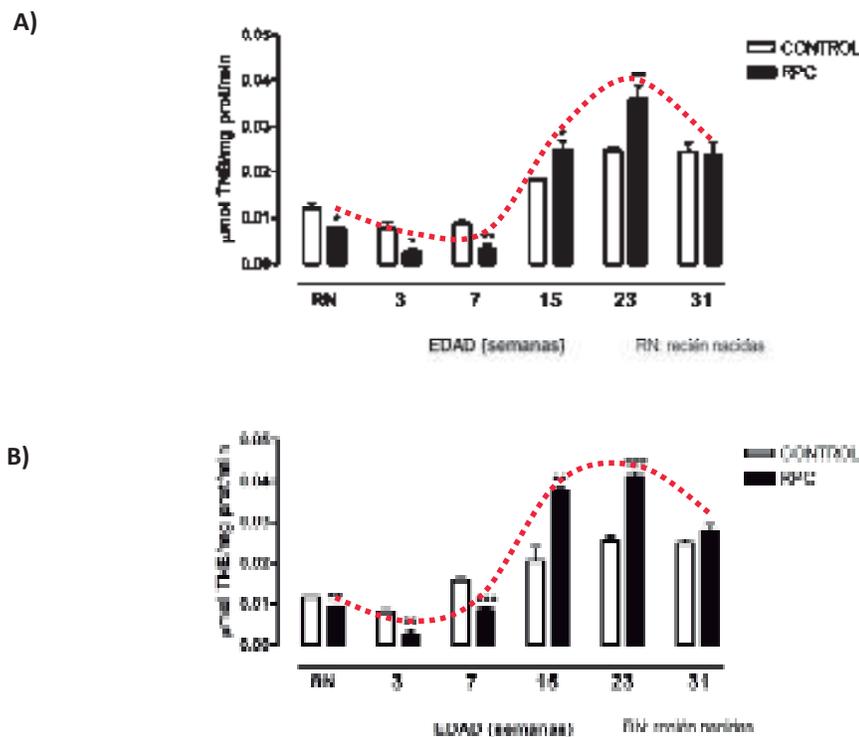


Fig. 28. Actividad de la enzima antioxidante glutatión reductasa en mitocondrias de hígado de rata en animales bajo RPC y control en hembras (A) y machos (B). Se muestra la media \pm D.E., n=3.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, son datos estadísticamente significativos.

VI.10 Efecto de la restricción proteico-calórica sobre los niveles de glutatión reducido mitocondrial.

Los niveles de glutatión reducido (GSH) nos ayudan a evaluar el estado oxido-redox de la mitocondria, este reacciona con el SSA y genera un compuesto que es leído a cierta longitud de onda mediante espectrofotometría. En la figura 29 se muestran los niveles de GSH en mitocondrias de hígado de ratas hembras (A) y machos (B) bajo RPC con respecto al control. Se observaron variaciones significativas, principalmente niveles por debajo del control en ambos géneros, a la edad RN los niveles son menores, un 10%, con respecto al control tanto en ratas hembras (A) como en ratas machos (B); y a las 31 semanas, los niveles son menores solo en el grupo de ratas machos (B). Estos datos sugieren que probablemente los efectos de la RPC están dañando a la mitocondria, así como su balance oxido-redox, debido a estos cambios y variaciones en los niveles de GSH mitocondrial.

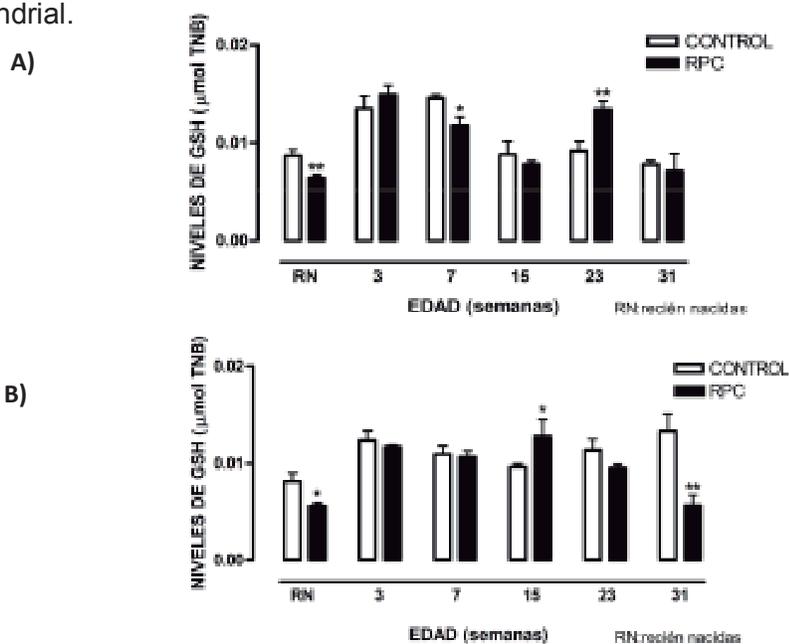


Fig. 29. Niveles de GSH en mitocondrias de hígado de ratas hembras (A) y machos (B) en animales en RPC y control. Se muestra la media \pm D.E., n=3. *p<0.05, **p<0.01 muestran datos estadísticamente significativos.

