



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

**Administración de dieta hipercalórica y hierro como
generadores de estrés oxidativo en animales de
experimentación**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Nutrición Humana

Presenta:

José Luis Villanueva Juárez

Dirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

SINODALES

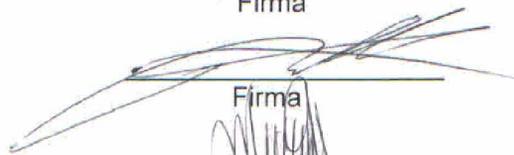
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente


Firma

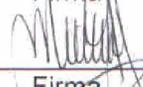
Dra. Karina de la Torre Carbot
Secretario


Firma

M. en C. Roberto Ferriz Martínez
Vocal


Firma

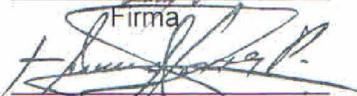
Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente


Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Suplente


Firma


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Director de la Facultad


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Octubre 2012
Querétaro, Qro.
México D.F.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA.
TERESA GARCÍA GASCA**

DEDICATORIA

*A la vida, Qué es la que construimos de sueños,
al vivir por ellos... Cada instante es un sueño,
cada sueño es un camino, una oportunidad para
materializar ese
instante, un camino
que se hace a cada paso, forjando una meta,
cada paso puede llevar tropiezos, quizá lo mejor,
para valorar lo que has logrado, permite un nuevo
espacio para llenarlo
con lo mejor de los
tropiezos, tropiezos que te harán experimentar y
sufrir, pero verás la realidad, una realidad que
te hará crecer en humanismo, amor, sabiduría.*

*La vida es uno mismo, se es parte de la vida y vivirla es el mejor de los sueños... solo hay una
oportunidad...*

Joselo 2010

AGRADECIMIENTOS

Durante los estudios de posgrado y la realización de este trabajo se otorgaron facilidades por el Servicio de Nutriología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ).

En algún momento de nuestra existencia volteamos a mirar hacia atrás, nos damos cuenta que se lograron muchas cosas materiales, que nos hicieron sentir plenos, con la vida en las manos, pero al mismo tiempo todo esto no es suficiente en la existencia. Entonces nos damos cuenta que cada pedazo de nuestra vida dedicada a los demás, no es comparable con lo material, al mismo tiempo que se construye y se forma parte de otra vida. Momentos que llenan de dicha al alma, que se pueden sentir, que se llevan en el corazón hasta el último parpadeo de la existencia...

Gracias por el tiempo dedicado a este trabajo.

ÍNDICE

Índice		i
Índice de cuadros		ii
Índice de figuras		iii
Resumen		iv
Summary		v
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	3
2.1	Oxígeno, especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo	3
2.2	Sistemas de defensa antioxidante	9
2.3	Dieta y estrés oxidativo	19
2.4	Hierro	30
2.5	Modelos para el estudio de estrés oxidativo	32
III.	JUSTIFICACIÓN	34
IV.	HIPÓTESIS	35
V.	OBJETIVOS	35
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
VIII.	CONCLUSIONES	58
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Análisis proximal de las dietas experimentales.	42
2	Características generales de los animales alimentados con dieta estándar vs dieta hipercalórica durante el estudio.	44
3	Peso de grasa y órganos de ratas alimentadas con DE y dieta DH durante 12 semanas.	49
4	Parámetros metabólicos de animales alimentados con dieta estándar vs alimentados con dieta hipercalórica.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Esquema del ataque de un radical libre a una biomolécula.	4
2	Producción y participación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en procesos de estrés oxidativo.	6
3	Mecanismo de los sistemas de defensa antioxidante endógeno enzimático, endógeno no enzimático y exógeno.	11
4	Efectos de una dieta de alta densidad energética sobre desórdenes metabólicos y su relación con estrés oxidativo.	21
5	Fisiopatología del síndrome metabólico.	23
6	Síndrome metabólico y su relación con el estrés oxidativo.	24
7	Esquema de la glicación y glicosilación de proteínas.	26
8	Proceso fisiológico de peroxidación de lípidos y alteración de la membrana biológica y productos finales.	27
9	Mecanismos por los cuales la oxidación de ácidos grasos pueden inhibir la oxidación de glucosa.	29
10	Vías de inducción de estrés oxidativo por metales de transición.	31
11	Reacción de Fenton.	31
12	Diseño experimental para el estudio del modelo de estrés oxidativo en ratas Wistar a partir de una dieta hipercalórica.	37
13	Comportamiento y ganancia de peso corporal, en animales alimentados con dieta estándar vs dieta hipercalórica durante 12 semanas de intervención.	46
14	Análisis del consumo de alimento en ratas Wistar alimentadas con DE vs DH.	47
15	Ingesta de energía en ratas Wistar alimentadas con DE vs DH.	47
16	Diferencia de pesos ajustados a los controles para grasa visceral y órganos entre los diferentes grupos.	49
17	Valores séricos de glucosa, colesterol y triglicéridos.	52
18	Niveles séricos de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en ausencia o presencia de hierro en ratas alimentadas con DE y DH.	53
19	Niveles séricos de peróxido de hidrógeno en ausencia o presencia de hierro en animales alimentados con dieta estándar y dieta hipercalórica.	54
20	Niveles séricos de la actividad enzimática de la catalasa en ausencia o presencia de hierro.	56
21	Concentración sérica de malondialdehído en ausencia o presencia de hierro.	57

RESUMEN

El estrés oxidativo resulta del desequilibrio entre especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. El exceso de azúcar, grasa y hierro pueden ser factores detonantes de estrés oxidativo. El propósito del presente estudio fue desarrollar un modelo de estrés oxidativo en animales de experimentación a partir de una dieta hipercalórica en presencia o ausencia de hierro. Se emplearon 25 ratas Wistar, hembras, de 6 semanas de edad, mantenidas en ambiente controlado y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Las ratas se distribuyeron en 2 grupos (n = 13, n = 12), alimentadas *ad libitum* con dieta estándar (DE) y dieta hipercalórica (DH) durante 12 semanas. Cinco días previos al sacrificio cada grupo se subdividió en 2 (DE, DEFe; DH, DHFe) y se les inyectó solución salina (DE y DH) o hierro dextrán (DEFe y DHFe) (0.10, 0.25 y 0.50 mg/mL) y posteriormente fueron sacrificados por decapitación. Los animales alimentados con DH presentaron tendencia a ganar peso (4.07%), disminución de peso en hígado y riñón ($p \leq 0.05$) y un aumento en los niveles de H_2O_2 . La administración de hierro dextrán provocó un aumento de malondialdehído independiente al tipo de dieta. Los resultados sugieren que la DH provoca sobreproducción de H_2O_2 , pero la presencia de hierro como catalizador es un factor determinante para provocar la peroxidación lipídica.

Palabras clave: Dieta hipercalórica, estrés oxidativo, hierro dextrán, peroxidación lipídica.

SUMMARY

Oxidative stress results from imbalance between reactive oxygen species and antioxidant systems. Too much sugar and fat in the diet can be a trigger factors for oxidative stress. The purpose of this study was to develop a model of oxidative stress in experimental animals based on high-caloric diet in the presence or absence of iron. Twenty-five female Wistar rats of 6 weeks old were maintained in a controlled environment with light-dark cycles of 12 hours. The rats were divided into 2 groups (n=13, n=12), fed ad libitum with standard diet (SD) or high-caloric diet (HD) for 12 weeks. Five days prior to sacrifice each group was subdivided into 2 (SD, SDFe; HD, HDFe) and were injected with saline solution (SD and HD) (0.10, 0.25 and 0.50 mg / mL) or iron dextran (SDFe and HDFe) and then were sacrificed by decapitation. Animals fed DH had a tendency to gain weight (4.07%) and decrement in liver and kidney weight ($p < 0.05$). Animals treated only with DH showed increased levels of H_2O_2 but administration of iron dextran caused an increase of malondialdehyde levels independent on the type of diet. The results suggest that DH leads to overproduction of H_2O_2 but the presence of iron as a catalyst factor for causing lipid peroxidation.

Key words: High fat diet, oxidative stress, iron dextran, lipid peroxidation.

I. INTRODUCCIÓN.

La mayoría de los organismos eucariontes y los seres humanos necesitan del oxígeno para mantener la producción de energía y sobrevivir. Sin embargo, en el metabolismo se pueden generar niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ERO) que son potencialmente nocivos a nivel celular. Diversos factores provocan un aumento de estas especies; la alimentación con alta densidad energética es un ejemplo y está considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de alteraciones metabólicas y enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con estrés oxidativo (Papp, 1995; Barja de Quiroga 1997; Pérez 2000).

La magnitud del patrón epidemiológico de estas enfermedades ha cambiado a escala mundial en las últimas décadas. La hipótesis con mayor aceptación, refiere que la modificación negativa de factores ambientales, estilo de vida, hábitos de alimentación, entre otros, son los responsables de un aumento en la producción de radicales libres (RL), especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Tapia y Araya, 2006; Kuwabara *et al.*, 2008). Estos factores, sobre todo hábitos de alimentación (exceso de grasa y azúcar), condicionan a una disminución de antioxidantes endógenos de manera directa o indirecta (enzimáticos y no enzimáticos) ocasionando cambios metabólicos con efecto negativo en la salud humana que se conoce como estrés oxidativo (EO) y se caracteriza por una producción excesiva de RL, ERO y ERN. La exposición a altas concentraciones de oxígeno, contaminantes, enfermedades crónico degenerativas o infecciones agudas aumentan la concentración de especies reactivas y desencadenan una respuesta inflamatoria sistémica (Hernández *et al.*, 2004). El mecanismo antioxidante endógeno se ve más alterado por una disminución en la ingesta de antioxidantes exógenos (nutrimentos, vitaminas, sustancias bioactivas) o aminoácidos azufrados necesarios para la generación de glutatión, indispensables como cofactores de enzimas endógenas antioxidantes. Si el EO se mantiene afecta al metabolismo celular a través del daño a proteínas, peroxidación de lípidos y rupturas de moléculas de ADN (Lesschaeve y Noble 2005; Liu *et al.*, 2009).

Se ha descrito una relación estrecha entre la alimentación, alteraciones metabólicas, EO y enfermedades crónico-degenerativas (Henning *et al.*, 2007). La densidad energética de los

alimentos demanda altas concentraciones de oxígeno ya que para la producción de energía necesaria para procesos celulares el oxígeno es reducido a agua por acción del complejo citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial y bióxido de carbono. Aproximadamente entre el 2 a 5 % del oxígeno es reducido de forma incompleta al aceptar menor número de electrones, lo que origina ERO (Andresen *et al.*, 2006; García-Gasca *et al.*, 2009). La disponibilidad de azúcares y grasa en la dieta se relaciona con hiperglucemia, hipertrigliceridemia, oxidación de LDL y obesidad, condiciones metabólicas que contribuyen a la generación de ERO y, por consiguiente, desarrollo de enfermedades crónico degenerativas (Ackroff *et al.*, 2007; Frazier *et al.*, 2008).

Se han estudiado diferentes modelos biológicos para generar estrés oxidativo *in vivo*, donde se emplean agentes tóxicos, ingredientes específicos (colesterol, ácido cólico) en la dieta, de tal forma que es posible provocar alteraciones puntuales como, disfunción vascular (Diniz *et al.*, 2004), enfermedad gastrointestinal (Wit *et al.*, 2008) y EO (Rocha *et al.*, 2009), entre otros. En el caso de EO, los modelos empleados no son siempre reproducibles ya que las sustancias químicas o ingredientes empleados en la intervención los hace de alto costo y artificiales (Balkan *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2009) y que requieren de equipo y técnicas sofisticadas por lo que no siempre se cuenta con estos recursos materiales, además de que muchos modelos no son aplicables a la alimentación del ser humano. Por lo anterior, resulta necesario desarrollar un modelo biológico de alimentación para animales de experimentación que permitan generar estrés oxidativo a base de azúcar, grasa (densidad energética), componentes que forman parte de la alimentación del ser humano y de hierro, un mineral altamente empleado en el ser humano, características que hagan al modelo fácilmente reproducible y económico (Ackroff *et al.*, 2007).

II. ANTECEDENTES.

2.1 OXÍGENO, ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO.

2.1.1 Oxígeno (O₂).

Molécula identificada por Sheele y Priestley en 1777, el primero describió los efectos tóxicos del oxígeno sobre los seres vivos y el segundo estableció que el oxígeno mantiene la combustión. El efecto tóxico del O₂ es mayor cuanto más alta sea la tasa metabólica. Sin embargo, es indispensable para la respiración de organismos superiores y a su vez peligroso para su existencia debido al efecto tóxico que le confiere la condición de radical libre (RL) (Papp, 1995; Barja de Quiroga, 1997; Pérez, 2000).

El oxígeno es el elemento más abundante en carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Vieira-Silva, 2008); es esencial para el metabolismo, permite obtener energía para el organismo a través de la fosforilación oxidativa, proceso que determina de manera parcial el aumento o disminución de RL y ERO (Novo y Parola, 2008). El oxígeno posee dos electrones no apareados con espines paralelos, esto hace difícil que capte 2 electrones simultáneamente en las reacciones en las que interviene y explica la facilidad de como participa en reacciones univalentes. Su estructura electrónica favorece su reducción por adición de electrones de uno en uno, lo que conduce a la generación de radicales libres de oxígeno. Aproximadamente del 2-5 % del oxígeno es reducido de forma incompleta al aceptar un menor número de electrones, dando origen así a compuestos intermedios inestables (RL) que a bajas concentraciones tienen un efecto protector pero a concentraciones elevadas son muy reactivos, capaces de producir daño sobre estructuras celulares, particularmente sobre membranas, proteínas, lípidos y ADN (Andresen *et al.*, 2006; García-Gasca *et al.*, 2009) que contribuyen a mutagénesis, peroxidación lipídica y envejecimiento (Vieira-Silva y Rocha, 2008).

2.1.2 Radicales Libres (RL).

Los RL se han definido como especies, cargadas o no, con una vida media muy corta. En su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, por lo que adquieren una configuración espacial que genera gran inestabilidad, lo que los hace

muy reactivos, difíciles de dosificar y actúan cercano al sitio de formación. Pueden iniciar reacciones en cadena por eliminación de un electrón de otra molécula para completar su propio orbital, y pueden producir lesiones celulares a través del daño oxidativo (Venéreo, 2002) (Figura 1).

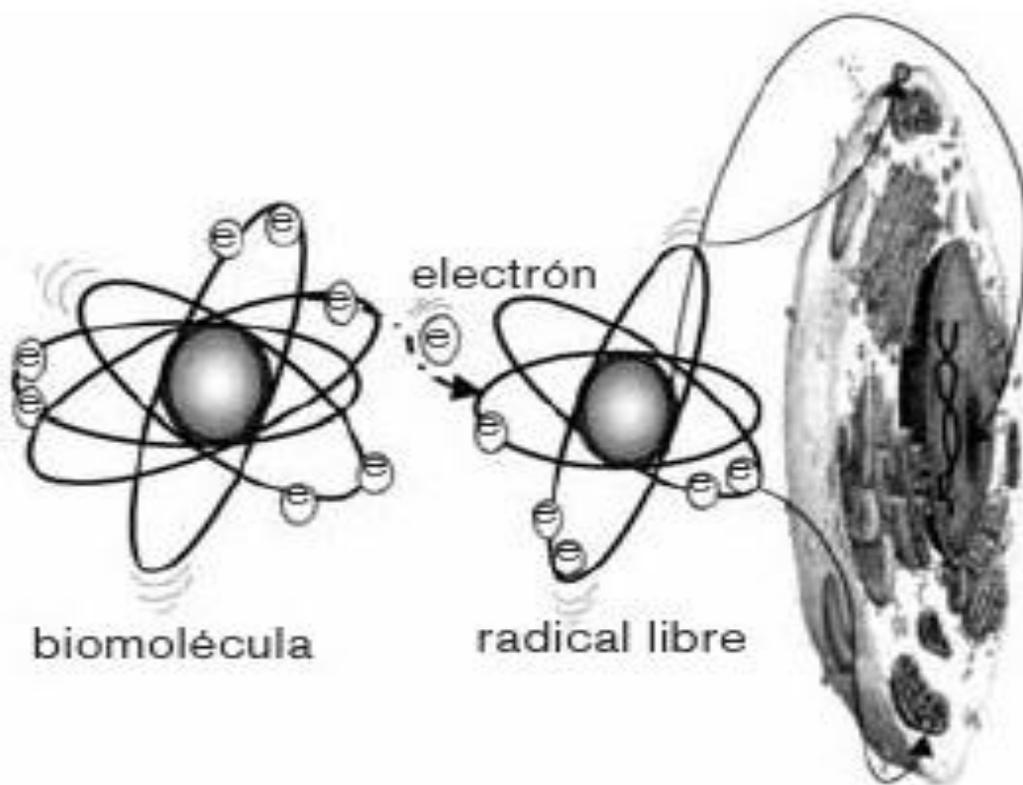


Figura 1. Esquema del ataque de un RL a una biomolécula (Velázquez *et al.*, 2004)

Los RL se producen por: 1) Procesos oxidativos celulares, que dan lugar generalmente a la transferencia de electrones al O_2 para formar H_2O sin liberación de intermediarios. Inevitablemente se forma un pequeño número de radicales de oxígeno debido a las pérdidas en las reacciones de transferencia de electrones. 2) Procesos de inflamación celular producida por infección bacteriana que activan a células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, macrófagos derivados de monocitos y eosinófilos) con la finalidad de un ataque citotóxico. En condiciones y niveles fisiológicos normales juegan un papel muy importante en reacciones de protección, de fagocitosis, detoxificación, de apoptosis y de combustión. En condiciones patológicas, donde se generan concentraciones excesivas, inducen daño oxidativo, promueven envejecimiento y enfermedades crónico degenerativas. Las especies reactivas comprenden radicales de oxígeno (reducción del oxígeno con transferencia

incompleta de electrones): anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}), radical peróxido (ROO^{\bullet}); no radicales de oxígeno (oxígeno parcialmente reducido): peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ozono (O_3), oxígeno singulete (1O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ácido hipobromoso ($HOBr$); y especies derivadas del óxido nítrico (NO) (peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), óxido nítrico (NO_x) al reaccionar con superóxido y oxígeno respectivamente (García-Gasca *et al.*, 2009). Estas últimas especies, son moléculas antimicrobianas producto de la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa 2 ($NOS2$). Se expresan principalmente en macrófagos y endotelio después de la inducción por citocinas y productos microbianos, específicamente interferón gamma ($IFN-\gamma$) y lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Langer *et al.*, 2008; Carsillo *et al.*, 2009).

Las ERO son producto de dos fuentes: endógena (mitocondria, citocromo P450, peroxisomas, activación celular inflamatoria, cadena respiratoria, transporte de electrones, reacciones de oxidación) y exógena (factores ambientales, luz ultravioleta, radiación, patógenos, dieta hipercalórica y drogas) (Venéreo, 2002; García-Gasca *et al.*, 2009). Las mitocondrias son las responsables de más del 90 % del consumo de oxígeno celular mediante reacciones enzimáticas y no enzimáticas, en procesos bioquímicos o mecanismos de señalización, por lo que son fuente importante de ERO. Entre las enzimas intracelulares que contribuyen a la producción de ERO se encuentran la xantina/xantina oxidasa, NADPH oxidasa, citocromo P450, óxido nítrico sintetasa y prostaglandina sintetasa. En un ambiente aerobio se produce el $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y OH^{\bullet} , este último es altamente reactivo y considerado como el responsable de la toxicidad del O_2 (Wang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008). En condiciones fisiológicas estas moléculas se generan y se utilizan para eliminar organismos extraños (bacterias y virus) por células como neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y fibroblastos (Velázquez *et al.*, 2004). Las ERO son importantes mediadores de lesión celular a través de daño a membranas o alteración en la actividad de enzimas (El-Hafidi y Baños, 1997). La producción excesiva ataca también a proteínas y ADN, altera mecanismos protectores y de señalización, destrucción de membranas y organelos subcelulares que resulta en muerte celular. En presencia de metales de transición, especies como el superóxido y el peróxido de hidrógeno son convertidos a radical hidroxilo que es más reactivo (Shulaev y Oliver, 2006; Murphy, 2009). En la Figura 2 se muestra un esquema sobre la producción y participación de radicales libres en procesos de estrés oxidativo.

Consumo de acuerdo a tasa metabólica (Densidad energética)
 Especie animal considerada
 Obtener energía (Fosforilación oxidativa)
 Reducción incompleta (2-5 %)
 Especies intermediarios inestables y reactivos

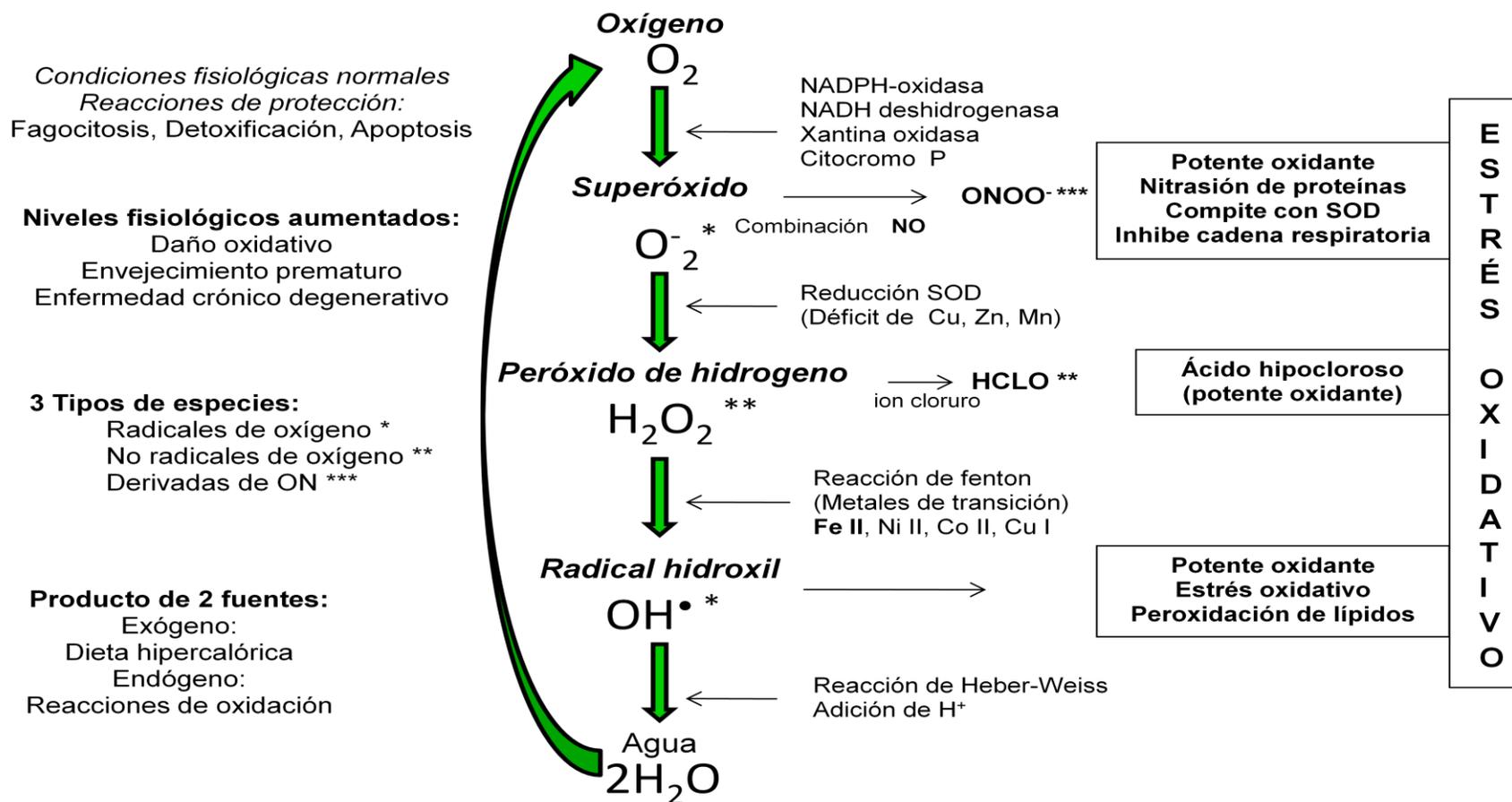


Figura 2. Producción y participación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en procesos de estrés oxidativo. Los asteriscos representan el tipo de especie, radicales de oxígeno (*), no radicales de oxígeno (**) y derivados de nitrógeno (***) (Adaptado de Wang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008).

a) Radical superóxido (O_2^*).

