



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00090

Metrícula: 2131800810

Efecto del tBHQ sobre la capacidad antioxidante y el proceso inflamatorio en ratas lactantes desnutridas

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:30 horas del día 3 del mes de abril del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
DRA. ORALIA NAJERA MEDINA



GRACIELA GAVIA GARCIA
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: GRACIELA GAVIA GARCIA

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

APROBAR

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARASASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCÉ ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

VOCAL

DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

SECRETARIA

DRA. ORALIA NAJERA MEDINA



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DEL tBHQ SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
Y EL PROCESO INFLAMATORIO EN RATAS LACTANTES
DESNUTRIDAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

M. en Biol. Exp. Graciela Gavia García

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. María Cristina González Torres
Dr. Armando Luna López

ASESORA:

Dra. Mina Königsberg Fainstein

CIUDAD DE MÉXICO

ABRIL DE 2017

El presente trabajo de Investigación fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular y en el de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

El programa del Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, con clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020

Para la realización del Doctorado en Biología Experimental se contó con el apoyo de CONACyT mediante la beca con número de registro 248836 y la beca de Movilidad en el extranjero 291062, otorgada por el mismo Consejo para la realización de una estancia de investigación en la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Argentina. Bajo la dirección de las Doctoras María Susana Feliu e Inés Fernández y supervisión de la Dra. Nora Slobodianik.

Los miembros del jurado designados 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: **"EFECTO DEL tBHQ SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL PROCESO INFLAMATORIO EN RATAS LACTANTES DESNUTRIDAS"** que presentó Graciela Gavia García el día 3 de abril de 2017.



PRESIDENTA

Dra. Mina Königsberg Fainstein

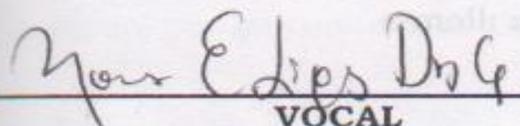
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa



SECRETARIA

Dra. Oralia Nájera Medina

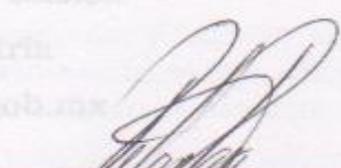
Departamento de Atención a la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-
Xochimilco



VOCAL

**Dra. Norma Edith López Díaz-
Guerrero**

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa



VOCAL

Dra. Raquel Retana Ugalde

Profesora de Carrera Titular "A" Tiempo
Completo.
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores- Zaragoza

COMITÉ TUTORAL

Co-DIRECTORA

Dra. María Cristina González Torres

Investigador Titular “C” de Tiempo Completo

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

e-mail: mcgt@xanum.uam.mx

Co-DIRECTOR

Dr. Armando Luna López

Investigador en Ciencias Médicas “D”

Subdirección de Investigación Biomédica

Departamento de Investigación Básica

Instituto Nacional de Geriátrica

e-mail: armando.luna@salud.gob.mx

ASESORA

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Investigador Titular “C” de Tiempo Completo

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

e-mail: mkf@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Cris** por la oportunidad que me brindó para integrarme en su grupo de trabajo y darme la oportunidad de crecer académicamente; por su paciencia y gran capacidad para explicarme y guiarme, por impulsarme a cumplir nuevos retos académicos y sobre todo por su gran calidad humana. De verdad Dra., le estaré agradecida toda mi vida. Mil gracias por todo lo que ha hecho por mí!!!

Al **Dr. Armando** por el gran apoyo para la realización de este trabajo, por estar siempre dispuesto a explicarme, enseñarme y compartir sus conocimientos conmigo. Simplemente sin Usted, este trabajo no hubiera podido terminar satisfactoriamente. Sin duda, ha sido una de las mejoras influencias en mi vida académica. Gracias por todo el apoyo que me brindó.

A la **Dra. Mina** por aportar sus conocimientos, sugerencias y mejorar con ellos cualquier trabajo que puse en sus manos; así como, por estar siempre dispuesta a apoyarme en todo lo que necesité.

Al **Dr. Miguel Betancourt** por permitirme trabajar en su laboratorio y estar siempre al pendiente de mi vida académica. Gracias por estar siempre dispuesto a apoyarme.

A la **Dra. Oralia** por estar siempre dispuesta a apoyarme y buscar siempre alternativas para que pudiera terminar satisfactoriamente este trabajo; así como, por sus aportaciones y comentarios para la realización de esta tesis.

A las **Dras. Norma Edith y Raquel** por aceptar ser parte del jurado, por sus sugerencias, correcciones y comentarios que sin duda me sirvieron para la realización de esta tesis y por estar siempre en la mejor disposición para ayudarme.

