



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO AL ADN POR ESTRÉS OXIDANTE ASOCIADO A  
LA EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS ARNm DE GENES QUE PARTICIPAN EN LA  
REGULACION DE LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO  
(ERO) EN TIMO DE RATAS 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. Graciela Gavia García**

**DIRECTORA:**

**Dra. María Cristina González Torres UAM-I**

**ASESORES:**

**Dra. Oralia Nájera Medina UAM-X**

**Dr. Ángel Miliar García ESM IPN**

**MÉXICO, D.F**

**DICIEMBRE DE 2012**

El presente trabajo de Investigación fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Superior de Medicina en el Instituto Politécnico Nacional.

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.

Para la realización de la Maestría en Biología Experimental se contó con el apoyo de CONACyT mediante la beca con número de registro 248836 y la beca otorgada por la Universidad Autónoma Metropolitana y el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal para la comunicación idónea de resultados.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la Tesis titulada: **“CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO AL ADN POR ESTRÉS OXIDANTE ASOCIADO A LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm DE GENES QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) EN TIMO DE RATAS DESNUTRIDAS”** que presentó Graciela Gavia García el día 6 de diciembre del 2012.



---

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



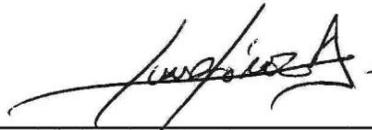
---

**SECRETARIO**  
Dr. Angel Miliar García  
*Sección de Estudios de Posgrado e Investigación*  
*Escuela Superior de Medicina*  
*Instituto Politécnico Nacional*



---

**VOCAL**  
Dra. Mina Konigsberg Fainstein  
*Departamento de Ciencias de la Salud*  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*



---

**VOCAL**  
Dr. Armando Luna López  
*Departamento de Investigación Básica*  
*Instituto Nacional de Geriátría*

## **COMITÉ TUTORAL**

### **DIRECTORA**

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

### **ASESORES**

Dra. Oralia Nájera Medina  
*Departamento de Atención a la Salud*  
*División de Ciencias Biológicas y de la Salud*  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco*  
*onajera@correo.xoc.uam.mx*

Dr. Ángel Miliar García  
*Sección de Estudios de Posgrado e Investigación*  
*Escuela Superior de Medicina*  
*Instituto Politécnico Nacional*  
*miga67@prodigy.net.mx*

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Cristina** por sus consejos y por el gran apoyo brindado en mi formación académica y personal, que me ha enseñado que cualquier aspecto de la vida siempre presenta desafíos, pero lo más importante es saber que método utilizar para enfrentarlos. Gracias por darme la oportunidad de realizar una de mis metas.

A la **Dra. Haydeé González** por tantas horas de trabajo compartidas, por su disposición en todo momento, por ser uno de los más grandes apoyos durante la realización de este trabajo, por ayudarme a cumplir las metas que me he propuesto y por brindarme su gran amistad.

A la **Dra. Oralia** por sus valiosos comentarios y recomendaciones para alcanzar los objetivos de este trabajo y por estar siempre dispuesta a apoyarme.

Al **Dr. Ángel Miliar** por sus aportaciones y comentarios. Gracias por estar siempre dispuesto a brindarme su apoyo y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al **Dr. Miguel Betancourt** por sus atinados comentarios y por brindarme la oportunidad de integrarme a su laboratorio y aprender en un ambiente de respeto.

A la **Dra. Mina** y al **Dr. Armando** por sus grandes aportaciones y experiencia que sirvieron para enriquecer la realización de este trabajo.

Al **Dr. Edmundo Bonilla** por sus consejos, su tiempo y el apoyo que me brindó en la realización de este trabajo.

A la **Dra. Edith Cortés** por el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

## DEDICATORIAS

A **David** mi esposo, por compartir su vida conmigo, por enseñarme que aunque siempre existan retos éstos son más fáciles de superarlos juntos, porque hemos aprendido al paso del tiempo que nuestros deseos personales son compartidos y ahora miramos en la misma dirección. TE AMO.

A mi pequeño **David**, por ser lo más valioso, la mejor experiencia y el mejor regalo que la vida me pudo dar, gracias por tu comprensión, por ser el motor que me impulsa a cada momento y por darme momentos de alegría inigualables.

A mis padres, **Graciela y Guillermo** que lo dan todo a cambio de nada, que siempre me han motivado a cumplir mis sueños, por confiar en mí, por tener siempre una palabra de aliento, por ser los mejores maestros de vida. Simplemente no hay palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos **Guillermo y Omar** por compartir y crecer conmigo, por su apoyo en todos los aspectos de mi vida. Estoy muy orgullosa de Ustedes.

A mis suegros **Esther y Francisco** por apoyarme en esta etapa de mi vida ya que han sido sin duda, parte fundamental en este logro. Gracias por siempre alentarnos a seguir adelante.

A mis cuñadas **Alejandra y Adalit** por su apoyo incondicional y por estar siempre dispuestas a apoyarme. Las quiero mucho.

A mis sobrinas **Daniela y Valeria** que con sus risas y travesuras siempre le dan alegría a mi vida.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
Índice de figuras	9
Índice de cuadros	9
Resumen	10
Abstract	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
1.1 Marco Teórico	12
1.1.1 Generalidades de la desnutrición	12
1.1.1.1 Marasmo	14
1.1.1.2 Kwashiorkor	14
1.1.1.3 Epidemiología de la desnutrición	15
1.1.1.4 Causas que producen la desnutrición	16
1.1.1.5 Efecto de la desnutrición a nivel del material genético	17
1.1.1.6 Genómica nutricional	18
1.1.2 Timo	20
1.1.2.1 Timo y desnutrición	21
1.1.3 Estrés oxidante	22
1.1.3.1 Sistemas de defensa antioxidante	23
1.1.3.2 Superóxido dismutasa	24
1.1.3.3 Glutación peroxidasa	26
1.1.3.4 Catalasa	27
1.1.3.5 Estrés oxidante y daño al ADN	28
1.1.3.6 p53 y estrés oxidante	30
1.1.3.7 Nrf2 y estrés oxidante	33
<b>2. Antecedentes</b>	<b>36</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>39</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>40</b>
<b>5. Objetivo General</b>	<b>40</b>
5.1 Objetivos Particulares	41

<b>6. Materiales y Métodos</b>	41
6.1 Desnutrición experimental	42
6.2 Extracción de timo	42
6.3 Evaluación del daño al ADN por HPLC	43
6.3.1 Extracción de ADN por la técnica de NaI	43
6.3.2 Hidrólisis enzimática de ADN	45
6.3.3 Curvas patrón	45
6.3.4 Cuantificación de la formación del aducto 8-OHdG y dG mediante HPLC	46
6.4 Detección de los niveles de expresión relativa de ARNm por qPCR	46
6.4.1 Obtención de ARN	46
6.4.2 Determinación de la concentración de ARN	47
6.4.3 Retrotranscripción	48
6.4.4 Evaluación de la expresión génica mediante qPCR	49
6.4.5 Curvas de rango dinámico	50
6.4.6 Niveles de expresión relativa del ARNm de los genes p53, Nrf2, SOD, GPx y CAT	51
<b>7. Análisis Estadístico</b>	52
<b>8. Resultados</b>	53
8.1 Generalidades de los diferentes grupos de estudio	53
8.2 Daño al ADN inducido por estrés oxidante	57
8.3 Expresión de los ARNm	62
<b>9. Discusión</b>	73
<b>10. Conclusión</b>	80
<b>11. Perspectivas</b>	80
<b>12. Bibliografía</b>	81

<b>Índice de figuras</b>		<b>Pág.</b>
Figura 1	Antioxidantes enzimáticos	28
Figura 2	Formación del aducto 8-OHdG	30
Figura 3	Regulación diferencial de genes blanco de p53	32
Figura 4	Efectos transcripcionales de Nrf2	35
Figura 5	Peso corporal de ratas BN y DN de 21 días de edad	53
Figura 6	Peso corporal de ratas BN y con diferentes grados de DN	54
Figura 7	Peso del timo de ratas	55
Figura 8	Integridad del ARN	56
Figura 9	Curva patrón de dG	58
Figura 10	Curva patrón 8-OHdG	58
Figura 11	Cromatograma de ADN hidrolizado	59
Figura 12	Identificación de 8-OHdG en ADN	59
Figura 13	Daño al ADN por estrés oxidante	61
Figura 14	Curva de rango dinámico y correlación lineal para $\beta$ -actina	62
Figura 15	Curvas estándar	63
Figura 16	Curvas de amplificación del ARNm	64
Figura 17	Expresión del ARNm de p53	66
Figura 18	Expresión del ARNm de Nrf2	67
Figura 19	Expresión del ARNm de SOD	68
Figura 20	Expresión del ARNm de GPx	69
Figura 21	Expresión del ARNm de CAT	70
Figura 22	Correlación lineal de genes regulados por p53	71
Figura 23	Correlación lineal de genes regulados por Nrf2	71
Figura 24	Correlación del daño al ADN con respecto a los niveles de expresión de p53 y Nrf2	72

### **Índice de cuadros**

Cuadro 1	Secuencias de oligonucleótidos	49
----------	--------------------------------	----

## Resumen

La desnutrición es un grave problema de Salud Pública en México. Se ha relacionado a la desnutrición con un incremento de daño a nivel del ADN y con una disminución en los niveles de ciertas moléculas que participan en la defensa antioxidante. Algunas de estas moléculas son enzimas y la disminución en su expresión, podría ser uno de los factores relacionados con la deficiente defensa antioxidante observada en organismos desnutridos, esto puede provocar un incremento de daño por estrés oxidante en diferentes moléculas esenciales para el correcto funcionamiento de las células, como el ADN.

El objetivo del presente estudio fue determinar en timo de ratas desnutridas (DN1, DN2 y DN3) y BN de 21 días de edad, los niveles de daño al ADN inducido por estrés oxidante mediante la cuantificación de la molécula 8-OHdG y asociarlo con la expresión relativa de los ARNm de dos genes que codifican para factores de transcripción p53 y Nrf2, que a su vez regulan la transcripción de algunas enzimas antioxidantes: SOD, GPx y CAT. La desnutrición fue inducida en ratas durante el periodo de lactancia mediante el método de competencia de alimento.

Los resultados obtenidos indican que existe un incremento en los niveles de daño generado por estrés oxidante en el ADN de timo de ratas desnutridas. Estos resultados estuvieron relacionados con una disminución en la expresión relativa de los ARNm de los genes SOD, GPx, CAT, p53 y Nrf2; los que se vieron afectados en mayor medida conforme el grado de desnutrición fue más evidente.

En conclusión, este estudio mostró por primera vez que la desnutrición está asociada con un mayor nivel de daño al ADN inducido por estrés oxidante, el cual está correlacionado con niveles bajos de expresión de los ARNm, de genes transcriptos por p53 y Nrf2. Adicionalmente, los resultados mostraron que un mayor desgaste corporal estuvo relacionado con alteraciones de mayor gravedad en el estado oxido-reducción en el timo, que condujo a un incremento en los niveles de daño al ADN generado por estrés oxidante.

## **Abstract**

Malnutrition is a serious public health problem in Mexico, it is related with an increased level of DNA damage and with decreased levels of certain molecules involved in the antioxidant defense. Some of these molecules are enzymes and their decreased expression could be one of the related factors with the poor condition of the antioxidant defense observed in malnourished organisms, this may result in increased oxidative stress damage in various essential molecules for the correct function of cells, as DNA.

The aim of this study was to determine in malnourished (First degree malnourished, Second degree malnourished, Third degree malnourished) and Well-nourished 21 day old rats thymus, the proportion of DNA damage induced by oxidative stress by quantifying the molecule 8-OHdG, and associating this with the relative mRNA expression of two genes which codify for the transcription factors: p53 and Nrf2, which in turn regulate the transcription of some antioxidant enzymes: SOD, GPx, CAT. Malnutrition was induced in the rats during the lactation period by the food competition method.

The results show increased levels of DNA damage generated by oxidative stress in the thymus from malnourished rats. This finding was related to a decreased relative mRNA expression of SOD, GPx, CAT, p53 and Nrf2 genes; all were affected in a greater extent as the degree of malnutrition was more evident.

In conclusion, this study show for the first time that malnutrition is associated with a higher level of DNA damage induced by oxidative stress, which is correlated with a low mRNA expression level, of genes transcribed by p53 and Nrf2. Additionally, results showed that a higher body weight deficit was related to more severe alterations in the thymus redox state, which leads to increased levels of DNA damage generated by oxidative stress.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 MARCO TEÓRICO**

### **1.1.1 Generalidades de la desnutrición**

La desnutrición es un estado patológico generado por la carencia de uno o varios elementos nutritivos básicos para la vida, ésta se puede originar por una dieta deficiente, debido a la escasez principalmente de proteínas, carbohidratos, lípidos o de oligoelementos esenciales; aunque también puede presentarse por alteraciones en la digestión o en la absorción (Parra-Gómez et al., 2003).

Dependiendo del tiempo durante el cual los individuos estén sujetos a la desnutrición, ésta puede presentar distintos grados de severidad y exhibir múltiples manifestaciones clínicas (Gómez et al., 1956). La desnutrición calórico-proteica (DCP) es la consecuencia de una ingestión y/o utilización de dietas con bajo contenido proteico principalmente, con ingesta variable de carbohidratos (Cravioto y Arrieta, 1985).

El método más usado para valorar la desnutrición en niños, se basa en el déficit de peso y talla con respecto a lo esperado para su edad cronológica, estableciéndose tres grados de acuerdo con su nivel de gravedad (Gómez et al., 1956; Parra-Gómez et al., 2003).

En la desnutrición de primer grado (leve), se observa una pérdida de peso que fluctúa entre el 10-24% con respecto a la que el niño debería tener para su edad cronológica; en la de segundo grado (moderada), fluctúa entre el 25-39% y

finalmente, en la de tercer grado (grave), la pérdida de peso es mayor al 40% (Gómez et al., 1956).

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 (de Onis et al., 2001).

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 inmunológico disminuye (Prudhon, 2002).

Desde el punto de vista clínico, existen dos tipos de desnutrición grave: el marasmo y el kwashiorkor o hipoalbuminemia (Parra-Gómez et al., 2003). Si la carencia de proteínas y calorías es grave, el resultado es el marasmo y si la dieta es deficiente en proteínas, tratándose de suplir la necesidad de energía mediante la ingesta abundante de alimentos ricos en carbohidratos, se produce el kwashiorkor (Bernabeu et al., 2008).

También se pueden asociar estos dos tipos de desnutrición, es decir: el individuo que muestra kwashiorkor, puede presentar al mismo tiempo marasmo,

conociéndose a ésta condición como kwashiorkor-marasmático que es una forma mixta de desnutrición, caracterizada por la detención del crecimiento asociado con edema. El marasmo y el kwashiorkor son considerados síndromes, ya que presentan signos y síntomas asociados, que son diferentes entre sí, pero característicos de cada una de éstas condiciones (Prudhon, 2002; Parra-Gómez et al., 2003).

#### **1.1.1.1 Marasmo**

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. El niño con marasmo presenta un aspecto de delgadez extrema, por la pérdida de grasa subcutánea, intensa atrofia muscular y de otros órganos. Estos niños suelen tener una cara triste, con arrugas, como la de una persona mayor (Parra-Gómez et al., 2003). Se ha establecido, que cuando los suministros proteicos y calóricos son deficientes, 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 (Mora, 2002).

#### **1.1.1.2 Kwashiorkor**

En 1933, la doctora británica Cicely Williams describió en pacientes de Ghana (antigua Costa de Oro), el kwashiorkor. En México a principios del siglo pasado, esta

enfermedad fue conocida como “culebrilla”, caracterizada por hiperpigmentación o hipopigmentación en la piel, dando la apariencia de serpientes pequeñas (Autret y Behar, 1954). En el kwashiorkor se observa edema de grado variable, desde una forma ligera localizada en pies y tobillos hasta un estado generalizado (Whaethon et al., 1968). Así mismo, se presentan alteraciones en el sistema digestivo, cardiovascular, músculo-esquelético, retraso en el crecimiento, cambio en la textura del cabello, alopecia, hipoalbuminemia, exceso de agua extracelular; los niños son incapaces de sintetizar lipoproteínas, de manera que se produce acumulación hepática de grasas (Autret y Behar, 1954; Mora, 2002). Otro problema común en el kwashiorkor es la diarrea, que contribuye a la mortalidad y la demora en la recuperación, debido a que los niños son más intolerantes a la lactosa (Whaethon et al., 1968).

### **1.1.1.3 Epidemiología de la desnutrición**

La DCP infantil alcanza proporciones alarmantes, en la actualidad se reconoce que aproximadamente 115 millones de niños menores de 5 años en todo el mundo presentan algún grado de desnutrición, con una mayor incidencia en países en vías de desarrollo. Así mismo, 178 millones de niños presentan una estatura baja para la edad, considerándose a este retraso de crecimiento como un indicador básico de la desnutrición crónica (OMS, 2011). Asia es el continente que presenta la prevalencia más elevada de retardo de crecimiento, África muestra una situación intermedia, que

varía según las subregiones; mientras que Latinoamérica muestra la proporción más baja (de Onis et al., 2001).

En México, los resultados de la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012), mostraron que a escala nacional el 2.8% de los niños menores de 5 años presentaron bajo peso, el 13.6% baja talla y el 1.6% desnutrición aguda. 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. En el Distrito Federal, 12 de cada 100 niños menores de 5 años presentaron algún grado de desnutrición. También se evidenció que en los últimos 24 años la desnutrición aguda o emaciación en niños menores de cinco años, ha disminuido un 4.6% (de 6.2% en 1988 a 1.6% en 2012). La baja talla disminuyó un 13.3% (de 26.9% en 1988 a 13.6% en 2012). Mientras que el bajo peso aminoró un 8% (de 10.8% en 1988 a 2.8% en 2012). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados por las autoridades sanitarias del país, no se ha logrado impactar de una forma adecuada, sobre la frecuencia de este padecimiento que continuará siendo uno de los grandes retos para el Sistema de Salud (ENSANUT D.F, 2012; ENSANUT, 2012).

#### **1.1.1.4 Causas que producen la desnutrición**

La marginación y la miseria son las principales causas de la desnutrición, pues en los entornos donde impera la pobreza, es donde la desnutrición suele prevalecer (Vega-Franco, 1999). El 90% de los estados de desnutrición, son ocasionados por una causa principal: la subalimentación, la que se debe a la deficiencia en la calidad

o en la cantidad de los alimentos consumidos por el sujeto (Gómez et al., 1956). El 10% restante de las causas que producen la desnutrición son las infecciones enterales o parenterales, defectos congénitos de los niños y nacimientos prematuros. También son causas que suelen empeorar la ingesta adecuada de alimentos: los estados de guerra, los desastres naturales, factores estacionales y climáticos, falta de educación, condiciones sanitarias ineficientes entre muchas otras (Amesty et al., 2002).

#### **1.1.1.5 Efecto de la desnutrición a nivel del material genético**

Se han realizado diferentes estudios en cuanto al efecto de la DCP sobre el material genético. En un estudio realizado en linfocitos de niños desnutridos se observó, además del efecto causado por la desnutrición, el efecto producido por las enfermedades infecciosas y el tratamiento con medicamentos, que son factores que generalmente acompañan a la desnutrición. Los resultados de este estudio mostraron que la desnutrición y sus factores asociados, pueden provocar daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) en comparación con los niños bien nutridos (Betancourt et al., 1995).

Por otra parte, en modelos experimentales, se ha observado que la desnutrición severa provoca un aumento de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de ratas de 21 días de edad; apoyando la idea de que la DCP tiene un efecto sobre la integridad del ADN, ya que los micronúcleos se forman por fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que no se integraron

correctamente al núcleo durante la división celular (Ortíz et al., 1995). Adicionalmente, se ha determinado también en ratas lactantes, que algunos tipos celulares son más susceptibles que otros a los efectos de la desnutrición, debido a que se encontró un mayor daño a nivel del ADN en linfocitos en comparación con las de bazo y médula ósea (Cortés et al., 2001). Así mismo, la desnutrición severa se asoció con un aumento significativo de daño en el ADN de células de hígado y testículos, en comparación con las de cerebro y riñón de ratas desnutridas; posiblemente, debido a las características estructurales y funcionales propias de cada tejido (Betancourt et al., 2005).