La mayor fuente de ERO es la mitocondria, especialmente por el complejo I (NADH deshidrogenasa y complejo III (Citocromo bc1). El radical superóxido se produce por la incorporación de un electrón a la molécula del oxígeno que, a su vez, presenta un electrón desapareado. Es producido por macrófagos, neutrófilos, leucocitos, fibroblastos y células del endotelio vascular. Es un radical poco reactivo capaz de oxidar grupos tioles y ácido ascórbico. Presenta un ácido conjugado, el radical hidroperóxido (HO_2^*) casi inexistente a pH fisiológico, más reactivo frente a moléculas biológicas y capaz de iniciar peroxidación lipídica. Es convertido a peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa (Lemma-Gray *et al.*, 2007) y diferentes isoenzimas localizadas en la mitocondria, citoplasma y compartimiento extracelular (Pacher *et al.*, 2007). Se ha reportado que una ingestión deficiente de potasio tiene relación con el aumento en la producción de superóxido (Babilonia *et al.*, 2005).

a) Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

El peróxido de hidrogeno es un moderado agente oxidante frente a compuestos orgánicos, por sí mismo no es altamente reactivo pero al reaccionar con metales de transición reducidos (Fe [II], Cu [I], Co [II], Ni [II]) produce radical hidroxilo (reacción de Fenton) que es extremadamente reactivo. El H_2O_2 se une al grupo heme del citocromo a_3 formando dos intermediarios catalíticos peroxy- y ferril-CcO siendo una potencial fuente de radicales libres. La presencia de Fe II en el ADN facilita la producción localizada del radical hidroxilo a partir de H_2O_2 , lo que genera rupturas en las hebras y alteraciones de bases (Lemma-Gray *et al.*, 2007). De la reacción del ion cloruro y el peróxido de hidrógeno, catalizada por mieloperoxidasa (MPO) se forma ácido hipocloroso (HOCL), un potente oxidante generado en neutrófilos que actúa como un importante mecanismo de defensa contra microorganismos. En situaciones de hipermetabolismo, alrededor del 40 % de H_2O_2 se convierte en hipoclorito y 60% forma radical hidroxilo (Anderson *et al.*, 1991).

c) Radical hidroxilo (OH^*).

Es considerado una de las especies más reactivas y potente oxidante, con una vida media extremadamente corta, reacciona en su lugar de generación con gran variedad de

macromoléculas biológicas y está implicado directamente con estrés oxidativo y, por lo tanto, numerosos procesos crónico degenerativos (Nguyen *et al.*, 2007). El cromo (Cr) es un elemento esencial en pequeñas cantidades, pero también se asocia a numerosos efectos tóxicos. La reducción del Cr VI a Cr III, resulta en la formación de intermediarios reactivos (Cr V, Cr IV, ERO) probables componentes de la toxicidad y de carcinogénesis generados por algunas reductasas (ascorbato, cisteína, glutatión, glutatión reductasa, enzimas de microsomas) que mediante la reacción de Fenton, contribuyen a convertir el peróxido de hidrogeno en radical hidroxilo (Borthiry *et al.*, 2007). Las ERO pueden agravar su citotoxicidad con hierro debido a que éste reacciona con el peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton generando radical hidroxilo (Deb *et al.*, 2009) que participa en procesos de peroxidación de lípidos (El-Hafidi y Baños, 1997).

d) Peroxinitrito (ONOO⁻).

El NO es generado por la enzima oxido nítrico sintasa tipo 2 (NOS 2) por estimulación de una variedad de señales pro-inflamatorias vinculadas al factor de necrosis tumoral, interferon gamma (IFN γ) y a infecciones por variedad de patógenos (Carsillo *et al.*, 2009). El NO es una molécula biológica de señalización, se mueve rápidamente por difusión en tejido y sangre, donde se convierte en nitrato al reaccionar con la oxihemoglobina, responsable de un gran número de funciones fisiológicas. Puede ser perjudicial cuando se produce en altas concentraciones y en especial, al combinarse con O₂^{*} mediante una reacción rápida que forma peroxinitrito sin necesidad de procesos enzimáticos. El ONOO⁻ es un potente oxidante, compite endógenamente con niveles de la superoxido dismutasa e inhibe variedad de enzimas en la mitocondria, incluyendo el complejo de la cadena respiratoria y la enzima aconitasa (citrato a isocitrato) del ciclo de krebs (Chenais *et al.*, 2002; Pacher *et al.*, 2007). Estimula diferentes procesos proinflamatorios incluyendo la expresión intracelular de moléculas de adhesión, interleucinas (IL-8) y el factor nuclear Kb (FN-Kb) (Vanhoutte, 2004).

2.1.3 Estrés oxidativo (EO).

Diversos factores se han señalado como responsables del desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, envejecimiento prematuro y de tipo neurológicas (Cordain *et al.*, 2005). El oxígeno y la dieta son algunos de ellos, necesidades básicas e indispensables

para los seres vivos sin embargo, son factores que contribuyen a efectos negativos en la salud. El tipo de dieta es un factor exógeno relacionado con morbilidad y mortalidad a largo plazo en padecimientos como obesidad y síndrome metabólico, entre otros (Hennig *et al.*, 2007).

La gran mayoría de las agresiones a nivel celular inducen la formación de moléculas oxidantes (ERO, ERN y otros RL) y electrófilas (partícula cargada positivamente que requiere de electrones y algunas tienen la función de agente oxidante, ejemplo: peroxiáxidos), que condicionan EO (Königsberg, 2007; Garcia-Gasca *et al.*, 2009). El estrés oxidativo se define como la suma de todas las reacciones redox que alteran las condiciones fisiológicas normales (Sreemantula *et al.*, 2005) destacando el desequilibrio en la producción de prooxidantes y antioxidantes a favor de los primeros (Das *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2009). En el medio clínico se relaciona con procesos patológicos, sobre todo por desequilibrio entre generación y eliminación de estas moléculas de oxidación que, a su vez, condicionan la supervivencia celular y contribuyen al desarrollo de enfermedades como diabetes mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cardiovasculares, cáncer y condiciones degenerativas (envejecimiento prematuro, neurodegeneración) (Collins, 2005; Kuwabara *et al.*, 2008; Selivanov *et al.*, 2008).

2.2 SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.

El organismo ha desarrollado mecanismos de adaptación y defensa antioxidante que incluyen quelación de metales por proteínas, uso de vitamina C y vitamina E, así como enzimas antioxidantes especializadas (Fattman *et al.*, 2003; Giles *et al.* 2006). Este sistema permite neutralizar ERO y sus precursores (Slater, 1984; Collins, 2005; Lesschaeve y Noble, 2005; Micallef *et al.*, 2007) así como a la constante agresión de sustancias tóxicas (Tien Kuo *et al.*, 2009). Los niveles de EO varían y, de acuerdo a estas fluctuaciones, hay inducción de síntesis de enzimas antioxidantes y enzimas renovadoras-reparadoras de daño a proteínas, lípidos y ADN (Pérez, 2000). El sistema de defensa antioxidante se caracteriza por ser de tipo endógeno (enzimático, no enzimático) y exógeno (dieta), con moléculas solubles en agua o en lípidos (Liu, *et al.*, 2009).

2.2.1 Sistema endógeno enzimático.

Las enzimas antioxidantes de tipo endógeno contrarrestan la producción y acción de ERO así como de RL (Hazra *et al.*, 2008; Kuwabara *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008) (Figura 3).

a) Superoxido Dismutasa (SOD).

Cataliza la dismutación del superóxido a O_2 y H_2O_2 , constituyendo la primera defensa celular frente a ERO. Los tres tipos de SOD difieren por el metal prostético: cobre/zinc (Cu/Zn), Manganeseo (Mn), Hierro (Fe). La CuZn-SOD es principalmente eucariótica y se localiza en el citosol, cloroplastos, espacio intermembranal mitocondrial y glioxisomas. La Fe-SOD y Mn-SOD son procariontas, pero la Mn-SOD también se encuentra en la mitocondria y peroxisomas, la Fe-SOD está presente en cloroplastos de pocas plantas (Becana *et al.*, 1989; Fattman *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2007). La SOD se inhibe cuando se expone a altas concentraciones de H_2O_2 , provocando que se acumulen sustancias como radical superóxido el cual queda disponible para reaccionar con el Fe^{+3} reduciéndolo a ion ferroso (Fe^{+2}). De esta manera se inicia la reacción de Fenton (combinación de Fe^{+2} con H_2O_2) con lo que se forman especies más reactivas como radical hidroxilo que posteriormente ocasiona daño a lípidos, proteínas y ADN (Caplés *et al.*, 2001).

b) Catalasa.

Enzima de 247 kDa localizada en los peroxisomas, compuesta por 4 cadenas idénticas de polipéptido monomérico con un grupo hemo (Fe^{+3}) con fuerte relación al NADPH. Ha sido considerada como un importante regulador de estrés oxidativo por ser muy eficiente al catalizar la conversión de H_2O_2 en agua y oxígeno (Bonini *et al.*, 2007; D'souza *et al.*, 2008). Tiene un papel central en la defensa contra oxidantes generados a través de varias vías metabólicas, presenta una actividad elevada a nivel hepático y tiene función en riñón y eritrocitos. Juega un papel crucial en la renovación de células hematopoyéticas y del hueso marrón (Lui *et al.*, 2009). En inflamación e infección parte del H_2O_2 es convertido a HOCl, un mediador de la respuesta inmune contra ciertos patógenos. La producción de este ácido esta mediado por mieloperoxidasas (MPO) y un exceso conlleva a inhibir la función de la catalasa que, además, oxida constituyentes de proteínas incluyendo grupos tiol, grupos amino y metionina, altamente reactivo y soluble en lípidos (Bonini *et al.*, 2007).

Defensa antioxidante

- * Endógeno enzimático
- ** Endógeno no enzimático
- *** Exógeno
(Dieta – Moléculas -Antioxidantes)

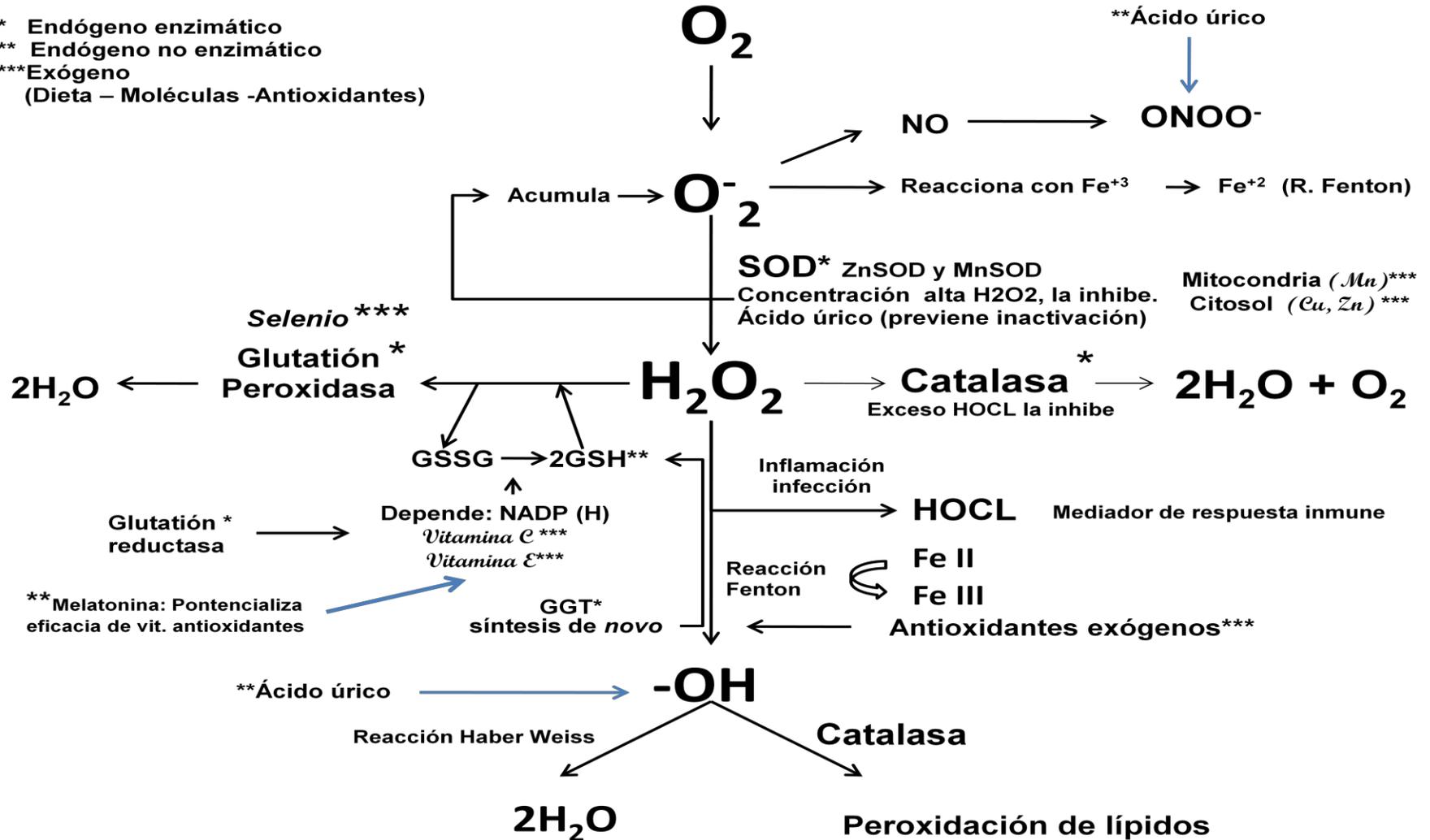


Figura 3. Mecanismo de los sistemas de defensa antioxidante endógeno enzimático, endógeno no enzimático y exógeno (Becana *et al.*, 1989; Cisneros, 1995; Pérez, 2000; Caplés *et al.*, 2001; Collins, 2005; Berger, 2006; Bonafine *et al.*, 2006; Zamora, 2007; Bonini *et al.*, 2007; D'souza *et al.*, 2008; García-Pinilla *et al.*, 2008; Sautin y Johnson, 2008; Liu *et al.*, 2009; Octaviano *et al.*, 2009; Zhang y Forman, 2009; Plum *et al.*, 2010).

c) Glutación Peroxidasa.

Pertenece a la familia de enzimas con actividad peroxidasa (neutralización de peróxidos), se encuentra en el citoplasma de casi todos los tejidos de mamíferos, de manera particular en las células endoteliales. Esta enzima tiene la función de transformar al peróxido de hidrógeno (principal sustrato) en agua y peróxidos de lípidos a sus respectivos alcoholes utilizando el glutati3n reducido disponible (García-Pinilla *et al.*, 2008; Gallo y Martino, 2009). Existen 8 isoformas conocidas sin embargo, sólo 5 de éstas contienen selenocisteina y son capaces de catalizar la reacci3n antes mencionada empleando glutati3n reducido como cofactor. La glutati3n peroxidasa (GPx-3) es la principal isoforma antioxidante extracelular que contiene selenocisteina (Octaviano *et al.*, 2009).

d) Glutati3n Reductasa.

Es una flavoenzima dependiente de nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducci3n de glutati3n oxidado (GSSG) a glutati3n reducido (GSH) el cual ser3a utilizado por la glutati3n peroxidasa (GPx) para la reducci3n del H₂O₂ y lipoper3xidos (L-OOH). Permite mantener concentraciones de GSH en la c3lula, 3til en la recuperaci3n de vitaminas C y E luego de participar en la eliminaci3n de RL generados *in situ* o a distancia. La alteraci3n de la actividad de la glutati3n reductasa provoca disminuci3n en las concentraciones de GSH dando lugar a un incremento en los niveles de ERO (Cisneros, 1995).

e) Gamma-Glutamil Transpeptidasa (GGT).

La GGT es una enzima que se encuentra principalmente en ri3n3n, p3ncreas, h3gado y pr3stata, participando en el transporte de amino3cidos hacia el interior de la c3lula (Beltr3n-Mart3nez y Correa-Chac3n, 2003). Cataliza el primer paso en la degradaci3n de glutati3n, que consiste en la escisi3n y la transferencia de la fracci3n c-glutamil a un receptor de amino3cidos (o la hidr3lisis de la liberaci3n de glutamato) y la liberaci3n de cisteinil-glicina (Alkhuder *et al.*, 2009). Es una enzima glicosilada que est3a parcialmente incrustada sobre la superficie de la membrana plasm3tica, cataliza la transferencia del γ -glutamil a glutati3n o glutati3n conjugado. La GGT proporciona ciste3na, que limita el

rango de aminoácidos para la síntesis de *ново* de GSH. Como tal, es indispensable para mantener la homeostasis de GSH y cisteína, su deficiencia resulta en estrés oxidativo y susceptibilidad celular a daño oxidativo. En consecuencia, la GGT también cataliza el metabolismo de componentes endógenos como leucotrienos C4 y xenobióticos después de su conjugación con GSH. Por lo tanto, la GGT juega un papel de suma importancia en la defensa antioxidante, detoxificación y procesos de inflamación (Zhang y Forman, 2009).

2.2.2 Sistema Endógeno no Enzimático.

Sistema paralelo al endógeno enzimático y especialmente útil cuando este sistema se satura. Determinado por una serie de compuestos llamados depuradores o neutralizadores de radicales libres que logran retrasar e inactivar su producción y su función. Dentro de este sistema se encuentra el ácido úrico, al glutatión (GSH), la melatonina, al ácido lipóico, la bilirrubina, las ubiquinonas, que forman parte de la estructura molecular de algunas enzimas antioxidantes (Zamora, 2007).

a) Ácido úrico.

Es el producto final de la degradación enzimática de purinas a nucleósidos y bases libres mediante la acción enzimática de la xantina óxidoreductasa (XOR). Se considera como un antioxidante importante en el plasma humano en concentraciones normales sin embargo, concentraciones elevadas correlacionan con el desarrollo de obesidad y enfermedades cardiovasculares, condiciones asociadas a estrés oxidativo. Se piensa que un aumento en sus niveles representa un intento de defensa como respuesta de protección al huésped, pero tiene una función pro-oxidante dentro de la célula (daño celular mediado por el sistema inmune, aumento en la producción de TNF- α , y citocinas pro-inflamatorias) (Sautin y Johnson, 2008). Su función antioxidante es similar a la del ácido ascórbico en niveles séricos normales, se piensa que tiene participación en varios procesos redox. Se ha observado que neutraliza al radical hidroxilo, oxígeno singulete y peroxinitrito, así como quelación de hierro. El ácido úrico también mantiene varios sistemas previniendo la inactivación extracelular de la SOD por el peróxido de hidrógeno y la oxidación del ascorbato (Johnson *et al.*, 2009). Cuando circula en la sangre puede neutralizar radicales reactivos que son perjudiciales para reacciones

como la auto-oxidación de la hemoglobina o producción de peróxido por macrófagos y a nivel de plasma puede prevenir la peroxidación de lípidos si el ácido ascórbico está presente (Sautin y Johnson, 2008).

b) Glutati6n.

Tripéptido formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina (Glu-Cys-Gly) con un grupo sulfidrilo (-SH) y es el tiol no proteico más abundante. Es un sustrato para la glutati6n peroxidasa y la glutati6n S-transferasa. Juega un papel contra estrés oxidativo y en detoxificaci6n de componentes ex6genos y end6genos del metabolismo, incluyendo carcin6genos y drogas. Asimismo, est6 involucrado en la regulaci6n del ciclo celular, seÑalizaci6n celular y apoptosis (Zhang y Forman, 2009). Est6 sujeto a un constante recambio en el organismo, siendo regulado por la actividad de la enzima gamma glutamil transpeptidasa (γ GT o GGT) localizada en la membrana celular y los 6rganos responsables de su homeostasis (h6gado, riÑones, pulmones, coraz6n, intestinos y m6sculos) (Deneke y Fanburg, 1989). Juega un papel fundamental en la protecci6n celular contra el daÑo oxidativo. Los cambios de la concentraci6n de GSH en sangre podr6an dar una medida del estr6s oxidativo *in vivo*. El GSH disminuye con el envejecimiento, el ejercicio intenso y tambi6n en ciertas patolog6as como diabetes, fibrosis qu6stica, SIDA, cirrosis, infecciones, malnutrici6n proteica y tratamientos quimioter6picos, entre otros (Mart6nez-Sarrasague *et al.*, 2006). Su principal funci6n es antioxidante y neutralizadora de RL que se encuentran en la circulaci6n. El glutati6n es oxidado por la enzima glutati6n peroxidasa permitiendo la degradaci6n del per6xido de hidr6geno y permite el reciclado de la oxidaci6n del alfa-tocoferol y ácido ascórbico, dos antioxidantes importantes en la circulaci6n (Micallef *et al.*, 2007).

c) Melatonina.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una prote6na descubierta originalmente como una hormona endocrina producida en la gl6ndula pineal (pinealocitos) sintetizada a partir del neurotransmisor serotonina, actualmente se sabe que se produce en otros 6rganos como el tracto gastrointestinal, adem6s representa ser un componente m6nimo de alimentos que f6cilmente puede cruzar cualquier tipo de membrana, por lo tanto su absorci6n es muy eficiente. El tracto gastrointestinal contiene cientos de veces m6s

melatonina (actúa como hormona parácrina) permitiendo que la absorción de vitaminas, minerales y nutrientes contenidos en el alimento sea lo más adecuado posible, además de liberarse a la sangre en respuesta a la ingesta de alimentos y a estímulos de nutrientes, en especial triptófano. Sus propiedades como antioxidante se basa en diversos efectos: captación directa de radicales, sobre-regula la producción de antioxidantes y sub-regula la de pro-oxidantes, mejora el metabolismo mitocondrial al evitar fuga de electrones y potencializa los efectos de otros antioxidantes como el ácido ascórbico, el trolox y vitaminas antioxidantes. También muestra efecto protector sobre las células frente a estrés oxidativo e induce apoptosis por supresión de ADN mitocondrial. Su oxidación es importante para la producción de otros metabolitos biológicamente activos, tales como N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramina (AFMK) y N¹-acetyl-5-methoxykynuramina (AMK) que presentan propiedades protectoras (Hardeland y Pandi-Perumal, 2005; Kimball *et al.*, 2008).

d) Ácido lipóico.

El ácido lipóico es un derivado del ácido octanóico, se considera un potente antioxidante a nivel de mitocondria, desempeña un papel central en el mantenimiento de la red de defensa con la regeneración de antioxidantes y neutralizando de manera efectiva a las ERO. También es un cofactor esencial en complejos enzimáticos implicados en el metabolismo oxidativo. Endógenamente este ácido se sintetiza a partir de ácido octanóico por la acción de sintasa de ácido lipóico (LASY). La sub-regulación de LASY a nivel de endotelio agrava la respuesta inflamatoria que se manifiesta con aumento en el TNF- α y de citocinas pro-inflamatorias, por lo tanto, la sobre-expresión de LASY disminuye la respuesta inflamatoria (Padmalayam *et al.*, 2009).

e) Bilirrubina.

Durante muchos años se consideró a la bilirrubina como producto de desecho del metabolismo del heme. Recientemente se ha propuesto que estos pigmentos desempeñan un papel como antioxidantes naturales ya que pequeñas cantidades permiten estabilizar a la vitamina A y β -caroteno durante la absorción intestinal y niveles bajos de bilirrubina en plasma van acompañados de los primeros signos de deficiencia de vitamina E. La bilirrubina no conjugada y a concentraciones micromolares neutraliza

eficientemente al radical peroxilo, ha superado al α -tocoferol como antioxidante y puede proteger a proteínas plasmáticas y lípidos de muchos oxidantes (Maghzal *et al.*, 2009).