VII. DISCUSIÓN

En el modelo de experimentación planteado en este trabajo, se aplicó una restricción proteico-calórica (RPC) al 50% en etapas críticas del desarrollo, como son la etapa prenatal y postnatal. Este tipo de restricción al 50% y aplicado en estas etapas, es similar a una desnutrición, debido a la disminución en el porcentaje de aporte de calorías y proteínas. Durante los últimos años, Barker y colaboradores, han publicado un número importante de trabajos científicos y textos sobre estudios epidemiológicos inicialmente desarrollados en la Gran Bretaña (Barker *et al.*, 1989; 1989a), planteando que el estado nutricional durante el período prenatal y durante la infancia, condicionan o influyen en el desarrollo de enfermedades en la edad adulta. Las ideas y mecanismos implicados son conocidos como la “hipótesis o teoría de Barker”. Propone que una agresión *in útero* sería capaz de inducir una programación anormal de diversos órganos y sistemas relacionados entre sí que se manifestaría a lo largo de la vida del individuo. Esta programación ocurriría, según la definición de Lucas (Lucas, 1991), «cuando un estímulo o agresión, que actúa en un periodo crítico del desarrollo, produce un cambio permanente o mantenido en la estructura o la función de un organismo».

Los efectos que se observaron en los animales sometidos a este modelo de RPC al 50% concuerdan con los efectos de una desnutrición *in útero*, se observó un bajo peso al nacer desde un 35% menos en ratas hembras hasta un 55% menor en ratas machos (Fig. 20), así como también una menor talla en los grupos de animales sometidos a este modelo de RPC en comparación con los del grupo control. Otro dato indicativo del estado nutricional fue la relación entre el peso y la talla de los animales, conocido como el índice de masa corporal (IMC) (Fig. 21), en el cual se observó una disminución significativa ($p < 0.001$) en los animales en RPC, con respecto al control, en etapas posteriores al nacimiento (23 y 31 semanas de edad en ratas hembras y 15, 23 y 31 semanas de edad en ratas machos). La idea de que la nutrición fetal podría tener efectos a largo plazo no es

nueva. Los estudios clásicos de Widdowson y McCance (Widdowson y McCance, 1974,1975) en animales mostraron que los que tenían bajo peso al nacimiento, no llegaban a alcanzar el tamaño de sus congéneres nacidos con peso normal, ni al llegar a la madurez; una disminución en el número de células de algunos órganos diana sería la explicación de este fenómeno. Se ha observado, además, que la restricción proteico-calórica durante la gestación en ratas se asocia con cambios en el tamaño, la morfología y la funcionalidad hepática (Desai *et al.*, 1995, Desai *et al.*, 1996, Hales *et al.*, 1996; Desai *et al.*, 1997). Efectos observados, en este trabajo, sobre un órgano metabólicamente activo como es el hígado, muestran una disminución significativa ($p < 0.001$) del peso de este órgano (Fig. 22), observándose una disminución de alrededor del 50% para ambos géneros (hembras y machos) en animales sometidos a RPC durante la etapa prenatal y postnatal, con respecto al grupo control, esta disminución de peso al nacimiento se asocia a incremento en el riesgo de padecer complicaciones en el periodo neonatal, aumento en la mortalidad perinatal y a un mayor riesgo de enfermedad en la vida adulta (Ceesay *et al.*, 1997; Valiente *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 2000; SEINAP, 2001, Parra-Gómez, 2003; Moreno y Serra, 2001; Tomkins, 2007). El impacto a largo plazo dependerá del estadio en el que se produzca la malnutrición, de su duración e intensidad. Cada órgano y tejido tiene un periodo crítico o sensible, de mayor replicación celular, durante el cual se verá más afectado (Becerra-Fernández, 1999; Bast, 2002).

Durante muchos años se consideró que el feto en etapa de desarrollo *in útero* se encontraba exento de sufrir algún daño por agentes externos, ya que se suponía que estaba protegido dentro del vientre materno. En los últimos años diversas áreas de investigación han sugerido que los eventos implicados en el desarrollo fetal normal tienen efectos a largo plazo e influyen en la salud durante la vida adulta. Se piensa que los estímulos o agresiones en las etapas tempranas de la vida originan consecuencias permanentes; esto es un fenómeno establecido en el

campo de la Biología del desarrollo, denominado programación (Lee *et al.*, 2005; Lebenthal y Bier, 2007; Martínez, 2007).

El estrés oxidativo y probablemente el nitrosativo, son las causas o trastornos, conocidas o probables, asociadas con el crecimiento fetal adverso (disminución en el desarrollo y crecimiento) (Martínez, 2008); éste podría ser un factor externo implicado en la programación, así como en la asociación entre la desnutrición fetal adversa y posteriormente el riesgo elevado de padecer enfermedades en la etapa adulta. Los mecanismos de programación del estrés oxidativo pueden ser directos, a través de la modulación de la expresión genética (Burdge *et al.*, 2007) o indirectos, mediante el efecto de ciertas moléculas oxidadas (Luo *et al.*, 2006).

Diversos experimentos han demostrado la función del balance redox en el funcionamiento adecuado de la mitocondria (Tuma, 2001), así como los efectos adversos que provocan el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Dröge, 2002; Boveris, 2005) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Drew y Leeuwenburgh, 2002; Guzman *et al.*, 2006).