Los daños observados en el ADN pueden deberse a la deficiencia de varios nutrientes necesarios para la síntesis de proteínas relacionadas con la integridad del ADN o esenciales para los mecanismos de reparación del mismo y/o a la falta de disponibilidad de las moléculas necesarias para proteger a las células contra el daño oxidante (Cortés et al., 2001).

#### **1.1.1.6 Genómica nutricional**

La nutrición es un proceso complejo que mantiene la homeostasis corporal. Los factores ambientales involucrados en la homeostasis de los organismos son varios, entre los que destaca la dieta (Bourges, 2003).

El genoma humano es sensible al entorno nutricional, de modo que algunos genes pueden modificarse en su expresión, en respuesta a los componentes de la dieta. La progresión de un fenotipo sano a un fenotipo con

disfunción crónica puede explicarse por cambios en la expresión génica o por diferencias en las actividades de proteínas y enzimas (Xacur-García et al., 2008). En 2008). En este sentido, hay varias vías por las que los componentes bioactivos de la dieta alteran la acción de los genes actuando como ligandos para la activación de factores de transcripción de modo positivo o negativo en las rutas de señalización (Gómez-Ayala, 2007).

Existen diversos nutrientes que actúan sobre la estabilidad genómica como los carotenoides y las vitaminas antioxidantes C y E, que en bajas concentraciones están relacionados con el daño oxidante en el ADN (Martínez de Victoria-Muñoz, 2007). Por su parte, existen ciertos oligoelementos esenciales cuya deficiencia o exceso pueden perturbar los procesos epigenéticos como: el selenio, zinc, níquel o hierro, vitamina C y niacina (Moleres y Marti, 2008).

Las investigaciones se están centrando en la identificación de componentes bioactivos de la dieta, pues a medida que se incremente la información disponible, éstos podrían utilizarse para desarrollar alimentos funcionales que prevengan o intervengan de forma específica en diferentes enfermedades (Gómez-Ayala, 2007).

Los estudios en éstas áreas del conocimiento permitirán establecer las posibles alteraciones que se esperaría se presentaran en los individuos que han presentado DCP en alguna etapa de su vida.

### 1.1.2 Timo

El timo surge bilateralmente de la tercera y cuarta bolsas faríngeas, su desarrollo comienza en la sexta semana gestacional y se posiciona en el mediastino antero-superior, justo encima del corazón (Bar et al., 1999). Es uno de los órganos linfoides primarios que juega un papel fundamental en la inmunidad celular y se le considera menos esencial para la inmunidad innata (Yang y Bell, 1993; Pallaro et al., 2001).

La corteza del timo está compuesta principalmente por linfocitos (timocitos) y pocas células epiteliales, mientras que la médula presenta una mayor cantidad de células epiteliales, corpúsculos de Hassall y pocos timocitos. Las células epiteliales o nodrizas, conforman la estructura del timo y su función principal es la maduración de los linfocitos T (Nishino et al., 2006).

El timo alcanza su peso máximo en la pubertad y posteriormente sufre involución, debido a la atrofia de los componentes epiteliales, dando lugar a linfocitos pequeños dispersos en el tejido adiposo (Nishino et al., 2006).

En roedores, las primeras células hematopoyéticas colonizan al timo en las primeras dos semanas de gestación. En la primera semana de edad posnatal, el timo alcanza su tamaño máximo y además, ocurre una disminución exponencial en el número de células en la región cortical, debido al proceso de muerte celular programada o apoptosis (Levinson y Jawetz, 1996).

Aunque la necesidad de que el timo, genere un continuo suministro de linfocitos T disminuye después de la pubertad; éste órgano sirve como un sitio de maduración y diferenciación de células T a lo largo de la vida (Nishino et al., 2006).

#### **1.1.2.1 Timo y desnutrición**

Estudios post-mortem en niños desnutridos, así como los realizados en animales desnutridos experimentalmente, permitieron establecer que ambos organismos mostraron atrofia de los tejidos linfoides, siendo el timo el más dañado. Aunado a esto, se observó un alto porcentaje de linfocitos T inmaduros y una baja proporción de linfocitos T maduros (Feliu y Slobodianik, 2002; Savino et al., 2007). Se ha evidenciado que la atrofia tímica en niños desnutridos está relacionada principalmente con la deficiencia de zinc (Zn) y una disminución de leptina. Sin embargo, este efecto puede ser revertido con una rehabilitación dietética apropiada, suplementada con Zn (Savino et al., 2007).

Además de ello, el microambiente del timo también es afectado, por cambios morfológicos en las células epiteliales y por la disminución en la producción de hormonas tímicas. Asociado con esto, se ha encontrado un aumento de proteínas extracelulares tales como fibronectina, laminina y colágeno en niños desnutridos, en comparación con los niños bien nutridos de la misma edad. El timo es el principal órgano blanco de la desnutrición, por ello, se le considera como el “barómetro de la desnutrición” (Savino et al., 2007).

Trabajos previos han demostrado que en el timo de ratas desnutridas, se presentan alteraciones en las proporciones de las subpoblaciones de timocitos, mostrando un incremento de células doblemente negativas  $CD4^-$  y  $CD8^-$  y una disminución de las dobles positivas  $CD4^+$  y  $CD8^+$ . Estas alteraciones pudieran ser causadas por la deficiencia de nutrimentos en el microambiente del timo y podrían repercutir en la diferenciación de los timocitos o en la regulación del proceso de eliminación celular selectivo por apoptosis (Ortíz et al., 2000).

### **1.1.3 Estrés oxidante**

En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el sistema de defensa antioxidante que mantiene la homeostasis y la regulación del estado redox intracelular. Cuando este balance no se mantiene, se dice que existe un estado de estrés oxidante. Lo cual puede originar lesiones en la estructura de lípidos (peroxidación lipídica), proteínas y ácidos nucleicos; provocando alteraciones en sus funciones metabólicas e inclusive la muerte (Venereo, 2002; López et al., 2003; Marnett et al., 2003).

La mayor parte de las ERO son radicales libres como: radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), radical peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ) éste último es el más reactivo, todos se caracterizan por poseer al menos un electrón desapareado en su orbital externo (Venereo, 2002). Esto les confiere inestabilidad y al mismo tiempo una gran reactividad con otras moléculas; el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por su parte, es una ERO más no un radical libre, sin embargo, puede generar

rápidamente radicales libres en presencia de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o cobre ( $\text{Cu}^{1+}$ ) libres, mediante la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Las ERO son producidas en la célula, a través de diversos procesos normales, como el metabolismo oxidante y la inflamación, así como, por la exposición a diversos agentes físicos como la luz UV, radiación ionizante, agentes químicos contaminantes o carcinogénicos y dietas incorrectas (Castellanos, 2008; Konigsberg, 2008). Por su parte, algunas de las enzimas oxidantes involucradas en su generación son: la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa, la lipoxigenasa, la triptófano dioxigenasa, entre otras (Venereo, 2002).

Las células presentan diversos mecanismos de protección contra la generación de ERO, transformándolos en productos menos tóxicos o no tóxicos mediante su captura o la prevención de su formación (González et al., 2000).

#### **1.1.3.1 Sistemas de defensa antioxidante**

La prevención, es la primer línea de defensa del organismo contra las ERO, este primer mecanismo lo efectúan proteínas que se unen a metales como Fe o cobre (Cu), evitando así, que estos metales participen en las reacciones en donde se producen diferentes ERO y por consiguiente el bloqueo de su formación. Dentro de las proteínas que ligan metales se encuentran la ferritina, transferrina, albúmina, ceruloplasmina y metalotioneínas (González et al., 2000; Hansberg, 2002).

Cuando los sistemas de prevención no son suficientes, entran en actividad los antioxidantes, que tienen como función la eliminación de ERO y se dividen en dos categorías no enzimáticos y enzimáticos (Hansberg, 2002).

Los antioxidantes de tipo no enzimáticos se unen a los radicales libres y los transfieren a sitios donde provocan daños menores, o bien, los transforman en compuestos menos agresivos. Entre estos antioxidantes se encuentra el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -carotenos, ácido ascórbico (vitamina C), glutatión, urato, bilirrubina, entre otros (González et al., 2000).

Dentro de los antioxidantes enzimáticos existen tres principales enzimas: la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) (González et al., 2000). Debido a la importancia de éstas, se mencionan a continuación sus características principales:

#### **1.1.3.2 Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)**

La enzima SOD dismuta la transformación de dos radicales  $O_2^{\bullet}$  a  $H_2O_2$  y oxígeno molecular ( $O_2$ ) (Figura 1), de una manera eficiente ( $10^9 M^{-1} s^{-1}$ ) e independiente del pH (Hansberg, 2002). Su principal función es la protección contra el  $O_2^{\bullet}$  (Venereo, 2002). La dismutación ocurre cuando una molécula de sustrato se reduce y la otra se oxida. Las SOD son una familia de metaloenzimas con ubicaciones diferentes: citoplasma, mitocondria, fluidos extracelulares (González et al., 2000) y en todos los compartimentos celulares limitados por membrana (Hansberg, 2002).

Existen varios tipos de SOD: las enzimas que poseen  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en su sitio activo, localizadas en el citosol y núcleo como la superóxido dismutasa tipo 1 (SOD1), las que contienen en su sitio activo manganeso (MnIII), superóxido dismutasa tipo 2 (SOD2) localizada en la matriz mitocondrial (Rojkind et al., 2002) y las enzimas que se encuentran extracelularmente, la superóxido dismutasa tipo 3 (ECSOD o SOD3). La CuZnSOD es un homodímero abundante, resistente a la desnaturalización, se inhibe con cianuro o con quelantes de Cu como el dietilditiocarbamato. El  $\text{Cu}^{2+}$  de la CuZnSOD, está sostenido entre cuatro histidinas en un barril aplanado de ocho bandas  $\beta$ -plegadas antiparalelas que lleva a cabo la transferencia de electrones, mientras que el  $\text{Zn}^{2+}$  tiene un papel estabilizador (Hansberg, 2002).

La SOD1 es un homotetrámero de 32 kilodaltones (kDa), se ha observado que modificaciones en el gen que codifica para SOD1, provoca una mayor susceptibilidad a tóxicos como plaguicidas que conduce a la infertilidad en animales. Por otra parte, se han encontrado mutaciones o alteraciones en la expresión de SOD1 en enfermedades tales como esclerosis amiotrófica familiar y Síndrome de Down (Rojkind et al., 2002).

La SOD2 es un homodímero o tetrámero de alrededor de 22 kDa, remueve el  $\text{O}_2^{\bullet}$  generado en la mitocondria, se desnaturaliza con detergentes o solventes y no se inhibe con cianuro, dietilditiocarbamato ni con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hansberg, 2002).

La SOD3 es una glicoproteína tetramérica mucho más grande que las enzimas intracelulares. Son glicoproteínas que se unen o no, a la superficie celular (Hansberg,

2002). Se presenta en una gran variedad de células, incluyendo fibroblastos y células gliales. Su función principal es mantener la acción vasodilatadora del óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), mediante la inhibición de la acumulación  $\text{O}_2^\bullet$  (Rojkind et al., 2002).

### **1.1.3.3 Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.19)**

Es una enzima que utiliza como cofactor al selenio (Se), se ha encontrado en el citoplasma y las mitocondrias de los tejidos animales. Cataliza la reacción a través de la cual, el agente reductor glutación reducido (GSH), reacciona con peróxidos para transformarlos en agua y alcohol. Durante este proceso el glutación es oxidado (GSSG), para posteriormente ser regresado a su estado original, por la enzima glutación reductasa (Figura 1) (González et al., 2000).

Los mamíferos tienen varias GPx: la glutación peroxidasa tipo 1 o citosólica (GPx1), la glutación peroxidasa tipo 2 o gastrointestinal (GPx2), la glutación peroxidasa tipo 3 o plasmática (GPx3) y la glutación peroxidasa tipo 4 o de hidroperóxidos de fosfolípidos (GPx4). Todas son homotetrámeros con la excepción de la GPx4 que es un monómero (Hansberg, 2002)

La GPx citosólica (GPx1) es la enzima más abundante, sobre todo en eritrocitos, hígado, riñón, pulmón y tiene una mayor afinidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que por lipoperóxidos (Hansberg, 2002; Venereo, 2002).

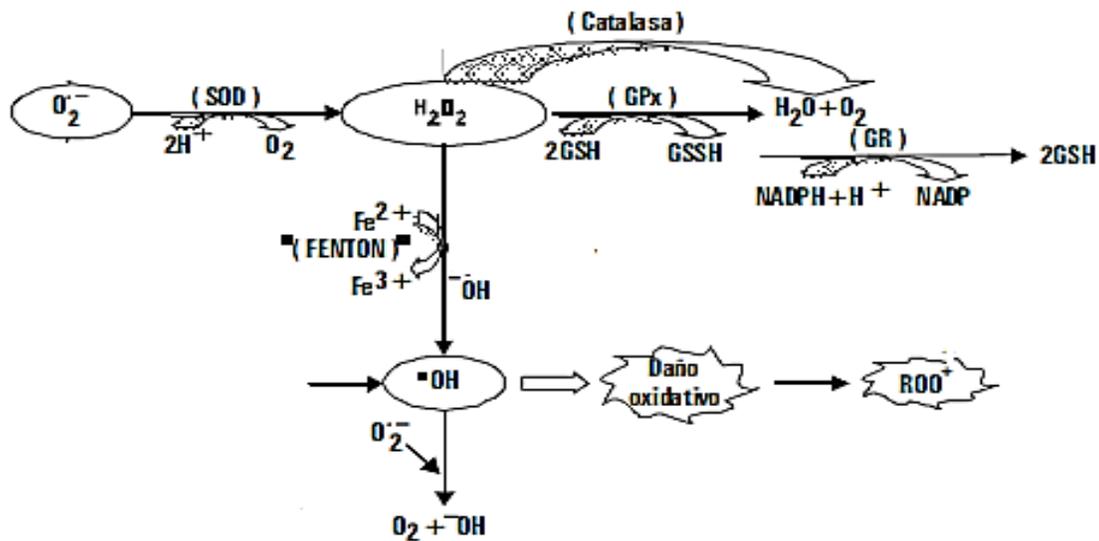
En los mamíferos estas enzimas tienen la particularidad de tener en su sitio activo una selenocisteína, una cisteína en la cual el azufre ha sido remplazado por el Selenio (Hansberg, 2002).

#### 1.1.3.4 Catalasa (EC 1.11.1.6)

La catalasa tiene una amplia distribución en el organismo, se encuentra en concentraciones altas, en hígado y riñón, en concentraciones bajas en tejido conectivo, epitelios y prácticamente nula en tejido nervioso. Su actividad se localiza principalmente en los peroxisomas, en donde dismuta al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y  $\text{O}_2$  (Figura 1) (González et al., 2000). Presenta dos funciones fundamentales, catalítica y peroxidativa (Venereo, 2002).

La catalasa es una enzima homodimérica u homotetramérica con subunidades de  $\approx 60$  kDa o de  $\approx 80$  kDa; cada subunidad contiene una ferro-protoporfirina-IX (hemo b) unida a su sitio activo. El dominio del barril- $\beta$  incluye la cavidad del hemo, los aminoácidos que lo orientan y el canal que conduce a él, son las partes más conservadas de la molécula; en el canal estrecho que conduce a la parte distal del hemo, participan una histidina y una asparagina junto con el Fe (III) y el hemo. El Fe (III) no presenta enlace de coordinación en la parte distal y en la parte proximal, el enlace es con una tirosina (Hansberg, 2002).

El canal estrecho y la falta de coordinación del Fe (III) en el lado distal, tienen que ver con la selectividad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y con la capacidad de oxidar metanol o etanol. Al entrar una molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al sitio activo toma un electrón del  $\text{Fe}^{2+}$  y otro del hemo, para generar una molécula de agua. Posteriormente, una segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 agua (Hansberg, 2002).



**Figura 1.** Antioxidantes enzimáticos (Tomado de Pérez y Pérez., 2000).

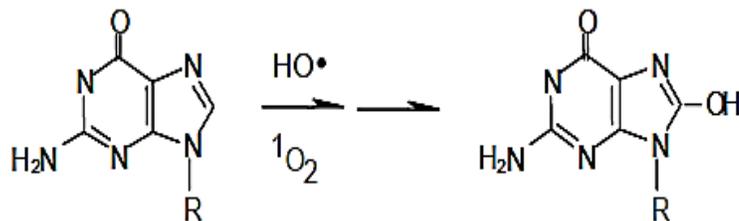
### 1.1.3.5 Estrés oxidante y daño al ADN

Las ERO pueden interactuar rápidamente con el ADN provocando alteraciones estructurales, fisiológicas y funcionales en las células. Las ERO producen diferentes tipos de modificaciones en los componentes del ADN, como daño a las bases, azúcares, entrecruzamientos de proteínas con el ADN, rupturas de cadena sencilla y doble, formación de sitios abásicos, como consecuencia afectan la transducción de señales, la proliferación celular, la comunicación intercelular, la síntesis de una proteína por daño a un gen específico (Konigsberg, 2008) e inactivación o pérdida de genes supresores de tumores (Venereo, 2002). El daño al ADN puede acumularse y heredarse a las siguientes generaciones celulares, dando lugar a genotipos alterados, mutaciones, deleciones y transformaciones carcinogénicas, que pueden llevar a la muerte celular (López et al., 2003; Konigsberg, 2008).

La guanina es la base nitrogenada que presenta el potencial de ionización más bajo entre los componentes de los ácidos nucleicos, por tanto, es la base más susceptible de ser oxidada por diferentes componentes oxidantes, como los radicales  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{O}_2\cdot$  (Konigsberg, 2008).

El radical  $\cdot\text{OH}$ , puede dañar al ADN, provocando modificaciones químicas en los grupos funcionales de las bases del ADN a las que se le conoce como aductos, entre los más conocidos está el 8-hidroxi 2-desoxiguanosina (8-OHdG) (Figura 2) (Halliwell y Gutteridge, 1999) que produce un mal apareamiento de la guanina con su respectiva base y por consiguiente ruptura de la cadena de ADN. La cantidad del nucleósido 8-OHdG, se utiliza como índice del daño oxidante al ADN (Rivera et al., 2006).

Existen diversos genes que censan el daño oxidante en el ADN e inducen la reparación como el gen supresor tumoral p53 (Sablina et al., 2005), o que son activados por diversos compuestos oxidantes como es el caso del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y que transcriben enzimas que mantienen el estado redox de la célula. En total se han reportado más de 100 genes involucrados en la respuesta antioxidante entre los que destacan también la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) (Konigsberg, 2007).



**Figura 2.** Formación del aducto 8-OHdG (Tomado de Hansberg, 2002).

### 1.1.3.6 p53 y estrés oxidante

El gen p53 o tp53, se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13), una región que con frecuencia se elimina en el cáncer humano, codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kDa y 393 aminoácidos, constituida por tres dominios, cuya función principal es la activación o represión de genes, a través de su unión a secuencias consenso específicas (El-Deiry et al., 1992).

Este factor de transcripción al unirse a un sitio específico del ADN, en respuesta a una inestabilidad genómica, controla la expresión de cientos de genes implicados en una variedad de respuestas fisiológicas, como procesos de: reparación del ADN, generación de ATP vía fosforilación oxidativa, autofagia, apoptosis, senescencia, envejecimiento, desarrollo y regulación del estrés oxidante (Vousden y Lane, 2007; Baena et al., 2009; Maclaine y Hupp, 2009).