2.2.3 Sistema Antioxidante Exógeno.

Los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de tipo endógeno dependen de otras sustancias esenciales. Por ejemplo la expresión de glutatión peroxidasa y tioredoxina reductasa dependen de cantidades adecuadas de selenio, la expresión de SOD depende de un aporte adecuado de cobre y zinc y la actividad de la glutatión reductasa de un aporte suficiente de riboflavina (Zamora, 2007). Estudios epidemiológicos permiten llegar a la conclusión de que la dieta constituye un factor clave y una herramienta potencial para el control de enfermedades crónicas. Muchos de sus componentes (sustancias biológicamente activas) están involucrados en estados de defensa antioxidante (Lampe, 1999) y existen razones biológicamente plausibles por lo que el consumo de frutas y vegetales previene y controla enfermedades crónicas por este tipo de sustancias (Wildman y Kelley, 2007; Aponte *et al.*, 2008). Entre las moléculas antioxidantes presentes en la dieta están los fitoquímicos, carotenoides, vitaminas: vitamina E, la vitamina C, la vitamina A y minerales como selenio, cobre, zinc y magnesio (Zamora 2007). Los niveles séricos y sistémicos de micronutrientes antioxidantes se han asociado con la prevención de cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades crónico degenerativas (Franke *et al.*, 2005). Las alteraciones en la alimentación con respecto a aporte, ingestión y absorción de estos compuestos altera negativamente la salud y por ende la calidad de vida, por lo que es de importancia mantener una adecuada alimentación ya que es la principal vía de entrada al organismo de compuestos antioxidantes (Zamora, 2007). En la Figura 3 se muestra un esquema integrador resumido del funcionamiento de los sistemas antioxidantes endógenos y exógenos.

a) Fitoquímicos.

Los alimentos, además de aportar nutrientes, contienen sustancias biológicamente activas que tiene un efecto funcional (protector antioxidante) en el organismo. No son considerados esenciales en el metabolismo sin embargo, son muy benéficos a largo plazo para la salud y se clasifican de acuerdo a su función y características

estructurales: terpenos (carotenoides, fitoesteroles, capsaicina, saponinas), fenoles (isoflavonas, lignanos, flavonoides, antocianinas, catequinas, taninos), tioles (compuestos organosulfurados) (Aponte *et al.*, 2008). Por no ejercer una función directa en el metabolismo se consideran metabolitos secundarios, dentro de sus principales funciones está: mejorar la respuesta inmune, ejercer una función antioxidante, proveer una protección anti-cancerígena, disminuir lípidos séricos, estimular procesos enzimáticos, retardar el proceso de envejecimiento (Bonafine *et al.*, 2006).

b) Vitamina E.

Proviene de la síntesis de tococromanoles, grupo de compuestos con actividad de vitamina E en diferentes porcentajes y esencial para la nutrición humana. De manera estructural y natural, la vitamina E incluye 8 moléculas que químicamente son distintas; α , β , γ , δ -tocoferol, α , β , γ , δ -tocotrienoles. Los síntomas causados por la deficiencia de α -tocoferol puede ser revertida por la presencia de tocotrienoles y por consiguiente vistos como miembros de la vitamina, tanto funcional como estructuralmente. Los tocotrienoles poseen un gran poder hipocolesterolémico, anticancerígeno, propiedades neuroprotectoras y protección al daño cerebral asociado a accidentes cerebrovasculares. Los 8 compuestos, por su homología estructural, poseen una eficacia antioxidante y con respecto al α -tocoferol puede ejercer también funciones ajenas a su propiedad antioxidante, como inhibir enzimas, por ejemplo la 5-lipoxigenasa lo cual inhibe la producción de leucotrienos y activar a otras como la proteína fosfatasa 2A que cataliza la reacción de defosforilación de una fosfoproteína (Sen *et al.*, 2007). La vitamina E cruza la barrera hemato-encefálica y se acumula con el tiempo a niveles terapéuticos en el sistema nervioso central y a su vez puede impedir el déficit cognitivo resultado de una dieta alta en grasa saturada (Wu *et al.*, 2010).

c) Vitamina C.

Micronutriente soluble en agua, indispensable para la función celular normal, crecimiento y desarrollo. Esta vitamina puede ser sintetizada por mamíferos a través de la ruta del ácido glucorónico a nivel hepático sin embargo, los seres humanos han perdido esta capacidad y se debe tomar de la alimentación. Existen dos formas de vitamina C, ácido ascórbico (forma activa reducida) y ácido dehidro-ascórbico (forma

oxidada). El primero es considerado como un antioxidante eficaz que actúa como depurador de radicales libres y un cofactor esencial en numerosas reacciones enzimáticas (Reidling *et al.*, 2008). Protege del estrés oxidativo a las células, previene daño a macromoléculas incluyendo lípidos, proteínas, ADN y la incidencia de ciertos tipos de cáncer. Ha permitido aumentar la vida replicativa de fibroblastos humanos atribuyéndose a la disminución del envejecimiento, reducción de daño mitocondrial y de ADN a través de la neutralización de ERO (Hwang *et al.*, 2007).

d) Selenio.

Es un no metal y su papel biológico más trascendente es su reconocido poder antioxidante, el cuál es secundario a las denominadas selenoenzimas. Su homeostasis se logra mediante su distribución en los tejidos y excreción en la orina, dado que su absorción no está regulada. Una vez absorbido va hacia hígado y de ahí a la vena porta, en el hígado es convertido a selenocisteína libre que rápidamente se cataboliza para producir selenio metabólicamente activo (Burk *et al.*, 2006). Se han descrito aproximadamente 35 selenoenzimas; proteínas que contienen un residuo de selenocisteína en su sitio activo y en las cuales el Se constituye su cofactor enzimático. Dentro de las selenoenzimas, las mejor caracterizadas y estudiadas son la Glutación Peroxidasa (GPx) que cataliza la reducción del peróxido de hidrogeno a agua y la Selenoproteína P (SePP) que parece tener efecto protector frente al ataque de peroxinitritos. Otras dos enzimas de importancia mayor son la Tiorredoxina reductasa cuya función es reducir nucleótidos durante la síntesis de ADN y la Iodotironina deiodinasa, responsable de la conversión periférica de T4 en T3 activa. La depleción del estado nutricional de selenio es una característica distintiva; la misma se traduce por una reducción de los niveles séricos y de las diferentes selenoenzimas, en especial la glutación peroxidasa y selenoproteína. Su función antioxidante cumple un papel de protección frente a lipoperoxidación de membranas celulares participando además en el proceso de regulación de la respuesta inflamatoria (Manzanares, 2007).

e) Zinc.

El zinc es un oligoelemento esencial, el cuerpo humano contiene alrededor de 2 a 3 g y, de este, el 90% es funcional en músculo y hueso. A nivel celular, del 30 a 40% se

encuentra en el núcleo, 50% en el citosol y el resto está asociado a la estructura de membranas. Influye sobre varios mecanismos moleculares de regulación, por ejemplo: la apoptosis (muerte programada de células), incluyendo la actividad de las caspasas (proteasas involucradas en la apoptosis y activación de citocinas proinflamatorias, ejemplo: IL-1beta, IL-8) y proteínas de la familia Bcl (proteínas reguladoras de supervivencia celular al inhibir la activación de las caspasas). La propiedad anti-apoptótica del zinc consta de 2 mecanismos: 1) limita el alcance de daño inducido durante estrés oxidativo, lo que resulta en supresión de las vías de señalización de la apoptosis, 2) niveles adecuados de zinc al parecer evitan la oxidación de grupos sulfhidrilos de las proteínas y por lo tanto reducen el estrés oxidativo. Con respecto a lípidos y proteínas puede preservar a membranas celulares y macromoléculas de daño oxidativo. Junto con el cobre forma homodímeros de la SOD que la hacen catalíticamente activa, el cobre se cree que juega un papel en la definición de la estructura y estabilidad de la SOD (Kayatekin *et al.*, 2008). Un exceso de zinc genera deficiencia de cobre (compite a nivel de absorción) que ocasiona el desarrollo de leucopenia, neutropenia, disminución de la SOD (particularmente en eritrocitos), incrementa colesterol, LDL:HDL y función cardiovascular anormal (Plum *et al.*, 2010).

2.3 DIETA Y ESTRÉS OXIDATIVO.

La alta cantidad de grasa y azúcar hace disponible alimentos con alta densidad energética, de bajo costo y sabrosos lo que los hace muy atractivos. Su ingesta, en combinación con la reducción del gasto energético (estilo de vida sedentario), promueve un balance energético positivo neto que resulta en incremento de la masa grasa corporal, ganancia de peso y aumenta la prevalencia de la obesidad (Hegarty *et al.*, 2002; Bonen *et al.*, 2004; Ackroff *et al.*, 2007; Bonnard *et al.*, 2008; Frazier *et al.*, 2008). La grasa es considerada parte básica de la alimentación pero su ingesta a largo plazo promueve efectos negativos en la salud. La dieta occidental aporta de 30 a 40 % de energía a base de grasa constituida por ácidos grasos saturados y ácidos grasos poliinsaturados (Diniz *et al.*, 2004).

El consumo de azúcar, uso de fructosa y edulcorantes se ha incrementado en la población americana en donde se calcula una ingesta promedio de estas 3 sustancias de 64 kg/año. Un consumo del 25 % de fructuosa sobre el requerimiento energético

durante 10 semanas podría resultar en incremento de peso (Hofmann y Tschop, 2009), aumento de depósitos de grasa, alteraciones en la homeostasis energética y alteraciones metabólicas (Hegarty *et al.*, 2002; Bonnard *et al.*, 2008; Bartolomucci *et al.*, 2009). La mayoría de las alteraciones metabólicas son silenciosas clínicamente y sólo se manifiestan cuando el daño ya es evidente (Rocha *et al.*, 2009) y tienen una relación estrecha con el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas en todas sus modalidades (Cordain *et al.*, 2005; Hennig *et al.*, 2007) (Figura 4):

- Desequilibrio en el metabolismo de lípidos (oxidación de ácidos grasos) (Hegarty *et al.*, 2002; Hofmann y Tschop, 2009)
- Disminución bioenergética (Mantena *et al.*, 2009)
- Alteración del ciclo celular, inflamación, sensibilidad de enterocitos a secreción de hormonas intestinales afectando la saciedad, citocinas pro y antiinflamatorias, alteración en la homeostasis de la glucosa, hiperglucemia, disminución en la capacidad oxidativa (fosforilación oxidativa) (Simoneau y Kelley, 1997; Petersen *et al.*, 2004; Lowell y Shulman, 2005; Bonnard *et al.*, 2008)
- Incremento en la secreción de insulina que precede la resistencia de insulina a nivel periférico (Shapiro *et al.*, 2007; Wit *et al.*, 2008; Brons *et al.*, 2009)
- Disfunción celular y mitocondrial, así como generación de especies reactivas de oxígeno (Krebs y Roden, 2004), que conlleva a inflamación e inducen daño en la membrana celular (Knight *et al.*, 2008).

2.3.1 Aumento de la masa grasa.

La masa grasa está constituida por adipocitos, fibroblastos, células endoteliales y macrófagos, que constituyen cerca del 50% del contenido celular total y a su vez conformado por dos tipos de tejido: pardo y blanco. El tejido adiposo pardo está especializado en la producción de calor (termogénesis) que está mediado por las proteínas desacoplantes-1 (UCP-1) a partir del almacenamiento de lípidos. El tejido adiposo blanco funciona como un depósito o eficiente reservorio de energía y recientemente se reconoce como un órgano con diversas funciones metabólicas y endocrinas (Pérez *et al.*, 2007; Potenza y Mechanick, 2009).

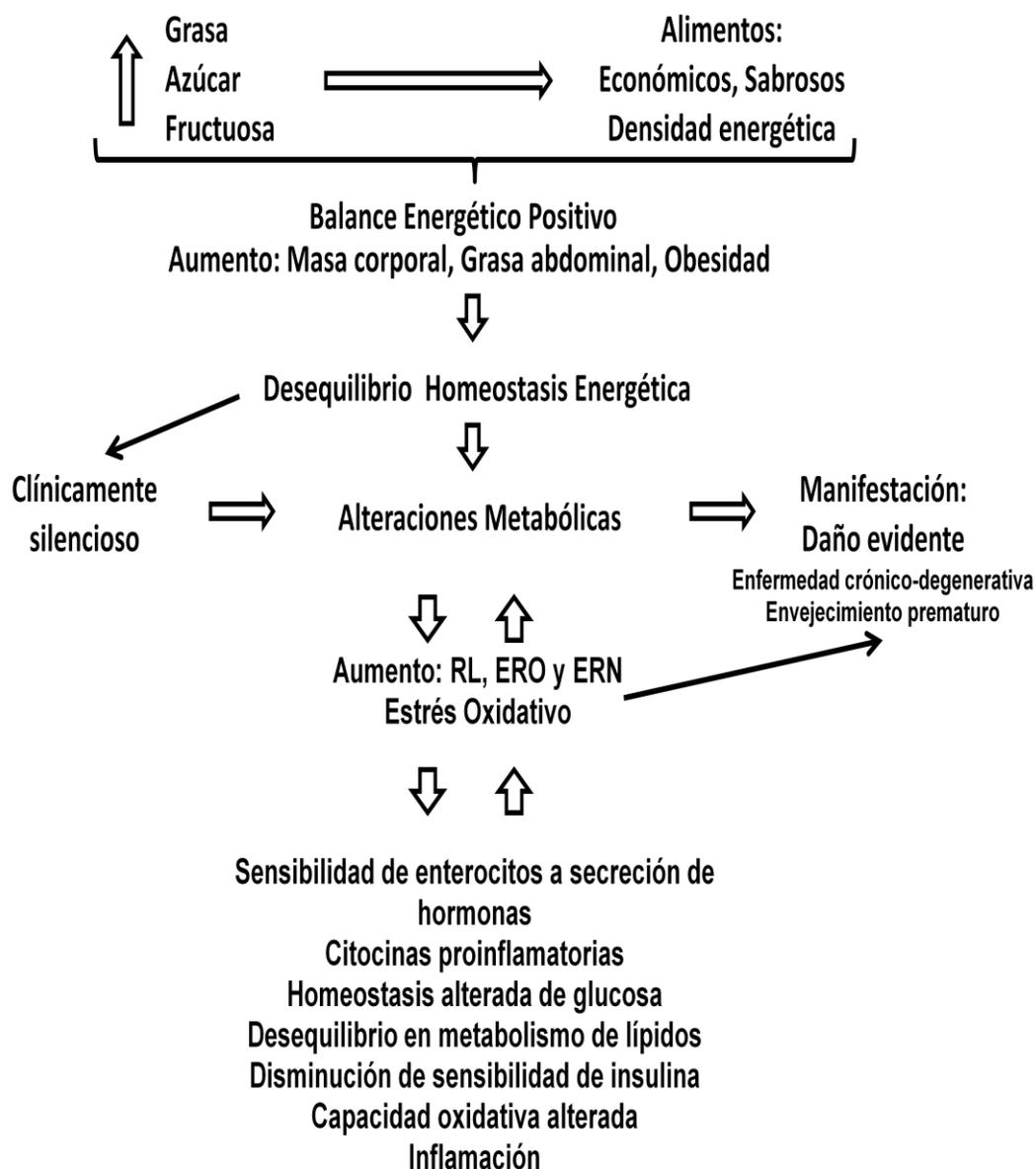


Figura 4. Efectos de una dieta de alta densidad energética sobre desordenes metabólicos y su relación con estrés oxidativo (Hegarty *et al.*, 2002; Bonnen *et al.*, 2004; Krebs y Roden, 2004; Cordain *et al.*, 2005; Ackroff *et al.*, 2007; Hennig *et al.*, 2007; Bonnard *et al.*, 2008; Frazier *et al.*, 2008; Bartolomucci *et al.*, 2009; Hofmann y Tschop, 2009; Mantena *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2009).

El tejido blanco visceral en exceso muestra un incremento de las adipocitocinas proinflamatorias; TNF- α , IL-6, proteína estimuladora de acilación (ASP), resistina y un decremento de las adipocinas antiinflamatorias como la adiponectina, las cuales modifican la sensibilidad a la insulina. Este tipo de desequilibrio se ha visto relacionado con el desencadenamiento de arteriosclerosis y otras complicaciones microvasculares

(Sánchez-Muñoz *et al.*, 2005). El aumento de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1beta, IL-8, TNF- α) y la actividad de monocitos y granulocitos se ha asociado a un aumento de las necesidades de oxígeno, favoreciendo la producción de ERO y ERN, como son los peróxidos y el óxido nítrico que, de saturar las defensas antioxidantes, condicionan estrés oxidativo (Rodríguez *et al.*, 2005).

El balance energético positivo, la predisposición genética, el sedentarismo, dieta baja en fibra y alta en ácidos grasos saturados, incrementan la masa grasa y por lo tanto, la masa del adipocito que actúa como un órgano endocrino capaz de comunicarse así mismo con otros órganos y sistemas, mediante la liberación de adipocinas (Studzinski *et al.*, 2008). Éstas actúan a nivel local y a distancia por efectos autócrinos, parácrinos y endócrinos y están implicadas en el control de la ingesta de alimentos, en el balance de energía, en el peso corporal, en la homeostasis de glucosa, en el metabolismo lipídico, en la angiogénesis, en la fibrinólisis, en los procesos pro y anti-inflamatorios, en el desarrollo sexual y en la reproducción. Estas sustancias tienen un papel clave en la patogénesis del síndrome metabólico, integrado por un grupo de factores de riesgo de origen metabólico que se acompañan a su vez de un riesgo aumentado de diabetes mellitus tipo 2 y de enfermedades cardiovasculares. El incremento en la masa del adipocito es un estímulo que condiciona, sobre todo si persiste durante mucho tiempo, a alteraciones en la secreción de citosinas y adipocinas inflamatorias así como de ácidos grasos no esterificados que propician síndrome metabólico (Figura 5) (Pérez *et al.*, 2007; Potenza y Mechanick, 2009; Muller *et al.*, 2011).

El síndrome metabólico se define como un estado inflamatorio resultante de un grupo de trastornos metabólicos: 1) aumento de la circunferencia de cintura, 2) disminución sérica de lipoproteínas de alta densidad (HDL), 3) aumento en los niveles séricos de triglicéridos, 4) hipertensión y 5) resistencia a la insulina. Recientes datos sugieren que el desarrollo del síndrome metabólico se debe a un incremento de estrés oxidativo en el tejido adiposo (Holvoet *et al.*, 2008) (Figura 6) que, en combinación con resistencia a insulina y disfunción endotelial, condicionan a un desequilibrio redox, donde hay una mayor producción de radicales libres y de citocinas (Esposito *et al.*, 2006).

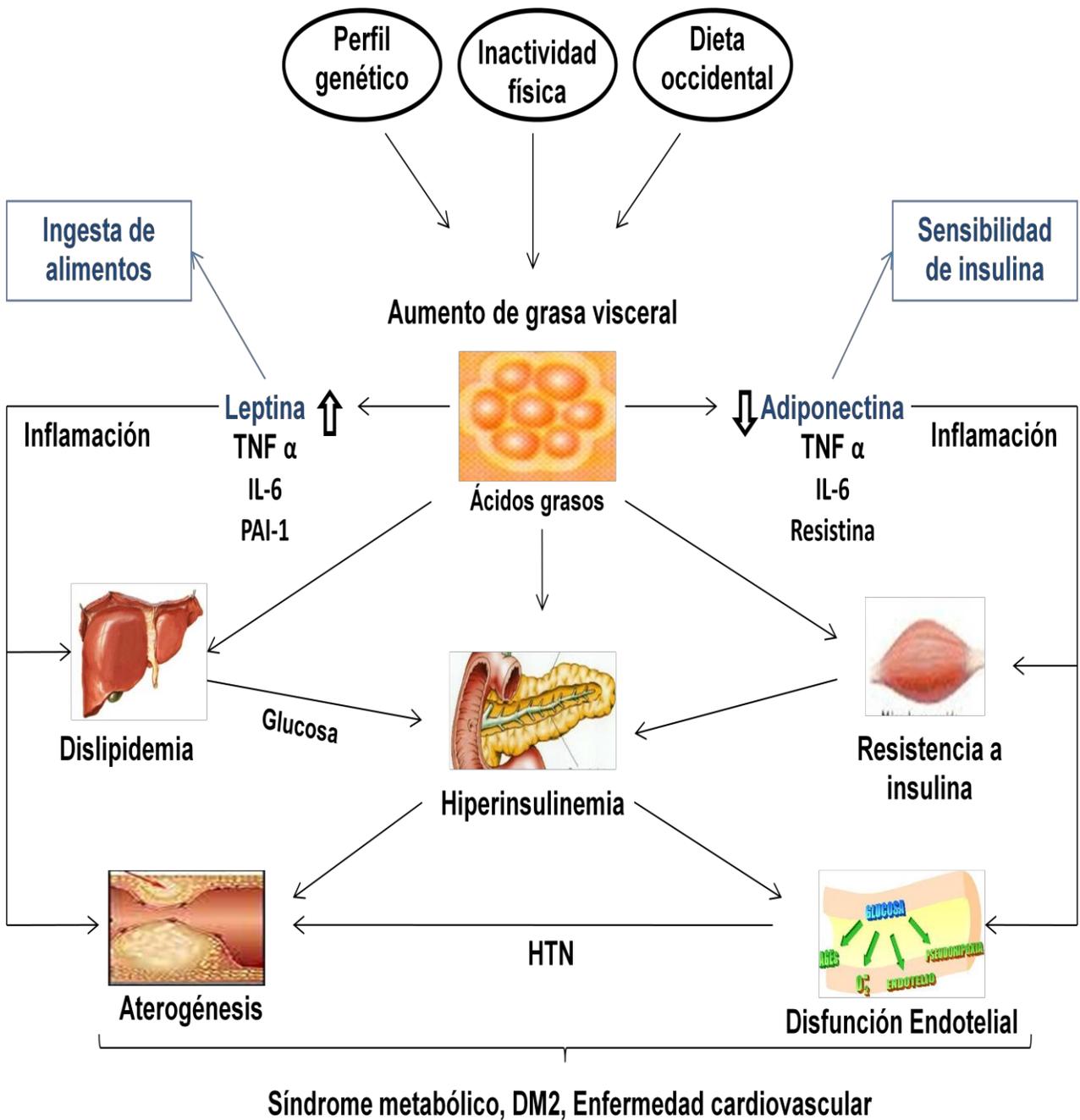


Figura 5. Fisiopatología del Síndrome Metabólico. El incremento de las adipocinas pro-inflamatorias y decremento de anti-inflamatorias a nivel de músculo esquelético generan resistencia a insulina y a nivel de hígado generan hiperinsulinemia, que conlleva a disfunción endotelial y aterogénesis. Los ácidos grasos alteran la producción de lípidos hepáticos hacia un perfil más aterogénico (disminución de lipoproteínas de alta densidad, aumento de lipoproteínas de baja densidad y elevación de triglicéridos) (Sánchez-Muñoz *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2007; Potenza y Mechanick, 2009).

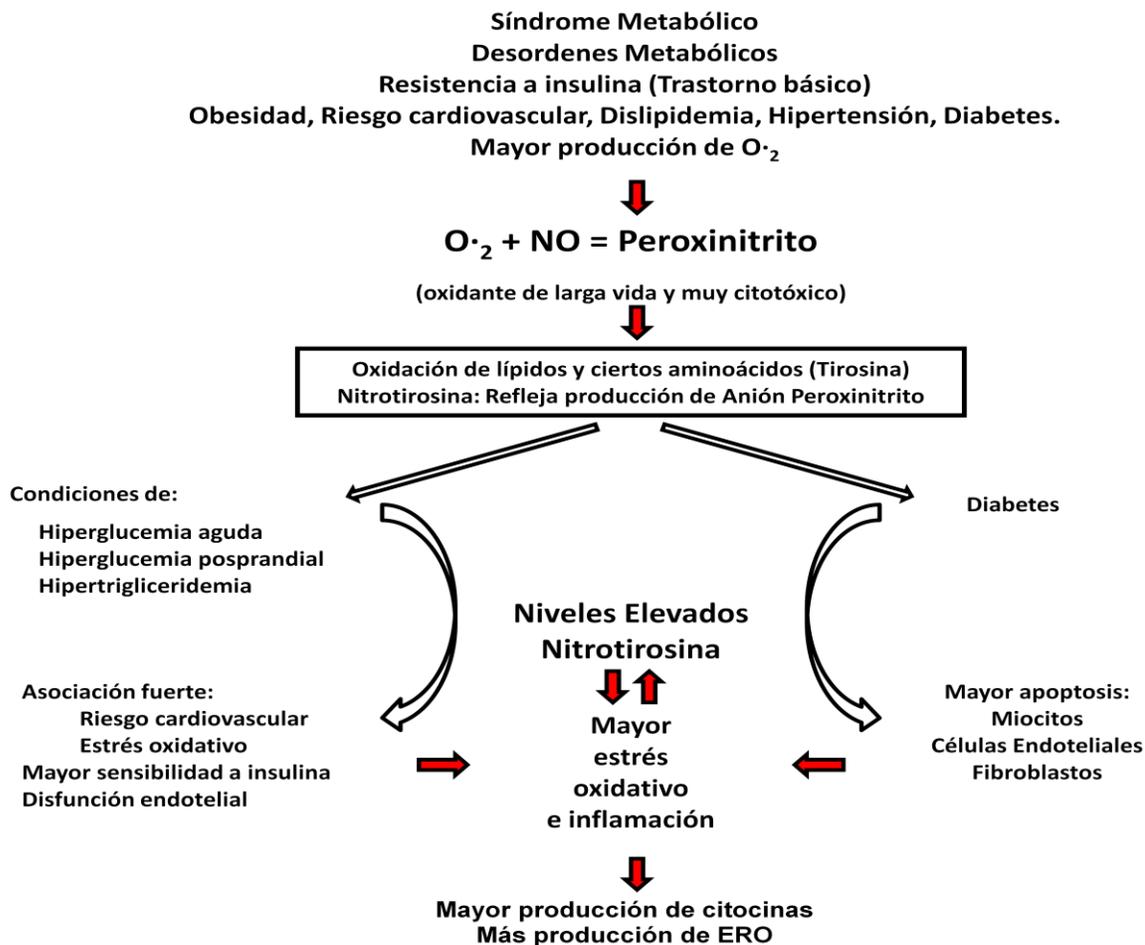


Figura 6. Síndrome metabólico y su relación con el estrés oxidativo (Adaptado de: Esposito *et al.*, 2006).

