

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA SATURADA
SOBRE MARCADORES ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS Y
NO ENZIMÁTICOS EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

TANIA MARGARITA GONZÁLEZ VELÁZQUEZ

DIRIGIDA POR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA SATURADA
SOBRE MARCADORES ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS Y
NO ENZIMÁTICOS EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

TANIA MARGARITA GONZÁLEZ VELÁZQUEZ

DIRIGIDA POR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SINODALES

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

DIRECTOR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SINODAL

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

SINODAL

M. en C. HÉCTOR ALEJANDRO BARAJAS VEGA

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la obesidad.	3
II.2 Estilos de vida y su relación con la obesidad.	4
II.3 Enfermedades crónico-degenerativas infantiles.	6
II.4 Factores y/o patrones alimentarios que afectan la obesidad.	8
II.4.1 Alimentación gestacional.	8
II.4.2 Alimentación posnatal.	10
II.4.3 Recomendaciones y patrón de consumo infantil en México.	12
II.5 Estrés oxidativo y nitrosativo.	14
II.6 Sistemas de defensa antioxidante.	16
II.6.1 Mecanismos antioxidantes enzimáticos.	17
II.6.1.1 Catalasa (CAT).	17
II.6.1.2 Glutación peroxidasa (GPX).	18
II.6.1.3 Glutación reductasa (GR).	18
II.6.1.4 Glutación-S-transferasa (GST).	19
II.6.2 Mecanismos antioxidantes no enzimáticos.	20
II.6.2.1 Glutación reducido (GSH).	20
II.7 Influencia de la obesidad en el estado oxidativo.	20
II.7.1 Peroxidación lipídica.	23
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	26

Contenido	Página
IV.1 General.	26
IV.2 Específicos.	26
V. METODOLOGÍA	27
V.1 Materiales.	27
V.1.1 Biológico.	27
V.1.1.1 Animales.	27
V.1.2 Reactivos químicos.	27
V.2 Métodos.	28
V.2.1 Preparación de las dietas.	28
V.2.2 Tratamiento.	28
V.2.3 Determinaciones fisiológicas <i>in vivo</i> .	29
V.2.3.1 Determinación de glucosa en ayuno.	30
V.2.3.2 Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa.	30
V.2.4 Sacrificio de animales y obtención de muestras.	30
V.2.4.1 Orina.	31
V.2.4.2 Sangre.	31
V.2.5 Determinaciones bioquímicas séricas.	31
V.2.5.1 Perfil de lípidos.	31
V.2.5.2 Creatinina.	31
V.2.5.3 Insulina.	32
V.2.5.4 Proteína C reactiva.	32
V.2.6 Determinaciones bioquímicas en orina.	32
V.2.6.1 Proteína total.	32
V.2.6.2 Creatinina.	32
V.2.7 Preparación de homogenados citosólicos.	32
V.2.8 Cuantificación de proteínas en los homogenados citosólicos.	33

Contenido	Página
V.2.9 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH).	34
V.2.10 Determinación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST): CDNB.	34
V.2.11 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX).	35
V.2.12 Determinación de la actividad de catalasa (CAT).	36
V.2.13 Determinación de la concentración de malondialdehído (MDA).	37
V.2.14 Análisis estadístico.	39
VI. RESULTADOS	40
VI.1 Descripción general y parámetros bioquímicos de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa saturada y el grupo control.	40
VI.2 Concentración de glutatión reducido y actividad de enzimas antioxidantes en hígado de ratas Sprague-Dawley con una dieta alta en grasa saturada.	43
VI.2.1 Concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado.	43
VI.2.2 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado.	44
VI.2.3 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPX) en hígado.	46
VI.2.4 Actividad enzimática de catalasa (CAT) en hígado.	48
VI.3 Concentración de glutatión reducido, malondialdehído y actividad de enzimas antioxidantes en riñón de ratas Sprague-Dawley con una dieta alta en grasa saturada.	50
VI.3.1 Concentración de glutatión reducido (GSH) en riñón.	50
VI.3.2 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón.	51

Contenido	Página
VI.3.3 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPX) en riñón.	52
VI.3.4 Actividad enzimática de catalasa (CAT) en riñón.	53
VI.3.5 Concentración de malondialdehído (MDA) en riñón.	54
VII. DISCUSION	56
VIII. CONCLUSIONES	67
IX. BIBLIOGRAFÍA	68
X. ANEXOS	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Prevalencia de obesidad en niños de 5 a 11 años.	7
2	Prevalencia de sobrepeso y obesidad de 5 a 11 años.	7
3	Variables dietéticas de niños en edad escolar (9-12 años) de una escuela pública urbana en la Ciudad de México.	13
4	Porcentaje de nutrientes en el alimento del estudio <i>in vivo</i> .	29
5	Diseño experimental del estudio <i>in vivo</i> .	29
6	Mediciones generales a las doce semanas de inicio de la dieta alta en grasa saturada.	40
7	Determinaciones bioquímicas a las doce semanas de inicio de la dieta alta en grasa saturada.	42
8	Alteraciones renales a las doce semanas de inicio de la dieta alta en grasa saturada.	43
9	Efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la concentración de GSH y la actividad enzimática de GST, GPX y CAT en el hígado de ratas Sprague-Dawley.	49
10	Efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la concentración de GSH, MDA y la actividad enzimática de GST, GPX y CAT en el riñón de ratas Sprague-Dawley.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Las enzimas SOD y CAT protegen las células al eliminar el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.	17
2	La GPX elimina el peróxido de hidrógeno, así como los peróxidos de lípidos.	18
3	Concentración de GSH en el hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.	45
4	Actividad enzimática de GST en el hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.	46
5	Actividad enzimática de GPX en el hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.	47
6	Actividad enzimática de CAT en el hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.	48
7	Concentración de GSH en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.	50
8	Actividad enzimática de GST en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.	51
9	Actividad enzimática de GPX en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.	52

Figura		Página
10	Actividad enzimática de CAT en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.	53
11	Concentración de MDA en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.	54

RESUMEN.

La evidencia experimental, clínica y epidemiológica ha identificado al estrés oxidativo como factor importante en el desarrollo de complicaciones por la obesidad, por lo cual los antioxidantes han recibido mayor atención. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto *in vivo* de una dieta alta en grasa durante etapas tempranas de vida sobre biomarcadores antioxidantes, su relación con parámetros bioquímicos y daño renal. Se administraron croquetas molidas altas en grasa a ratas Sprague-Dawley de 4 semanas de edad como única fuente de alimento. Después de 12 semanas de tratamiento se observaron elevados niveles de proteína C reactiva, insulina y creatinina en suero y proteinuria; sin embargo, hubo disminución de la tasa de filtración glomerular, lo que pudiera asociarse a daño renal. Posteriormente, se determinó por espectrofotometría la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX), la concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado y riñón, así como de malondialdehído (MDA) y triglicéridos en riñón. Observándose que la actividad de GST en hígado y riñón disminuyó significativamente, así como la concentración de GSH en hígado respecto al grupo control. Las actividades de GPX y CAT en ambos órganos incrementaron significativamente, relacionándose con una remoción eficiente de productos de peroxidación lipídica como resultado de una mayor concentración de triglicéridos en riñón, obteniéndose valores similares de MDA. Estos resultados sugieren que una dieta alta en grasa saturada en niños desequilibra el estado antioxidante lo cual podría dar lugar al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas.

A mis padres MARGARITA y GILBERTO por confiar en mí, por estar conmigo en mis decisiones, aun en mis equivocaciones me han demostrado cuan tan grande es su amor, por enseñarme que el deseo para lograr los sueños es más fuerte que las limitaciones para alcanzarlos, porque gracias a ustedes, a su ejemplo, soy lo que soy ahora, gracias por ser la fuerza que me impulsa a seguir, gracias por su amor incondicional y gracias por confiar en mí, son lo más grande en mi vida, todo esto y lo que venga es por ustedes, ¡¡LOS AMO!!

AGRADECIMIENTOS.

A mis hermanos Mina, Gilberto y Valeria porque a su lado he descubierto la magia de vivir, por estar conmigo durante tantos años y soportándome en los momentos más difíciles de mi vida, por todo su apoyo que de una forma u otra me ayudaron a permanecer firme hasta el fin.

A Jerry, por ser un impulso constante en mi vida, porque sé que tu apoyo está siempre presente, por todas las palabras de ánimo en los momentos más difíciles, por tus consejos, por tu paciencia, por tu cariño y simplemente porque donde sea, cuando sea y como sea, pero que sea contigo.

A mis tías Alicia y Feli, por mostrar siempre interés en lo que estoy haciendo y por sus palabras de aliento que muy oportunas me ayudaron a no desistir.

A mis abuelitos Socorro⁺ y Juvenal⁺, por enseñarme el significado de lo que es el amor, porque gracias a ellos siempre recordé que todo tiene su tiempo y que aun en esos momentos en los que se desvanecen las fuerzas y las ilusiones se pierden, existe siempre una razón para seguir adelante.

A mis amigos: Pau, Zaira, Paquirri, Adriana y Cori por compartir conmigo momentos inolvidables y por mostrarme el lado bueno de los momentos difíciles, porque con su compañía la carrera fue más fácil de llevar.

A la Dra. Minerva por darme la oportunidad de colaborar en este proyecto, por permitirme trabajar con usted, por su confianza y por la amabilidad con que siempre me recibió.

Así como por ser mis sinodales a la Dra. Rosalía, la Dra. Loarca y al M. en C. Alejandro Barajas, por sus consejos, sus comentarios oportunos, aportaciones y palabras que me ayudaron a perseverar en concluir mi objetivo.

I. INTRODUCCIÓN.

La prevalencia de enfermedades crónicas está aumentando rápidamente en todo el mundo. Casi la mitad del total de muertes por enfermedades crónicas son atribuibles a las enfermedades cardiovasculares; la obesidad y la diabetes también están mostrando tendencias preocupantes, no sólo porque afectan ya a una gran parte de la población sino también porque han comenzado a aparecer en etapas más tempranas de la vida. Adicionalmente, dichas enfermedades producen alteraciones cardiovasculares.

Actualmente, tanto en los países industrializados como en los países en vías de desarrollo, en los que se observa el fenómeno de transición alimentaria, la incidencia de obesidad está alcanzando cifras alarmantes, hasta el punto que se ha convertido en un problema sanitario de primera magnitud. En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 muestra cifras alarmantes del aumento de la prevalencia de la obesidad en los últimos siete años, de un 42.5% en los hombres y de 37.4% en las mujeres; resultados que señalan la urgencia de aplicar medidas preventivas en este renglón.

Existen evidencias de que la obesidad en humanos provoca un estado de estrés oxidativo crónico, lo que a su vez está directamente relacionado con la inflamación. Múltiples estudios sugieren que el estrés oxidativo y la inflamación son los mecanismos biológicos mediante los cuales la obesidad contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas.

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre los radicales libres, las especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes en los tejidos. Los radicales libres se producen en el organismo como subproductos del metabolismo normal, como resultado de la dieta o condiciones fisiopatológicas como la obesidad, como resultado de la exposición a la radiación y algunos agentes contaminantes del medio ambiente. La susceptibilidad del cuerpo para liberar el daño mediado por los radicales se relaciona con el equilibrio entre la carga pro-oxidante y la adecuación

de la defensa antioxidante. La disminución de los daños podría ser factible mediante el aumento de la concentración de antioxidantes en los tejidos.

Los sistemas antioxidantes celulares están implicados en la protección de las macromoléculas biológicas esenciales, entre las que se encuentra el ADN. Los sistemas intracelulares antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), el ácido ascórbico, la vitamina E, el β -caroteno y las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), quinona reductasa (QR), glutatión reductasa (GR) y enzimas de reparación del ADN actúan evitando un estrés oxidativo asociado al declive general de las funciones celulares.

Las enfermedades crónicas son, en gran medida, enfermedades prevenibles bajo un estilo de vida saludable. Desde hace muchos años se sabe que la dieta tiene una importancia crucial como factor de riesgo de estas patologías. Los alimentos que consume la gente, en toda su variedad cultural, definen en gran medida la salud, el crecimiento y el desarrollo de las personas. Los comportamientos de riesgo, como el consumo de tabaco y la inactividad física, modifican el resultado para bien o para mal. Todo ello se inscribe en un ambiente social, cultural, político y económico que puede agravar la salud de las poblaciones a menos que se tomen medidas enérgicas para hacer que el ambiente sea favorable para la salud.

Existe poca información sobre los factores que influyen en el sistema de defensa antioxidante en los niños, aunque se piensa que los niveles basales son más bajos que en los adultos. Por lo tanto, la extensión de los conocimientos referentes a estrés oxidativo y la relación que guarda con la alimentación diaria a través de la evaluación del efecto sobre sistemas antioxidantes por una dieta con alto contenido de grasas saturadas en un modelo *in vivo* nos permitirá conocer el estado oxidante en etapas tempranas de la vida y su relación con la obesidad.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la obesidad.

La obesidad es un problema médico de creciente gravedad por su morbilidad y su alta e incrementada prevalencia. El sobrepeso y la obesidad en adultos y niños se ha transformado en un problema mundial de carácter epidemiológico que conlleva graves repercusiones en la salud, la calidad de vida de las personas, así como en los costos de la atención a la salud de las mismas (Bersh, 2006; Rodríguez, 2006).

La obesidad está asociada con problemas significativos de salud en la infancia y es un importante y temprano factor de riesgo en gran parte de la morbilidad y mortalidad del adulto. Las condiciones de salud asociadas con el exceso de peso incluyen un mayor riesgo de diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia, síndrome metabólico, aterosclerosis, enfermedades degenerativas conjuntas, apnea obstructiva del sueño, ciertos cánceres y enfermedades cardiovasculares (Rodríguez, 2006).

La relación entre la obesidad y el desarrollo de las condiciones patológicas relacionadas con esta patología no se ha entendido claramente; sin embargo, cada vez hay más pruebas que apoyan el papel de la inflamación como un posible enlace. A este respecto, numerosos estudios han evaluado el biomarcador inflamatorio proteína C reactiva (PCR), la cual es producida por los hepatocitos como respuesta a un incremento en el nivel de citocinas proinflamatorias producidas por células del sistema inmune durante la infección, o bien, por los adipocitos en la obesidad. Dichos estudios han encontrado una asociación entre categorías de peso corporal cada vez mayor y el aumento de concentraciones de PCR. Los niveles elevados de PCR se han asociado con mayor inflamación en las arterias coronarias y, por lo tanto, un marcador de mayor riesgo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (Nguyen y col., 2009).

Las enfermedades crónicas se han convertido en las principales causas de morbilidad y mortalidad en México, destacan por su magnitud la diabetes mellitus

tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Dichas enfermedades tienen efectos en la salud y la sobrevivencia durante etapas productivas en la vida, contribuyendo de manera importante al proceso de la enfermedad (Rivera, 2007).

II.2 Estilos de vida y su relación con la obesidad.

La obesidad resulta de un desequilibrio entre el aporte calórico de la ingesta y el gasto energético, modulado por el metabolismo y el nivel de actividad física. Su etiología es multifactorial y su tratamiento debe ser multidisciplinario e incluir elementos educativos, nutricionales, asistencia médica y abordaje psicológico y conductual (Bersh, 2006).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad y el sobrepeso como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El índice de masa corporal (IMC) (peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros) es usado como una referencia simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos, tanto a nivel individual como poblacional. El IMC es la herramienta más útil, sencilla, económica y reproducible para conocer el estado nutricional de una persona, pues la forma de calcularlo no varía en función del sexo ni de la edad en la población adulta. La OMS define el sobrepeso como un IMC igual o superior a 25 kg/m^2 , y la obesidad como un IMC igual o superior a 30 kg/m^2 (SSA, 1998).

A lo largo de la historia evolutiva de la raza humana, los recurrentes períodos de escasez de alimentos han seleccionado sujetos con una propensión a incrementar su reserva lipídica, en nuestra sociedad actual se vive una situación de abundancia que ha conducido a un desequilibrio en el balance energético. El incremento en la prevalencia de obesidad, se debe principalmente al sedentarismo, a la disminución del gasto energético y a un elevado consumo energético, tendencia que se ha observado en la mayoría de los países desarrollados, incluso subdesarrollados (Vizmanos y col., 2006).

Las modificaciones en los factores ambientales de la población durante el siglo XX han contribuido al cambio del patrón alimentario en la sociedad, al generar cambios de comportamiento en la determinación de la elección del tipo de alimentos que se decide o no consumir. La incorporación de la mujer al mundo laboral, las limitaciones de tiempo para desplazarse y cocinar, el incremento de la oferta de alimentos precocidos (industrializados) y una mayor cantidad de opciones de consumo fuera de casa, son algunos de los factores que han contribuido a modificar los patrones alimentarios. Como consecuencia de ello, se ha observado una intensa introducción de las cadenas de comida rápida y occidental; así, los hábitos alimenticios adquiridos con las características de la comida rápida parecen ser un marcador de la creciente prevalencia de la obesidad. El mecanismo involucrado es, probablemente, que el suministro de alimentos se caracteriza por el tamaño grande de las porciones con una alta densidad de energía provocada en parte por un alto contenido de grasa en dichos alimentos y las bebidas refrescantes, carbonatadas y no carbonatadas ricas en azúcar, las cuales han triplicado su tamaño en los últimos 50 años. Lo anterior aunado a un menor consumo de frutas, verduras, cereales y sobre todo de leche en etapas tempranas de la vida persistiendo hasta la vida adulta (Vizmanos y col., 2006; Astrup y col., 2008).

Uno de los factores de riesgo que contribuyen a la génesis de la obesidad infantil es el uso de los medios de comunicación electrónicos, los cuales fomentan el sedentarismo y el consumo de comida rápida con campañas publicitarias que incluyen a los personajes preferidos de los mismos, trayendo como consecuencia el aumento de la ingesta hipercalórica. La actividad fundamentalmente sedentaria del tiempo libre, con una gran disponibilidad de entretenimientos como la televisión, los videos y los videojuegos, aunado al creciente proceso de urbanización que ha reducido las posibilidades de gastar calorías en número significativo, ha traído como consecuencia un decremento en la frecuencia y duración de las actividades físicas cotidianas de los niños, tales como caminar a la escuela y hacer los quehaceres del hogar. En la población mexicana se estimó que por cada hora de

televisión se incrementa en un 12% el riesgo de obesidad en niños de 9 a 16 años, en los cuales se encontró que dedican en promedio 4.1 ± 2.2 horas/día a ver televisión o jugar videojuegos (Islas y Peguero, 2006; Rodríguez, 2006; Arroyo, 2008).

Conjuntamente, la comida rápida de las principales cadenas en la mayoría de los países contiene niveles inaceptablemente altos de ácidos grasos trans que ejercen efectos biológicos adversos, y contribuyen a la diabetes tipo 2 y enfermedad arterial coronaria. Nueva evidencia también sugiere que una alta ingesta de grasas trans puede provocar obesidad abdominal, un factor importante en el síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular (Astrup y col., 2008).

Todo esto se ha traducido en una falta de adecuación en el consumo de nutrimentos de acuerdo a las recomendaciones propuestas por la Secretaría de Salud de México, que se evidencia por muy bajos porcentajes de la población que cumplen las recomendaciones, mientras que elevados porcentajes las exceden o no las alcanzan (Vizmanos y col., 2006).

II.3 Enfermedades crónico-degenerativas infantiles.

La obesidad en niños y adolescentes es un problema de salud pública alrededor del mundo. Datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006) reportan que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México es de 26% para niños entre los 5 y 11 años de edad, y alcanza 32% en adolescentes. Se encontró que el incremento más alarmante fue en la prevalencia de obesidad en los niños (77%) comparado con las niñas (47%) como se indica en el Cuadro 1. Además, el incremento de su prevalencia entre 1999 y 2006 fue de 1.1 puntos porcentuales por año, o de 39.7% de la prevalencia reportada en la Encuesta Nacional de Nutrición 1999, es decir, el sobrepeso y obesidad en este grupo aumentó casi 40% en tan sólo siete años (Cuadro 2) (INSP, 2006; Bonvecchio y col., 2007; Romero y Vásquez, 2008).