La regulación de p53 puede estar mediada por MDM2, una proteína homóloga a la ligasa 3 que al unirse a la ubiquitina induce su degradación vía proteosoma (Sheng, 2004). Existe entre ambas proteínas un sistema de retroalimentación, haciendo que en condiciones normales la proteína MDM2 se una a la proteína p53 y la mantenga en niveles bajos, mediante la proteólisis realizada por el proteosoma

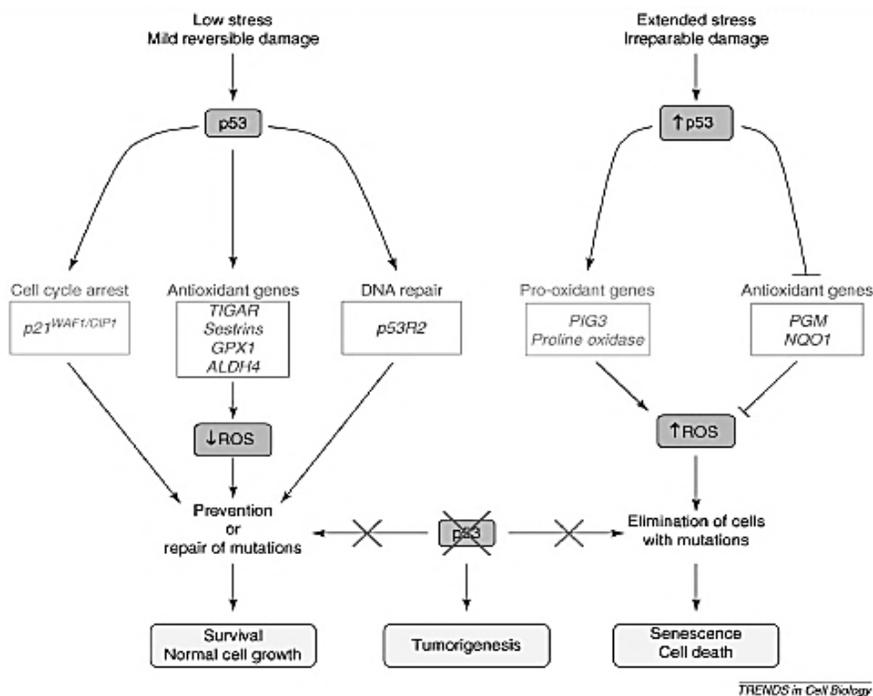
26s; mientras que cuando la célula está sometida a algún tipo de estrés, se bloquea la capacidad de unión entre ambas moléculas, alterando por consecuencia la forma de degradación mediada por MDM2 (Baena et al., 2009). p53 ha sido descrito como el “guardián del genoma”, por su papel protector en cuanto a la acumulación de alteraciones genéticas, tarea que realiza mediante la detención de la proliferación celular o senescencia, para evitar la replicación del ADN dañado. Las ERO causan daño al ADN e inestabilidad genómica y modifican alrededor de 20,000 bases por día en una célula. La función antioxidante de p53, que es esencial para la acción supresora de tumores, se evidenció en un estudio reciente, en el que se demostró que una dieta suplementada con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC), abolió la incidencia de linfomas en ratones “knock-out” p53<sup>-/-</sup> (Aylon y Oren, 2011).

El papel de p53 como supresor de tumores, depende de su actividad proapoptótica y se encuentra mutado en el 50% de los diferentes tipos de cáncer humanos. Además, de que su vía de señalización se encuentra alterada hasta en un 80%, en todos los tipos de cáncer (Lozano y Elledge, 2000).

En ausencia de estrés agudo, p53 se encuentra expresado en niveles bajos que son suficientes para el incremento en la expresión de diversos genes con productos antioxidantes que están asociados, con una disminución de ERO intracelulares y por consiguiente, previniendo posibles daños a diversas moléculas. Mientras que en respuesta a un estrés severo, tal como una activación oncogénica o una exposición a altas dosis de radiación, induce apoptosis. En cambio una disminución en la expresión de p53, resulta en una oxidación excesiva de ADN,

acumulando mutaciones y deleciones que pueden conducir al cáncer (Figura 3) (Sablina et al., 2005).

Se ha determinado que existen ciertos genes, cuya expresión es regulada por p53, tales como: GPx1, GPx2 (Tan et al., 1999; Chumakov, 2006), SOD, aldehído deshidrogenasa miembro A1 de la familia 4 (ALDH4A1) (Yoon et al., 2004), sestrinas 1 y 2 (SESN1 y SESN2) (Sablina et al., 2005) y CAT (O'Connor et al., 2008) que codifican productos con función antioxidante, los cuales están asociados con una disminución de ERO intracelulares (Yoon et al., 2004).



**Figura 3.** Regulación diferencial de genes blanco de p53 que determinan la elección de respuesta (Tomado de Bensaad y Vousden, 2007).

### 1.1.3.7 Nrf2 y estrés oxidante

El gen Nrf2 se encuentra localizado en el cromosoma 2 (2q31.2), codifica para una proteína de 68 kDa, originalmente identificada como una proteína de unión al locus del gen  $\beta$ -globina. Presenta un característico “zipper” o cierre de leucinas (bZip) en la región carbonilo terminal (C-terminal). La región básica corriente arriba de bZip es la responsable de la unión al ADN (Jong y Johnson, 2004; Konigsberg, 2007) mientras que, el dominio ácido rico en ácido glutámico y aspártico de la región amino terminal (N-terminal), se requiere para la activación transcripcional. Se expresa ubicuamente en la mayoría de los tejidos en diferentes niveles (Moi et al., 1994).

Nrf2 regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes de la fase II, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (elemento de respuesta antioxidante), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes o electrófilos de naturaleza diversa (Konigsberg, 2007). Regula la expresión de genes que codifican para enzimas y proteínas antioxidantes entre las que se encuentran: NADPH quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), GST, glutamato cisteína-ligasa (GCL), UDP-glucoronil transferasa (UGT) (Jong y Johnson, 2004), SOD1, CAT y GPx1 entre otras (Zhu et al., 2005; Varady et al., 2012).

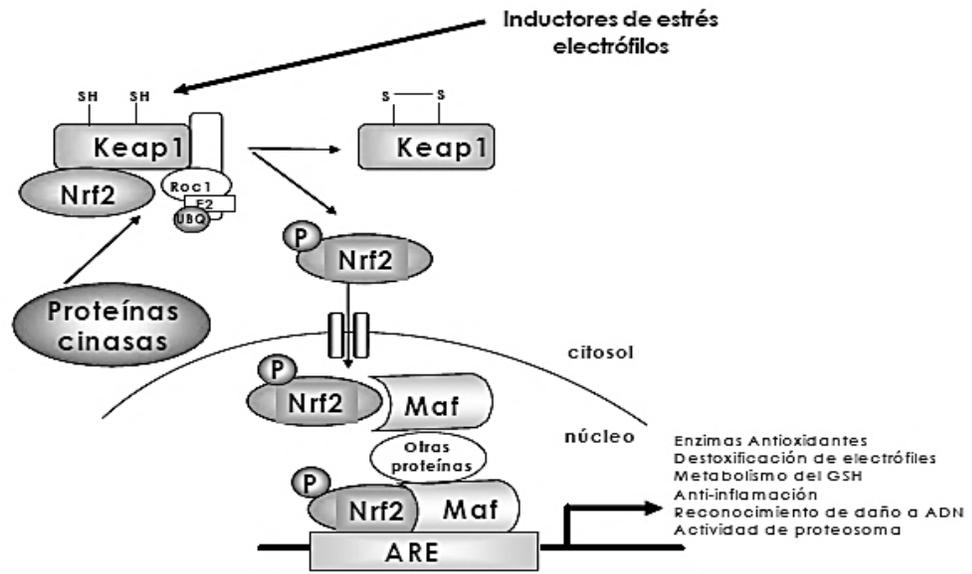
La actividad de Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida, debido a la unión con la proteína citoplasmática Keap1 (proteína derivada de células eritroides tipo Kelch asociada a proteína 1) que a su vez está asociada al sistema Cul3-

ubiquitinligasa. La función principal de Keap1 es suprimir hasta en un 80% la translocación nuclear de Nrf2. Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 por el proteosoma, por lo que el control primario de su función radica en su distribución subcelular, más que en la síntesis *de novo* (Nguyen et al., 2009).

La vida media de Nrf2 es muy corta de alrededor de 15-20 minutos, sugiriendo su rápida degradación dentro de la célula, la degradación de Nrf2 ocurre mediante la vía de ubiquitinación y reconocimiento del proteosoma (Nguyen et al., 2009).

El efecto inhibitorio de Keap1 es dependiente del estado redox de sus cisteínas (que funcionan como sensores del estado redox); por lo que la ubiquitinación y la proteólisis son inhibidas en condiciones oxidantes (Sykiotis et al., 2011). Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra el estrés oxidante frente a varias patologías como el cáncer y la inflamación entre otras (Konigsberg, 2007). Al disociarse el complejo Nrf2-Keap1, provoca que Nrf2 se transloque al núcleo conduciendo a la activación transcripcional de diversos genes (Figura 4) (Jong y Johnson, 2004).

La primera evidencia del papel de Nrf2 en cuanto a la protección antioxidante fue cuando se demostró que la sobreexpresión del ADNc de Nrf2 aumentaba la expresión e inducción de la flavoproteína NQO1, además de regular positivamente a ARE (Lee y Johnson, 2004).



**Figura 4.** Efectos transcripcionales de Nrf2 (Tomado de Konigsberg, 2007).

## 2. Antecedentes

En los últimos años, se han relacionado las ERO con diversas condiciones patológicas, entre ellas la DCP. Debido a que en diversos trabajos se ha observado que algunos compuestos antioxidantes como las vitaminas A, C y E (Lenhartz et al., 1998; Ashour et al., 1999), el  $\beta$ -caroteno (Becker et al., 1994), el  $Zn^{2+}$  (Singla et al., 1996), el Se, el Cu, (Ashour et al., 1999), el GSH (Lenhartz et al., 1998), la relación nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida y oxidada respectivamente (NADPH/NADP<sup>+</sup>), la actividad de la GPx y de la glutatión-S-transferasa (GST), están mayormente disminuidas en niños desnutridos tipo kwashiorkor que en niños bien nutridos (Golden y Ramdath, 1987; Sive et al., 1993; Squali-Houssaini et al., 1997).

Así mismo, la concentración de GSH en sangre disminuye en niños con desnutrición tipo marasmo o kwashiorkor, en éstos últimos existe la evidencia que vincula la generación de radicales libres y la disminución de antioxidantes, con el desarrollo de edema (Becker et al., 1995; Ahmed et al., 2009). En niños con desnutrición tipo kwashiorkor la disminución en la síntesis de GSH se ha asociado con concentraciones bajas de cisteína en eritrocitos y plasma (Reid et al., 2000).

Las concentraciones bajas de estas moléculas antioxidantes en los niños con DCP pudieran ser el resultado de las restricciones en su dieta, aunque otra opción es que se sufran degradación proteolítica por el proceso oxidante (Albretch y Pélissier, 1995). En los niños con DCP no se han detectado mecanismos compensatorios;

tales como un incremento en las actividades de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Becker et al., 1995).

En un estudio realizado en eritrocitos de niños con DCP de tipo marasmático, se encontró que existe un incremento de daño por estrés oxidante, debido a un incremento de lipoperoxidación y una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como GPx y CAT, en comparación con los niños bien nutridos (Bosnak et al., 2010).

Por otra parte, en algunos estudios se ha determinado el efecto de la DCP sobre el estado oxidante en modelos experimentales; en los cuales, se asoció a la desnutrición con una disminución en la actividad enzimática de SOD y CAT en riñón, pulmón e hígado y en algunas regiones del cerebro como la corteza cerebral y cerebelo, con un concomitante incremento de lipoperoxidación en estos órganos (Jimoh et al., 2005; Feoli et al., 2006) y un aumento de daño por estrés oxidante en proteínas del cerebelo y corteza cerebral (Feoli et al., 2006).

En un estudio realizado en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, se determinó el daño por estrés oxidante en el ADN de riñón e hígado; mediante la cuantificación del aducto 8-OHdG. Los resultados de ese trabajo, demostraron que el daño en el ADN del hígado de ratas desnutridas fue ocho veces mayor en comparación con el grupo testigo. Sin embargo, no se detectó daño en el ADN de riñón de ratas desnutridas, lo que sugiere que la tolerancia al daño por estrés oxidante puede ser dependiente de tejido; en este caso la tolerancia del daño al ADN fue mayor en riñón comparándolo con hígado (López, 2005).

p53 tiene un papel importante en respuesta al estrés oxidante y es extremadamente sensible, incluso a niveles bajos de daño al ADN. Muchas señales, pueden alterar su actividad; entre ellas, la privación de nutrientes. Por su parte Nrf2 tiene un papel muy importante en la regulación metabólica e interactúa con diferentes sistemas de señalización que responden al insumo nutricional, como es el caso de la insulina/Akt y en el metabolismo de lípidos (Sykiotis et al., 2011).

### **3. Justificación**

La desnutrición es un grave problema de Salud Pública a nivel mundial, ya que alcanza proporciones alarmantes en los países en vías de desarrollo. Se sabe que la desnutrición provoca mayor susceptibilidad a los procesos infecciosos, lo cual está relacionado con diversas alteraciones morfológicas, estructurales y fisiológicas observadas en algunos órganos, entre ellos el timo. Estudios previos, han mostrado que ciertos órganos de ratas desnutridas, así como, linfocitos de niños desnutridos presentan daño al ADN a diferentes niveles, lo que puede comprometer la funcionalidad de estos órganos, células y por ende para el organismo.

Por otra parte, es un requisito indispensable la capacidad de adaptación al estrés generado por el medio ambiente, particularmente al producido por estrés oxidante para la supervivencia de la célula. Por lo que, la célula para protegerse de ese daño, posee una gran variedad de moléculas para disminuirlo o neutralizarlo. Sin embargo, diversos trabajos han mostrado que los antioxidantes, principalmente los de tipo no enzimático, se encuentran disminuidos en los organismos desnutridos; por lo que es factible que el ADN del timo presente daño por estrés oxidante, aspecto que no ha sido evaluado hasta la fecha. Como ya se mencionó anteriormente, el timo es un órgano muy importante para el sistema inmunológico, por lo que el daño a este órgano, podría comprometer la salud y la vida del organismo completo.

Debido a la importancia de la molécula de ADN, a que ésta podría estar en riesgo de presentar daño oxidante relacionado con la desnutrición y a que ésta posibilidad no se ha evaluado en un órgano tan primordial para el sistema

inmunológico como es el caso del timo, se consideró de importancia, estudiar el daño al ADN inducido por ERO en timo de ratas desnutridas, mediante la evaluación de la molécula 8-OHdG y relacionarlo con la expresión de genes que codifican para factores de transcripción como p53 y Nrf2, los cuales a su vez, son responsables de modular la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes como CAT, GPx y SOD. Todas estas moléculas, involucradas en la regulación intracelular de ERO.

#### **4. Hipótesis**

La DCP está asociada con una disminución de los niveles de diferentes antioxidantes y con daño al ADN. Por lo que, la desnutrición experimental durante la lactancia en ratas, será capaz de provocar daño a nivel del ADN por estrés oxidante, y éste daño estará asociado a cambios en los niveles de expresión del ARNm de genes que participan en la regulación de la respuesta antioxidante.

#### **5. Objetivo General**

Cuantificar el daño al ADN generado por estrés oxidante, así como la expresión relativa de genes que participan en la respuesta antioxidante, en timo de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia.

## 5.1 Objetivos Particulares

- Cuantificar el daño al ADN inducido por estrés oxidante mediante la detección de la molécula 8-OHdG en timo de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia y bien nutridas, mediante la técnica de HPLC.
- Establecer si el grado de desnutrición influye en la cantidad de ADN dañado.
- Determinar los niveles de expresión relativa del ARNm de los genes p53, Nrf2, SOD, GPx y CAT mediante qPCR.
- Establecer si el grado de desnutrición modula la expresión de los genes p53, Nrf2, SOD, GPx y CAT.
- Establecer si el daño al ADN por estrés oxidante está asociado a cambios en los niveles de expresión relativa del ARNm del gen p53, Nrf2, SOD, GPx y CAT.

## 6. Materiales y Métodos

Se emplearon ratas de la cepa Wistar, mantenidas en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, bajo condiciones de ciclo de luz-obscuridad L12/O12, temperatura de 22-25°C y humedad relativa de 45%. Las madres fueron criadas con alimento balanceado para roedores (PMI 5001, Lab Diet) y agua filtrada *ad libitum*; mantenidas en cajas de acrílico transparentes; con cama de viruta de madera estéril, especial para roedores (Beta-Chip, Aspen). Los procedimientos utilizados se desarrollaron de acuerdo a las guías aprobadas institucionalmente (UAM-I), basadas en la guía del National Institute of Health (NIH),

para el uso de animales de experimentación (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010) y en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999.

### **6.1 Desnutrición experimental**

La desnutrición se indujo por el método de competencia de alimento durante la lactancia, incrementando el número de crías por madre nodriza. La cual se basa en la reducción de la cantidad de leche por cría. Se distribuyeron aleatoriamente a las crías al día siguiente de su nacimiento en 2 lotes: lote experimental (desnutridas), en el cual se colocaron 17 crías con su nodriza y lote control (bien nutridas), con 6 ó 7 crías con su nodriza. Se procuró tener en ambos grupos el mismo número de hembras y machos por camada. Las crías se pesaron cada tercer día, desde el día 1 hasta los 21 días de edad (destete). Se consideraron con desnutrición grave o de tercer grado (DN3), cuando presentaron un déficit de peso corporal del 40% o más; de segundo grado (DN2) cuando el déficit de peso fluctuó entre el 25-39%, y de primer grado (DN1) cuando presentaron entre el 10-24% de déficit peso con respecto al peso promedio de las bien nutridas de la misma edad (Ortíz et al., 1996).

### **6.2 Extracción de timo**

Las ratas de 21 días de edad de ambos lotes, se sacrificaron por dislocación cervical, se les disectó el timo bajo condiciones asépticas (Bolant et al., 1990) del cual, se obtuvo un trozo de tejido de alrededor de 0.2 g el cual se almacenó a -70°C hasta que se realizó la determinación del daño al ADN mediante la técnica de

cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EC). Un segundo fragmento de alrededor de 10 mg de tejido, se utilizó para el análisis de la detección de los niveles de expresión de los ARNm mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), éste último fragmento, inmediatamente se transfirió a un tubo eppendorf estéril libre de RNasas con 175  $\mu$ L de amortiguador de lisis (Promega, EUA), para su disgregación con un pistilo libre de RNasas y ya disgregado se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **6.3 Evaluación del daño al ADN por HPLC**

#### **6.3.1 Extracción de ADN por la técnica de Yoduro de Sodio (NaI)**

Se extrajo el ADN de timo de ratas desnutridas y bien nutridas, mediante el método de NaI (Wang et al., 1994). Para ello, se utilizaron 0.2 g de tejido, que se homogenizó con 1000  $\mu$ L del amortiguador A [0.32M sacarosa (Merck, México), 5mM  $\text{MgCl}_2$  (Sigma, EUA), 10 mM Tris-HCl (Promega, EUA), 0.1 mM Desferroxamina (Sigma, EUA), 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma, EUA), pH = 7.5]. Se centrifugó a 1500 xg por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 1000  $\mu$ L del mismo amortiguador. Por segunda vez, se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 1000  $\mu$ L de amortiguador B [10 mM Tris-HCl, 5mM  $\text{EDTA-Na}_2$  (Sigma, EUA), 0.15 mM Desferroxamina, pH = 8.0]; se agregaron 100  $\mu$ L de duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (Sigma, EUA), 40  $\mu$ L de RNasa T1 (Sigma, EUA) a una concentración de 20 U/ $\mu$ L, 60  $\mu$ L de RNasa A (Sigma, EUA) a una concentración 20 U/ $\mu$ L y se agitó por

inversión. Los tubos se incubaron a 37°C por una hora en baño de agua, para la activación de las RNasas. Pasado este tiempo, se adicionaron 50 µL de Proteinasa K (Sigma, EUA) a una concentración de 30 U/µL y se incubó a 37°C por una hora. Los tubos se centrifugaron a 5000 xg por 15 minutos a 4°C; se recuperó el sobrenadante y se colocó en hielo, esta porción contenía el ADN. Al sobrenadante se le agregó 1 mL de solución de NaI [7.6 mM NaI (Reasol, México), 40 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 0.5 mM Desferroxamina, pH = 8.0] y 1 mL de isopropanol absoluto frío (JT Baker, México), se agitó por inversión y después los tubos se almacenaron a -20°C, durante toda la noche. Al día siguiente, se tomó el ADN y se transfirió a tubos eppendorf estériles, se centrifugaron a 9000 xg por 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, posteriormente se le agregó 1 mL de isopropanol frío al 60% (v/v) y se resuspendió lentamente, se centrifugó a 9000 xg por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol (JT Baker, México) al 70% (v/v) frío, se resuspendió, se centrifugó a 9000 xg por 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante; se agregaron 200 µL de Desferroxamina 0.1 mM y se resuspendió la pastilla; para finalizar se adicionaron 100 µL de Desferroxamina 0.1 mM y se almacenaron las muestras a -20°C (Helbock et al., 1998).