2.3.2 Oxidación de macromoléculas.

a) Carbohidratos

En condiciones normales los monosacáridos, en presencia de metales de transición ($\text{Fe}^{3,2+}$, $\text{Cu}^{2+,+}$, Zn^{2+}) y los niveles elevados de glucosa sérica (hiperglucemia) conducen a estrés oxidativo. Dado que la glucosa se oxida se permite la formación de alfa-cetoaldehídos, superóxido y peróxido de hidrógeno, que conlleva a un exceso en la producción de ERO y deficiencia del sistema antioxidante para eliminarlas (Caplés *et al.*, 2001). Así mismo, la hiperglucemia crónica produce una acumulación de productos de glicación reversibles y productos finales de glicación avanzada (AGE, *Advanced Glycation Endproducts*) en diferentes proteínas estructurales y circulantes del

organismo generando simultáneamente estrés oxidativo y carbonílico, proceso denominado glicosilación (Actis y Rebolledo, 2000). El proceso de glicosilación o reacción de Maillard, consiste en una serie de reacciones que suceden en el siguiente orden: 1) Adición de un grupo amino primario (de proteína o de fosfolípido) al grupo carbonilo del monosacárido lo que forma una base de Schiff (aldiminas), compuesto poco estable donde si no disminuye la concentración de glucosa circulante avanza hacia la segunda etapa. 2) Se da nuevamente un re-arreglo interno para formar moléculas de mayor estabilidad, los compuestos de Amadori (fructosaminas) pero genera más carbonilos reactivos. Hasta este punto las reacciones son todavía reversibles hasta la parte inicial si disminuye la concentración de glucosa. 3) Si la reacción no se revierte, los grupos carbonilos de los compuestos de Amadori tienen la capacidad de reaccionar nuevamente con los grupos amino de las proteínas originando moléculas más grandes por entrecruzamiento de la glucosa con otras proteínas, generándose lentamente los compuestos AGE propiciado por la presencia de oxígeno y metales reductores (Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez, 2007). Esto permite mayor oxidación de lípidos (ácidos grasos poliinsaturados) y oxidación de proteínas en las membranas celulares lo que modifica la estructura de estas macromoléculas y, por consiguiente, deterioro en todas sus funciones (Actis y Rebolledo, 2000) (Figura 7).

b) Lípidos

En condiciones metabólicas normales los ácidos grasos, en particular los libres, pueden ser oxidados por muchos tejidos, principalmente por el hígado y el tejido muscular para obtener energía. Además, el organismo tiene la capacidad de almacenarlos en forma de triacilglicerol, lo que condiciona exceso de tejido adiposo repercutiendo en un estado de inflamación celular hasta llegar a EO. Además, los ácidos grasos son componentes estructurales de las membranas celulares, como son los fosfolípidos y glucolípidos y este tipo de biomoléculas son las más susceptibles de sufrir daño oxidativo ocasionado en especial por el radical hidroxilo que tiende a oxidarlos en cascada y otros radicales libres, proceso químico conocido como peroxidación lipídica. Este proceso resulta muy relevante en la evolución del EO ya que la peroxidación de lípidos conlleva a la disfunción fisiológica de la membrana celular alterando su fluidez, su potencial y la permeabilidad iónica, que condicionan la pérdida de su integridad (Gutteridge y Halliwell

1990; Alvarez *et al.*, 1993; Wong-ekkabut *et al.*, 2007). Los peróxidos lipídicos (LOOH) y sus derivados carbonilos citotóxicos pueden bloquear la acción de macrófagos, inhibir la síntesis de proteínas, inactivar enzimas, generar trombinas y actuar como agentes quimiotácticos (señales intracelulares) para fagocitos (Berlett y Stadman, 1997). Los productos finales de la peroxidación de lípidos, malondialdehído (MDA), 4-Hidroxi-nonenal (HNE) y peróxidos lipídicos producen lesiones en proteínas al interactuar con restos de lisina, cisteína e histidina (Esterbauer *et al.*, 1991) (Figura 8).

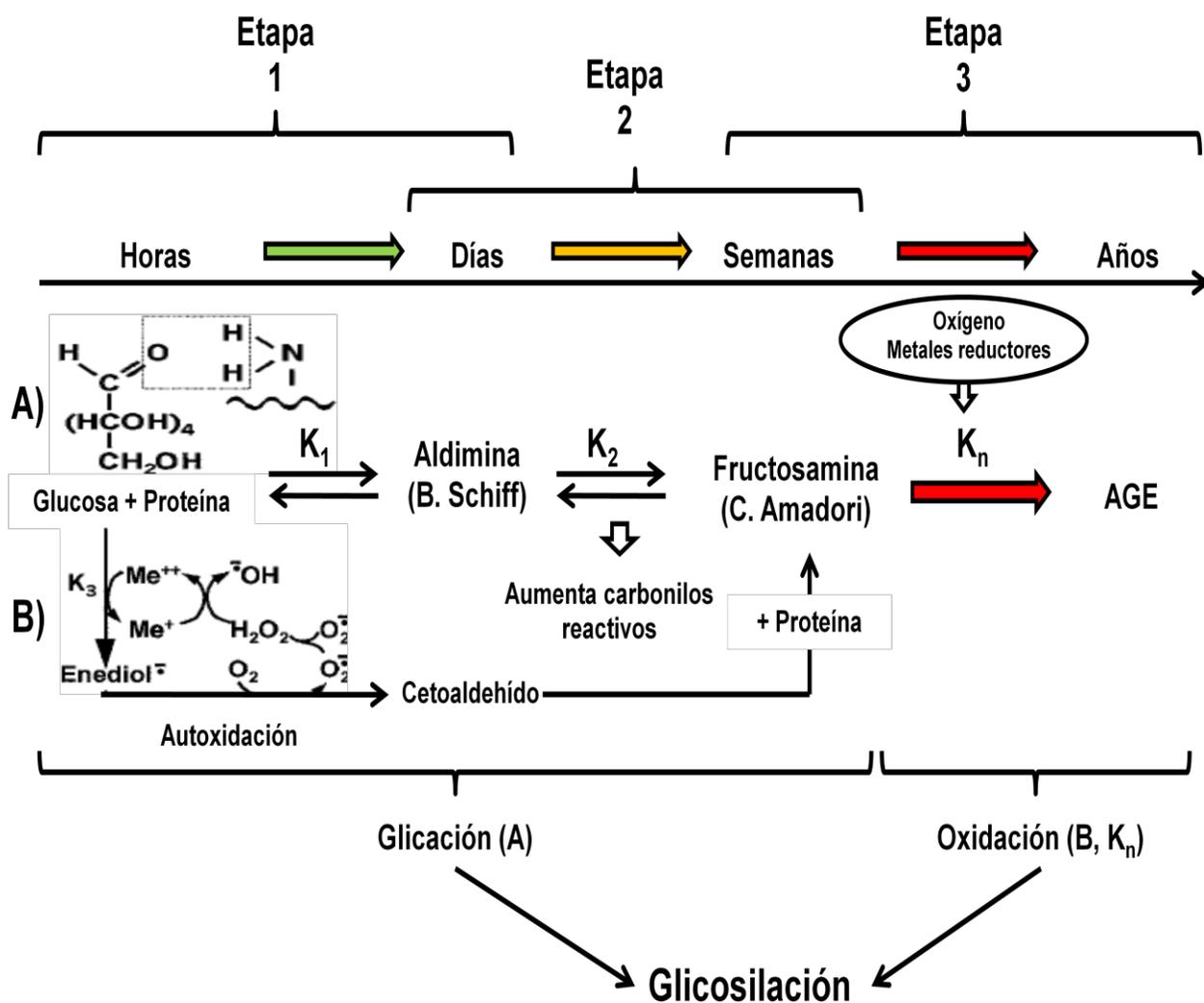


Figura 7. Esquema de la glicación y glicosilación de proteínas. A) Formación de aldimina y compuestos de amadori. B) Producción de cetoaldehídos reactivos por autoxidación de glucosa con generación de radicales libres. Ambos procesos conducen a formación de productos finales de glicosilación avanzada (Actis y Rebolledo, 2000; Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez., 2007).

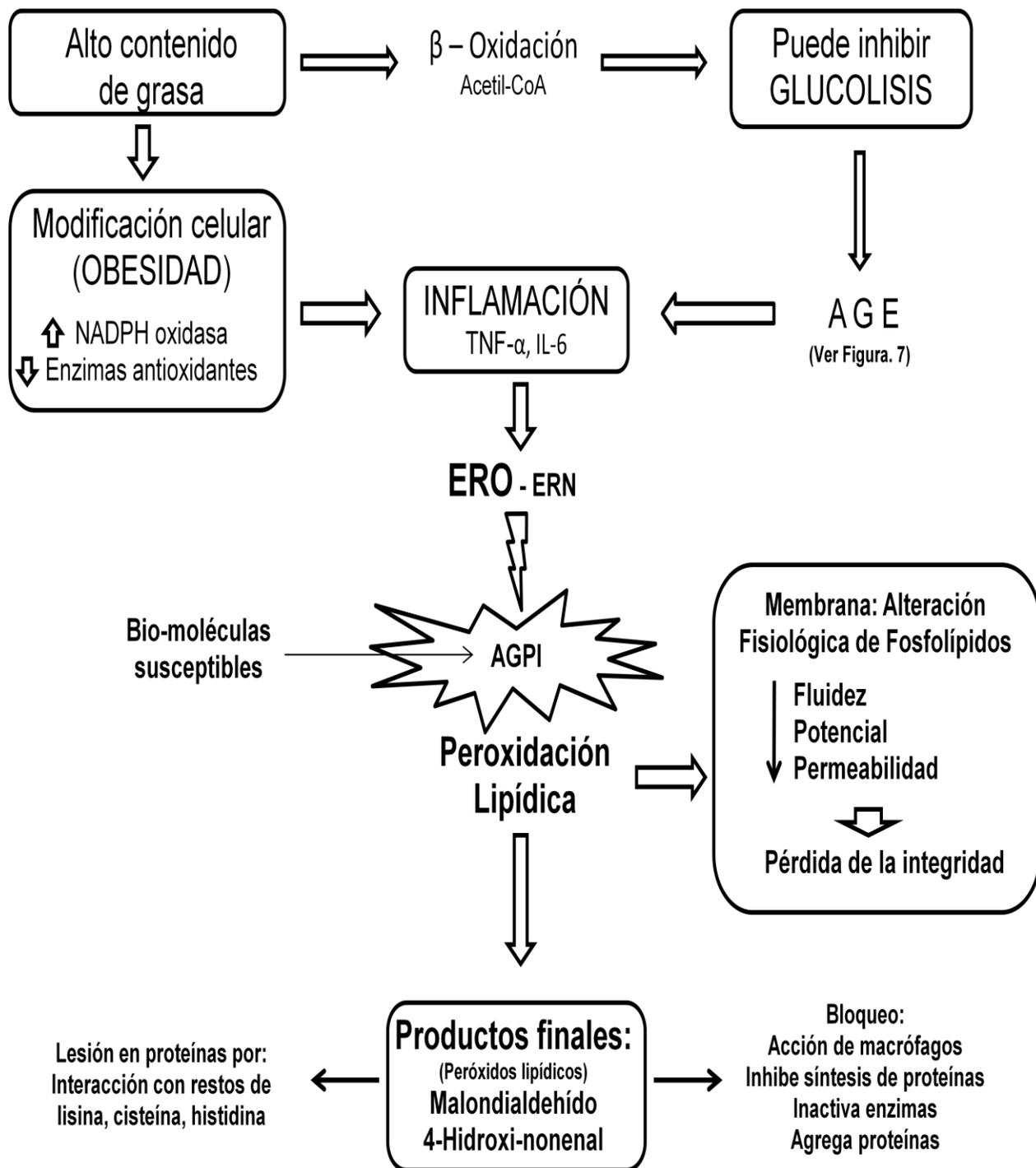


Figura 8. Proceso fisiológico de peroxidación de lípidos, alteración de la membrana biológica y productos finales (Esterbauer *et al.*, 1991).

c) Ciclo glucosa – ácidos grasos

La interacción entre el metabolismo de lípidos y el de carbohidratos puede ser explicado en parte por la existencia del llamado ciclo glucosa-ácidos grasos propuesto por Randle *et al.* (1963) (Figura 9). Un aumento en la concentración de ácidos grasos en plasma podría conducir a una oxidación aumentada de grasas (β -oxidación) que resulta en acumulación de Acetil CoA y NADH lo que puede condicionar una inhibición de la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH) y por consiguiente evitar la oxidación de piruvato. El inhibir la piruvato deshidrogenasa puede conducir a un ahorro de carbohidratos, dado que el piruvato convertido en acetil CoA se oxida. Un incremento de acetil CoA, de hecho un aumento en el cociente acetil CoA/CoA resulta en incremento en la concentración de citrato que inhibe a la enzima fosfofructocinasa (PFK) enzima determinante de la velocidad de la vía glucolítica. Estos efectos pueden resultar en una reducción de la tasa de glucólisis y glucogenólisis lo que conduce a un aumento de glucosa en sangre, así como concentraciones más bajas de ácidos grasos pueden generar adaptaciones opuestas (Randle *et al.*, 1963; Jeukendrup *et al.*, 1998; Rumberger *et al.*, 2004).

d) Proteínas

El daño sobre aminoácidos determina alteraciones en la conformación de la proteína y su función. La pérdida de función cambia o frena procesos celulares y puede, además, inducir la producción de autoanticuerpos. La oxidación de proteínas puede estimarse por carbonilos, que derivan de la oxidación directa de cadenas laterales de aminoácidos y de la ruptura oxidativa de proteínas. Los carbonilos son aparentemente difíciles de inducir y pueden, por lo tanto, indicar estrés oxidativo más severo (Andresen *et al.*, 2006). Los aminoácidos, péptidos y proteínas son susceptibles de ser sustrato de RL o ERO o bien originar derivados de tipo lipídico o glucídico que reaccionan con los grupos funcionales de las proteínas. La modificación conlleva a una desaminación o descarboxilación del aminoácido proteico, formando bitirosina y compuestos carbonilos como productos finales de oxidación (Daneshvar *et al.*, 1997; Stadman and Beriett., 1998; Szapacs *et al.*, 2008). Se pueden alterar proteínas funcionales tales como transportadoras y enzimas, lo que condiciona rupturas que permiten la salida del

contenido de las células y organelos como enzimas hidrolíticas lisosomales (Gutteridge y Halliwell 1990; Alvarez *et al.*, 1993; Wong-ekkabut *et al.*, 2007).

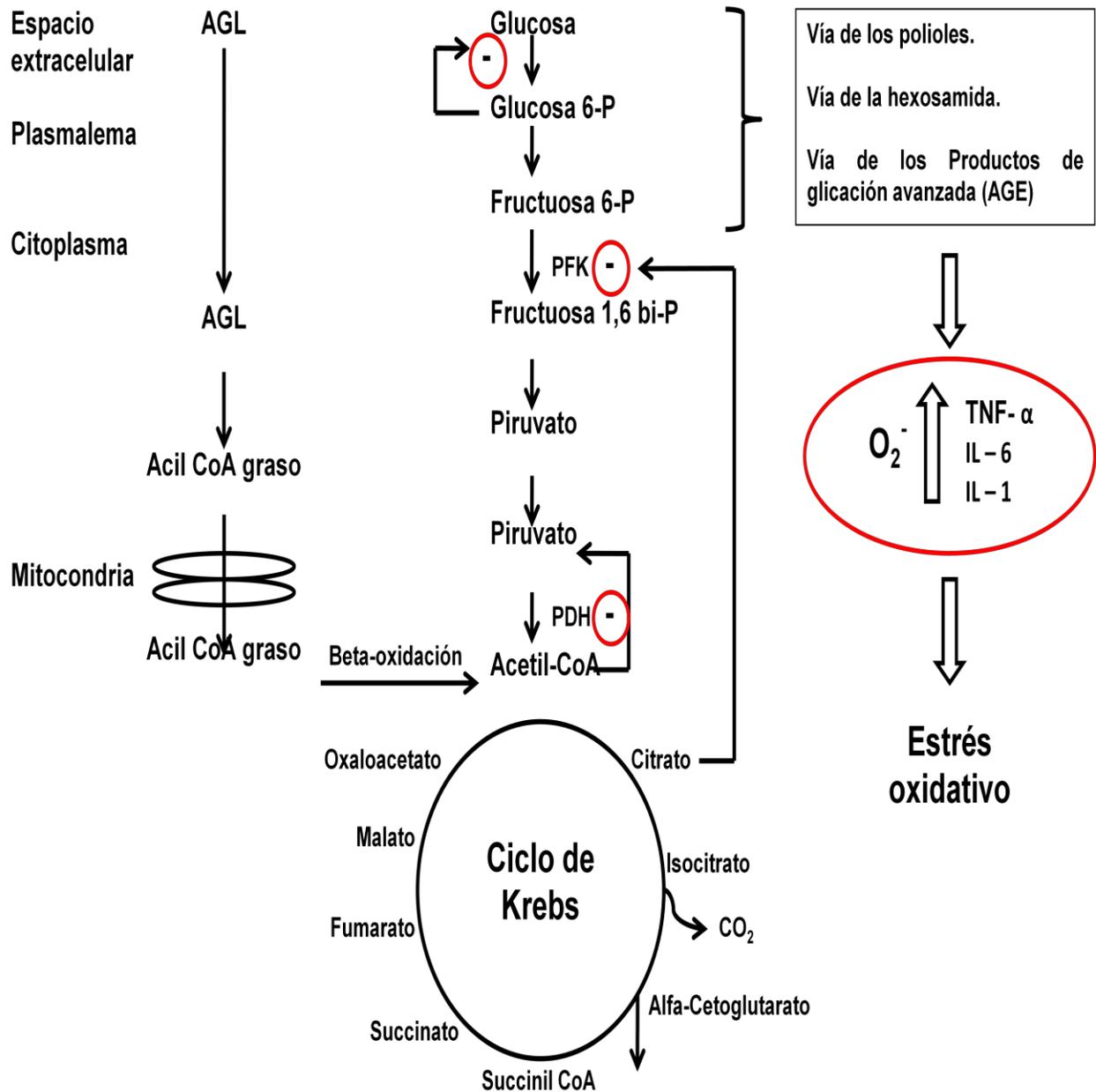


Figura 9. Mecanismos por los cuales la oxidación de ácidos grasos pueden inhibir la oxidación de glucosa (P = Fosfato, PFK = Fosfofructocinasa, PDH = Piruvato Deshidrogenasa) (Jeukendrup *et al.*, 1998).

2.4. HIERRO.

Diversos metales de transición, tales como zinc, hierro, cobre, cobalto y manganeso son esenciales ya que participan en el control de diversas vías metabólicas y de señalización. Sin embargo, su coordinación química y sus propiedades redox son tales que son capaces de escapar de los mecanismos de control como la homeostasis, transporte, compartimentalización y unión a tejidos y constituyentes celulares designados (Figura 10) (Valko *et al.*, 2005). El hierro es un elemento traza de vital importancia para la vida celular, encontrándose en un estado divalente. Por esta naturaleza, el hierro puede actuar como un componente redox de proteínas y es, por lo tanto, vital en los procesos biológicos que requieren de transferencia de electrones como el transporte de oxígeno, fosforilación oxidativa, biosíntesis de DNA y metabolismo de xenobioticos. El hierro es un constituyente de importantes proteínas como, hemoglobina, citocromos, oxigenasas, flavoproteínas y redoxinas. La transición del metal participa en la transferencia de electrones a través de la vía de reacciones oxido-reducción, que resulta en la fluctuación del hierro entre su estado férrico (Fe^{3+}) y estado ferroso (Fe^{2+}). Esta característica es en gran parte responsable de la significancia biológica del hierro. Esa característica del hierro le permite participar en la producción de energía por transferencia de electrones, lo que también causa toxicidad que resulta en un exceso de hierro libre. El hierro es un metal capaz de hacer ciclos redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado, permitiendo catalizar reacciones que producen radicales libres y pueden producir especies reactivas de oxígeno (Mackenzie *et al.*, 2008).

2.4.1 Reacción de Fenton.

La reacción de Fenton se produce cuando el hierro ferroso interacciona con peróxido de hidrogeno, de dicha reacción se genera radical hidroxilo (Figura 11) en conjunto con hierro férrico, este último puede volver a interactuar con el superóxido agravando aún más los procesos de oxidación. Estas reacciones, si superan las defensas antioxidantes endógenas y exógenas, condicionarán peroxidación de lípidos, daño oxidativo al DNA y pueden afectar a otras macromoléculas (Valko *et al.*, 2005; Mackenzie *et al.*, 2008).

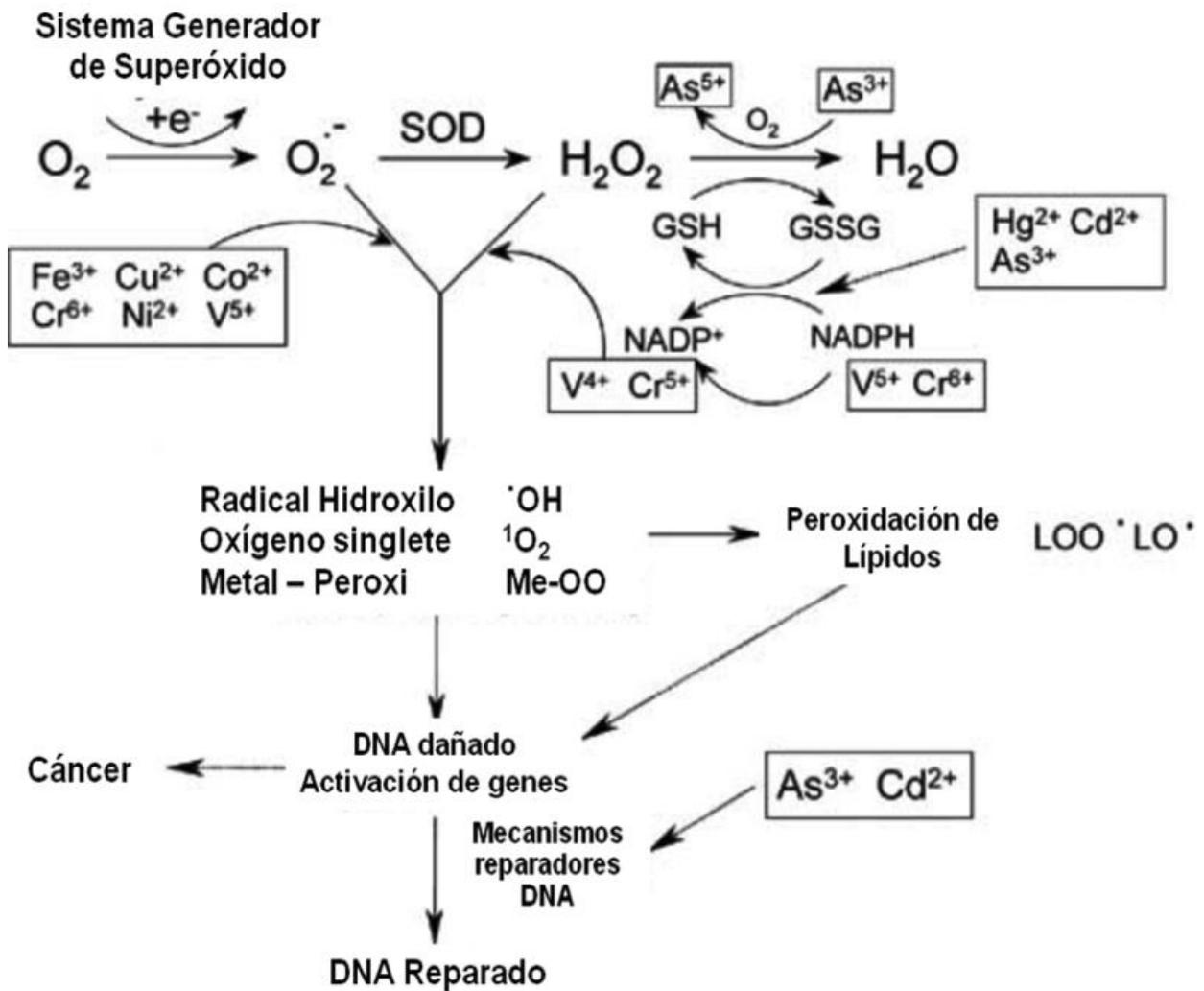


Figura 10. Vías de inducción de estrés oxidativo por metales de transición (Tomada de Valko *et al.*, 2005).