Cuadro 1. Prevalencia de obesidad en niños de 5 a 11 años (INSP, 2006).

Obesidad en niños de 5 a 11 años	1999	2006	Incremento 1999 a 2006
Prevalencia nacional en niños	5.3%	9.4%	77%
Prevalencia nacional en niñas	5.9%	8.7%	47%

Cuadro 2. Prevalencia de sobrepeso y obesidad de 5 a 11 años (INSP, 2006).

Obesidad en niños de 5 a 11 años	1999	2006	Incremento 1999 a 2006
Prevalencia nacional	18.6%	26.0%	39.7%

La obesidad, en la niñez y la adolescencia, ha pasado de ser una enfermedad rara a una epidemia emergente, con consecuencias adversas en etapas posteriores de la vida. Es importante reconocer que la obesidad en niños y adolescentes no es un problema estético únicamente, sino que se asocia a la presencia de alteraciones físicas, metabólicas y psicosociales que afectan el estado de salud de los niños que la padecen (Gómez y col., 2008; Romero y Vásquez, 2008).

La obesidad en niños y adolescentes trae como consecuencia la presencia de estados fisiopatológicos que afectan la salud cardiovascular (hipercolesterolemia, dislipidemia e hipertensión), el sistema endócrino (hiperinsulinismo, resistencia insulínica, alteraciones de tolerancia a la glucosa, diabetes mellitus tipo 2 e irregularidad menstrual), y la salud mental (depresión y baja autoestima). El estrés psicológico por la estigmatización social impuesta a los niños obesos puede ser más peligroso que las morbilidades médicas (Rodríguez, 2006).

Uno de los problemas considerados de mayor importancia es el que se relaciona con el desarrollo de factores de riesgo cardiovascular desde etapas tempranas de la vida, ya que actualmente se considera a la enfermedad cardiovascular aterosclerótica como la primera causa de muerte en adultos y se sabe que los procesos patológicos y los factores de riesgo asociados a su presencia inician en la niñez, incluyendo las alteraciones anatómicas, metabólicas, el desarrollo de

sobrepeso y obesidad y estilos de vida inadecuados como el sedentarismo, tabaquismo, y malos hábitos alimentarios. A este respecto, la acumulación excesiva de tejido adiposo tiene un papel central en el síndrome de resistencia a la insulina que incluye la presencia de hiperinsulinemia, hipertensión, dislipidemia, alteraciones en el metabolismo de la glucosa y, por tanto, incremento del riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Romero y Vásquez, 2008).

II.4 Factores y/o patrones alimentarios que afectan la obesidad.

Durante el desarrollo fetal, el tipo de alimentación de la mujer gestante juega un rol fundamental en el adecuado crecimiento. Sin embargo, cuando esta condición no es la adecuada puede conducir a un bajo o elevado peso al nacer. Ambas condiciones se han asociado con mayor prevalencia de obesidad abdominal, dislipemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 o insulino resistencia en la vida adulta. Lo que demuestra que los hábitos alimenticios personales y familiares, así como el uso de la comida condicionan la génesis de dichas enfermedades y la obesidad (Cabello y Zúñiga, 2007; Regidor y col., 2007).

Una asociación causal entre la obesidad y una amplia gama de enfermedades ha sido bien documentada. Sin embargo, hallazgos recientes sugieren un papel etiológico más complicado que una simple asociación de peso-enfermedad (Egger y Dixon, 2008).

II.4.1 Alimentación gestacional.

La prevención de la obesidad se inicia con el seguimiento cuidadoso de la mujer embarazada y con una adecuada orientación a la familia sobre hábitos alimentarios saludables (Islas y Peguero, 2006).

Las investigaciones recientes sugieren que varias de las principales enfermedades de la edad avanzada, incluyendo la enfermedad coronaria, cambios en el

metabolismo del colesterol, el desarrollo renal, la hipertensión y la diabetes tipo 2, se originan por problemas en el crecimiento y desarrollo intrauterino. Estas enfermedades pueden ser consecuencia de la llamada "programación fetal", mediante la cual un estímulo o lesión en un período crítico, sensible de la vida temprana, tiene efectos permanentes sobre la estructura, fisiología y el metabolismo del individuo. Los primeros estudios epidemiológicos que apuntaban a los efectos a largo plazo de un ambiente intrauterino adverso se basaron en el seguimiento de hombres y mujeres en la vida media y tardía, de los cuales se registraron su peso y talla al nacer. La evidencia de que la hipertensión, la enfermedad coronaria y la diabetes están programadas proviene de estudios longitudinales realizados en 25,000 hombres y mujeres del Reino Unido, en los cuales se relacionó la talla al nacer con la ocurrencia de la enfermedad en la edad madura. Las personas que fueron pequeños o desproporcionados (delgados o bajos) al nacer tenían altos índices de enfermedades coronarias, presión arterial alta, concentraciones elevadas de colesterol y metabolismo anormal de glucosa-insulina. Sin embargo, estas relaciones son independientes de la duración de la gestación, lo que sugiere que las enfermedades cardiovasculares están relacionadas con la restricción del crecimiento fetal en lugar de un parto prematuro. La replicación de los resultados del Reino Unido ha dado lugar a una amplia aceptación de la hipótesis de que las bajas tasas de crecimiento fetal están asociadas con enfermedad cardiovascular en la edad adulta (Godfrey y Barker, 2000).

Los estudios experimentales en animales han documentado numerosos ejemplos de la programación fetal. Investigaciones científicas recientes han demostrado que las alteraciones en la nutrición materna pueden tener efectos relevantes a largo plazo sobre los hijos en lo que respecta a enfermedades cardiovasculares. Langley y Jackson (1994) realizaron un estudio basado en una dieta baja en proteínas a ratas preñadas y los resultados indican un aumento permanente de la presión arterial en los hijos. Las ratas cuyas madres habían sido alimentadas con una dieta con baja proporción de proteína durante el embarazo mostraron un equilibrio

alterado permanentemente entre la producción hepática de glucosa y su utilización; el grupo control de ratas alimentadas con la misma dieta durante la vida postnatal no tenía alteraciones en el metabolismo de la glucosa hepática.

El hallazgo de que las variaciones en el tamaño normal del feto al nacer tienen implicaciones para la salud durante toda la vida, ha llevado a una reevaluación de la regulación del crecimiento y desarrollo del feto. Aunque el genoma del feto determina el potencial de crecimiento en el útero, el peso de la evidencia sugiere que desempeña un papel subordinado en la determinación del crecimiento que lleva realmente a cabo. Lo anterior sugiere que el determinante dominante del crecimiento fetal es el medio nutricional y hormonal en el que el feto se desarrolla, y, en particular, el suministro de oxígeno y nutrientes. Los experimentos con animales han sugerido que la desnutrición fetal en la gestación temprana produce crías pequeñas pero con proporciones normales, mientras que la desnutrición en la gestación tardía puede tener efectos importantes en las proporciones del cuerpo, pero poco efecto sobre el peso al nacer (Godfrey y Barker, 2000).

Se ha sugerido la existencia de periodos críticos durante el desarrollo fetal de forma que las exposiciones socioeconómicas y de conductas de riesgo para la salud en estos periodos determinan el nivel de salud en el futuro. Por el contrario, también se ha formulado la hipótesis de que las exposiciones que aumentan el riesgo de enfermedad pueden ir acumulándose a lo largo de la vida e interactuar entre sí hasta que finalmente originan daño a la salud. Según esta hipótesis, conforme el número y/o la duración de las exposiciones aumenta, se produce un daño biológico acumulativo (Regidor y col., 2007).

II.4.2 Alimentación posnatal.

Los primeros dos años de la vida representan un periodo de desafío especial para la nutrición y salud de los niños porque su tasa metabólica relativamente elevada y la rápida velocidad de crecimiento imponen requerimientos nutrimentales relativamente mayores. Además, la inmadurez del tracto gastrointestinal, de la

coordinación neuromuscular y de la función inmunológica del lactante limita los tipos de alimentos que es capaz de consumir y lo expone a un riesgo elevado de infección transmitida a través de los alimentos y a alergias alimentarias (Vásquez y Romero, 2008a).

Durante el primer año de vida, se presenta el primer brote de crecimiento acelerado que resulta en un cambio constante de los requerimientos energéticos y de nutrimentos en este grupo de edad. La OMS recomienda en la actualidad que "todo lactante debe ser alimentado exclusivamente del pecho materno durante los primeros seis meses de edad". Posteriormente, "los lactantes deben recibir alimentos complementarios adecuados y seguros mientras continúa la alimentación al pecho materno hasta los dos años de edad". De este alimento materno, el lactante recibe la energía y nutrimentos que necesita para crecer y desarrollarse, mecanismos de protección contra alergias e infecciones (Vásquez y Romero, 2008a; OMS, 2010).

Hay evidencias convincentes de que la alimentación al pecho materno durante los primeros meses de la vida, se asocia a menor riesgo de obesidad, niveles más bajos de presión arterial y concentraciones menores de colesterol. Lo anterior representa un ejemplo de la llamada "programación temprana", en la cual el metabolismo de los lípidos en lactantes está condicionado, desde etapas tempranas de la vida, a manejar grandes cantidades de colesterol suministrado inicialmente por la leche humana (Vásquez y Romero, 2008a).

Durante el primer año de vida, el lactante inicia la formación de hábitos y preferencias alimentarias que van a afectar la salud y nutrición futuras. Por ello, la alimentación complementaria adecuada tiene un papel formativo, porque promueve hábitos de alimentación saludables. El período desde los 24 meses de edad hasta la pubertad se caracteriza por un crecimiento físico lento. El patrón de crecimiento en los niños varía individualmente; de los dos años de edad a la pubertad incrementan en promedio de 2 a 3 kg de peso y crecen 5 a 8 cm de estatura por año. Como la velocidad de crecimiento disminuye durante la etapa de preescolar, el

apetito es menor y la ingestión de alimentos parece irregular o impredecible (Regidor y col., 2007; Vásquez y Romero, 2008b).

Durante el período de los 8 a 11 años, los niños varían en peso, forma corporal y velocidad de crecimiento, las amistades y personas fuera de la familia pueden influir en sus actitudes y en su selección de alimentos, lo cual puede tener un efecto favorable o desfavorable en el estado de nutrición del escolar. Las demandas de energía y nutrimentos son mayores entre los 11 y los 14 años, período del pico del crecimiento y gradualmente van disminuyendo hasta llegar a los 18 años. Los requerimientos nutrimentales durante la pubertad se incrementan para sobrellevar el crecimiento y el desarrollo acelerados de esta etapa. La alimentación durante este período de crecimiento debe aportar la cantidad de energía, macro y micro nutrimentos necesarios para el crecimiento y el desarrollo, así como para sentar y consolidar los hábitos alimenticios saludables a lo largo de la vida. Los requerimientos nutrimentales se han estimado de estudios longitudinales y se basan en las ingestiones recomendadas (Rodríguez, 2006; Vásquez y Romero, 2008b).

II.4.3 Recomendaciones y patrón de consumo infantil en México.

Perichart y colaboradores (2007) llevaron a cabo una caracterización del estado nutricional de 561 niños de 6 a 12 años de edad en una escuela pública urbana en la Ciudad de México, de los cuales 49.7% eran niñas y 50.3% eran niños. En este estudio se encontró que la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 27.1% y 21.4%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre el peso de niños y niñas, pero sí se observó que la prevalencia de sobrepeso y obesidad incrementa significativamente con la edad. Por lo anterior, se realizó un segundo grupo conformado por niños de 9 a 12 años (n=88) a los cuales se les evaluó el consumo de alimentos de dos días, uno que cubría el fin de semana y otro en un día laborable. El promedio del consumo de nutrientes en los dos días se presenta

en el Cuadro 3, así como la ingesta diaria recomendada (IDR) en México de los diferentes nutrientes para ese grupo de edad en México (IOM, 2010).

Cuadro 3. Variables dietéticas de niños en edad escolar (9-12 años) de una escuela pública urbana en la Ciudad de México (Perichart y col., 2007; IOM, 2010).

Variable	Total de niños (n=88)
Edad	10.12 ± 0.89
IMC	21.42 ± 3.77
Peso (kg)	43.30 ± 10.94
Energía (kcal/d)	1,853
Carbohidratos (g/d)	231.68
Grasas (g/d)	70.07
Proteínas (g/d)	74.50

El consumo promedio de la energía de la dieta fue 1,853 kcal/día, lo que correspondió al 90% del IDR de energía total. La ingesta de azúcar fue excesiva (90.56 g/día), lo que representa 18.31% del consumo total de energía. De la misma forma, se observó una ingesta excesiva de proteínas (232.18% IDR) e hidratos de carbono (188.81% IDR). La ingesta media de lípidos fue de 70.07 g/día, lo que representó 34.3% del aporte energético diario. A este respecto, el consumo de grasas saturadas estaba levemente elevado (10.70% de la ingesta total de energía); mientras que el consumo de grasa monoinsaturada (9.83% del consumo total de energía) y grasas poliinsaturadas (4.32% del consumo total de energía) fue adecuado para este grupo de edad (Perichart y col., 2007).

Los niños tienen un rápido aumento de su porcentaje de grasa corporal, el cual se ve reflejado en su IMC durante el primer año de vida; después de 9 a 12 meses de edad, el IMC disminuye hasta alcanzar un punto de mínima reserva de grasa corporal. Este punto en el crecimiento de los niños se ha denominado rebote de adiposidad y, generalmente, ocurre entre los 5 y los 7 años de edad. A partir de allí, el individuo empieza a reacumular grasa, proceso que continúa a lo largo de la

pubertad y de la edad adulta. Esta reacumulación de grasa se refleja en un aumento considerable del IMC. La edad en la que ocurre el rebote de adiposidad en el escolar es crítica para el desarrollo posterior de obesidad; la aparición de un rebote de adiposidad temprano (edad más temprana en la que se alcanza el mínimo IMC en un niño de acuerdo con su edad), se asocia con un IMC más elevado en la adolescencia y al inicio de la edad adulta (Whitaker, 1998; Williams, 2005).

La edad preescolar y escolar son períodos críticos para transmitir actitudes familiares y culturales, prácticas y creencias sobre la comida y la alimentación, el desarrollo de preferencias alimentarias, regulación de ingestión de energía y prevención de sobrepeso (Vásquez y Romero, 2008b).

II.5 Estrés oxidativo y nitrosativo.

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la supervivencia de los seres humanos y, en general, de todos los organismos aeróbicos. Sin embargo, en el proceso natural de oxidación y de respiración, el cuerpo humano produce especies reactivas de oxígeno (EROs), especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y radicales libres. Estas moléculas pueden causar daños a las proteínas, a los lípidos y al ADN, pero generalmente son removidas por sistemas de reparación de daño oxidativo y nitrosativo, sustancias llamadas antioxidantes y sistemas de enzimas antioxidantes antes de que puedan atacar a las células, por lo que continuar con una dieta adecuada promueve esta reparación (Chen y Ping, 2008; Novo y Parola, 2008).

Los radicales libres son especies químicas que tienen electrones no apareados, los cuales buscan otros electrones para aparearse. Así, los radicales libres son en general reactivos y atacan a otras moléculas. Las EROs incluyen al radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), al radical hidroxilo (OH^{\bullet}), al oxígeno (O_2), al hipoclorito (HOCL) y al no radical peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Del mismo modo, las especies reactivas derivadas del nitrógeno son conocidas como ERNs y sus principales precursores

son el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (ONOO⁻) (Papass, 1998; Ortega y col., 2010).

Varias enfermedades humanas tienen una fuerte asociación con el daño oxidativo y nitrosativo en los tejidos causado por una inadecuada protección contra las EROs, como en el cáncer, enfermedades cardíacas, la diabetes, la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento. No obstante, estas EROs se producen continuamente en todas las células como un soporte para las funciones celulares normales y, en condiciones fisiológicas normales, aproximadamente un 0.1% a 5% de oxígeno que entra en la cadena de transporte de electrones se reduce a superóxido (Kowluru y Chan, 2007; Chen y Ping, 2008).

Sin embargo, cuando aumenta la concentración y superan los mecanismos antioxidantes fisiológicos, se convierten en tóxicas. A este fenómeno se le denomina estrés oxidativo, es decir, la falta de balance entre la formación y la eliminación de las EROs, favoreciéndose la primera, beneficiando la oxidación (Papass, 1998; Al-Gubory y col., 2004; Álvarez y col., 2007).

Existen evidencias epidemiológicas que sustentan el papel patogénico de las EROs en procesos biológicos. Los principales antecedentes surgen de estudios que muestran la correlación entre la incidencia de enfermedades inflamatorias y degenerativas y las bajas concentraciones de antioxidantes en la sangre. La relación entre la presencia de algunas enfermedades, como las cardiovasculares y el cáncer, entre otras, se puede establecer con la elevación de marcadores de daño oxidativo y disminución de los niveles plasmáticos de antioxidantes, los que pueden ser modificados al aumentar la ingesta de antioxidantes (Avello y Suwalsky, 2006).

El desorden metabólico, ocasionado por el consumo no adecuado de nutrimentos, así como diversos factores ambientales y físicos, incrementa en los individuos el estrés oxidativo. Recientemente se han descubierto en algunos alimentos otros antioxidantes no nutrientes, como los compuestos fenólicos y algunos pigmentos como la clorofilina. Algunas fuentes de éstos son los frijoles (isoflavonas), cítricos (flavonoides), cebolla (quercetina) y polifenoles (aceitunas). También se han encontrado algunos antioxidantes fenólicos en el café, vino tinto y té. Por esta

razón, la forma de suplir adecuada y continuamente los antioxidantes para proteger al organismo del efecto oxidativo producido por el exceso de radicales libres es el consumo de alimentos ricos en vitaminas E y C, carotenoides y otras sustancias que tienen función antioxidante, tales como los compuestos fenólicos (Avello y Suwalsky, 2006; Mendoza, 2009).

De la misma forma, bajos niveles de ERNS se producen continuamente en las células de mamíferos y desempeñan funciones fisiológicas importantes. Estas incluyen procesos tan diversos como la expresión de genes, la proliferación y sobrevivencia celular, la remoción de patógenos por el sistema inmune, y la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Sin embargo, cuando la cantidad de ERNs excede la capacidad antioxidante de la maquinaria, el resultado es un estrés nitrosativo que puede inducir daños irreversibles en todas las macromoléculas celulares, incluyendo el ADN. Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis redox es crítico para la función celular y la supervivencia, y su alteración está implicada en la fisiopatología de muchas enfermedades humanas, tales como las enfermedades cardiovasculares, diabetes, artritis reumatoide y los trastornos neurológicos (por ejemplo, el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson), o el cáncer (Ortega y col., 2010).

II.6 Sistemas de defensa antioxidante.

Los antioxidantes pueden ser tanto endógenos como exógenos. En general, los antioxidantes son compuestos fuertemente reductores que contrarrestan la tendencia de un metabolito a oxidarse a una especie potencialmente tóxica o perjudicial. En general, estos compuestos protegen a las células contra los efectos nocivos de las EROs (Mathews y col., 2002; Wang y col., 2007).

Los organismos aeróbicos son protegidos del estrés oxidativo inducido por los radicales libres y las EROs por una serie de sistemas de defensa. Dichos sistemas de defensa contra el exceso de producción de EROs han evolucionado en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, protegiendo así a los organismos contra

daños oxidantes. Sin embargo, diferentes factores externos y el envejecimiento disminuye la capacidad de tales sistemas, resultando eventualmente en perturbaciones del equilibrio redox (Papas, 1998; Benitez, 2008).

La ingestión de antioxidantes exógenos a través de una dieta rica en frutas y hortalizas también puede ayudar a neutralizar estas EROs y, por consiguiente, disminuir la prevalencia de algunas enfermedades. Por esta razón, durante la última década, se ha observado un aumento en el consumo de alimentos ricos en antioxidantes, como las frutas y hortalizas. No obstante, en personas obesas se ha observado un mínimo y en ocasiones nulo consumo de estos alimentos (Álvarez y col., 2007).

II.6.1 Mecanismos antioxidantes enzimáticos.

