



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**“DAÑO OXIDANTE EN TESTÍCULO
DE RATAS LACTANTES DESNUTRIDAS”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

Biol. Exp. María de los Ángeles Rosas Trejo

COMITÉ DE TUTORES

CODIRECTORA INTERNA

Dra. María Cristina González Torres. UAM-I

CODIRECTOR EXTERNO

Dr. Armando Luna López. INGER

ASESORA

Dra. Mina Königsberg Fainstein. UAM-I

Ciudad de México, diciembre 2017

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular y en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular, ambos pertenecientes al Departamento de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCyT-2003IMPTNNN0020.

La realización de la Maestría en Biología Experimental se llevó a cabo con el apoyo de CONACyT a través de la beca con número de registro 593010.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, aprobó la Tesis titulada: **“DAÑO OXIDANTE EN TESTÍCULO DE RATAS LACTANTES DESNUTRIDAS”** que presentó María de los Ángeles Rosas Trejo el día 14 de diciembre del 2017.



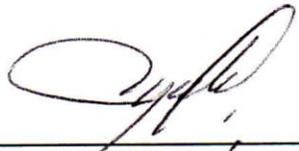
PRESIDENTA

Dra. Mirna Königsberg Fainstein
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



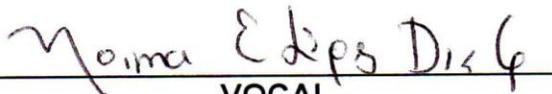
SECRETARIA

Dra. Oralia Nájera Medina
Departamento de Atención a la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco



VOCAL

Dra. Marcela Arteaga Silva
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORA INTERNA

Dra. María Cristina González Torres
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de Salud
mcgt@xanum.uam.mx

CODIRECTOR EXTERNO

Dr. Armando Luna López
Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Geriátría
allbioexp@yahoo.com

ASESORA

Dra. Mina Königsberg Fainstein
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de Salud
mkf@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a la Dra. María Cristina González Torres. Quien a pesar de las adversidades siempre estuvo a mi lado, guiándome y mostrándome los diferentes caminos para resolver contrariedades. Quien con su firmeza, perseverancia y conocimientos la convierten en parte fundamental en este trabajo y sobre todo en mi formación profesional y personal. Gracias por depositar su confianza en su servidora.

A la Dra. Mina Königsberg Fainstein, le muestro gratitud por ser una excelente Profesora, le agradezco por haber aceptado ser parte de mi Comité a pesar de sus múltiples ocupaciones. También le agradezco por todas aquellas sugerencias y observaciones tan acertadas respecto a la investigación y sobre mi formación. Le agradezco por haberme cobijado en su laboratorio, pieza esencial en la práctica de este trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Armando Luna López por transmitirme su fortaleza para defender mis ideas, por fomentar confianza para externar opiniones y sugerencias con respecto al trabajo. Sobre todo le agradezco su honestidad por expresar francamente su punto de vista y le agradezco las palabras de aliento para continuar adelante.

Agradezco a la Dra. y amiga Graciela Gavia García, ya que es a través de ella que adquirí la paciencia, disciplina y responsabilidad para realizar este trabajo. Gracias Chela por compartir tu tiempo, tus sentimientos y tu vida conmigo. Gracias por escucharme y apoyarme.

Agradezco a la Dra. Oralia Nájera Medina por proporcionar el material biológico, a través del cual, sin duda alguna, se llevó a cabo esta investigación. También le agradezco por sus comentarios para mejorar esta tesis.

Agradezco a la Dra. Marcela Arteaga Silva quien, a pesar de las circunstancias, consiguió con su conocimiento y paciencia despojarme de la ignorancia, entendiendo con mayor claridad la fisiología del órgano objeto de estudio de este trabajo. Le agradezco por los comentarios para mejorar esta tesis.

Al Biol. Exp. Eduardo García Mendoza agradezco por apoyar con su colaboración y dedicación, ya que, gracias a su participación, parte de este trabajo se realizó satisfactoriamente.

Agradezco al Dr. José Miguel Betancourt Rule, quien me recibió y proporcionó un lugar en su laboratorio, permitiendo el desarrollo continuo y adecuado de este trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Mario García Lorenzana por el apoyo y el tiempo que dedicó para realizar este trabajo.

Agradezco a la Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero por los comentarios tan oportunos para mejorar esta tesis.

Agradezco a mis amigos, al Maestro Mario Teteltitla y al Maestro Alejandro Domínguez por estar conmigo escuchándome, apoyándome y ayudándome.

DEDICATORIAS

Completa y enteramente dedicado este trabajo a mis padres, Gregorio y Antonia y por supuesto a mis hermanas, Alejandra y Erika. Quienes indiscutiblemente, son los pilares de mi vida, mi inspiración, mi sustento interior y mi fortaleza. Dedicado a ellos, que incondicionalmente me apoyaron para transitar este camino de la ciencia. Dedicado a ellos, que no me han permitido dejar de luchar por lo que quiero. Dedicado a ellos, que siempre han estado conmigo disfrutando tanto de mis logros como de mis fracasos. Dedicado a ellos, que con tesón y ahínco han sabido darme consuelo y ayuda en cada capítulo de mi existencia. Sobre todo, dedicado a ellos que me conocen y aceptan como soy.

El Señor es mi pastor; nada me falta.

Me hace descansar en verdes pastos,
me guía a arroyos de tranquilas aguas,

me da nuevas fuerzas

y me lleva por caminos rectos.

Aunque pase por el más oscuro de los valles,

no temeré peligro alguno,

porque él está conmigo.

(Salmo, 23)

ÍNDICE	Pág.
Resumen	11
Abstract	13
1. Introducción	15
1.1 Marco Teórico	15
1.1.1 Desnutrición	15
1.1.1.1 Prevalencia	15
1.1.1.2 Indicadores antropométricos	17
1.1.1.3 Tipos de desnutrición	18
1.1.1.3.1 Marasmo o No Edematosa	19
1.1.1.3.2 Kwashiorkor o Edematosa	19
1.1.1.4 Causas que generan la desnutrición	21
1.1.2 Estrés oxidante	22
1.1.2.1 Procedencia de las ERO	23
1.1.3 Sistema de defensa antioxidante	24
1.1.3.1 Superóxido dismutasa	26
1.1.3.2 Catalasa	27
1.1.3.3 Glutación peroxidasa	29
1.1.4 Lipoperoxidación	30
1.1.5 Oxidación de proteínas	32
1.1.6 Testículo	33
1.1.6.1 Tipos celulares	34
1.1.6.2 Función testicular	35
2. Antecedentes	37

3. Justificación	40
4. Pregunta de investigación	42
5. Hipótesis	42
6. Objetivo General	42
6.1 Objetivos Particulares	42
7. Material y Métodos	43
7.1 Desnutrición experimental	43
7.2 Disección de testículos	43
7.3 Extracción y cuantificación de proteína	44
7.4 Determinación de la expresión de SOD CuZn, CAT, GPx-1 y GR	44
7.5 Determinación de la actividad enzimática de SOD CuZn, CAT y GPx total	45
7.6 Determinación del cociente GSH/GSSG	47
7.7 Evaluación de los niveles de lipoperoxidación	47
7.8 Determinación de la oxidación de proteínas	48
7.9 Morfometría del testículo	48
8. Análisis bioestadístico	49
9. Resultados	49
9.1 Peso corporal	49
9.2 Grado de desnutrición	50
9.3 Peso testicular	51
9.4 Expresión de la proteína SOD CuZn	52
9.5 Actividad enzimática de SOD CuZn	53
9.6 Expresión de la proteína CAT	54

9.7 Actividad enzimática de CAT	55
9.8 Expresión de la proteína GPx-1	56
9.9 Actividad enzimática de GPx total	57
9.10 Cociente GSH/GSSG	58
9.11 Expresión de la proteína GR	59
9.12 Niveles de lipoperoxidación	60
9.13 Carbonilación de proteínas	61
9.14 Morfología testicular	62
10. Discusión	64
11. Conclusiones	83
12. Referencias	84

RESUMEN

La desnutrición en niños se considera un grave problema de salud pública, tanto que, en 1956 se creó la primera clasificación para establecer los diferentes grados de desnutrición. En los años 60's se comenzaron a realizar estudios sobre los sistemas de defensa antioxidante y la concentración de micronutrientes en niños desnutridos a nivel sistémico y su relación con los daños funcionales observados.

El objetivo de la presente investigación fue determinar si la desnutrición en ratas lactantes se relaciona con un aumento en el daño oxidante en proteínas y lípidos y a una disminución en la expresión y actividad de enzimas con función antioxidante en testículo, lo cual provocaría cambios morfológicos a nivel del túbulo seminífero, induciendo la posible alteración en la función de este órgano. La desnutrición experimental se indujo mediante el método de competencia de alimento y la clasificación de las ratas con diferentes grados de desnutrición se realizó a los 21 días de edad.

Los resultados obtenidos fueron bastante reveladores, ya que se encontró una disminución en la expresión y actividad de enzimas con función antioxidante como SOD CuZn y CAT, pero en el caso de la enzima GPx ésta presentó una expresión disminuida y una actividad elevada indicando que el testículo trata de alguna manera de equilibrar la producción de ERO. Sin embargo, este no fue suficiente para disminuir el daño oxidante en lípidos y proteínas, daño que se vio reflejado en la morfología del túbulo seminífero, unidad funcional del testículo, ya que se observó una disminución del área total del túbulo, desde la etapa de DN1.

A pesar de la variedad de estudios realizados sobre la desnutrición, en esta investigación se reporta por primera vez su efecto sobre el testículo. Los resultados del sistema de defensa antioxidante mostraron que la desnutrición está asociada con disminución en la expresión y actividad de enzimas con función antioxidante que provoca daño a biomoléculas, lo que se correlaciona con la reducción del área total del túbulo seminífero. Finalmente es importante señalar que la desnutrición tuvo un fuerte impacto en todos los parámetros analizados desde la DN1, no encontrando un efecto diferencial entre la DN1, DN2 y DN3 durante la lactancia.

ABSTRACT

Children malnutrition is considered a severe public health problem, so much so that in 1956 the first classification was created to establish the different degrees of malnutrition. In the 1960s, studies were begun on the antioxidant defense systems and the concentration of micronutrients in malnourished children at a systemic level and their relation to the functional damage observed.

The objective of the present investigation was to determine if malnutrition in lactating rats is related to an increase in oxidative damage in proteins and lipids due to the decrease in the expression and activity of enzymes with antioxidant function in the testicle, which would cause morphological changes to level of the seminiferous tubule inducing the possible alteration in the function of this organ. Experimental malnutrition was induced by the food competition method and the classification of rats with different degrees of malnutrition was performed at 21 days of age.

The results obtained were quite revealing, since it was found a decrease in the expression and activity of enzymes with an antioxidant function such as SOD CuZn and CAT, but in the case of the GPx enzyme it showed a decreased expression and an elevated activity indicating that the testicle try in some way to balance the production of ROS. However, this was not enough to decrease the oxidative damage in lipids and proteins, a damage that was reflected in the morphology of the seminiferous tubule, a functional unit of the testicle, since a decrease in the total area of the tubule was observed, from the stage of MN1.

Despite the variety of studies conducted on malnutrition, this research reports its effect on the testicle for the first time. The results of the antioxidant defense

system showed that malnutrition is associated with a decrease in the expression and activity of enzymes with antioxidant function that causes damage to biomolecules, which correlates with the reduction of the total area of the seminiferous tubule. Finally it is important to point out that malnutrition had a strong impact on all parameters analyzed from MN1, not finding a differential effect between MN1, MN2 and MN3 during lactation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Marco Teórico

1.1.1 Desnutrición

La desnutrición se define como un desequilibrio entre la necesidad de nutrientes y la ingesta de éstos, dando como resultado un déficit acumulativo de energía, proteínas o micronutrientes que pueden afectar negativamente el crecimiento y el desarrollo de un organismo. Basado en su etiología, la desnutrición puede estar relacionada con enfermedades secundarias que resultan directamente en el desequilibrio de nutrientes o bien puede ser causada por factores ambientales/conductuales asociados con la disminución de la ingesta/distribución de nutrientes. Los factores ambientales que resultan en la desnutrición a menudo involucran condiciones socioeconómicas asociadas con la disponibilidad inadecuada de alimentos o trastornos del comportamiento como anorexia y aversión al alimento (Mehta et al., 2013).

1.1.1.1 Prevalencia

Las estimaciones más recientes indican que unos 780 millones de personas de todo el mundo, lo que equivale a más de una persona de cada nueve, estuvieron subalimentadas en 2014-16, es decir, 167 millones menos que hace un decenio y 216 millones menos que en 1990-92. La gran mayoría de las personas que pasan hambre viven en las regiones en desarrollo (FAO, FIDA, PMA, 2015). De estos 780 millones de personas desnutridas, cerca de 101 millones eran niños menores de 5 años que presentaban desnutrición crónica o desnutrición aguda (UNICEF, 2013).

Según las estimaciones, 19 millones de niños en edad preescolar, la mayoría de la región de África y la región de Asia Sudoriental de acuerdo a la OMS (2016), padecen emaciación severa. La desnutrición infantil es un problema de salud mundial muy importante que contribuye a la morbilidad y mortalidad en la niñez, perjudica el desarrollo intelectual y, ya en la edad adulta, acarrea una menor capacidad de trabajo y un mayor riesgo de padecer enfermedades. De los 7.6 millones de muertes anuales de menores de 5 años, aproximadamente el 35% se deben a factores relacionados con la nutrición y se ha comprobado que el 4.4% de los fallecimientos son atribuibles en concreto a la emaciación severa. La desnutrición aguda severa sigue siendo una causa muy importante de mortalidad infantil en el mundo. Aunque en muchos casos la última etapa antes de la muerte es una neumonía o una diarrea, se estima que la desnutrición aguda severa cobra la vida de unos 400 000 niños cada año. De ahí que la atención de la desnutrición aguda severa forme parte de la resolución de la Asamblea Mundial de la Salud sobre Nutrición del lactante y del niño pequeño para mejorar la supervivencia en la niñez y reducir la carga mundial de morbilidad (OMS, 2016).

De acuerdo con los resultados de la ENSANUT 2012 (Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición), en México entre 1988 y 2012, la prevalencia de desnutrición en menores de cinco años ha tenido una disminución notable. La prevalencia de emaciación o desnutrición aguda (bajo peso para la talla) y bajo peso disminuyeron a una cuarta parte (4.6%) de las prevalencias de 1988 (de 6.2% a 1.6% en 2012), para alcanzar valores compatibles con poblaciones sin desnutrición. El bajo peso aminoró un 8% (de 10.8% a 2.8% en 2012); mientras que la desnutrición crónica (baja talla

para la edad), aunque disminuyó a la mitad de la prevalencia de 1988 (13.3%), sigue siendo elevada (de 26.9% a 13.6% en 2012), representando casi 1.5 millones de menores de cinco años en dicha condición, encontrándose a su vez que los niveles más altos de desnutrición se registraron en la zona sur del país, mientras que los de menor prevalencia se registraron en los estados del norte (ENSANUT, 2012).

1.1.1.2 Indicadores antropométricos

Dependiendo del tiempo durante el cual los individuos estén sujetos a la desnutrición, ésta se puede presentar en distintos grados de severidad y exhibir múltiples manifestaciones clínicas (Gómez et al., 1956).

Existen tres indicadores clásicos para evaluar el estado nutricional en niños menores de cinco años a partir del registro de peso, talla y edad: a) Peso para la edad, b) Talla para la edad, y c) Peso para la talla (Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el Medio Rural, 1996). La clasificación de Gómez y cols. (1956) para la desnutrición es una de las más usadas en el mundo, utiliza el índice peso/edad, lo cual resulta muy útil para clasificar a niños menores de cinco años. La desnutrición mediante este método se clasifica según el déficit de peso que tengan los niños; es decir, considera normales a los niños cuyo peso es mayor o igual al 90% del peso para la edad; los tres grados de desnutrición corresponden con déficits de peso del 10 al 24% (grado I o leve), del 25 al 39% (grado II o moderado) y superior al 40% (grado III o grave) (Gómez et al, 1956).

La desnutrición ocurre más frecuentemente durante la gestación y los primeros dos años de vida, cuando el crecimiento del niño y el desarrollo de su

cerebro son particularmente rápidos, teniendo efectos adversos sobre la salud y el desarrollo de sus capacidades. En el niño desnutrido, se inicia un estancamiento en la relación peso/talla para su edad cronológica, y eventualmente puede pasar con mayor o menor rapidez de la desnutrición leve a la moderada y de ésta a la muy grave, en forma progresiva (Gómez et al., 1956). Además del estancamiento de peso, se presenta retraso del desarrollo motor, trastornos de la coordinación muscular y del lenguaje; así como, disminución en la capacidad cognoscitiva, a su vez el organismo desnutrido sufre una adaptación nutricia, es decir, crea nuevas condiciones homeostáticas en sus diferentes sistemas, órganos y tejidos (Flores-Huerta, 1995).

En los niños con desnutrición de tercer grado, los procesos vitales que permiten mantener un equilibrio fisiológico se ven alterados. El metabolismo es más lento, la regulación térmica se altera, la absorción intestinal y la eliminación renal se reducen, la capacidad del hígado para sintetizar proteínas y eliminar toxinas es limitada; así como, la capacidad del sistema inmune disminuye (Prudhon, 2002).

1.1.1.3 Tipos de desnutrición

La desnutrición puede llevar a diferentes manifestaciones clínicas de desnutrición grave o desnutrición aguda severa conocidos como Marasmo o No Edematosa, Kwashiorkor o Edematosa y Marasmo-Kwashiorkor o Mixta.

1.1.1.3.1 Marasmo o No Edematosa

El marasmo es producto de una dieta pobre en proteínas y calorías, que se caracteriza por un severo retraso del crecimiento, además de diarrea e infecciones; presentándose en el 2% de los individuos desnutridos. Es prevalente en África, Sureste de Asia, América Central y del Sur (Parra-Gómez et al., 2003).

Es una forma de desnutrición crónica caracterizada clínicamente por emaciación severa del tejido subcutáneo, músculos y grasa; la síntesis de albúmina se mantiene dentro de los rangos normales, hasta muy avanzado el agotamiento nutricional y por esta razón no se presenta edema en los niños con marasmo, se presenta antes del primer año de edad. Los niños con marasmo, tienen mayor capacidad de sostenerse frente a una disminución del aporte de proteínas y lípidos obteniendo mayores tasas de supervivencia, a pesar que tienen mayor emaciación del tejido (Realpe-Muñoz, 2013).

El niño marasmático presenta un aspecto envejecido o arrugado, se ve emaciado y débil, tiene bradicardia, hipotensión, hipotermia, piel seca y delgada, cabello escaso y que se cae fácilmente y hambre incontrolable (Realpe-Muñoz, 2013).