Figura 11. Reacción de Fenton. 1) Interacción de hierro férrico con superóxido. 2) Generación de radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Tomado de Valko *et al.*, 2005).

2.5. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE ESTRÉS OXIDATIVO.

En la literatura claramente se han propuesto diferentes modelos biológicos para generar estrés oxidativo mediante los cuales se busca determinar diferentes sustancias químicas que permitan medir la severidad de esta condición. El desarrollar e implementar estos modelos en estudios *in vitro* e *in vivo* define circunstancias y condiciones específicas que el autor busca en su estudio. Es importante hacer notar que muchos modelos emplean sustancias específicas como colesterol puro, ácido cólico (ácido biliar sintetizado en hígado a partir de colesterol), entre otros, para generar las condiciones que se desean y de esta manera estudiar el comportamiento de otra sustancia como tratamiento. Wilson *et al.* (2007) en su modelo animal (ratas Wistar) estudió el efecto de la dieta tipo occidental, alta en grasa y baja en grasa sobre el metabolismo de ácidos grasos y la disfunción en la contracción del corazón y, a su vez, hacen referencia sobre el estado redox. Así mismo, refiere tipos de clasificación de periodos corto, mediano o intermedio y largo plazo, considerando esta clasificación, resulta de importancia ya que permite observar, de una manera más clara, que el tiempo o periodo de estudio tiene relevancia en lo que se está estudiando. Studzinski *et al.* (2008) documentaron que una dieta tipo occidental alta en grasa promueve un número bien establecido de alteraciones metabólicas e incrementa la morbilidad. El efecto mejor descrito a largo plazo incluye incremento en la incidencia de obesidad, hiperinsulinemia, hiperglucemia, hipertensión y enfermedad cardiovascular. La ingesta de este tipo de dieta se ha relacionado con la alteración de péptidos circulantes derivados del tejido adiposo, conocidos como adipocinas, que potencialmente promueven efectos degenerativos en diferentes sistemas orgánicos.

Otros estudios han documentado que la dieta alta en grasa promueve de forma degenerativa alteraciones bioquímicas en varios tejidos. De forma particular Diniz *et al.* (2004) y Rocha *et al.* (2009) vincularon la dieta alta en grasa con un incremento en la producción de ERO que llevan a estrés oxidativo, oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos. Ambos formularon la dieta alta en grasa utilizando aceite de soya, sacarosa, colesterol y ácido cólico en 1000 g de alimento estándar. Balkan *et al.* (2004) reportaron en su estudio un modelo de dieta alta en colesterol para estudiar el efecto sobre el perfil de lípidos y la generación de estrés oxidativo en plasma, hígado y aorta. Dicha

investigación fue desarrollada en conejos Nueva Zelanda y ratas Wistar (machos). Para los conejos, se reportó que estos son más susceptibles ($p < 0.001$) a presentar alteraciones en el estado redox, alteraciones en los niveles séricos de lípidos. En las ratas, a pesar de encontrar alteraciones con las mismas condiciones, presentaron una significancia baja ($p < 0.05$) en la mayoría de las variables contempladas, por tal consideración este modelo animal es más resistente al estrés oxidativo, a alteraciones en los lípidos. Es de importancia resaltar que, contrario a lo esperado y por los resultados obtenidos por los autores, la enzima antioxidante SOD mantiene concentraciones muy similares a nivel hepático, cuando se estudiaron ratas machos Wistar. Silva *et al.* (2008) realizaron un estudio en el cual se empleó una dieta a la que llamo hiperlipidémica debido a que contenía como ingrediente extra o añadido al colesterol como agente lipídico, prácticamente con una densidad energética muy similar a la del grupo control (4084 kJ/kg y 4064 kJ/kg, respectivamente). Junto con este tipo de dieta, se empleó sobre carga de hierro en dosis no tóxicas para investigar el efecto histológico sobre el tejido hepático, sobre perfiles séricos de lípidos y nivel sérico de glucosa. Sobre el efecto histológico en el hígado reportó la presencia de esteatosis hepática sobre todo en el grupo hiperlipidémico y en menor medida en el grupo hiperlipidémico con administración de hierro. En cuanto a los niveles séricos de triglicéridos estos se aumentaron con la administración de hierro, no así para los niveles séricos de glucosa y hemoglobina glucosilada que presentaron una reducción con la administración de hierro independientemente del tipo de dieta que se les haya administrado.

III. JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades crónico-degenerativas han presentado un aumento considerable en las últimas décadas. Tienen como factores de riesgo, la exposición a contaminantes ambientales, la radiación, la predisposición genética, los estilos de vida, los hábitos de alimentación, entre otros. En particular, la dieta hipercalórica resulta en alteraciones metabólicas que condicionan un desequilibrio homeostático redox. Este desequilibrio se ve afectado por la deficiencia de antioxidantes endógenos y exógenos, así como por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno resultado de la demanda de O_2 en el metabolismo celular. La alta reactividad de estas especies generan inflamación, que a su vez aumenta la producción de citocinas inflamatorias ($TNF\alpha$, IL1, IL6), dañan a biomoléculas (ADN, proteínas, lípidos) y mecanismos de señalización, proceso químico conocido como estrés oxidativo, lo que lleva al desarrollo de enfermedades que comprometen la calidad de vida.

En la alimentación se han identificado a los hidratos de carbono simples (azúcares) y grasas como factores responsables de generar mayor estrés oxidativo y alteraciones metabólicas como obesidad, hiperglucemia, dislipidemia, resistencia a insulina, entre otras. Las alteraciones metabólicas mantenidas (largo plazo), contribuyen a la generación de radicales libres, especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno y por consiguiente estrés oxidativo, promoviendo la aparición de enfermedades crónico degenerativas. La presente investigación tiene como finalidad formular una dieta hipercalórica y determinar la importancia de la administración de hierro como modelo de estrés oxidativo, con ingredientes similares a los utilizados por los seres humanos con la finalidad de evaluar el impacto sobre especies reactivas de oxígeno, enzimas antioxidantes, peroxidación de lípidos y su efecto metabólico, que proporcione más evidencia científica de la interrelación en la triada alimentación – estrés oxidativo - enfermedad.

IV. HIPÓTESIS.

La dieta hipercalórica per se y en combinación con la administración de hierro condiciona a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que conlleva a alteraciones del sistema de defensa antioxidante generando estrés oxidativo.

V. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar un modelo de dieta hipercalórica en combinación con hierro en animales de experimentación como inductor de alteraciones metabólicas y generador de estrés oxidativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Formular un modelo de dieta hipercalórica con una mezcla de ingredientes de fácil disponibilidad que genere condiciones propicias para alteraciones metabólicas y permita inducir estrés oxidativo.
2. Evaluar el modelo en combinación con la administración intraperitoneal de hierro dextran, como un inductor de estrés oxidativo.
3. Determinar niveles séricos de glucosa, colesterol total, triglicéridos y cantidad de grasa visceral como parámetros de alteraciones metabólicas.
4. Determinar especies reactivas de oxígeno (H_2O_2), enzimas antioxidantes (SOD, CAT) y peroxidación de lípidos (MDA) como marcadores de estrés oxidativo.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental.

Se emplearon 25 ratas hembra de la cepa Wistar, de 6 semanas de edad que se mantuvieron a $22 \pm 3^\circ \text{C}$, humedad relativa de $60 \pm 5\%$ y ciclos de 12 horas de luz-oscuridad. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales y se manejaron de acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y se les proporcionó agua *ad libitum*. Los animales fueron divididos en dos grupos de forma aleatoria conforme a su peso inicial y distribución normal. Grupo 1, con peso promedio de 262 ± 23.05 y alimentado *ad libitum* con Dieta Estándar (DE) y Grupo 2, con peso promedio de 262.5 ± 21.57 y alimentado *ad libitum* con Dieta hipercalórica (DH) durante 12 semanas. En la última semana se procedió a subdividir ambos grupos para administración intraperitoneal de hierro dextran, donde: 1er. subgrupo (DE) = Dieta estándar con administración de solución salina, 2do. subgrupo (DEF_e) = Dieta estándar con administración de hierro dextran, 3er. subgrupo (DH) = Dieta alta en grasa con administración de solución salina y 4to. subgrupo (DHF_e) = Dieta alta en grasa con administración de hierro. Las dosis de hierro dextran fueron de 10, 25 y 50 mg/kg de peso durante el día 5, 3 y 1 antes del sacrificio respectivamente (El-Hafidi y Baños, 1997). Durante el estudio se registró el consumo de alimento 2 veces por semana para determinar la ingesta energética (promedio del consumo diario X energía dietaría metabolizable). El peso corporal se registró semanalmente y se utilizó para determinar el área superficial corporal ($\text{g}^{0.7}$) = peso corporal final^{0.7} (Rocha *et al.*, 2009). En la Figura 12 se muestra un esquema del diseño experimental.

Se emplearon 2 tipos de dieta basados en el alimento para roedores del proveedor Laboratory Rodent Diet 5001. Para la preparación de la DH se molió dieta estándar del mismo proveedor utilizando un molino Thomas ScientificTM 800-345-2100, Modelo 3575-E15 a 1 micra de diámetro y se mezclaron 81 g de dieta estándar molida con 10 g de sacarosa, y 9 g de aceite hidrogenado comercial, procediéndose a preparar pellets por extrusión (Extrusor en frío, de modo tornillo TA 6/D, Didacta Italia, D45TE).

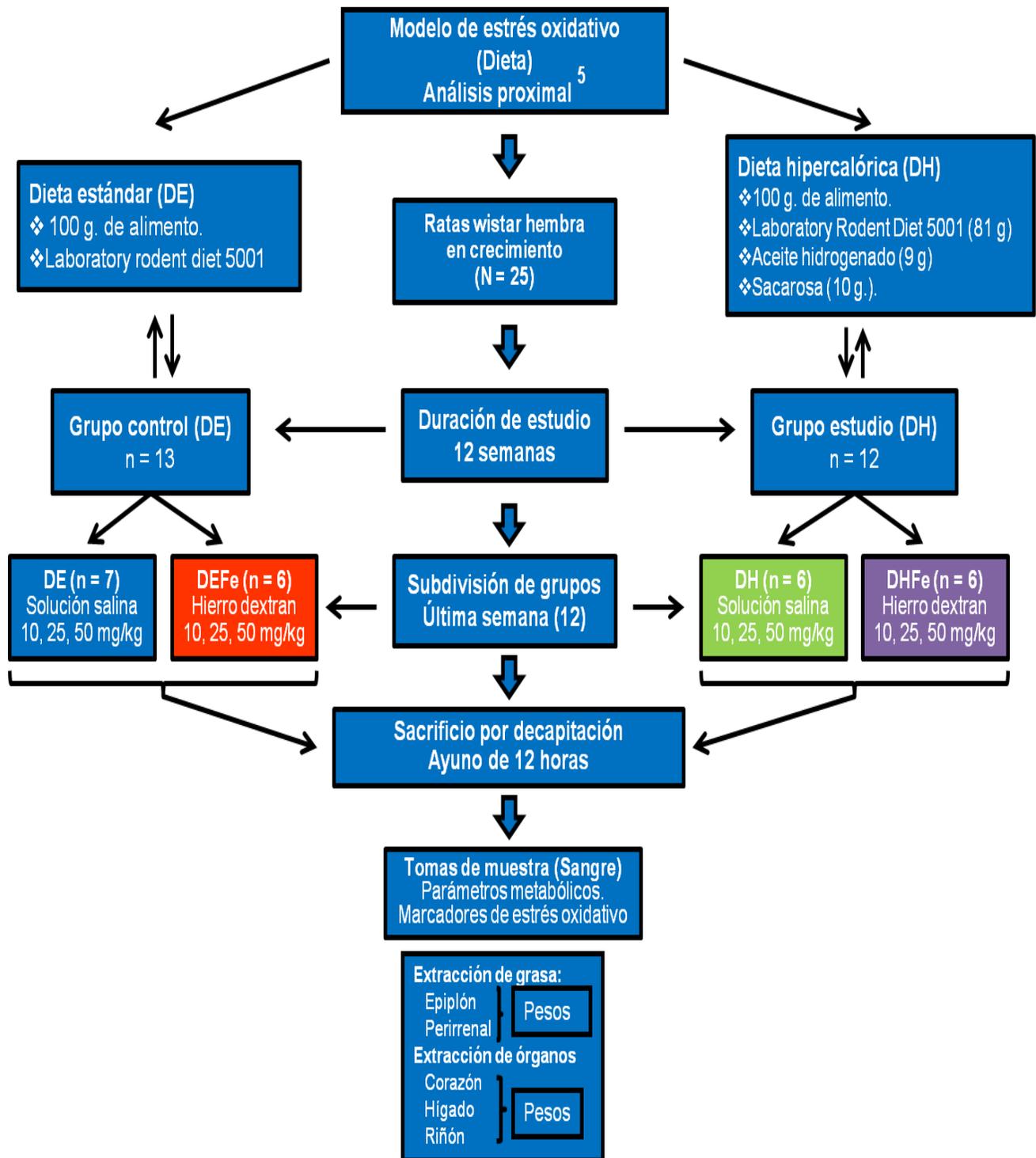


Figura 12. Diseño experimental para el estudio del modelo de estrés oxidativo en ratas Wistar a partir de una dieta hipercalórica.

6.2 Análisis Químico Proximal

Se realizó un análisis químico proximal para determinar los valores finales de los componentes de la dieta de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC International (Association of Official Agricultural Chemists International).

a) Determinación de humedad y materia seca.

Esta determinación se realizó siguiendo el método AOAC 930.15. Después de pesar las muestras (20 g) se colocaron en una charola de aluminio y se secaron por 24 h en la estufa de desecación con aire forzado a una temperatura constante de 65° C. Pasado el tiempo se retiraron de la estufa y se colocaron en un desecador durante 1 h. Posteriormente se registraron los pesos y se obtuvo el % de humedad mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \left(\frac{\text{Peso de la muestra seca} \times 100}{\text{Peso de la muestra inicial, g}} \right)$$

$$\% H = \frac{(A-B) \times 100}{M}$$

$$\% MS = 100 - \% H$$

Dónde:

A= peso charola + muestra húmeda, (g).

B= peso charola + muestra seca, (g).

M= peso muestra inicial, (g)

MS = Materia Seca.

Los resultados se calcularon y se presentan como porcentaje de humedad y materia seca.

b) Determinación de cenizas.

Para la determinación de cenizas se siguió el método AOAC 942.05. Brevemente, se pesaron 3 g de muestra para cada repetición, posteriormente se colocaron en crisoles de porcelana previamente puestos a peso contante. Las muestras fueron calcinadas en

la mufla a una temperatura de 550° C por 12 h hasta tener cenizas grises. Transcurrido el tiempo, los crisoles se sacaron de la mufla y se colocaron en la estufa de secado para enfriarlos durante 30 min. Después se colocaron en el desecador alrededor de 2 h y se registraron los pesos. El porcentaje de cenizas se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(A - B)}{M} \times 100$$

Dónde:

A= peso del crisol + cenizas, (g).

B= peso del crisol a peso contante, (g).

M= peso de la muestra inicial, (g)

c) Determinación de fibra cruda

La determinación de fibra cruda se determinó por el método 962.09 de la AOAC. 1990. La fibra cruda está constituida por la fracción de materia orgánica que queda después de digerir la muestra con ácido sulfúrico y e hidróxido de sodio bajo condiciones controladas. Esta fracción está formada principalmente por celulosa, cutina y parte de la lignina presentes en la muestra. La fibra se pierde en la ignición del residuo seco remanente después de la digestión de la muestra.

Se pesaron 2 g de muestra, con una exactitud de 0.1 mg y se transfirió en un matraz para calentamiento a reflujo, en otro matraz para blanco se agregaron 2.0 g de fibra cerámica, a ambos matraces se les puso 200 mL de H₂SO₄ 0.255 N hirviendo, gotas de antiespumante y perlas de vidrio, se conectó el aparato de calentamiento a reflujo y se dejó hervir rotando el matraz periódicamente durante 30 min, después de esto se desmontó el equipo y se filtró a través de un embudo Büchner. El filtrado se lavó con 75 mL de agua hirviendo. Se retornó el residuo al aparato de calentamiento a reflujo y se hirvió nuevamente por 30 min, rotando el matraz periódicamente, posteriormente se lavó con 25 mL de H₂SO₄ 0.255 N hirviendo y 3 porciones de 50 mL de agua hirviendo y con 25 mL de etanol al 95%. El residuo se removió y se transfirió a un crisol previamente pesado. Se secó en la estufa a 130 + 2 °C por 2 h, se enfrió en el

deseCADador y se peso. Posteriormente se incineró por 30 min a 600 + 15 °C, se enfrió en el desecador y se pesó. Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

% Fibra cruda en muestra molida = C = (Pérdida de peso en la incineración – pérdida de peso del blanco de fibra cerámica) x 100/ peso de la muestra.

%Fibra cruda (base húmeda) = $C \times 100 - \% \text{ Humedad muestra original.}$
100

Se realizó la prueba por duplicado, se promediaron los valores obtenidos y se expresaron los resultados con dos decimales, se cuidó que la variación entre los valores obtenidos en las dos pruebas no fuera superior al 5%.

d) Obtención del extracto etéreo (contenido de grasa)

La determinación del extracto etéreo se realizó siguiendo el método de la AOAC 920.39. Esta determinación usa el método Soxhlet que utiliza un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en el alimento.

Una vez pesadas las muestras (3 g), se transfirieron a los cartuchos y se colocaron en el extractor Soxhlet. En la parte inferior se ajustaron los vasos recolectores del extractor previamente llevados a peso constante. Se puso en calentamiento la parrilla y se colocó el refrigerante para condensar el éter. Se añadieron 80 mL de éter por el extremo superior para obtener las descargas, la extracción se efectuó por 4 h. Al transcurrir este tiempo se retiraron los vasos y se dejaron en una campana de extracción hasta que se evaporó el éter restante, posteriormente se metieron en la estufa por 3 h a 100° C. Finalmente se colocaron en el desecador para después registrar el peso. Los resultados fueron calculados con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ extracto etéreo} = \frac{(A - B) \times 100}{M}$$

Dónde:

A = peso del vaso con residuo lipídico, (g).

B = peso constante del vaso, (g).

M= peso de la muestra, (g).

Los resultados se presentan como porcentaje de extracto etéreo.

e) Determinación de proteína (N x6.25)

La proteína se determinó con el método AOAC 2001.11. El método también es llamado Kjeldahl. Esta técnica se basa en que las proteínas y demás materia orgánica, son oxidados por el ácido sulfúrico, añadiéndose sulfato de sodio como catalizador y aumentar la temperatura de la mezcla y de esta manera acelerar la reacción, fijándose el nitrógeno, en forma de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Esta sal se hace reaccionar con una base fuerte desprendiéndose amoníaco (NH_3) , que se destila y se recibe en un volumen conocido de ácido bórico (H_3BO_3) . Por titulación del ácido se calcula la cantidad de NH_3 , conociéndose de esta manera la cantidad de nitrógeno contenido en la muestra que multiplicado por el factor de conversión (6.25) resulta en la cantidad de proteína cruda o bruta.

Se tomaron por triplicado 2.0 g de muestra y se colocaron en tubos Kjeldahl agregándose 25 mL de ácido sulfúrico al 97% y 2 pastillas de la mezcla digestora (1000 Kjeltabs Cu/3.5) para iniciar la digestión (líquido oscuro). Los matraces se colocaron sobre las parrillas de calentamiento y después de 45 min cuando el líquido tomó una coloración verde claro se retiró de la parrilla y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Para realizar la destilación se midieron 50 mL de ácido bórico al 2% con 3 gotas de rojo de metilo en un matraz Erlenmeyer y éste se colocó en la terminal del refrigerante de la unidad de destilación, para recibir el amoníaco. En este punto se agregó hidróxido de sodio al 50% al tubo Kjeldahl y se colocó inmediatamente en la unidad de destilación hasta destilar aproximadamente 150 mL. Se tituló con una solución de ácido sulfúrico 0.1N hasta que se produjo el cambio de color amarillo a rosa tenue. Los cálculos para obtener el porcentaje de nitrógeno se realizaron aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(A - B) \times C \times N \times 100}{M}$$

Dónde:

A= mL de H₂SO₄ gastados de la muestra problema

B= mL de H₂SO₄ gastados del blanco.

C= miliequivalentes de nitrógeno (0.014).

N= Normalidad del ácido H₂SO₄.

M= peso de la muestra, (g).

% de proteína cruda o bruta = % Nitrógeno x factor de conversión (6.25).

Los resultados se presentaron en % de proteína.

En el Cuadro 1 se muestra la composición proximal de las dietas en donde se observa que la DH contuvo un aporte energético 13% mayor respecto a la DE.

Cuadro 1. Análisis proximal de las dietas experimentales (valores por 100 g).

Ingredientes	Dieta Estándar (DE)		Dieta Hipercalórica (DH)	
Materia seca	93.8 %		95.4 %	
	%	Energía aportada (kCal)	%	Energía aportada (kCal)
Carbohidratos	43.5	174	39.1*	156.4
Proteína cruda	25	100	23.3	93.2
Grasa	6	54	13.6**	122.4
Fibra	18.2	NA	18.3	NA
Cenizas	7.3	NA	5.7	NA
Total	100		100	
Energía metabolizable (kCal/g)	3.28	328	3.72	372

* Adición de sacarosa (10 g)

**Adición de aceite hidrogenado comercial (9 g)

NA: No aplica

6.3 Sacrificio y toma muestras.

Al terminar el periodo experimental los animales se sometieron a 12 horas de ayuno para posteriormente ser sacrificados por decapitación. La sangre se colectó del tronco y se colocó en tubos de centrifuga sin anticoagulante (tipo de tubos) para centrifugar a

3000 rpm por 7 min, recuperando el suero con cuidado para evitar la hemólisis y se almacenó a -80° C hasta su uso. Después del sacrificio y recolección de sangre se procedió a la disección de donde se extrajo tejido graso (epiplón, perirrenal) y órganos (corazón, hígado y riñón) para determinar el peso y características fisiológicas post-mortem.

6.4 Determinaciones en suero.

El suero se empleó para determinación de parámetros metabólicos: triglicéridos (Elitech, TGML-0517), colesterol total (Elitech CHSL-0507) y marcadores de estrés oxidativo: peróxido de hidrógeno (BioVision, Hydrogen Peroxide Assay Kit, Catalog No K265-200), malondialdehído (TBARS Assay Kit, Catalog No. 10009055, Probiotek, Cayman Chemical Co.) y marcadores de defensa antioxidante: superóxido dismutasa SOD (Superoxide Dismutase Assay Kit, Catalog No. 706002, Probiotek, Cayman Chemical Co.) y catalasa (Catalase Assay Kit, Catalog No. 707002, Probiotek, Cayman Chemical Co.).