La concentración de ADN fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{ADN}] \text{ en } \mu\text{g/mL} = (\text{Abs } 260 \text{ nm} \times \text{Factor de dilución} \times 50 \mu\text{g ADN/mL})$$

Mientras que la pureza fue determinada de acuerdo al cociente  $A_{260}/A_{280}$

### **6.3.2 Hidrólisis enzimática de ADN**

Para la evaluación del aducto 8-OHdG se realizó una digestión enzimática del ADN, utilizando enzimas ADN nucleasa P1 y fosfatasa alcalina, para obtener nucleósidos puros y posteriormente inyectar 100  $\mu\text{L}$  de éstos en la HPLC.

La hidrólisis se realizó de la siguiente manera: por cada 100  $\mu\text{g}$  de ADN se adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio (Sigma, EUA) 1M, 2.5  $\mu\text{L}$  de nucleasa P1 (Sigma, EUA) a una concentración 0.4 U/ $\mu\text{L}$  y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de 100  $\mu\text{L}$ , se incubaron por 30 min a 37°C; y se adicionaron 4  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 1M, pH 7.4 y 13.5  $\mu\text{L}$  de enzima fosfatasa alcalina 0.22 U/  $\mu\text{L}$  (Sigma, EUA), ésta última, anteriormente disuelta en amortiguador de fosfatasa [50% (v/v) de glicerol (Sigma, EUA), 50 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Sigma, EUA) y 0.1 mM de  $\text{ZnCl}_2$  (Sigma, EUA), pH = 7.5]. Posteriormente se incubó por 1 hora a 37°C. Las muestras fueron centrifugadas y la fase acuosa fue obtenida para ser analizada en el equipo de HPLC.

### **6.3.3 Curvas patrón**

Se realizaron curvas patrón tanto para la molécula 8-OHdG como para Desoxiguanosina (dG), usando estándares comerciales. Se prepararon soluciones a concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 300 nM de dG y soluciones de 2, 5, 10 y 20 nM de 8-OHdG, de las cuales se inyectaron 100  $\mu\text{L}$  de cada una en el sistema cromatográfico HPLC. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de ambos compuestos en las muestras problema.

### **6.3.4 Cuantificación de la formación de 8-OHdG y dG mediante HPLC**

Para la cuantificación de 8-OHdG y dG se tomaron 100  $\mu$ L de ADN extraído del timo y se inyectaron en el sistema cromatográfico. La cromatografía utilizada fue isocrática en fase reversa con flujo de 1 mL/min; la separación se realizó en una columna supelcosil LC-18 (supelco) con una fase móvil de fosfato monobásico de potasio (JT Baker) 50 mM pH=5.5 y metanol (Sigma grado HPLC) al 8%, con una bomba WATERS 600. El sistema cromatográfico estuvo acoplado a un detector UV-VIS WATERS 485, para detectar la dG a una longitud de onda de 254 nm debido a sus dobles enlaces conjugados y a un detector electroquímico (ANTEC LEYDEN, Intro), el cual permitió identificar el aducto 8-OdHG a 290 mV.

Se determinó la concentración correspondiente de dG y de 8-OHdG integrando el área bajo la curva e interpolando ese valor con la curva patrón correspondiente para cada compuesto. A continuación, la concentración de la molécula 8-OHdG se dividió entre la concentración de dG, y el cociente correspondió al número de bases dañadas que presentaron cada una de las muestras.

## **6.4 Detección de los niveles de expresión relativa de ARNm por qPCR**

### **6.4.1 Obtención de ARN**

Se realizó la purificación de ARN con el kit SV Total ARN Isolation System (Promega). Al tejido disgregado, se le adicionaron 350  $\mu$ L de amortiguador azul SV ARN, se incubó a 70°C por 2 minutos y se centrifugó a 13500 xg durante 10 minutos. El lisado se transfirió a un tubo estéril, al cual, se le adicionaron 200  $\mu$ L de etanol al 95%. Esta solución se colocó en una columna spin (Promega), junto con un tubo

colector (Promega) y se centrifugó a 13500 xg durante un minuto. Se descartó el líquido del tubo colector y a la columna se le añadieron 600 µL de solución de lavado SV ARN; la cual, se centrifugó con las condiciones anteriores. Se preparó una mezcla que incluía 40 µL amortiguador amarillo, 5 µL de MnCl<sub>2</sub> al 0.09 M y 5 µL de DNasa, la cual se adicionó directamente a la membrana de la columna. Se incubó durante 15 minutos a 25°C, se le adicionaron 200 µL de solución SV DNasa “stop” y se centrifugó a 13500 xg durante un minuto. Posteriormente, se le adicionaron 600 µL de solución de lavado SV ARN y se centrifugó a 28500 xg durante 2 minutos. Se tomó la columna y se colocó en un tubo de elución, al cual se le agregaron 100 µL de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 13500 xg durante un minuto (Promega, 2004). El ARN obtenido, fue fraccionado en alícuotas de 10 µL y almacenado a -70°C, hasta su uso.

#### **6.4.2 Determinación de la concentración de ARN**

El ARN se cuantificó mediante espectrofotometría. Se tomaron 10 µL de ARN y se mezclaron con 990 µL de agua: dilución 1/100; la cual se colocó en una celda de cuarzo para realizar la lectura en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Biomate3) a una longitud de onda de 260 nm y mediante la siguiente ecuación se determinó la concentración:

$$[\text{ARN}] \text{ en } \mu\text{g/mL} = (\text{Abs } 260 \text{ nm} \times \text{Factor de Dilución} \times 40 \mu\text{g ARN/mL})$$

Para determinar la pureza del ARN, se utilizó la relación de ADN-ARN/proteínas. La abundancia de proteínas remanentes en el extracto se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. Un buen ARN en calidad y pureza, se consideró aquel, cuya relación A260/A280 se encontró entre 1.7 y 2.0.

La integridad del ARN extraído de cada una de las muestras, se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio, el cual fue visualizado utilizando un fotodocumentador con transiluminador de luz UV (GL 200, Kodak); permitiendo con ello, realizar un análisis comparativo del tamaño del ARN con respecto a un marcador de peso molecular (Invitrogen, EUA) (Posso, 2009).

#### **6.4.3 Retrotranscripción (RT)**

Se utilizaron 10  $\mu$ L de ARN aislado para realizar la síntesis de la primera cadena de ADNc por transcripción reversa. A la alícuota de ARN, se le agregaron 1  $\mu$ L de Oligo (dT)<sub>15</sub> 500 ng (Promega), 1  $\mu$ L de dinucleótidos trifosfatos (dNTP's, Promega) 10 mM y 1  $\mu$ L de DEPC; se homogenizó y se incubó a 65°C por 5 min. Posteriormente, se agregó 1  $\mu$ L de transcriptasa reversa Superscrit III (Life Technologies, EUA), se homogenizó y la RT se llevó a cabo incubando esta mezcla a 50°C por 50 min. Al terminar la reacción, la enzima se inactivó a 70°C durante 15 min., el ADNc (ADN complementario) se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### 6.4.4 Evaluación de la expresión génica mediante qPCR

La evaluación de la expresión génica, se realizó mediante qPCR utilizando la tecnología LightCycler (Roche Applied Science). La amplificación fue realizada en capilares de borosilicato (Roche Diagnostics GmbH). El ADNc se amplificó, utilizando un par de oligonucleótidos iniciadores específicos para cada uno de los genes p53, Nrf2, SOD1, GPx-1, CAT y  $\beta$ -actina (IDT, EUA). Las sondas de hidrólisis tipo TaqMan, fueron tomadas de la Universal ProbeLibrary (Roche Diagnostics GmbH); marcadas con el fluorocromo FAM y se detectó la fluorescencia en el canal uno a 530 nm. En el Cuadro 1 se muestran las secuencias de oligonucleótidos y los números de sondas utilizados para cada uno de los genes analizados.

**Cuadro 1.** Secuencias de oligonucleótidos, temperatura de anillamiento y sondas utilizadas para la amplificación de los genes.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Temp. de alineación (°C)	Sonda
p53	L: AGAGAGCACTGCCACCA	60	55
	R: AACATCTCGAAGCGCTCAC	59	
Nrf2	L: AGCATGATGGACTTGGAATTG	59	3
	R: CCTCCAAAGGATGTCAATCAA	59	
SOD	L: GGTCCAGCGGATGAAGAG	59	5
	R: GGACACATTGGCCACACC	60	
CAT	L: ATCAGGGATGCCATGTTGTT	60	129
	R: GGGTCCTTCAGGTGAGTTTG	59	
GPx	L: CGACATCGAACCCGATATAGA	59	56
	R: ATGCCTTAGGGGTTGCTAGG	60	
$\beta$ -actina	L: CCCGCGAGTACAACCTTCT	60	17
	R: CGTCATCCATGGCGAACT	60	

#### **6.4.5 Curvas de rango dinámico**

El rango dinámico se utilizó para determinar la eficiencia de amplificación y la sensibilidad de la técnica. Para evaluarlo, se realizó una curva estándar elaborada a partir de una muestra control concentrada de ADNc (100 ng), a la que se le efectuaron diluciones seriadas en órdenes de 10 (1:10 y 1:100), respectivamente. La muestra concentrada de ADNc y sus diluciones se amplificaron por duplicado, para cada uno de los genes; se utilizó la siguiente mezcla de reacción para PCR: 5.8  $\mu\text{L}$  de agua, 0.5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los oligonucleótidos (10 $\mu\text{M}$ ), 0.1  $\mu\text{L}$  de sonda TaqMan, 0.1  $\mu\text{L}$  de enzima Light Cycler Uracil-ADN glicosilasa, 2  $\mu\text{L}$  de solución maestra Light Cycler TaqMan Master (Roche Diagnostic GmbH) y 1  $\mu\text{L}$  de ADNc.

Todas las muestras se amplificaron con el siguiente programa de PCR: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min; 30 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C durante 10 seg., alineamiento a 60°C durante 30 seg., seguida de la extensión a 72°C durante 1 seg. La intensidad de fluorescencia se registró al final de cada ciclo de PCR.

De la curva obtenida, se calculó la correlación lineal entre los valores de Cp (crossing point) y del logaritmo de la concentración, para determinar la eficiencia de amplificación. El Cp es un número fraccional que indica cuantos ciclos le tomó a cada muestra, generar cantidad suficiente de fluorescencia para llegar a un umbral de detección. El valor del Cp fue calculado por el software del Light Cycler (Roche Applied Science).

La fórmula empleada para calcular la eficiencia de amplificación fue la siguiente:

$$N=N_0 \times E^{Cp}$$

Donde:

N= número de moléculas obtenidas en cada ciclo

N<sub>0</sub>= número inicial de moléculas

E= eficiencia de amplificación

Cp= número de ciclo de detección del umbral

Con la eficiencia de la amplificación se comprobó la efectividad de la sonda y de los oligonucleótidos utilizados para cada uno de los genes.

#### **6.4.6 Niveles de expresión relativa del ARNm de los genes p53, Nrf2, SOD, GPx y CAT**

Para el análisis de la expresión relativa del ARNm de cada uno de los genes, se procedió a evaluar la expresión del gen de interés y el de referencia en cada muestra problema, así como, para el calibrador (muestra positiva que establece la relación entre el gen de interés y el de referencia) en cada corrimiento. Posteriormente los resultados se normalizaron con el gen de expresión constante para asegurar que las variaciones observadas en la expresión, fueron realmente debidas a cambios de expresión y no a una cantidad variable de muestra añadida entre los ensayos.

Como primer paso para normalizar el valor de Cp, se obtuvo la diferencia entre los valores obtenidos del calibrador y el de la muestra problema del gen de interés; a este valor, se le adicionó la diferencia de los valores obtenidos de la muestra problema y del calibrador del gen de referencia, utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = [\text{gen de interés (calibrador)} - \text{gen de interés (problema)}] + [\text{gen de referencia (problema)} - \text{gen de referencia (calibrador)}]$$

Finalmente estos valores, fueron expresados en unidades arbitrarias relativas, utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , para cada uno de los genes de interés p53, Nrf2, SOD, GPx y CAT después de que fueron normalizados con el gen de referencia  $\beta$ -actina; tanto para el grupo control como para el experimental.

## **7. Análisis estadístico**

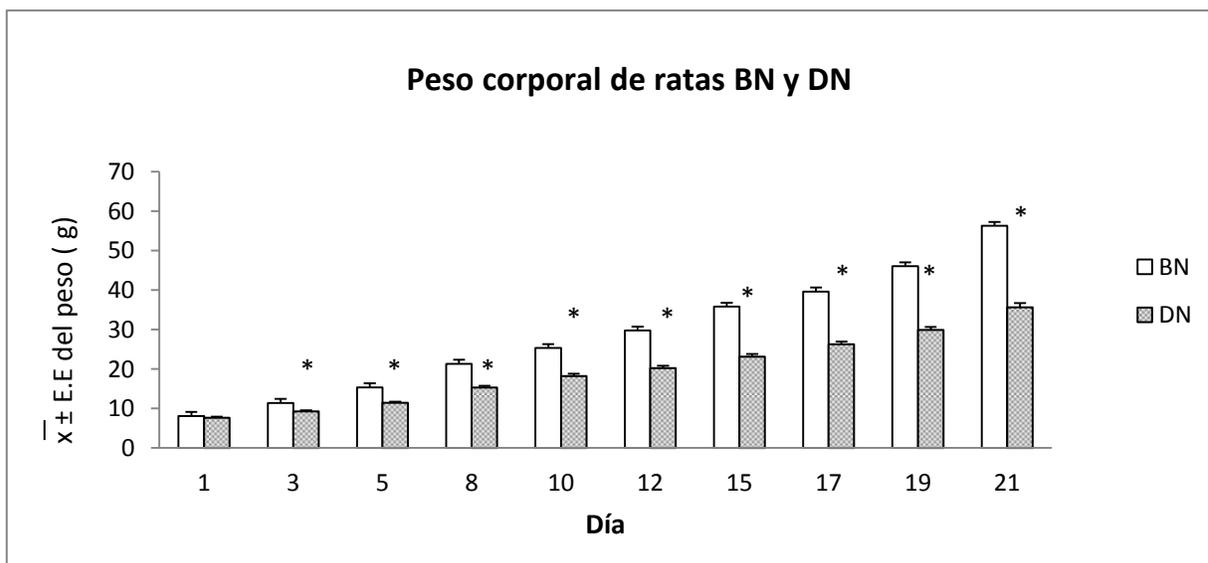
Los datos obtenidos fueron expresados como el promedio  $\pm$  E.E de los diferentes ensayos. Las diferencias entre los grupos experimentales con respecto al grupo control (BN) para la evaluación de la cuantificación de la molécula 8-OHdG, así como, las diferencias entre el grupo control (BN) y grupos experimentales para el caso de la expresión de los ARNm fueron evaluadas con la prueba U de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa StatPlus2009, considerándose diferencias estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0.05$ .

## 8. Resultados

### 8.1 Generalidades de los diferentes grupos de estudio

#### 8.1.1 Peso corporal

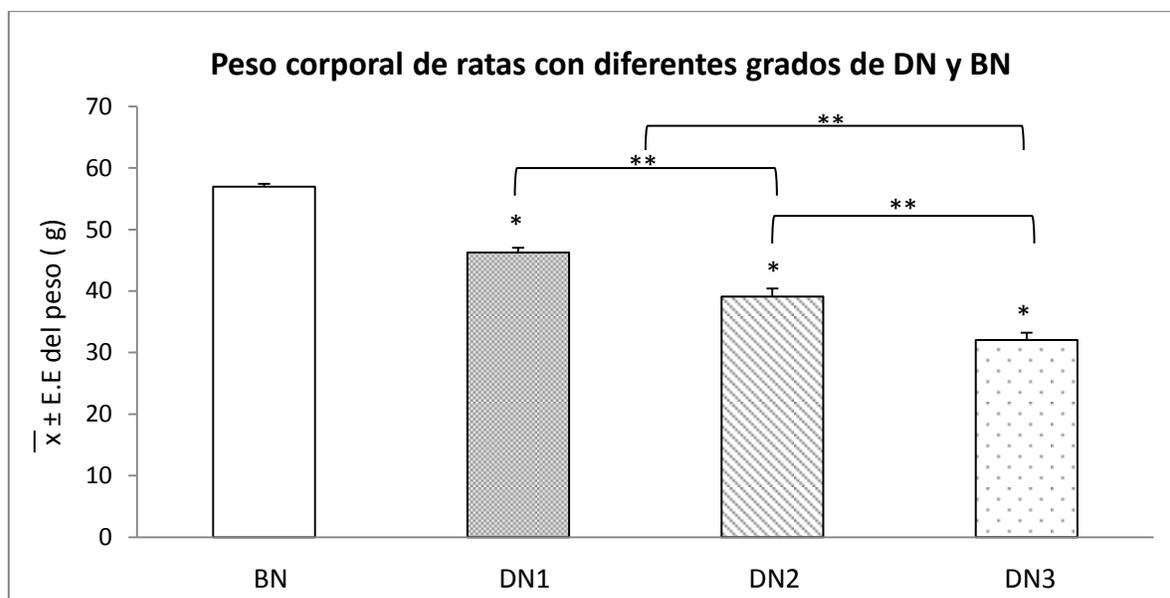
El grupo control estuvo conformado por 5 ratas bien nutridas, de las cuales 3 fueron hembras y 2 machos; mientras que el grupo experimental estuvo conformado por 15 ratas desnutridas, 10 hembras y 5 machos, divididas en tres grupos según el grado de desnutrición (DN1, DN2 y DN3); de cada una de las ratas de ambos grupos, se llevó el registro de peso corporal en gramos cada tercer día, desde el día uno al 21 después de su nacimiento. En la Figura 5 se presentan los promedios  $\pm$  E.E. de peso corporal de las ratas DN y BN desde el día uno al día 21 después de su nacimiento. En donde se puede observar para el caso de las DN, un déficit de peso estadísticamente significativo desde el día tres, el cual persistió hasta el día 21, en comparación con el grupo control de la misma edad.



**Figura 5.** Peso corporal (g) de ratas BN y DN del día 1 después de su nacimiento a los 21 días de edad. BN n=5 Y DN n=15. (\* $p < 0.05$ ) Diferencias estadísticamente significativas en ratas DN con respecto al grupo BN de la misma edad desde el día 3-21 después de su nacimiento.

### 8.1.2 Grado de desnutrición

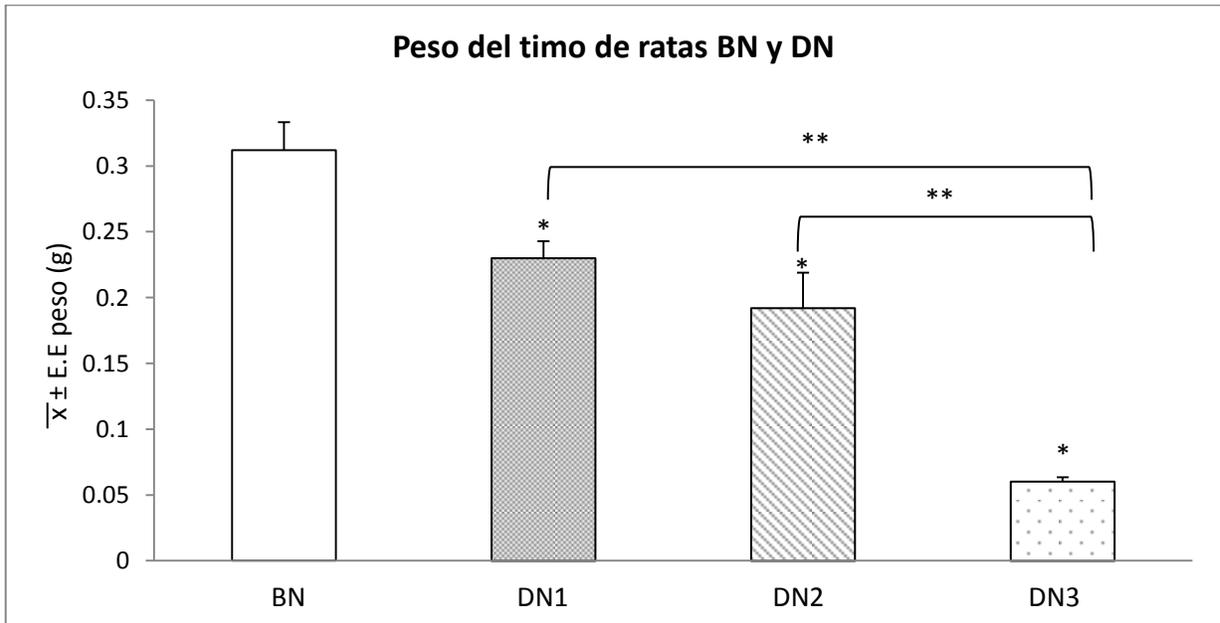
Los análisis se realizaron en cinco ratas BN con un peso corporal de  $56.94 \pm 0.5$  g y en cinco que presentaron cada uno de los grados de desnutrición, las ratas DN1 presentaron un peso corporal de  $46.26 \pm 0.75$  g y un déficit de peso de 18.74%, las DN2 tuvieron un peso de  $39.1 \pm 1.33$  g y un déficit de peso del 31.14% y las DN3 un peso corporal de  $32.04 \pm 1.16$  g y un déficit de peso de 43.73%, en comparación con el peso promedio de las ratas BN. En la Figura 6 se muestra el peso corporal de los grupos de ratas con diferentes grados DN y BN a los 21 días de edad. En donde se puede apreciar la disminución de peso en las ratas con diferentes grados de desnutrición en comparación con las ratas bien nutridas. Así mismo, existen diferencias estadísticas entre los diferentes grados de desnutrición.