1.1.1.3.2 Kwashiorkor o Edematosa

La palabra Kwashiorkor, fue usada inicialmente en Ghana y se traduce como “enfermedad del niño destetado”, término utilizado por las madres para describir la enfermedad del primer hijo cuando nace el segundo. Este término fue introducido a la medicina moderna por la doctora británica Cicely Williams en 1933: “una enfermedad

nutricional de niños, asociada con una dieta de maíz” (Realpe-Muñoz, 2013). En México a principios del siglo pasado, la desnutrición fue conocida como “culebrilla”, caracterizada por hiperpigmentación o hipopigmentación en la piel, dando la apariencia de serpientes pequeñas (Autret et al., 1954).

La desnutrición grave de tipo Kwashiorkor es más frecuente en lactantes con déficit de proteínas, pero adecuada ingesta de carbohidratos y se caracteriza por depleción de proteínas séricas, principalmente la albúmina, que tiende a ser más severa en esta forma de desnutrición. Clínicamente su marcador más llamativo es la presencia de edema, que se acompaña de otras manifestaciones que incluyen dermatosis, diarrea, hígado graso, cambio en el cabello, pérdida del interés y del apetito. La teoría clásica postula que una ingesta inadecuada de proteína lleva a bajas concentraciones de albúmina en plasma que llevan al edema. Este tipo de desnutrición es más común en zonas rurales de países en vías de desarrollo y afecta principalmente a los niños de 2 años de edad, asociado al periodo de destete e inicio de dieta rica en almidón y pobre en proteínas (Realpe Muñoz, 2013).

La desnutrición tipo Kwashiorkor, se considera como una condición compleja, multifactorial, en la cual existe una combinación de factores geográficos, climáticos, educacionales, psicosociales, culturales, nutricionales, y otros factores. Puede ser considerado el punto final de la combinación de todos éstos en un organismo que no tiene la capacidad de adaptarse a un cambio de condiciones, que lleva a que se desarrollen las características clínicas (Realpe-Muñoz, 2013). Los niños con Kwashiorkor mueren en mayor proporción que los pequeños con marasmo.

El niño con Kwashiorkor es anoréxico, irritable, con cara de luna llena, edema periorbitario y edema en extremidades inferiores y manos, abdomen globoso con hepatomegalia (infiltración grasa del hígado), piel seca y el cabello se cae fácilmente.

Existe una variante clínica en la que se encuentran características de ambos tipos de desnutrición grave Kwashiorkor/marasma. Cuando un niño con Kwashiorkor sobrevive lo suficiente para alcanzar a consumir la grasa excesiva y conserva los edemas, se suele llamar Kwashiorkor-Marasmático.

La combinación más común es la emaciación del tejido celular subcutáneo asociado a edema de miembros inferiores, hepatomegalia y depleción severa de proteínas (Realpe-Muñoz, 2013).

1.1.1.4 Causas que generan la desnutrición

Hay tres causas relacionadas con el inicio de la desnutrición, la subalimentación, la absorción inadecuada y/o incremento de la demanda de nutrientes por enfermedades. La subalimentación consiste en alimentar a una persona de manera insuficiente. Ya sea por la deficiencia en la calidad o en la cantidad de los alimentos consumidos. Se puede decir que el 90% de los estados de desnutrición, son ocasionados por esta causa y es la causa principal de la desnutrición. Esta subalimentación es determinada por varios factores como no acceso a los alimentos por falta de recursos económicos, aspectos educacionales donde se incluyen faltas de higiene o alimentaciones absurdas y faltas de técnica en la alimentación del niño. Tiene múltiples orígenes, pero en general son la pobreza y/o la ignorancia (Gómez-Santos, 1946; Mehta et al., 2013).

La desnutrición por las otras causas es debida a una enfermedad subyacente que conduce a una ingestión o absorción inadecuadas y representa un 10%. Se presenta por infecciones enterales (tracto digestivo) o parenterales (sistema respiratorio, etc.), en los defectos congénitos de los niños, en el nacimiento prematuro y en enfermedades metabólicas (Gómez-Santos, 1946; Mehta et al., 2013).

Independientemente de la causa, la desnutrición representa un factor estresante que de manera directa o indirecta afecta el equilibrio dinámico del organismo, su estatus metabólico y por lo tanto las reacciones redox, lo que puede inducir estrés oxidante en los organismos que la padecen (Bosnak et al., 2010; Realpe-Muñoz, 2013).

1.1.2 Estrés oxidante

El estrés oxidante se refiere al establecimiento de un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y las defensas antioxidantes en un tejido o célula. El término ERO incluye tanto a moléculas que son radicales libres como a especies químicas no radicales. Ejemplos de radicales libres son el radical superóxido (O_2^{\bullet}), el radical peroxilo (ROO^{\bullet}), el oxígeno singulete (1O_2) y el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$). Éste último es el más reactivo. Los radicales libres se caracterizan por poseer al menos un electrón desapareado en su orbital externo. Esto les confiere inestabilidad y al mismo tiempo una gran reactividad. Ejemplos de especies químicas que, sin ser radicales libres, son generadoras de estas moléculas o resultan de la reducción o metabolismo de ellas son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido

hipocloroso (HOCl) y el peroxinitrito (ONOO⁻). El H₂O₂ puede generar rápidamente radicales libres, como el [•]OH en presencia de hierro (Fe²⁺) o cobre (Cu²⁺) libres, mediante la reacción de Fenton (Burton et al., 2011).

1.1.2.1 Procedencia de las ERO

Las ERO se originan a partir de la reducción del oxígeno dentro de la célula y estas ERO son más reactivas que éste en su estado basal de energía. No hay que considerar que las ERO son inevitablemente tóxicas, sino que su toxicidad depende de su concentración y del contexto en el que se producen (Königsberg-Fainstein, 2008).

Las ERO son producidas en la célula bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo, en el metabolismo oxidante o en la inflamación, en donde se ven involucradas enzimas oxidantes como la citocromo P₄₅₀, la NADPH oxidasa, la xantina oxidoreductasa, la lipoxigenasa, la triptófano dioxigenasa, entre otras, así como en la cadena respiratoria. Bajas concentraciones de ERO estimulan el crecimiento de las células, también funcionan como señales que determinan respuestas fisiológicas de adaptación al medio ambiente. Finalmente las ERO son indispensables para la diferenciación celular y para la muerte celular programada (Königsberg-Fainstein, 2008; Burton et al., 2011).

La exposición a diversos agentes exógenos como la luz UV, la radiación ionizante, los agentes químicos contaminantes o carcinogénicos, el humo de cigarrillos y la administración de drogas, generan ERO (Königsberg-Fainstein, 2008).

1.1.3 Sistema de defensa antioxidante

Está claro que la producción excesiva de ERO puede oxidar estructuras lipídicas, proteínicas e incluso al ADN y ARN (Pajuelo et al., 2004), llevando a múltiples daños que podrían culminar en la muerte celular. Por esta razón las células han desarrollado sistemas de defensa antioxidante a manera de limitar la formación de ERO a rangos fisiológicos evitando el daño celular que pudieran causar (De Zwart et al., 1999). Las ERO son removidas de nuestro organismo por diversos mecanismos antioxidantes (Benítez-Zequeira, 2006; Velásquez-Rodríguez et al., 2007; Königsberg-Fainstein, 2008; Cisneros et al., 2011; Denzoin-Vulcano et al., 2013; Ribas et al., 2014):

- * Proteínas que disminuyen la disponibilidad de agentes pro-oxidantes, tales como el grupo hemo o iones de hierro y el cobre. Entre éstas se encuentran transferrinas, ferritinas, albúmina, ceruloplasmina (CRP) y metalotioneínas (MTs).
- * Proteínas que protegen a las biomoléculas del daño por otros mecanismos como son las proteínas de shock térmico (HSP).
- * Agentes de bajo peso molecular que neutralizan ERO conocidos como antioxidantes no enzimáticos. Ejemplos de ellos son el glutatión reducido (GSH). Tripéptido hidrosoluble, L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina, formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina. GSH es capaz de ceder electrones (reducir) desde su grupo sulfhidrilo (SH) de la cisteína a una especie oxidada, como podría ser un lipoperóxido de las membranas, funcionando, como un potente agente antioxidante y rindiendo el producto oxidado (GSSG).

Tiene un rol importante en la detoxificación de una gran variedad de compuestos, conjugándose con estos para luego ser excretados por la orina o heces. La oxidación enzimática del GSH se produce como producto de la actividad enzimática de la proteína GPx, ya que para reducir el H₂O₂ y/o hidroperóxidos orgánicos a agua y alcohol, respectivamente. Así como también la GSH tiene una interacción no enzimática con radicales como el O₂[•], el óxido nítrico y el radical [•]OH eliminando las ERO, siendo una molécula con función antioxidante. Otros ejemplos son la vitamina E (α-tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A (β-caroteno) y otros antioxidantes lipo e hidrosolubles (ubiquinol, ácido úrico, bilirrubina). De aquí la íntima relación que existe entre la nutrición y las defensas antioxidantes.

- * Enzimas que remueven catalíticamente radicales libres y especies reactivas, como son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Ésta última usa como agente reductor al GSH. Otras enzimas con función antioxidante son las peroxirredoxinas (Prx), que eliminan al H₂O₂ en forma directa y la enzima hemooxigenasa-1 (HO-1) que desempeña una función muy importante en la protección contra el estrés oxidante.

La protección antioxidante fisiológica involucra a una gran variedad de componentes químicos de origen endógeno y exógeno, que interaccionan mediante efectos sinérgicos y complementarios, así la protección antioxidante resulta ser un mecanismo muy flexible y eficiente (Jacob, 1995).

1.1.3.1 Superóxido dismutasa

El O_2^{\bullet} es una de las primeras especies generadas por diversos sistemas celulares, es altamente tóxico por sí mismo y puede ser el generador de otras especies reactivas. La SOD es la enzima encargada de transformar esta ERO en una de menor toxicidad, como el H_2O_2 , el cual es posteriormente transformado en agua por otras enzimas (Königsberg-Fainstein, 2008). La enzima SOD dismuta la transformación de dos radicales O_2^{\bullet} a H_2O_2 y O_2 de una manera eficiente ($10^9 M^{-1} s^{-1}$) e independiente del pH (Hansberg, 2002). Su principal función es la protección contra el O_2^{\bullet} . La dismutación ocurre cuando una molécula de sustrato se reduce y la otra se oxida (Venereo, 2002).

Las SOD son una familia de enzimas formada por tres miembros, los cuales se ubican en lugares claramente específicos. La SOD1 o SOD CuZn tiene en su centro catalítico un Cu^{2+} y un Zn^{2+} y se ubica en el citoplasma, el núcleo, los peroxisomas y en la membrana externa de la mitocondria. La enzima SOD1 es un homodímero de 32 kDa. Sólo el Cu tiene importancia catalítica, mientras que el Zn confiere estabilidad a la estructura proteínica. La SOD CuZn es un homodímero abundante, resistente a la desnaturalización, se inhibe con cianuro o con quelantes de Cu como el dietilditiocarbamato. Mutaciones en el gen *sod1* han sido asociadas con Síndrome de Down y esclerosis lateral amiotrófica (Königsberg-Fainstein, 2008).

La SOD2 o MnSOD está ubicada cerca de la membrana interna mitocondrial. Es una SOD que une manganeso (Mn^{3+}) en su centro catalítico. Es un homotetrámero con un peso de 22kDa por subunidad, y posee un Mn^{3+} por monómero. Es vital la presencia de SOD2 dentro de la mitocondria, ya que éste es el

organelo celular sometido a mayor estrés oxidante. Se desnaturaliza con detergentes o solventes y no se inhibe con cianuro, dietilditiocarbamato ni con H_2O_2 . Variaciones genéticas en el gen *sod2* se han asociado a patologías, como el envejecimiento prematuro y la progeria (Königsberg-Fainstein, 2008).

La SOD3 o EC-SOD se localiza fuera de la célula y está asociada a la matriz extracelular, al igual que la SOD1, ésta tiene asociado un Cu^{2+} y un Zn^{2+} . La SOD3 está principalmente unida a la heparina y a las fibras de colágena tipo I de la mayor parte de los tejidos. Es una proteína tetramérica de casi 135 kDa y contiene un átomo de Cu^{2+} y uno Zn^{2+} por subunidad. Su función principal es mantener la acción vasodilatadora del óxido nítrico (NO^\bullet), mediante la inhibición de la acumulación O_2^\bullet (Rojkind et al., 2002). Deficiencias en la SOD3 se relacionan con algunas patologías, en particular con enfermedades vasculares como la arteriosclerosis (Königsberg-Fainstein, 2008).

La compartimentación de las diferentes SOD se explica en gran medida por el hecho de que el O_2^\bullet no puede cruzar con facilidad las membranas que separan los compartimientos celulares y mitocondriales (Königsberg-Fainstein, 2008).

1.1.3.2 Catalasa

El H_2O_2 es una de las ERO más estables, sin embargo, puede reaccionar y generar otras ERO más reactivas. Así, el principal efecto tóxico de esta ERO consiste en su gran capacidad de difusión y reacción con metales de transición (Fe^{2+} o Cu^{2+}) para formar $^\bullet\text{OH}$ (Königsberg-Fainstein, 2008).

La CAT es la enzima que descompone al H_2O_2 directamente en O_2 y H_2O . Para ello, emplea dos moléculas de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como oxidante. La CAT es una de las enzimas más rápidas que existen, cataliza la transformación de alrededor de 1×10^7 moléculas de sustrato por segundo. Está formada por cuatro subunidades idénticas, cada una asociada en su sitio activo a un grupo hemo. El hemo (protohemo-IX (hemo-b)) es una molécula de porfirina tetrapirrólica que forma un complejo de quelato con un átomo de hierro. Tiene una masa de 50 a 65 kDa por subunidad. Cada subunidad se caracteriza por cuatro dominios: el extremo amino terminal, el dominio barril- β , un dominio de conexión y el dominio α -helicoidal (Königsberg-Fainstein, 2008).

Al entrar una molécula de H_2O_2 al sitio activo toma un electrón del Fe^{2+} y otro del hemo, para generar una molécula de agua. Posteriormente, una segunda molécula de H_2O_2 cede un electrón al ferroxilo y otro al hemo, restituyendo el estado inicial de la enzima y liberando una molécula de dióxígeno y otra de H_2O (Hansberg, 2002).

La expresión de CAT en mamíferos es muy elevada en hígado y eritrocitos, alta en el tejido adiposo y riñón, moderada en el páncreas y pulmones y baja en el suero, corazón y cerebro, está localizada en los peroxisomas de estos órganos, en eritrocitos es citosólica. La ausencia de genes funcionales de CAT trae como consecuencia una deficiencia de la actividad de la enzima, deficiencia conocida como acatalasemia (Königsberg-Fainstein, 2008).

1.1.3.3 Glutación peroxidasa

GPx es el nombre genérico para una familia de múltiples isoenzimas que se caracterizan por su triada catalítica compuesta de los aminoácidos selenocisteína (Sec), glutamina y triptófano, es decir, estos aminoácidos son cruciales para las interacciones enzima-substrato y son altamente conservados en todos los mamíferos (Lubos et al., 2011). Existen cuatro isoenzimas dependientes de Selenio (Se) (Almaguer-Gotay et al., 2006; Königsberg-Fainstein, 2008):

- GPx clásica o citosólica (GPx-1 o cGPx): es la forma preponderante. Se expresa a nivel mitocondrial y citosólica. Presente en todos los tejidos, pero sus niveles son elevados en eritrocitos, riñón, pulmón e hígado.
- GPx gastrointestinal (GPx-2 o GPx-GI): localizada en el citosol de hígado y tracto intestinal de humano.
- GPx plasmática (GPx-3 o pGPx): localizada en los fluidos extracelulares de varios tejidos, aunque es en riñón donde existe una alta concentración.
- GPx de fosfolípidos (GPx-4 o PHGPx): se encuentra en la membrana y citosol de varios tejidos.

Las isoformas 1, 2 y 3 de GPx son homotetrámeros, mientras que la GPx-4 es un monómero; cada una de ellas contiene un átomo de Se en su sitio activo, en forma de Sec, es decir, una cisteína en la cual el azufre ha sido remplazado por el Se (Hansberg, 2002). La GPx es una enzima que requiere de un tripéptido de bajo peso molecular, el GSH, para reducir el H_2O_2 a H_2O . El GSH es el donador de equivalentes reductores en dicha reacción, de esta manera, la reducción del H_2O_2 a

H₂O y la oxidación de GSH a glutatión oxidado (GSSG) ocurren simultáneamente. La reducción del GSSG a GSH la lleva a cabo la enzima glutatión reductasa (GR), esta enzima transfiere electrones del NADPH (vía de las pentosas fosfato) al GSSG, reduciendo esta molécula a GSH, donde el GSH es reciclado más no consumido, para ser utilizado cuando se requiera (Martínez-Sámano et al., 2011).

El daño celular que resulta de una producción excesiva de ERO ha tratado de ser explicado como consecuencia de una alteración de la membrana celular por la oxidación de los residuos de ácidos grasos de la bicapa lipídica, proceso que se ha convenido denominar lipoperoxidación (LPO), y que está presente en procesos de desnutrición, diferentes patologías y variados estados (Matheus-Cortéz et al., 2009).

1.1.4 Lipoperoxidación

Se considera que la LPO ocasiona cambios en la composición química, y deterioro en la organización ultraestructural de las membranas celulares, disminuyendo la fluidez de las mismas, alterando su permeabilidad e inactivando enzimas y receptores ligados a la membrana (Paparella et al., 2015).

En la LPO ocurre una amplificación de radicales libres, ya que los aldehídos generados en el proceso pueden actuar como segundos mensajeros tóxicos en la compleja cadena de reacciones que se inician si los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la bicapa de la membrana son convertidos en lípidos hidroperóxidos. Entre los diferentes aldehídos que pueden formarse en el proceso de LPO, y que más se han estudiado, están: el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-alquenal, en particular el 4-hidroxinonenal (HNE) y 4-hidroxihexenal. Aldehídos que pueden

considerarse como indicadores del estrés oxidante. Las fuentes potenciales de producción de radicales libres que promueven la peroxidación de los ácidos grasos pueden ser las reacciones de autooxidación donde interviene el ion Fe^{2+} . El hierro puede provenir de la hemoglobina o de la ferritina. El H_2O_2 formado normalmente puede liberar ion Fe^{2+} de la hemoglobina y así estimular la peroxidación de los lípidos de la membrana celular (Torres et al., 2004).

El proceso de ataque oxidante a los lípidos, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso y arranca un átomo de hidrógeno, formando un radical alquílico (Halliwell, 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los PUFAs, debido a que, los radicales formados pueden estabilizarse por resonancia con el enlace doble. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, R-COO^\bullet (Calvin, 1981).

Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros PUFAs adyacentes; se forma un radical alquilo ($\text{R}'\text{-CH}^\bullet$) y un peróxido lipídico (R-COOH), con lo que se propaga la reacción en cadena (Halliwell, 1994). Cuando se produce este proceso, los ácidos grasos que son esenciales para dar a la membrana la fluidez que necesita, se pierden y la permeabilidad se altera, lo que puede conducir a la célula a un proceso de muerte celular (Batellier et al., 2001).

La reacción del H_2O_2 con el Fe^{2+} produce el radical $\bullet\text{OH}$, el cual a su vez reacciona con las cadenas laterales de los aminoácidos adyacentes al sitio de unión al metal de la proteína. La localización de la reacción de oxidación proteica se debe a

la alta reactividad del radical hidroxilo, el cual no se difunde fuera del sitio donde se genera, sino que reacciona inmediatamente con los residuos cercanos.

1.1.5 Oxidación de proteínas

En general, cualquier factor que ocasione estrés oxidante puede causar oxidación proteínica, por ejemplo, la disminución en la eficiencia de los sistemas antioxidantes de defensa, el aumento en la producción de ERO, la disminución en la capacidad de reciclar las proteínas oxidadas o un aumento en la susceptibilidad de las proteínas para ser oxidadas, por lo tanto, todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación. Dentro de las principales modificaciones que sufren ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a proteólisis. Aunque se ha demostrado que individualmente algunos aminoácidos son más susceptibles a oxidarse que otros, una proteína, dependiendo de su conformación tridimensional, puede exponer o no esos aminoácidos a la oxidación (Díaz-Acosta et al. 2006).

Las proteínas poseen diversos grupos con diferentes grados de oxidación, los cuales pueden sufrir varios grados de modificación al exponerse ante agentes oxidantes. Dependiendo de la ERO a la que se expongan las proteínas la oxidación puede ser específica o inespecífica; reversible (formación de puentes disulfuro, glutationilación, S-nitrosilación) o irreversible (carbonilación, ruptura de enlaces peptídicos, nitración, formación de enlaces proteína-proteína). Existen modificaciones

extensas en cadenas laterales de las proteínas, producto de la oxidación, entre ellas se encuentra la aparición de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), oxidación de residuos de histidina a oxo-histidina y otros productos de degradación, de fenilalanina a orto y meta-tirosina, la conversión de metionina a metioninsulfóxido o la degradación oxidativa de triptófano a quinureninas (Díaz-Acosta et al. 2006).

Se ha visto que la desnutrición provoca en el organismo alteraciones anatómicas a nivel de órganos, caracterizadas macroscópicamente por atrofia y disminución del peso, particularidades que han sido confirmadas al identificarse en órganos como hígado, intestino y timo (Velazco-Brito et al., 2013; Gavia-García et al., 2015). Sin embargo, en testículo, cuya función se considera fundamental para la reproducción y el desarrollo de las características sexuales, aún no se cuentan con datos sobre el posible efecto de la desnutrición sobre la estructura de este órgano y tampoco se cuenta con conocimientos relacionados con la influencia que pudiera tener la desnutrición sobre sistemas de protección, como el sistema de defensa antioxidante y sobre el daño oxidante en el mismo órgano.

1.1.6 Testículo

El testículo forma parte del aparato reproductor masculino en el que se diferencian tres componentes principales (Urroz, 1991):

- ✓ El testículo y conductos asociados (túbulos rectos, red testicular, conductillos eferentes, conducto epididimario, conducto deferente y conducto eyaculador)
- ✓ Las glándulas accesorias: la vesícula seminal, la próstata y la glándula bulbouretral

✓ El pene

Los testículos proceden del interior de la cavidad abdominal, a derecha e izquierda de la columna lumbar, al lado de los riñones. Hacia el tercer mes del desarrollo fetal, los testículos abandonan esta región y descienden por el conducto inguinal, atravesando la pared abdominal, arrastrando consigo las bolsas que los envuelve hasta su posición definitiva (Urroz, 1991).

Los testículos son dos glándulas ovoides tienen una consistencia dura y elástica debido al escroto. La función principal del escroto es regular la temperatura interna de las gónadas mediante la contracción involuntaria del músculo dartos (músculo fino adherido al escroto). Los testículos están recubiertos por dos capas serosas de la túnica vaginalis y una capa de tejido conectivo denso e irregular, que constituye la túnica albugínea. De la túnica albugínea emergen trabéculas de tejido conectivo que convergen en el mediastino ubicado en el centro del parénquima testicular, y dividen al testículo en un número variable de lobulillos testiculares que contienen de 1 a 4 túbulos seminíferos contorneados. Los túbulos seminíferos se unen a la salida de cada lobulillo, y forman los túbulos rectos agrupados en el mediastino, que a su vez conforman la rete testis. De la rete testis sale una docena de túbulos llamados vasos eferentes que convergen en la porción dorsal del mediastino para luego llegar a la cabeza del epidídimo (Urroz, 1991).

1.1.6.1 Tipos celulares del testículo

En el testículo se encuentran tres compartimentos funcionales (Urroz, 1991):

- a. El compartimento intersticial, contiene las células de Leydig (que rodean cada túbulo seminífero y lo bañan con un fluido rico en testosterona), macrófagos y vasos sanguíneos y linfáticos. Las células de Leydig derivan de las células estromáticas mesenquimáticas. Se localizan fuera de los túbulos seminíferos, responden al estímulo de la hormona luteinizante (LH; implicada en la síntesis de testosterona). También contiene células mioideas que rodean los túbulos seminíferos y realizan la contracción rítmica que provoca ondas peristálticas que ayudan a movilizar los espermatozoides y los líquidos testiculares a través de los túbulos seminíferos. Actividad contráctil estimulada por la oxitocina.
- b. El compartimento basal, separado del compartimento intersticial por la lámina propia testicular. En él se encuentran los túbulos seminíferos, en cuyo interior se localizan las células de Sertoli (células de sostén). Dichas células proceden del epitelio celómico. Se disponen envolviendo a las células germinales (espermatogonias, espermatocitos y espermátides) durante su desarrollo, estando íntimamente ligadas al proceso de maduración del esperma. Responden a la hormona folículo estimulante (FSH) y a la testosterona.
- c. El compartimento adluminal, que incluye la porción apical de las células de Sertoli, los espermatocitos y espermátidas. Aquí ocurre la espermiogénesis (diferenciación de las espermátides a espermatozoides) (Urroz, 1991).

1.1.6.2 Función testicular

El testículo tiene dos funciones principales que son (Urroz, 1991):

- a) La esteroidogénesis o secreción de hormonas masculinas, como la testosterona y la androsterona a través del proceso de esteroidogénesis, en las células de Leydig.
- b) La gametogénesis o producción de espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis, en los túbulos seminíferos. Considerada la función primordial, y que por ella es destacado como un órgano importante en la preservación de la especie.

2. ANTECEDENTES

La desnutrición es una condición que ha sido estudiada desde hace tiempo, a diferentes niveles. Por ejemplo, Federico Gómez (1956) propuso la primera clasificación antropométrica basada en un indicador (peso para la edad) y sobre esta base, forjó la clasificación que aún se emplea a nivel mundial (Frenk, 2009).

En 1933 Cecily William describió un síndrome que ella denominó Kwashiorkor y lo atribuyó a un déficit de proteínas en las dietas (Bengoa-Lecanda, 2003). En la década de los 60's y 70's se reportaron por primera vez los niveles de sistemas antioxidantes enzimáticos como no enzimáticos en niños con desnutrición. McLaren y cols. (1969) y Smith y cols. (1973) encontraron en plasma de niños desnutridos disminuida la concentración de carotenos. Por otro lado, en niños con Kwashiorkor, Burk y cols. (1967) observaron en plasma que la concentración de selenio (Se) está disminuida, lo que coincide con lo reportado por Golden y cols. (1987), quienes además de encontrar disminuido el Se en niños desnutridos, también encontraron una disminución de la vitamina E, vitamina A y carotenos, en la actividad de la enzima SOD y disminución del GSH en eritrocitos.

En otro estudio en el cual se analizaron los niveles de SOD en eritrocitos y GPx en sangre de niños con Marasmo y Kwashiorkor realizado por Shaaban y cols. (2002), se determinó que, igualmente los niveles de estas enzimas estaban disminuidos. Se propuso que pudiera deberse a los niveles deficientes de Cu^{2+} y Zn^{2+} , oligoelementos conocidos por ser parte integral de la enzima SOD CuZn; en tanto que la actividad de GPx estaba disminuida, por la deficiencia de Se, elementos que se obtienen a partir de la dieta. Velazco-Brito y cols. (2013), indujeron

desnutrición moderada en ratas Wistar albinas a partir de los 28 días de nacidas durante cuatro semanas. Los resultados obtenidos son semejantes a los antes mencionados, ya que la actividad de SOD y CAT en el suero de estas ratas estaba disminuida. Este mismo estudio propone que la desnutrición es una condición que va acompañada de la disminución de peso de órganos como el hígado y el intestino delgado.

En otros estudios (Ashour et al., 1999; Agudelo et al., 2006) se encontró que la ceruloplasmina, está disminuida tanto en niños con Marasmo como en niños con Kwashiorkor, proponiéndose que tal situación podría promover la presencia de Cu^{2+} libre en plasma, y aumentar la producción de radicales libres con el consecuente incremento en la oxidación. La transferrina fue analizada por Velásquez-Rodríguez y cols. (2007), quienes reportaron la existencia en niños con desnutrición de tipo Kwashiorkor, de altas concentraciones de hierro libre en plasma; siendo el hígado y la médula ósea, los órganos con depósitos aumentados de este elemento. Lo anterior se asoció con bajas concentraciones de transferrina, reportando un posible riesgo de estrés oxidante.

Matheus-Cortéz y cols. (2009) emplearon como modelo experimental a ratones, a los que mantuvieron bajo restricción nutricia durante los 84 días iniciales de su vida. Determinaron la actividad enzimática de SOD, así como la concentración de GSH, en hígado. Los resultados mostraron que tanto la actividad de SOD como la concentración de GSH están disminuidas bajo restricción nutricia. Albrecht y cols. (1995), confirmaron que, la deficiencia de nutrientes disminuye la protección antioxidante, lo cual fue corroborado por Bosnak y cols. (2010), quienes encontraron

disminuida la concentración de GSH y la actividad SOD y CAT en eritrocitos de niños con Marasmo en comparación con niños bien nutridos, indicando que la deficiencia en la concentración y actividad, respectivamente, de estas moléculas resulta en un aumento en los niveles de lipoperoxidación. Mencionan también que estas alteraciones pueden atribuirse a la ingesta insuficiente de micronutrientes (zinc, selenio, cobre) y vitaminas (E, C y A), permitiendo así un incremento del estrés oxidante y un decremento de la defensa antioxidante.

Los estudios mencionados, han analizado el efecto de la desnutrición sobre el sistema de defensa antioxidante, en su mayoría, en eritrocitos o plasma de niños con tal patología. Sin embargo, poco se ha determinado a nivel de otros órganos, ya sea en cuanto al sistema de defensa antioxidante o en cuanto a oxidación de lípidos y proteínas. Lo único que se sabe es que existe una modificación del peso (Velazco-Brito et al., 2013). Estudios como el de Matheus-Cortéz (2009) y el de Gavia-García y cols. (2015) han empleado como modelo biológico a la rata, con la finalidad de evaluar el efecto que tiene la desnutrición en órganos como el hígado y el timo. Así se tiene que, en timo de ratas lactantes desnutridas se encontró disminuida la expresión y actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx, asociados a un incremento en los niveles de lipoperoxidación, lo que puede ser atribuido a la disminución de la defensa enzimática antioxidante.

Zambrano y cols. (2005), estudiaron el efecto de la desnutrición inducida por una dieta baja en proteínas en ratas durante el periodo de la gestación y la lactancia. Las repercusiones de esta dieta se analizaron en las crías al llegar a la edad reproductiva. Reportando como primer dato que las crías al nacer presentan un peso

corporal disminuido. Estas crías en fase reproductiva presentaron una actividad sexual y cantidad de espermatozoides disminuida, resultados que los llevaron a concluir que la restricción de proteínas en la dieta materna durante la gestación y lactancia retrasa la maduración sexual en ratas macho adultas.

La diferencia de los trabajos antes mencionados con respecto a éste, consiste en que aquí se evaluó el sistema de defensa antioxidante, así como el daño oxidante y a ambos se les trató de relacionar con daño a nivel tisular de un órgano que no había sido previamente estudiado como es el testículo de ratas a las que se les indujo desnutrición durante la lactancia.

3. JUSTIFICACIÓN

La desnutrición se considera un grave problema de salud pública debido a la alta prevalencia que presenta y a que es un factor que afecta el equilibrio dinámico de quien la padece. Características por las cuales ha sido motivo de un amplio estudio, tanto en adultos como en niños. El estudio del efecto de esta condición en infantes se considera un punto importante de investigación ya que es en esta etapa de la vida en la que el organismo se encuentra en pleno desarrollo y crecimiento, adquiriendo madurez en los diferentes niveles de organización de un ser vivo, para lo cual necesita del aporte adecuado y suficiente de nutrientes. Peculiaridades que permitirán que el organismo en edad adulta, lleve a cabo sus funciones de manera óptima.

Se han evaluado diferentes parámetros en niños con desnutrición. Por cuestiones éticas es imposible investigar el efecto de la desnutrición a nivel de

órganos, sólo es posible investigarlo a nivel sistémico. Por ejemplo, se ha encontrado que la desnutrición en niños está relacionada con una defensa antioxidante enzimática disminuida en eritrocitos, pero a nivel de órganos es desconocido. Es por ello que se ha hecho indispensable el uso de modelos biológicos, como la rata, con la finalidad de explicar, entender y dar a conocer la gravedad que trae consigo esta condición. De esta manera se encontró que en el timo de ratas lactantes desnutridas el sistema de defensa antioxidante está disminuido, resultando en daño oxidante de biomoléculas, lo cual podría inducir la atrofia de este órgano, así como también promover que la función se vea alterada permitiendo que el organismo sea susceptible a enfermedades, lo que supondría que en edad adulta será propenso a un mayor ataque de infecciones.

Estos estudios preliminares permiten cuestionar si la desnutrición durante la lactancia, tendrá un efecto diferencial sobre los distintos órganos que conforman un organismo, con respecto al sistema de defensa antioxidante. Es así como surge el interés por investigar aspectos de protección antioxidante, de daño oxidante y de posible daño a nivel tisular en el testículo de ratas sometidas a desnutrición durante la lactancia, ya que es un órgano de gran importancia por su función, ser el encargado de producir espermatozoides maduros con la finalidad de que éstos puedan depositar su genoma haploide en el ovocito para así combinarse con el genoma haploide femenino iniciando el desarrollo de una nueva generación, permitiendo la continuidad de la especie.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo afectará la desnutrición la capacidad de respuesta antioxidante en testículo de ratas durante la lactancia?

5. HIPÓTESIS

Bajo el efecto de la desnutrición el testículo de ratas lactantes presenta un sistema de defensa antioxidante enzimático disminuido y daño oxidante en lípidos y proteínas, así como daño en su morfología estructural.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el daño oxidante y los mecanismos de la respuesta antioxidante en testículo de ratas lactantes desnutridas.

6.1. Objetivos Particulares

1. Determinar si la desnutrición está relacionada con cambios en los niveles de expresión y la actividad enzimática de las diferentes proteínas que participan en la respuesta antioxidante en testículo de ratas lactantes desnutridas.
2. Determinar si la desnutrición incrementa el daño oxidante en lípidos y proteínas en testículo de ratas lactantes.
3. Analizar si la desnutrición está relacionada con daño a nivel de la morfología de estructuras testiculares de ratas lactantes.
4. Establecer en testículo de ratas lactantes si existe un impacto diferencial entre la desnutrición de primero, segundo y tercer grado sobre la expresión y actividad

enzimática de proteínas con función antioxidante, sobre el daño oxidante en lípidos y proteínas, así como sobre el daño morfológico estructural.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Desnutrición experimental

Se emplearon ratas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) de la colonia del Bioterio de la UAM-X. La desnutrición se indujo por el método de competencia de alimento durante la lactancia. El cual se basa en la reducción de la cantidad de alimento disponible por cría. Para tal efecto, se distribuyeron al azar las crías al día siguiente de su nacimiento, en dos lotes: lote experimental (desnutridas), en la cual se colocaron 15 crías con una nodriza y el lote control o testigo (bien nutridas), con 6 crías con su respectiva nodriza. Las crías se pesaron cada tercer día, desde el día uno hasta los 21 días de edad (día del destete) (Ortiz et al., 1996). Se consideraron con desnutrición de primer grado (DN1) cuando presentaron un déficit de peso corporal entre el 10-24%, de segundo grado (DN2) cuando el déficit de peso se presentó entre el 25-39% y de tercer grado (DN3) con un déficit de peso del 40% o más, con respecto al promedio de las bien nutridas de la misma edad (Gómez et al., 1956).

7.2 Disección de testículos

Al cabo de 21 días se sacrificaron las ratas de ambos lotes por dislocación cervical. Técnica aceptada, ya que induce inconciencia rápida y no contamina tejidos. Asimismo, se cumplió con las reglas de ética para el trato de animales, los cuales se

mantuvieron en instalaciones con adecuada temperatura, humedad, ventilación, iluminación y en cajas con espacio adecuado, así como con alimentación y bienestar psicológico (NOM-062-ZOO-1999). Se disectaron los testículos bajo condiciones asépticas. Se lavaron perfectamente con un amortiguador de fosfatos salino (PBS), se almacenaron en tubos Eppendorf estériles, posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido a -70°C y se almacenaron a -96°C , hasta su procesamiento.

7.3 Extracción y cuantificación de proteína

De los testículos almacenados, se cortó un trozo de aproximadamente 100 mg de tejido, el que se depositó en buffer de lisis, se maceraron en un tubo Eppendorf sobre hielo, con un politrón. El macerado se detuvo al momento en que el tejido dejó de ser visible (aproximadamente 20 segundos). Se centrifugaron a $14,000 \times g$ durante 20 minutos en frío (4°C), recuperando el sobrenadante. Se cuantificaron las proteínas totales por medio del Método de Bradford (1976). El cual consiste en tomar una alícuota de $1\mu\text{L}$ de la muestra a la que se le adiciona el reactivo de Bradford, homogenizando en celdas de plástico nuevas con agua destilada. Se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. La cuantificación se realizó mediante una interpolación en una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

7.4 Determinación de la expresión de SOD CuZn, CAT, GPx-1 y GR

La expresión de estas proteínas se determinó mediante la técnica de Western Blot. Para llevar a cabo este método se tomaron $30 \mu\text{g}$ de proteína, necesarios para la electroforesis, es decir, la separación de macromoléculas mediante el uso de geles

de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Towbin et al., 1979). Después las macromoléculas ya separadas en función de su diferente peso molecular fueron transferidas a una segunda matriz, a una membrana de PVDF (Burnette, 1981). Posteriormente, se saturaron (bloqueo) todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados, para evitar la unión no específica de anticuerpos. La membrana se lavó con TBS-Tween 20 para retirar el exceso de la solución bloqueadora. Se incubó la membrana con anticuerpos primarios contra las proteínas SOD CuZn (2:1000), CAT (1:1000), GPx-1 (2:1000) y GR (1:1000) durante 12 horas en frío (8°C). Después la membrana se lavó con TBS-Tween 20 para retirar el exceso del anticuerpo primario. La membrana se incubó nuevamente con los anticuerpos secundarios para SOD CuZn (1:1400), CAT (1:2000), GPx-1 (1:2000) y GR (1:2000) durante una hora y media en frío (8°C).