Al **Dr. Edmundo** por el tiempo, recomendaciones, aportaciones y apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

A las **Dras. Susana, Inés y Nora** por acogerme en su laboratorio y hacerme sentir parte de él desde el primer día. Gracias por el tiempo que me brindaron, por compartir conmigo sus conocimientos y crear una de las experiencias más gratas e inigualables de mi vida académica.

DEDICATORIAS

A mi esposo por siempre estar dispuesto a escucharme, darme ánimos y alentarme a buscar nuevos desafíos; sin duda, eres y seguirás siendo mi mayor apoyo en la vida. Gracias amor, por todos estos años que has compartido conmigo tu vida.

A mi hijo por ser lo mejor que me ha podido pasar en la vida, por tu gran paciencia y comprender a veces mi ausencia. Sabes que te amamos no sólo porque día a día te lo escribimos en el pizarrón antes de salir de casa, sino porque todo lo que hacemos es siempre pensando en ti. Recuerda, eres único en muchos sentidos.

A mis padres por apoyarme siempre en todas las decisiones que he tomado, e inculcar en mí la responsabilidad, perseverancia y el compromiso en cualquier aspecto de mi vida; indudablemente han sido parte fundamental de este logro, su logro.

A **mis suegros, hermanos y cuñada** por todo el gran apoyo que he recibido de Ustedes durante todo este tiempo.

RESUMEN

La desnutrición es un grave problema de Salud Pública a nivel mundial, que afecta principalmente a niños menores de cinco años. Se ha establecido que los individuos que la padecen presentan alteraciones en la respuesta inmunológica posiblemente asociadas con daño por EOX, el que se origina como consecuencia de una dieta deficiente en nutrientes necesarios para contrarrestar los niveles de ERO. De igual modo, se ha relacionado con un incremento del estado inflamatorio de bajo grado, que puede comprometer la salud y afectar el crecimiento y desarrollo de los individuos desnutridos. Por otra parte, el tBHQ es un antioxidante sintético, al que se le ha atribuido un efecto protector contra el daño por EOX.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el posible efecto protector del tBHQ frente al estrés oxidante en timo, un órgano fundamental para la respuesta inmunológica de tipo celular; así como, el estado inflamatorio en plasma de ratas desnutridas. La desnutrición se indujo mediante el método de competencia de alimento durante la lactancia, periodo en el cual los efectos producidos por este padecimiento pueden ser más severos.

Los resultados indican que la desnutrición es un factor que predispone a la amplificación del daño por estrés oxidante a nivel de lípidos, proteínas y ADN asociado a una disminución en el contenido y la

función biológica de SOD, GPx y CAT; enzimas que participan en los mecanismos de protección antioxidante. Así mismo, se observó un incremento del estado inflamatorio sistémico evidenciado por la elevación de la concentración plasmática de citocinas proinflamatorias tales como IL-6 y TNF- α ; probablemente mediadas por el factor transcripcional NF- κ B. Ambos aspectos fueron proporcionales al nivel del desgaste corporal. Estas alteraciones pueden repercutir en el crecimiento y desarrollo de los organismos desnutridos. Al igual que en la funcionalidad del timo, lo que podría comprometer la respuesta inmunológica.

Los resultados permitieron establecer que el tBHQ confirió protección contra el daño por EOx en lípidos y proteínas en timo de ratas desnutridas por el restablecimiento de los mecanismos de protección antioxidante tales como SOD y GPx; probablemente mediadas por la activación transcripcional de Nrf2. De igual modo, a este antioxidante se le puede atribuir un efecto antiinflamatorio por la disminución en la concentración plasmática de TNF- α e IL-6. El efecto del tBHQ pudiera reflejarse en una mejoría en la función inmunológica y por consecuencia, en una mayor protección frente a un factor frecuentemente asociado a la desnutrición, como es el caso de las infecciones, aunque este aspecto aún debe ser estudiado.

ABSTRACT

Malnutrition is a serious Public Health problem in the entire world; it mainly affects children under five years old. It has been established that individuals that suffer from it present alterations in the immunological response possibly associated with damage by oxidative stress, the one that originates like a consequence of a nutrient-deficient diet required to counteract ROS levels. Likewise, it has been associated with an increase in the low-grade inflammatory state; it could compromise health and affect the growth and development of malnourished individuals. On the other hand, a protective effect against oxidative damage has been attributed to the synthetic antioxidant tBHQ.

The goal of this study was to evaluate the possible role of tBHQ as a protective agent against oxidative damage in thymus, a fundamental organ for the cellular type immunologic response; as well as the inflammatory status in plasma of malnourished rats. Malnutrition was induced through the feeding competition method during lactation; in this period the effects produced by this disease could be more severe.