**Figura 6.** Peso corporal de ratas BN y con diferentes grados de desnutrición a los 21 días de edad. BN  $n=5$ , DN1  $n=5$ , DN2  $n=5$  y DN3  $n=5$ . (\* $p<0.05$ ) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con BN y (\*\* $p<0.05$ ) entre grupos. Prueba U de Mann Whitney.

### 8.1.3 Peso del timo

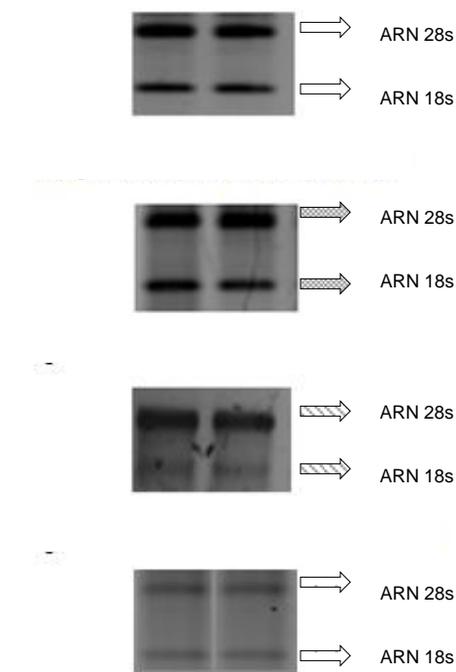
Además del peso corporal, a los 21 días de edad se registró el peso del timo de las ratas BN, DN1, DN2 y DN3, las ratas desnutridas presentaron déficits de peso del 26%, 40% y 80% respectivamente, en comparación con el peso del timo de las ratas BN de la misma edad. La Figura 7, muestra la disminución del peso del timo en los tres grupos de ratas desnutridas en comparación con el grupo control. De la misma manera que ocurrió con el peso corporal, se pudo apreciar que existen diferencias significativas en el peso del timo de ratas con DN3 en comparación con el peso del timo de las ratas DN1 y DN2. Así mismo, se obtuvo una correlación positiva igual a 0.9193 entre el peso corporal de los diferentes grupos analizados y el peso del timo.



**Figura 7.** Peso del timo  $\pm$  E.E en ratas BN, DN1, DN2 y DN3 a los 21 días de edad. BN n=5, DN1 n=5, DN2 n=5 y DN3 n=5. (\* $p < 0.05$ ) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con BN y (\*\* $p < 0.05$ ) entre grupos. Prueba U de Mann Whitney.

### 8.1.4 Integridad del ARN

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa, para verificar la integridad del ARN extraído a partir de un kit comercial y mediante un fotodocumentador con transiluminador de luz UV, se pudieron visualizar las imágenes de la Figura 8, en la que se observa el gel de integridad del ARN con una banda superior que corresponde al ARNr 28s y una banda inferior que corresponde al ARNr 18s. Se muestran las imágenes de integridad del ARN extraído de dos ratas BN, dos de cada grado de desnutrición.



**Figura 8.** Imágenes que muestran la integridad del ARN de ratas BN, DN1, DN2 y DN3 de 21 días de edad, en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

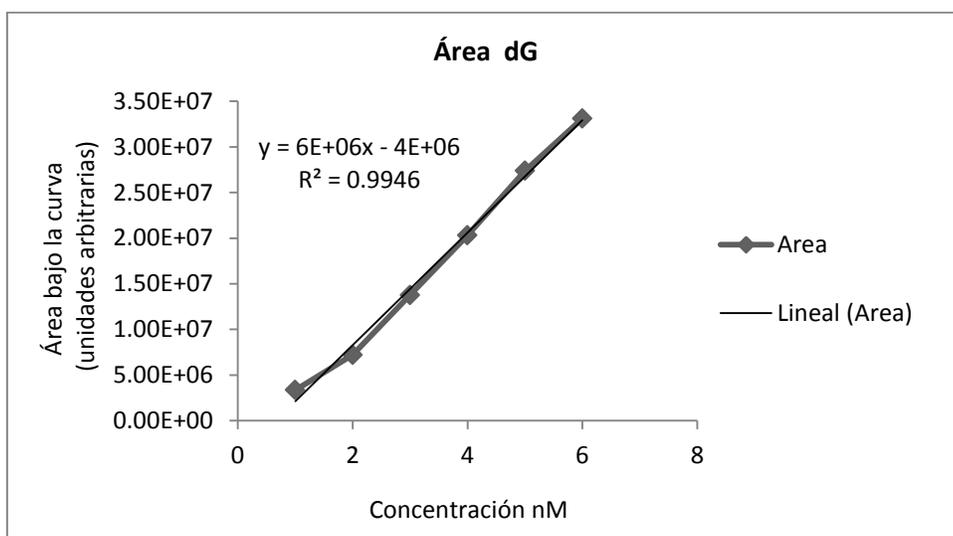
## **8.2 Daño al ADN inducido por estrés oxidante**

### **8.2.1 Pureza del ADN y cuantificación de estándares de dG y 8-OHdG**

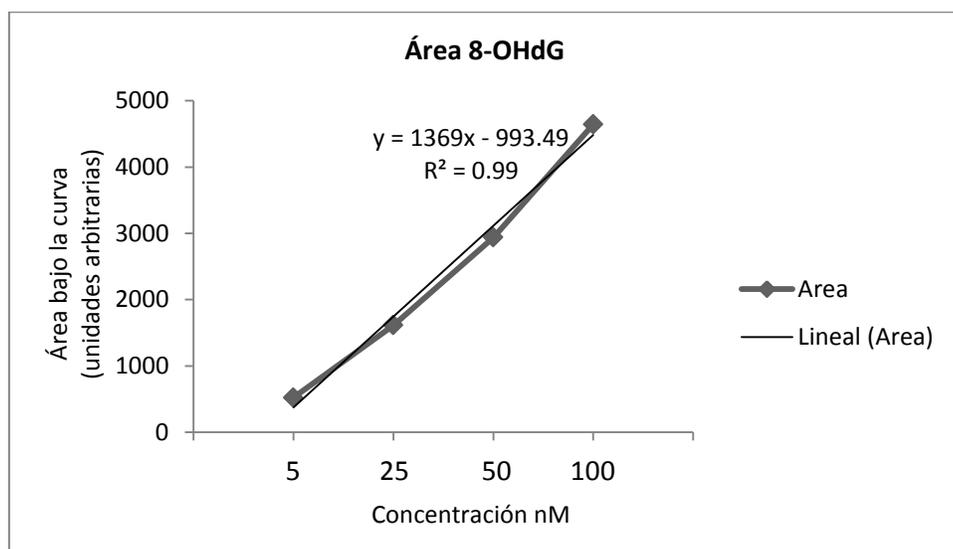
La pureza del ADN extraído en base al criterio del índice de absorbancia 260/280 fue superior a 1.5 en todas las muestras. Para determinar el daño al ADN por estrés oxidante se utilizó la técnica de HPLC-EC, mediante la cual se cuantificaron los niveles del aducto 8-OHdG y de dG. Las curvas patrón de los estándares comerciales de dG (Figura 9) y de 8-OHdG (Figura 10), se corrieron en el sistema cromatográfico respectivamente, obteniéndose los tiempos de retención y las áreas bajo la curva. La dG tuvo un tiempo de retención de 10.15 minutos observado con el detector UV-VIS, mientras que la molécula 8-OHdG fue retenida a los 16 minutos y evidenciada con el detector EC. Las curvas patrón tuvieron un coeficiente de correlación de 0.99 para dG y para 8-OHdG; además, se obtuvieron las pendientes y las ordenadas al origen que sirvieron para determinar las siguientes ecuaciones de la recta:  $y=6 \times 10^6 x - 4 \times 10^6$  para dG;  $y=1369x - 993.49$  para 8-OHdG, a partir de las que se calcularon las concentraciones de dG y de 8-OHdG.

Mediante la técnica de HPLC se obtuvieron los cromatogramas representativos de cada una de las muestras de ADN hidrolizado de timo, tanto de ratas BN como de las DN. En la Figura 11 se muestra el cromatograma de una muestra de ADN aislado de timo de rata BN hidrolizado enzimáticamente, a un tiempo de retención de 10.15 minutos con un detector UV-VIS a 254 nm. En donde,

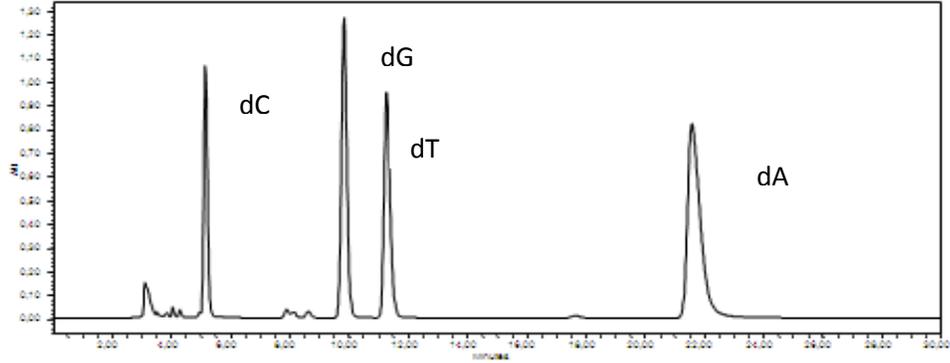
se puede apreciar el pico de dG; así mismo, los picos correspondientes a los tres nucleósidos derivados de la hidrólisis del ADN.



**Figura 9.** Curva patrón estándar de dG identificada con un detector UV-VIS a una longitud de onda de 254nm.

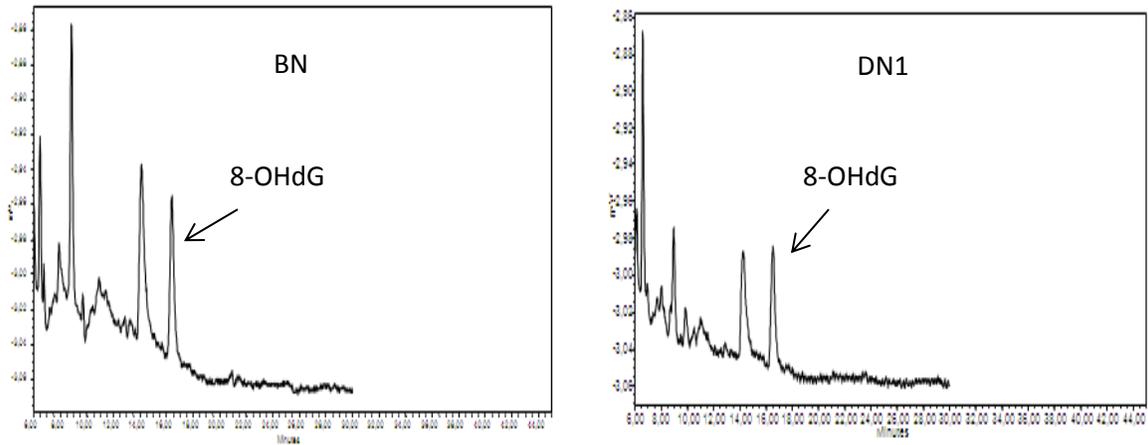


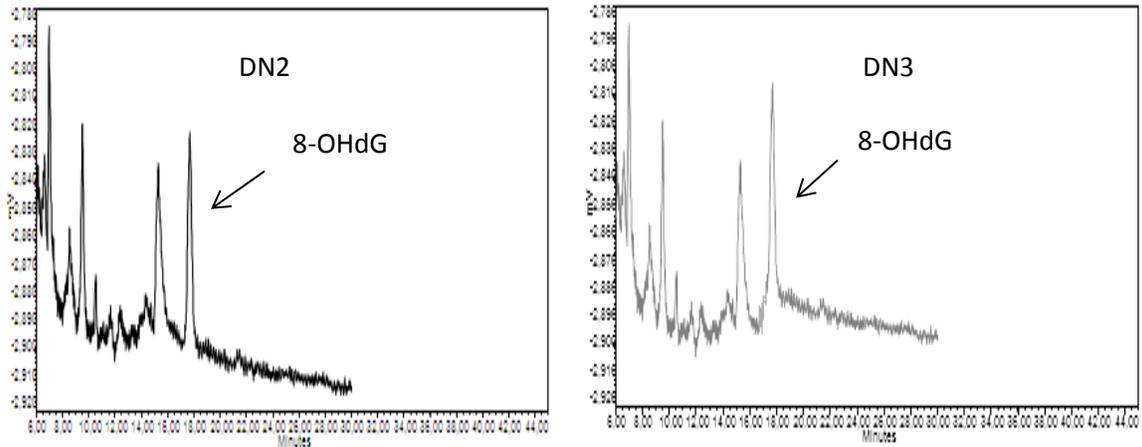
**Figura 10.** Curva patrón estándar de 8-OHdG identificada con un detector electroquímico a 290mV.



**Figura 11.** Cromatograma de una muestra de ADN aislado de timo de rata BN hidrolizado enzimáticamente. En donde se puede apreciar el pico de dG identificado mediante un detector UV-VIS a 254 nm.

En la Figura 12 se puede observar el pico del aducto 8-OHdG identificado con el detector electroquímico a 290 mV mediante la técnica de HPLC, con un tiempo de retención de 16 minutos, a partir de ADN hidrolizado de muestras de una rata del grupo BN, DN1, DN2 y DN3 respectivamente.

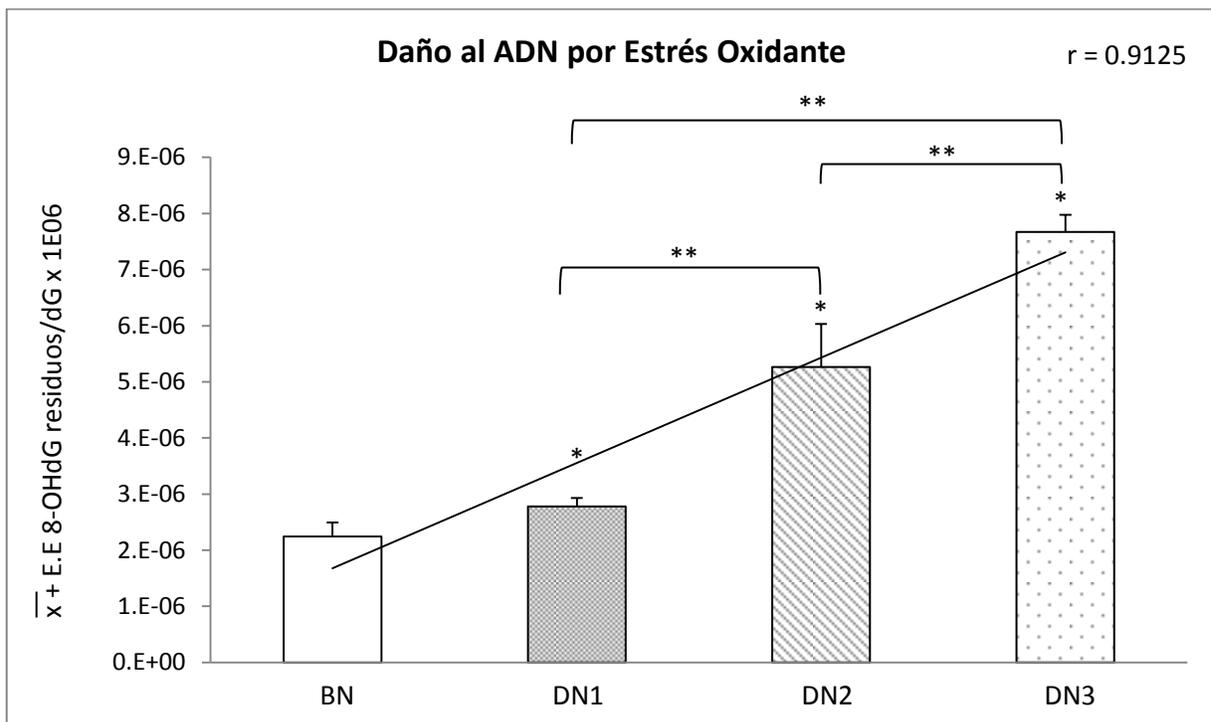




**Figura 12.** Identificación del aducto 8-OHdG mediante HPLC. Cromatogramas representativos de muestras de ADN hidrolizado de timo. Se puede observar el aducto 8-OHdG identificado con el detector EC-290mV de ADN en una muestra de rata BN, DN1, DN2 y DN3 respectivamente.

Para determinar el daño inducido por estrés oxidante presente en el ADN hidrolizado de timo de ratas BN, DN1, DN2 y DN3, se calcularon las concentraciones de dG y del aducto 8-OHdG de cada una de las muestras integrando el área bajo la curva y utilizando las ecuaciones de la recta obtenidas a partir de las curvas patrón. En base a ello, se obtuvo la relación de la molécula 8-OHdG y de dG del ADN de cada una de las muestras. El daño al ADN cuantificado y expresado como el cociente de la concentración de 8-OHdG/dG para el grupo control fue de  $2.246 \pm 0.2448$ , para las ratas DN1 fue de  $2.779 \pm 0.1585$  con un aumento del 23.7%, para las ratas DN2 fue de  $5.246 \pm 0.767$  con un aumento del 133.5% y para las ratas DN3 fue de  $7.671 \pm 0.307$  con un aumento del 241.5%, en comparación al daño por estrés oxidante observado en el timo de ratas BN. Así mismo, se observó una correlación positiva igual a 0.9125. En la Figura 13 se muestra el daño por estrés oxidante del ADN de

timo de ratas BN y DN a los 21 días de edad. Se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de ratas DN con respecto al grupo de las BN, así como, diferencias significativas entre los diferentes grados DN.

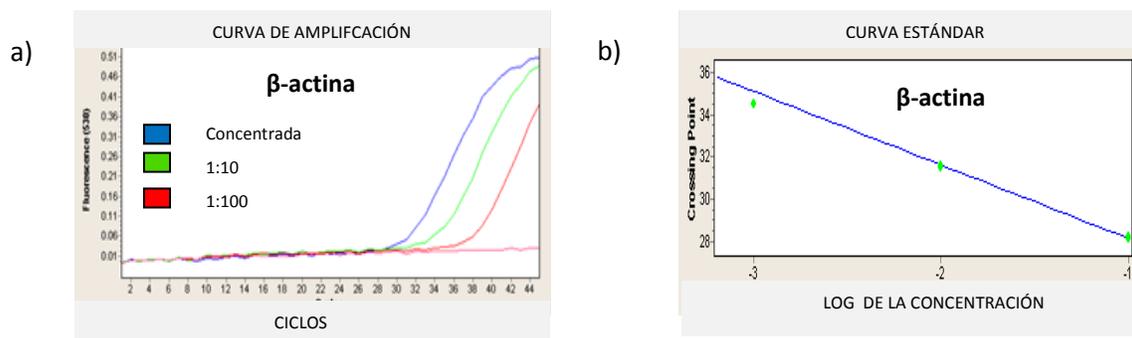


**Figura 13.** Daño al ADN por estrés oxidante de tимо de ratas BN, DN1, DN2 y DN3 de 21 días de edad, evaluado mediante HPLC. (\* $p < 0.05$ ) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con BN y (\*\* $p < 0.05$ ) entre grupos. Prueba U de Mann Whitney.