Finalmente, se añadió un sustrato quimioluminiscente (Immobilion™ Western. Chemiluminescent HRP substrate. Millipore Corporation, Billerica) que al combinarse con la enzima correspondiente produjo luz como producto final, la cual se detectó mediante un fotodocumentador (KODAK Gel Logic 1500 Imaging System. E.U.A.), sistema de revelado de bandas de proteínas marcadas con el complejo de anticuerpos.

7.5 Determinación de la actividad enzimática de SOD CuZn, CAT y GPx total

La actividad enzimática de SOD CuZn, CAT y GPx total se determinó a partir del sobrenadante obtenido de la extracción de proteínas. La actividad de SOD CuZn se determinó por el Método de Paoletti (1986). En donde se utilizó el sistema

xantina/xantina oxidasa como generador constante del radical superóxido, el cual, al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce y formando un producto llamado formazán, cuyo cambio de color se detectó mediante espectrofotometría a 560 nm, cuando la SOD CuZn inhibió la reducción del NBT. Las lecturas que se llevaron a cabo fueron una lectura cada 30 segundos durante 5 min.

La actividad de CAT, mediante el Método de Aebi (1984) que consiste en medir la descomposición enzimática del H_2O_2 directamente por decrecimiento de la absorbancia a 240 nm. La actividad de la enzima CAT se determinó midiendo el consumo de H_2O_2 en un medio que contuvo 1mL de sustrato (H_2O_2 , 0.05% en buffer de fosfatos 50mM, pH 7). La absorbancia inicial de esa mezcla debió encontrarse en el rango de 0.45-0.5) y 1 μ L del sobrenadante. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína, lo que indica que una unidad es definida como la cantidad de enzima que puede descomponer un μ mol de H_2O_2 por minuto a 25°C y a pH = 7. Se analizaron las muestras por triplicado y se registró la absorbancia cada 10 segundos durante 2 minutos.

La actividad de GPx total se determinó mediante la catalización del H_2O_2 en H_2O , mediada por glutatión reducido; se monitoreó la reducción del NADPH al mantener constantes los niveles de glutatión reducido (Folhé y Günzler, 1984). Se registró el cambio en la absorbancia a 340 nm cada 3 segundos durante 40 segundos, analizando las muestras por triplicado.

7.6 Determinación del cociente GSH/GSSG

El contenido de glutatión reducido (GSH) y disulfuro de glutatión (GSSG) se determinó por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), siguiendo el protocolo descrito por Farris (1987), con algunas modificaciones. 100 mg de tejido fueron colectados en 1 mL de ácido clorhídrico/BPDS (APC/BPDS 1mM (Sigma, St. Louis, EUA)) y disgregado sobre hielo por 30 s; la suspensión fue centrifugada a 10 000 x g por 10 min a 4°C. Enseguida se utilizó el extracto puro a una dilución 1:10 con PBS, sin transformar. Se tomaron 100 µL de cada muestra y fueron inyectadas al sistema de HPLC (Waters) y separados por una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 250 mm y 5 µm de partícula, utilizando como fase móvil acetonitrilo al 1% y buffer de fosfato de potasio (KH₂PO₄) 20 mM; pH = 2.7. Los eluidos fueron analizados por detección ultravioleta a 265 nm. El área bajo la curva se determinó mediante el uso de estándares de GSH/GSSG partiendo de diferentes concentraciones (10, 25, 50, 100, 200 y 400 µM).

7.7 Evaluación de los niveles de lipoperoxidación

La lipoperoxidación se evaluó mediante la detección de la concentración de malondialdehído (MDA), usando un kit (No. Catálogo MAK085 SIGMA-ALDRICH). La lipoperoxidación se determinó por la reacción de MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en la que se formó un producto colorimétrico (492 nm), cuya intensidad fue proporcional al MDA presente. La concentración de MDA en cada muestra se calculó utilizando una curva estándar generada de cantidades conocidas de MDA (0, 4, 8, 12, 16 y 20 nmol) y se presentaron como nmol de MDA/µL. Esta determinación se

realizó por duplicado para cada muestra. Analizándose en un lector de placas de pocillos múltiples espectrofotométrico (lector de Elisa) midiendo la absorbancia a 532 nm.

7.8 Determinación de la oxidación de proteínas

La oxidación de proteínas se determinó siguiendo el Método de Levine y cols. (1990), mediante la cuantificación del contenido de carbonilos en proteínas. Este método se basa en que el 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) es capaz de unirse covalentemente a los grupos carbonilo, para dar lugar a hidrazonas estables como el dinitrofenilo (DNP). El grupo DNP fue detectado espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico con una absorbancia máxima a 365-375 nm.

7.9 Morfometría del testículo

Se disectaron los testículos bajo condiciones asépticas, se despojaron de la grasa circundante, se lavaron perfectamente con un amortiguador de fosfatos salino (PBS) y se calculó el peso promedio de los mismos expresado en gramos (g). Inmediatamente después se fijaron por inmersión en fijador de Bouin durante 24 h.

Los testículos inmersos en el fijador Bouin se lavaron con una solución de alcohol etílico al 70%, se deshidrataron en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico (80%, 96%, absoluto). Seguido, los testículos deshidratados se aclararon con xilol.

Utilizando un micrótopo (Leica Instruments GmbH) se obtuvieron cortes de 5 μm , que fueron teñidos con H-E, para ser observados al fotomicroscopio Axioskop2 (Carl Zeiss, 801983, Durchlicht Mikroskop DIC). El análisis morfométrico de los túbulos seminíferos incluyó el área total de los túbulos seminíferos (Arteaga et al., 2013). Las mediciones se realizaron en 30 túbulos seminíferos por muestra, 10 túbulos de la parte craneal, 10 de la parte media y 10 de la parte caudal, mediante el programa AxioVision Rel 4.8. Las fotomicrografías se obtuvieron mediante la cámara AxioCam MRc5 Zeiss integrada al microscopio.

8. ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron expresados como el promedio \pm E. E. de los diferentes ensayos. Las diferencias entre los grupos experimentales (DN1, DN2 y DN3) con respecto al grupo control (BN) fueron evaluadas empleando el estadístico Prueba de Tukey-Kramer, a través del programa estadístico NCSS 2007 para Windows versión de software 7.0 (NCSS Statistical Software, Kaysville, UT, USA). Considerándose diferencias significativas cuando $p \leq 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 Peso corporal

Una camada del grupo desnutrido (DN) estuvo formado por 16 ratas, en tanto que una camada del grupo bien nutrido (BN) se formó por 6 ratas. En la Figura 1 se muestran los promedios \pm E. E. del peso corporal de una camada de estas ratas DN y BN desde el día uno hasta al día 21. Observándose que el grupo DN, presenta un

déficit del peso desde el día tres, el cual persistió hasta el día 21, en comparación con el grupo control (BN).

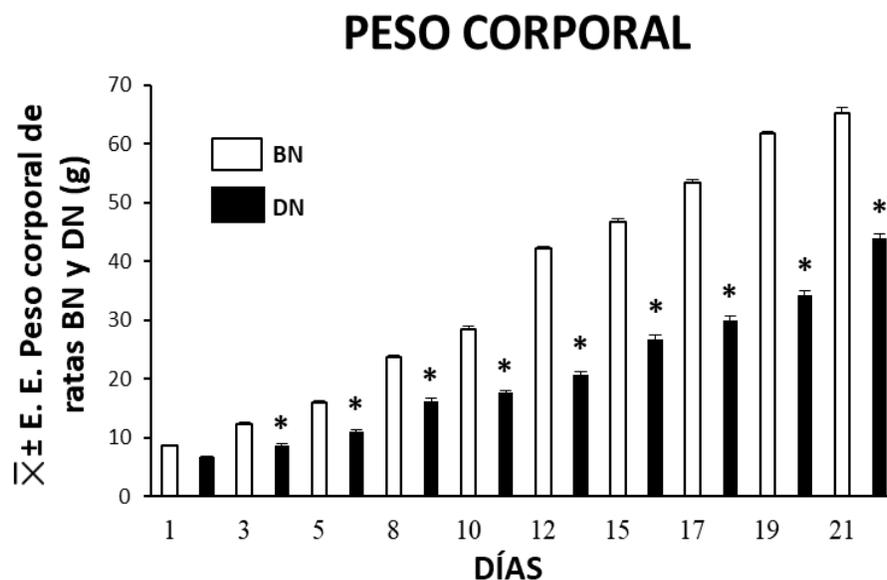


Figura 1. Peso corporal (g) de ratas Bien Nutridas (BN) y Desnutridas (DN) desde el día 1 de nacimiento hasta el día 21. BN n=6 y DN n=15. Diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo desnutrido (DN) vs el grupo control (BN) (* $p \leq 0.05$).

9.2 Grado de desnutrición

Para evaluar los déficits de peso entre las diferentes camadas se realizó el análisis de una camada BN las que presentaron un peso corporal promedio de 53.96 g y las ratas de una camada del grupo DN. Las ratas con DN1 presentaron un peso corporal promedio de 44.58 g, ratas con DN2 tuvieron un peso corporal promedio de 37.15 g y las ratas con DN3 tuvieron un peso corporal de 26.8 g. El déficit de peso corporal que presentaron las ratas, mediante el cual se clasificaron en DN1, DN2 y DN3 (17.38%, 31.16% y 50.33%, respectivamente) se observan en la gráfica de la Figura 2. Los que se establecieron comparando el peso promedio de las ratas DN con el peso promedio de las ratas BN. En la Figura 2 se muestra el peso corporal de

los grupos de ratas con diferentes grados de DN y BN a los 21 días de nacidas. En esta figura se muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los diferentes grados de desnutrición con el grupo control, así como entre los grupos.

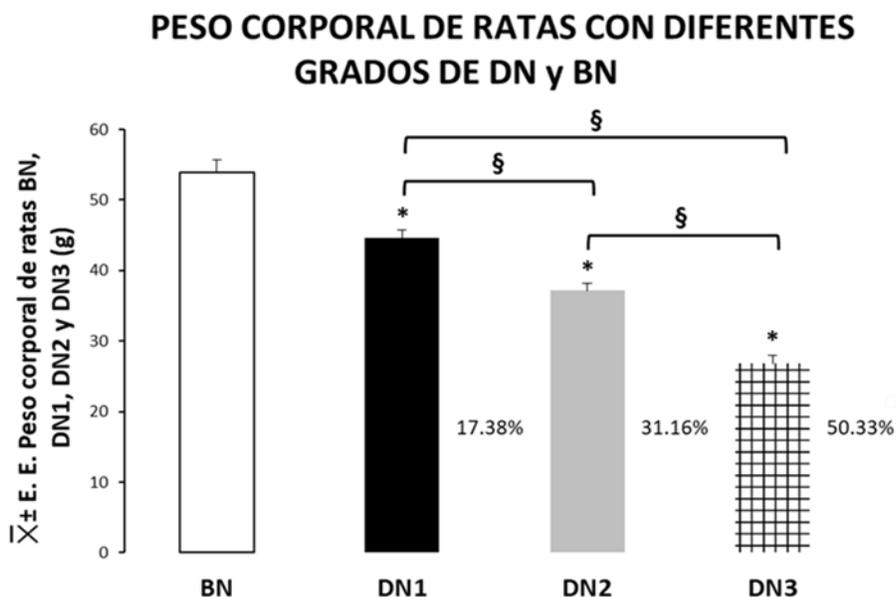


Figura 2. Peso corporal (g) de ratas Bien Nutridas (BN, n=6) y con diferentes grados de desnutrición a los 21 días de nacidas. Ratas desnutridas de primer grado (DN1, n=6), ratas desnutridas de segundo grado (DN2, n=6), ratas desnutridas de tercer grado (DN3, n=6). Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo control (*p≤0.05) y entre grupos de ratas desnutridas (§p≤0.05).

9.3 Peso testicular

El peso del testículo de ratas se registró a los 21 días de edad. Los pesos correspondientes fueron 0.36 g para ratas BN, 0.28 g para ratas DN1, 0.25 g para ratas DN2 y 0.16 g para ratas DN3. Teniendo déficits de peso del 22.58 %, 28.57% y 55.76%, respectivamente, en comparación con el peso del testículo de las ratas BN. La Figura 3, muestra la disminución del peso testicular en los tres grupos de ratas

DN y en el grupo BN, se señala el número de veces que disminuyó el peso en cada grupo experimental con respecto del grupo control. Las DN1, DN2 y DN3 presentaron diferencia estadísticamente significativa en el peso del testículo contra las BN. Entre los tres grados de desnutrición las DN1 y las DN2 fueron estadísticamente diferentes a las DN3.

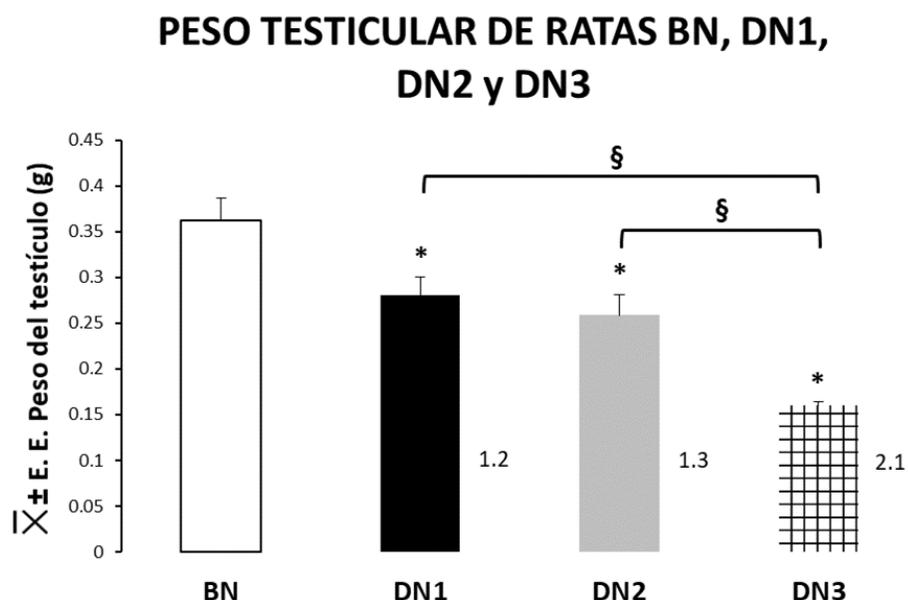


Figura 3. Peso testicular (g) de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, $n=6$), de segundo grado (DN2, $n=6$) de tercer grado (DN3, $n=6$) y bien nutridas (BN, $n=6$). Diferencia entre las BN y las desnutridas ($*p \leq 0.05$). La comparación entre los grupos de desnutridas sólo mostró diferencia estadísticamente significativa para DN3 vs DN1 y DN2 ($^{\S}p \leq 0.05$). 1.2, 1.3 y 2.1 número de veces que disminuyó el peso testicular de las ratas desnutridas con respecto al peso testicular de las BN.

9.4 Expresión de la proteína SOD CuZn

El análisis de la expresión de la enzima SOD CuZn se evaluó en testículos de las ratas lactantes BN, DN1, DN2 y DN3. Como lo muestra la Figura 4, el revelado de bandas indicó que la proteína SOD CuZn se encontró expresada en cada uno de los

grupos con diferente grado de DN, así como en el grupo BN. Se observó que la expresión de esta enzima fue menor conforme el grado de DN es mayor, a pesar de ello, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grados de DN. Aunque, se presentaron diferencias significativas al comparar los grupos experimentales con el grupo BN.

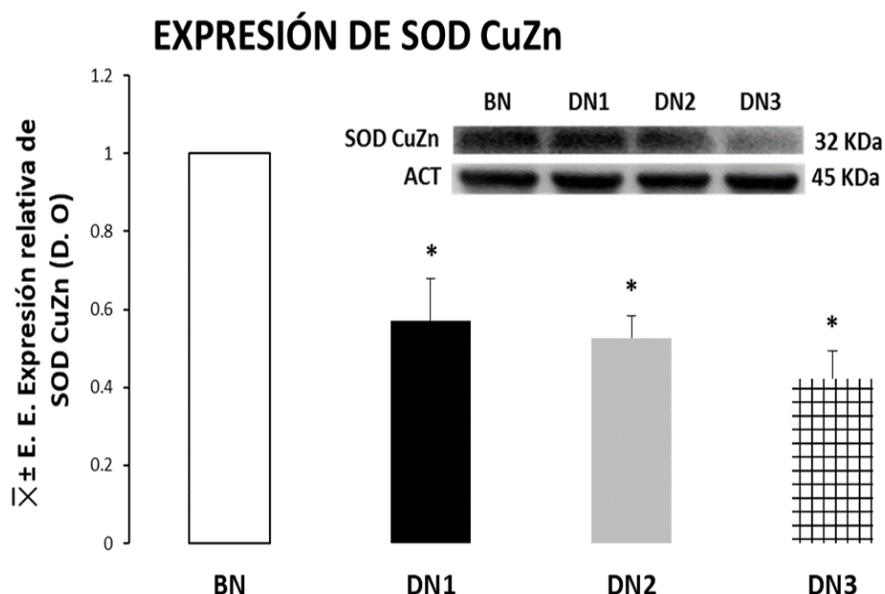


Figura 4. Expresión de la proteína superóxido dismutasa dependiente de CuZn (SOD CuZn) en testículo de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, n=6), de segundo grado (DN2, n=6) de tercer grado (DN3, n=6) y bien nutridas (BN, n=6). Diferencias significativas al comparar la expresión de SOD CuZn de los diferentes grados de DN con el grupo BN ($*p \leq 0.05$). Entre los grupos de ratas desnutridas no hubo diferencias estadísticas.

9.5 Actividad enzimática de SOD CuZn

La actividad enzimática de SOD CuZn se analizó en testículos de ratas BN, DN1, DN2 y DN3. Esta actividad se aprecia en la Figura 5, la cual indica que la actividad de la proteína está disminuida en cada uno de los grupos experimentales con respecto a la actividad de la enzima en el grupo BN. Se presentaron diferencias

significativas al comparar los distintos grados de DN con el grupo control y no existieron diferencias significativas entre grupos desnutridos.