6.5 Análisis estadístico.

Los datos se presentan en media \pm desviación estándar. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 17 y los resultados se analizaron mediante comparación de medias utilizando una Prueba T, ($p \leq 0.05$), ANOVA para la comparación entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y para la comparación entre cada tratamiento y el control (Dunnett, $p \leq 0.05$).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Ganancia de peso y consumo de alimento.

Se incluyeron 25 ratas para el estudio de características homogéneas en peso, se observó que el tipo de dieta administrada no tuvo un impacto significativo en el peso corporal final, por tal razón, la ganancia de peso durante el estudio fue similar para ambos grupos. Con respecto al consumo de alimento, se observó que la administración de dieta estándar condicionó a que los animales del grupo control (DE) comieran más alimento en comparación con los alimentados con dieta hipercalórica ($p = 0.008$). Sin embargo, la ingesta energética (kCal) y el área de superficie corporal no mostraron diferencias significativas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características generales de los animales alimentados con dieta estándar vs dieta hipercalórica durante el estudio.

Parámetros	Grupos	
	(n = 13)	(n = 12)
	DE	DH
Peso corporal inicial (g)	104.04 ± 14.39	107.00 ± 16.72
Peso corporal final (g)	197.73 ± 12.58	206.13 ± 14.12
Ganancia de peso (g)	93.69 ± 17.30	99.13 ± 24.81
Consumo de alimento (g/kg/día)	14.16 ± 1.38*	12.29 ± 1.71*
Ingesta de energía (Kcal/kg/día)	42.75 ± 4.16	46.47 ± 6.47
Área superficial corporal (g^{0.7})	36.53 ± 4.67	37.25 ± 4.80

Los datos se presentan en media ± desviación estándar, para el grupo de Dieta Estándar (DE) con una n = 13 vs para el grupo de Dieta Hipercalórica (DH) con una n = 12.

* Significancia estadística significativa (g/kg/día) del grupo de DE vs DH, Prueba T, $p \leq 0.008$.

a) Peso corporal

La administración de la DE y de la DH inició a las 8 semanas de edad de los animales. A esta edad las ratas Wistar se encuentran en etapa de crecimiento, desarrollo y por lo tanto incrementan su peso corporal.

Al evaluar el peso corporal de los animales con respecto al tipo de dieta administrada durante 12 semanas de intervención, se observó que la ganancia de peso se comportó

de manera muy similar en ambos grupos desde el inicio hasta el término del experimento. Sin embargo, se aprecia en el comportamiento que los animales alimentados con DH presentaron una tendencia en el aumento del peso corporal del 4.076 % con respecto al grupo control al término del estudio, sin representar alguna significancia estadística (Figura 13).

Se ha reportado que la alimentación en animales de experimentación con dietas de alta densidad energética condiciona aumento en los depósitos de grasa y por consiguiente una ganancia importante de peso (Bartolomucci *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2007; Diniz *et al.*, 2004). Sin embargo, se han reportado resultados similares al encontrado en el presente estudio sobre la ganancia de peso corporal (sobre todo en periodos cortos) donde se observa que, independientemente del tipo de dieta con la que se alimenta al animal, el peso se mantiene. Este patrón se ha observado en un periodo de estudio de 45 días (Rocha *et al.*, 2009) y en otro periodo de estudio de 18 – 20 semanas (El-Hafidi y Baños, 1997). Wilson *et al.* (2007) en su estudio refiere una clasificación de periodos, donde, un periodo inmediato va de 1 día a una semana, un periodo corto es de 4 a 8 semanas, un periodo intermedio es de 16 a 24 semanas y un periodo largo es de 32 a 48 semanas. Este estudio, tendría una clasificación entre corto a intermedio, compartiendo esta característica con el estudio de Rocha *et al.*, y con el estudio de El-Hafidi y Baños por tal motivo, el patrón de comportamiento del peso corporal fue similar a lo reportado por estos dos autores. Si se considera el tiempo, este último parece ser el factor que determina una ganancia significativa sobre el peso corporal cuando se emplea una dieta hipercalórica (tipo occidental o alta en grasa) en comparación con dietas bajas en grasa, ya que se reporta una ganancia de peso del 30% con una diferencia significativa ($p = 0.001$) a un tiempo de 48 semanas (Wilson *et al.*, 2007).

b) Consumo de alimento

Respecto a la ingestión de alimento, durante la semana previa a la administración de dieta hipercalórica se alimentó a los animales con dieta estándar, siendo la misma cantidad de consumo neto para ambos grupos. Una vez que se administró la dieta hipercalórica se observaron diferencias en el consumo de alimento, con tendencia a menor cantidad para el grupo DH con respecto al grupo control.

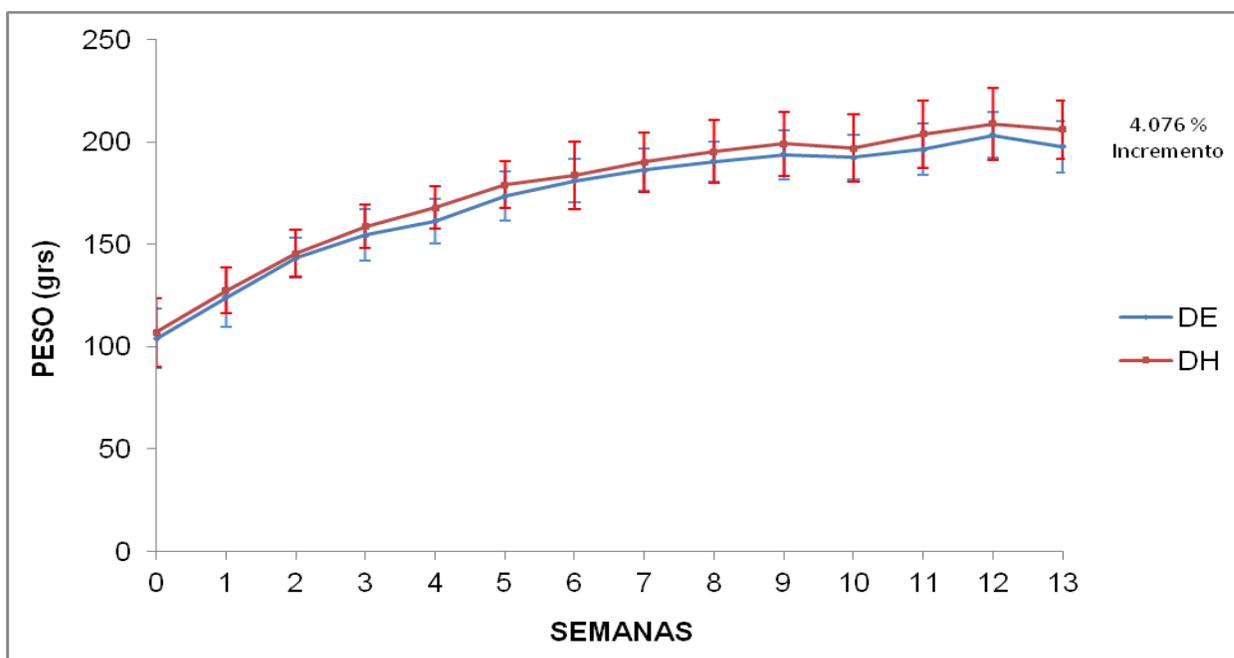


Figura 13. Comportamiento y ganancia de peso corporal, en animales alimentados con dieta estándar vs dieta hipercalórica durante 12 semanas de intervención. El comportamiento en el peso presenta una ligera tendencia del 4.076 % de mayor ganancia en los animales alimentados con dieta hipercalórica, sin diferencia estadística significativa.

La densidad energética de la dieta hipercalórica modificó el consumo de alimento en las ratas, donde se observó una relación inversa. El grupo alimentado con dieta hipercalórica tuvo el menor consumo de alimento y fue significativo en comparación con el control (DE) durante las 9 semanas de intervención (***p ≤ 0.008**). Al realizar un análisis más detallado, se presentó mayor diferencia estadística significativa (****p = 0.0001**) para el consumo de alimento entre los grupos, durante las semanas 3 – 5 y 8 – 10 de intervención (Figura 14).

Para tratar de establecer el impacto del consumo de alimento se calculó la ingesta de energía metabolizable de cada tipo de dieta durante las 12 semanas de intervención. Se observó que el patrón para el consumo de alimento no fue el mismo que para la ingesta de energía ya que, a pesar de que los animales alimentados con DE consumieron más alimento, la energía metabolizable presentó una tendencia a aumentar, principalmente en las semanas 1, 2, 4, 7 y 12 (***p ≤ 0.01**) cuando se alimentaron con DH (Figura 15).

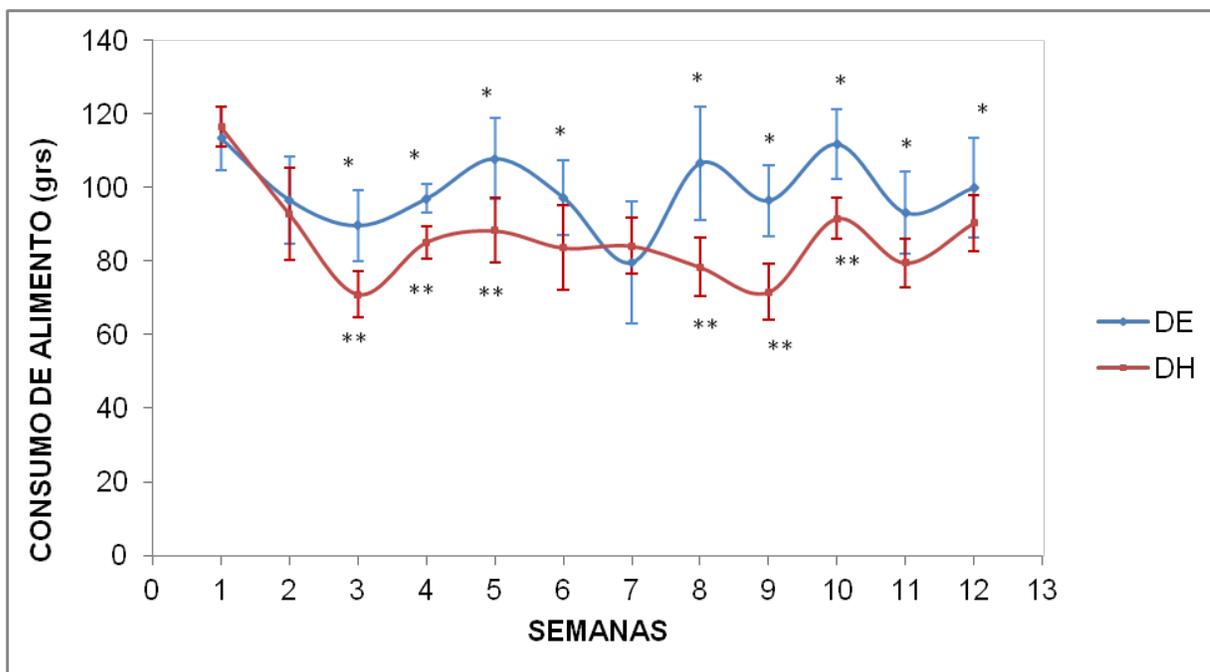


Figura 14. Análisis del consumo de alimento en ratas Wistar alimentadas con DE vs DH. Se muestra el consumo promedio de alimento en gramos por semana para ambos grupos durante el periodo de estudio. *Diferencia significativa durante las 12 semanas (*Prueba T, $p \leq 0.008$) y diferencia significativa (**Prueba T, 0.0001) en las semanas de mayor consumo.

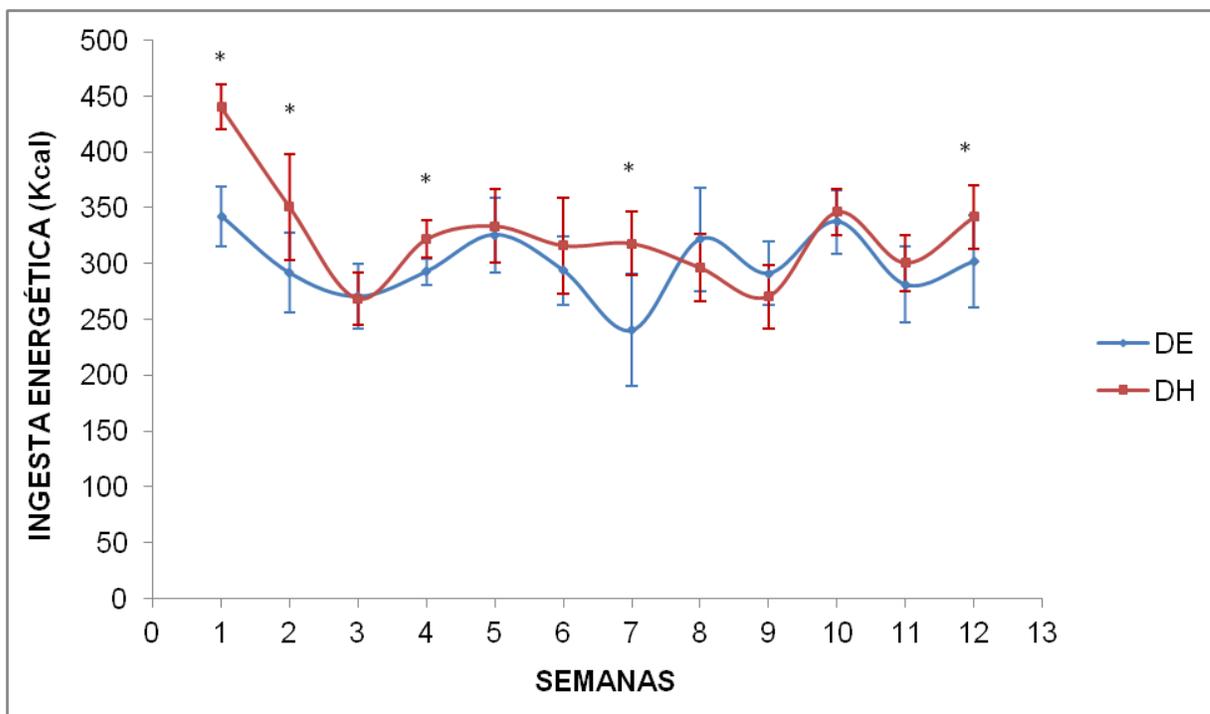


Figura 15. Ingesta de energía en ratas Wistar alimentadas con DE vs DH. Se muestra la ingesta energética en kilocalorías por semana de acuerdo a la energía metabolizable para cada dieta. *Diferencia estadística significativa (Prueba T, $p \leq 0.01$) cuando hubo mayor ingesta energética en el grupo de la dieta hipercalórica.

La variación en la ingesta de energía conduce a suponer que la tendencia en el aumento de peso corporal del 4.076% en el grupo que fue alimentado con DH, se debe a este factor. Esta tendencia se observó en otros estudios cuando se emplearon dietas con una densidad de energía similar (3.41 kCal/g) (Rocha *et al.*, 2009) a la empleada en este estudio, en donde se comparó con una dieta control (2.75 kCal/g), encontrando que animales alimentados con la dieta alta en grasa presentaron una ingesta de energía mayor.

En un estudio donde se observó un aumento de peso en periodo intermedio, la densidad energética de la dieta alta en grasa en promedio fue de 5.25 kCal/g (Diniz *et al.*, 2004), superior en un 39% a la densidad energética empleada en el presente estudio. En otro estudio con un periodo largo se emplearon 3 tipos de dieta, una similar a la estándar, otra con 45% de grasa y por último una con 60% de grasa, reportando que las dietas de alta densidad energética, con 45 y 60 % de grasa, tuvieron un impacto significativo sobre la ganancia de peso corporal y el peso al final del estudio en comparación con la dieta con 10% de grasa (Wilson *et al.*, 2007).

La densidad energética parece ser el punto clave que determina la cantidad de alimento a ingerir. Este fenómeno se atribuye a que los animales son capaces de ajustar su ingesta calórica de acuerdo al contenido energético, aunque esta hipótesis es considerada controversial (Martínez *et al.*, 2006). Se ha reportado que la ingesta de energía en los animales de experimentación disminuye de manera voluntaria cuando la alimentación o el tipo de dieta empleada esta suplementado con grasa (Diniz *et al.*, 2004). Lo anterior repercute en la ganancia de peso corporal y por consiguiente en el peso al final del estudio, donde diversos factores (hipofagia, densidad energética, entre otros) pueden contribuir a patrones diferentes en la ingesta de alimento.

7.2 Grasa visceral y órganos.

Los cambios en la acumulación de masa grasa visceral (epiplón, perirrenal) y la modificación de peso en los órganos (corazón, hígado, riñón) se muestran en el Cuadro 3. En la Figura 16 se muestra el comportamiento que se observó con respecto a valores ajustados al grupo control.

Cuadro 3. Pesos de grasa y órganos de ratas alimentadas con DE y dieta DH durante 12 semanas.

Parámetro Peso relativo**	Dieta Estándar (DE)	DE con Hierro (DEFé)	Dieta Hipercalórica (DH)	DH con Hierro (DHFe)
Grasa				
Epiplón	0.0047 ± 0.0007	0.0067 ± 0.0029	0.0079* ± 0.0024	0.0056 ± 0.0018
Perirrenal	0.0182 ± 0.0094	0.0222 ± 0.0115	0.0207 ± 0.0050	0.0229 ± 0.0131
Órgano				
Corazón	0.0037 ± 0.0007	0.0031 ± 0.0008	0.0037 ± 0.0006	0.0037 ± 0.0008
Hígado	0.0303 ± 0.0015	0.0336 ± 0.0046	0.0265 ± 0.0023	0.0290* ± 0.0028
Riñón	0.0081 ± 0.0008	0.0067 ± 0.0006	0.0065* ± 0.0005	0.0068 ± 0.0008

Los datos se presentan en media ± desviación estándar.

** Peso relativo = Peso de grasa u órgano (g) entre peso final del animal (g).

*Diferencia estadística significativa (ANOVA, $p < 0.05$) entre grasa y órganos de cada grupo.

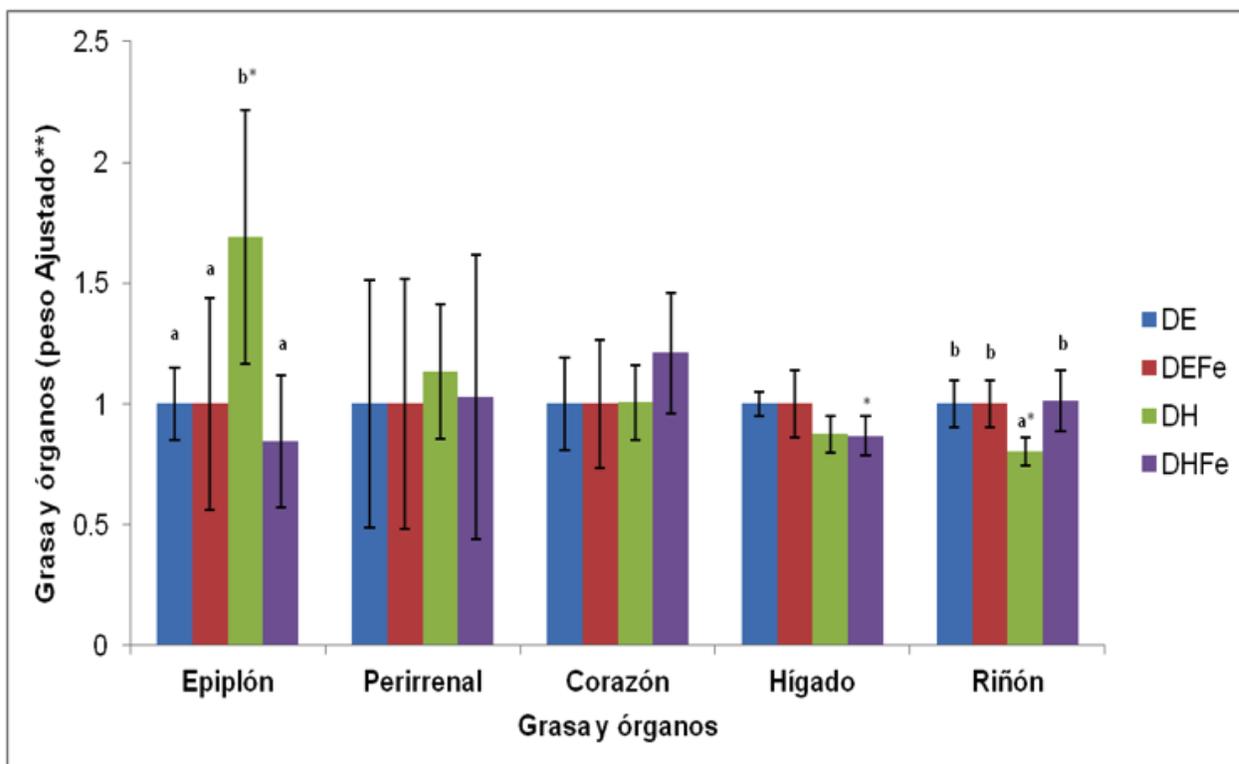


Figura 16. Diferencia de pesos ajustados a los controles para grasa visceral y órganos entre los diferentes grupos.

b*, *, a*: ANOVA: Epiplón, $p = 0.003$; Hígado, $p = 0.018$; Riñón, $p = 0.003$ respectivamente.

** Peso ajustado: (Peso relativo de grasa y órganos del grupo de dieta hipercalórica, dieta hipercalórica con hierro) entre (peso promedio de grasa y órganos del grupo de dieta estándar y dieta estándar con hierro).

La ingesta de alimento se modificó de acuerdo a la densidad de energía en la dieta, donde se observó que en algunas semanas la ingesta energética fue mayor en el grupo alimentado con DH. La carga energética se relaciona con incremento de grasa, principalmente visceral. Los animales alimentados con DH presentaron un aumento significativo ($p < 0.05$) en la ganancia de tejido adiposo a nivel de epiplón con respecto a los demás subgrupos. La ganancia de grasa afecta de manera positiva el peso corporal final sin embargo, a pesar de encontrar diferencia estadística significativa en el contenido de grasa de epiplón, ésta no tuvo un efecto de relevancia sobre el peso corporal final. Este comportamiento concuerda con lo documentado por Wilson et al. (2007) donde no se observaron cambios relevantes en periodos de estudio con un tiempo menor a 16 semanas de experimentación. Cabe señalar que en el subgrupo de DHFe, la ganancia de grasa de epiplón estuvo por debajo de los demás subgrupos, a pesar de no presentar diferencia estadística significativa. Esta reducción concuerda con lo reportado respecto al efecto lipolítico del hierro, lo que pudo provocar disminución de tejido adiposo (Rumberger *et al.*, 2004) y menor acumulación de grasa visceral.

En el caso de los órganos, el peso del hígado fue inferior en animales que fueron alimentados con DH, sobre todo en presencia de hierro ($p = 0.018$). El peso del riñón se comportó muy similar entre subgrupos, a excepción del subgrupo alimentado con DH en cual se observó una disminución ($p = 0.003$). La disminución de peso del hígado es un proceso que no está claro sin embargo, es probable que pueda tener relación con el estado de estrés oxidativo, ya que el hígado es el encargado de metabolizar al hierro y la sobre carga de hierro pueda ejercer un efecto negativo en dicho órgano. Los efectos negativos sobre el peso de hígado y riñones son contrarios a los esperados y será necesario continuar estudiando estas respuestas.

Los resultados sugieren que la alimentación con DH, bajo las condiciones experimentales del presente estudio, favorecieron la acumulación de grasa visceral en epiplón, así como un incremento modesto de peso que, aunque no significativo estadísticamente. Ambos eventos pueden ser el inicio de un proceso fisiológico parecido a la obesidad en seres humanos. La alimentación con DHFe parece tener un efecto lipolítico sobre el tejido adiposo y es probable que afecte el desarrollo del hígado.