## 8.3 Expresión relativa de los ARNm

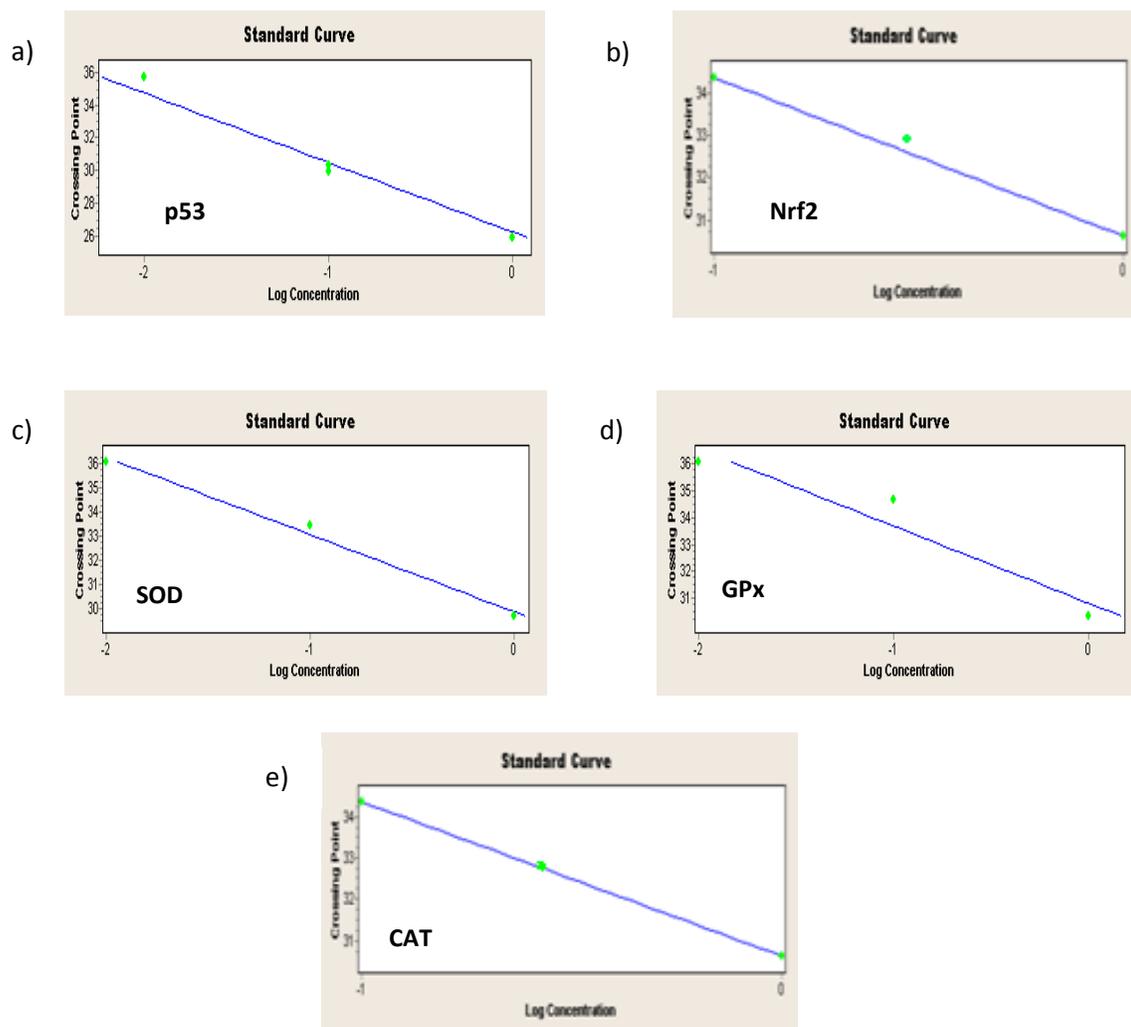
### 8.3.1 Curva de rango dinámico y curvas estándar.

Para establecer la eficiencia de amplificación y la sensibilidad de la técnica se realizó una curva de rango dinámico, a partir de una muestra de ADNc de una rata bien nutrida diluida serialmente (concentrada, 1:10 y 1:100) (Figura 14a). Se calculó la correlación lineal entre los valores de Cp (crossing point) y del logaritmo de la concentración para determinar la eficiencia de amplificación, la curva estándar tuvo una eficiencia de 1.941 para  $\beta$ -actina (Figura 14b).



**Figura 14.** Curvas de rango dinámico y correlación lineal para el gen constitutivo ( $\beta$ -actina), obtenidas a partir de la curva de amplificación y curva patrón respectivamente con una eficiencia de 1.941.

Mientras que para p53 se tuvo una eficiencia de 2.068 (Figura 15a), Nrf2 una eficiencia de 1.854 (Figura 15b), SOD de 2.068 (Figura 15c), GPx una eficiencia de 2.226 (Figura 15d), y para CAT una eficiencia de 1.956 (Figura 15e).

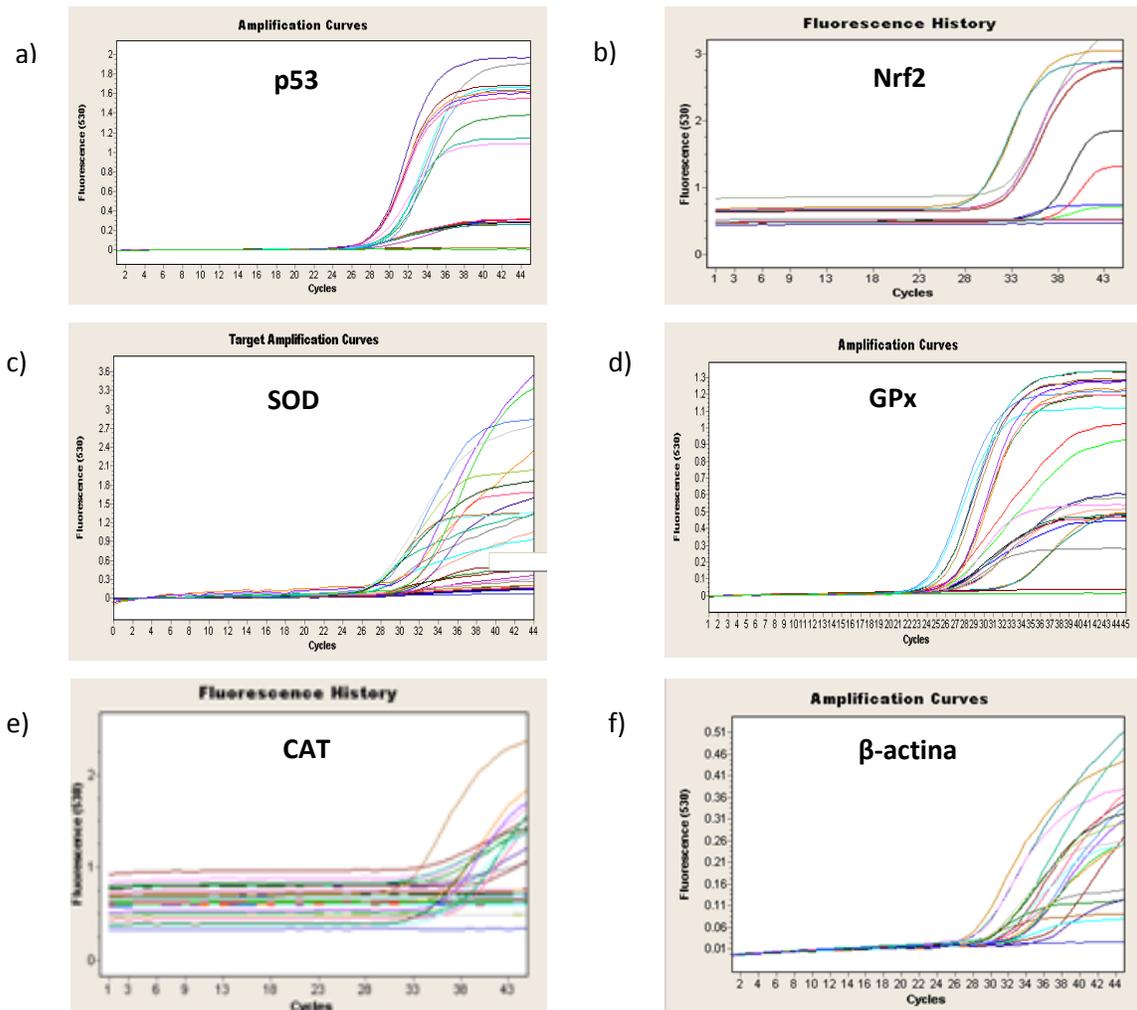


**Figura 15.** Curvas estándar de p53, Nrf2, SOD, GPx y CAT, obtenidas a partir de diluciones seriales de ADNc, amplificado por qPCR. La eficiencia y el error fueron cercanos a 2.0 y 0.05 respectivamente.

### 8.3.2 Curvas de amplificación

Para determinar la expresión relativa de los ARNm de p53, Nrf2, SOD, GPx, CAT y  $\beta$ -actina se realizaron curvas de amplificación por duplicado de cada una de las muestras tanto de ratas BN, como de las ratas con diferentes grados de desnutrición. En la Figura 16 se muestran las curvas de amplificación para cada uno

de los genes: p53 (Figura 16a), Nrf2 (Figura 16b), SOD (Figura 16c), GPx (Figura 16d), CAT (Figura 16e), así como, del gen constitutivo  $\beta$ -actina (Figura 16f).

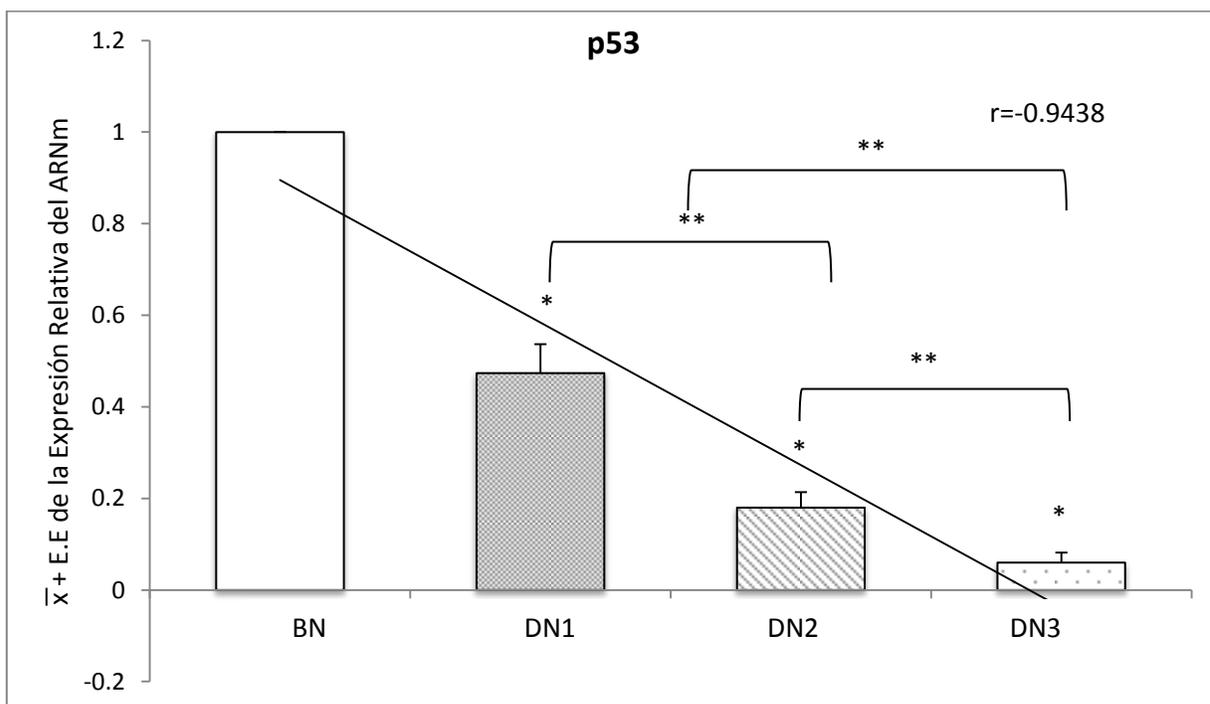


**Figura 16.** Curvas de amplificación del ARNm del gen p53, SOD, GPx, CAT y  $\beta$ -actina, respectivamente. Representación del aumento de la fluorescencia producido durante el transcurso de la reacción, de muestras por duplicado de ratas BN, con DN1, DN2 y DN3.

### 8.3.3 Expresión del ARNm de los genes p53, Nrf2, SOD, GPx, y CAT

A partir de las curvas de amplificación se obtuvieron los valores de Cp, para cada uno de los genes de interés y mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  se determinó la expresión relativa de los ARNm de p53, Nrf2, SOD, GPx y CAT; para ello, se cuantificó la expresión del gen de interés en ratas bien nutridas y con diferentes grados de desnutrición y de igual forma para el gen de referencia, representado en este caso, por el gen constitutivo  $\beta$ -actina. Los valores, fueron expresados en unidades arbitrarias relativas. Se comparó la expresión génica de las ratas con DN1 contra las que presentaron DN2 y DN3 y el de éstas, contra las bien nutridas; de cada uno de los genes de interés para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas.

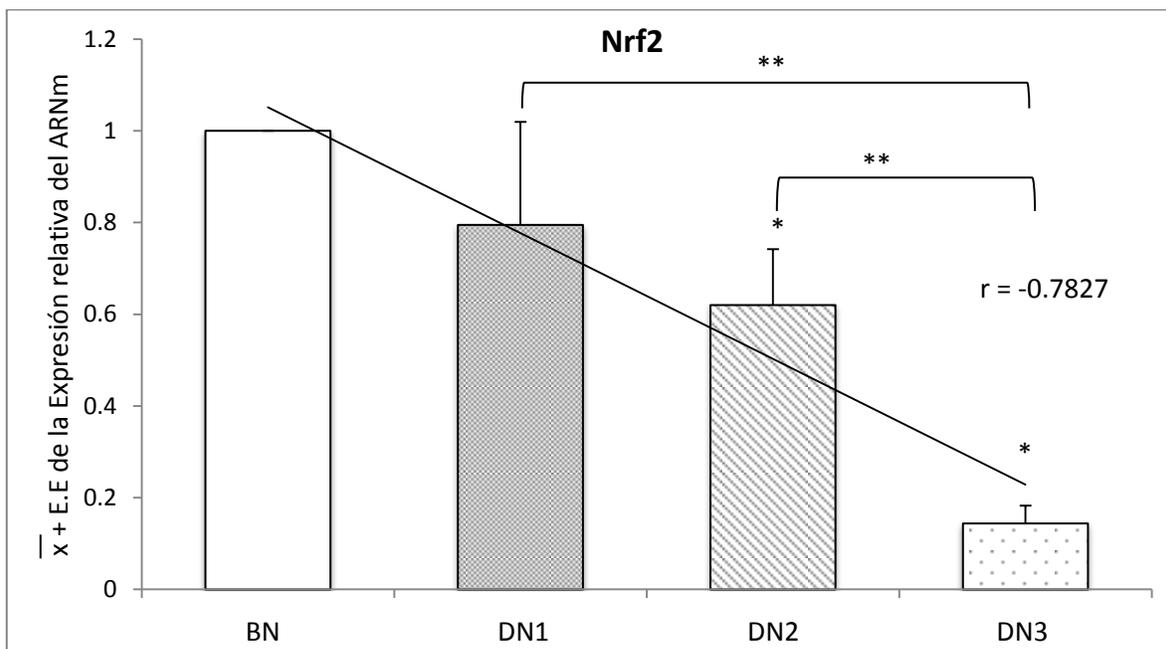
En la Figura 17 se presentan los niveles de expresión relativa del ARNm del gen p53 en ratas BN, DN1, DN2 y DN3. En donde se puede apreciar que en el caso de las ratas con desnutrición existe una disminución significativa en los niveles de expresión relativa del ARNm con respecto a las BN, BN Cp=1, DN1 Cp=0.4734 con una disminución del 52%, DN2 Cp=0.18 con una disminución del 82% y DN3 Cp=0.06 con una disminución del 94% en comparación con la expresión relativa del ARNm de las ratas bien nutridas. Al comparar los grupos de desnutrición se pudo observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de desnutrición. Así mismo, se obtuvo una correlación de negativa igual a 0.9438.



**Figura 17.** Expresión del ARNm de p53 en timo de ratas. Nivel de expresión relativa del ARNm del gen p53 en ratas DN1, DN2, DN3 y BN, los cuales se normalizaron con la expresión del ARNm de  $\beta$ -actina. Resultados de cinco determinaciones independientes por duplicado. (\* $p < 0.05$ ) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con BN y (\*\* $p < 0.05$ ) entre grupos. Prueba U de Mann Whitney.

En cuanto a la expresión relativa del ARNm del gen Nrf2, se graficaron los niveles de expresión que presentaron las ratas BN, DN1, DN2 y DN3 respectivamente. En la Figura 18 se puede apreciar que en el caso de las ratas DN2 y DN3 existe una disminución significativa en los niveles de expresión relativa del ARNm con respecto a las BN, (BN Cp=1, DN2 Cp=0.62 con una disminución del 38% y DN3 Cp=0.144 con una disminución del 85.6% en comparación a los niveles de expresión de las ratas BN). Sin embargo, en el caso de las ratas DN1 Cp=0.7948 con una disminución de los niveles de expresión del 20.52%, no se observó diferencia significativa con respecto al grupo control. Al comparar los grupos de desnutrición se

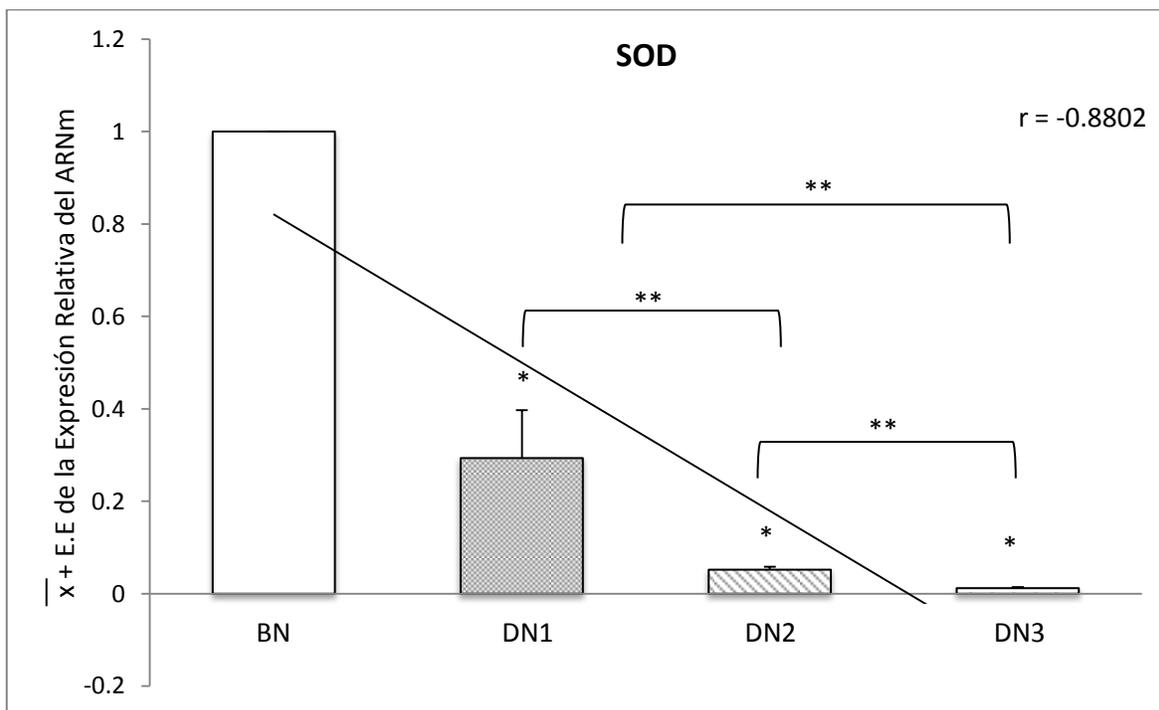
pudo observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grados de desnutrición. Así mismo, se obtuvo una correlación negativa con un valor de -0.7827.