En los estudios realizados en este proyecto el enfoque fue determinar la influencia de la RPC sobre la producción de óxido nítrico mitocondrial ($\text{NO}\cdot\text{m}$), como un indicativo de daño nitrosativo, ya que ésta molécula es de las principales especies reactivas de nitrógeno (ERN). Los datos obtenidos mostraron un incremento significativo ($p < 0.001$) en las ratas recién nacidas (RN) bajo este régimen (Fig. 25). El incremento fue por arriba del 50%, en comparación con los animales control, tanto en animales hembras como machos; en etapas posteriores al nacimiento, en ratas machos, los valores de $\text{NO}\cdot\text{m}$ se mantuvieron en concentraciones similares al control; y en hembras, se observó una tendencia a disminuir por debajo de los valores de los animales control, posiblemente debido al efecto hormonal. Baylis (2008), en un estudio comparativo entre ratas hembras y machos, del daño a nivel renal por la disminución en la producción de $\text{NO}\cdot$ endotelial, encontró un efecto protector, debido a las hormonas femeninas (estrógenos) en ratas hembras, en comparación con ratas machos durante el daño renal. Los datos observados en

este estudio concuerdan con lo reportado por Baylis, a diferencia que nuestros datos son a nivel mitocondrial y son datos novedosos, ya que no existen reportes sobre la producción de $\text{NO}\cdot\text{m}$ en ratas sometidas a una restricción proteico-calórica del 50%. Se ha observado, en estudios hechos en aorta de rata, la relación que existe entre la disminución en la producción de $\text{NO}\cdot$ endotelial ($\text{NO}\cdot\text{e}$) y la posible predisposición de padecer hipertensión en la edad adulta debido a una restricción nutricional durante la etapa postnatal y los resultados muestran una disminución en la actividad de la enzima NOSe y como consecuencia, una probable disminución en la producción de $\text{NO}\cdot\text{e}$ (Racasan *et al.*, 2005; Nyut, 2008).

Otro dato indicador de estrés nitrosativo, es la determinación del perfil de nitrosilación de proteínas a nivel celular (Guzman *et al.*, 2006); al respecto, los resultados de este trabajo en mitocondrias de hígado de rata, mostraron un incremento del 25% en el perfil de nitrosilación de las proteínas en animales hembras y machos en RPC, pero solo en la etapa de RN (Fig. 26). En etapas posteriores, los niveles se mantuvieron similares a los del grupo control. En los grupos control se observó un incremento en el perfil de nitrosilación de proteínas dependiente de la edad. Este patrón se repitió en animales hembras y en machos, esto indica que el perfil de nitrosilación es diferente, según la edad de la rata; etapas tempranas y cercanas al nacimiento, tienen un incremento en la producción de estas especies reactivas de nitrógeno, y en etapas posteriores al nacimiento, cuando el animal se considera adulto, tienen valores similares, con respecto al control, en ambos géneros. Así como también, los efectos que tiene el envejecimiento en el incremento de las ERN y como consecuencia, el incremento del perfil de nitrosilación con respecto a la edad (Van der Loo *et al.*, 2000).

Otro daño debido a la sobreproducción de las ERO, y como consecuencia estrés oxidativo, es la oxidación de lípidos de membrana (lipoperoxidación). Este daño es principalmente provocado por el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el cual genera un daño a nivel membranar, provocando el mal funcionamiento celular y posteriormente

apoptosis (Pamplona *et al.*, 1998). En estudios realizados en niños nacidos con bajo peso, se observaron niveles elevados de lipoperoxidación en muestras de sangre, tanto de los niños, las madres y el cordón umbilical, esto en comparación con niños nacidos con un peso adecuado (Biri *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en este proyecto mostraron una disminución significativa de la lipoperoxidación a nivel mitocondrial en los animales en RPC (Fig. 27), durante las etapas cercanas a la fecha de nacimiento. En etapas posteriores, se observó un dato relevante a la semana 7 de edad, donde se incrementaron los niveles de lipoperoxidación por encima de los niveles del grupo control. Este patrón se mantuvo en animales hembras y machos, este resultado es contrastante al observado en niños que estuvieron bajo desnutrición durante la etapa prenatal (Biri *et al.*, 2007), nos sorprendió encontrar niveles disminuidos de lipoperoxidación a nivel mitocondrial, pero probablemente estos niveles bajos sean debido a cambios y/o alteraciones en la composición de lípidos de membrana, ya que estudios realizados en humanos muestran que la desnutrición tiene un efecto sobre las enzimas encargadas de generar las insaturaciones (desaturasas) en los lípidos de membrana. Probablemente la restricción proteico-calórica, aplicada desde la etapa prenatal y posterior al nacimiento, esté afectando la actividad de estas enzimas desaturasas, y como consecuencia disminuyendo las insaturaciones en los lípidos de las membranas mitocondriales; y estos se vuelven menos propensos al daño oxidativo por el radical hidroxilo (Sastre *et al.*, 2000; Myatt y Cui, 2004; Myatt, 2006).