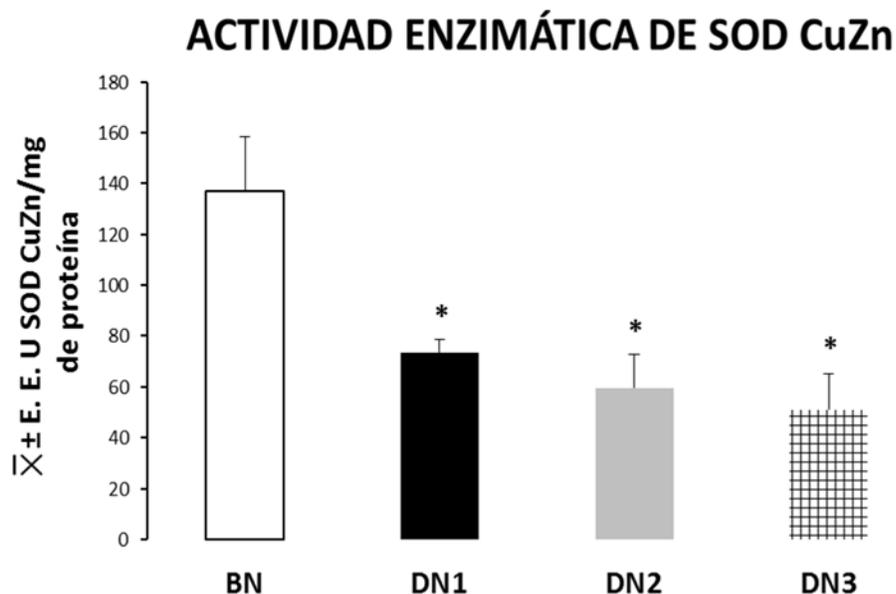


Figura 5. Actividad enzimática de superóxido dismutasa dependiente de CuZn (SOD CuZn) en testículo de ratas lactantes desnutridas de primer grado (DN1, n=8), de segundo grado (DN2, n=8) de tercer grado (DN3, n=8) y bien nutridas (BN, n=8). La actividad enzimática de SOD CuZn se observa disminuida significativamente en las ratas con DN respecto de las BN (* $p \leq 0.05$). No hubo diferencias significativas entre los grupos de ratas desnutridas.

9.6 Expresión de la proteína CAT

En testículos de ratas BN, DN1, DN2 y DN3 se analizó la expresión de CAT. Se observa en la Figura 6 el revelado de bandas de la proteína CAT, indicando que CAT se encuentra presente tanto en testículo de ratas BN como en las DN, sin embargo esta expresión, al igual que SOD CuZn, fue menor conforme el grado de DN fue mayor. Se presentaron diferencias significativas al comparar los grupos experimentales con el grupo control, no obstante, no existieron diferencias entre los diferentes grados de DN.

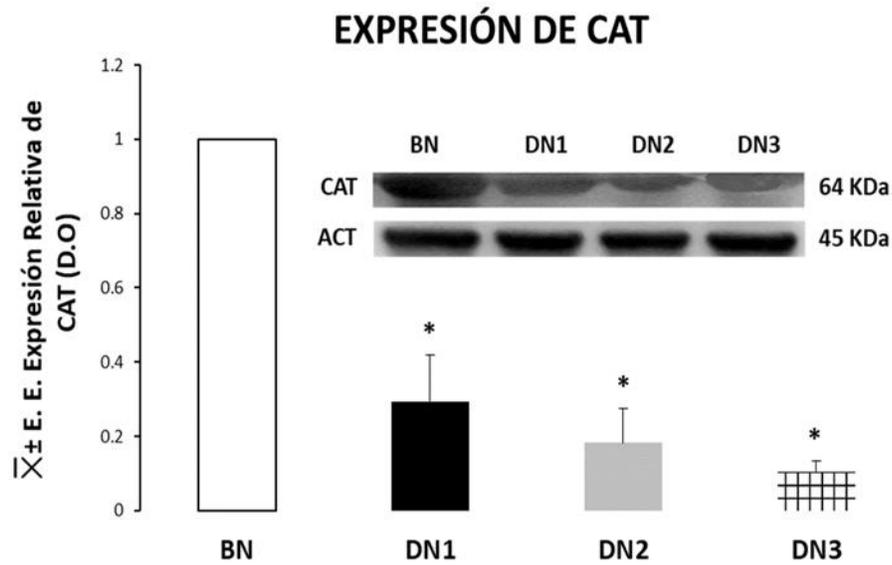


Figura 6. Expresión de la catalasa (CAT) en testículo de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, n=6), de segundo grado (DN2, n=6) de tercer grado (DN3, n=6) y bien nutridas (BN, n=6). Diferencias significativas al comparar la expresión de los diferentes grados de DN con el grupo BN (* $p \leq 0.05$). Entre los grupos de desnutridas no hubo diferencia estadística.

9.7 Actividad enzimática de CAT

Se determinó la actividad de CAT en testículos de ratas lactantes tanto BN como DN1, DN2 y DN3. Se observa en la Figura 7 que la actividad enzimática de CAT disminuyó en todos los grupos con DN respecto al grupo BN. Presentándose diferencias significativas al comparar los diferentes grados de DN con el grupo BN, además de que no existieron diferencias significativas entre los grupos con DN.

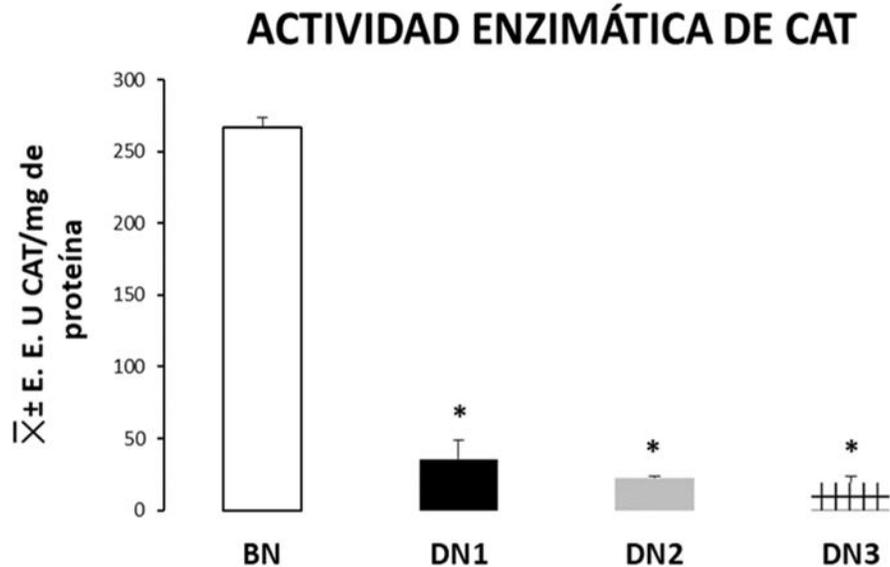


Figura 7. Actividad enzimática de catalasa (CAT) en testículo de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, n=6), de segundo grado (DN2, n=6), de tercer grado (DN3, n=6) y bien nutridas (BN, n=6). La actividad enzimática de CAT se observa disminuida significativamente en las ratas con DN respecto de las BN (* $p \leq 0.05$). Diferencias significativas no se encontraron entre los grupos de ratas desnutridas.

9.8 Expresión de la proteína GPx-1

Se evaluó la expresión de esta proteína con función antioxidante en testículos de ratas lactantes BN y con diferente grado de DN. La enzima glutatión peroxidasa 1 o citosólica (GPx-1), tal como lo indica el revelado se encontró expresada en ratas BN y DN. El resultado de esta evaluación se observa en la Figura 8, la cual indica que la expresión es menor en testículo de ratas lactantes con diferente grado de DN comparado con la expresión observada en testículo de ratas BN de la misma edad, encontrando diferencias estadísticamente significativas. No obstante, no hubo diferencias significativas entre los grupos DN1, DN2 y DN3.

EXPRESIÓN DE GPx-1

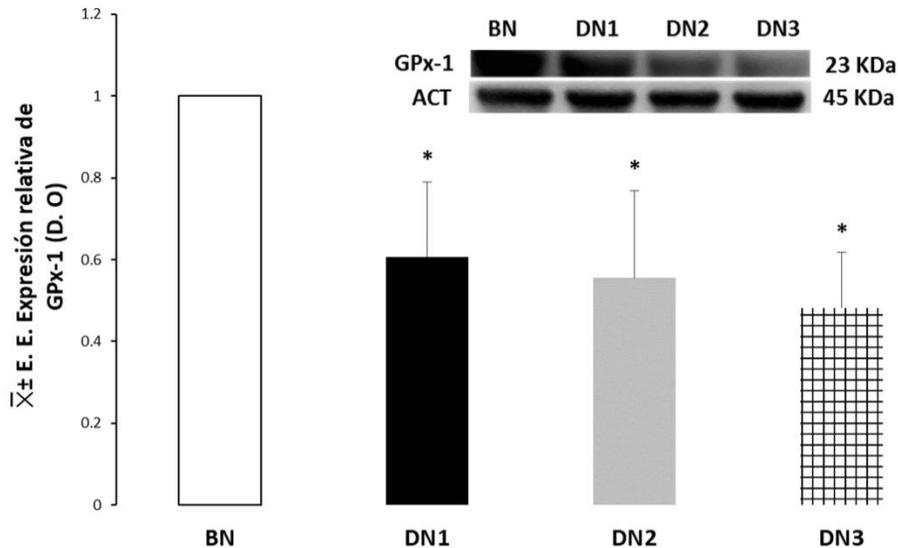


Figura 8. Expresión de la glutatión peroxidasa-1 (GPx-1) en testículo de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, n=6), de segundo grado (DN2, n=6) de tercer grado (DN3, n=6) y bien nutridas (BN, n=6). Diferencias significativas existen al comparar los diferentes grados de DN con el grupo BN (* $p \leq 0.05$). No hubo diferencia estadística entre los grupos de desnutridas.

9.9 Actividad enzimática de GPx total

El análisis de la actividad enzimática de GPx total se estableció en testículos de ratas BN, así como en testículo de ratas DN1, DN2 y DN3. En este caso se observa en la Figura 9 que la actividad de GPx total se encontró elevada en los grupos con diferente grado de DN con respecto a lo encontrado en el grupo BN. Presentando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos desnutridos con el grupo BN. Por el contrario, no se presentaron diferencias significativas al comprar la actividad de GPx total entre los tres diferentes grados de DN. A pesar de encontrar una expresión disminuida de esta enzima en ratas con DN1, DN2 y DN3, tal como se observa en la Figura 8.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GPx TOTAL

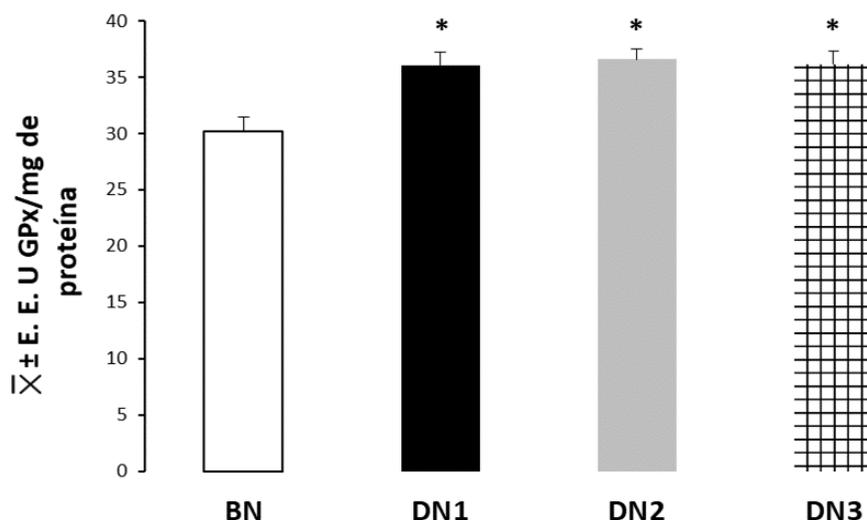


Figura 9. Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) total en testículo de ratas lactantes desnutridas de primer grado (DN1, n=8), de segundo grado (DN2, n=8) de tercer grado (DN3, n=8) y bien nutridas (BN, n=8). La actividad enzimática de GPx total se observa aumentada significativamente en las ratas con DN respecto de las BN (* $p \leq 0.05$). Diferencias significativas no se encontraron entre los grupos de ratas desnutridas.

9.10 Cociente GSH/GSSG

Se determinó la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) tanto en testículo de ratas lactantes BN como en testículo de ratas lactantes DN. Se observó este cociente disminuido en testículo de ratas lactantes con DN1, DN2 y DN3 al compararse con BN. No hubo diferencias al comparar este parámetro entre los tres diferentes grados de DN, tal como se observa en la Figura 10. Por otro lado, se aprecia que al comparar el cociente de los grupos desnutridos con el cociente del grupo BN se hallaron diferencias significativas.

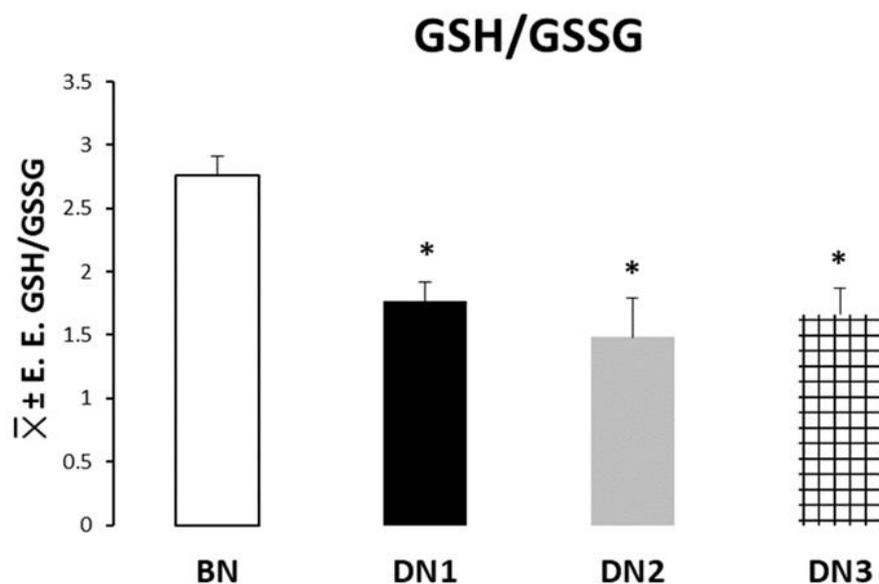


Figura 10. Relación GSH/GSSG en testículo de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, n=5), desnutrición de segundo grado (DN2, n=5), desnutrición de tercer grado (DN3, n=5) y bien nutridas (BN, n=5). Diferencias significativas existen al comparar los diferentes grados de DN con el grupo BN (* $p \leq 0.05$). No se observó diferencia estadística entre los grupos de desnutridas.

9.11 Expresión de la proteína Glutación reductasa

Se analizó este parámetro en testículos de ratas BN y en ratas DN1, DN2 y DN3. La Figura 11 muestra que, de acuerdo al revelado de bandas, se encuentra presente la proteína glutación reductasa (GR), la cual participa en la reducción del glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido (GSH), para que la enzima GPx continúe con su actividad y el cociente GSH/GSSG se mantenga inclinado a favor del GSH manteniendo el estado redox adecuado, así como, el tripéptido GSH lleve a cabo procesos como antioxidante no enzimático, se encontró aumentada en testículo de ratas lactantes con DN1, DN2 y DN3, de acuerdo a lo observado en testículo de ratas lactantes BN. Al comparar entre grupos experimentales no se encontró

diferencia significativa, sólo hubo diferencia significativa al comparar los grupos desnutridos con el grupo control.

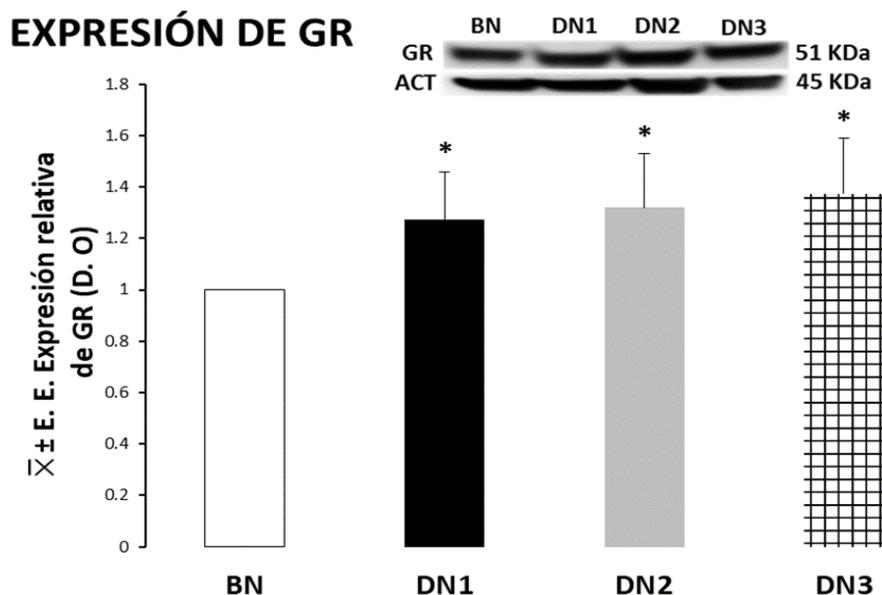


Figura 11. Expresión de la proteína Glutación reductasa (GR) en testículo de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, n=5), desnutrición de segundo grado (DN2, n=5), desnutrición de tercer grado (DN3, n=5) y bien nutridas (BN, n=5). Al comparar los diferentes grados de desnutrición con el grupo bien nutrido se encontraron diferencias significativas (* $p \leq 0.05$). No hubo diferencia estadística entre los grupos de desnutridas.

9.12 Niveles de lipoperoxidación

La concentración de malondialdehído (MDA) se analizó en testículos de ratas BN, así como en testículos de ratas DN1, DN2 y DN3. En este estudio se observó que los grupos con DN1, DN2 y DN3 presentaron niveles de LPO más elevados que el grupo BN, es decir, se encontró una concentración de MDA elevada en cada uno de los grupos desnutridos en relación con el grupo BN, presentando diferencias estadísticamente significativas de todos los grados de DN con respecto al grupo control, tal y como se aprecia en la Figura 12.