**Figura 18.** Expresión del ARNm de Nrf2 en timo de ratas. Nivel de expresión relativa del ARNm del gen Nrf2 en ratas DN1, DN2, DN3 y BN por qPCR, los cuales se normalizaron con la expresión del ARNm de  $\beta$ -actina. Resultados de cinco determinaciones independientes por duplicado. (\* $p < 0.05$ ) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con BN y (\*\* $p < 0.05$ ) entre grupos. Prueba U de Mann Whitney.

Los niveles de la expresión del ARNm de SOD tuvieron los siguientes valores: BN Cp=1, DN1 Cp=0.2934 con una disminución del 70.66%, DN2 Cp=0.052 con una disminución del 94.8% y DN3 Cp=0.012 con una disminución del 98% en comparación con los niveles de expresión del ARNm de las ratas bien nutridas, respectivamente y una correlación de tipo negativa con un valor de  $r = -0.8802$ . En la Figura 19 se puede observar diferencias significativas entre los grupos de ratas

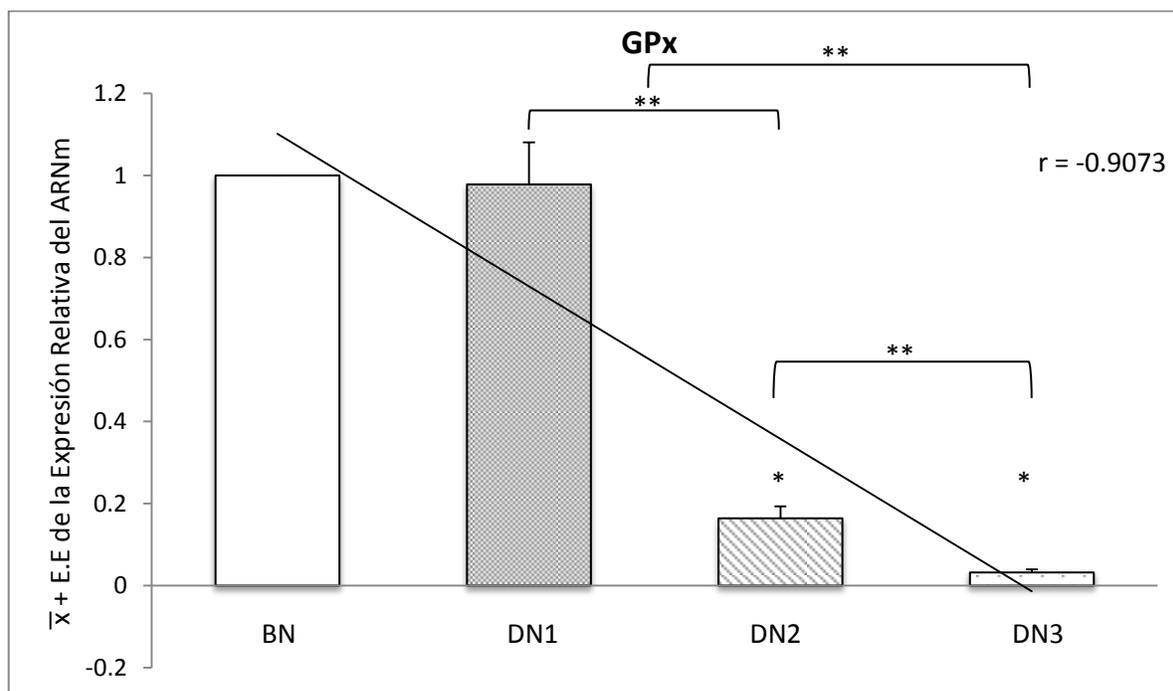
desnutridas con respecto al grupo control, así como, diferencias entre los diferentes grados de desnutrición (Figura 19).



**Figura 19.** Expresión del ARNm de SOD en timo de ratas. Nivel de expresión relativa del ARNm del gen SOD en ratas DN1, DN2, DN3 y BN por qPCR, los cuales se normalizaron con la expresión del ARNm de  $\beta$ -actina. Resultados de cinco determinaciones independientes por duplicado. (\* $p < 0.05$ ) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con BN y (\*\* $p < 0.05$ ) entre grupos. Prueba U de Mann Whitney.

En cuanto a la expresión de GPx se tuvieron los siguientes valores: BN Cp=1, DN1 Cp=0.9782 con una disminución del 2.2%, DN2 Cp=0.164 con una disminución del 83.6% y DN3 Cp=0.032 con una disminución del 96.8% con respecto a los niveles de expresión de las ratas bien nutridas. Así mismo, se pudo observar una correlación negativa con un valor de  $r = -0.9073$ . De igual manera a lo observado en

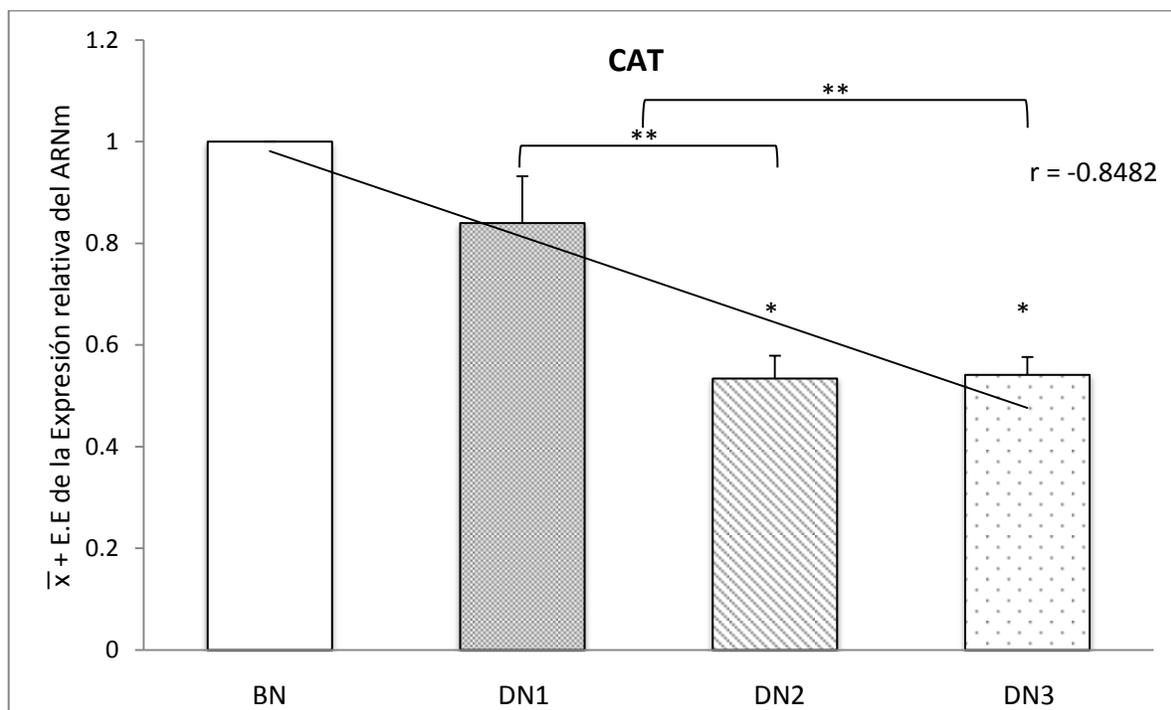
los niveles de expresión relativa del ARNm del gen Nrf2 sólo se pudieron observar diferencias significativas en los grupos de ratas DN2 y DN3 con respecto al grupo control, sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de ratas desnutridas (Figura 20).



**Figura 20.** Expresión del ARNm de GPx en timo de ratas. Nivel de expresión relativa del ARNm del gen GPx en ratas DN1, DN2, DN3 y BN por qPCR, los cuales se normalizaron con la expresión del ARNm de  $\beta$ -actina. Resultados de cinco determinaciones independientes por duplicado. (\* $p < 0.05$ ) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con BN y (\*\* $p < 0.05$ ) entre grupos. Prueba U de Mann Whitney.

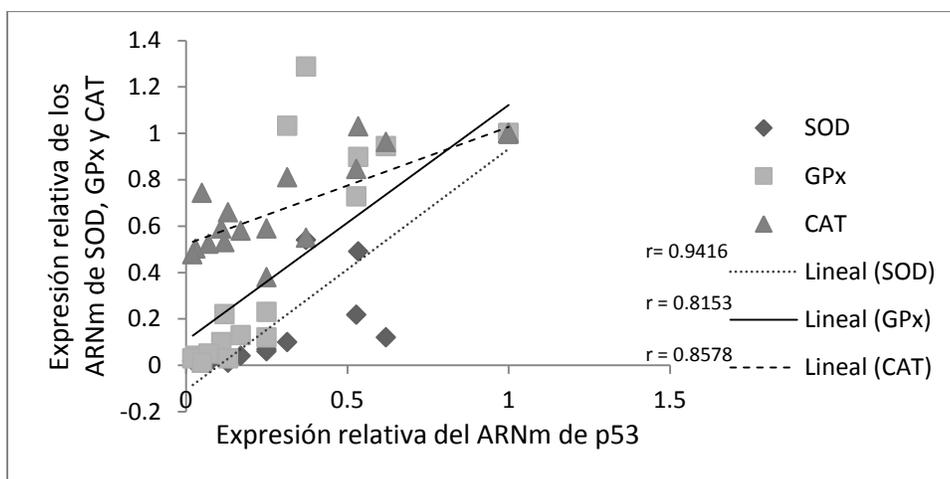
Los valores obtenidos en cuanto a la expresión de CAT fueron los siguientes: BN Cp=1, DN1 Cp=0.8938 con una disminución del 11%, DN2 Cp=0.534 con una disminución del 46.6% y DN3 Cp=0.5412 con una disminución del 46% con respecto a la expresión del ARNm de las ratas bien nutridas. Así mismo, se pudo observar una

correlación de negativa con un valor de  $r = -0.8482$ . En la Figura 21 se representan gráficamente estos valores, en donde se puede apreciar que para el gen CAT solo existieron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas DN2 y DN3 en comparación con el grupo control, aunque para las ratas DN1 no se pudo observar diferencias significativas en comparación al grupo control, existe una disminución en sus niveles de expresión. Así mismo, entre grupos de ratas desnutridas sólo existieron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas DN2 y DN3 con respecto al grupo de las ratas DN1.

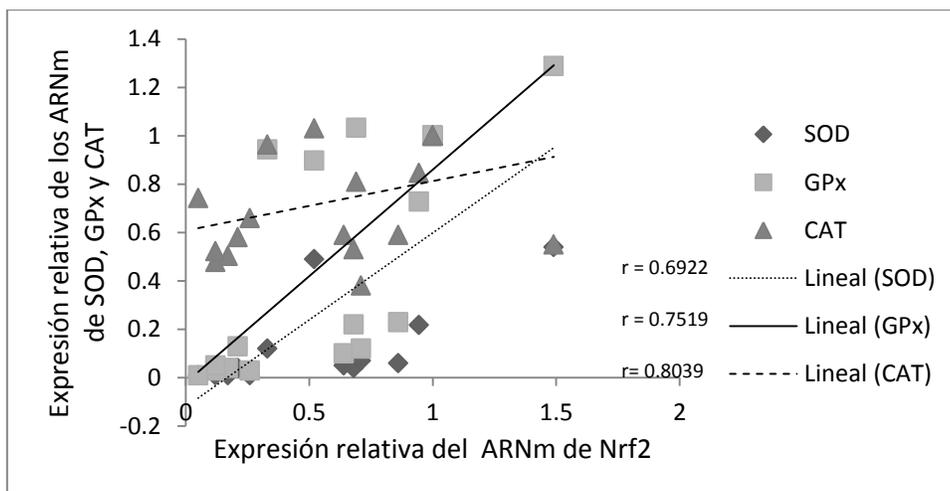


**Figura 21.** Expresión del ARNm de CAT en timo de ratas. Nivel de expresión relativa del ARNm del gen CAT en ratas DN1, DN2, DN3 y BN por qPCR, los cuales se normalizaron con la expresión del ARNm de  $\beta$ -actina. Resultados de cinco determinaciones independientes por duplicado. (\* $p < 0.05$ ) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con BN y (\*\* $p < 0.05$ ) entre grupos. Prueba U de Mann Whitney.

Adicionalmente, para establecer si existía una correspondencia entre los genes p53 y Nrf2 con los genes SOD, GPx, y CAT se obtuvieron los siguientes valores del índice de correlación ( $r$ ): para el gen p53 se obtuvo una correlación positiva SOD = 0.9416, GPx = 0.8153 y CAT = 0.8578 (Figura 22). Así mismo, los valores para el caso de Nrf2 fueron los siguientes: SOD = 0.6922, GPx = 0.7519 y CAT = 0.8039 (Figura 23).

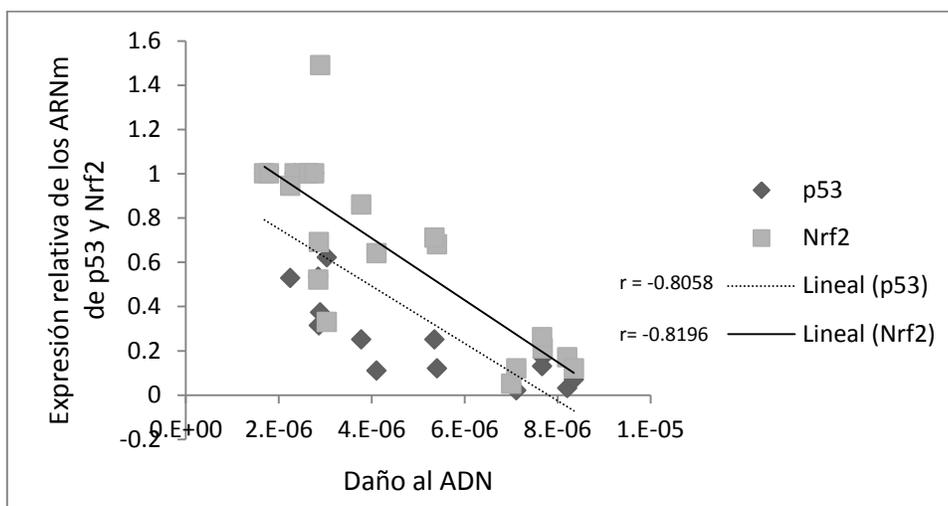


**Figura 22.** Correlación lineal entre la expresión relativa del ARNm de p53 y de genes que codifican para enzimas antioxidantes SOD, GPx y CAT.



**Figura 23.** Correlación lineal entre la expresión relativa del ARNm de Nrf2 y de genes que codifican para enzimas antioxidantes SOD, GPx y CAT.

Para establecer si el daño al ADN por estrés oxidante estaba asociado a cambios en los niveles de expresión relativa de los ARNm de p53 y Nrf2, se procedió a obtener la correlación lineal obteniéndose valores negativos tanto para p53, como para Nrf2 iguales a -0.8058 y -0.8195 respectivamente, observados en la Figura 24.



**Figura 24.** Correlación del daño al ADN con respecto a los niveles de expresión relativa de los ARNm de p53 y Nrf2.

## 9. Discusión

Una de las características de la desnutrición infantil es que la relación peso con respecto a la edad cronológica disminuye (Gómez et al., 1956), lo que también ha sido observado en modelos experimentales (Cortés et al., 2001).

En el presente estudio se pudo apreciar una disminución en la ganancia de peso corporal en las ratas DN en comparación con el peso de las BN de la misma edad, el que fue persistente desde el día tres al día 21 después de su nacimiento, esto muestra que el proceso de desnutrición por competencia provoca una disminución en la cantidad de alimento que recibe cada una de las crías, lo que es suficiente para obtener organismos con diferentes grados de DCP, como lo establecieron previamente Ortiz y colaboradores (1996).

Por otro lado, se ha demostrado que una baja cantidad o una mala calidad de los alimentos ingeridos provoca un estado nutricional deteriorado, el que afecta casi todos los mecanismos de defensa inmunológica (Prudhon, 2002), favoreciendo el establecimiento de procesos infecciosos (Rodríguez et al., 2005). Estos mecanismos son mediados en su mayoría por células originadas o maduras en los órganos linfoides, que se sabe son altamente susceptibles a los efectos de la desnutrición (Savino et al., 2007); la desnutrición particularmente tiene un fuerte impacto en el tamaño de estos órganos, y afecta al timo más que a otros (Ortiz et al., 2000). Asociado con lo anterior, se ha observado disminución en la cantidad de esplenocitos (Cortés et al., 2008) y timocitos en organismos desnutridos (Feliu y Slobodianik, 2002), en comparación con los organismos bien nutridos de la misma edad.

En el presente trabajo, se observó un déficit de peso en el timo de ratas DN en comparación con el peso del timo de las BN de 21 días de edad, el cual fue notablemente mayor en las ratas con un mayor déficit de peso corporal. Adicionalmente a ello, se obtuvo una correlación positiva entre el peso corporal de las ratas de los diferentes grupos analizados con respecto al peso del timo de las mismas; es decir, el peso corporal es directamente proporcional al peso del timo. Sin embargo, la disminución en el tamaño del timo no es la única alteración que se ha reportado asociada con la desnutrición, pues se ha observado que en el timo de ratas desnutridas se presentan alteraciones en las proporciones de las subpoblaciones de timocitos, las que pudieran ser causadas por la deficiencia de nutrimentos en el microambiente del timo, y repercutir en la diferenciación de los timocitos (Ortíz et al., 2000).

Se han realizado diversos trabajos en los que se han determinado los efectos de la desnutrición sobre los mecanismos de defensa antioxidante tanto en niños (Reid et al., 2000; Ahmed et al., 2009), como en animales de experimentación (Jimoh et al., 2005; Feoli et al., 2006). En los cuales, se ha apreciado una disminución en los niveles de moléculas con función antioxidante, en su mayoría de tipo no enzimáticas y una disminución de ciertos oligoelementos involucrados en la protección contra el daño oxidante como el selenio y el zinc (Becker et al., 1994; Ashour et al., 1999).

Conjuntamente existen trabajos, en los que se ha reportado en los organismos desnutridos, disminución en la actividad de ciertas enzimas como SOD (Savitri et al., 2004) y GPx (Ashour et al., 1999) en comparación con los organismos bien nutridos,

esto podría explicar el incremento de daño por estrés oxidante en biomoléculas como lípidos y proteínas, que son fundamentales para el correcto funcionamiento de las células (Jimoh et al., 2005; Feoli et al., 2006).

Las concentraciones bajas de estas moléculas antioxidantes y la reducción en la actividad de enzimas con función antioxidante, pueden deberse en parte a la reducción en la tasa de síntesis de estas moléculas, como resultado de las restricciones en la dieta, aunque otra posibilidad es que se destruyan por el proceso oxidante (Albretch y Pélissier, 1995; Jimoh et al., 2005). Estos compuestos al estar disminuidos, conducen a una pérdida de la protección antioxidante que pudieran contribuir a la patofisiología de la DCP (Savitri et al., 2004), en particular de tipo kwashiorkor, pues en estos niños se ha percibido un incremento de daño oxidante en sus membranas celulares, proteínas unidas a membranas o citosólicas, lo cual se propone conduce al edema característico observado en estos niños (Manary et al., 2000).

Desde hace algunas décadas se han estudiado los efectos, secuelas y el desarrollo posterior del organismo, causados por la desnutrición. Se ha encontrado que la desnutrición tiene efectos adversos sobre diferentes tipos celulares y a diferentes niveles como el celular, citogenético (Betancourt y Ortiz, 1991), así como, a nivel del material genético tanto en niños (Betancourt et al., 1995), como en modelos experimentales (Ortíz et al., 1995).

En particular, se ha observado que el ADN de organismos desnutridos presenta daño a diferentes niveles, lo que podría parcialmente deberse a la falta de ciertas

moléculas necesarias para proteger a las células contra el daño oxidante (Cortés et al., 2001). Sin embargo, hasta el momento no existe un estudio en el que se evidencie si una de las posibles causas de daño al ADN observado en los organismos desnutridos, sea provocada por estrés oxidante. Por lo que este estudio, estuvo enfocado en determinar si la desnutrición induce daño por estrés oxidante sobre el material genético del timo y relacionarlo con la expresión de genes de factores de transcripción implicados en la expresión de enzimas antioxidantes.