Las defensas antioxidantes tienen un papel importante para combatir la producción de especies reactivas o de radicales libres, así como prevenir el daño a biomoléculas importantes (Monsalve, *et al.*, 2007). La mitocondria cuenta con una batería antioxidante importante para prevenir y evitar la sobreproducción de especies reactivas que dañen el funcionamiento mitocondrial. Una de las principales defensas con las que cuenta la mitocondria es el ciclo de oxidoreducción del glutatión, dentro del cual se incluye la enzima glutatión reductasa,

que es la principal encargada de mantener las pozas de glutatión reducido adecuadas para dentro de la mitocondria mantener el equilibrio redox. En estudios realizados en niños con desnutrición se observó que en el plasma disminuyó la actividad de esta enzima (Reid *et al.*, 2000) se tomaron muestras de sangre y evaluó la actividad de la glutatión reductasa, encontrando valores por debajo del normal en comparación con niños en buen estado nutricional, ellos manejan que debido a la desnutrición existe una disminución de la vitamina B12 la cual es la encargada de producir flavín mono nucleótido (FMN) una importante coenzima y necesaria para la actividad de esta enzima. Los resultados obtenidos en este trabajo al evaluar las defensas antioxidantes mitocondriales, como fue, la actividad de la glutatión reductasa, mostraron una disminución significativa en la actividad de esta enzima alcanzando valores de 45% menos en ratas bajo RPC al 50% en comparación con los controles, esto se observó en ratas hembras y machos en etapas tempranas del desarrollo (RN, 3 y 7 semanas de edad) (fig. 28). Posteriormente, al evaluar este parámetro en etapas posteriores (15, 23 y 31 semanas) del desarrollo completo del animal, se encontró una tendencia a incrementar la actividad enzimática hasta alcanzar valores similares a los control, este patrón continuó tanto en ratas hembras como en ratas machos del grupo en RPC (fig. 28) Nuestros resultados en etapas tempranas y cercanas a la fecha de nacimiento, concuerdan con los datos reportados por Reid y col., (2000), donde los niños en etapas tempranas del desarrollo, presentan un una disminución de la actividad de la glutatión reductasa.

En cuanto a defensas antioxidantes no enzimáticas dentro de la mitocondria, la evaluación de los niveles de glutatión reducido (GSH) es un indicativo de daño oxidativo, ya que estudios realizados por Lash (2002, 2006) muestran que los niveles basales de glutatión al interior de la mitocondria deben de mantenerse en equilibrio, y que una alteración (disminución y/o aumento) son indicativos de daño a nivel mitocondrial. Nuestros resultados mostraron variaciones en cuanto a los niveles de GSH mitocondrial en los animales bajo RPC, estas variaciones son

niveles por debajo y por arriba del control sin tener un patrón definido, algo importante de mencionar son los niveles bajos observados a la edad de RN en comparación con el grupo control, estos resultados se encontraron similares en ambos géneros (fig. 29). Lash (2005) propuso que el daño oxidativo mitocondrial puede estar implicado en el incremento y/o en la disminución de los niveles de GSH mitocondrial, ya que este daño pudiera afectar la participación y actividad de los transportadores encargados de introducir glutatión al interior de la mitocondria, y que como una defensa antioxidante primaria se observa una disminución de los niveles de GSH al interior de la mitocondria, posteriormente como una defensa antioxidante secundaria la mitocondria censa estos niveles bajos y como resultado incrementa el transporte de GSH hacia el interior de esta para combatir el daño generado por el incremento de estas especies reactivas. Otro dato importante es la disminución del aminoácido cisteína que es el limitante en la síntesis de este glutatión, en niños en desnutrición se han encontrado niveles reducidos de este aminoácido en plasma, debido a la subnutrición de nutrientes clave, como lo son las proteínas (Lyons, 2002). Los resultados diferenciales y dependientes de la etapa de determinación observados en este trabajo, concuerdan con lo reportado por Alexander en el 2007, en donde ella propone que los efectos sobre el estrés oxidativo, que probablemente son provocados por la restricción proteico-calórica tienen una vía divergente, y que son dependientes de la etapa donde se presenta esta restricción. Animales sometidos a restricción alimenticia en etapas críticas del desarrollo como lo son la gestación y etapas cercanas al nacimiento tienen un efecto adverso, y existe la posibilidad de que el estrés oxidativo esté implicado en la probable programación fetal (Luo, et al., 2006) y que el resultado sean personas propensas a padecer enfermedades propias del Síndrome Metabólico; por otro lado si esta restricción es implementada en animales en edad adulta o en etapas posteriores al nacimiento donde el organismo ha alcanzado un adecuado crecimiento los resultados serán benéficos, disminuyendo la producción de ERO y como consecuencia prolongando la vida (Weindruch, 1996; Barja, 2005).

VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

DETERMINACIÓN	ETAPA PERINATAL (RN, 3 y 7 sem)		ETAPA POSTNATAL (15, 23 y 31 sem)	
	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS
Niveles de NO [•]	↑	↑	↓	↑
Perfil de NITROSILACIÓN	(RN) ↑	(RN) ↑	=	=
Niveles de LIPOPEROXIDACIÓN	* _{7sem} ↓	* _{7sem} ↓	↓	↓
Actividad de la GR	↓	↓	↑	↑
Niveles de GSH	(RN) ↓	(RN) ↓	=	* ₃₁ =

↑ Aumento, ↓ Disminución, = Valores similares, * Diferencias en esa etapa.