Los sistemas enzimáticos incluyen la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y las enzimas implicadas en el ciclo de glutatión: glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST), entre otras enzimas (Mathews y col., 2002; Nistala y col., 2008).

II.6.1.1 Catalasa (CAT).

La catalasa (CAT) elimina el peróxido de hidrógeno originado por la SOD al catalizar la conversión de superóxido en H_2O_2 (Figura 1).

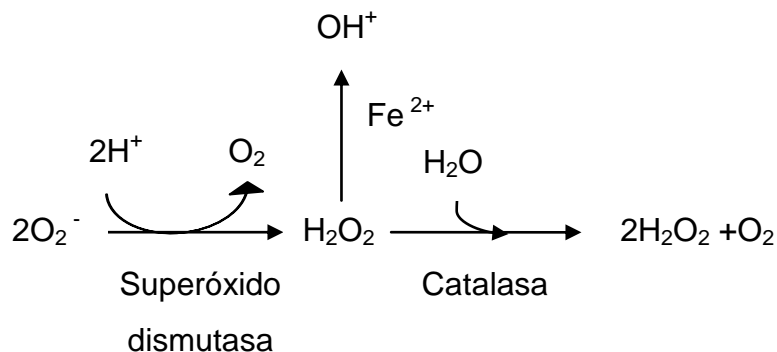


Figura 1. Las enzimas SOD y CAT protegen las células al eliminar el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Devlin, 2004).

La CAT es una enzima que está presente a concentraciones elevadas en los peroxisomas, descomponiendo el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La CAT junto con la GPX conforman el principal sistema enzimático de remoción de moléculas de H_2O_2 ; a altas concentraciones del mismo, la CAT se vuelve primordial en su remoción (Devlin, 2004; Albarrán, 2007).

II.6.1.2 Glutación peroxidasa (GPX).

La glutatión peroxidasa (GPX), la principal peroxidasa en los mamíferos presente en cantidades significativas en el citoplasma, cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O a través de la oxidación de GSH dando como resultado GSSG (Figura 2). A diferencia de la CAT, ésta actúa a bajas concentraciones de H_2O_2 . Además, la GPX cataliza la degradación de los peróxidos lipídicos (LPO) y puede biotransformar los hidroperóxidos lipídicos a ácidos grasos hidroxilados menos reactivos evitando así el daño ocasionado por la reacción en cadena en las membranas celulares y sus funciones (Al-Gubory y col., 2004; Albarrán, 2007).

II.6.1.3 Glutación reductasa (GR).

La glutatión reductasa (GR) es un componente importante del mecanismo celular de defensa antioxidante. Esta enzima cataliza la reducción de la forma oxidada de glutatión (GSSG) a GSH, empleando NADPH como cofactor (Figura 2).

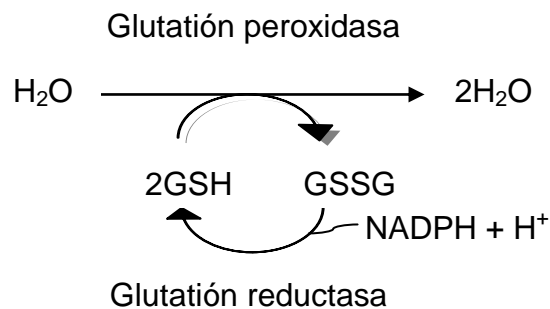


Figura 2. La GPX elimina el peróxido de hidrógeno, así como los peróxidos de lípidos (Devlin, 2004).

Por lo tanto, la GR es esencial para el ciclo del GSH, ya que mantiene los niveles adecuados de GSH. La capacidad de GPX para reducir H_2O_2 u otros peróxidos depende de la actividad de GR (Al-Gubory y col., 2004).

II.6.1.4 Glutación-S-transferasa (GST).

Las glutación-S-transferasas (GST) son una familia de isoenzimas citoplasmáticas que desempeñan un papel importante en la desintoxicación de metabolitos reactivos, catalizando la conjugación con GSH. Las GST están involucradas en el transporte intracelular de compuestos y su entrega a los sitios para la transformación posterior y/o la excreción (Al-Gubory y col., 2004).

Los sustratos exógenos para GST incluyen medicamentos, productos intermedios industriales, plaguicidas, herbicidas, contaminantes ambientales y sustancias cancerígenas. La conjugación de los compuestos exógenos con GSH casi siempre conduce a la formación de productos menos reactivos que se excretan fácilmente. En algunos casos, sin embargo, el conjugado de glutación es más reactivo que el compuesto original.

Tres grandes familias de proteínas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza presentes en las células de mamíferos exhiben actividad GST. Dos de ellas, las GST citosólicas y mitocondriales, comprenden enzimas solubles. La tercera familia incluye la GST microsomal, las cuales se conocen ahora como las proteínas asociadas a la membrana. Las GST citosólicas representan la mayor familia de transferasas y la actividad que realizan es exclusiva de este grupo de enzimas. Las tres familias contienen miembros que catalizan la conjugación de GSH con el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) y exhiben la actividad de glutación peroxidasa con hidroperóxido de cumeno.

Es importante reconocer que las enzimas GST son parte de una estrategia integrada de defensa y su efectividad depende de la acción combinada del glutamato cisteína ligasa y glutación sintasa para abastecer el GSH. Sin embargo, la sobreexpresión de GST en células tumorales de mamíferos se ha relacionado

con resistencia a los agentes contra el cáncer y diversos carcinógenos químicos. Además, los niveles elevados de GST se han asociado con la tolerancia selectiva de los insecticidas y herbicidas (Hayes y col., 2005).

II.6.2 Mecanismos antioxidantes no enzimáticos.

II.6.2.1 Glutación reducido (GSH).

El GSH es el antioxidante no enzimático más relevante a nivel celular, su función no es eliminar directamente las EROs, sino mantener el equilibrio redox y participar en las reacciones enzimáticas antioxidantes proporcionando los reductores equivalentes como se indica en la Figura 2. El GSH actúa a través de tres reacciones: 1) reacciones de conjugación, 2) oxidación, y 3) degradación (Salvadó, 2005).

El GSH es un tripéptido que, a diferencia de las vitaminas, puede sintetizarse intracelularmente a través de varios pasos enzimáticos; es un compuesto metabólicamente importante, por ello la concentración de GSH en los tejidos está muy regulada, por tanto, el agotamiento o el exceso de GSH en el cuerpo se presenta particularmente bajo ciertas condiciones fisiopatológicas (Papas, 1998).

En general, el incremento de los niveles de GSH protege a los organismos frente a condiciones tóxicas, tales como la formación de peróxidos de ácidos grasos derivados de la oxidación lipídica, radiación ionizante, agentes alquilantes, u otros intermediarios reactivos (Devlin, 2004; Rios, 2006).

II.7 Influencia de la obesidad en el estado oxidativo.

El estrés oxidativo se identifica comúnmente en muchas enfermedades relacionadas con la obesidad y podría ser el mecanismo subyacente del inicio y progresión de estas enfermedades. Se ha considerado que el estrés oxidativo juega un papel en la dieta para el deterioro de la salud. Las dietas altas en grasa

incrementan la cantidad de sustrato disponible para la oxidación y el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial mediante la optimización de la producción de radicales libres. En sistemas celulares, la peroxidación de lípidos es de gran importancia principalmente en biomembranas donde la mayoría de las enzimas activadoras de oxígeno están presentes. Por tanto, se sugiere que esta peroxidación de lípidos está fuertemente asociada con el envejecimiento y la carcinogénesis, entre otras enfermedades degenerativas (Rosales, 2005; Catalá y col., 2008; Gletsu y col., 2009).

Diversos estudios muestran que la obesidad perturba las defensas antioxidantes en los tejidos. Olusi (2002) evaluó la actividad de las enzimas SOD y GPX en plasma sanguíneo de cincuenta voluntarios adultos sanos con IMC saludable y 250 pacientes con diferentes grados de obesidad, sin antecedentes de tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedad renal, hepática o cáncer. Los sujetos con IMC saludable tuvieron una actividad significativamente mayor tanto de SOD como GPX en comparación únicamente con los sujetos con obesidad mórbida ($> 40 \text{ kg/m}^2$), el cual representa un valor muy elevado ya que la OMS define al sobrepeso como un IMC igual o superior a 25 kg/m^2 y la obesidad como un IMC igual o superior a 30 kg/m^2 . Por lo cual, la actividad de SOD y GPX se asocia negativamente con el IMC. Por otro lado, Aaseth y Stoa (2000) analizaron el plasma sanguíneo de diez pacientes con sobrepeso y diabetes tipo 2 no controlada y 13 controles sanos con peso normal en un rango de 40 a 60 años de edad. El nivel intracelular de GSH en los glóbulos rojos de los pacientes diabéticos se redujo al 60% respecto al grupo control. Rodrigo y colaboradores (2007) evaluaron la asociación de la presión sanguínea en parámetros relacionados con el estrés oxidativo en hombres hipertensos y normotensos con un rango de 35 a 60 años de edad, encontrando que los niveles de GSH en eritrocitos fueron menores en los hipertensos (29%) respecto a los controles (normotensos).

En lo que respecta a estudios en animales, Kaul y colaboradores (1995) llevaron a cabo un estudio con ratas diabéticas inducidas con una sola inyección de estreptozotocina (65 mg/kg). A las 4 semanas, los corazones de los animales

diabéticos mostraron una disminución de las actividades enzimáticas de SOD (50%) y GPX (60%). Asimismo, Strother y colaboradores (2001) compararon la actividad de CAT, GPX, GR y SOD, así como los niveles de GSH en hígado y riñón de ratas Sprague-Dawley diabéticas inducidas con estreptozotocina. A los 30 días de experimentación, se encontró que los niveles hepáticos de la actividad de CAT disminuyeron de forma significativa en comparación al control. Los niveles hepáticos y renales de GSH se redujeron de forma significativa en comparación al control. Sin embargo, se observó un aumento de la actividad de GPX en el hígado, aumento de la actividad de SOD en los riñones, aumento de la CAT renal y disminución de la actividad renal de GR.

Es importante también añadir que la insuficiencia de las defensas antioxidantes probablemente se inicia y se mantiene con una baja ingesta de antioxidantes en la dieta y fitoquímicos que poseen capacidad antioxidante. Las personas obesas tienen una menor ingesta de alimentos ricos en fitoquímicos (frutas, verduras, granos enteros, legumbres, vino, aceite de oliva, semillas y nueces) con respecto a personas no obesas. Por ello, los niveles de antioxidantes adquiridos a través de la dieta están inversamente relacionados con el grado de adiposidad, debido a esto, las personas obesas presentan un "déficit de antioxidantes" como resultado del pobre consumo de antioxidantes por lo que no pueden evitar o controlar el inicio de ciertas enfermedades (Vincent y col., 2007).

La protección proporcionada por la actividad de las enzimas antioxidantes también puede ser inadecuada en la obesidad. En las primeras etapas de desarrollo de la obesidad, puede haber un incremento inicial de las enzimas antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo, mientras que la obesidad crónica agota las fuentes de enzimas antioxidantes con el tiempo, es decir, la magnitud de la adiposidad también afecta a las actividades enzimáticas. No obstante, diversos estudios han sugerido que las dietas elevadas en grasas crónicamente no incrementan la concentración de las enzimas antioxidantes para contrarrestar el aumento de la producción de radicales libres, y de hecho pueden suprimirlas. La severidad de la obesidad es también una correlación inversa con las actividades específicas de las

enzimas antioxidantes, entre ellas la SOD y GPX (Greathouse y col., 2005; Vincent y col., 2007; Gletsu y col., 2009).

En la vida temprana, incluso durante la gestación, la grasa corporal se deposita en tejidos como los vasos en forma de estrías grasas. Las deficiencias nutricionales, tales como los antioxidantes y alimentos ricos en fitoquímicos, que pueden ocurrir durante los primeros años de vida pueden dar lugar a un estrés oxidativo inicial. Durante toda la infancia, la elección de alimentos pobres en antioxidantes y el incremento de los depósitos de grasa del cuerpo contribuyen a niveles excesivos de leptina, disfunción endotelial y deterioro de la homeostasis de la glucosa, todos ellos mecanismos importantes para la producción de EROs. Dado que el ejercicio regular mejora las defensas antioxidantes en niños, el comportamiento sedentario probablemente contribuye a niveles inadecuados de antioxidantes en tejidos como las enzimas (SOD, GPX) en la obesidad. En la adultez joven y la edad adulta, las perturbaciones sistémicas asociadas con la obesidad son agravadas. La inflamación, el colesterol, los triglicéridos elevados, el exceso de la producción de hormonas y la insensibilidad a la insulina aumentan con la obesidad. Estos cambios sistémicos, combinados con la pobre ingesta de antioxidantes y una actividad física inadecuada en un período de años, probablemente agravan el estrés oxidativo y aceleran la manifestación clínica de enfermedades relacionadas con la obesidad como la diabetes mellitus, hipertensión, artritis y enfermedades del corazón. El estrés oxidativo también empeora con la edad. Por lo tanto, se debe hacer hincapié en la prevención del estrés oxidativo temprano en la vida para evitar aparición de la enfermedad en el futuro. La exposición prolongada al estrés oxidativo provoca en el organismo una serie de padecimientos, que con el tiempo permiten el desarrollo de enfermedades, como la diabetes (Vincent y col., 2007; Mendoza, 2009).

II.7.1 Peroxidación lipídica.

La peroxidación de lípidos es la reacción biológica en cadena de radicales más estudiada, ya que se ha establecido como un importante mecanismo de lesión

celular en muchos sistemas biológicos de origen vegetal y animal. El mecanismo implica un proceso en el que los lípidos no saturados se oxidan para formar otras especies radicales, así como subproductos tóxicos que pueden ser perjudiciales para el sistema. Así, los lípidos poliinsaturados son especialmente susceptibles a este tipo de daño en un ambiente oxidante y pueden reaccionar para formar peróxidos lipídicos. Estos últimos son inestables y sufren una descomposición adicional para formar una compleja serie de compuestos, como lo son los peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados que reaccionan para formar malondialdehído (MDA). El MDA se puede encontrar en la mayoría de las muestras biológicas incluyendo los productos alimenticios, suero, plasma, tejidos y orina, como resultado de la peroxidación lipídica, y se ha convertido en uno de los analitos de referencia con el fin de estimar los efectos del estrés oxidativo sobre los lípidos (Halliwell y Chirico, 1993).

Con base en lo expuesto anteriormente, es evidente que una dieta alta en grasas tiene un efecto negativo en la salud de las personas que la consumen, el cual se reflejada en la actividad de las enzimas antioxidantes. Tomando en cuenta la alta prevalencia de obesidad en niños que existe hoy en día en nuestro país, en el presente estudio se evaluó el efecto inducido por una dieta con un alto contenido de grasas saturadas sobre biomarcadores antioxidantes en hígado y riñón de ratas Sprague-Dawley jóvenes, ya que en el hígado se lleva a cabo el metabolismo de la glucosa y lípidos, además de ser el órgano que cuenta con una mayor concentración de enzimas antioxidantes; mientras que el riñón es un órgano blanco de las complicaciones de la diabetes, ya que los niveles de glucosa en sangre exceden la capacidad del riñón para filtrar y reabsorberla, por ello, la insuficiencia renal es una de las principales complicaciones de la diabetes.

III. HIPÓTESIS.

Una dieta alta en grasa saturada incrementa el metabolismo generando un estrés oxidativo que altera los sistemas antioxidantes, modificando así los niveles de biomarcadores antioxidantes enzimáticos (CAT, GPX y GST) y no enzimáticos como GSH y malondialdehído en un modelo *in vivo*.

IV. OBJETIVOS.

IV.1 General.

Evaluar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre biomarcadores antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en el hígado y riñón de ratas macho Sprague-Dawley.

IV.2 Específicos.

- Determinar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) en hígado y riñón de ratas macho Sprague-Dawley.
- Determinar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre los niveles de malondialdehído (MDA) en el riñón de ratas macho Sprague-Dawley.
- Determinar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la actividad antioxidante de catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX) en hígado y riñón de ratas macho Sprague-Dawley.
- Comparar el efecto diferencial de una dieta alta en grasa saturada sobre los biomarcadores antioxidantes en hígado y riñón de ratas macho Sprague-Dawley.

V. METODOLOGÍA.

V.1 Materiales.

V.1.1 Biológico.

V.1.1.1 Animales.

Se emplearon ratas macho Sprague-Dawley recién destetadas de aproximadamente cuatro semanas de edad con un peso promedio de 30–50 g, las cuales fueron adquiridas del bioterio del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) campus Juriquilla, Querétaro, Querétaro.

V.1.2 Reactivos químicos.

Los reactivos para las determinaciones enzimáticas tales como ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB), 1-cloro,-2,4-dinitrobenceno (CDNB), L-glutación reducido (GSH) 99%, glutación reductasa (GR), hidroxicumeno, nicotín-adenín-difosfato reducido (NADPH), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cloruro de potasio, sacarosa ultra pura y Tritón X-100 fueron de la marca Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Los siguientes solventes y reactivos para las determinaciones enzimáticas como metanol, ácido tricloro-acético (TCA), ácido tiobarbitúrico (TBA), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de potasio (KCl), ácido etilén diamino tetra acético (EDTA), etanol 100%, fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), Tris hidrocioruro ultrapuro (TRIS-HCl) y TRIS base ultrapuro fueron de la marca J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

Tiras reactivas AccuChek[®] de la marca comercial ROCHE[®] para la determinación de glucosa.

El kit enzimático para determinar el perfil de lípidos fue de la marca RANDOX[®] (Antrim, Reino Unido).

El Rat/Mouse Insulin ELISA kit para la determinación de la insulina por medio del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas fue de la marca Millipore[®].

El kit Creatinina por método colorimétrico para la determinación de Creatinina fue de la marca RANDOX[®] (Antrim, Reino Unido).

El Rat C Reactive Protein (CRP) ELISA Kit para la determinación de la Proteína C Reactiva mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) fue de la marca Millipore[®].

El kit para la cuantificación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA) fue de la marca Pierce, Inc (Rockford, IL, EUA).

V.2 Métodos.

V.2.1 Preparación de las dietas.

Los grupos fueron tratados considerando el consumo de grasas saturadas en los niños obesos mexicanos y el consumo recomendado (control) (Cuadro 3). Las croquetas NIH-31 (Zeigler BROS, INC) se molieron en un molino pulvex y se ajustaron sus nutrientes para los animales del grupo alto en grasa con manteca de cerdo y manteca de coco para lograr la composición nutrimental indicada en el Cuadro 4.

V.2.2 Tratamiento.

Se utilizaron 26 ratas macho Sprague-Dawley con un peso promedio de 30 – 50 g. Las ratas se alojaron en cajas de plástico y se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10\%$), ciclos día/noche de 12/12 horas y temperatura adecuada (23 ± 2 °C) y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Después de una semana de aclimatación, los animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos

como se muestra en el Cuadro 5. Se evaluó el nivel de consumo de alimento, de grasa saturada y el peso corporal de los animales a lo largo de todo el estudio.

Cuadro 4. Porcentaje de nutrientes en el alimento del estudio *in vivo*.

Nutriente	Tipo de Dieta	
	Control	Alta en grasa
Energía (kcal/g)	3.07	4.23
Proteínas	22 %	19 %
Carbohidratos	66 %	42 %
Grasa total, de la cual:	12 %	39 %
De la cual:		
Saturada	4 %	23.70 %
Poliinsaturada	4 %	7.20 %
Monoinsaturada	4 %	8.10 %

Cuadro 5. Diseño experimental del estudio *in vivo*.

Grupo	No. de animales	Dieta
1	11	Control
2	15	Alta en grasa saturada

V.2.3 Determinaciones fisiológicas *in vivo*.

Durante la semana 12 de alimentación se determinó glucosa en ayuno y se realizó una curva de tolerancia a la glucosa para determinar la capacidad de uso de glucosa de los animales, para observar así el efecto de la alimentación sobre el desarrollo de alteraciones en el metabolismo de glucosa.

V.2.3.1 Determinación de glucosa en ayuno.