7.3 Parámetros metabólicos.

Los datos del presente estudio reflejan un cambio estadístico significativo sobre los niveles séricos de glucosa ($p \leq 0.05$) cuando se administró DH (Cuadro 4). Por su parte, los niveles séricos de glucosa disminuyeron con la DHFe, comportamiento metabólico que no está claro. Cabe señalar que a pesar de no presentar cambios estadísticos significativos, los valores séricos de triglicéridos presentaron un incremento de aproximadamente 25% cuando se administró hierro, siendo independiente al tipo de dieta empleada (Figura 17). Lo anterior sugiere que este incremento se debe a al efecto lipolítico del hierro (Rumberger *et al.*, 2004) con el respectivo aumento de triglicéridos a nivel sérico. La alimentación alta en grasa promueve síntesis de colesterol pero ésta no estimula la secreción de triglicéridos y, en consecuencia, los esterios de colesterol y triglicéridos se acumulan en el hígado de animales alimentados con la dieta alta en grasa. Rennison *et al.* (2009) reportaron en su investigación un comportamiento similar sobre los niveles séricos de triglicéridos al no ser alterados sin embargo, encontraron una diferencia significativa de éstos al acumularse en el tejido cardiaco.

Cuadro 4. Parámetros metabólicos de animales alimentados con dieta estándar vs alimentados con dieta hipercalórica.

Parámetros Metabólicos (mg/dL)	Dieta Estándar (DE)	DE con Hierro (DEFe)	Dieta Hipercalórica (DH)	DH con Hierro (DHFe)
Glucosa	93.92 ± 9.73	91.90 ± 11.36	104.56 ± 5.97*	80.48 ± 9.41
Colesterol	41.95 ± 10.34	48.88 ± 12.33	46.57 ± 13.84	42.14 ± 8.48
Triglicéridos	40.59 ± 14.47	51.86 ± 14.92	37.84 ± 8.55	46.08 ± 19.82

* Los niveles séricos de glucosa se incrementaron significativamente en el subgrupo alimentado con dieta hipercalórica (ANOVA, $p \leq 0.05$).

La mayoría de las alteraciones metabólicas son silenciosas (Rocha *et al.*, 2009) y tienen una repercusión degenerativa a largo plazo (Actis y Rebolledo, 2000). La evidencia obtenida en este estudio vincula a la DH con alteraciones metabólicas modestas: 1) niveles séricos de glucosa elevados, 2) aumento de tejido graso visceral a nivel de epiplón y 3) ligero incremento de peso corporal. Al tomarse en cuenta lo reportado por

Rocha *et al.*, 2009, los niveles séricos de triglicéridos pueden ir incrementándose según sea la exposición al tipo de alimentación, en este caso, a la DH y pasar inadvertidos si no se tiene una evaluación periódica de estos parámetros. Otros reportes (Oosterveer *et al.*, 2009; Rennison *et al.*, 2009) muestran que el colesterol, pero sobre todo triglicéridos, tienden a acumularse en tejidos (hepático y cardíaco) lo que predispone a estos órganos a un efecto degenerativo sobre su función, principalmente a largo plazo. Es probable que se requiera un mayor tiempo de exposición a la DH para observar los efectos de la grasa sobre los parámetros lipídicos estudiados.

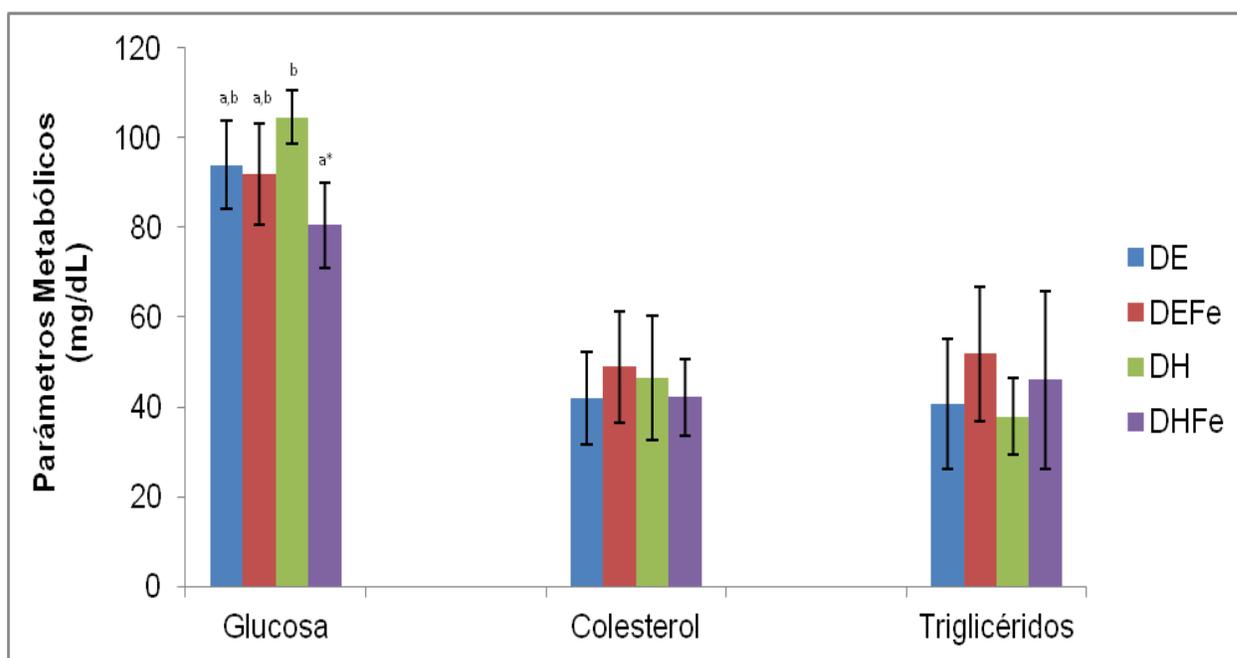


Figura 17. Valores séricos de glucosa, colesterol y triglicéridos. La alimentación a base de dieta hipercalórica durante las 12 semanas de estudio modifica significativamente los niveles séricos de glucosa (ANOVA, $p \leq 0.05$)

7.4 Marcadores de estrés oxidativo.

Los marcadores de estrés oxidativo, presentaron algunas variaciones significativas, sobre todo cuando las muestras sanguíneas contenían hierro dextran.

a) Superóxido dismutasa.

La actividad enzimática de la SOD sérica presentó un decremento importante en presencia de hierro ($p \leq 0.05$) independientemente del tipo de dieta empleada. El

comportamiento de la enzima, en el caso de los subgrupos, a los que se les administró solución salina (Figura 18) fue muy parejo. La diferencia significativa sugiere que el exceso de hierro tiene un efecto directo, al inhibir su síntesis y actividad de la enzima SOD (Hernández, 2003) y, en este caso, el resultado observado probablemente esté relacionado con dicho evento. Probablemente la sobrecarga de hierro provocó la formación de radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton además de inhibir la síntesis y actividad enzimática de la superóxido dismutasa, lo que repercute en un aumento en los niveles séricos de malondialdehído (Valko *et al.*, 2005).

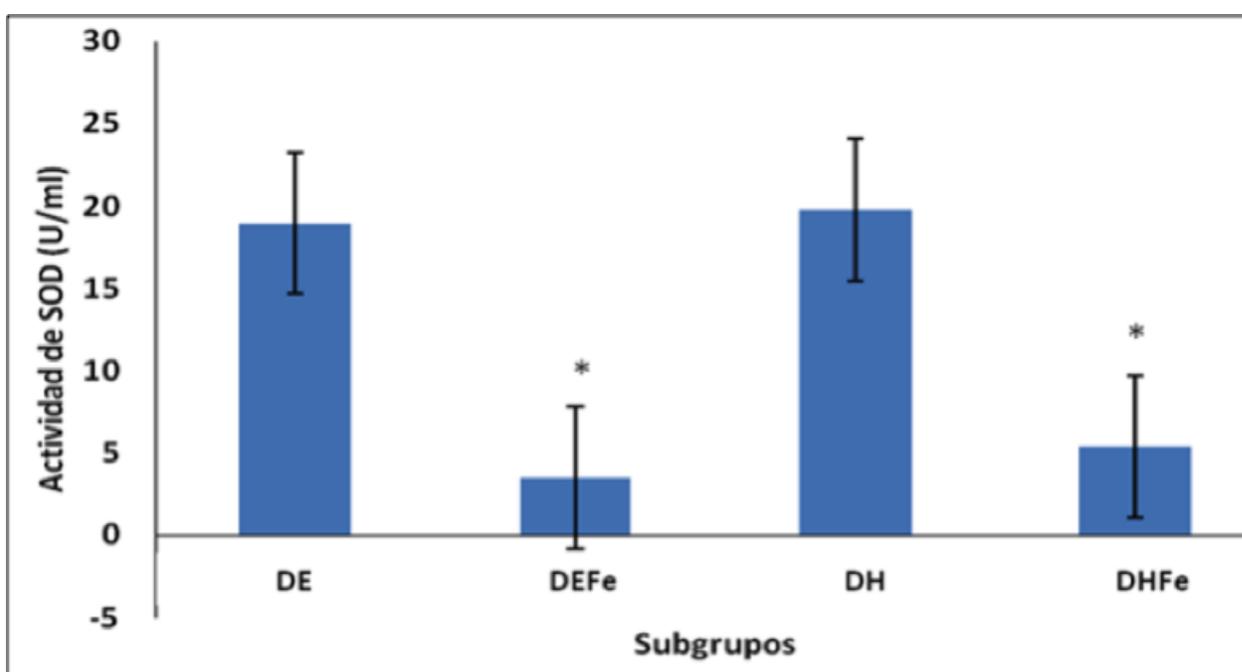


Figura 18. Niveles séricos de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en ausencia o presencia de hierro en ratas alimentadas con DE y DH. *Diferencia estadística significativa con respecto a su contraparte (solución salina vs hierro) ($p \leq 0.05$)

b) Peróxido de hidrógeno.

Dado que la función enzimática de la SOD es la dismutación del superóxido a peróxido de hidrógeno, se esperaría un aumento importante de este último. Sin embargo, en 3 de los 4 subgrupos los niveles séricos de H_2O_2 se mantuvo en concentraciones bajas. El subgrupo alimentado con DH en ausencia de hierro presentó altos niveles séricos de peróxido de hidrógeno ($p \leq 0.05$) (Figura 19).

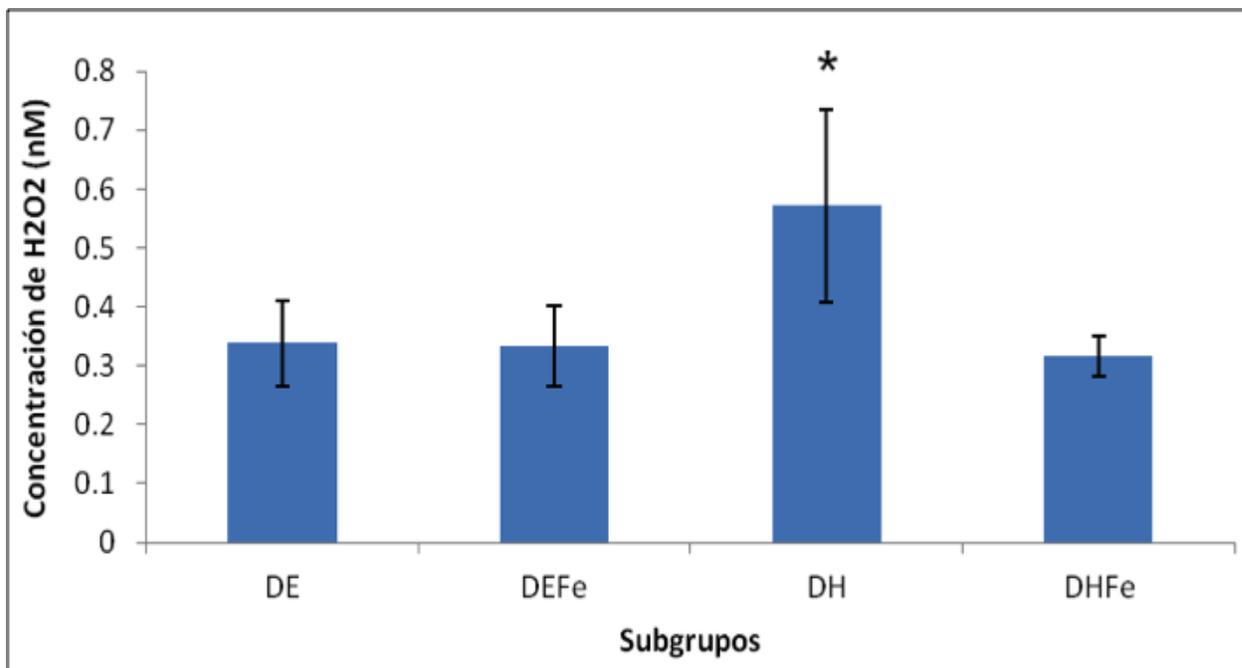


Figura 19. Niveles séricos de peróxido de hidrógeno en ausencia o presencia de hierro en animales alimentados con dieta estándar y dieta hipercalórica. Diferencia estadística significativa respecto a los subgrupos DE, DEFe y DHFe ($p \leq 0.05$).

Los niveles de peróxido de hidrógeno disminuidos en los grupos DEFe y DHFe pueden estar relacionados directamente a la inhibición de la SOD ya que el hierro puede promover reacciones directas con el peróxido de hidrogeno generando radicales superóxido, lo que también contribuye a disminuir la función enzimática de la SOD y a su vez disminuye la cantidad de peróxido de hidrogeno existente. Además, el hierro cataliza al superóxido de manera directa formando radical hidroxilo y de esta manera se evita la síntesis de SOD y la formación de peróxido de hidrogeno (Valko *et al.*, 2005).

Está documentado que con una dieta con alta densidad energética, una de sus principales consecuencias es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres (Diniz *et al.*, 2004). El peróxido de hidrogeno no se considera una especie reactiva de oxígeno, pero contribuye a generar estrés oxidativo por estar considerado como radical libre. Tales consideraciones concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde el grupo alimentado con DH presenta mayores niveles de H₂O₂ lo que a la larga llevaría a mayor producción de radical hidroxilo. La producción de radical hidroxilo se hace más evidente cuando el peróxido de hidrogeno

se combina con un catalizador, en este caso la administración de hierro, que a través de la reacción de Fenton, permite la formación de radical hidroxilo y por consiguiente peroxidación de lípidos (El-Hafidi y Baños., 1997).

c) Catalasa.

Los niveles séricos de la actividad enzimática de la catalasa entre los diferentes grupos mostraron un comportamiento muy similar (Figura 20). La catalasa es una de las principales enzimas antioxidantes de tipo endógeno (Hazra *et al.*, 2008; Kuwabara *et al.*, 2008), por consiguiente se ha considerado como un importante regulador de estrés oxidativo debido, principalmente, a que es muy eficiente para catalizar la conversión de peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno (Bonini *et al.*, 2007; D'souza *et al.*, 2008). Tiene un papel central en la defensa antioxidante, sobre todo de radicales libres generados a través de vías metabólicas, principal destino de la alimentación. Al tener una fuerte relación con el metabolismo, refuerza que una alimentación con alta densidad energética, sobre todo el exceso de grasa y bajas concentraciones de vitaminas, contribuye a generar más oxidantes y por lo tanto inhibir la actividad enzimática según sea la condición (Lui *et al.*, 2009). De acuerdo a la literatura, resulta importante señalar que en el subgrupo alimentado con DH se esperaba un aumento en la actividad enzimática de la catalasa ya que este subgrupo presentó un aumento significativo en los niveles séricos de peróxido de hidrogeno. Probablemente el efecto se lograría si se incrementa el tiempo de exposición a la DH es decir, las condiciones experimentales del presente estudio no permitieron observar un incremento de la actividad de catalasa.

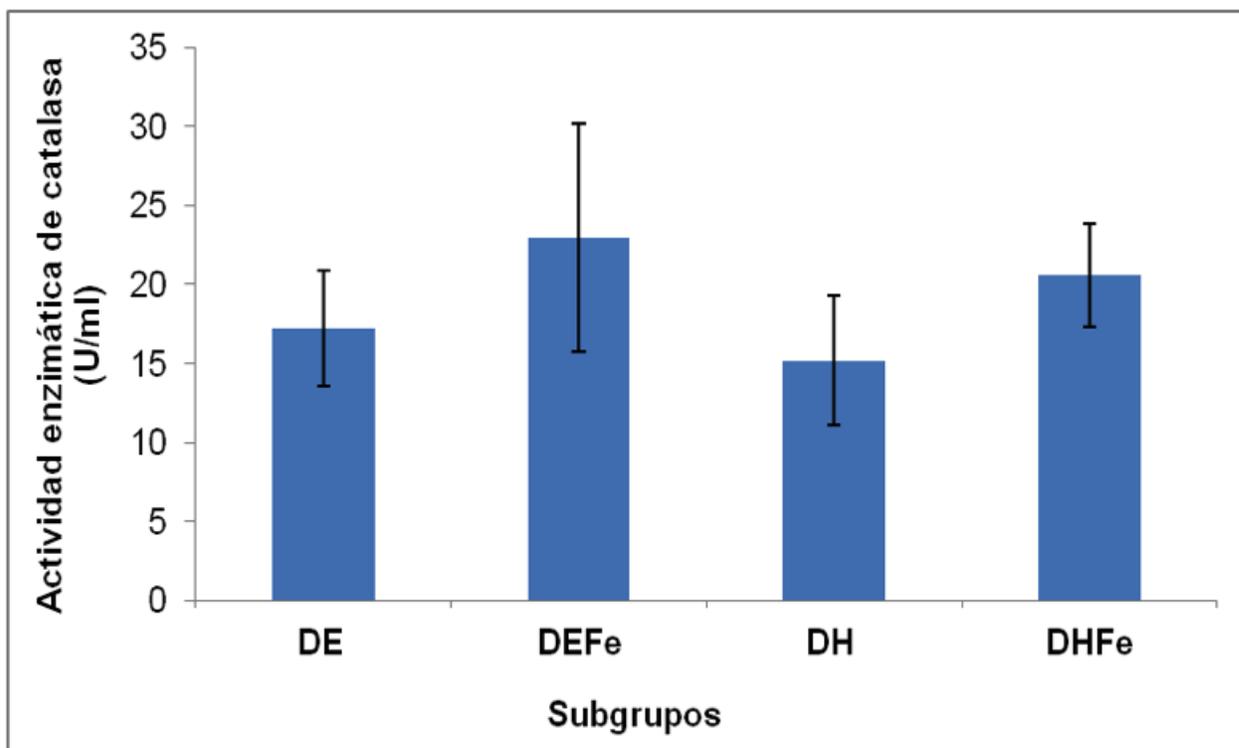


Figura 20. Niveles séricos de la actividad enzimática de la catalasa en ausencia o presencia de hierro. No se observó diferencia estadística significativa entre grupos.

d) Malondialdehído.

Las concentraciones séricas de este producto final (malondialdehído) de peroxidación de lípidos mostraron incrementos significativos ($p \leq 0.05$) en los subgrupos a los que se les administró hierro en comparación con los subgrupos que solo recibieron dieta (Figura 21). El incremento en los niveles séricos de malondialdehído se debe a la formación de radical hidroxilo y el ataque de este sobre las estructuras lipídicas de las membranas celulares (Gutteridge y Halliwell 1990; Alvarez *et al.*, 1993; Wong-ekkabut *et al.*, 2007) sobre todo con la presencia del hierro como catalizador (Valko *et al.*, 2005). Este comportamiento refuerza lo documentado en la literatura, que la presencia de hierro por un lado inhibe la síntesis de la enzima SOD, lo que condiciona que la producción de radical hidroxilo sea de forma directa y en consecuencia el proceso de peroxidación de lípidos, lo que lleva a un incremento en las concentraciones séricas de malondialdehído y estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

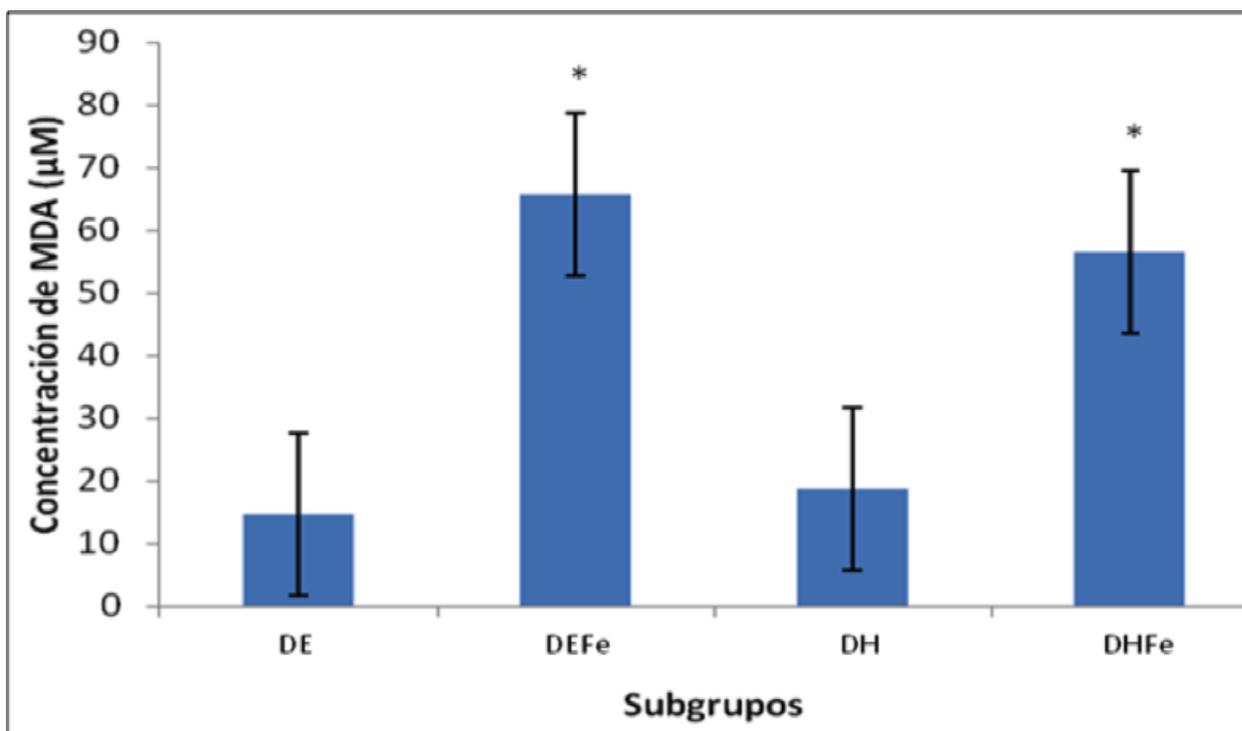


Figura 21. Concentración sérica de malondialdehído en ausencia o presencia de hierro. Diferencia estadística significativa respecto a los subgrupos que se les administro solución salina ($p \leq 0.05$).

Resulta muy importante analizar estos resultados dentro de un contexto integrador. Los marcadores de estrés oxidativo fueron similares en ausencia de hierro (DE y DH) a excepción de los niveles séricos de peróxido de hidrogeno, lo que sugiere un incremento de EO pero sin lograr estimular la actividad de SOD o catalasa. Asimismo la DH no provocó peroxidación lipídica bajo el esquema experimental estudiando. Respecto a los datos obtenidos para el caso de los grupos con hierro (DEFe, DHFe), se observó inhibición de SOD sin afectar los niveles basales de peróxido de hidrogeno sérico pero sí se observó aumento de peroxidación de lípidos dado que el hierro permite la formación directa del radical hidroxilo lo que lleva a mayores concentraciones séricas de malondialdehído.

VIII CONCLUSIONES

El modelo experimental, basado en DH con una densidad energética de 3.72 kcal/g vs el modelo de DE con 3.28 Kcal/g de energía metabolizable no propició diferencias importantes en la ganancia de peso corporal durante el periodo de estudio. Se observaron algunas diferencias sobre el consumo de alimento y la ingesta de energía, esto de acuerdo al tipo de dieta que recibieron los animales, siendo mayores para los alimentados con DH.

El modelo de DH propició alteraciones metabólicas sobre niveles séricos de glucosa, no así para colesterol total y triglicéridos. Estos últimos presentaron niveles mayores cuando se administro DHFe sin ser estadísticamente significativos. En cuanto a la ganancia de tejido graso, la DH condicionó aumento en los depósitos de grasa visceral (epiplón), pero no en grasa perirrenal. Los animales alimentados con este tipo de dieta presentaron una disminución en el peso del hígado y riñón, comportamiento contrario a lo esperado. Estos resultados pueden estar relacionados con el tiempo de exposición a la dieta y sería importante realizar experimentos cambiando esta variable.