IX. CONCLUSIONES

En la restricción proteico-calórica existen cambios diferenciales en el estrés oxidativo y nitrosativo dependientes de la etapa de desarrollo de la rata.

X. REFERENCIAS

Akerboom, T.P., y Sies, H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* **77**: 373-382.

Alexander, B.T. 2006. Fetal programming of hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**: R1-R10.

Alexander, B.T. 2007. Divergent pathways of programming: prenatal vs. postnatal protein undernutrition. *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**: 1257-1258.

Anderson, G.A., Ahokas, R.A., Lipschitz, J., y Diltz, P.V. 1980. Effects of maternal dietary restriction during pregnancy on maternal weight gain and fetal birth weight in the rat. *J. Nutr.* **110**: 883-90.

Arends, N., Johnston, L., Hokken-Koelega, A., Van de Ridder, M., Savage, M., y Clark, A. 2002. Polymorphism in the IGF-I gene: clinical relevance for short children born small for gestational age (SGA). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 2720.

Attardi, G., y Schatz, G. 1988. Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**: 289-333.

Avila-Curiel, A., Shamah-Levy, T., Galindo-Gómez C., Rodríguez-Hernández, G. y Barragán-Heredia L.M. 1998. La desnutrición infantil en el medio rural mexicano. *Salud Pública Mex.* **40**: 150-160.

Badaloo, A., Reid, M., Forrester, T., Heird, W., y Jahoor, F. 2000. Cysteine supplementation improves the erythrocyte glutathione synthesis rate in children with severe edematous malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**: 646-52.

Barja, G. 2005. Radicales libres de origen mitocondrial y longevidad. *An. R. Acad. Nac. Farm.* **71**: 783-798.

Barker D.J., y Osmond C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet.* **1**: 1077-1081.

Barker, D.J.P., Hales, C.N., Fall, C.H.D., Osmond, C., Phipps, K., y Clark, P.M.S. 1993. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetol.* **36**: 62-7.

Barker, D.J.P., Osmond, C., y Goldings, J. 1989. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. **298**: 564-567.

Barker, D.J.P., Winter, P.D., y Osmond, C. 1989a. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. **2**: 577-580.

Bast, A. 2002. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetol*. **45**: 867-876.

Baylis, C. 2008. Sexual dimorphism of the aging kidney: role of nitric oxide deficiency. *Physiol*. **23**: 142-150.

Becerra-Fernández, A. 1999. Malnutrición fetal y enfermedad metabólica en la vida adulta. *Nutrición y Obesidad*. **5**: 243-251.

Bereiter-Hahn, J., y Voth, M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech*. **27**: 198-219.

Biri, A., Bozcurt, N., Turp, A., Kavutcu, M., Himmetoglu, Ö., y Durak, I. 2007. Role of Oxidative Stress in Intrauterine Growth Restriction. *Gynecol. Obstet*. **64**: 187-192.

Block, G., Dietrich, M., Norkus, E.P., Morrow, J.D., Hudes, M., y Caan, B. 2002. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am. J. Epidemiol*. **156**: 274-85.

Bloomfield, F.H., Oliver, M.H., Giannoulas, C.D., Gluckman, P.D., Harding, J.E., y Challis, J.R. 2003. Brief undernutrition in late-gestation sheep programs the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult offspring. *Endocrinol*. **144**: 2933-40.

Boveris, A. 2005. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars. Pharm*. **46**: 85-95.

Bowen, R.S., Moodley, J., Dutton, M.F., y Theron, A.J. 2001. Oxidative stress in pre-eclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. **80**: 719-725.

- Buege, J.A., Aust, S-D., 1978. Microsomal Lipid peroxidation. *Met. Enzymol.* **52**: 302-310.
- Burdge, G.C., Hanson, M.A., Slater-Jefferies, J.L., y Lillycrop, K.A. 2007. Epigenetic regulation of transcription: A mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br. J. Nutr.* **97**: 1036–1046.
- Burns, S.P., Regan, G., Murphy, H.C., y Kinchesh, P. 2000. Fetal programming of hepatic lobular architecture in the rat demonstrated ex vivo with magnetic resonance imaging. *NMR Biomed.* **13**: 82-91.
- Ceesay, S.M., Prentice, A.M., Cole, T.J., Foord, F., Weaver, L.T., Postkitt, E.M.E., y Whitehead, R.G. 1997. Effects on birth weight and perinatal mortality of maternal dietary supplements in rural Gambia: 5 year randomized controlled trial. *BMJ.* **315**: 786-790.
- Chance, B., Sies, H., y Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527-605.
- Chen, L.B. 1988. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**: 155-181.
- Cho, S., Hazama, M., Urata, Y., Goto, S., Horiuchi, S., y Sumikawa, K. 1999. Protective rol of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* **26**: 589-602.
- Cisneros, P.E. 2000. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **14**: 15-19.
- Cleeter M.W., Cooper J.M., y Schapira A.H. 2001. Nitric oxide enhances MPP+ inhibition of complex I. *FEBS Lett.* **504**: 50-52.
- De Boo, H., y Harding, J. 2006. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. Australian and New Zealand. *J. Obs. and Gynaec.* **46**: 4–14.
- Deleve L.D., y Kaplowitz N. 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics* **52**: 287-305.