The results indicate that malnutrition is a factor that predisposes to the amplification of oxidative stress damage at the level of lipids, proteins and DNA associated to a decrease in the content and biological function of SOD, GPx and CAT, enzymes involved in antioxidant protection mechanisms. Likewise, an increase in the systemic inflammatory state

evidenced by the elevation of the plasma concentration of proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α ; probably mediated by transcription factor NF- κ B. Both aspects were proportional to the level of body wear. These alterations can have an impact on the growth and development of malnourished organisms. As in the functionality of the thymus, this could compromise the immune response.

Results allowed establishing that tBHQ conferred protection against Eox damage in lipids and proteins in the thymus of malnourished rats by the reestablishment of antioxidant protection mechanisms such as SOD and GPx probably mediated by the transcriptional activation of Nrf2. Similarly, to this antioxidant can be attributed to an anti-inflammatory effect because to the decrease in the plasma concentration of TNF- α and IL-6. Furthermore effect of tBHQ could be reflected in an improvement in the immunological function and consequently, in greater protection against malnutrition associated factor, as is the case of infections, although this aspect has yet to be studied.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	14
1.1 Generalidades de la desnutrición	14
1.1.1 Desnutrición grave tipo marasmo	15
1.1.2 Desnutrición grave tipo kwashiorkor	16
1.1.3 Desnutrición grave tipo kwashiorkor-marasmático	17
1.1.4 Epidemiología de la desnutrición	18
1.1.5 Causas que producen la desnutrición	19
1.2 Desnutrición y sistema inmunológico	20
1.2.1 Timo	21
1.2.2 Desnutrición y timo	23
1.3 Estrés oxidante	24
1.3.1 Daño a lípidos por estrés oxidante	26
1.3.2 Daño a proteínas por estrés oxidante	27
1.3.3 Daño al ADN por estrés oxidante	28
1.4 Antioxidantes	29
1.4.1 Antioxidantes enzimáticos	30
1.4.1.1 Superóxido dismutasa	31
1.4.1.2 Glutación peroxidasa	32
1.4.1.3 Catalasa	33
1.4.2 Antioxidantes sintéticos	33
1.4.2.1 tBHQ	34
1.5 Hormesis	35
1.6 Factores de transcripción y estrés oxidante	36
1.6.1 Nrf2	37
1.6.2 NF-κB	39
1.7 Inflamación	41
1.8 Citocinas	42
1.8.1 Interleucina 6	43

1.8.2 TNF- α	45
2. Antecedentes	47
3. Justificación	51
4. Pregunta de investigación	54
5. Hipótesis	54
6. Objetivo general	54
6.1 Objetivos particulares	54
7. Material y Métodos	56
7.1 Desnutrición experimental	56
7.2 Grupos experimentales	57
7.3 Tratamiento con tBHQ	57
7.4 Obtención de muestras	58
7.5 Extracción y cuantificación de proteínas	58
7.6 Daño a lípidos por estrés oxidante	59
7.7 Daño a proteínas por estrés oxidante	59
7.8 Daño al ADN por estrés oxidante	61
7.8.1 Extracción de ADN	61
7.8.2 Hidrólisis enzimática de ADN	62
7.8.3 Curvas patrón	63
7.8.4 Cuantificación de 8-OHdG y dG	63
7.9 Determinación de la actividad enzimática	64
7.9.1 Actividad de SOD	64
7.9.2 Actividad de GPx	65
7.9.3 Actividad de CAT	67
7.10 Medición de GSH y GSSG	67
7.11 Análisis de proteínas	68
7.12 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	69
7.13 Análisis estadístico	70
8. Resultados	71
8.1 Generalidades de los diferentes grupos de estudio	71

8.2 Niveles de GSH/GSSG	72
8.3 Daño a lípidos por estrés oxidante	74
8.4 Daño a proteínas por estrés oxidante	76
8.5 Daño al ADN por estrés oxidante	78
8.6 Actividad enzimática de SOD	79
8.7 Actividad enzimática de GPx	80
8.8 Actividad enzimática de CAT	82
8.9 Expresión de proteínas	83
8.10 Estado inflamatorio sistémico	89
9. Discusión	91
10. Conclusiones	112
11. Perspectivas	113
12. Bibliografía	115

1. Introducción

1.1 Generalidades de la desnutrición

La desnutrición se define como un desequilibrio entre las necesidades nutricionales y la ingesta de alimento, traducido en déficits acumulativos de energía, proteínas o micronutrientes que pueden afectar negativamente el crecimiento y desarrollo de un individuo [Mehta et al., 2013]; aunque también, puede ser ocasionada por alteraciones en la digestión o en la absorción [Parra-Gámez, 2003]. Se ha considerado a la desnutrición como causa subyacente de la mortalidad infantil con proporciones alarmantes de alrededor del 52.5% a nivel mundial; asociada a diarrea, neumonía, sarampión y malaria [Caulfield et al., 2004].