Las ratas se sometieron a un periodo de ayuno de mínimo 8 horas, y posteriormente se les tomó una muestra de sangre extraída de la vena caudal localizada en la cola de las ratas, la cual se colocó en una tira reactiva AccuChek® de la marca ROCHE®, y se analizó en un glucómetro de la misma marca, el cual tiene un rango de sensibilidad de 10 a 600 mg/dL de glucosa.

V.2.3.2 Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa

Posterior a la glucosa en ayuno, las ratas recibieron por vía intragástrica una solución de dextrosa (3 g/kg de peso corporal), y se cuantificaron los niveles plasmáticos de glucosa a los tiempos 0, 30, 60 y 120 minutos. Para la medición de las concentraciones de glucosa se utilizaron tiras reactivas AccuChek® de la marca ROCHE®, y un glucómetro de la misma marca. La primera medición de glucosa (tiempo 0) se realizó posterior a las 8 horas de ayuno, mientras que las concentraciones de los siguientes tiempos se determinaron a los minutos indicados tras la carga intragástrica de dextrosa.

V.2.4 Sacrificio de animales y obtención de órganos.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo a las 12 semanas después de iniciada la dieta, los cuales permanecieron en ayuno entre 8 y 12 horas, tiempo en el que se recolectó una muestra de orina. Se utilizó una cámara de sacrificio con éter etílico para anestesiarse a los animales y posteriormente se hizo una incisión vertical desde el tórax hasta el ano, separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales. Primeramente se extrajo la sangre y a continuación se extrajeron el hígado y ambos riñones, estos últimos se lavaron con solución fisiológica estéril fría, se llevó a cabo el corte de la vena porta para asegurar la

muerte clínica. Las muestras obtenidas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C para su análisis posterior.

V.2.4.1 Orina

Se recolectó orina de 12 horas durante el lapso de tiempo en que los animales permanecieron en ayuno previo a la recolección de muestras. La orina se filtró y se almacenó en tubos estériles de 15 mL en congelación a -20°C hasta el momento de la realización de las pruebas correspondientes.

V.2.4.2 Sangre

Una vez anestesiado el animal, se realizó una punción cardiaca para la extracción de 10 mL de sangre en un tubo BD vacutainer® serum. Posteriormente, la muestra se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm para la obtención del suero, el cual se colocó en varias alícuotas de 500 µL cada una y se congelaron a -20° hasta el día de las determinaciones bioquímicas.

V.2.5 Determinaciones bioquímicas séricas

V.2.5.1 Perfil de lípidos

La cuantificación de los niveles séricos de colesterol total, triglicéridos, lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL), se llevo a cabo mediante kits enzimáticos de la marca RANDOX® (Antrim, Reino Unido).

V.2.5.2 Creatinina

Se determinó la concentración sérica de creatinina, por medio de un método colorimétrico utilizando creatinina de la marca RANDOX® (Antrim, Reino Unido).

V.2.5.3 Insulina

La determinación de las concentraciones séricas de insulina se realizó por medio del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), con el Rat/Mouse Insulin ELISA kit de la marca Millipore®.

V.2.5.4 Proteína C reactiva

La cuantificación y detección de proteína C reactiva se realizó mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), utilizando el kit Rat C Reactive Protein (CRP) ELISA de la marca Millipore®.

V.2.6 Determinaciones bioquímicas en orina

V.2.6.1 Proteína total

Para la determinación de la proteína total en orina, se utilizó el método colorimétrico de Lowry y colaboradores (1951) obteniendo las concentraciones de proteína en mg/dL.

V.2.6.2 Creatinina

Se determinó la concentración de creatinina en orina por medio de un método colorimétrico utilizando el kit Creatinina de la marca RANDOX® (Antrim, Reino Unido).

V.2.7 Preparación de homogenados citosólicos.

Para las determinaciones de GSH y GST en los homogenados citosólicos de hígado y riñón, se pesaron 0.3 g de órgano en un tubo cónico, se añadieron 4 mL

de solución amortiguadora Tris/Sacarosa (Anexo 1) y se homogenizaron con la ayuda de un polytrón (Kinematica, Suiza). Los homogenados se centrifugaron a 8000 g durante 20 min a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania). Se recuperó el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur y se transfirió a la celda de la ultracentrífuga Beckman Optima L90K (Beckman, EUA). Los tubos se ultracentrifugaron a 4 °C con una velocidad 100,000 g durante 1 hora. El sobrenadante o citosol se transfirió a tubos eppendorf y se almacenó a -70 °C hasta su análisis. Durante todo el procedimiento los tubos y las soluciones se mantuvieron a 4 °C en hielo.

Para la determinación de GPX y CAT en los homogenados citosólicos de hígado y riñón, se pesaron 0.3 g de órgano en un tubo cónico, se añadieron 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (Anexo 2), que contenía EDTA 0.5 mM, Tritón 0.5% y etanol 0.01 mL/mL, posteriormente se homogenizaron con un polytrón (Kinematica, Suiza). Los homogenados se centrifugaron a 8000 g durante 15 min a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania). El sobrenadante se colocó en tubos eppendorf y se almacenó a - 70 °C hasta su análisis. Todo el tiempo los tubos y las soluciones se mantuvieron a 4 °C.

V.2.8 Cuantificación de proteínas en los homogenados citosólicos.

La cuantificación de proteínas de los homogenados citosólicos se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA), empleando albúmina bovina como estándar. Se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.5 (Anexo 3). Posteriormente, se colocaron 50 µL del citosol diluido en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra). Se agregaron 250 µL de la solución de trabajo para la determinación de proteína (Anexo 4) en cada pozo. La placa se incubó 30 min a 37 °C. Finalmente, las muestras se leyeron en un lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a una longitud de onda de 562 nm. Los resultados se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1.

V.2.9 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH).

Los niveles de GSH en las muestras se expresaron en μM extrapolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración realizada previamente. Los resultados se expresan en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína considerando el factor de dilución. Para la realización de la curva estándar de GSH, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: Solución amortiguadora TRIS 0.2 M, EDTA 0.02 M pH 8.2, TRIS-EDTA (Anexo 5), solución de trabajo inicial para la curva estándar de GSH (Anexo 6), metanol y solución de DTNB 2.46 mM (Anexo 7). La reacción se inició con la adición de este último reactivo y se incubó por 5 min. Las muestras se leyeron inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 412 nm a 25 °C en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Para las muestras se utilizaron citosoles concentrados, a los cuales se les precipitó previamente la proteína con el siguiente procedimiento: En un tubo eppendorf se adicionaron 120 μL de agua destilada, 150 μL de citosol concentrado y 30 μL de TCA al 20% (Anexo 8), a continuación se dejaron reposar por 30 min a 4 °C y luego se centrifugaron a 8000 g por 5 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo eppendorf. De este nuevo tubo se tomaron 50 μL para colocarse en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra). Se agregaron además 150 μL de solución amortiguadora TRIS-EDTA, 80 μL de metanol y 20 μL de DTNB, se incubaron 5 min y se leyeron inmediatamente con las mismas condiciones utilizadas en la curva estándar. La concentración de GSH se determinó por el método de Ellman (1959), basado en la habilidad del grupo SH para reducir ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB) a ácido 5-thio-2-nitrobenzoico (TNB).

V.2.10 Determinación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST): CDNB.

Este método se basa en la reacción catalizada por esta enzima entre GSH y el sustrato CDNB (1-cloro,-2,4-dinitrobenzono), el cual tiene un amplio intervalo para

detectar las diferentes isoenzimas. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de CDNB-GSH conjugado por minuto (Habig y col., 1974).

De las diluciones de los homogenados citosólicos empleadas para la cuantificación de proteínas, se colocaron 50 μ L en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra). Se agregaron 100 μ L de la solución de trabajo de GSH 3 mM (Anexo 9) y en seguida se adicionaron 150 μ L de la solución de trabajo CDNB de 2 mM (Anexo 10) en cada pozo, evitando la formación de burbujas. La formación del conjugado CDNB-GSH por la enzima de GST se monitoreó inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C en un periodo de 2 min de reacción en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), obteniéndose lecturas cada 20 segundos. Los resultados se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1. La actividad de GST se expresó en nmol de producto formado por mg de proteína por minuto, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{nmol}}{(\text{mg})(\text{min})} = \frac{\Delta (\text{abs min 2} - \text{abs min 1})}{(\text{mg de proteína})(0.0096)}$$

Donde:

abs min 2: es la absorbancia de la muestra a 340 nm en el min 2 de reacción.

abs min 1: es la absorbancia a 340 nm en el min 1 de reacción.

mg proteína: mg de proteína de la muestra considerando el factor de dilución.

0.0096: es el coeficiente de extinción de CDNB ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

V.2.11 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX).

La actividad de GPX se midió por el método de Plagia y Valentine (1976), el cual se basa en la oxidación de GSH a glutatión oxidado (GSSG) catalizado por GPX, completando el ciclo convirtiendo GSSG a GSH utilizando glutatión reductasa y NADPH. Para esta determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente

orden: se colocaron en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra) 100 μL de solución amortiguadora de reacción (Anexo 11), 50 μL cocktail de GSH/GR (42 mM GSH, 10 unidades/mL de GR) (Anexo 12), 50 μL muestra y 50 μL NADPH (Anexo 13). Justo antes de realizar la lectura, se adicionaron 50 μL de hidroxicumeno 1 mM (Anexo 14) y se mezclaron bien. Las muestras se leyeron inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C, con una frecuencia de mediciones cada 9 segundos por un tiempo de corrida de 2 min en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Nota: No deben transcurrir más de 10 segundos entre la adición de hidroxicumeno y la lectura de la muestra en el espectrofotómetro.

La actividad de GPX (unidades/mL) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{nmol}}{\text{(mg) (min)}} = \frac{[(\text{Pendiente de la muestra}) - (\text{Pendiente del blanco de reacción})]}{(0.02018) \text{ (mg de proteína)}}$$

Donde:

0.02018: es el coeficiente de absortividad molar del NADPH ($\text{nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

mg proteína: mg de proteína de la muestra considerando el factor de dilución.

V.2.12 Determinación de la actividad de catalasa (CAT).

La actividad de CAT se midió por el método de Aebi (1984). Se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo 2). Se ajustó la concentración de peróxido de hidrógeno 30 mM (Anexo 15) realizando una lectura de la absorbancia a 240 nm en el espectrofotómetro UV-Vis modelo Lambda 40 (Perkin Elmer) y se calculó la concentración con la siguiente fórmula:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] \text{ mM} = A_{240} / 0.0436$$

Donde:

A_{240} : es la absorbancia del peróxido H_2O_2 30 mM a 240 nm.

0.0436: es el coeficiente de extinción del H_2O_2 ($\mu M^{-1} cm^{-1}$).

Para esta determinación las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en una celda de cuarzo 1700 μL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo 2), 300 μL del citosol diluido y 1000 μL de H_2O_2 30 mM (Anexo 15). Las muestras se leyeron inmediatamente en el espectrofotómetro UV-Vis modelo Lambda 40 (Perkin Elmer), ya que la reacción comenzó al agregarse el H_2O_2 , y se monitoreó el decremento en la absorbancia con una frecuencia de mediciones cada 5 segundos por un tiempo de corrida de 30 segundos basados en la velocidad de descomposición del H_2O_2 a 240 nm a 25 °C.

Nota: Los citosoles deben ser analizados dentro de 5 a 10 min después de su dilución.

La actividad de CAT se calculó usando la siguiente fórmula:

$$[\text{Actividad Enzimática}] = \frac{(\Delta \text{abs}/\text{min}) (\text{Volumen total}) (\text{Factor de dilución})}{(\text{volumen muestra}) (\text{min}) (0.0436)}$$

Donde:

Volumen total (mL): 3 mL

Volumen muestra (mL): 0.30 mL.

min: 0.5 min

0.0436: es el coeficiente de extinción del H_2O_2 ($\mu M^{-1} cm^{-1}$).

Los resultados se expresaron en U/mg de proteína.

V.2.13 Determinación de la concentración de malondialdehído (MDA).

Este método se basa en el empleo del malondialdehído (MDA) como un marcador de daño oxidativo de lípidos mediante la determinación de su concentración, la cual varía dependiendo del tipo de estrés al que se sometan las células. Este marcador

es cuantificado mediante el ensayo de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Qui y col., 2010).

Se pesaron 100 mg de tejido, se añadió 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 (Anexo 16) con KCl al 1.17% (Anexo 17) y se homogenizó con la ayuda de un polytrón (Kinematica, Suiza). Los homogenados se centrifugaron a 8000 g durante 5 min a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania). Se separó la fracción nuclear que se encontraba en el pellet, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 10 500 g durante 20 min a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania). Se recuperó el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur y se transfirieron 850 µL a un tubo eppendorf, se le agregaron 150 µL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4, 1 mL de TBA al 0.67% (Anexo 18) y 1 mL de TCA al 10% (Anexo 19), se agitó el tubo y se puso a ebullición durante 20 min. Se colocaron los tubos en hielo y se agregaron 2.5 mL de butanol y se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 min a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania). Se recuperó el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur y las muestras se leyeron por espectrofotometría a una longitud de onda de 532 nm a 25 °C en el espectrofotómetro UV-Vis modelo Lambda 40 (Perkin Elmer). Todo el tiempo de análisis los tubos y las soluciones se mantuvieron a 4 °C.

La concentración de MDA se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{nmol}}{\text{mg de tejido}} = \frac{(\text{Abs}) (1 \times 10^9) (0.0025)}{(1.56 \times 10^5) (0.5)(\text{mg de tejido})}$$

Donde:

Abs: absorbancia de la muestra a 532 nm.

0.0025: Volumen final del butanol (L)

1.56×10^5 : es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$).

0.5: tamaño de la celda del espectro.

mg de tejido: mg de tejido usados para la preparación de la muestra.

V.2.14 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (EE) y se evaluaron estadísticamente mediante un análisis con la prueba t de Student para la determinación de las diferencias entre dos medias muestrales. Se empleó un nivel de significancia de $P < 0.05$. Los análisis se realizaron en el programa estadístico Sigma Stat versión 2.0 (1992-1997).

VI. RESULTADOS.

VI.1 Descripción general y parámetros bioquímicos de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa saturada y el grupo control.

Se observó una menor ingesta de alimento en el grupo de animales con una dieta alta en grasa saturada con un consumo equivalente al 23.70% de la ingesta energética total, comparada con el grupo control los cuales presentaron una ingesta de 4%. Los animales alimentados con la dieta alta en grasa saturada tuvieron un consumo energético mayor (17%) en comparación con los del grupo control, no obstante, las ratas que recibieron la dieta alta en grasa saturada consumieron 15% menos alimento en comparación con las del grupo control durante las 12 semanas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Mediciones generales a las doce semanas de inicio de la dieta alta en grasa saturada.

Parámetro	Dieta	
	Control	Alta en grasa saturada
Peso corporal (g)	362.00 ± 8.50	394.90 ± 8.80 *
Incremento de peso corporal (g)	306.33 ± 9.96	331.20 ± 9.46 *
Consumo de alimento (g)	1596.00 ± 38.97	1355.70 ± 29.10 *
Consumo de grasa saturada (g)	21.77 ± 0.53	178.55 ± 3.84 *
Consumo de energía (kcal)	4899.17 ± 119.41	5739.10 ± 123.31 *
Tejido adiposo visceral (g)	3.71 ± 0.05	10.67 ± 0.80

* Indica diferencia estadística significativa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student (P < 0.001). El cuadro muestra la media de los experimentos ± error estándar (EE) de cada grupo.

El efecto de la dieta sobre la ganancia de peso fue muy similar en ambos grupos hasta la semana 9, mostrando a partir de esta semana un ligero incremento de peso en las ratas con dieta alta en grasa saturada, llegando a tener un peso significativamente mayor (8%) en la semana 12 comparado con el grupo control (394.90 ± 8.80 y 362.00 ± 8.50 g, respectivamente).

Con respecto al nivel de almacenamiento de tejido adiposo visceral, este fue mayor, aunque no significativo, en las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa saturada con respecto a las del grupo control. Los valores se presentan en el Cuadro 6.

Con respecto a las determinaciones bioquímicas, en el perfil lipídico no se observaron diferencias estadísticas significativas del grupo alto en grasa saturada con respecto al grupo control en las concentraciones de colesterol total (82.50 ± 3.60 y 76.70 ± 3.10 mg/dL, respectivamente), lipoproteína de alta densidad (HDL) (54.00 ± 3.60 y 47.90 ± 2.30 mg/dL, respectivamente) y de baja densidad (LDL) (19.80 ± 4.60 y 17.50 ± 4.60 mg/dL, respectivamente); sin embargo, las concentraciones de triglicéridos disminuyeron significativamente con respecto al grupo control (43.70 ± 6.90 y 55.80 ± 5.50 mg/dL, respectivamente). Las concentraciones de glucosa en ayuno fueron similares entre las ratas que recibieron una alimentación alta en grasa saturada y las que recibieron una alimentación normal sin mostrar diferencia estadística significativa. La curva de tolerancia a la glucosa muestra que los niveles de glucosa de las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa saturada no presentan alteraciones estadísticamente significativas a los tiempos 0 y 30 minutos con respecto al grupo control; sin embargo, a los 120 minutos las concentraciones fueron significativamente diferentes entre los grupos de estudio. Los valores se presentan en el Cuadro 7.

Se observó un incremento estadísticamente significativo del grupo con dieta alta en grasa saturada en las concentraciones plasmáticas de proteína C reactiva, insulina y creatinina en plasma con respecto al grupo control. Los valores se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Determinaciones bioquímicas a las doce semanas de inicio de la dieta alta en grasa saturada.

Parámetro	Dieta	
	Control	Alta en grasa saturada
Glucosa en ayuno	71.33 ± 3.16 mg/dL	70.20 ± 1.97 mg/dL
Curva de tolerancia a la glucosa:		
0 min	82.50 ± 3.45 mg/dL	79.20 ± 3.12 mg/dL
30 min	123.50 ± 6.72 mg/dL	118.00 ± 5.25 mg/dL
120 min	94.50 ± 3.20 mg/dL	116.90 ± 6.02 mg/dL *
Proteína C Reactiva	793.52 ± 23.48 µg/mL	999.80 ± 57.03 µg/mL *
Insulina	18.18 ± 1.04 µU/mL	32.18 ± 4.57 µU/mL *
Creatinina en suero	0.98 ± 0.14 mg/dL	1.93 ± 0.13 mg/dL *

* Indica diferencia estadística significativa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student (P < 0.001). El cuadro muestra la media de los experimentos ± error estándar (EE) de cada grupo.

El balance oxidante-antioxidante ha sido estudiado ampliamente en los trastornos del sistema renal. Existe un gran número de investigaciones que avalan la importancia de conocer el estado oxidativo del tejido renal; de manera que la terapéutica antioxidante se convierte en un pilar central del tratamiento preventivo de las enfermedades del riñón.

Cuando se estudian los mecanismos fisiopatológicos básicos de los trastornos renales se aprecia que en muchos de ellos están presentes factores que predisponen al desequilibrio oxidativo. Como por ejemplo, los fenómenos isquémicos o tóxicos que pueden dañar al túbulo de manera aguda, así como el daño glomerular de origen inmunológico, pueden acompañarse de la generación excesiva de EROs (Saldaña y col., 2004).

Por lo tanto, se determinó el nivel de excreción urinaria de proteína y se observó que las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa saturada presentaron un nivel de excreción mayor significativo comparado con el grupo control, lo mismo ocurrió

con el nivel de triglicéridos y creatinina; mientras que la tasa de filtración glomerular disminuyó. Los valores se presentan en el Cuadro 8.

Al relacionar las concentraciones plasmáticas y urinarias de creatinina, se demostró una disminución del 62% en la tasa de filtración glomerular de los animales que recibieron una alimentación alta en grasa saturada con respecto al grupo control. Los niveles de glucosa en orina no presentaron diferencia estadísticamente significativa del grupo con dieta alta en grasa con respecto al grupo control.

Cuadro 8. Alteraciones renales a las doce semanas de inicio de la dieta alta en grasa saturada.