- Deneke, S., y Fanburg, B. 1989. Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.* **257**: 163-73.
- Desai, M., Byrne, C.D., Zhang, J., Petry, C.J., Lucas, A., y Hales, C.N. 1997. Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rats dams fed a protein-restricted diet. *Am. J. Physiol.* **272**: 1083-1090.
- Desai, M., Crowther, N.J., Lucas, A., y Hales, C.N. 1996. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mother. *Br. J. Nutr.* **76**: 591-603.
- Desai, M., Crowther, N.J., Ozanne, S.E., Lucas, A., y Hales, C.N. 1995. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem. Soc. Trans.* **7**: 351-363.
- Desai, M., Hales, C.N. 1997. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **72**: 329-48.
- Drew, B., y Leeuwenburgh, C. 2002. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **959**: 66–81.
- Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**: 47-55.
- Duchen, M.R. 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* **25**: 365-451.
- Fall, C.H.D. 2005. Congreso Chileno de Nutrición. Medwave-XIV. No. 7.
- Fall, C.H.D., Stein, C.E., Kumaran, K., Cox, V., Osmond, C., Barker, D.J.P., y Hales, C.N. 1998. Size at birth, maternal weight, and type 2 diabetes in south India. *Diabetic Med.* **15**: 220-227.
- Fernández-Checa, J.C., y Kaplowitz, N. 2005. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and the role in disease and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**: 263-273.
- Flanagan, D.E., Moore, V.M., Godsland, I.F., Cockington, R.A., Robinson, J.S., y Phillips, I.W. 2000. Fetal growth and the physiological control of glucose tolerance

in adults: a minimal model analysis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**: 700-706.

Fowden, A.L., Forhead, A.J., Coan, P.M., y Burton, G.J. 2008. The placental and Intrauterine programming. *J. Neuroendocrinol.* **20**: 439-450.

Ghafourifar, P., y Richter, C. 1997. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* **418**: 291-296.

Gicquel, C., y Le Bouc, Y. 2006. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm. Res.* **3**: 28-33.

Godfrey, K.M., y Barker D.J.P. 2000. Fetal nutrition and adult disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 1344-52.

Gornal, A. G., Bardavill, C. J., David, M. M. (1949). *J. Biol. Chem.* **177**: 751-760.

Gosby, A.K., Maloney, C.A., Phuyal, J.C., Denyer, G.S., Bryson, J.M., y Caterson, I.D. 2003. Maternal protein restriction increases hepatic glycogen storage in young rats. *Pediatr. Res.* **54**: 413-418.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131 Abstract.

Griffith, O.W. 1999. Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad. Biol. Med.* **27**: 922-35.

Guyton, A.C., y Hall, J.E. 2001. Capítulo70. El hígado como órgano. Tratado de fisiología médica. Décima Edición. Edit. McGraw-Hill. 961-966.

Guzmán, G.A.M., Velázquez, G.A., y Sierra, V.M.P. 2006. Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* **14**: 227-232.

Hagopian, K., Harper, M.E., Ram, J.J., Humble, S.J., Weindruch, R. y Ramsey, J.J. 2004. Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**: E674-E684.

Hales, C.N. 1997. Metabolic consequences of intrauterine growth retardation. *Acta Paediatr. Suppl.* **423**: 184-187.

Hales, C.N., Desai, M., Ozanne, S.E., y Crowther, N.J. 1996. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 341-350.

Hales, C.N., Desai, M., y Ozanne, S.E. 1997. The thrifty phenotype hypothesis: how does it look after after 5 years?. *Diabetic Medicine.* **14**: 189-195.

Hansberg, T.W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje bioquímico. Vol. XXVI. 19-54.

Huang, C.G., y Fwu, M.L. 1993. Degree of protein deficiency affects the extent of the depression of the antioxidative enzyme activities and the enhancement of tissue lipid peroxidation in rats. *J. Nutr.* **123**: 803-810.

Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein R., y Buttemer, W.A. 2007. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiol Rev.* **87**: 1175-1213.

Ignarro, L. 2000. Capítulo 2. The chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides, del libro Nitric Oxide. Biology and Pathobiology. Academic Press. Pag. 23-40.

Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición - ENSANUT 2006. Resultados de Nutrición en el país. <http://www.insp.mx/ensanut/>

Jiménez-Guerra, S.D. 2003. Indicadores de desnutrición proteico-calórica. *Rev. Cub. Med. Int. Emerg.* **2**: 29-34.

Jones, D., Carlson, J.L., Mody, V.C., Cai, J., Lynn, M., y Sternberg, P. 2000. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Rad. Biol. Med.* **28**: 625-35.

Jones, D.P. 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**: 849-868.

Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., y Harrison, L.J. 2006. Edición 16. Principios de medicina interna. Capítulo IV Nutrición. Edit. McGraw-Hill. 447-482.

Kelly, D.P., y Scarpulla, R.C. 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* **15**: 357-368.

Knapen M, Zusterzeel P, Peters W, Steegers E. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **82**: 171-84.

Langley-Evans, S.C. 2001. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc. Nutr. Soc.* **60**: 505-513.

Lash, L.H. 2006. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem. Biol. Interact.* **163**: 54-67.