La administración de hierro dextran intra-peritoneal en conjunto con los modelos de alimentación condicionó variaciones sobre los marcadores de estrés oxidativo. La Presencia de hierro inhibió la actividad de SOD y aumentó la peroxidación lipídica independientemente del tipo de dieta utilizado. Los niveles de peróxido de hidrógeno sólo se vieron aumentados al administrar la DH sin hierro. Este incremento lleva a pensar que en el modelo con alta densidad energética sí se genera estrés oxidativo, pero se recomienda una mayor exposición a este tipo de alimentación para poder ocasionar alteraciones en los marcadores. La actividad de catalasa no mostró cambios significativos en ninguno de los grupos estudiados.

Los datos obtenidos sugieren que la administración intraperitoneal de hierro dextrán es suficiente para generar alteraciones redox que desencadenen en estrés oxidativo agudo. La dieta hipercalórica provoca alteraciones a largo plazo. La combinación de ambos factores a nivel dietario pudiera ser un modelo efectivo y económico a nivel experimental.

IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackroff K, Bonacchi K, Magee M, Yiin YM, Graves J, Sclafani A. 2007. Obesity by choice revisited: Effects of food availability, flavor variety and nutrient composition on energy intake. *Physiol Behav* 92(3): 468-478.

Actis DSM y Rebolledo OR, 2000., La glicación y glicoxidación de las lipoproteínas su importancia en la diabetes mellitus. *MEDICINA (Buenos Aires)* 60:645-656

Alkhuder K, Meibom KL, Dubail L, Dupuis M, Charbit A. 2009. Glutathione provides a source of cysteine essential for intracellular multiplication of *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog* 5: e1000284.

Alvarez E, Ruiz-Gutierrez V, Santa-María C, Machado A. 1993. Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech Ageing Dev.* 71:1-12.

Andresen M, Regueira T, Leighton F. 2006. Estrés Oxidativo en el Paciente Crítico. *Rev. Med. Chile.* 134:649-656.

Anderson BO, Brown JM, Harken A. 1991. Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J Surg Res.* 51:170-179.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 930.15

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 942.05

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 962.09.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 920.39

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17a ed., Gaithersburg: AOAC, 2000. Official Method 2001.11

Aponte M, Calderon M, Delgado A, Herrera I, Jimenez Y, Ramirez Z, Rojas J, Toro Y. 2008. Fitoquímicos., Ministerio del poder popular para la salud. Instituto Nacional de Nutrición. Dirección de investigaciones nutricionales. Venezuela. Disponible en: <http://www.inn.gob.ve/pdf/docinves/fitoquímicos.pdf> (06/10/2009).

Babilonia E, Wei Y, Sterling H, Kaminski P, Wolin M, Wang WH. 2005. Superoxide anions are involved in mediating the effect of low K intake on c-Src expression and renal K secretion in the cortical collecting duct., J Biol Chem 280(11):10790-10796.

Balkan J, Dog̃ru-Abbasog̃lu S, Aykac̃,-Toker G, Uysal M., 2004. The effect of a high cholesterol diet on lipids and oxidative stress in plasma, liver and aorta of rabbits and rats. Nutr Res 24:229–234

Barja de Quiroga G. 1997. Radicales Libres y Antioxidantes. En: Bioquímica y Fisiología del Estrés Oxidativo. Coordinado por Cascales Angosto M. Real Academia de Farmacia. Monografía IV. Fundación José Casares Gil. Madrid. pp. 21-44.

Bartolomucci A, Cabassi A, Govoni P, Ceresini G, Cero C, Berra D, Dadomo H, Franceschini P, Dell’Omo G, Parmigiani S, Palanza P. 2009. Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. PLoS ONE. 4(1):e4331-e4343.

Becana M, Paris FJ, Sandalio LM, Del Rio LA. 1989. Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of phaseolus vulgaris L., Pisum sativum L., and Vigna unguiculata (L.) Walp. Plant Physiol 90: 1286-1292.

Beltrán-Martínez R J, Correa-Chacón A J. 2003. Valor de la gamma-glutamyltransferasa en el diagnóstico de enfermedad metastásica en pacientes con carcinoma de células renales. Gac Méd Méx 139 (2):122-125.

Berger MM. 2006. Antioxidant micronutrients in major trauma and burns: Evidence and practice. Nutr Clin Pract 21:438-449.

Berlett BS, Stadman E. 1997. Protein oxidation in aging; disease; and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313-20316.

Bonafine O, Cañizares A, Laverde D. 2006. Importancia de los fitoquímicos en la alimentación. INIA divulga [Peru], *Nutrición Humana* 7:9-12.

Bonen A, Parolin ML, Steinberg GR, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Heigenhauser G, Dyck DJ. 2004. Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J.* 18:1144–1146.

Bonini MG, Siraki AG, Atanassov BS, Mason RP. 2007. Immunolocalization of hypochlorite-induced, catalase-bound free radical formation in mouse hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 42(4): 530-540.

Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Chauvin MA, MorioB, Vidal H, Rieusset J. 2008. Mitochondrial Dysfunction Results from Oxidative Stress in the Skeletal Muscle of Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *J. Clin. Invest.* 118:789-800.

Borthiry GR, Antholine WE, Kalyanaraman B, Myers JM, Myers CR. 2007. Reduction of hexavalent chromium by human cytochrome b5: generation of hydroxyl radical and superoxide. *Free Radic Biol Med.* 42(6):738-755.

Brons C, Jensen CB, Storgaard H, Hiscock NJ, White A, Appeli JS, Jacobsen S, Nilsson E, Larsen CM, Astrup A, Quistorff B, Vaag A. 2009. Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men. *J Physiol* 587(10):2387–2397.

Burk RF, Hill KE, Motley AK, Austin LM, Norsworthy BK. 2006. Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content. *Biochim Biophys Acta* 1760(12):1789-1793.

Caplés S, Torres O, Companioni M, Villariño U, Broche F, Céspedes EM. 2001. Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Rev Cubana Invest Biomed.* 20(2):93-98

Carsillo M, Kumar KV, Puschela K, Blanco J, Kuppusamy P, Niewieska S. 2009. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by cotton rat (*Sigmodon hispidus*) macrophages reflect the same pattern as human macrophages. *Dev Comp Immunol.* 33(5):718–724.

Chénais B, Morjani H, Drapier JC. 2002. Impact of endogenous nitric oxide on microglial cell energy metabolism and labile iron pool. *J Neurochem.* 81(3):615–623.

Cisneros PE. 1995. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Rev Cubana Invest Biomed* 14 (1): 0-0. On-line ISSN 1561-3011.

Collins A. 2005. Assay for Oxidative Stress and Antioxidant Status: Applications to Research into the Biological Effectiveness of Polyphenols. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 261-267.

Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O’Keefe JM, Brand-Miller J. 2005. Origins and Evolution of the Western Diet: Health Implications for the 21st Century. *Am J Clin Nutr.* 81(2):341-354.

Daneshvar B, Frandsen H, Dragsted LO. 1997. Analysis of native human plasma proteins and haemoglobin for the presence of bityrosine by high-performance liquid chromatography. *Pharmacol Toxicol* 81:205-208.

Das S, Santani DD, Dhalla NS. 2007. Experimental Cardiology: Review Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine. *Exp Clin Cardiol.* 12(1):5-10.

Deb S, Johnson EE, Robalinho-Teixeira RL, Wessling-Resnick M. 2009, Modulation of intracellular iron levels by oxidative stress implicates a novel role for iron in signal transduction. *Biometals* 22(5):855-862.

Deneke S, Fanburg B. 1989. Regulation of Cellular Glutathione. *Am J Physiol.* 257:163-173.

Diniz YSA, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli ELB. 2004., Diets Rich in Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids: Metabolic Shifting and Cardiac Health. *Nutrition* 20:230 –234.

D'souza A, Kurien Biji T, Rodgers R, Shenoi J, Kurono S, Matsumoto H, Hensley K, Nath Swapan K, Scofield RH. 2008. Detection of Catalase as a major protein target of the lipid peroxidation product 4-HNE and the lack of its genetic association as a risk factor in SLE. *BMC Medical Genetics*. 9:62. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/9/62>

El-Hafidi ME, Baños G. 1997. In Vivo Plasma Lipid Oxidation in Sugar-Induced Rat Hypertriglyceridemia and Hypertension. *Hypertension* 30:624-628.

Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. 2006. Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome. *J. Endocrinol. Invest.* 29(9):791-795

Esterbauer H, Schau RJ, Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal; malondialdehyde and related aldehyde. *Free Radic Biol Med.* 11:81-128.

Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. 2003. Extracellular Superoxide Dismutase in Biology and Medicine. *Free Radic Biol Med.* 35(3):236–256.

Franke AA, Cooney RV, Henning SM, Custer LJ. 2005. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *J Agric Food Chem.* 53(13):5170–5178.

Frazier CRM, Masson P, Zhuang X, Beeler JA. 2008. Sucrose exposure in early life alters adult motivation and weight gain. *PLoS ONE* 3(9): e3221. Disponible en: <http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0003221>

Gallo G, Martino G. 2009. Red blood cell glutathione peroxidase activity in female nulligravid and pregnant rats. *Reprod Biol Endocrinol* 7:7 Disponible en: <http://www.rbej.com/content/7/1/7>

García-Gasca T, Martínez-Dávila I, Reyes P, Mejía C. 2009. Apoptosis: The role of free radicals in physiological and pathological states. En: *Pro-Oxidant Reactions: Physiological and Pathological Implications*. Editors: Díaz-Muñoz M, Santamaría del Angel A., Research Signpost., pp. 85-104.

García-Pinilla JM, Gálvez J, Cabrera-Bueno F, Jimenez-Navarro M, Gómez-Doblas JJ, Galisteo M, Camuesco D, Galván CT, Espinosa-Caliani S, Zarzuelo A, Teresa-Galván E. 2008. Baseline glutathione peroxidase activity Affects prognosis after acute coronary syndromes. *Tex Heart Inst J.* 35(3):262 – 267.

Giles Steven S, Stajich JE, Nichols C, Gerrald Quincy D, Alspaugh JA, Dietrich F, Perfect JR. 2006. The *Cryptococcus neoformans* Catalase Gene Family and Its Role in Antioxidant Defense. *Eukaryotic Cell.* 5(9):1447–1459.

Gutteridge JM, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem* 15:129-135.

Hardeland R, Pandi-Perumal SR., 2005. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug., *Nutrition & Metabolism (Lond)* 2:22 Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1743-7075/2/22>

Hazra B, Biswas S, Mandal N. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement Altern Med.* 8:63 Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/8/63>

Hegarty BD, Cooney GJ, Kraegen EW, Furler SM. 2002. Increased Efficiency of Fatty Acid Uptake Contributes to Lipid Accumulation in Skeletal Muscle of High Fat-Fed Insulin-Resistant Rats. *Diabetes* 51:1477-1484.

Hennig B, Ettinger AS, Jandacek RJ, Koo S, McClain C, Seifried, Silverstone A, Watkins B, Suk WA. 2007. Using Nutrition for Intervention and Prevention against Environmental. Chemical Toxicity and Associated Diseases. *Environ Health Perspect.* 115:493–495.

Hernández Reyes H. 2003. *Nutrición Vegetal- Deficiencias y excesos.* México. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/53101690/NUTRICIO-VEGETAL-DEFICIENCIAS-Y-EXCESOS>

Hernández S, De León C, González Velázquez F, Fuentes Allen JL, González Bonilla CR, García Elorriaga G. 2004. Citocinas proinflamatorias en la infección de tejidos blandos de pacientes diabéticos. *Rev Med IMSS*. 42(3):227-233

Hofmann SM y Tschop MH. 2009. Dietary sugars: a fat difference. *J Clin Invest* 119:1089-1092.

Holvoet P, Keyzer DD, Jacobs DR. 2008. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol* 3(6): 637-649.

Hwang WS, Park SH, Kim HS, Kang HJ, Kim MJ, Oh SJ, Park JB, Kim J, Kim SC, Lee JY. 2007. Ascorbic acid extends replicative life span of human embryonic fibroblast by reducing ADN and mitochondrial damages. *Nutr Res Pract* 2: 105-112

Jeukendrup AE, Saris WHM, Wagenmakers AJM. 1998. Fat metabolism during exercise: a review. Part II: The effects of nutritional interventions. *International Journal of Sports Medicine* 19:371-379, R.

Johnson RJ, Sautin YY, Oliver WJ, Roncal C, Mu W, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Benner SA. 2009. Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society? *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systematic, and Enviromental Physiology*, 179(1):67-76.

Kayatekin C, Zitzewitz JA, Matthews CR. 2008. Zinc binding modulates the entire folding free energy surface of human Cu, Zn superoxide dismutase. *J Mol Biol* 384(2):540-555.

Kimball SR, Abbas A, Jefferson LS. 2008. Melatonin represses oxidative stress-induced activation of the MAP kinase and mTOR signaling pathways in H4IIE hepatoma cells through inhibition of Ras. *J Pineal Res*. 44(4):379-386.

Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A, Imig JD. 2008. Endothelial Dysfunction and the Development of Renal Injury in Spontaneously Hypertensive Rats Fed a High Fat Diet. *Hypertension*. 51(2):352-9.

Königsberg FM. 2007. Nfr2: La Historia de un Nuevo Factor de Transcripción que Responde a Estrés Oxidativo. REB 26(1):18-25.

Krebs M, Roden M. 2004. Nutrient-Induced Insulin Resistance in Human Skeletal Muscle. Curr. Med. Chem. 11:901-908.

Kuwabara M, Asanuma T, Niwa K, Inanami O. 2008. Regulation of Cell Survival and Death Signals Induced by Oxidative Stress. J. Clin. Biochem. Nutr. 43:51–57

Lampe WJ. 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. Am J Clinical Nutr 70:475S-490S

Langer DA, Das A, Semela D, Kang-Decker N, Hendrickson H, Bronk SF, Katusic ZS, Gores GJ, Shah VH. 2008. Nitric Oxide Promotes Caspase-Independent Hepatic Stellate Cell Apoptosis through the Generation of Reactive Oxygen Species. Hepatology. 47(6):1983-1993.

Lemma-Gray P, Weintraub ST, Carroll CA, Musatov A, Robinson ST. 2007. Tryptophan 334 Oxidation in Bovine Cytochrome *c* Oxidase Subunit I Involves Free Radical Migration. FEBS Lett. 581(3):437–442.

Lesschaeve I, Noble A. 2005. Polyphenols: Factors Influencing their Sensory Properties and their effects on Food and Beverage Preferences. Am J Clin Nutr 81:330-335.

Lui Y, Adachi M, Zhao S, Hareyama M, Koong AC, Luo D, Rando TA, Imai K, Shinomura Y. 2009. Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. Cell Death Differ 16(6): 847-857.

Lowell BB, Shulman GI. 2005. Mitochondrial Dysfunction and type 2 Diabetes. Science. 307:384-387.

Mackenzie EL, Iwasaki K and Tsuji Y. 2008. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. Antioxid Redox Signal. 10(6):997-1030.

Maghzal GJ, Leck MC, Collinson E, Li C, Stocker R. 2009. Limited role for the bilirubin-biliverdin redox amplification cycle in the cellular antioxidant protection by biliverdin reductase. *J Biol Chem* 284(43):29251-29259.

Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM, Bailey SM. 2009. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function *in vivo*. *Biochem J.* 417:183–193.

Manzanares CW. 2007. Selenio en pacientes críticos con respuesta inflamatoria sistémica. *Nutr Hosp* 22(3):295-306.

Martínez AG, López-Espinoza A, Martínez H., 2006. Efectos de modificar el contenido energético del agua sobre el peso corporal, consumo de agua, alimento y calorías en ratas. *Univ Psychol.* 5(2):361-370.

Martínez-Sarrasague M, Barrado Domingo A, Zubillaga M. 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 40(1):45-54

Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. 2007. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J.* 6:27 Disponible en: <http://www.nutritionj.com/content/6/1/27>

Mueller C, Compher C, Ellen DM. 2011. American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. Nutrition screening, assessment, and intervention in adults. *J.P.E.N.* 35(1): 16-24.

Murphy MP. 2009. How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochem. J.* 417:1-13.

NOM-062-ZOO-1999. NORMA Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio 22 de Agosto de 2001, Diario Oficial de la Federación. Última actualización Noviembre 2008. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=743>

Nguyen V, Bonds DV, Prokai L. 2007. Measurement of Hydroxyl-Radical Formation in the Rat Striatum by In Vivo Microdialysis and GC-MS. *NIH-PA Chromatographia*. 68(1):s57-s62.

Novo E, Parola M. 2008. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and Fibrogenesis. *Fibrog Tiss Rep*. Disponible en: <http://www.fibrogenesis.com/content/1/1/5>

Octaviano FG, Tang SS, Handy DE, Loscalzo J. 2009. Regulation of the Extracellular Antioxidant Selenoprotein Plasma Glutathione Peroxidase (GPx-3) in Mammalian Cells. *Mol Cell Biochem* 327(1-2):111-126.

Oosterveer MH, Dijk TH, Tietge UJF, Boer T, Havinga R, Stellaard F, Groen AK, Kuipers F, Reijngoud DJ. 2009. High Fat Feeding Induces Hepatic Fatty Acid Elongation in Mice., *PLoS ONE* 4(6):e6066.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*. 87(1):315-424.

Padmalayam I, Hasham S, Saxena U, Pillarisetti S., 2009. Lipoic Acid Synthase (LASY) A novel role in inflammation, mitochondrial function and insulin resistance. *Diabetes* 58:600-608.

Papp D. 1995. *Historia de las ciencias desde la antigüedad hasta nuestros días*. Ed. Emecé Editores, Buenos Aires. p 182

Pérez LM. 2000. Estrés Oxidativo: La Paradoja del Oxígeno. *Rev. Cubana Endocrinol*. 11(3):139-42.

Pérez MM. 2007. El adipocito como órgano endocrino. Implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Rev Fac Med*. 15 (2):225-242.

Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. 2004. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-resistant offspring of Patients with type 2 Diabetes. *N. Engl. J Med*. 350(7):664-71.

Petersen SV, Valnickova Z, Oury TD, Crapo JD, Nielsen NChr, Enghild JJ. 2007. The subunit composition of human extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) regulates enzymatic activity. *BMC Biochemistry*. 8:19 [PMC free article] [PubMed].

Plum LM, Rink L, Haase H. 2010. The essential toxin: Impact of zinc on human health., *Int J Environ Res., Public Health* 7(4):1342-1365.

Potenza M, Mechanick JI. 2009. The metabolic syndrome: Definition, global impact, and pathophysiology. *Nutrition in Clinical Practice* 34(5): 560-573.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785–789.

Reidling JC, Subramanian VS, Dahhan T, Sadat M, Said HM. 2008. Mechanisms and regulation of vitamin C uptake: studies of the hSVCT systems in human liver epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295(6):G1217-G1227.

Rennison JH, McElfresh TA, Chen X, Anand VR, Hoit BD, Charles L. Hoppel CL, Chandler MP. 2009. Prolonged Exposure to High Dietary Lipids is not Associated with Lipotoxicity in Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol*. 46(6): 883–890.

Rocha KKR, Souza GA, Ebaid GX, Seiva FRF, Cataneo AC, Novelli ELB. 2009. Resveratrol toxicity: Effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. *Food Chem Toxicol* 47:1362–1367

Rodríguez AM, Sosa GLC, Marcos RA, Araña MJ, Alerm GA, León PA. 2005. Evaluación de niveles séricos de citocinas proinflamatorias y marcadores de estrés oxidativo en mujeres embarazadas a término. *Rev Cubana Endocrinol.* [online] 16(2):0-0. ISSN 1561-2953.

Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez. 2007. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*. 32 (2): 58-69.

Rumberger JM, Peters T, Burrington C, Green A. 2004. Transferrin and iron contribute to the lipolytic effect of serum in isolated adipocytes. *Diabetes* 53:2535-2541.

Sánchez-Muñoz F, García-Macedo R, Alarcón-Aguilar F, Cruz M. 2005. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac Med Mex.* 141(6):505-512.

Sautin YY, Johnson RJ. 2008. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. *NIH Public Acces., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 27(6):608-619.

Selivanov VA, Zeak JA, Roca J, Cascante M, Trucco M, Votyakova TV. 2008. The Role of External and Matrix pH in Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation. *J. Biol. Chem.* 283(43):29292-29300.

Sen CK, Khanna S, Roy S. 2007. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family. *Mol Aspects Med.* 28(5-6):692-728.

Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. 2008. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 295(5):R1370–R1375

Shulaev V, Oliver DJ. 2006. Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. New Tools for Reactive Oxygen Species Research. *Plant Physiol.* 141:367-372.

Silva M, Silva ME, De Paula H, Martins CC, Pedrosa ML. 2008. Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis, and increases serum triacylglycerols in rats. *Nutrition Research* 28: 391-398.

Simoneau JA, Kelley DE. 1997. Altered Glycolytic and Oxidative Capacities of Skeletal Muscle Contribute to Insulin Resistance in NIDDM. *J. Appl. Physiol.* 83:166-171.

Slater TF. 1984. Free-Radical Mechanisms in Tissue Injury. *Biochem. J.* 222(1):1-15.

Sreemantula S, Nammi S, Kolanukonda R, Koppula S, Boini KM. 2005. Adaptogenic and Nootropic Activities of Aqueous Extract of *Vitis Vinifera* (grape seed): an experimental study in rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 5:1
Disponibile en: <http://biomedcentral.com/1472-6882/5/1>

Stadtman ER, Beriet BS. 1998. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 30:225-243.

Studzinski CM, Li F, Bruce-Keller AJ, Fernandez-Kim SO, Le Z, Weidner AM, Markesbery WR, Murphy MP, Keller JM. 2008. Effects of short-term Western diet on cerebral oxidative stress and diabetes related factors in APP x PS1 knock-in mice. *J Neurochem* 108 (4):860-866.

Sun A, Wang Q, Simonyi A, Sun G. 2008. Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular Med.* 10(4):259–274

Szapacs ME, Kim HYH, Porter NA, Liebler DC. 2008. Identification of proteins adducted by lipid peroxidation products in plasma and modifications of apolipoprotein A1 with a novel biotinylated phospholipid probe. *J Proteome Res.* 7:4237-4246.

Tapia SA, Araya M. 2006. Estrés oxidativo, prooxidantes y enfermedad de Crohn. *Rev. Med. Chile.* 134(1):95-100.

Tien Kuo M, Bednarski P, Kohno K, Salerno M, Tarasiuk J, Zunino F. 2009. Redox Regulation of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 11(1):99-134.

Valko M, Morris H and Cronin MTD. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12 (10): 1161-1208.

Vanhoutte PM. 2004. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol Res.* 49:503-508.

Velázquez PM, Prieto GB, Contreras PR, 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* 75:36-43 Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/cns/no75/CNS07505.pdf>

Venereo Gutiérrez JR. 2002. Daño Oxidativo, RL y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 31(2):126-33

Vieira-Silva S, Rocha EPC. 2008. An Assessment of the Impacts of Molecular Oxygen on the Evolution of Proteomes. *Mol Biol Evol.* 25(9):1931–1942.

Wang C, Mehendale SR, Yuan C. 2007. Commonly Used Antioxidant Botanicals: Active Constituents and their Potential Role in Cardiovascular Illness. *Am J Chin Med.* 35(4):543–558.

Wildman REC, Kelley M. 2007. Nutraceuticals and Functional Foods. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. Ed. CRC Press. 2ª edición. E U. pp. 1-22.

Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME, Taegtmeyer H. 2007. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem. J.* 406:457–467.

Wit NJW, Bosch-Vermeulen H, Groot PJ, Hooiveld GJEJ, Grootte BMM, Jansen J, Muller M, Meer R. 2008. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Medical Genomics* 1:14
Disponibile en: <http://www.biomedcentral.com/1755-8794/1/14>

Wong-ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. 2007. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Biophys. J.* 93 (12):4225-4236.

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla. 2010. Vitamin E protects against oxidative damage and learning disability after mild traumatic brain injury in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 24(3): 290-298.

Zamora SJD. 2007. Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud. *Rev Chil Nutr* 34(1): 17-26.

Zhang H, Forman HJ. 2009. Redox regulation of γ -glutamyl transpeptidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 509-515.