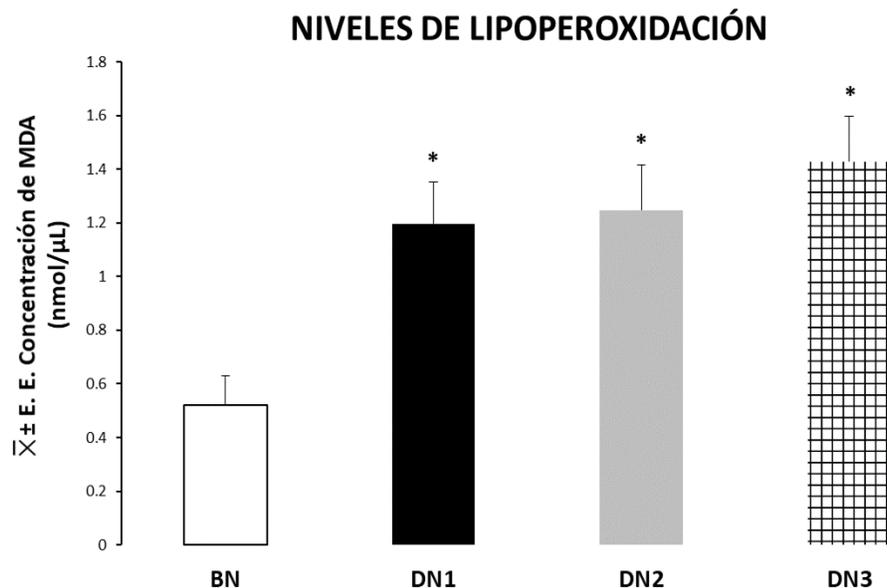


Figura 12. Niveles de lipoperoxidación (malondialdehído (MDA)) en testículo de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, n=8), desnutrición de segundo grado (DN2, n=8), desnutrición de tercer grado (DN3, n=8) y bien nutridas (BN, n=8). Diferencias significativas al comparar los diferentes grados de DN con el grupo BN (* $p \leq 0.05$). No se observó diferencia estadística entre los grupos de desnutridas.

9.13 Carbonilación de proteínas

El contenido de carbonilos totales en proteínas de testículo de ratas lactantes se evaluó tanto BN como con DN1, DN2 y DN3. Se aprecia en la Figura 13 que los grupos con DN1, DN2 y DN3 presentaron un contenido de carbonilos totales más elevados que el grupo BN, presentando diferencias estadísticamente significativas de todos los grados de DN con respecto al grupo control, a su vez, no se encontraron diferencias significativas al comparar el contenido de carbonilos totales entre los diferentes grupos experimentales.

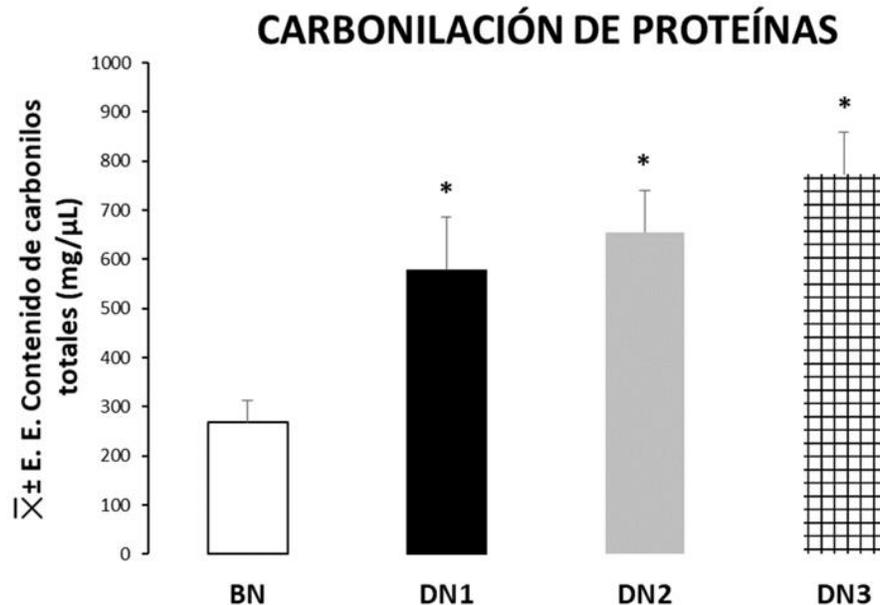


Figura 13. Contenido de carbonilos totales en testículo de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, n=8), desnutrición de segundo grado (DN2, n=8), desnutrición de tercer grado (DN3, n=8) y bien nutridas (BN, n=8). Diferencias significativas al comparar los diferentes grados de DN con el grupo BN (*p<0.05). Entre los grupos de desnutridas no se observó diferencia estadística.

9.14 Morfología testicular

Se realizaron cortes histológicos de testículos de ratas lactantes BN y desnutridas, utilizando el equipo Axioskop2 (Carl Zeiss, 801983, Durchlicht Mikroskop DIC) se determinó el área de los túbulos seminíferos, tanto del grupo control como experimental, así como también se obtuvieron fotomicrografías de cada grupo, de las que se tomaron ejemplos de los túbulos a los cuales se les realizó la medición correspondiente (Figura 14). El resultado conseguido de la medición de 30 túbulos seminíferos analizados por muestra se aprecia en la Figura 15, figura que evidencia que el promedio \pm E. E. del área de túbulos seminíferos de testículo de ratas BN es mayor con respecto al área del túbulo seminífero de testículo de ratas

con diferente grado de DN, encontrando diferencias significativas entre estos grupos. Por otro lado, no se presentaron diferencias al comparar el área del túbulo seminífero entre los grupos experimentales.

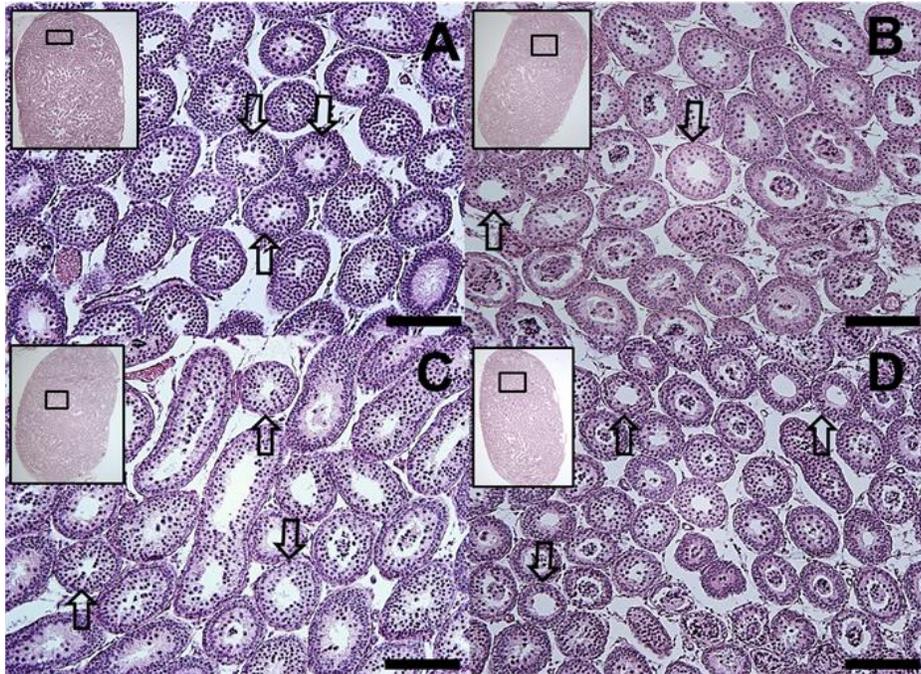


Figura 14. Fotomicrografías de secciones histológicas sagitales de testículo (1.25x y 10x). 30 túbulos por n, obtenidas de ratas lactantes. (A) Morfología de túbulo seminífero de rata lactante bien nutrida (BN). (B) Morfología de túbulo de ratas lactantes de primer grado de desnutrición (DN1), (C) desnutrición de segundo grado (DN2) y (D) desnutrición de tercer grado (DN3). Observando un diámetro reducido de los túbulo de las ratas desnutridas con respecto al diámetro del túbulo de ratas BN, así como también se observa una disminución del epitelio seminífero. Tinción hematoxilina y eosina. Barra de escala 500 µm. (Túbulo señalado con flecha).

ÁREA TOTAL DEL TÚBULO SEMINÍFERO

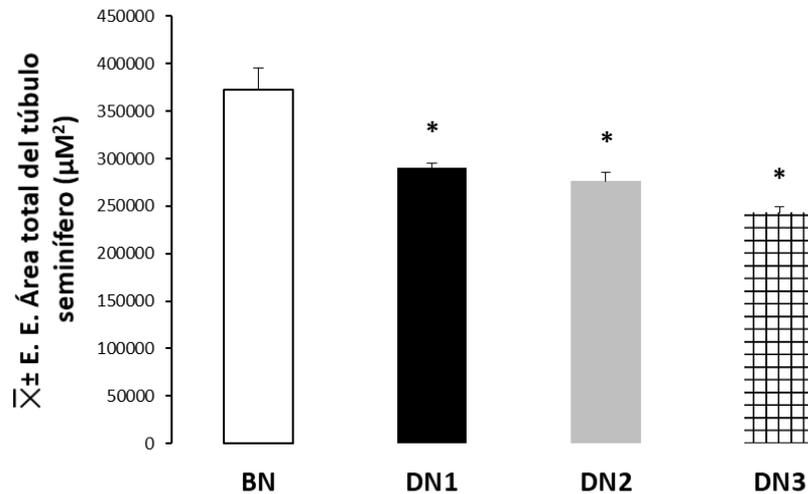


Figura 15. Área total del túbulo seminífero (30 túbulos por n) de testículo de ratas lactantes con desnutrición de primer grado (DN1, $n=6$), desnutrición de segundo grado (DN2, $n=6$), desnutrición de tercer grado (DN3, $n=6$) y bien nutridas (BN, $n=6$). Diferencias significativas al comparar el área total de los diferentes grados de DN con el grupo BN ($*p \leq 0.05$). Entre los grupos de desnutridas no se observó diferencia estadística.

10. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que el método de competencia de alimento resultó altamente eficiente, debido a que hubo una disminución en la ganancia de peso corporal en las ratas desnutridas en comparación con el peso de las BN y que fue muy claro a los 21 días de iniciado el proceso de DN. Esto confirma, que el método de desnutrición por competencia de alimento (Ortiz et al., 1996), provoca disminución en la cantidad de alimento que recibe cada una de las crías, lo que es suficiente para que en una camada se tengan individuos con diferentes grados de DN. Además de que la presencia de ratas con diferentes grados de DN podría deberse a procesos de lucha por la supervivencia del más fuerte.

Los diferentes grados de DN, fueron definidos de acuerdo a los criterios propuestos por Gómez y cols. (1956), quien utilizó el parámetro déficit de peso para la edad. Las ratas de una camada presentaban diferentes promedios de déficit de peso (17.38%, 31.16% y 50.33%) los que se establecieron comparando el peso corporal de las DN con el de las ratas BN. De acuerdo a Velazco-Brito y cols. (2013), el peso es el primer parámetro en afectarse durante la DN, así como también sugieren que el tejido muscular es una fuente de energía de primer orden del que el organismo en esa condición dispone. La presencia dentro de la misma camada de ratas con DN1, DN2 y DN3, evidencia que hay ratas que son más vulnerables al efecto de la competencia por alimento, lo que las conduce a tener mayor déficit de peso. Velazco-Brito y cols. (2013) proponen a su vez que, en animales de experimentación el crecimiento y desarrollo se debe valorar atendiendo a las variaciones del peso corporal y de los órganos, variables que no son independientes entre sí, sino que se mantienen muy estrechamente relacionadas durante la vida del animal.

La DN provoca en el organismo alteraciones anatómicas a nivel de todos los órganos, caracterizadas macroscópicamente por atrofia y disminución del peso. Estas alteraciones en la estructura condicionan de forma paralela una disminución de su capacidad funcional que contribuye a las complicaciones de la DN (Martín-Peña et al., 2007). Así, Velazco-Brito y cols. (2013) encontraron disminuido el peso corporal en ratas albinas Wistar macho con DN moderada, inducida durante 4 semanas a partir de los 28 días de nacidas, así como una disminución evidente del peso del

intestino delgado e hígado, lo que es similar a lo que se observó en este estudio. En el presente estudio se aprecia que el peso testicular de ratas lactantes con DN3 fue 2.1 veces menor en comparación con el grupo BN. Se observa una baja ganancia del peso testicular en la DN3, indicando que la DN tiene un fuerte impacto en el tamaño de este órgano, debido posiblemente a una disminución en la capacidad de proliferación celular, ya que no hay aporte suficiente de nutrientes o quizá existan procesos de estrés oxidante que induzcan a lisis o apoptosis. Nodera y cols. (2001) proponen que un incremento en los niveles de Fe y una deficiencia de Zn en timo y testículo resulta en la producción de ERO, desencadenando estrés oxidante, lo cual conlleva a la apoptosis y por consiguiente a cambios morfológicos tales como la atrofia, comprometiendo la función (Nodera et al., 2001; Tamayo-Meneses et al., 2008).

Por otro lado, la reducción en el peso testicular entre las ratas DN1 y DN2 fue similar, lo que podría deberse a que la cantidad de nutrientes recibidos es suficiente para mantener procesos de proliferación celular al mismo nivel en ambos grados de DN.

En este caso aparece por lo tanto el concepto de la selección de órganos, “el mayor enigma de la desnutrición”, ya que como lo menciona Krieger (1921) el sistema nervioso central al verse privado de energía, para preservar sus funciones y que el organismo se mantenga con vida, utiliza la materia orgánica de aquellos órganos menos necesarios, por lo que se establece una jerarquización, en donde los órganos que son indispensables para la vida, tienen prioridad. La intensidad de las funciones es una condición para establecer las preferencias de un órgano sobre otro

durante la DN. Por ejemplo, Miescher (1871) descubrió que en salmones sometidos a ayuno, los músculos de las aletas que más se utilizan se conservan en buen estado, mientras que los músculos menos necesarios se atrofian. Krieger concluye que, el bazo, el hígado, el páncreas, el corazón, los testículos, la tiroides y los riñones son los que sufren una mayor pérdida de peso, mientras que el cerebro y las suprarrenales apenas pierden peso (Martín-Peña et al. 2007). Lo que coincide con lo encontrado en este estudio respecto al testículo.

Por otro lado, se ha hablado de la toxicidad de las ERO, siendo el radical O_2^{\bullet} una de las primeras especies generadas por diversos sistemas celulares (Königsberg-Fainstein, 2008). La SOD es una metaloenzima que cataliza la dismutación del radical O_2^{\bullet} en oxígeno molecular y H_2O_2 , formando parte del mecanismo de defensa antioxidante celular.

Con respecto a la enzima con función antioxidante SOD CuZn se observó que la expresión de esta enzima se encuentra disminuida en las ratas DN con respecto a las BN, sin embargo, la expresión de esta enzima entre los diferentes grupos desnutridos fue similar. Se esperaría que esta disminución en la expresión de proteínas fuera gradual de acuerdo al grado de DN, no obstante, esta información permite suponer que la DN tiene un impacto similar en los testículos de las ratas lactantes que padecen esta condición, no importando el grado de DN.

Por otro lado, se esperaría algo similar con respecto a la actividad de la enzima en cuestión, a pesar de ello, la actividad de esta enzima está disminuida en las ratas de los tres grados de DN sin encontrar diferencias significativas entre los

grupos desnutridos. Observando que, bajo condiciones de DN, ya sea de primer, segundo o tercer grado, tanto la expresión como la actividad de esta enzima están disminuidas.

Esta disminución, podría deberse a la deficiencia en la ingesta de nutrientes, es decir, la ingesta apropiada de alimento provee tanto de macromoléculas (lípidos, carbohidratos y proteínas) como de micronutrientes (Zn, Cu, Fe, Se, Mg, vitaminas), los cuales son necesarios para el adecuado funcionamiento de enzimas (Jiang et al., 2016). Teniendo que minerales como Cu y Zn son importantes cofactores para la regulación de la expresión y actividad de la enzima antioxidante SOD CuZn, ya que la falta de Cu reduce la síntesis de ARNm de SOD CuZn, así como la inserción de este elemento en la enzima para formar la enzima activa. La deficiencia de Cu también reduce la expresión de la actividad SOD CuZn en tejidos humanos (Negi et al., 2012). Una reducción del Zn conduce a una disminución en la actividad de la enzima. La deficiencia de este cofactor en niños desnutridos conduce a la disminución en la actividad de SOD CuZn. Por lo tanto, los elementos Cu y Zn forman el grupo prostético de SOD CuZn y cualquier alteración en sus niveles afecta la expresión y actividad de la enzima (Aly et al., 2014).

La enzima CAT es esencial para mantener la homeostasis en la producción de ERO, metaboliza el H_2O_2 , por lo que alteraciones en su actividad y expresión conducirían a un desbalance en la producción de ERO. La actividad y expresión de esta proteína es comúnmente empleada como parámetro para detectar estrés oxidante en una amplia gama de organismos (Königsberg-Fainstein, 2008). La

expresión de la enzima en el presente estudio en los tres grupos con DN, se aprecia bastante reducida con respecto al grupo BN. No existieron diferencias significativas entre los diferentes grados de DN, lo que sugiere que existe una tendencia a disminuir la expresión de esta enzima y que la DN tiene un impacto sobre dicho parámetro en cualquier grado de DN. La disminución en los niveles de expresión de CAT también se podría deber a la falta de nutrientes, lo que traería como consecuencia una reducción en la fase de síntesis de esta proteína. Por otro lado, Gelain y cols. (2008) propusieron que el retinol, también conocido como vitamina A, tiene un efecto sobre la expresión y actividad de CAT. Al trabajar con concentraciones específicas de retinol en un cultivo celular, observaron que la expresión y actividad de CAT incrementa, por lo que plantean que el retinol tiene una función antioxidante, aparte de ser un componente esencial para diversas funciones fisiológicas, participando en la reproducción, visión nocturna y crecimiento; en la diferenciación celular, mantenimiento de epitelios y en la expresión génica (Gelain et al., 2008; Königsberg-Fainstein, 2008).

La CAT constituye una de las principales enzimas del sistema de defensa antioxidante y se piensa que su actividad y contenido deberían aumentar como respuesta al aumento de ERO (McCord y Fridovich, 1969). Sin embargo, en condiciones de DN, la actividad se observó claramente disminuida tanto en testículos de ratas con DN1, DN2 y DN3, presentando diferencias significativas comparativamente, con lo que ocurre en el testículo de ratas BN, esto muestra que los testículos son órganos altamente susceptibles a los efectos de la DN, no importando el grado. En un estudio de Velazco-Brito y cols. (2013), encontraron altos

déficits del peso corporal y en órganos como intestino delgado e hígado en ratas albinas Wistar macho con DN moderada inducida a partir de los 28 días de nacidos, también encontraron que la actividad de la enzima CAT en suero, disminuía, como en el presente estudio, en testículo.