Lash, L.H., Putt, D.A., Hueni, S.E., Cao, W., Xu, F., Kulidjian, S.J., y Horwitz, J.P. 2002. Cellular energetics and glutathione status in NRK-52E cells: toxicological implications. *Biochem. Pharmacol.* **64**: 1533-1546.

Lebenthal, E., y Bier, M.D. 2007. Novel concepts in the developmental origins of adult health and disease. *J. Nutr.* **137**: 1073-1075.

Lederman, S.A., y Rosse, P. 1981. Food restriction and pregnancy on fetal and maternal weight and on body composition in rats. *J. Nutr.* **111**: 2162-71.

Lee, H.K., Park, K.S., Cho, Y.M., Lee, Y.Y., y Park, Y.K. 2005. Mitochondria-based model for fetal origin of adult disease and insulin resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1042**: 1-18.

Lucas, A. 1991. Programming by early nutrition in man. En: Bock, G.R., Whelan, J., eds. The childhood environment and adult disease. CIBA Foundation Symposium 156. Chichester: John Wiley and Sons. 38-55.

Luo, Z.C., Fraser, W.D., Julien, P., Deal, C.L., Audibert, G.N., Xiong, X. y Walker M. 2006. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: Programming by oxidative stress?. *Med. Hypothesis.* **66**: 38-44.

Lyons, J., Rauh-Pfeiffer, A., Ming-Yu, Y., Lu, X.M., Zurakowski, D., Curley, M., Collier, S., Duggan, C., Nurko, S., Thompson, J., Ajami, A., Borgonha, S., Young,

V.R., y Castillo, L. 2001. Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Crit. Care Med.* **29**: 870-7.

Lyons, J., Rauh-Pfeiffer, A., Yu, Y.M., Lu, X.M., Zurakowski, D., Tompkins, R.G., Ajami, A.M., Young, V.R., y Castillo, L. 2000. Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 5071-6.

Martínez, A.E., Sánchez, R.M.A., y Hafidi, B.E.M. 2005. Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica.* **30**: 82-89.

Martínez, V.L.E. 2008. Programación fetal de enfermedades expresadas en la etapa adulta. *Medicina Universitaria.* **10**: 108-13.

McClave, S.A., Mituraj, T.E., Thielmeie, K.A., Greenburg, R.A. 1992. Differentiating subtypes (hypoalbuminemics vs marasmic) of protein caloric malnutrition, incidence and clinical significance in a university hospital setting. *J.P.E.N.* **16**: 337-342.

Meister, A. 1995. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**: 35-42.

Mercado S.S., y Ruiz G.M.J. 2006. Biología del proceso de envejecimiento celular. *Radiobiología.* **6**: 131-135.

Mitchell, P. 1993. David Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. In Nobel Lectures in Chemistry 1971-1980 (ed. S. Forsén), pp. 295-332.

Monsalve, M., Borniquel, S., Valle, I., y Lamas, S. 2007. Mitochondrial dysfunction in human pathologies. *Frontiers in Bioscience.* **12**: 1131-1153.

Moreno, J.M.V., y Serra, D.J. 2001. Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿Algo más que una hipótesis? *Acta pediátrica española.* **59**: 573-581.

Myatt, L. 2006. Placental adaptive responses and fetal programming. *J. Physiol.* **572**: 25-30.

Myatt, L., y Cui, X. 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell Biol.* **122**: 369-82.

Nagaoka, Y., Iuchi Y., Ikeda Y., y Fujii J. 2004. Glutathione reductase is expressed at high levels in pancreatic islet cells. *Redox Report.* **9**: 321-324.

Nair, S., Singh, S.V., y Krishan, A. 1991. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry.* **12**: 336-342

Nuyt, A.M. 2008. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin. Sci.* **114**: 1–17.

Olson, R.E. 2005. Capítulo 133. Trastornos de la Nutrición y el Metabolismo. Alteraciones de la nutrición. Manual Merck de Información Médica. Edit. Oceano.

Onis, M., Frongilio, E.A., y Blössner M. 2001. ¿Está disminuyendo la malnutrición? Análisis de la evolución del nivel de malnutrición infantil desde 1980. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud.* **4**: 100-110.

Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2008. Comité de seguridad alimentaria mundial. 34° periodo de sesiones. Roma, 14-17 de Octubre de 2008. Evaluación de la seguridad alimentaria y situación de la nutrición a escala mundial.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. <http://www.who.int/features/factfiles/nutrition/facts/en/index.html>

Ozanne, S.E., y Hales, N.C. 1999. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Procc. Nutr. Soc.* **58**: 615-619.

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Ruiz, C., Prat, J., Bellmunt, M.J., y Barja, G. 1998. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J. Lipid Res.* **39**: 1989–1994.

Parra-Gámez, L., Téllez-Girón, J.R., y Escobar-Briones, C. 2003. La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo. *Rev. Fac. Med. UNAM.* **46**: 32-36.

Pérez-García, S.G., y Castañeda-Orellana, F. 2000. Criterios de McLaren en la desnutrición proteico-calórica. *Rev. Chil. Nutr.* **29**: 125-135.

Peterside, I.E., Selak, M.A., y Simmons, R.A. 2003. Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria of growth retarded rats alters glucose metabolism. *Am. J. Physiol.* **285**: 1258-1264.

Peuchant, E., Brun, J.L., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M.J., y Daniel, J.Y. 2004. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin. Biochem.* **37**: 293-298.