Parámetro	Dieta	
	Control	Alta en grasa saturada
Proteína en orina	0.41 ± 0.16 g/12 h	0.94 ± 0.09 g/12 h *
Creatinina	0.33 ± 0.03 g/dL	0.54 ± 0.05 g/dL *
Tasa de filtración glomerular	3.44 ± 1.20 mL/min	1.30 ± 0.14 mL/min *
Triglicéridos (mg/g tejido)	7.82 ± 0.49 mg/g	12.57 ± 0.90 mg/g *
Glucosa	71.33 ± 3.16 mg/dL	70.20 ± 1.97 mg/dL

* Indica diferencia estadística significativa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student ($P < 0.05$). El cuadro muestra la media de los experimentos ± error estándar (EE) de cada grupo.

VI.2 Concentración de glutatión reducido y actividad de enzimas antioxidantes en hígado de ratas Sprague-Dawley con una dieta alta en grasa saturada.

VI.2.1 Concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado.

GSH es la biomolécula más importante contra la toxicidad inducida químicamente, ya que es la solución amortiguadora redox intracelular elemental presente en concentraciones cercanas a 10 mM. El glutatión funciona como un secuestrador directo de radicales libres y en la reparación de daño biológico causado por los

mismos, como un cosustrato para la actividad de GPX en la eliminación de intermediarios reactivos por la reducción de hidroperóxidos, como un cofactor para muchas enzimas y, al mismo tiempo, protege a las células de las sustancias oxidantes de origen endógeno y exógeno (Maritim y col., 2003; Venkateswaran y Pari, 2003; García, 2004).

El glutatión está presente en el interior de las células sobre todo en forma reducida (90-95% del glutatión total). La oxidación de glutatión conduce a la formación de disulfuro de glutatión (GSSG). El glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) es uno de los muchos pares redox celulares que contribuyen directamente al estado redox. Además, el agotamiento de GSH mediante la conjugación, remoción de la célula o la oxidación de GSSG afecta significativamente el potencial redox global de la célula (Nair y col., 1991; Ugochukwu y Cobourne, 2003).

En la Figura 3 se puede observar el efecto de una dieta alta en grasa saturada en la concentración de GSH en hígados de ratas Sprague-Dawley. La disminución en la concentración de GSH muestra una diferencia significativa (31%) en los homogenados citosólicos de hígado de las ratas con una dieta alta en grasa saturada ($P < 0.001$) con respecto al grupo control. Los resultados de la concentración de GSH se muestran como la media \pm el error estándar (EE).

VI.2.2 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado.

La GST representa una gran familia multigénica de proteínas con actividad enzimática que desempeñan un papel importante en la protección de los tejidos contra el daño oxidativo al actuar en el transporte de componentes o metabolitos celulares siendo, por lo tanto, importantes para la desintoxicación de muchos xenobióticos diferentes en los mamíferos. La reacción principal catalizada por las GSTs es la conjugación del glutatión (γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina, GSH) con una amplia variedad de compuestos electrofílicos exógenos o endógenos. De esta forma, las enzimas GSTs neutralizan los sitios activos del electrófilo y generan

productos más hidrosolubles y, por lo tanto, más fácilmente excretables (Mozer y col., 1983; Girón y col., 1999; García, 2004).

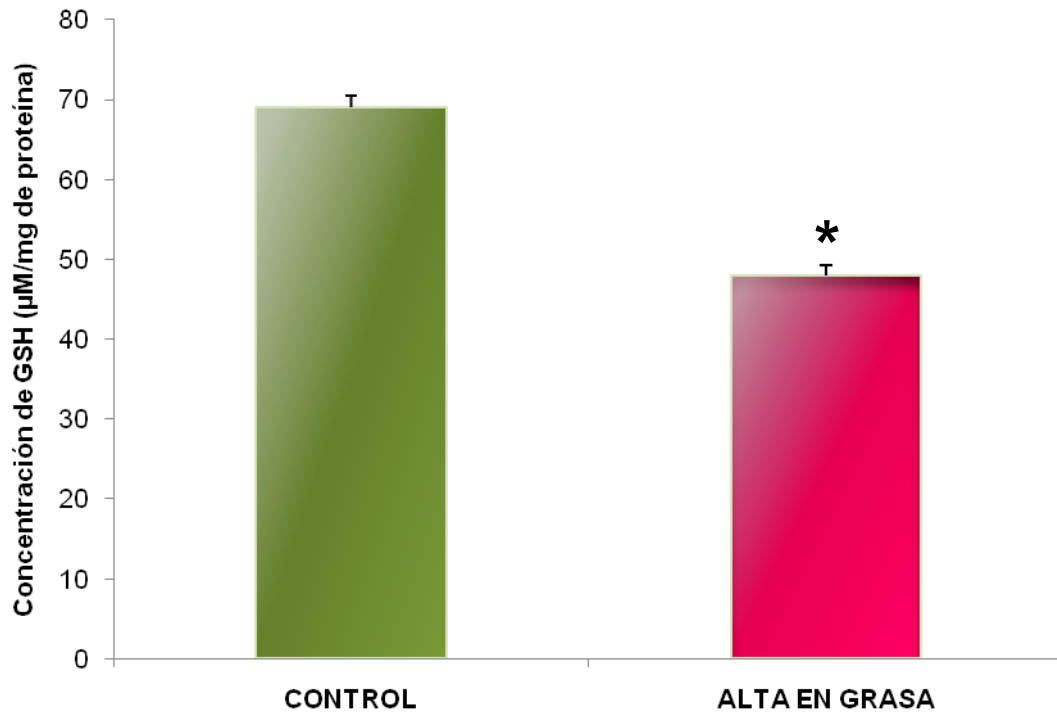


Figura 3. Concentración de GSH en el hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.

* Indica diferencia estadística significativa de la media del grupo alto en grasa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student ($P < 0.001$). Las barras representan la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

En la Figura 4 se puede observar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la actividad enzimática de GST en el hígado de ratas Sprague-Dawley. La disminución en la actividad enzimática de GST (18%) muestra una diferencia significativa en los homogenados citosólicos de hígado de las ratas con una dieta alta en grasa saturada ($P < 0.001$) con respecto al grupo control. Los resultados de la actividad enzimática de GST se muestran como la media \pm el error estándar (EE).

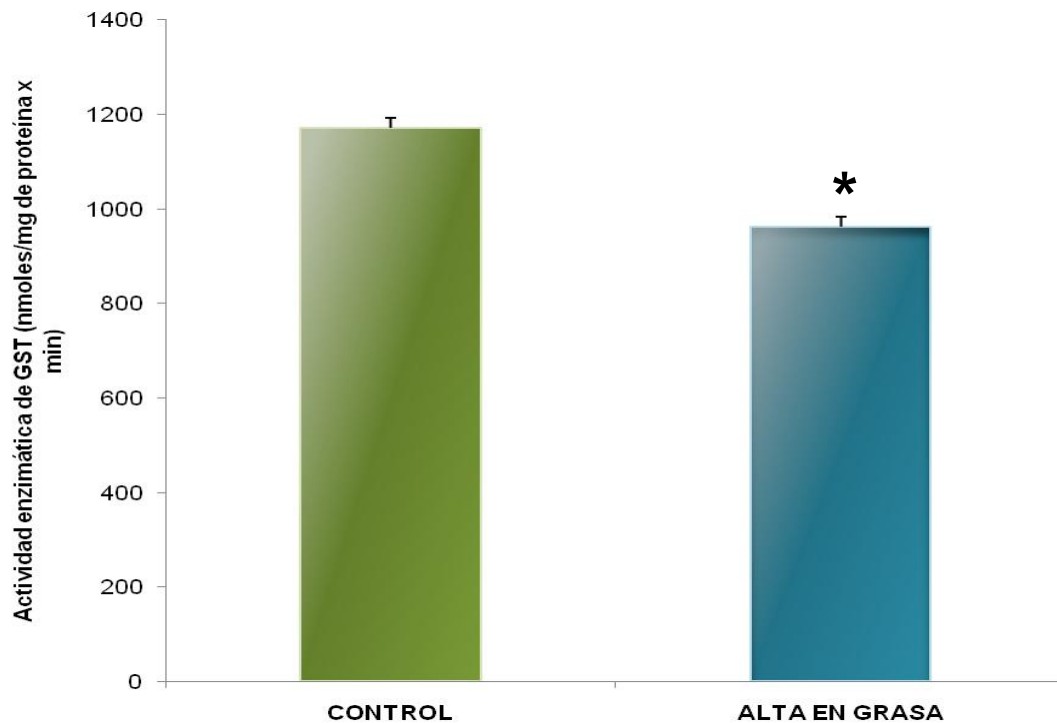


Figura 4. Actividad enzimática de GST en el hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.

* Indica diferencia estadística significativa de la media del grupo alto en grasa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student ($P < 0.001$). Las barras representan la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

VI.2.3 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPX) en hígado.

GPX desempeña un papel importante en la defensa celular contra las EROs, es una enzima que utiliza como cofactor al selenio y que se ha encontrado en el citoplasma y las mitocondrias de los tejidos animales. Esta enzima metaboliza el peróxido de hidrógeno a agua mediante el uso de GSH como donante de hidrógeno. El glutatión disulfuro (GSSG) regresa a su estado de glutatión por la GR, utilizando el cofactor NADPH generado por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. A diferencia de otras enzimas, como la CAT que realiza esta misma función, GPX tiene un espectro más amplio, porque también reduce peróxidos lipídicos, catalizando la reacción a través de la cual el GSH reacciona con peróxidos para transformarlos en agua y alcohol. Durante este proceso, el glutatión es oxidado

para posteriormente ser regenerado a su estado original por la enzima GR, es decir, de la misma forma que lo hace con el H_2O_2 (González y col., 2000; Limaye y col., 2003; Maritim y col., 2003).

En la Figura 5 se puede observar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la actividad enzimática de GPX en el hígado de ratas Sprague-Dawley. El aumento en la actividad enzimática de GPX (1.8 veces) muestra una diferencia significativa en los homogenados citosólicos de hígado de las ratas con una dieta alta en grasa saturada ($P < 0.001$) con respecto al grupo control. Los resultados de la actividad enzimática de GPX se muestran como la media \pm el error estándar (EE).

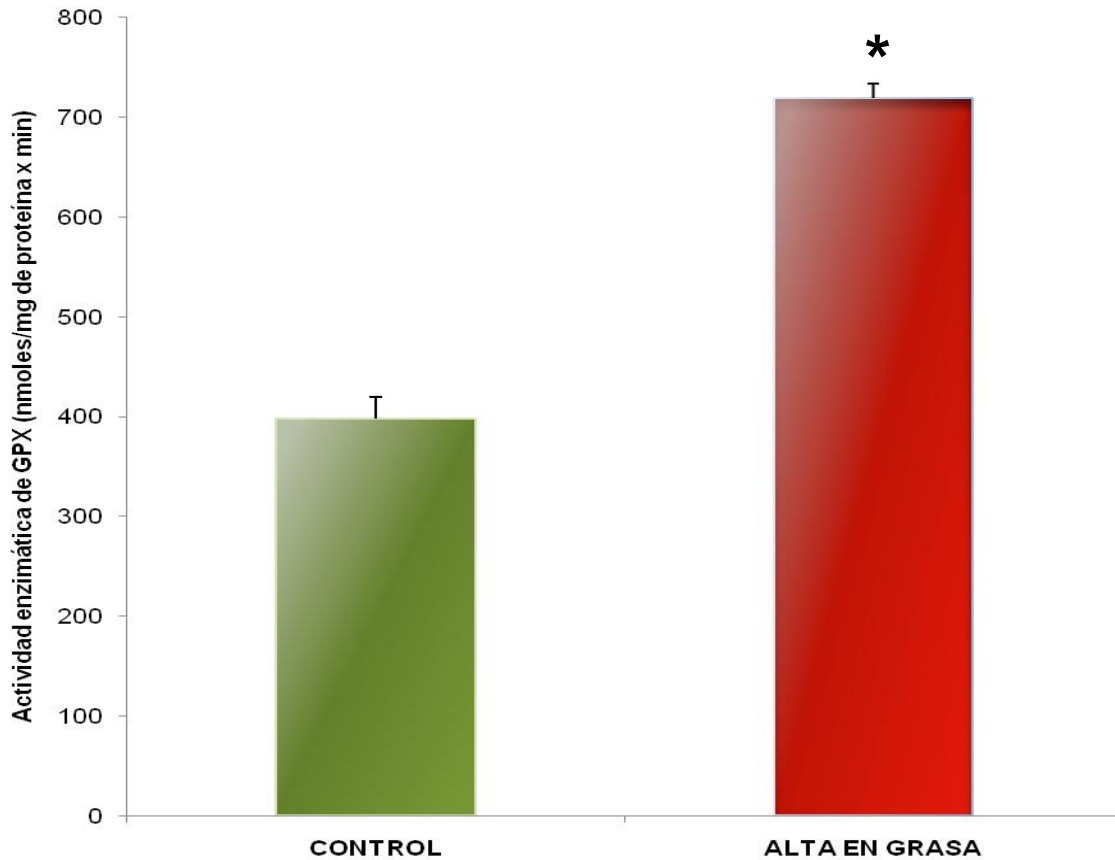


Figura 5. Actividad enzimática de GPX en el hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.

* Indica diferencia estadística significativa de la media del grupo alto en grasa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student ($P < 0.001$). Las barras representan la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

VI.2.4 Actividad enzimática de catalasa (CAT) en hígado.

La CAT es una enzima de amplia distribución, que consiste de cuatro subunidades proteicas. Se caracteriza por presentar una tasa de renovación extraordinariamente elevada (>40,000 moléculas por segundo). Su actividad se localiza básicamente en los peroxisomas, en donde cataliza la conversión de H_2O_2 en agua y oxígeno molecular en muchos tejidos, siendo por tanto específicamente responsable de la destrucción de H_2O_2 dañino generado en exceso por diferentes procesos subcelulares.

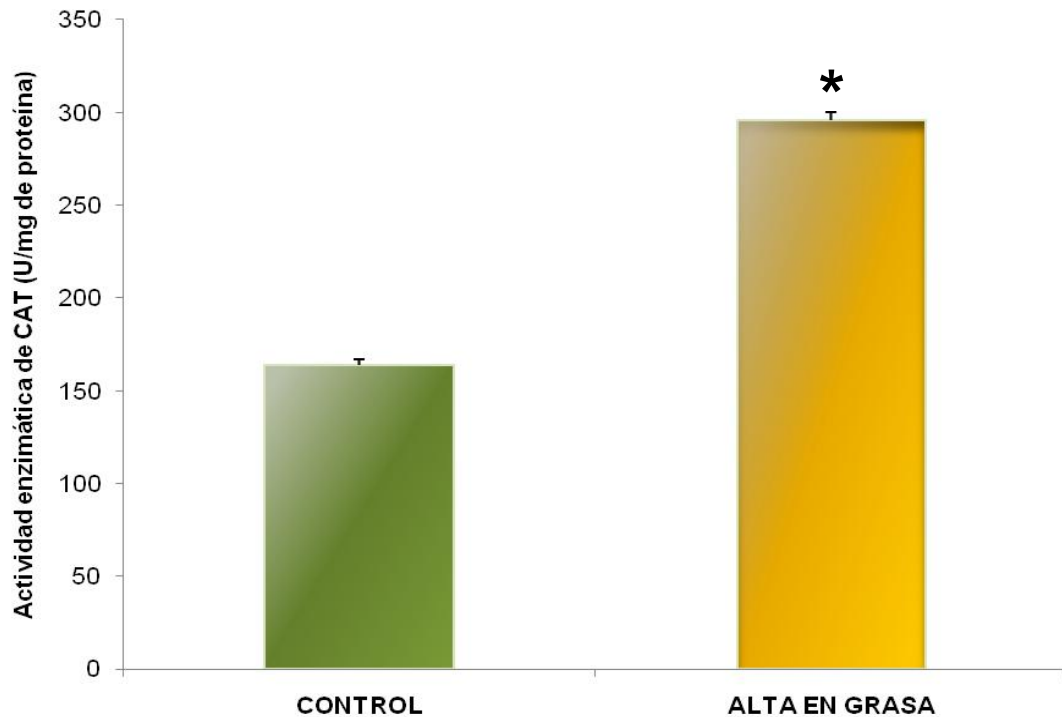


Figura 6. Actividad enzimática de CAT en el hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.

* Indica diferencia estadística significativa de la media del grupo alto en grasa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student ($P < 0.001$). Las barras representan la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

El H_2O_2 no sólo es tóxico para las células, sino también puede ser un precursor de otras especies tóxicas. Éste es permeable a las membranas celulares y, por tanto,

su sitio de acción puede ser diferente de su sitio de producción. En el medio extracelular, el H₂O₂ puede reaccionar con metales de transición tales como Fe²⁺ y Cu²⁺ generando OH[•] altamente reactivo que puede dañar macromoléculas en los alrededores (González y col., 2000; Limaye y col., 2003; Fernández y col., 2004). En la Figura 6 se puede observar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la actividad enzimática de CAT en el hígado de ratas Sprague-Dawley. El aumento en la actividad enzimática de CAT muestra una diferencia significativa (1.8 veces) en los homogenados citosólicos de hígado de las ratas con una dieta alta en grasa saturada (P < 0.001) con respecto al grupo control. Los resultados de la actividad enzimática de CAT se muestran como la media ± el error estándar (EE). Recapitulando, el cuadro 9 muestra el efecto de la dieta alta en grasa saturada sobre la concentración hepática de GSH y la actividad enzimática de GST, GPX y CAT.

Cuadro 9. Efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la concentración de GSH y la actividad enzimática de GST, GPX y CAT en el hígado de ratas Sprague-Dawley.

Marcador antioxidante	Tipo de dieta	
	Control	Dieta alta en grasa saturada
Glutación reducido (µM/mg de proteína)	69.04 ± 1.40	48.03 ± 1.25 *
Glutación-S-transferasa (nmoles/mg de proteína x min)	1172.26 ± 19.68	962.74 ± 20.82 *
Glutación peroxidasa (nmoles/mg de proteína x min)	398.35 ± 21.20	719.23 ± 14.34 *
Catalasa (U/mg de proteína)	163.94 ± 2.94	295.67 ± 4.64 *

* Indica diferencia estadística significativa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student (P < 0.001). El cuadro muestra la media de los experimentos ± error estándar (EE) de cada grupo.

VI.3 Concentración de glutatión reducido, malondialdehído y actividad de enzimas antioxidantes en riñón de ratas Sprague-Dawley con una dieta alta en grasa saturada.

En el caso del riñón, el estrés oxidativo representa un punto de convergencia del mecanismo de daño renal provocado por nefropatías resultantes de muy diversas etiologías. Así, el daño que puede sufrir el riñón expuesto a isquemia, agentes nefrotóxicos o infecciosos, y a obstrucciones de la vía urinaria, se asocia a un predominio prooxidante respecto a las defensas antioxidantes (Castillo y col., 2003).

VI.3.1 Concentración de glutatión reducido (GSH) en riñón.

En la Figura 7 se puede observar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la concentración de GSH en el riñón de ratas Sprague-Dawley.