La disminución de la actividad enzimática de CAT bajo el efecto de la DN, podría explicarse por un decremento en sus niveles de expresión, por la reducción en la síntesis de proteína, quizá exista la presencia de un efecto inhibitor sobre la CAT, provocado por la presencia de radicales como el radical O_2^{\bullet} (Patel et al., 2006), que a altas concentraciones inactiva el sitio activo de la enzima (Franceschutti et al., 1996). Por otro lado, Fang y cols. (2002) mencionan que una dieta deficiente en vitamina E (α -tocoferol) reduce la actividad de CAT en hepatocitos, situación similar que podría estar sucediendo en testículo. La vitamina E se encuentra en la fracción lipídica de numerosos alimentos, particularmente en los de origen vegetal ya que sólo las plantas son capaces de sintetizar tocoferoles, es decir, es una vitamina que al igual que la vitamina A se adquiere mediante alimentos naturales como las almendras, germen de trigo, cacahuete, aceite de cártamo, soya y maíz (Königsberg-Fainstein, 2008). Fang y cols. (2002) también hacen hincapié en que la coenzima tiamina, también conocida como vitamina B1 es esencial para la generación de NADPH, cofactor que está estrechamente unido a la enzima CAT, considerada necesaria para mantener la función enzimática de dicha proteína. Por lo tanto, si no se obtiene la tiamina mediante alimentos como carne de cerdo, huevo, vegetales de hoja verde, cereales, frutos secos y legumbres (Mollinedo-Patzi et al., 2014), que es

la única manera de obtenerla, la actividad de la enzima CAT se ve comprometida. La deficiencia de la vitamina B1 de las ratas desnutridas sería otra explicación para comprender lo que de alguna forma estaría aconteciendo en testículo de ratas lactantes desnutridas.

La disminución en el contenido y actividad enzimática de SOD CuZn sugiere que el O_2^{\bullet} no se estaría transformando eficazmente a H_2O_2 y O_2 . El O_2^{\bullet} puede reaccionar con centros de hierro-azufre (Fe-S) liberando el Fe que puede producir $\bullet OH$ con el H_2O_2 , ocasionando una excesiva producción de radicales libres (Königsberg-Fainstein, 2008). En el caso del H_2O_2 intracelular puede ser metabolizado principalmente por tres diferentes familias de enzimas antioxidantes: CAT, GPx y peroxirredoxinas (Prx) (Brigelius-Flohé et al., 2013).

La GPx-1 o citosólica en testículo de ratas lactantes se comportó de manera similar a SOD CuZn y CAT, observándose que la expresión en los tres grados de DN estuvo disminuida en comparación con las BN, sin presentar diferencia entre las DN1, DN2 y DN3. Estos datos sugieren que la DN tiene un impacto sobre la expresión de GPx citosólica en testículo de ratas lactantes no importando el grado de DN, debido posiblemente a la disminución en la cantidad de aminoácidos disponibles, por la insuficiente ingesta de nutrientes, indispensables para la síntesis de proteínas.

La GPx citosólica tiene una función antioxidante primaria en el metabolismo del H_2O_2 , por lo que al encontrar su expresión disminuida en los grupos experimentales, se esperaría que al igual que SOD CuZn y CAT, la actividad de GPx

estuviese reducida, sin embargo la actividad fue elevada en testículo de ratas lactantes con DN1, DN2 y DN3 con respecto a lo encontrado en testículo de ratas lactantes BN. Este resultado permitiría suponer que la enzima GPx estaría eliminando al H₂O₂ eficientemente bajo condiciones de DN no importando el grado. Esta eficiente funcionalidad puede deberse, de acuerdo a lo que Fong-Fong y cols. (2004) sugieren, que la enzima GPx-1 y GPx-2 tienen una mayor eficiencia enzimática y una mejor capacidad para operar bajo las condiciones extremas.

La DN implica deficiencia no sólo de macronutrientes como carbohidratos, grasas, proteínas, sino también micronutrientes como vitaminas y oligoelementos. Muchos sistemas de defensa antioxidante dependen de los micronutrientes. El organismo a causa de la susceptibilidad al insulto oxidante se provee naturalmente con un sistema antioxidante eficiente y elementos traza que son componentes principales de enzimas antioxidantes tales como el selenio (Se), el cual es un oligoelemento esencial como componente de la enzima GPx citosólica, ya que la enzima es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas y cada subunidad contiene una selenocisteína en el sitio activo, que participa en la reducción del peróxido (Negi et al., 2012). La deficiencia en la dieta de Se disminuye en un 90% la actividad de la enzima lo que resulta en daño a lípidos y disfunción mitocondrial (Fang et al., 2002). Asimismo, el gen que codifica para la GPx citosólica es sensible a las fluctuaciones en los niveles de Se, así que el RNAm de esta enzima es rápidamente degradado durante la falta de Se (Fong-Fong et al., 2004) viéndose disminuida, por lo tanto, la actividad. A pesar de la disminución de la expresión y actividad de la GPx por la deficiencia de Se y aminoácidos, se ha señalado que en la miocarditis, enfermedad

asociada a la deficiencia de Se, la enzima GPx citosólica protege (Fong-Fong et al., 2004), por lo que se podría considerar que en la DN, la GPx parece tener una eficiente actividad.

El GSH es un antioxidante no enzimático, que disminuye cuando existe estrés oxidante bajando la relación GSH/GSSG (Enggar-Fitri et al., 2016). En el presente trabajo, se observó una disminución de la relación GSH/GSSG en testículos de ratas lactantes desnutridas. Lo que indica que posiblemente se está empleando el GSH para controlar el estrés oxidante originado durante la DN, lo que contribuye a la existencia de un desequilibrio del balance redox dentro de las células del testículo de ratas lactantes.

El que haya una mayor proporción de la forma oxidada del glutatión en los grupos DN, se puede relacionar con la alta actividad de la enzima GPx total observada, ya que ello implicaría utilizar una mayor cantidad de GSH produciendo una mayor proporción de GSSG.

Otra posible explicación para la acumulación del GSSG en testículo de ratas lactantes DN es a un deficiente sistema de recuperación de la forma reducida, dicho de otra manera, tal vez el ciclo para regenerar al GSH, donde participa la enzima GR que usa NADPH como agente reductor, no se lleva a cabo de manera eficaz.

Por otro lado, se encontró que la expresión de la enzima GR en testículo de ratas lactantes DN está aumentada, lo que de cierta manera permitiría intuir que quizá la actividad de tal enzima podría encontrarse elevada, llevando a cabo el reciclaje de GSSG a GSH lo que posibilitaría a que la enzima GPx tenga una

actividad elevada y esta actividad elevada provocaría una concentración aumentada de GSSG. Otra posible explicación sería que a pesar de la expresión aumentada de esta enzima quizá su actividad se encuentre disminuida, con el precedente desbalance redox en el testículo de ratas lactantes desnutridas, lo que conlleva a un estrés oxidante y a daño celular. Asimismo, la concentración aumentada de GSSG podría deberse, también, a una disminución en la síntesis de novo de GSH, acción que llevan a cabo tanto la enzima γ -glutamil cisteína sintetasa como la enzima glutatión sintetasa. Sería conveniente evaluar la actividad de la enzima GR, así como de las enzimas que participan en la síntesis de novo, tanto en testículo de ratas BN como en testículo de ratas desnutridas.

Que la actividad de la enzima GPx total y la expresión de la enzima GR se encuentren elevados sugiere que son moléculas importantes en la protección de las células contra el daño oxidante. Alves y cols. (2003) han señalado que existe un incremento en la actividad de la enzima GPx total y de GR en individuos atletas, debido a un aumento en la formación de ERO por el aumento del consumo de oxígeno que se produce durante el ejercicio físico.

Estos resultados permiten deducir que el estrés oxidante presente durante la DN en testículo de ratas lactantes altera el estado redox de la relación GSH/GSSG, alteración que se ha visto puede afectar el balance de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular en este órgano. Ya que niveles disminuidos de GSH juegan un importante rol en la iniciación del proceso de apoptosis (Denzoin-Vulcano et al., 2013).

Es importante mantener el equilibrio redox ya que regula diversos procesos metabólicos intracelulares que incluyen la actividad enzimática, el transporte celular, transducción de señales y la expresión génica mediada por la transcripción de factores entre los que se destacan el activador de proteína (AP-1), el factor nuclear kappa- β (NF- κ -B) y el p53 (Königsberg-Fainstein, 2008).

Estos resultados se podrían relacionar con lo propuesto por Aly y cols. (2014), en cuanto a que una deficiencia dietética de antioxidantes nutricionales y minerales, en organismos desnutridos resultaría en la alteración del sistema de defensa antioxidante. Esto a su vez podría implicar eventos de oxidación en lípidos, proteínas y ADN generando daño oxidante en las células comprometiendo su función.

La expresión y actividad enzimática de SOD CuZn y CAT disminuidas indica que las DN tienen un sistema de defensa antioxidante disminuido, a pesar de encontrar una actividad de la enzima GPx total aumentada, lo cual no fue suficiente para evitar la generación de un desbalance en el equilibrio ERO/antioxidantes, que llevaría a procesos de estrés oxidante. La presencia de estrés oxidante en testículo de ratas lactantes DN se pudo inferir al evaluar niveles de lipoperoxidación (LPO).

Aunque el malondialdehído (MDA), óxido nítrico (ON) y el ácido úrico se usan con frecuencia como marcadores biológicos confiables del estrés oxidante (Souki et al., 2007) ninguno de ellos ha sido evaluado en testículos de ratas lactantes desnutridas.

La LPO en este estudio se evaluó mediante el análisis de la concentración de MDA. Los grupos con DN1, DN2 y DN3 presentaron niveles de LPO más elevados

que el grupo BN, sin presentar diferencia entre las DN1, DN2 y DN3. Efecto provocado posiblemente debido a la falta de nutrientes que recibió la rata lactante DN para mantener un sistema de defensa antioxidante óptimo.

Estos resultados sugieren que la DN está asociada con una disminución del sistema antioxidante o con un incremento en la producción de las ERO que estimulan la LPO, disminución que se relaciona con la baja expresión y actividad de la enzima SOD CuZn y CAT, lo que impidió que lleven a cabo eficientemente su función, a pesar de encontrar una actividad aumentada de la enzima GPx, lo cual no es suficiente para impedir la producción de ERO.

Fang y cols. (2002), establecieron que la deficiencia en la dieta de vitamina E, por ejemplo, reduce la actividad de CAT, lo que induce LPO, que puede causar desórdenes neurológicos y cardiovasculares, así como también neurodegenerativos y quizá hasta desórdenes en la reproducción.

Se considera que la LPO ocasiona cambios en la composición química, y deterioro en la organización ultraestructural de las membranas celulares, disminuyendo la fluidez de las mismas, alterando su permeabilidad e inactivando enzimas y receptores ligados a la membrana (Paparella et al., 2015).

Las ERO son generadas durante procesos fisiológicos normales, incluyendo el metabolismo aerobio y se sabe que tienen un papel dual en los sistemas biológicos resultando en un efecto benéfico o desfavorable. Bajas concentraciones o la exposición transitoria a ERO inducen proliferación celular y regulan la activación de varias vías de señalización. Sin embargo, a altas concentraciones, las ERO son

mediadores importantes del daño, ya que éstas pueden oxidar proteínas, y como ya se presentó, también oxidar lípidos. La oxidación de proteínas es un proceso de suma importancia debido a que son el grupo más grande de macromoléculas celular. La carbonilación de proteínas es el biomarcador más comúnmente utilizado para identificar proteínas oxidadas, asimismo es considerado un biomarcador de estrés oxidante (Baraibar et al., 2013), y fue este marcador el que se evaluó en testículo de ratas lactantes DN y BN. La carbonilación se refiere a la aparición de grupos carbonilo en las cadenas laterales de las proteínas, grupos aldehídos y cetonas (Díaz-Acosta et al., 2006). En el presente trabajo se observó una diferencia significativa al comparar el contenido de grupos carbonilo en proteínas de testículo de ratas lactantes DN en relación al contenido hallado en testículo de ratas BN. No encontrando diferencia entre ratas con DN1, DN2 y DN3. Estos hallazgos demuestran que la DN es una condición que conduce a la existencia de daño en biomoléculas, como en lípidos y proteínas. Se esperaría que este daño en proteínas fuese gradual de acuerdo al grado de DN, sin embargo, se observa que la DN tiene un fuerte impacto en testículo de ratas lactantes no importando el grado de DN.

La oxidación de proteínas puede originarse por la acción directa de ERO o por la reacción indirecta con productos secundarios del estrés oxidante (Baraibar et al., 2011). Por ejemplo, en este estudio se observó que bajo el efecto de la DN existe una disminución en la expresión y actividad enzimática de proteínas con función antioxidante, SOD, CAT, así como una disminución en la expresión y aumento en la actividad de GPx total. Por lo que podría aumentar la generación del radical $\bullet\text{OH}$, causante de la oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos o de la

escisión del esqueleto de la proteína, resultando en la formación de grupos carbonilo. Especialmente los carbonilos son producidos en las cadenas laterales de los aminoácidos, particularmente en los residuos de prolina, arginina, lisina y treonina, los cuales son oxidados a derivados aldehídos o cetonas. Se ha documentado que la mayoría de los carbonilos formados en las proteínas mediante la oxidación catalizada por cationes metálicos son el semialdehído glutámico derivado de la arginina y prolina, el semialdehído 2-aminoadípico derivado de la lisina y el ácido 2-amino-3-cetobutírico derivado de la treonina (Havelund et al., 2017).

La reacción indirecta con productos secundarios del estrés oxidante puede dar lugar a proteínas carboniladas. En este trabajo se analizaron los niveles de LPO, encontrando elevada la concentración del MDA en testículo de ratas lactantes de DN comparados con las BN, lo que se relaciona con daño oxidante en lípidos. El MDA es considerado producto y marcador de la LPO y adicionalmente ocasiona modificaciones en los residuos de histidina, cisteína y lisina mediante la formación de aductos, añadiendo grupos carbonilo a las proteínas, produciendo de esta manera proteínas carboniladas (Baraibar et al., 2013).

Las consecuencias de la oxidación de proteínas con frecuencia resultan en la disminución de la actividad enzimática, menor estabilidad térmica, incremento de la hidrofobicidad, así como también hay cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a la proteólisis. Las proteínas oxidadas son degradadas por el proteosoma 20S, sin embargo, proteínas altamente dañadas se vuelven resistentes a la proteólisis y además estas proteínas pueden actuar como

inhibidores de la actividad del proteosoma. Bajo estas condiciones, la disminución de la actividad del proteosoma puede, por tanto, dar como resultado una eliminación tardía de las proteínas oxidadas y contribuir a una oxidación aumentada de la proteína en estado estacionario que conduce a la acumulación de proteínas oxidadas (Baraibar et al., 2013). Los resultados de esta investigación indican que las proteínas presentes en testículo de ratas lactantes desnutridas, se afectan durante la DN lo que podría conducir a una disfunción celular que lleve a comprometer la función del órgano.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se propone que la DN es una condición que, en testículo de ratas lactantes determina la disminución en la actividad del sistema de defensa antioxidante enzimático, induciendo a un deterioro de la membrana de las células y sobre las proteínas, lo que permite suponer la presencia de estrés oxidante, en un órgano que tiene la función de la espermatogénesis, como la producción y secreción de hormonas. Con la finalidad de corroborar la presencia de estrés oxidante en testículo, se evaluó daño a biomoléculas y se analizó si existían cambios morfométricos en el testículo de ratas lactantes DN con respecto al testículo de ratas lactantes BN.

Comúnmente para evaluar la morfología en testículos, no importando las condiciones a las que esté sometido, es el área donde se pueden encontrar cambios a nivel de los túbulos seminíferos. Estructura considerada como la unidad funcional del testículo, ya que en ella se lleva a cabo el desarrollo de las células germinales,

proceso que se divide en cuatro etapas: mitosis, meiosis, espermiogénesis y espermiación, fases que pertenecen al ciclo del epitelio seminífero. Cada paso del ciclo se caracteriza por arreglo particular de las células germinales diferenciadas: espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas (Lie et al., 2009). El área total del túbulo seminífero es un parámetro comúnmente utilizado en organismos en edad reproductiva, siendo este trabajo, hasta el momento, el primero en evaluar el área total del túbulo seminífero de testículo de ratas lactantes DN y BN a la edad de 21 días. Se considera al área total del túbulo seminífero un parámetro morfométrico, ya que la morfometría se refiere al análisis cuantitativo de la forma, un concepto que abarca el tamaño y la forma, por lo tanto, la morfometría se utiliza para detectar cambios en la forma y tamaño (Loy, 2007).

El área total de los túbulos seminíferos se estimó analizando el área de 10 túbulos de la parte craneal, 10 de la parte media y 10 túbulos de la parte caudal del corte histológico de testículo. En la fotomicrografía que se presenta en la Figura 14 se aprecian los túbulos seminíferos tanto de testículos de ratas lactantes BN (A) como de testículos de ratas con diferente grado de DN (B, C y D) (10x). Se distingue de manera cualitativa una disminución del tamaño del túbulo seminífero en cada uno de los diferentes grados de DN comparado con el tamaño del túbulo seminífero del grupo control. Ahora bien, de manera cuantitativa, el área del túbulo de testículo de rata con DN1, DN2 y DN3 es menor de acuerdo a la comparación respecto al túbulo de testículo de rata BN de la misma edad. Lo que podría indicar que el estrés oxidante durante la DN está relacionado con la reducción del área total del túbulo seminífero y además esta disminución no se presenta de manera gradual de acuerdo

al grado de DN, como se esperaría, sino que hay disminución desde la DN1 y además al no presentar diferencias significativas entre grupos experimentales se propone que posiblemente el estrés oxidante en la DN tiene un impacto similar sobre este parámetro no importando el grado de DN.

Algo que se podría relacionar con los cambios observados en los túbulos seminíferos es la LPO, que estuvo elevada en testículos de ratas lactantes con diferente grado de DN y es posiblemente la que contribuyó a la disminución del área del tubo seminífero. El daño en las membranas celulares según Jedlinska-Krakowska y cols. (2006) causa desestabilización en la membrana de las células de Sertoli, las cuales durante el periodo infantil están sometidas a un proceso de proliferación celular (Vilar, 1970). La proliferación podría verse interrumpida por el efecto de la LPO, asimismo esta desestabilización de la membrana de la célula de Sertoli podría estar implicada como se ha señalado, en la pérdida de la unión célula de Sertoli-células germinales conduciendo a la pérdida de espermatogonias y espermatocitos primarios, principales tipos celulares presentes a los 21 días de edad en testículos de ratas Wistar lactantes (Arteaga et al., 2013). Lo anterior influiría también en la disminución del área del tubo seminífero en testículo de los grupos experimentales. Se podría considerar que debido a la disminución en la expresión y actividad de la enzima SOD CuZn, las células de Sertoli no pueden reparar el daño causado por ERO y por lo tanto son especialmente propensas a los daños inducidos por el radical superóxido, promoviendo la LPO dañando tanto a las células de Sertoli como a las células germinales. También sería posible que en el testículo de las ratas DN se tuvieran altas concentraciones de H_2O_2 que se sabe inhibe el ciclo celular, lo

que origina una disminución en la división celular de las células germinales y de Sertoli, así como también, altas concentraciones de H_2O_2 induce apoptosis lo que eventualmente conlleva a la muerte celular de las células germinales originando la disminución del epitelio seminífero.