En los resultados obtenidos en el presente estudio, se observó que efectivamente existe daño inducido por estrés oxidante a nivel del ADN, el cual está incrementado en el timo de ratas DN, siendo las ratas con un mayor déficit de peso las más afectadas, en las que posiblemente una de las causas del daño incrementado al ADN, sea debido al consumo disminuido de ciertos antioxidantes que conduce finalmente al daño por estrés oxidante (Halliwell, 2001).

El daño al ADN se hizo evidente cuando se determinó que la frecuencia del aducto 8-OHdG, un biomarcador de estrés oxidante que puede provocar transversiones GC→TA e inclusive cáncer si el daño es persistente (Halliwell, 2001), fue mayor en el timo de las DN que en las BN, hecho que sugiere en las primeras la existencia de un desbalance entre los mecanismos de defensa antioxidante y los niveles de ERO, ya sea por una disminución de las moléculas que participan en la defensa antioxidante o por un incremento de ERO, cuya alta reactividad puede provocar degradación proteica o el daño observado a nivel del material genético (Pérez y Pérez, 2000).

La cantidad de daño oxidante presente en el ADN, fue proporcional con el grado de desnutrición, siendo las ratas con DN3 las que presentaron 2.5 veces más daño por estrés oxidante en comparación con el daño observado en el grupo control. Por consiguiente, los organismos desnutridos no sólo presentan un incremento de daño por estrés oxidante a nivel de lípidos y proteínas, como anteriormente se había reportado, ya que los resultados obtenidos mostraron que también, existe daño oxidante a nivel del ADN. Daño que por supuesto, puede ser el efecto de la deficiente ingesta calórica, proteica y de micronutrientes.

Matés y colaboradores (1999) propusieron que cuando el estrés oxidante surge a consecuencia de un evento patológico, el sistema de defensa promueve la regulación de la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes, sin embargo, en la DCP el sistema es tan débil que impide que el sistema de defensa promueva la regulación de estos genes. Por lo que otro de los objetivos del presente estudio, fue observar el efecto de la DCP y sus posibles repercusiones sobre la expresión génica de moléculas que participan en la regulación de ERO, como la SOD, GPx y CAT que a su vez son reguladas por los factores de transcripción p53 y Nrf2. Debido a que se ha sugerido que un alto estrés oxidante está usualmente acompañado por una disminución en la capacidad antioxidante (Akinola, 2010).

Los resultados de este estudio indican que la falta de nutrientes provoca una modulación transcripcional de p53 y Nrf2, dos proteínas relacionadas a mecanismos protectores contra el daño oxidante, debido a la disminución en sus niveles de expresión génica, lo cual a su vez, estuvo correlacionado directamente con una

disminución en los niveles de expresión de algunos de los genes blanco que regulan, como SOD, GPx y CAT en ratas DN, comparados con los niveles de expresión de los mismos genes en ratas BN. Esta alteración, pudiera estar relacionada con la disminución en la actividad enzimática de dichas moléculas en diversos órganos de ratas desnutridas (Akinola, 2010), como consecuencia de la disminución en los niveles de ciertos oligoelementos como Cu/Zn y Se que participan en los centros activos de SOD y GPx respectivamente (Singla et al., 1996; Ashour et al., 1999; Savitri et al., 2004). Aunque, no todos los micronutrientes se encuentran mayormente disminuidos en los organismos desnutridos, pues se han encontrado altas concentraciones de  $Fe^{2+}$  libre en plasma de niños con desnutrición tipo kwashiorkor, el que puede actuar como generador de estrés oxidante (Sive et al., 1997).

La disminución en la expresión relativa de los ARNm de genes que codifican para enzimas antioxidantes, implica una posible modificación en el estado redox en las células del timo, que pudiera estar relacionado con un aumento de ERO y por consiguiente ser una de las posibles causas del incremento del daño al ADN observado en el presente estudio.

La disminución en la expresión génica de p53 y de Nrf2 estuvo correlacionada con un incremento de daño a nivel del ADN en ratas DN, por lo que se puede proponer que el daño al ADN por estrés oxidante puede ser uno de los factores que pudieran estar modulando la disminución en los niveles de expresión observados.

Este hecho pudiera estar asociado con lo observado en el estudio realizado por Sablina y colaboradores (2005), quienes en timocitos de ratón  $p53^{-/-}$  determinaron que los niveles de ERO se incrementaron en comparación con los niveles de  $p53$  tipo silvestre, mientras que en esplenocitos de ratón  $p53^{-/-}$  los niveles de 8-OHdG aumentaron en comparación con los tipo silvestres. También observaron un incremento de ERO después de inhibir la función de  $p53$  por diferentes mecanismos tales como la sobreexpresión de mutaciones oncogénicas o de sus respectivos inhibidores como MDM2 (Sablina et al., 2005). De igual forma la disminución en la expresión de Nrf2 pudiera estar asociado con lo observado en ratones genéticamente modificados y carentes de Nrf2  $^{-/-}$ , en donde los ratones tuvieron un desarrollo aparentemente normal, no obstante, estos ratones no pudieron inducir la expresión de los genes responsables de la protección contra el estrés oxidante, como CAT ó GSH (Zhu et al., 2005).

Así mismo, en el presente estudio se observó que el grado de desnutrición y la expresión relativa de los los genes estudiados tuvieron una correlación negativa, es decir, conforme aumentó el grado de desgaste corporal los niveles de expresión relativa de los ARNm disminuyeron. Por lo tanto, se podría inferir que la deficiencia de nutrientes provoca una baja de la expresión del ARNm de genes que codifican para enzimas antioxidantes, siendo las ratas con un mayor déficit de peso (DN3) las más afectadas en comparación con los otros grupos de ratas desnutridas; contribuyendo posiblemente, al incremento de daño al ADN por estrés oxidante en comparación con los daños observados en los otros grupos de ratas desnutridas.

Esto indica que un mayor desgaste corporal está relacionado con alteraciones en el estado redox de mayor gravedad en el timo. Con los resultados anteriores, se tiene un panorama más amplio de las alteraciones existentes en los mecanismos protectores en el timo de ratas desnutridas, relacionadas con la protección antioxidante, mediados por p53 y Nrf2. Lo cual pudiera repercutir en la función de éste órgano y posiblemente contribuir a una deficiente respuesta inmunológica característica de los organismos desnutridos.

Estos resultados evidencian que existen alteraciones en el manejo del estado antioxidante por parte de los organismos desnutridos, detectándose que son proporcionales al nivel del desgaste corporal (Akinola, 2010).

## **10. Conclusión**

La desnutrición experimental en el timo de ratas de 21 días de edad, predispone a un incremento de daño inducido por estrés oxidante a nivel del ADN, asociado a una disminución en la expresión génica de moléculas que participan en la protección antioxidante, ambos aspectos se ven afectados directamente por el grado de desnutrición.

## **11. Perspectivas**

- Determinar los niveles de expresión de las proteínas por Western Blot
- Determinar la actividad enzimática de SOD, GPx y CAT.
- Determinar la activación de Nrf2 y p53

## 12. Bibliografía

- Ahmed T, Rahman S, Cravioto A. 2009. Oedematous malnutrition. *Indian J Med Res.* 130:651-654.
- Akinola F, Oguntibeju O, Alabi O. 2010. Effects of severe malnutrition on oxidative stress in Wistar rats. *Sci Res Essays.* 5:1145-1149.
- Albretch R, Pélissier MA. 1995. About the oxidative stress status in children with kwashiorkor. *Food Chem Toxicol.* 33:1081-1083.
- Amesty de Valbuena A, Castillo JL, Vicente VM, Núñez JR, Marcano H, Colmenares Y, Atencio R, Rivero M, Cayama N. 2002. Citocinas proinflamatorias y proteína C reactiva en niños desnutridos graves infectados y en un grupo control. *Archiv Venezolano de Pueric Pediatr.* 65:91-99.
- Ashour MN, Salem SI, El-Gabdan HM, Elwan NM, Basu TK. 1999. Antioxidant status in children with protein-energy malnutrition (PEM) living in Cairo, Egypt. *Eur J Clin Nutr.* 52:669-673.
- Autret M, 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.
- Aylon Y, Oren M. 2011. New plays in the p53 theater. *Curr Opin Genet Dev.* 21:86-92.
- Baena VJ, Peláez GI, Castaño ME. 2009. p53: la historia sin final de un polifacético guardián. 8:217-230.
- Bar DY, Afek A, Goldberg I, Kopolovic J. 1999. Proliferation, apoptosis and thymic involution. *Tissue Cell.* 31:391-396.
- Becker K, Bötticher D, Leichsenring M. 1994. Antioxidant vitamins in malnourished Nigerian children. *Int J Vitam Nutr Res.* 64:306-310.
- Becker K, Leichsenring M, Gana L, Bremer HJ, Schirmer RH. 1995. Glutathione and associated antioxidant systems in protein energy malnutrition: results of study in Nigeria. *Free Rad Biol Med.* 18:257-263.
- Bensaad K, Vousden KH. 2007. p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol.* 17:286-291.
- Bernabeu MJ, Wandem-Bergne LC, Sanz V, Castiel LD, Landaeta JM, Anderson H. 2008. El abordaje de la malnutrición en el contexto de la cultura científica. *Club Universitario. España.* pp. 55-58.
- Betancourt M, Ortíz R. 1991. Efectos de la desnutrición severa en el nivel citogenético. *Ciencia.* 42:367-373.
- Betancourt M, Cortés E, Pérez V, González C, Ortíz R. 2005. Assesment of damage in brain, liver, kidney and testis from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Rev Int Cont Ambient.* 21:79-83.
- Betancourt M, Ortíz R, González C, Pérez P, Cortés L, Rodríguez L, Villaseñor L. 1995. Assessment of damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutat Res.* 331:65-77.

- Bolant HB, Calvo BM, Cejalvo LD, Gimeno FD, Lloris CJ. 1990. La eutanasia en los animales de laboratorio. *Reach Surg.* 5:45-57.
- Bosnak M, Kelekci S, Kocyigit Y, Sen V, Ece A. 2010. Oxidative stress in marasmic children relationships with leptin. *Eur J Gen Med.* 7:1-8.
- Bourges RH. 2003. La nutriología a partir de la doble hélice. *Rev Invest Clin.* 55:220-226.
- Castellanos PE. 2008. La nutrición su relación con la respuesta inmunitaria y el estrés oxidativo. *Rev Haban Cienc Med.* 7:1-12.
- Chumakov PM. 2006. Function of the p53 gene: choice between life and death. *Biochem.* 65:28-40.
- Cortés BE, González MH, Gómez OJ, Ortíz MR. 2008. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets an activation assessed by flow cytometry. *Clin Exp Immunol.* 152:585-592.
- Cortés E, González C, Betancourt M, Ortíz R. 2001. Assessment of damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Teratogen Carcin Mut.* 21:231-247.
- Cravioto J, Arrieta R. 1985. Nutrición, desarrollo mental, conducta y aprendizaje. DIF. 2da. Edición. México.
- de Onis M, Frongilio EA, Blössner M. 2001. ¿Está disminuyendo la malnutrición? Análisis de la evolución del nivel de malnutrición infantil desde 1980. *Bol OMS.* 4:100-110.
- El-Deiry W, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein Bert. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1:45-49.
- ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados por entidad federativa, Distrito Federal. *Inst Nac Sal Pub.* pp. 83-85.
- ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. 2012. *Inst Nac Sal Pub.* pp. 83-95.
- Feliu MS y Slobodianik KN. 2002. Efectos de la desnutrición proteica y de su repercusión nutricional en el timo de rata. *Rev Chil Nutr.* 29:125-135.
- Feoli AM, Siqueira IR, Almeida L, Tramontina A, Vanzella C, Sbaeaini S, Schweigert I, Netto C, Perry M, Goncalves C. 2006. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition.* 22:160-165.
- Golden MH, Ramdath D. 1987. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proc Nutr Soc.* 46:53-68.
- Gómez F, Ramos-Galván R, Frenk S, Cravioto J, Chávez R, Vázquez J. 1956. Mortality in second and third degree malnutrition. *J Trop Pediat.* 2:77-83.
- Gómez-Ayala A. 2007. Nutrigenómica y nutrigenética. *Nutrición.* 26:78-85.
- González TM, Betancourt RM, Ortíz M. 2000. Daño oxidante y antioxidantes. *Bioquímica.* 25:3-9.
- Guide for the care and use of laboratory animals. 2010. National research council of the national academics. Washington, EUA.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3a ed. Clarenton Press. Oxford.

- Hansberg TW. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mens Bioq.* 26:19-54.
- Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. 1998. I Oxidation Matters: The HPLC-Electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Med. Sci.* 95: 288-293.
- Jimoh FO, Odutuga AA, Oladiji AT. 2005. Status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the tissues of rats fed low protein diet. *Pakistan J Nutr.* 4:431-434.
- Jong ML, Johnson JA. 2004. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol.* 37:139-143.
- Konigsberg FM. 2007. Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB.* 26:18-25.
- Konigsberg FM. 2008. Radicales libres y estrés oxidante: Aplicaciones Médicas. Manual Moderno. México.
- Lee J, Johnson JA. 2004. An important role of Nrf2-ARE pathway in the celular defense mechanisms. *J Biochem Mol Biol.* 37:139-143.
- Lenhartz H, Ndasi R, Anninos A, Bötticher D, Mayatepek E, Tetanye E, Leichsering M. 1998. The clinical manifestation of the kwashiorkor syndrome is related to increased lipid peroxidation. *J Pediatr.* 132:879-881.
- Levinson W, Jawetz E. 1996. *Medical microbiology and immunology: examination and board review.* 4ta. Ed. Appleton and Lange. EUA. pp. 523.
- López AH. 2005. Detección de daño al ADN por estrés oxidante, en hígado y riñón de ratas desnutridas de 21 días de nacidas. Tesis Licenciatura en Biología Experimental. UAM.
- López DN, Gutiérrez RM, Cortés BE, Zentella DA, Konigsberg FM. 2003. Daño al DNA y niveles de radicales libres en fibroblastos de ratones jóvenes y viejos. *Rev Cub Invest Biomed.* 22:109-116.
- Lozano G, Elledge SJ. 2000. p53 sends nucleotides to repair I. *Nature.* 6773:24-25.
- Maclaine NJ, Hupp T. 2009. The regulation of p53 by phosphorylation: A model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging.* 1:490-502.
- Manary M, Leeuwenburgh C, Heinecke J. 2000. Increased oxidative stress in kwashiorkor. *J Pediatrics.* 137:421-424.
- Marnett LJ, Riggins JN, West JD. 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with and protein. *J. Clin Invest.* 111:583-593.
- Martínez de Victoria-Muñoz E. 2007. Genómica nutricional la nueva nutrición. *Nutrición Clínica en Medicina.* 1:73-86.
- Matés J, Pérez G, Núñez C. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 8:595-603.
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Wai KY. 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that

binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the  $\beta$ -globin locus control region. *Genetics*. 91:9926-9930.

- Moleres VA, Marti MA. 2008. Influencia del ambiente y la alimentación en la programación epigenética de la obesidad. *Rev Esp Obes*. 6:66-74.
- Mora RJ. 2002. Soporte nutricional especial. Panamericana. Tercera edición. Colombia. pp.77-78.
- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. 2009. The Nrf2 antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *JBC*. 284:13291-13295.
- Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boisselle PM, Hatabu H. 2006. The thymus: a comprehensive review. *RG*. 26:335-349.
- O'Connor JC, Wallace DM, O'Brien CJ, Cotter TG. 2008. A novel antioxidant function for the tumor-suppressor gene p53 in the retinal ganglion cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49:4237-4244.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011. Estadísticas Sanitarias Mundiales.
- Ortíz MR, Cortés ML, Gómez OJ, González TC, Cortés BE. 2000. Análisis con citometría de flujo de los diferentes timocitos en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. *Ciencia y tecnología de la UACJ*. 1:77-84.
- Ortíz R, Cortés E, González C, Pérez L, Betancourt M. 1995. Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environ Mol Mutagen*. 26:55-59.
- Ortíz R, Cortés E, Medina H. 2008. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocytes subpopulations of rats. *Clin Exp Immunology*. 155:96-106.
- Ortíz R, Cortés E, Pérez L, González C, Betancourt M. 1996. Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. *Med Sci Res*. 24:843-846.
- Pallaro AN, Roux ME, Slobodianik NH. 2001. Study of the thymus in growing rats. *Nutr*. 17:724-728.
- Parra-Gámez L, Téllez-Girón J, Escobar-Briones C. 2003. La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. *Facultad de Medicina, UNAM*. 46:32-36.
- Pérez GP, Pérez AJ. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cub Med Milit*. 29:192-198.
- Posso D. 2009. Protocolo de electroforesis del ADN en geles de agarosa. *Inst Venez Invest Cient*. pp. 4.
- Promega Corporation. 2004. SV total RNA Isolation system. EUA. pp. 28.
- 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.

- Reid M, Badaloo A, Forrester T, Morlese JF, Frazer M, Heird WC, Jahoor F. 2000. In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in children with severe protein-energy malnutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278:405-412.
- Rivera M, Roselló LE, García BF, Bertomeu V, Payá R, Cortés R, Martínez DL, Jordán A, Pérez BJ, Salvador A, Marín F, Sogorb F, Valero R, Miró V, Portolés M. 2006. Valores de 8-hidroxi-2'desoxiguanosina y de peroxidación lipídica en pacientes con insuficiencia cardiaca. *Rev Esp Cardiol.* 59:1140-1145.
- Rodríguez L, González C, Flores L, Graniel J, Ortiz R. 2005. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12:502-507.
- Rojkind M, Domínguez RJ, Nieto N, Greenwel P. 2002. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci.* 59:1-20.
- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med.* 11:1306-1313.
- Savino W, Dardenne M, Velloso LA, Silva BD. 2007. The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Brit J Nutr.* 98:11-16.
- Savitri T, Neelam G, Poonam K. 2004. Serum copper and zinc concentrations and their relation to superoxide dismutase in severe malnutrition. *Eur J Pediatr.* 163:742-744.
- Sheng WG. 2004. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Therapy.* 3:156-161.
- Singla PN, Chand P, Kumar A, Kachhawaha JS. 1996. Serum zinc and copper levels in children with protein energy malnutrition. *Indian J Pediatr.* 63:199-203.
- Sive AA, Dempster WS, Malan H, Rosseau S, Heese HD. 1997. Plasma free iron: a possible cause of oedema in kwashiorkor. *Arch Dis Child.* 76: 54-56.
- Sive AA, Subotzky EF, Malan H, Dempster WS, Heese HD. 1993. Red blood cell antioxidant enzyme concentrations in kwashiorkor and in marasmus. *Ann Trop Paediatr.* 13:33-38.
- Squali-Houssaini FZ, Arnaud J, Richard MJ, Renversez JC, Favier A. 1997. Evaluation of oxidative stress and antioxidant defences in malnourished Moroccan children. *Ann Nutr Metab.* 41:149-159.
- Sykiotis GP, Habeos IG, Samuelson AV, Bohmann D. 2011. The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 14:41-48.
- Tan M, Li S, Swaroop M, Kunliang G, Oberley GW, Sun Y. 1999. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J Biol Chem.* 274:12061-12066.
- Varady J, Gessner DK, Most E, Eder K, Ringseis R. 2012. Dietary moderately oxidized oil activates the Nrf2 signaling pathway in the liver of pigs. *Lipids Health Dis.* 11:1-9.
- Vega-Franco L. 1999. Hitos conceptuales en la historia de la desnutrición proteico-energética. *Salud Pública de México.* 41:328-333.

- Venereo GJ. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 31:126-133.
- Vousden KH, Lane DP. 2007. p53 in health and disease. *Mol Cell Biol.* 8:275-283.
- Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y. 1994. Purification of genomic DNA human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res.* 22:1774-1775.
- Whaeton B, Howells G, Phillips I. 1968. Diarrhoea in kwashiorkor. *Brit Med.* 4:608-611.
- Xacur-García F, Castillo-Quan JI, Hernández-Escalante VM, Laviada-Molina H. 2008. Genómica nutricional una aproximación de la interacción genoma-ambiente. *Rev Med Chile.* 136:1460-1467.
- Yang CP, Bell EB. 1993. Thymic education curtailed: defective immune responses in nude rats reconstituted with immature thymocyte subsets. *Int Immunol.* 6:469-577.
- Yoon KA, Nakamura Y, Arakawa H. 2004. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J Hum Genet.* 49:134-140.
- Zhu H, Itoh K, Masayuki Y, Zweier JL, Li Y. 2005. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS.* 579:3029-3036.