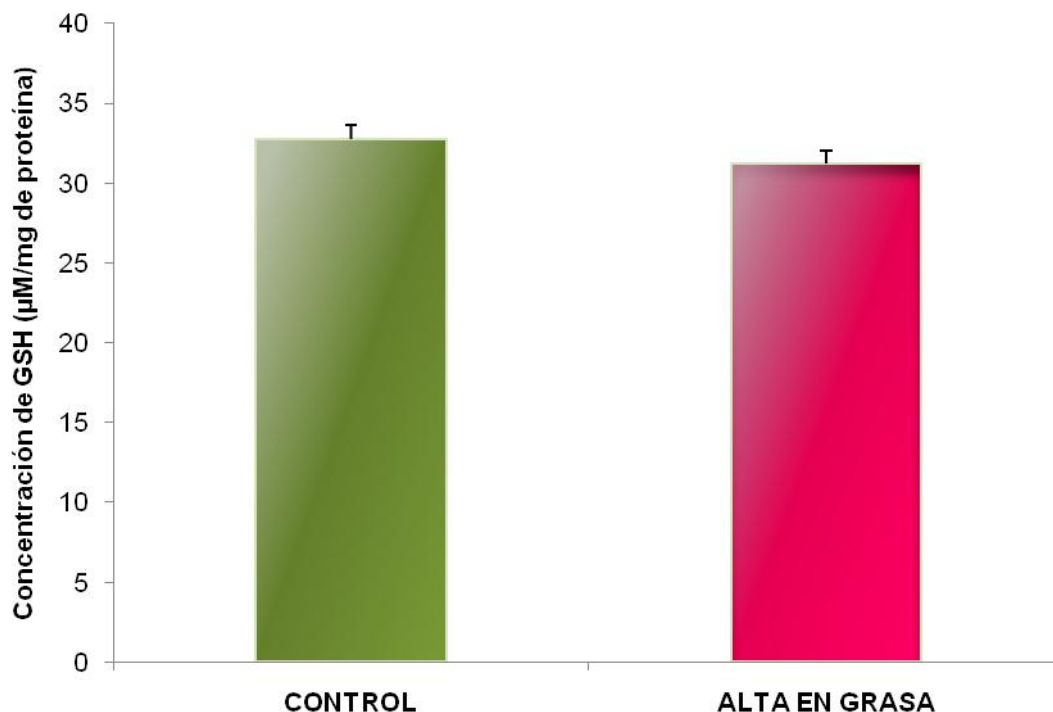


Figura 7. Concentración de GSH en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.

Las barras representan la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

La disminución en la concentración de GSH (5%) no muestra una diferencia estadística significativa en los homogenados citosólicos de riñón de las ratas con una dieta alta en grasa saturada con respecto al grupo control. Los resultados de la concentración de GSH se muestran como la media \pm el error estándar (EE).

VI.3.2 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón.

En la Figura 8 se puede observar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la actividad enzimática de GST en el riñón de ratas Sprague-Dawley. La disminución en la actividad enzimática de GST (12%) muestra una diferencia significativa en los homogenados citosólicos de riñón de las ratas con una dieta alta en grasa saturada ($P < 0.001$) con respecto al grupo control.

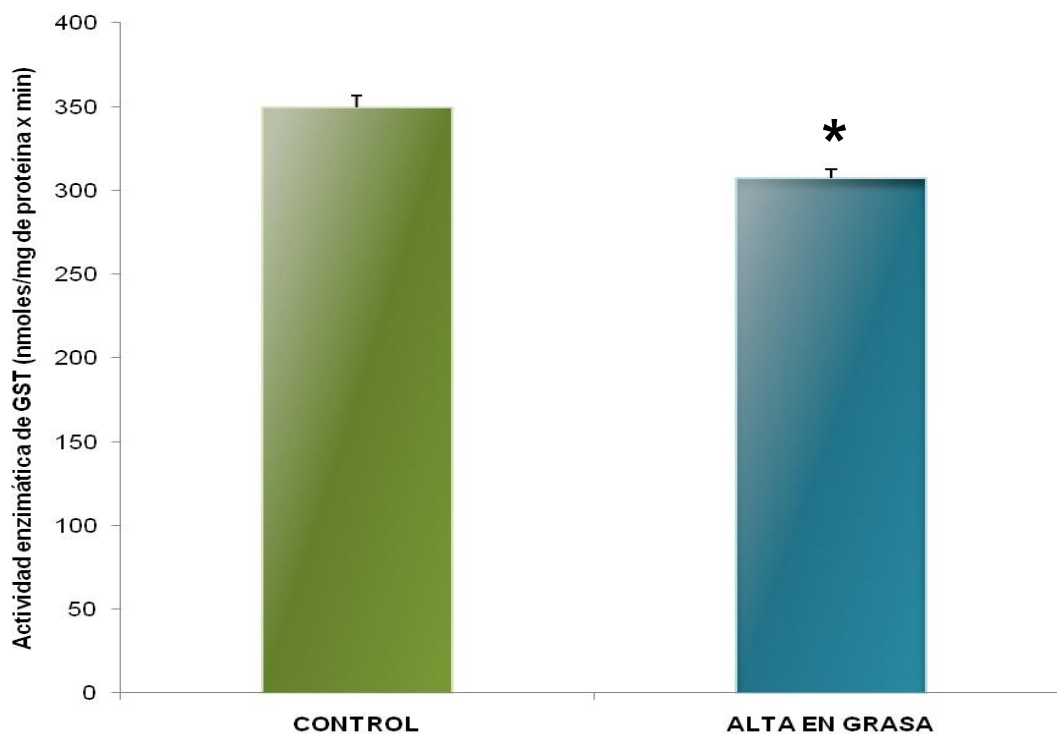


Figura 8. Actividad enzimática de GST en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.

* Indica diferencia estadística significativa de la media del grupo alto en grasa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student ($P < 0.001$). Las barras representan la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

Los resultados de la actividad enzimática de GST se muestran como la media \pm el error estándar (EE).

VI.3.3 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPX) en riñón.

En la Figura 9 se puede observar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la actividad enzimática de GPX en el riñón de ratas Sprague-Dawley. El aumento en la actividad enzimática de GPX (1.5 veces) muestra una diferencia significativa en los homogenizados citosólicos de riñón de las ratas con una dieta alta en grasa saturada ($P < 0.001$) con respecto al grupo control. Los resultados de la actividad enzimática de GPX se muestran como la media \pm el error estándar (EE).

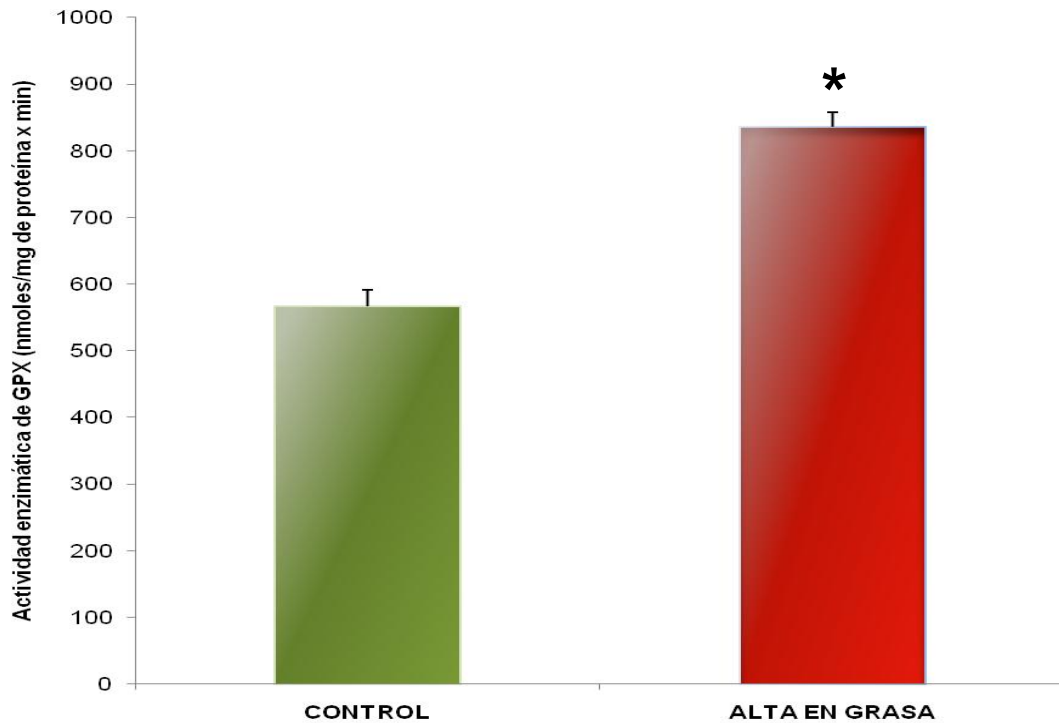


Figura 9. Actividad enzimática de GPX en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.

* Indica diferencia estadística significativa de la media del grupo alto en grasa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student ($P < 0.001$). Las barras representan la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

VI.3.4 Actividad enzimática de catalasa (CAT) en riñón.

En la Figura 10 se puede observar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la actividad enzimática de CAT en el riñón de ratas Sprague-Dawley. El aumento en la actividad enzimática de CAT (1.5 veces) muestra una diferencia significativa en los homogenados citosólicos de riñón de las ratas con una dieta alta en grasa saturada ($P < 0.001$) con respecto al grupo control. Los resultados de la actividad enzimática de CAT se muestran como la media \pm el error estándar (EE).

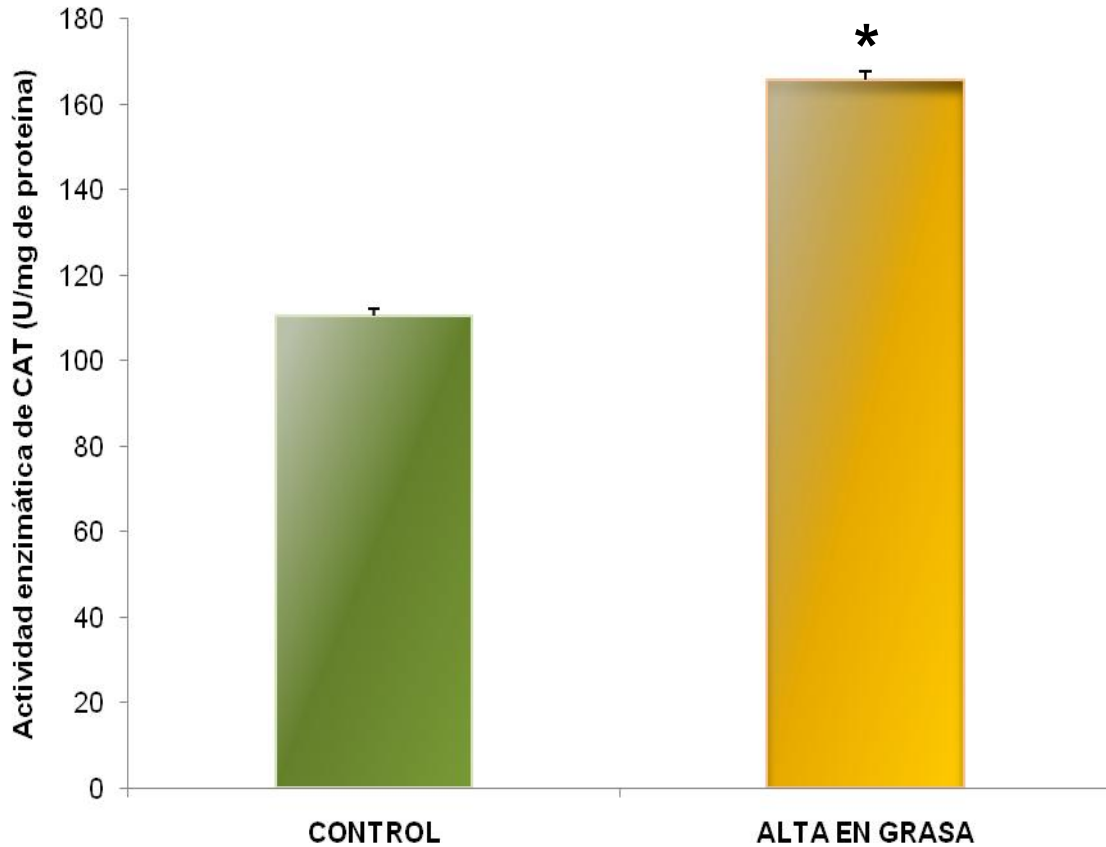


Figura 10. Actividad enzimática de CAT en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.

* Indica diferencia estadística significativa de la media del grupo alto en grasa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student ($P < 0.001$). Las barras representan la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

VI.3.5 Concentración de malondialdehído (MDA) en riñón.

La peroxidación lipídica puede dar lugar a daños reversibles e irreversibles en las células y los tejidos. El proceso de peroxidación lipídica se inicia por las EROs como los radicales hidroxilo. En los sistemas biológicos, el nivel de estado estacionario de la peroxidación lipídica se evalúa a menudo mediante la medición de los productos de la peroxidación de lípidos, como el malondialdehído (MDA). El MDA es un producto final estable de la peroxidación lipídica y por lo tanto puede ser utilizado como un marcador indirecto de la acumulación de peróxidos lipídicos (Knutson y col., 2000).

En la Figura 11 se puede observar el efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la concentración de MDA en el riñón de ratas Sprague-Dawley.

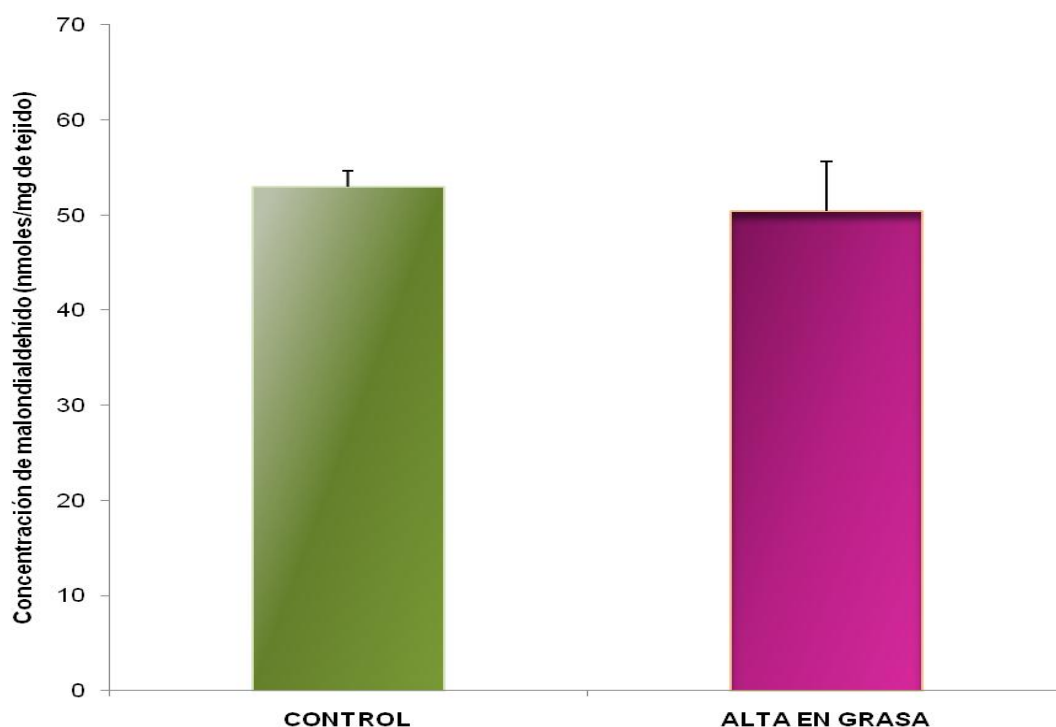


Figura 11. Concentración de MDA en el riñón de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante doce semanas con una dieta alta en grasa saturada.

Las barras representan la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

La disminución en la concentración de MDA (5%) no muestra una diferencia estadística significativa en los homogenados citosólicos de riñón de las ratas con una dieta alta en grasa saturada con respecto al grupo control. Los resultados de la concentración de MDA se muestran como la media \pm el error estándar (EE).

Recapitulando, el cuadro 10 muestra el efecto de la dieta alta en grasa saturada sobre la concentración renal de GSH y malondialdehído y la actividad enzimática de GST, GPX y CAT.

Cuadro 10. Efecto de una dieta alta en grasa saturada sobre la concentración de GSH, MDA y la actividad enzimática de GST, GPX y CAT en el riñón de ratas Sprague-Dawley.

Marcador antioxidante	Tipo de dieta	
	Control	Dieta alta en grasa saturada
Glutación reducido ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína)	32.72 \pm 0.92	31.21 \pm 0.81
Glutación-S-transferasa (nmoles/mg de proteína x min)	349.61 \pm 6.71	307.43 \pm 4.95 *
Glutación peroxidasa (nmoles/mg de proteína x min)	566.16 \pm 25.44	836.12 \pm 21.32 *
Catalasa (U/mg de proteína)	110.53 \pm 1.51	165.72 \pm 1.93 *
Malondialdehído (nmoles/mg de tejido)	53.01 \pm 1.59	50.42 \pm 5.21

* Indica diferencia estadística significativa con respecto a la media del control de acuerdo a la prueba t de Student ($P < 0.001$). El cuadro muestra la media de los experimentos \pm error estándar (EE) de cada grupo.

VII. DISCUSION.

En México, la obesidad en niños y adolescentes es un problema de salud pública que está creciendo alarmantemente. La obesidad es un padecimiento crónico, complejo y multifactorial que se establece por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. Los efectos negativos de la obesidad en etapas tempranas de la vida, se deben, entre otras causas, a la resistencia periférica a la insulina, al incremento de grasa abdominal, a la hipertensión arterial y a las dislipidemias. La asociación entre la obesidad y diversas enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, está bien documentada en la literatura científica. Una gran cantidad de estudios sostienen que el estrés oxidativo y la inflamación son los mecanismos biológicos mediante los cuales la obesidad conduce a enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas (Charles y col., 2008; Fernández y col., 2008).

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción y la eliminación de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. El estrés oxidativo induce la producción de EROs, las cuales son una pieza importante de los mecanismos de defensa contra infecciones; no obstante, una generación excesiva o prolongada puede dañar tejidos, siendo tóxicas para la célula, en particular para la membrana celular, ya que estos radicales interactúan con la bicapa lipídica y producen peróxidos lipídicos. La peroxidación lipídica provoca una degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, bajas concentraciones de peróxidos lipídicos se encuentran en los tejidos. El daño oxidativo se produce cuando las EROs producidas por las mitocondrias no son eliminadas por la enzima citocromo P450 en el retículo endoplasmático y los peroxisomas, evadiendo la desintoxicación. Ya que el nivel del estado estacionario de daño oxidativo depende de la velocidad relativa de la acumulación de daños, la reparación, y la degradación (Santhakumari y col., 2003; Ugochukwu y Cobourne, 2003; Venkateswaran y Pari, 2003; Green y col., 2004; Charles y col., 2008).

Los altos niveles y/o la inadecuada eliminación de EROs puede causar un grave desequilibrio metabólico y daño oxidativo a macromoléculas biológicas. El estrés oxidativo *in vivo* es de suma importancia, ya que puede dañar no sólo los receptores, las enzimas, las vías de transducción de señales y proteínas de transporte, sino también dar lugar a daños secundarios en otras biomoléculas. Se sabe que el estrés oxidativo provoca diversos efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. Además, las proteínas modificadas oxidativamente pueden ser reconocidas como "extrañas" por el sistema inmune, provocando la formación de anticuerpos (Hidalgo y col., 2002; Limaye y col., 2003).

Los niveles de EROs, así como el nivel de peroxidación lipídica en células, están regulados por una variedad de mecanismos de defensa celular que consiste de sistemas enzimáticos y no enzimáticos (GSH, α -tocoferol y otros secuestradores de EROs). Las tres principales enzimas secuestrantes involucradas en la desintoxicación de EROs en los sistemas de los mamíferos son CAT, SOD y GPX. El sistema antioxidante glutatión juega un papel fundamental en la defensa celular contra radicales libres reactivos y otras especies oxidantes. Se compone de glutatión reducido y una gran variedad de enzimas funcionalmente relacionadas con los recursos genéticos de los cuales es responsable de la regeneración del glutatión, mientras que GPX y GST trabajan juntas con el GSH en la descomposición del peróxido de hidrógeno u otros hidroperóxidos orgánicos. Otras enzimas que participan en la defensa antioxidante contra los radicales libres son: SOD y CAT. SOD cataliza la dismutación del radical superóxido para producir peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. CAT ha sido señalada como responsable de la detoxificación del peróxido de hidrógeno (Girón y col., 1999; Venkateswaran y Pari, 2003).

Los niveles altos de radicales libres y la disminución simultánea de los mecanismos de defensa antioxidante pueden conducir al daño de los orgánulos celulares y las enzimas, el aumento de la peroxidación lipídica y el desarrollo de resistencia a la insulina. Estas consecuencias del estrés oxidativo favorecen el desarrollo de complicaciones de la diabetes mellitus (Maritim y col., 2003).