La desnutrición puede producir estragos entre la población en general, siendo los niños pequeños los más vulnerables, debido a que se encuentran en una etapa crítica de la vida, en la que sus requerimientos nutricionales son mayores para permitir un crecimiento y desarrollo óptimos [Blössner y de Onis, 2005].

Cuando el crecimiento se detiene, el desarrollo cerebral se rezaga, por lo que los niños con retraso del crecimiento tienen más probabilidades de presentar problemas de aprendizaje [OMS, 2011], memoria, conducta, bajo rendimiento escolar [Pérez et al., 2012], que traen consecuencias importantes en la adolescencia [Walker et al., 2007]; así como, en la vida adulta; entre ellas, una disminución en la capacidad de trabajo, lo que

puede repercutir incluso en la productividad económica de un país [de Onis et al., 2001].

Aunque existen diversos métodos para evaluar el estado nutricional en niños, uno de los más utilizados es el propuesto por Gómez y colaboradores, basado en el déficit de peso con respecto a lo esperado para la edad cronológica, estableciéndose tres grados de desnutrición de acuerdo al nivel de gravedad. La desnutrición de primer grado (leve o DN1), se caracteriza por un déficit de peso entre el 10-24%; en la de segundo grado (moderada o DN2) la pérdida de peso fluctúa entre el 25-39%, y por último, en la de tercer grado (grave o DN3) el déficit de peso es $\geq 40\%$ [Gómez et al., 1956].

De esta última, se conocen tres tipos de desnutrición bien caracterizados conocidos como marasmo, kwashiorkor y kwashiorkor-marasmático, todos ellos presentan un estancamiento en la tasa de crecimiento corporal, aunque cada tipo presenta manifestaciones clínicas muy particulares [Schofield y Ashworth, 1997].

1.1.1 Desnutrición grave tipo marasmo

Se considera que si la carencia de proteínas y calorías es grave, el resultado es el marasmo que generalmente predomina en lactantes menores de un año [Bernabeu et al., 2008]. Este tipo de desnutrición se caracteriza por un severo retraso en el crecimiento, desgaste muscular con disminución en el contenido de grasa y por lo tanto, una pérdida

considerable de peso. Estos niños presentan una cara similar a la de una persona de edad avanzada, falta de apetito, ojos hundidos y cambios en el estado de ánimo [Nagle et al., 2014].

En estos niños es posible que se presente una adaptación metabólica como resultado de la baja concentración de insulina y aumento de cortisol. La acción del cortisol favorece la degradación de aminoácidos de las proteínas musculares para ser utilizados en la gluconeogénesis. Mientras que no existan fuentes de energía exógenas, este ciclo se repite y contribuye a mantener las funciones básicas para la supervivencia; sin embargo, este delicado equilibrio puede romperse cuando se presentan otros factores como las infecciones [Prudhon et al., 2002].

1.1.2 Desnutrición grave tipo kwashiorkor

Este tipo de desnutrición lo padecen frecuentemente los niños entre uno y tres años de edad. Se propone que si la dieta es deficiente en proteínas y se reemplaza la necesidad de energía por la ingesta abundante de alimentos ricos en carbohidratos, se produce el kwashiorkor [Bernabeu et al., 2008]. Sin embargo, se ha evidenciado que no existen diferencias entre las dietas que consumen los niños que desarrollan marasmo o kwashiorkor [Gopalan, 1968]. Por lo que han surgido algunas teorías sobre la etiología de este tipo de desnutrición; una de las más aceptadas es derivada de la evidencia que vincula el desequilibrio entre la generación de radicales libres (RL) y su correcta eliminación, lo que genera estrés

oxidante (EOx) [Golden y Ramdath, 1987]. Por otro lado, el edema, un signo clínico característico de este tipo de desnutrición se ha relacionado con un aumento en la secreción de sustancias antidiuréticas (probablemente hormona antidiurética) que impiden una respuesta excretora normal a la administración del agua. Por lo tanto, en estos niños la homeostasis del fluido corporal se encuentra alterada, resultando en un exceso de fluido en el espacio intersticial. El edema puede ser de grado variable, desde una forma ligera localizada hasta el edema generalizado grave [Parra et al., 2005].

Otras de las alteraciones características de este tipo de desnutrición son el daño hepático, lesiones en la piel con hiperqueratosis. El pelo se vuelve seco, quebradizo, lacio y pierde color, volviéndose amarillento o blanco. Pérdida de apetito, apatía e irritabilidad. Fisiológicamente el kwashiorkor es una desnutrición más compleja que el marasmo porque sus efectos son más profundos debido a la deficiencia de aminoácidos específicos [Parra et al., 2005; Ahmed et al., 2009].