Phillips, D.I.W., Barker, D.J.P., Hales, C.N., Hirst, S., y Osmond, C. 1994. Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetol.* **37**: 150-154.

Phung, C. D., Ezieme, J. A., y Turrens, J. F. 1994. Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**: 479-482.

Racasan, S., Braam, B., Koomans, H.A., y Joles, J.A. 2005. Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted Barker phenomenon. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **288**: F626–F636.

Radi R., Beckman, J.S., Bush, K.M., y B.A. Freeman. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**: 4244-4250.

Radi R., Beckman, J.S., Bush, K.M., y B.A. Freeman. 1991a. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 481-487.

Radi, R. 2000. Peroxinitrito: una década de investigación sobre la bioquímica y biología celular de un intermediario citotóxico. *Actas de Fisiología.* **6**: 123-130.

Reid, M., Badaloo, A., Forrester, T., Morlese, J.F., Frazer, M., y Heird, W.C. 2000. In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in children with severe protein-energy malnutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**: 405-12.

Roberts, J.M., y Lain, K.Y. 2002. Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta.* **23**: 359-372.

Saavedra-Molina A., Calderón-Cortés, E., Sierra-Campos, E., Cortés-Rojo, C., Gaona-Zamudio, F.J., y Clemente-Guerrero, M. 2004. Papel patofisiológico del óxido nítrico mitocondrial. *Mensaje bioquímico*. Vol. XXVIII. 27-43

Saavedra-Molina and Devlin, T.M. 1997. Effect of extra- and intramitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids*. **12**: 293-298.

Sallout, B., y Walker, M. 2003. The fetal origins of adult diseases. *J. Obst. Gynecol.* **23**: 555-560.

Sarrasague, M.M., Barrado, D.A., Zubillaga, M., Hager, A., De Paoli, T., y Boccio, J. 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión: utilización de los isotopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **40**: 45-54.

Sastre, J., Pallardo, F.V., y Vina, J. 2000. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*. **49**: 427-435.

SEINAP. 2001. Repercusión de la nutrición y alimentación en la infancia y adolescencia en la patología del adulto. *Acta Pediatr. Esp.* **59**: 356-365.

Selak, M.A., Storey, B.T., Peterside, I.E., y Simmons, R.A. 2003. Impaired oxidative phosphorylation in skeletal muscle contributes to insulin resistance and hyperglycemia. *Am. J. Physiol.* **285**: 130-137.

Serrano, P.J., Casasnovas, J.A., y Ferreira, I.J. 2000. Impacto de las distintas estrategias en prevención cardiovascular. *Cardiovascular Risk Factors*. **9**: 250-257.

Sies, H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, H. Sies, Ed. London: Academic Press Inc. 1-7.

Sies, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem.* **25**: 1058-1071.

Simon, J.B. 2005. Capítulo 114. Biología del hígado y la vesícula biliar. Manual Merck de Información Médica. Edit. Oceano.

- Stuehr, D.J. 1997. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 339-359.
- Tomkins, C.C. 2007. Does fetal under-nutrition predispose disease in adult offspring? University of Alberta Heal. *Sci. J.* **4**: 16-20.
- Tuma, R. 2001. The two faces of oxygen. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **(1)**:oa5.
- Turrens, J.P. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**: 335-344.
- Valiente, D., Alfonso, C., Gilda, M., Molina, J., y González, V. 1999. Crecimiento y composición corporal de las crías de ratas sometidas a restricción alimentaria. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **18**: 104-10.
- Van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J.M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J.D., Quaschnig, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., y Lüscher, T.F. 2000. Enhanced Peroxynitrite Formation Is Associated with Vascular Aging. *J. Exp. Med.* **192**: 1731-1743.
- Vargas, F., Rivas, C., Nursamaa, A., y Zoltan, T. 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química.* **2**: 3-15.
- Vehaskari, V.M., y Woods, L.L. 2005. Prenatal programming of hypertension: lessons from experimental models. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**: 2545-2556.
- Velho, G., Hattersley, A.T., y Froguel, P. 2000. Maternal diabetes alters birth weight in glucokinase-deficient (MODY2) kindred but has no influence on adult weight, height, insulin secretion or insulin sensitivity. *Diabetol.* **43**:1060-1063.
- Viña, J., Viña, J. R., y Saez, G.T. 1986. Glutathione: metabolism and physiological functions. *Life Chem. Rep.* **4**: 1-35.
- Wang, Y., y Walsh, S.W. 1998. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta.* **19**: 581-586.
- Weindruch, R. 1996. Caloric restriction and aging. *Sci Am.* **274**: 46-52.

Widdowson, E.M., y McCance, R.A. 1974. The determinants of growth and form. *Proc. R. Soc. Lond.* **185**: 1-17.

Widdowson, E.M., y McCance, R.A. 1975. A review: new thoughts on growth. *Pediatr. Res.* **9**: 154-156.

Winick, M., y Noble, A. 1966. Cellular response in rats during maturation at various ages. *J. Nutr.* **89**: 300-306.

Wu, G., Bazer, F.W., Cudd, T.A., Meininger, C.J., y Spencer, T.E. 2004. Maternal nutrition and fetal development. *J. Nutr.* **134**: 2169-2172.