La disminución del área del túbulo podría estar relacionada con una reducción de la proliferación de las células que conforman el túbulo seminífero, ya que se ha visto que bajo restricción calórica se disminuye la concentración de hormonas, como la testosterona, induciendo la reducción de la proliferación de células germinales (Valenzuela-Estrada et al., 2014). Otra posible explicación podría deberse a la presencia de muerte celular, ya que si la oxidación es moderada puede desencadenar apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar necrosis. Por lo que se considera importante e interesante evaluar parámetros que permitan explicar con certeza la causa de la disminución del área del túbulo durante la DN. De manera que se propone identificar procesos de muerte celular, como apoptosis y necrosis, así como evaluar concentración de testosterona. Asimismo, es fundamental averiguar si la gónada durante la etapa reproductiva es funcional a pesar del daño oxidante sufrido durante la lactancia bajo el efecto de la DN, por lo tanto, se propone determinar la funcionalidad espermática y la capacidad reproductiva, para futuros trabajos.

11. CONCLUSIONES

El efecto de la desnutrición experimental en testículo de ratas lactantes de 21 días de edad, mostró una disminución del sistema de defensa antioxidante enzimático lo que estuvo asociado con un incremento en el daño oxidante en biomoléculas como son lípidos y proteínas, daño que posiblemente se vio reflejado en la disminución del área del túbulo seminífero, lo que probablemente permitirá que la función del testículo se vea comprometida. Algo importante de señalar es que todos los parámetros evaluados se observaron afectados desde el primer grado de desnutrición, lo que indica que el testículo es un órgano altamente susceptible a los efectos de la desnutrición.

12. REFERENCIAS

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Agudelo, G. M., Cardona, O. L., Velásquez, C. M., Parra, B. E., Acosta, M., Morales, G. E., Bernal, C. A., y Burgos, L. C. (2006). Concentración sérica de cobre libre y ceruloplasmina en niños con desnutrición aguda grave antes de iniciar la terapia nutricional y al momento de recuperar el apetito en turbo, Antioquia, Colombia. *Revista Chilena de Nutrición*, 33(2), 1-16.
- Albrecht, R., y Pélissier, M. A. (1995). About the oxidative stress status in children with Kwashiorkor. *Food and Chemical Toxicology*, 33(12), 1081-1083.
- Almaguer-Gotay, D., y Almaguer-Mederos, L. E. (2006). Estrés oxidativo y muerte neuronal. Una visión biomolecular. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 7(4), 330-337.
- Alves, A. A., Pereira da Silva, L., Macedo, D. V., y Kubota, L. T. (2003). Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. *Analytical Biochemistry*, 323, 33-38.
- Aly, G. S., Shaalan, A. H., Mattar, M. K., Ahmed, H. H., Zaki, M. E., y Abdallah, H. R. (2014). Oxidative stress status in nutritionally stunted children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*, 62, 28-33.
- Arteaga-Silva, M., Viguera-Villaseñor, R. M., Retana-Márquez, S., Hernández-González, M., Bonilla-Jaime, H., Guzmán-García, X., y Contreras-Montiel, J. L. (2013). Testosterone levels and development of the penile spines and testicular tissue during the postnatal growth in Wistar rats. *Advances in Sexual Medicine*, 3, 1-9.

- Ashour, M. N., Salem, S. I., El-Gadban, H. M., Elwan, N. M., y Basu, T. K. (1999). Antioxidant status in children with protein-energy malnutrition (PEM) living in Cairo, Egypt. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52(8), 669-673.
- Autret, M., y Behar, M. (1954). Le Syndrome de Polycarence de L'enfance en Amerique Centrale (Kwashiorkor). *Bull Org mond Santé. Bull Wld Hlth Org*, 11, 891-966.
- Baraibar, M. A., Hysewicz, J., Rogowska-Wrzesinska, A., Ladouce, R., Roepstorff, P., Mouly, V., y Friguet, B. (2011). Oxidative stress-induced proteome alterations target different celular pathways in human myoblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 1522-1532.
- Baraibar, M. A., Ladouce, R., y Friguet, B. (2013). Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during celular ageing. *Journal of proteomics*, 92, 63-70.
- Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J. M., y Magistrini, M. (2001). Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, 68, 181-190.
- Bengoa-Lencada, J. M. (2003). Historia de la nutrición en salud pública. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 16(2), 85-96.
- Benítez-Zequeira, D. E. (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25(2), 1-8.

- Bosnak, M., Kelekci, S., Kocyigit, Y., Sen, V., y Ece, A. (2010). Oxidative stress in marasmic children relationships with leptin. *European Journal of General Medicine*, 7, 1-8.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brigelius-Flohé, R., y Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3289-3303.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195-203.
- Burk, R. F., Pearson, W. N., Wood, R. P., y Viteri, F. (1967). Blood selenium levels and in vitro red blood cell uptake of Se in kwashiorkor. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 20(7), 723-733.
- Burton, G. J., y Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology*, 25(3), 287-299.
- Calvin, H. I. (1981). Comparative labelling of rat epididymal spermatozoa by intratesticularly administered $^{65}\text{ZnCl}_2$ and $[^{35}\text{S}]$ cysteine. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61, 65-73.
- Cisneros, R., Oré, R., Arnao, I., y Suárez, S. (2011). Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii walp*). *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(2), 107-111.

- Denzoin-Vulcano, L. A., Soraci, A. L., y Tapia, M. O. (2013). Homeostasis del glutati3n. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(3), 529-539.
- De Zwart, L. L., Meerman, J. H .N., Commandeur, J. N., y Vermeulen, N. P. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and inhumans. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(1-2), 202-226.
- DÍaz-Acosta, A. E., y Membrillo-Hernández, J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidaci3n de proteínas por carbonilaci3n en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(1), 34-44.
- Encuesta Nacional de Alimentaci3n y Nutrici3n en el Medio Rural. (1996). 1, 51-69.
- Enggar-Fitri, L., Iskandar, A., Wahyu-Sardjono, T., Ditya-Erliana, U., Rahmawati, W., Candradikusuma, D., Budi-Saputra, U., Suhartono, E., Setiawan, B., y Sulistyaningsih, E. (2016). Plasma glutathione and oxidized glutathione level, glutathione/oxidized glutathione ratio, and albumin concentration in complicated and uncomplicated falciparum malaria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 646-650.
- ENSANUT. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrici3n. *Instituto Nacional de Salud Pública*. Pp 1-4.
- Fang, Y. Z., Yang S., y Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- FAO, FIDA, y PMA. (2015). El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2015. Cumplimiento de los objetivos internacionales para 2015 en relaci3n con el hambre: balance de los desiguales progresos. *Roma. FAO*.

- Farris, M. W., y Reed, D. J. (1987). High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivates. *Methods in Enzymology*, 143, 101-109.
- Flohé, L., y Günzler, W. A. (1984). Assays for glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114–120.
- Flores-Huerta, S. (1995). Desnutrición Energético-Proteínica. Nutriología Médica. México Editorial Médica Panamericana. Pp 151-67.
- Fong-Fong, C., Esworthy, S., y Doroshov, J. H. (2004). Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Serial Review: Reactive Oxygen Species in Immune Responses*, 36(12), 1481-1495.
- Franceschutti, D., Baldwin, J., Lee, L., y Mutus, B. (1996). Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site. *Protein engineering*. 9, 189-194.
- Frenk, S. (2009). Federico Gómez, el pionero. *Revista Mexicana de Pediatría*, 76(3), 146-148.
- Gavia-García, G., González-Martínez, H., Miliar-García, A., Bonilla-González, E., Rosas-Trejo, M. A., Königsberg, M., Nájera-Medina, O., Luna-López, A., y González-Torres, M. C. (2015). Oxidative damage and antioxidant defense in thymus of malnourished lactating rats. *Nutrition*, 31, 1408-1415.
- Gelain, D. P., De Bittencourt-Pasquali, M. A., Zanotto-Filho, A., De Souza, L. F., De Oliveira, R. B., Klamt, F., y Fonseca-Moreira, J. C. (2008). Retinol increases

- catalase activity and protein content by a reactive species-dependent mechanism in Sertoli cells. *Chemico-Biological Interactions*, 174, 38-43.
- Golden, M. H., y Ramdath, D. (1987). Free radicals in the pathogenesis of Kwashiorkor. *Proceedings of the Nutrition Society*, 46(1), 53-68.
 - Gómez, F., Ramos-Galván, R., Frenk, S., Cravioto, J., Chávez, R., y Vázquez, J. (1956). Mortality in second and third degree malnutrition. *The Journal of Tropical Pediatrics*, 2, 77-83.
 - Gómez-Santos, F. (1946). Desnutrición. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 45, 576-582.
 - Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52(8 Pt 1), 253-265.
 - Hansberg, T., W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*, 26, 19-54.
 - Havelund, J. F., Wojdyla, K., Davies, M. J., Jensen, O. N., MØller, I. M., y Rogowska-Wrzesinska, A. (2017). A biotin enrichment strategy identifies novel carbonylated amino acids in proteins from human plasma. *Journal of Proteomics*.
 - Jacob, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15, 755-766.
 - Jedlinska-Krakowska, M., Bomba, G., Jakubowski, K., Rotkiewicz, T., Jana, B., y Penkowski, A. (2006). Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats, *Journal of Reproduction and Development*, 52(2), 203-209.

- Jiang, J., y Xiong, Y. L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science*, 120, 107-117.
- Königsberg-Fainstein, M. (2008). *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. México, D. F.: El Manual Moderno.
- Krieger, M. (1921). Ueber die Atrophie der menschlichen Organe bei Inanition. *Z Angew Anat. Konstitutionsl*, 7, 87-134.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, J., Lenz, A. G., Ahn B. W., Shaltiel, S., y Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464-478.
- Lie, P., Cheng, Y., y Mruk, D. (2009). Coordinating cellular events during spermatogenesis: a biochemical model. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(7), 366-373.
- Loy, A. (2007). Morphometrics and theriology homage to marco corti. Hystrix, the Italian. *Journal of Mammalogy*, 18(2), 115-136.
- Lubos, E., Loscalzo, J., y Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signalin*, 15, 1957-1997.
- Martín-Peña, G., y Paredes de Dios, N. (2007). Clásicos de nutrición. Comentario al artículo "Sobre la atrofia de los órganos durante la inanición". *Nutrición Hospitalaria*, 22(1), 112-123.
- Martínez-Sámano, J., Torres-Durán, P. V., y Juárez-Oropeza, M. A. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la

esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de Educación Bioquímica*, 30(2), 56-67.

- Matheus-Cortéz, N., Mendoza, C., Castro, C., y López-Ortega, A. (2009). Restricción Nutricional y su relación con Lipoperoxidación y Respuesta Antioxidante Hepáticas. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 14(1), 33-42.
- McLaren, D. S., Shirajian, E., Loshkajian, H., y Shadarevian, S. (1969). Short-term prognosis in protein-calorie malnutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 22(7), 863-870.
- McCord, J. M., y Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Mehta, N. M., Corkins, M. R., Lyman, B., Malone, A., Goday, P. S., Carney, L., Monczka, J. L., Plogsted, S. W., Schwenk, W. F., y American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. (2013). Defining pediatric malnutrition: A paradigm shift toward etiology-related definitions. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 37(4), 460-481.
- Miescher, F. (1871). Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Med. Chem. Unters.* 4, 441-460.
- Mollinedo-Patzi, M. A., y Carrillo-Larico, K. J. (2014). Absorción, excreción y metabolismo de las vitaminas hidrosolubles. *Revista de Actualización Clínica Médica*, 41, 2146-2150.
- Negi, R., Pande, D., Karki, K., Kumar, A., Khanna, R. S., y Khanna, H. D. (2012). Trace elements and antioxidant enzymes associated with oxidative stress in the

- pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation. *Clinical Nutrition*, 31, 946-950.
- Nodera, M., Yanagisawa, H., y Wada, O. (2001). Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats. *Life Sciences*, 69, 1639-1649.
 - NORMA Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
 - OMS. (2016). *Directriz: actualizaciones sobre la atención de la desnutrición aguda severa en lactantes y niños*. Organización Mundial de la Salud (Ginebra).
 - Ortiz, R., Cortés, E., Pérez, L., González, C. y Betancourt M. (1996). Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. *Medical Science Research*, 24(12), 843-846.
 - Pajuelo, T. M., Yamada, A. L., Florentini, R. E., y Carranza, A. E. (2004). Enzimas antioxidantes en cerebro de cobayos nativos de las grandes alturas. *Facultad de Farmacia y Bioquímica*, 2, 18-23.
 - Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., y Caparrini, A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 154, 536–541.
 - Paparella, C. V., Pavesi, A. B., Feldman, R. N., y Bouvet, B. R. (2015). Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. *Archivos de Medicina Interna*, 37(1), 7-14.
 - Parra-Gómez, L., Téllez-Girón, J., y Escobar-Briones, C. (2003). La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. Facultad de Medicina, UNAM. 46, 32-36.

- Patel, N. J., Gujarati, V. B., Gouda, T. S., Venkat R. N., Nandakumar, K., y Shantakumar, S. M. (2006). Antidiarrhoeal activity of alcoholic and aqueous extracts of roots of *Tylophora indica* (Wight & Arn.) in rodents. *Pharmacologyonline*, 1, 19-29.
- Prudhon, C. (2002). Evaluación y tratamiento de la desnutrición en situaciones de emergencia: manual de tratamiento terapéutico de la desnutrición y planificación de un programa nutricional. Editorial Icaria. Barcelona, España. Pp. 28-47.
- Realpe-Muñoz, A. M. (2013). Desnutrición severa tipo Kwashiorkor. *Revista Gastrohnutp*, 15(1), 20-26.
- Ribas, V., García-Ruiz, C., y Fernández-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5(151), 1-19.
- Rojkind, M., Domínguez, R. J., Nieto N., y Greenwel, P. (2002). Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59. 1-20.
- Shaaban, S. Y., Nassar, M. F., Ibrahim, S. A., y Mahmoud, S. E. (2002). Impact of nutritional rehabilitation on enzymatic antioxidant levels in protein energy malnutrition. *La Revue de Santé de la Méditerranée Orientale*, 8(2/3), 290-296.
- Smith, F. R., Goodman, D. S., Zaklama, M. S., Gabr, M. K., Maraghy, S., y Patwardhan, V. N. (1973). Serum vitamin A, retino-binding protein and prealbumin concentration in protein-calorie malnutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 26, 973-987.
- Souki, A., Cano, C., Mengua, I. E., García, D., Torres, D., Almarza, J., Urdaneta, Y., León, L., Chávez, Z., Molero, E., Medina, M., y Amel, I. A. (2007). Marcadores

- biológicos de estrés oxidativo. Distribución por edad y sexo de las concentraciones basales de MDA, NO y ácido úrico en niños y adolescentes de Maracaibo-Venezuela. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 26(2), 23-28.
- Tamayo-Meneses, L., Rodríguez-Vargas, A., y Quiroga-Chui, M. (2008). Desnutrición mixta grave complicada: Actualización del tratamiento a propósito de un caso. *Revista-Cuadernos*, 53(1), 60-67.
 - Torres, C. A., Perales, M. I., Zúñiga, H., y Carranza, E. (2004). Niveles de malondialdehído y catalasa en tejidos de cobayos nativos de la altura. *Revista de la Facultad de Farmacia y Bioquímica*, 1, 28-33.
 - Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
 - UNICEF. (2013). *Improving child nutrition. The chievable imperative for global progress*. New York, NY. USA: UNICEF.
 - Urroz, C. (1991). *Elementos de Anatomía y Fisiología Animal*. Ed. EUNED. Costa Rica. Pp. 191-195.
 - Valenzuela-Estrada, M., Parra, R., Velasco-Martin, J. P., Núñez, H., Regadera, J., y Bustos-Obregón, E. (2014). Efecto de la maca peruana (*Lepidium meyenii*) y de la melatonina sobre el desarrollo testicular del ratón expuesto a hipoxia hipobárica continua. *International Journal of Morphology*, 32(1), 70-78.

- Velásquez-Rodríguez, C. M., Parra-Sosa, B., Morales-Mira, G., Agudelo-Ochoa, G., Cardona-Henao, O., Bernal-Parra, C., Burgos-Herrera, L., y Betancur-Acosta, M. (2007). Hierro libre, transferrina y ferritina séricas en desnutrición aguda grave. *Anales de Pediatría*, 66(1), 17-23.
- Velazco-Brito, L., González-Santiestebán, A., Pérez-Trujillo, J., y Méndez-Herrera, M. (2013). Modificaciones de indicadores somatométricos asociados a la defensa antioxidante en ratas renutridas tras desnutrición moderada. *Revista de Ciencias Médicas. La Habana*, 19(1), 101-116.
- Venereo, G. J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31, 126-133.
- Vilar, O. (1970) *Histology of the Human Testis from Neonatal Period to Adolescence*. Advances in experimental medicine and biology. Boston, M. A.: Springer.
- Williams, C. D. (1933). A nutritional disease of child-hodd asociated with a maize diet. *Archivies of Disease in Childhood*, 58, 550-560.
- Zambrano, E., Rodríguez-González, G. L., Guzmán, C., García-Becerra, R., Boeck, L., Díaz, L., Menjivar, M., Larrea, F., y Nathanielsz, P. W. (2005). A maternal low protein diet during pregnancy y lactation in the rat impairs male reproductive development. *Journal of Physiology*, 563(1), 275-284.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00183

Matrícula: 2153803897

DAÑO OXIDANTE EN TESTÍCULO
DE RATAS LACTANTES
DESNUTRIDAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 14 del mes de diciembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
DRA. ORALIA NAJERA MEDINA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: MARIA DE LOS ANGELES ROSAS TREJO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

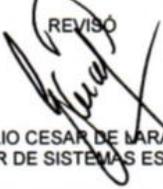
Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



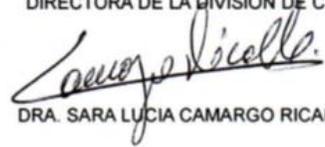

MARIA DE LOS ANGELES ROSAS TREJO
ALUMNA

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARANSASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



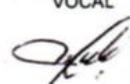
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICARDE

PRESIDENTA



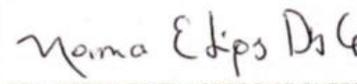
DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL



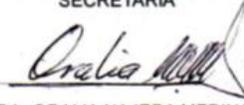
DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

VOCAL



DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

SECRETARIA



DRA. ORALIA NAJERA MEDINA