1.1.3 Desnutrición grave tipo kwashiorkor-marasmático

Este tipo de desnutrición se refiere a los casos que presentan síntomas combinados del marasmo y kwashiorkor. Sus características principales son la presencia de edema, con o sin lesiones en la piel, cambios en la textura del cabello, hepatomegalia, desgaste muscular y disminución de la grasa subcutánea. Durante el tratamiento de

recuperación nutricional, el edema desaparece y los niños adquieren las características del marasmo [Mora, 2002; Latham, 2012].

1.1.4 Epidemiología de la desnutrición

La desnutrición infantil sigue siendo uno de los principales problemas de Salud Pública a nivel mundial, con mayor incidencia en los países subdesarrollados. De acuerdo a los patrones de crecimiento infantil de la OMS en el 2016, se estimó que alrededor de 159 millones de los niños menores de cinco años, presentaron baja estatura para la edad y 50 millones bajo peso para la altura [UNICEF et al., 2016].

La incidencia de bajo peso es más alta en Asia, seguida de África y las prevalencias más bajas se encuentran en América Latina y el Caribe. Así mismo, se observó que los niños que viven en zonas rurales tienen más probabilidades de presentar bajo peso en comparación a los que viven en zonas urbanas [WHO, 2013].

En México, de acuerdo a los resultados obtenidos en la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, se estimó que en todo el país el 2.8% de los menores de cinco años presentaron bajo peso, el 13.6% baja talla que refleja los efectos acumulados de la desnutrición y se relaciona con retraso en el crecimiento y el 1.6% emaciación. En base a la extensión territorial de nuestro país, la zona sur presentó las mayores prevalencias de baja talla con un 19.2%, seguida de la zona centro con un 11.4% y por último la zona norte del país con un 8.9%. De igual manera a lo reportado

por la OMS, las localidades rurales de estas regiones presentaron una mayor cantidad de niños con baja talla con respecto a las localidades urbanas [ENSANUT, 2012]. En la Ciudad de México el 10.2% presentó baja talla, 1.5% bajo peso y 0.4% emaciación [ENSANUT D.F., 2012]. Según los resultados de los últimos 29 años, la desnutrición infantil en México ha ido descendiendo. Sin embargo, los esfuerzos realizados por las autoridades sanitarias no han sido lo suficientemente efectivos, como para poder impactar adecuadamente sobre la frecuencia de este padecimiento que compromete la calidad de vida de los niños, por lo que la desnutrición sigue siendo uno de los grandes desafíos para el Sistema de Salud de nuestro país [ENSANUT, 2012].

1.1.5 Causas que producen la desnutrición

La falta de recursos económicos, información inadecuada sobre nutrición, bajo nivel educativo, falta de higiene, consumo de alimentos en mal estado, un alto número de niños en el hogar, la incidencia de enfermedades diarreicas y respiratorias, entre otras, son indicadores que se relacionan con la ingesta inadecuada de nutrientes [Hernández et al., 2003]. A su vez, las infecciones parasitarias intestinales por *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura* pueden también ser consideradas como factores de riesgo asociadas a la desnutrición [Quihui-Cota et al., 2004].

El 90% de los casos de desnutrición son ocasionados por una causa principal: la subalimentación, ya sea en cantidad o calidad de los

alimentos consumidos por el individuo. El 10% restante de los casos son producidos por defectos congénitos, nacimientos prematuros e infecciones [Gómez et al., 1956].

1.2 Desnutrición y Sistema Inmunológico

La infección y la desnutrición se relacionan estrechamente, tanto que se ha propuesto que coexisten sinérgicamente, creándose un ciclo vicioso entre ambas [Scrimshaw et al., 1968, Keusch, 2003]. Es decir, la infección prolongada conduce a la desnutrición y la desnutrición por su parte expone al organismo a contraer infecciones fácilmente [Gómez et al., 1956]. De tal manera, que los niños que sufren retraso del crecimiento como consecuencia de una alimentación deficiente y/o infecciones, tienden a presentar un mayor número de episodios diarreicos graves y mayor vulnerabilidad a contraer enfermedades infecciosas [de Onis et al., 2001].

Las complicaciones comunes de las infecciones como diarrea y parasitosis, por sí mismas, incluyen trastornos en la ingesta de alimentos, tales como disminución en la absorción de nutrientes, pérdida del apetito, desviación de nutrientes para la respuesta inmune, daño a las mucosas y pérdida de nitrógeno y electrolitos a través de la orina [Cunningham-Rundles y Ponda, 2005; Katona y Katona-Apte, 2008]. Si durante el episodio de infección no se aportan los nutrientes necesarios para restablecer las demandas del gasto energético perdidos durante la enfermedad, se utilizarán las propias reservas energéticas, esto conduce a

que el niño pierda peso y deje de crecer [Burguess y Glasauer, 2006; Schaible y Kaufmann, 2007]. Bajo estas condiciones, sus mecanismos inmunológicos se ven comprometidos y probablemente se repetirán las infecciones con mayor frecuencia y severidad [Chandra et al., 2012], lo que podría conducir de forma progresiva de la desnutrición leve a la moderada y de ésta a la muy grave. Por lo anterior, se ha considerado a la desnutrición como la fuente principal de inmunodeficiencia [Katona y Katona-Apte, 2008] y la causa subyacente de las muertes infantiles alrededor del mundo [Caulfield et al., 2004].