El concepto de que el estrés oxidativo es el factor común subyacente a la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, puede explicar la presencia de inflamación en todas estas condiciones. Es bien sabido que la inflamación es una manifestación de estrés oxidativo, y de las vías que generan los mediadores de la inflamación, tales como moléculas de adhesión y las interleucinas, las cuales son inducidas por el estrés oxidativo. Curiosamente, se ha propuesto recientemente que el estado subclínico pro-inflamatorio observable en muchas condiciones incluyendo la aterosclerosis, el cáncer y el envejecimiento es causado por una sobregeneración mitocondrial de radicales libres. Por otra parte, la hipótesis es apoyada por los estudios *in vivo*, que han demostrado que la glucosa y ácidos grasos libres que inducen la inflamación a través del estrés oxidativo, tienen un efecto acumulativo e independiente, y que los antioxidantes revierten el fenómeno (Ceriello y Motz, 2004).

Dada la importancia citoprotectora de estos biomarcadores antioxidantes en el organismo y tomando en cuenta la alta prevalencia de obesidad en niños que existe en nuestro país, en el presente estudio se evaluaron dichos biomarcadores después de la administración de una dieta con un alto contenido de grasas saturadas (23.70%) en el hígado y riñón de ratas Sprague-Dawley de aproximadamente cuatro semanas de edad con un peso promedio de 30-50 g.

En el presente trabajo se encontró que el consumo de grasa saturada durante etapas tempranas de crecimiento induce aumento en el peso corporal y genera un almacenamiento en exceso de tejido adiposo en la zona visceral, lo cual representa un factor de riesgo para el desarrollo de alteraciones metabólicas.

La concentración de GSH disminuyó estadísticamente (31%) en el hígado del grupo con una dieta alta en grasa saturada, comparado con el grupo control. Así mismo, la actividad enzimática de GST en el hígado de los animales con una dieta alta en grasa disminuyó estadísticamente en un 18% con respecto al grupo control. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos por Manjunatha y Srinivasan (2007), quienes llevaron a cabo un estudio con ratas macho adultas Wistar de 100 – 105 g de peso a las cuales alimentaron con una dieta alta en grasa (30%) durante 8

semanas. Al final del periodo experimental, la concentración de GSH en el hígado de los animales alimentados con la dieta alta en grasa disminuyó significativamente (12%) con respecto al control; así mismo, se observó el mismo comportamiento en la actividad enzimática de GST, tanto en el hígado (9%) como en el plasma (17%). Xiong y colaboradores (2007) condujeron un estudio similar sobre el metabolismo antioxidante de ratas macho Sprague-Dawley de 4 semanas de edad, las cuales fueron alimentadas con una dieta alta en grasa (12%) por un tiempo de 5 semanas, observándose que la concentración de GSH en hígado y plasma disminuyó estadísticamente en un 11% y 22%, respectivamente, con respecto al grupo control. Hsu y Yen (2007) obtuvieron resultados similares que los estudios anteriores al llevar a cabo un estudio con ratas macho Wistar de 4 semanas de edad, las cuales fueron alimentadas con una dieta alta en grasa (400 g/kg de peso corporal de grasa animal incluida en el alimento para el caso del grupo alto en grasa y 0 g/kg de peso corporal para el grupo control), con una duración de 10 semanas. La concentración de GSH y la actividad enzimática de GST disminuyeron significativamente en un 69 y 44%, respectivamente, en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa comparado con el grupo control.

El GSH destruye efectivamente a los EROs, directa e indirectamente a través de reacciones enzimáticas; no obstante, el agotamiento de GSH también aumenta la sensibilidad de las células a las agresiones diversas y también tiene varios efectos metabólicos. Se sugiere que dicho agotamiento de GSH en el presente estudio es debido al aumento de la actividad enzimática de GPX, ya que el GSH participa en la eliminación de intermediarios reactivos por la reducción de hidroperóxidos en la presencia de GPX, la cual a su vez emplea al GSH como donante de hidrógeno, creando con ello una insuficiente disponibilidad de GSH, siendo a pesar de ello suficiente para el buen funcionamiento de GPX a las 12 semanas de la dieta alta en grasa saturada de los animales usados en este estudio. La disminución estadísticamente significativa de la actividad enzimática de GST observada en este estudio sugiere una depresión debido a un estrés oxidativo que no puede ser contrarrestado. Dicho estrés es causado por el incremento de la ingesta calórica o

bien de sustrato lipídico en los animales con una dieta alta en grasa saturada, ya que al incrementarse este sustrato la actividad de la GPX aumenta para contrarrestar la peroxidación lipídica (Cuadro 9), deprimiendo los niveles de su donador de hidrógeno GSH, por lo cual la GST no puede llevar a cabo la desintoxicación de metabolitos reactivos, ya que requiere GSH para catalizar la conjugación.

La actividad de GPX en el hígado de los animales tratados con una dieta alta en grasa saturada incrementó significativamente (1.8 veces) con respecto al control. Esta inducción en la actividad enzimática fue también observada en la CAT hepática, la cual incrementó 1.8 veces comparada con el grupo control. En un estudio previo realizado por Catalá y colaboradores (2008) con ratas macho y hembra Wistar de 8 semanas de edad a las cuales alimentaron con una dieta alta en grasa (55.20%) durante 14 semanas, se observó que la actividad de CAT y GPX en el hígado de los animales, tanto hembras como machos alimentados con la dieta alta en grasa, disminuyó significativamente con respecto al control. Lee y colaboradores (2009) llevaron a cabo un estudio con ratas macho Sprague-Dawley de 165-185 g de peso corporal las cuales fueron alimentadas durante 6 semanas con una dieta con 5% de grasa total para el grupo control y con 25% de grasa total para el grupo denominado alto en grasa, observándose una disminución estadísticamente significativa de las actividades enzimáticas de GST, GPX, CAT del grupo alto en grasa con respecto al control. Dichos resultados no son acordes con los obtenidos para GPX y CAT en este estudio y las razones de ellos podrían ser el excesivo peso de las ratas empleadas en el estudio de Lee y colaboradores (2009) que representan el 400% del peso de las ratas empleadas en el presente estudio, además los animales fueron de 6 semanas, es decir, ya no eran jóvenes; para el caso de Catalá y colaboradores (2008) la edad de las ratas, que representa el doble de las empleadas en este estudio y la excesiva ingesta de grasa (55.20%) ya que en nuestro estudio la grasa total fue de 39%. Esta última razón se sugiere que podría haber ocasionado la depresión de los niveles de GPX, ya que la ingesta excesiva de sustrato para esta enzima rebasó el poder de actividad de la misma

que no pudo contrarrestar la peroxidación lipídica. La reducción significativa de la actividad de la catalasa en estos estudios denota una menor formación de peróxido de hidrógeno que podría estar relacionada con una disminución de la actividad enzimática de SOD, por lo cual podría existir una excesiva acumulación de superóxidos. Dicho comportamiento ha sido reportado anteriormente por Kaul y colaboradores (1995) quienes llevaron a cabo un estudio con ratas diabéticas inducidas con una sola inyección de estreptozotocina (65 mg/kg). A las 4 semanas de la inducción de diabetes, los corazones de los animales diabéticos mostraron una disminución estadísticamente significativa de las actividades enzimáticas de SOD (50%) y GPX (40%) con respecto al grupo control. No obstante, en un estudio realizado por Adéchian y colaboradores (2009) con ratas macho Wistar adultas con un peso aproximado de 323 g, las cuales fueron alimentadas durante 5 semanas con una dieta alta en grasa consistente de 45% en lípidos totales, se reportó un incremento no estadísticamente significativo de la actividad enzimática de GPX (1.05 veces) y CAT (1.05 veces) en el hígado de las ratas tratadas con una dieta alta en grasa. Asimismo, Marczuk y colaboradores (2009) llevaron a cabo un estudio en ratas adultas hembras con un peso promedio de 230 g, las cuales fueron divididas en dos grupos: el primer grupo recibió una dieta estándar (control) enriquecida con ácido linoleico obteniendo un 15% final de grasa, el segundo grupo recibió una dieta estándar enriquecida a un total de 15% de grasa con ácido palmítico. Este estudio se llevo a cabo únicamente por 4 semanas al final de las cuales la actividad enzimática de CAT y GPX en hígado incrementaron estadísticamente 1.75 y 1.21 veces (para la dieta enriquecida con ácido linoleico y ácido palmítico, respectivamente) y 3.00 y 1.09 veces (para la dieta enriquecida con ácido linoleico y ácido palmítico, respectivamente) con respecto al grupo control. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en el hígado de las ratas empleadas en este estudio, sugiriendo que al mismo tiempo que incrementa la actividad de GPX por el exceso de sustrato, la actividad de la SOD (no medida en este estudio) también incrementa, por lo cual hay una disminución de la peroxidación lipídica reflejada en el incremento de la actividad de CAT.

El hígado es la glándula de mayor tamaño en el organismo, entre 2% y 5% del peso corporal; mientras que el riñón sólo representa entre 0.05% y 0.1%. Sin embargo, la biotransformación de sustancias tóxicas y su excreción como un mecanismo de protección para el organismo constituye la función metabólica más importante que realizan estos dos órganos en su conjunto. Las sustancias dentro del sistema portal, que incluyen metabolitos y materiales tóxicos, son recibidas por los macrófagos y los hepatocitos para ser procesados metabólicamente y ser vertidos a la circulación para llegar al riñón y ahí ser nuevamente procesadas y excretadas (Quezada y col., 2002).

Por lo tanto, un daño en riñón como resultado de un estado inflamatorio (crónico) inducido por una dieta alta en grasa puede afectar seriamente el papel biotransformador y de excreción de este órgano. Por lo anterior, en este estudio se evaluó la concentración de GSH y la actividad enzimática de GST, GPX y CAT en riñón.

Aunque no estadísticamente significativo, la concentración de GSH en el riñón de los animales alimentados con una dieta alta en grasa saturada disminuyó (5%) comparado con el control; mientras que la actividad enzimática de GST en el riñón de las ratas con una dieta alta en grasa saturada disminuyó significativamente (12%) respecto al control. Dichos resultados también fueron observados en otros estudios, por ejemplo Vijayakumar y colaboradores (2004) llevaron a cabo un estudio con ratas Wistar de 8-9 semanas de edad las cuales fueron alimentadas con una dieta alta en grasa (20 % aceite de coco, 2% de colesterol y 0.125% sales biliares mezclada con la dieta estándar de pellets, la cual contenía 5% de grasa) por 10 semanas. El hígado, corazón y riñón de dichos animales mostraron una reducción significativa en la concentración de GSH (58%, 41% y 37%, respectivamente) y la actividad enzimática de GST (53%, 23% y 69%, respectivamente) en comparación con el grupo control. Este mismo comportamiento fue obtenido en modelos de diabetes como lo demuestra un estudio realizado por Venkateswaran y Pari (2003), en el cual ratas macho Wistar fueron inducidas con estreptozotocina (45 mg/kg de peso corporal) para presentar

un cuadro diabético. A los 45 días de experimentación, se encontró que los niveles hepáticos y renales de la concentración de GSH tuvieron una disminución estadísticamente significativa (50% y 38%, respectivamente) comparado con el grupo control; asimismo, la actividad enzimática en hígado y riñón de SOD, CAT, GPX y GST disminuyeron de forma significativa (61%, 49%, 43% y 55%, respectivamente en hígado y 43%, 40%, 39% y 60%, respectivamente en riñón) en comparación al grupo control. Como se puede observar existe una disminución en el nivel de GSH en el hígado y el riñón en la diabetes. La disminución en el nivel de GSH representa un incremento en su uso debido al estrés oxidativo, el cual se ve reflejado en una menor actividad enzimática de SOD, CAT, GPX y GST. A diferencia del estudio de Venkateswaran y Pari (2003), los animales empleados en este estudio sólo presentaron una disminución significativa en la concentración hepática de GSH y la actividad enzimática hepática y renal de GST. No obstante, estas actividades antioxidantes más bajas pueden ser el desequilibrio inicial susceptible a inducir futuras alteraciones metabólicas, como las ocurridas durante la diabetes y sus complicaciones.

La actividad de GPX en el riñón de los animales tratados con una dieta alta en grasa saturada incrementó significativamente (1.5 veces) con respecto al grupo control; esta inducción en la actividad enzimática fue también observada en la CAT renal, la cual incrementó 1.5 veces comparada con el grupo control. Dicho comportamiento también se ha observado en animales diabéticos, Strother y colaboradores (2001) compararon la actividad de CAT, GPX, GR y SOD, así como los niveles de GSH en hígado y riñón de ratas Sprague-Dawley diabéticas inducidas con estreptozotocina. A los 30 días de experimentación, se encontró que la actividad hepática de CAT, así como los niveles hepáticos y renales de GSH se redujeron de forma significativa en comparación al control. Sin embargo, se observó un aumento de la actividad de GPX en el hígado, aumento de la actividad de SOD en los riñones, aumento de la CAT renal y disminución de la actividad renal de GR. Estos resultados comparados con los obtenidos en este estudio sugieren que existe un desequilibrio del estado oxidativo en ambos casos, por lo cual se

considera que la dieta alta en grasa saturada incrementó la oxidación de los ácidos grasos a través de la vía de oxidación peroxisomal que se asocia con una mayor generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La actividad enzimática de la catalasa, una enzima localizada en los peroxisomas que cataliza la descomposición de H_2O_2 incrementó, y este aumento sugiere una respuesta compensatoria del sistema de defensa bajo una condición de incremento de generación hepática y renal de H_2O_2 . Por último, se considera que los resultados sugieren que las actividades de peroxidasa y catalasa son espacial y temporalmente coordinadas.

Un incremento en la concentración de los productos finales de la peroxidación lipídica es la prueba más frecuentemente citada para determinar la participación de los radicales libres en las enfermedades humanas. Sin embargo, es probable que el daño oxidativo ocurra en muchas enfermedades humanas principalmente crónicas y desempeñe un papel patológico importante en algunas de ellas. Un blanco frecuente del ataque de los agentes prooxidantes son los lípidos de las membranas de las células renales, ocasionando la peroxidación de estos. Esta lipoperoxidación compromete la integridad de la membrana basal y del epitelio de los órganos, por lo que también puede afectar las funciones de transporte realizadas en el túbulo renal (Halliwell y Chirico, 1993; Castillo y col., 2003).

Por lo anterior, en este estudio se evaluó la concentración de MDA en el riñón de los animales alimentados con una dieta alta en grasa saturada, aunque no estadísticamente significativo, la concentración de MDA disminuyó (5%) comparado con el control; dichos resultados también han sido observados en otros estudios. Prapurna y colaboradores (1999) investigaron los efectos de la grasa de la dieta y la edad en el nivel de MDA en el cerebelo, riñón e hígado de ratas Fischer 344 hembras de 57 días de edad, alimentadas con dietas que contenían diferentes niveles de aceite de maíz (3, 5, 10, 15, o 20%) por un periodo de 2, 10 o 20 semanas. A las 2 semanas se observó que las ratas con las dietas de 3 y 5% de aceite de maíz produjeron niveles significativamente más elevados de MDA en comparación con las alimentados con dietas altas en grasa, es decir, 10, 15 o 20% de aceite de maíz. Después de 20 semanas, la concentración de MDA en cada uno

de los tres órganos estudiados no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las dietas de ratas que consumían 10, 15, o 20% de aceite de maíz, observándose además una disminución en el nivel de MDA, tanto en el cerebelo y el hígado. Dichos resultados no concuerdan con los observados por Vijayakumar y colaboradores (2004) quienes llevaron a cabo un estudio con ratas Wistar de 8-9 semanas de edad las cuales fueron alimentadas con una dieta alta en grasa (20% aceite de coco, 2% de colesterol y 0.125% sales biliares mezclada con la dieta estándar de pellets, la cual contenía 5% de grasa) por 10 semanas. El riñón, corazón e hígado de dichos animales mostraron un aumento significativo en la concentración de MDA (1.54, 1.55 y 1,49 veces, respectivamente) en comparación con el grupo control. Milagro y colaboradores (2006) conformaron dos grupos de ratas Wistar macho con un peso 265 gramos, el grupo de animales (control) fue alimentado con una dieta estándar (16.60% de la energía en forma de proteínas, 73.10% de energía en forma de carbohidratos y 10.30% de la energía en forma de lípidos) y los animales restantes fueron alimentados con una dieta alta en grasa para generar una obesidad inducida por una dieta modelo (9.30% de la energía en forma de proteínas, 31.50% de la energía como carbohidratos y 59.20% de la energía como lípidos). Al final del período experimental (56 días), los animales alimentados con la dieta alta en grasas mostraron mayor peso corporal, una mayor deposición de grasa y el peso total del hígado, y el consumo de energía aumentó en comparación con los de la dieta estándar de grasa. Se observó un aumento de las concentraciones de MDA en el hígado de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa en comparación con las ratas control. Los niveles elevados de MDA en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa sugieren que el incremento de la peroxidación de lípidos en los depósitos de grasa podría estar relacionada y tener efectos perjudiciales en los hepatocitos y otras células hepáticas. En los hepatocitos, las EROs y los productos de la peroxidación lipídica pueden poner en peligro la cadena respiratoria, ya sea directa o indirectamente a través de daño oxidativo en el genoma mitocondrial. Estas características, a su vez, conducen a la generación de más EROs, y se produce un círculo vicioso. A diferencia de los

estudios de Milagro y colaboradores (2006) y Vijayakumar y colaboradores (2004), los animales empleados en este estudio presentaron una disminución no significativa en la concentración renal de MDA, lo que pudiera deberse a la eficiente remoción de productos de peroxidación lipídica y H_2O_2 por GPX y CAT respectivamente, las cuales se encuentran elevadas en este órgano. No obstante, esta disminución en la concentración puede ser el desequilibrio inicial susceptible a inducir futuras alteraciones metabólicas, como las ocurridas durante la diabetes y sus complicaciones.

VIII. CONCLUSIONES.

En el presente estudio se demuestra que una dieta alta en grasa saturada genera un estrés oxidativo que altera los sistemas antioxidantes, modificando así los niveles de biomarcadores antioxidantes enzimáticos (CAT, GPX y GST) y no enzimáticos como GSH en hígado y riñón y de MDA en riñón de ratas macho Sprague-Dawley jóvenes.

La ingesta prolongada de una dieta alta en grasa saturada puede dar lugar a una disminución de la actividad hepática y renal de GPX como sucede en la diabetes, debido a la inactivación de esta enzima y a la insuficiente disponibilidad de GSH.

Los peróxidos lipídicos son removidos de manera eficiente por la GPX y, en última instancia, el H_2O_2 por la CAT por lo que la concentración de MDA no se incrementa al someterse a los animales a una dieta alta en grasa saturada.

A las 12 semanas con una dieta alta en grasa saturada se observa el nivel de glucosa en ayuno normal pero la respuesta después de una carga de glucosa es lenta a partir de 120 min, los niveles de PCR, insulina, creatinina y triglicéridos en suero así como de la proteína, creatinina y triglicéridos en orina se encuentran elevados, por otro lado, la tasa de filtración glomerular disminuye lo que denota lesión del riñón.

En general, estos resultados sugieren que la administración de una dieta alta en grasa saturada promueve un estrés oxidativo que compromete los mecanismos endógenos de defensa antioxidante, elevando la actividad de enzimas antioxidantes (GPX y CAT) que juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis redox celular, pero disminuye GST y GSH, el cual podría agotarse o disminuir bajo condiciones continuas y crónicas, promoviendo el desarrollo de los efectos adversos asociados al estrés oxidativo.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

Aaseth, J. y Stoa, G. 2000. Glutathione in overweight patients with poorly controlled type 2 diabetes. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. Vol. 13: 105-111.

Adéchian, S., Giardina, S., Rémond, D., Papet, I., Buonocore, D., Gaudichon, C., Dardevet, D., Marzatico, F. y Mosoni, L. 2009. Excessive energy intake does not modify fed-state tissue protein synthesis rates in adult rats. *Obesity*. Vol. 17: 1348-1355.