Las anormalidades más consistentes en respuesta a la infección por parte del sistema inmunológico de los individuos desnutridos se ven reflejadas en los mecanismos inespecíficos debido a alteraciones en la función de la barrera intestinal, bajos niveles del sistema del complemento, disfunción fagocítica, etc. Así mismo, también repercuten en la inmunidad adaptativa; por ejemplo, los niveles de anticuerpos producidos después de la vacunación se reducen en niños con desnutrición severa, los niveles de IgA se encuentran elevados, la producción de citocinas se ve alterada y el tejido linfático particularmente el timo presenta atrofia [Marco et al., 2003; Rytter et al., 2014].

1.2.1 Timo

El timo es un órgano linfoide primario bilobulado, que se localiza en el mediastino anterior justo por encima del corazón. Es fundamental para

la inmunidad celular y es el sitio de maduración y diferenciación de los linfocitos T. Alcanza su peso máximo en la pubertad y posteriormente sufre involución dependiente de la edad [Nishino et al., 2006]. El tamaño del timo, generalmente corresponde a su capacidad funcional [Gui et al., 2012] y predice la supervivencia posterior en infantes [Moore et al., 2014].

Se encuentra dividido en lobulillos, cada uno conformado por una corteza externa de tejido conectivo denso, fibroblastos y timocitos, así como por una médula interna en la que se localizan corpúsculos de Hassall y en menor proporción timocitos. En todo el timo se encuentran células epiteliales y macrófagos procedentes de la médula ósea [Savino y Dardenne, 2010; Abbas et al., 2015].

Presenta una irrigación abundante y vasos eferentes que drenan en los ganglios linfáticos. Los timocitos se pueden encontrar en diferentes estadios de maduración; en general, los inmaduros llegan a la corteza a través de los vasos sanguíneos y es en esta zona donde comienzan su diferenciación, dichos timocitos no expresan el complejo CD3/receptor de células T (TCR), conocidas como CD4⁻CD8⁻ doblemente negativas, las que representan el 5% de la población total de timocitos. Conforme los timocitos progresan en su diferenciación, comienzan a expresar CD3/TCR y marcadores de membrana CD4⁺CD8⁺ (doblemente positivas), que representan el 80% de la población. Estas células son sometidas a eventos de selección positiva y negativa, como consecuencia de la interacción con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que es crucial para la

diferenciación. Las células epiteliales corticales están involucradas en la selección positiva, mientras que las células dendríticas en la negativa. Las células seleccionadas negativamente mueren por apoptosis y son fagocitadas por macrófagos, los timocitos seleccionados positivamente se desplazan hacia la médula, convirtiéndose en maduros CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺ representando al 15% de la población y son estos linfocitos con un solo marcador positivo, los que logran abandonar el timo y pasan así, a la sangre y a los órganos linfoides periféricos para llevar a cabo su función [Savino y Dardenne, 2010; Abbas et al., 2015].

1.2.2 Desnutrición y Timo

El primer estudio descriptivo del timo en organismos desnutridos fue realizado por Simon en 1845, quien observó una marcada disminución en su tamaño, por lo que acuñó el término de “barómetro de la desnutrición” [Simon, 1845]. Así mismo, se han realizado estudios en modelos experimentales y en niños desnutridos post-mortem, los cuales han tenido hallazgos similares a los observados por Simon, mostrando una intensa atrofia tímica; la cual se ha relacionado con deficiencia de zinc y leptina, efecto que se ve revertido con una rehabilitación dietética apropiada [Feliu y Slobodianik, 2002; Savino et al., 2007].

La atrofia tímica en organismos desnutridos se ha asociado principalmente a la pérdida de timocitos maduros, probablemente debido al desequilibrio hormonal entre los niveles disminuidos de leptina y los

elevados de corticosterona en suero. También se han observado bajos niveles en la producción de timulina, timopoyetina y disminución en la proliferación celular [Savino et al., 2007; Mittal et al., 1988], modificaciones en las subpoblaciones celulares, incremento en la frecuencia de apoptosis [Ortiz et al., 2001; Ortiz et al., 2008], junto con alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidante [He et al., 2012].

Del mismo modo, se han reportado cambios morfológicos e histológicos, a causa del aumento de fibronectina, laminina y colágeno [Savino et al., 2007; Barone et al., 1993], con pérdida en la distinción entre áreas corticales y medulares del timo, así como, disminución en el volumen de tejido epitelial en estas dos zonas [França et al., 2009], mostrando pocos timocitos y cuerpos de Hassall alargados, degenerados y ocasionalmente calcificados [Hoffman-Goetz, 1986].

1.3 Estrés oxidante

Bajo condiciones fisiológicas normales, la producción de prooxidantes y antioxidantes se mantienen en equilibrio. El EOx, se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) originadas a partir de oxígeno molecular y los mecanismos de defensa antioxidante, en el que los niveles de prooxidantes están en exceso. Estos últimos, son sustancias que generan oxidantes o inhiben los sistemas antioxidantes ganando electrones en las reacciones redox [Thomas, 2013].

Las ERO pueden clasificarse en dos tipos:

1) Radicales libres (RL), como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido (ROO^{\cdot}), oxígeno singulete (1O_2) y radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$) siendo éste el más reactivo. Todas estas moléculas poseen uno o más electrones desapareados en su último orbital externo, confiriéndoles gran inestabilidad y por lo tanto, reactividad con otras moléculas.

2) Especies reactivas de oxígeno que no son RL, como el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que aunque no son RL pueden generarlos rápidamente en presencia de metales de transición como el hierro (Fe^{2+}) o cobre (Cu^{1+}), mediante la reacción de Fenton [Halliwell y Gutteridge, 2015; Venereo, 2002].

Las fuentes principales en la producción de ERO en la célula son las enzimas de la cadena respiratoria, así como enzimas asociadas al metabolismo del ácido araquidónico, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, xantina oxidasa, NADPH oxidasa, triptófano dioxigenasa y el citocromo P-450. De manera exógena también pueden generarse por la exposición a diversos agentes físicos como la luz UV, radiación ionizante, humo del cigarrillo, medicamentos y dietas inapropiadas [Castellanos, 2008; Königsberg, 2008].

Las ERO se han visto involucradas en la etiología o patología de más de 100 enfermedades, entre las que destacan distintos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas, diabetes, trastornos neurológicos [Céspedes y Sánchez, 2000] y desnutrición [Golden y Ramdath, 1987].

Las ERO pueden causar daño oxidante por promover y originar oxidación en macromoléculas tales como carbohidratos, lípidos, proteínas e incluso en el ADN y por consiguiente, pueden provocar en ellas alteraciones estructurales y/o funcionales [Marnett et al., 2003; Gutiérrez et al., 2009].

1.3.1 Daño a lípidos por estrés oxidante

La peroxidación lipídica (LPx) se puede describir como un proceso en el cual oxidantes tales como las ERO, atacan a los ácidos grasos, especialmente a los poliinsaturados de doble enlace carbono-carbono (PUFAs) de las membranas celulares, provocando la eliminación de un átomo de hidrógeno de la cadena, para generar un radical lipídico (L^\bullet). Este RL da lugar a un endoperóxido o toma un átomo de hidrógeno de un carbono de otro ácido graso poliinsaturado, para formar un nuevo radical lipídico y un hidroperóxido. Este radical, se puede combinar con el O_2 y se propaga el daño, dando como productos principales al malondialdehído (MDA) y al 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) [Gutiérrez et al., 2009; Ayala et al., 2014]. Así, las membranas pueden resultar seriamente dañadas y por consiguiente, su funcionalidad se ve alterada, por lo que este tipo de daño puede repercutir sobre la salud humana [Burcham, 1998].

1.3.2 Daño a proteínas por estrés oxidante

Todos los aminoácidos que conforman a las proteínas son blancos del daño oxidante, aunque algunos son más susceptibles que otros como son la prolina, arginina, lisina y treonina; ese tipo de daño puede ser ocasionado ya sea por ataque directo por parte de los RL o indirecto por productos secundarios del EOX; cuyo resultado suele ser la introducción de un grupo carbonilo libre y formar así, las llamadas proteínas carboniladas (aldehídos y cetonas) que son sumamente estables [Sánchez-Rodríguez et al., 2004; Campos, 2014].

Este daño puede ser irreversible y traer consigo diferentes consecuencias tales como el enrollamiento erróneo de la estructura secundaria, pérdida de la formación de las estructuras terciarias y cuaternarias; así como, el entrecruzamiento entre proteínas o con otras biomoléculas como la glucosa (glucosilación) [Sánchez-Rodríguez et al., 2004; Borton y Jauniaux, 2011].