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. Vol. 105: 121-126.

Albarrán, M. E. 2007. Efecto modulador de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) sobre biomarcadores de estrés oxidativo en ratas Wistar y diabéticas inducidas con estreptozotocina. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 18-19.

Al-Gubory, K. H., Bolifraud, P., Germain, G., Nicole, A. y Ceballos-Bicot, I. 2004. Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Society for Reproduction and Fertility*. Vol. 128: 767-774.

Álvarez, E., De la Rosa, L. A., Martínez, N. R. y González, G. A. 2007. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Vol. 5: 329-334.

Arroyo, P. 2008. La alimentación en la evolución del hombre: su relación con el riesgo de enfermedades crónico degenerativas. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. Vol. 65: 431-440.

Astrup, A., Dyerberg, J., Selleck, M. y Stender, S. 2008. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obesity Reviews*. Vol. 1: 48-52.

Avello, M. y Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. Vol. 494: 161-172.

- Benitez, C. V. 2008.** Efecto de extractos acuosos y metanólicos de plantas comestibles sobre biomarcadores antioxidantes en ratas Sprague-Dawley. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Químico en Alimentos. 8-9.
- Bersh, S. 2006.** La obesidad: aspectos psicológicos y conductuales. Revista Colombiana de Psiquiatría. Vol. 35: 537-546.
- Bonvecchio, A., Safdie, M., Theodore, F., Aburto, N., Gust, T., Villanueva, M., Nava, F. y Rivera, J. A. 2007.** Diseño y evaluación de una estrategia para la prevención de la obesidad en el niño mexicano. Salud Pública de México. Vol. 49: 229.
- Cabello, M. L. y Zúñiga, J. G. 2007.** Aspectos intrapersonales y familiares asociados a la obesidad: un análisis fenomenológico. Ciencia UANL. Vol. 10: 183-188.
- Castillo, R., Huerta, P., Carrasco, R. y Rodrigo, R. 2003.** Estrés oxidativo y daño renal. Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamericana. Vol. 8: 43-52.
- Catalá, A., Estrany, M. E., Proenza, A. M., Gianotti, M. y Lladó, I. 2008.** Skeletal muscle and liver oxidative metabolism in response to a voluntary isocaloric intake of a high fat diet in male and female rats. Cellular Physiology and Biochemistry. Vol. 22: 327-336.
- Ceriello, A. y Motz, E. 2004.** Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Vol. 24: 816-823.
- Charles, L. E., Burchfiel, C. M., Violanti, J. M., Fekedulegn, D., Slaven, J. E., Browne, R. W., Hartley, T. A. y Andrew, M. E. 2008.** Adiposity measures and oxidative stress among police officers. Obesity. Vol. 16: 2489-2497.
- Chen, D. y Ping, Q. 2008.** Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. International Journal of Molecular Sciences. Vol. 9: 1196-1206.
- Devlin, T. M. 2004.** Bioquímica clínica. 4ta. ed., Reverte, España: 486, 592.

Egger, G. y Dixon, J. 2008. Should obesity be the main game? Or do we need an environmental makeover to combat the inflammatory and chronic disease epidemics? *Obesity Reviews*. Vol. 10: 237-249.

Ellman, G. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 82: 70-79.

ENSANUT. 2006. 2a. Edición. México. Instituto Nacional de Salud Pública.

Férrandez, N., Carvajal, M. y Olmos, E. 2004. Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Annals of Botany*. Vol. 93: 53-60.

García, R. J. C. 2004. Glutathión-S-transferasa como sistema protector en los procesos neurodegenerativos. *Ciencias Biológicas*. Vol. 35: 56-58.

Girón, M. D., Salto, R., González, Y., Girón, J. A, Nieto, N., Periago, J. L., Suárez, M. D. y Hortelano, P. 1999. Modulation of hepatic and intestinal glutathione-S-transferases and other antioxidant enzymes by dietary lipids in streptozotocin diabetic rats. *Chemosphere*. Vol. 38: 3003-3013.

Gletsu, N., Hansen, J. M., Jones, D. P., Go, Y. M., Torres, W. E., Ziegler, T. R. y Lin, E. 2009. Loss of total and visceral adipose tissue mass predicts decreases in oxidative stress after weight loss surgery. *Obesity*. Vol. 17: 439-446.

Godfrey, K. M. y Barker, D. J. P. 2000. Fetal nutrition and adult disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 71: 1344s-1352s.

Gómez, R. A., Rábago, R., Castillo, E., Vázquez, F., Barba, R., Castell, A., Andrés, S. y Wachter, N. H. 2008. Tratamiento del niño obeso. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. Vol. 65: 528-546.

González, M. C., Betancourt, M. y Ortiz, R. 2000. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. Vol. 25: 3-9.

Greathouse, K. L., Samuels, M., DiMarco, N. M. y Criswell D. S. 2005. Effects of increased dietary fat and exercise on skeletal muscle lipid peroxidation and antioxidant capacity in male rats. *European Journal of Nutrition*. Vol. 44: 429-435.

Green, K., Brand, M. D. y Murphy, M. P. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. Vol. 53: S110-S118.

Habig, W. H., Pabst, M. J. y Jabkoby. 1974. Glutathione-S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 249: 7130-7139.

Halliwell, B. y Chirico, S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 57: 715S-725S.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U. y Jowsey, I. R. 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*. Vol. 45: 51-88.

Hidalgo, M. C., Expósito, A., Palma, J. M. y de la Higuera, M. 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol. 34: 183-193.

Hsu, C. L. y Yen, G. C. 2007. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*. Vol. 98: 727-735.

INSP, 2006. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006.

IOM, 2010. Institute of Medicine. <http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx>. Septiembre 11 de 2010.

Islas, L. y Peguero, M. 2006. Obesidad infantil. *Boletín de Práctica Médica Efectiva*. Vol. 1: 1-6.

Kaul, N., Siveski, N., Thomas, T. P., Hill, M., Khaper, N. y Singal, P. K. 1995. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition*. Vol. 11: 551-554.

Knutson, M. D., Walter, P. B., Ames, B. N. y Viteri, F. E. 2000. Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *The Journal of Nutrition*. Vol. 130: 621-628.

Kowluru, R. A. y Chan, P. S. 2007. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research*. Vol. 10: 1-12.

Langley, S. C. y Jackson, A. A. 1994. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clinical Science*. Vol. 86: 217-222.

- Lee, S. J., Choi, S. K. y Seo, J. S. 2009.** Grape skin improves antioxidant capacity in rats fed a high fat diet. *Nutrition Research and Practice*. Vol. 4: 279-285.
- Limaye, P. V., Raghuram, N. y Sivakami, S. 2003.** Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 243: 147-152.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 193: 265-275.
- Manjunatha, H. y Srinivasan, K. 2007.** Hypolipidemic and antioxidant effects of curcumin and capsaicin in high-fat-fed rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 85: 588-596.
- Marczuk, D., Hryniewiecki, T., Paluszak, J., Krauss, H. y Nowak, D. 2009.** High fat content in diets and oxidative stress in livers of non-diabetic and diabetic rats. *Polish Journal of Environmental Studies*. Vol. 18: 249-253.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A. y Watkins III, J. B. 2003.** Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. Vol. 17: 24-38.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. y Ahern, K. G. 2002.** *Bioquímica*. 3ra. ed., Pearson Educación, Madrid: 1290.
- Mendoza, M. 2009.** Efecto protector de frijol negro 8025 sobre el daño pancreático y renal generado durante el desarrollo y complicaciones de la diabetes. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 8, 19.
- Milagro, F. I., Campión, J. y Martínez, A. 2006.** Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity*. Vol. 14: 1118-1123.
- Mozer, T. J., Tiemeier, D. C. y Jaworski, E. G. 1983.** Purification and characterization of corn glutathione-S-transferase. *Biochemistry*. Vol. 22: 1068-1072.
- Nair, S., Singh, S. V. y Krishan, A. 1991.** Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry*. Vol 12: 336-342.

Nguyen, X. M. T., Lane, J., Smith, B. R. y Nguyen, N. T. 2009. Changes in inflammatory biomarkers across weight classes in a representative US population: a link between obesity and inflammation. *The Journal of Gastrointestinal Surgery*. Vol. 13: 1205-1212.

Nistala, R., Whaley, A. y Sowers, J. 2008. Redox control of renal function and hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 10: 2047-2089.

Novo, E. y Parola, M. 2008. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. Vol. 1: 1-58.

Olusi, S. O. 2002. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *International Journal of Obesity*. Vol. 26: 1159-1164.

OMS, 2010. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/es/>. Septiembre 17 de 2010.

Ortega, A., Mena, S. y Estrela, J. 2010. Oxidative and nitrosative stress in the metastatic microenvironment. *Cancers*. Vol. 2: 274-304.

Papas, A. M. 1998. Antioxidant status, diet, nutrition and health. 1ra. ed., CRC Press, USA: 3-4, 14-16, 23, 237.

Perichart, O. Balas, M., Schiffman, E., Barbato, A. y Vadillo, F. 2007. Obesity increases metabolic syndrome risk factors in school-aged children from an urban school in Mexico city. *Journal of the American Dietetic Association*. Vol. 107: 81-91.

Plagia, D. E. y Valentine, W. N. 1976. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. Vol. 70: 158-169.

Prapurna, R., Lu, M. H., Lewis, S. M., Djuric, Z. Tang, N. y Hart, R. W. 1999. The effect of dietary fat on malondialdehyde concentrations in fischer 344 rats. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol. 110: 87-99

Quezada, T., Jaramillo, F., Valdivia, A., Reyes, J. L., Ortiz, R. y Rodríguez, M. L. 2002. Estudio comparativo de la concentración del glutatión reducido y actividades de gammaglutamiltransferasa y transferasa de glutatión en hígado y riñón de pollos y ratas. *Veterinaria México*. Vol. 33: 125-135.

- Qui, J. A., Peña, L. M., Castro, L. A. y Miranda, M. de L. 2010.** Peroxidación lipídica como marcador de muerte celular en cultivos celulares de cempasúchil (*Tagetes erecta L.*). Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 28: 165.
- Regidor, E., Gutiérrez, J. L., Banegas, J. R., Domínguez, V. y Rodríguez, F. 2007.** Influencia a lo largo de la vida de las circunstancias socioeconómicas, de la inactividad física y la obesidad sobre la presencia de síndrome metabólico. Revista Española de Salud Pública. Vol. 81: 25-31.
- Rios, M. C. 2006.** Efecto del consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) sobre la incidencia de cáncer de colon y su relación con la enzima glutatión S- transferasa. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. 20-21.
- Rivera, J. A. 2007.** Potencial de la dieta y la actividad física para la prevención de enfermedades crónicas. Salud Pública de México. Vol. 49: 17.
- Rodrigo, R., Prat, H., Passalacqua, W., Araya, J., Guichard, C. y Bächler, J. P. 2007.** Relationship between oxidative stress and essential hypertension. Hypertension Research. Vol. 30: 1159-1167.
- Rodríguez, R. 2006.** La obesidad infantil y los efectos de los medios electrónicos de comunicación. Investigación en Salud. Vol. 8: 95-98.
- Romero, E. y Vásquez, E. M. 2008.** La obesidad en el niño, problema no percibido por los padres. Su relación con enfermedades crónicas y degenerativas en la edad adulta. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. Vol. 65: 519-527.
- Rosales, D. G. 2005.** Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos metanólicos de nueve especies vegetales comestibles. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. 3.
- Saldaña, A., García, B. E., Enamorado, A. y García, J. C. 2004.** El estrés oxidativo en la insuficiencia renal crónica. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. Vol. 23: 118-120.
- Salvadó, R. J. 2005.** Efecte antígenotòxic i modilador de l'expressió d'enzims antioxidants per procianidines del vi negre en condicions d'èxtrés oxidatiu. Univeritat

Rovira i Virgili. Tarragotna, Italia. Tesis para obtener el título de Doctora en Bioquímica. 26.

Santhakumari, P., Prakasam, A. y Pugalendi, K. V. **2003**. Modulation of oxidative stress parameters by treatment with *Piper betle* leaf in streptozotocin induced diabetic rats. Indian Journal of Pharmacology. Vol. 35: 373-378.

SSA. **1998**. NOM-174-SSA1-1998, Para el manejo integral de la obesidad.

Strother, R. M., Thomas, T. G., Otsyula, M., Sanders, R. A. y Watkins, J. M. **2001**. Characterization of oxidative stress in various tissues of diabetic and galactose-fed rats. International Journal of Experimental Diabetes Research. Vol. 2: 211-216.

Ugochukwu, N. H. y Cobourne, M. K. **2003**. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry. Vol. 336: 73-81.

Vásquez, E. M. y Romero, E. **2008a**. Esquemas de alimentación saludable en niños durante sus diferentes etapas de la vida. Parte I. Primeros dos años de vida. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. Vol. 65: 593-604.

Vásquez, E. M. y Romero, E. **2008b**. Esquemas de alimentación saludable en niños durante sus diferentes etapas de la vida. Parte II. Preescolares, escolares y adolescentes. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. Vol. 65: 605-615.

Venkateswaran, S. y Pari, L. **2003**. Effect of *Coccinia indica* leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 84: 163-168.

Vijayakumar, R. S., Surya, D. y Nalini, N. **2004**. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. Redox Report. Vol. 9: 105-110.

Vincent, H. K., Innes, K. E. y Vincent, K. R. **2007**. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. Diabetes, Obesity and Metabolism. Vol. 9: 813-839.

Vizmanos, B., Hunot, C. y Capdevila, F. **2006**. Alimentación y obesidad. Investigación en Salud. Vol. 8: 79-85.

Wang, C. Z., Mehendale, S. R. y Yuan, C. S. 2007. Commonly used antioxidant botanicals: active constituents and their potential role in cardiovascular illness. *American Journal of Chinese Medicine*. Vol. 35: 543-558.

Whitaker, R. C., Pepe, M. S., Wright, J. A., Seidel, K. D. y Dietz, W. H. 1998. Early adiposity rebound and the risk of adult obesity. *Pediatrics*. Vol. 101: 1-6.

Williams, S. M. 2005. Weight and height growth rate and the timing of adiposity rebound. *Obesity Research*. Vol. 13: 1123-1130.

Xiong, S. L., Li, A. L., Jin, Z. Y. y Chen, M. 2007. Effects of oral chondroitin sulfate on lipid and antioxidant metabolisms in rats fed a high-fat diet. *Journal of Food Biochemistry*. Vol. 31: 356-369.

X. ANEXOS.

ANEXO 1. Solución amortiguadora de Tris/Sacarosa, pH 7

- a) Pesar 7.9 g de Tris-HCl
- b) Pesar 2.1 g de $MgCl_2$
- c) Pesar 1.9 g de KCl
- d) Pesar 85.6 g de sacarosa ultra pura
- e) Disolver con 1000 mL agua destilada
- f) Medir el pH antes de aforar. En caso de almacenarse por un período prolongado, esterilizar mediante filtración ($45 \mu M$) al vacío en una atmósfera estéril.

ANEXO 2. Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7

- a) Pesar 1.362 g de NaH_2PO_4
- b) Pesar 2.67 g de Na_2HPO_4
- c) Disolver en 500 mL de agua destilada y medir el pH antes de aforar.

ANEXO 3. Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.5

- a) Pesar 4.725 g de NaH_2PO_4
- b) Pesar 2.237 g de Na_2HPO_4
- c) Disolver en 500 mL de agua destilada y medir el pH antes de aforar.

ANEXO 4. Solución de trabajo para la determinación de proteína (Kit de BCA).

- a) Solución de trabajo = 10 mL de reactivo A + 200 μL de reactivo B.

ANEXO 5. Solución amortiguadora TRIS 0.2 M, EDTA 0.02 M, pH 8.2

- a) Pesar 0.744 g de EDTA, para preparar 100 mL de EDTA con una concentración de 0.02 M.
- b) Pesar 3.152 g de TRIS, para preparar 100 mL de TRIS con una concentración de 0.2 M.

- c) Para ambas soluciones diluir en agua destilada.
- d) Ajustar el pH antes de aforar.

ANEXO 6. Solución de trabajo inicial para la curva estándar de GSH.

- a) Pesar 0.00184 g de GSH.
- b) Disolver en 10 mL de solución amortiguadora TRIS 0.2 M, EDTA 0.02 M, pH 8.2.
- c) Almacenar en refrigeración.

ANEXO 7. Solución de DTNB 2.46 mM

- a) Pesar 0.0243 g de ácido 5,5'-ditiobis dinitrobenzoico (DTNB).
- b) Disolver en 25 mL de metanol.

ANEXO 8. Solución de TCA al 20%

- a) Pesar 1.1051 g de ácido tricloro-acético.
- b) Disolver en 5 mL de agua destilada.

ANEXO 9. Solución de trabajo GSH 3 mM

- a) Pueden prepararse una solución inicial y el día del experimento se puede preparar la solución de trabajo; el volumen debe modificarse de acuerdo a la cantidad de muestras.
- b) La solución inicial 150 mM: Pesar 0.0461 g de GSH y disolver en 1 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M pH 6.5.
- c) Para la solución de trabajo mezclar 140 μ L de solución inicial GSH 150 mM y añadir 6.86 mL de solución amortiguadora de fosfatos de 0.1 M pH 6.5.
- d) Los volúmenes deben ajustarse de acuerdo al número de muestras.

ANEXO 10. Solución de trabajo CDNB 2 mM

- a) Pueden prepararse una solución inicial y el día del experimento se prepara la solución de trabajo.

- b) La solución inicial 60 mM: Pesar 0.0244 g de CDNB y añadir 2 mL de etanol 100% puro.
- c) Para la solución de trabajo mezclar 300 μ L de solución inicial CDNB 60 mM con 8.7 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.5.

ANEXO 11. Solución amortiguadora de reacción 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 8.

- a) Pesar 0.788 g de Tris HCl.
- b) Pesar 0.01861 g de EDTA.
- c) Disolver en 500 mL de agua destilada.
- d) Ajustar el pH antes de aforar con agua desionizada.

ANEXO 12. Cocktail de GSH/GR (42 mM GSH, 10 unidades de GR/mL)

- a) Pesar 0.0129 g de glutatión reducido (GSH).
- b) Adicionar 50 μ L de glutatión reductasa (256 unidades/mL).
- c) Aforar a 1 mL con solución amortiguadora.
- d) El cocktail no se debe almacenar, la solución es estable por dos horas, por lo cual debe prepararse antes de cada determinación.

ANEXO 13. NADPH 5 mM.

- a) Pesar 0.004167 g de NADPH en 1 mL de solución amortiguadora de reacción en la determinación de GPX.
- b) Se debe preparar inmediatamente antes de usarse.
- c) La solución es estable por 5 días a 4 °C.
- d) El NADPH es sumamente inestable, consérvese a -20 °C en desecador.

ANEXO 14. Hidroxicumeno 1 mM.

- a) Pipetear 4.6 μ L de hidroxicumeno al 80% y aforar a 25 mL con agua destilada estéril.

ANEXO 15. Peróxido de hidrógeno 30 mM.

- a) Diluir 340 μL de H_2O_2 al 30% en 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.

ANEXO 16. Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4

- a) Pesar 1.38 g de NaH_2PO_4 para preparar 100 mL de NaH_2PO_4 con una concentración de 0.1 M (solución 1).
- b) Pesar 1.42 g de Na_2HPO_4 para preparar 100 mL de Na_2HPO_4 con una concentración de 0.1 M (solución 2).
- c) Para ambas soluciones diluir en agua destilada.
- d) Ajustar el pH antes de aforar.
- e) Para obtener el pH 7.4 mezclar 15 mL de la solución 1 con 35 mL de la solución 2.

ANEXO 17. Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 con KCl 1.17%.

- a) Añadir 0.117 g de KCl por cada 10 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 indicada en el Anexo 16.

ANEXO 18. TBA al 0.67%

- a) Disolver 0.234 g de ácido tiobarbitúrico en 35 mL de agua destilada.

ANEXO 19. TCA al 10%

- a) Disolver 3.5 g de TCA en 35 mL de agua destilada.