Por ejemplo, el peroxinitrito puede reaccionar con residuos de tirosina para formar 3-nitrotirosina. A niveles fisiológicos se cree que la nitración de proteínas puede ser selectiva y reversible, conduciendo a la activación de una manera análoga a la fosforilación, pero a niveles más altos, pueden ser perjudiciales. Así mismo, la abstracción de un átomo de hidrógeno del grupo tiol de la cisteína puede conducir a la formación de disulfuros y por lo tanto un plegamiento anormal de la proteína [Borton y Jauniaux, 2011].

1.3.3 Daño al ADN por estrés oxidante

El daño por EOX inducido por radicales $^{\circ}\text{OH}$ a nivel del ADN, puede provocar la inactivación o pérdida de genes y si este daño no es reparado puede acumularse y heredarse a las siguientes generaciones celulares; dando lugar a mutaciones o transformaciones carcinogénicas que pueden llevar a la muerte [Venereo, 2002].

El daño en las bases del ADN puede conducir a la generación de aductos, como es el caso de las moléculas timidín glicol, 8-hidroxi-citosina y la más abundante de todas la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) que resulta de la unión del radical $^{\circ}\text{OH}$ al carbono 8 de la guanina [Halliwell y Gutteridge, 2015; García-Triana et al., 2012]. Siendo la guanina, la base más susceptible a ser dañada por diferentes moléculas oxidantes [Königsberg, 2008].

Otro componente de la molécula de ADN que es susceptible a ser dañada por EOX es la desoxirribosa, la que al oxidarse puede inducir al rompimiento entre el azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido; generar sitiosapurínicos o apirimidínicos (sitios AP) mecanismos mediante los cuales se forman rupturas de cadena sencilla o doble; lo que a su vez provoca inestabilidad genética [González-Torres et al., 2000; García Triana et al., 2013]. Mientras que si el daño se da a nivel de histonas se puede llevar a cabo la formación de enlaces cruzados que interfieren con el plegado de la cromatina, la reparación del ADN y la transcripción.

Así mismo, el ADN mitocondrial (ADNmt) también es vulnerable a los ataques de las ERO, a causa de su proximidad al lugar de generación del O₂ por parte de la cadena transportadora de electrones, junto con la falta de protección ya que no cuenta con histonas ni con mecanismos de reparación tan eficientes. En consecuencia, el daño al ADNmt es extenso, incluso en condiciones normales; ya que las mutaciones ocurren de cinco a 10 veces más, en comparación con las observadas en el ADN nuclear. Por lo tanto, debido a que el ADNmt codifica para varias proteínas, incluyendo enzimas de la cadena de transporte de electrones, las mutaciones pueden conducir a problemas en la producción de energía en la célula y el riesgo de nuevos escapes de electrones, lo que puede agravar el EOX [Borton y Jauniaux, 2011].

1.4 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier molécula que retrasa, evita o elimina el daño oxidante a una molécula, actuando como donador de electrones (agente reductor) [Thomas, 2013]. De tal manera, que los RL pueden ser transformados en productos menos tóxicos o no tóxicos para la célula [González-Torres et al., 2000] y se encuentran presentes en concentraciones bajas en comparación con la cantidad de sustratos oxidables [Thomas, 2013].

Este sistema es fundamental para la homeostasis celular. Se divide en defensas de tipo enzimáticas y no enzimáticas que suelen ser eficaces

en la neutralización de las ERO [Borton y Jauniaux, 2011; Birben et al., 2012].

Las defensas no enzimáticas incluyen al ascorbato (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (vitamina A) y glutatión (GSH), entre otros. Estos actúan de forma coordinada, por lo que el ascorbato es necesario para regenerar α -tocoferol. En este grupo también se encuentran la ceruloplasmina y transferrina que juegan papeles importantes en el secuestro de metales de transición libres; por lo que inhiben la reacción de Fenton y la producción del radical $^{\circ}\text{OH}$.

1.4.1 Antioxidantes enzimáticos

Las defensas enzimáticas se caracterizan por tener un metal de transición en su núcleo, capaz de asumir diferentes valencias ya que transfieren electrones durante el proceso de detoxificación [Borton y Jauniaux, 2011]. Según sus mecanismos de acción se les considera como antioxidantes primarios, pues evitan la reducción secuencial y univalente del oxígeno molecular mediante sistemas enzimáticos [Hicks et al., 2006]. De tal manera, que previenen la formación de nuevas ERO, efecto que se logra por la conversión de estas especies en moléculas menos perjudiciales para la célula, antes de que puedan reaccionar con diversas biomoléculas.

Se han descrito un gran número de enzimas especializadas que inactivan por diferentes mecanismos a las ERO, como es el caso de la

superóxido dismutasa SOD, catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), entre otras [Hicks et al., 2006].

1.4.1.1 Superóxido dismutasa

La SOD detoxifica al radical O_2^\bullet mediante una dismutación para producir H_2O_2 y O_2 . La dismutación es un tipo especial de reacción, donde dos molécula de sustrato, en este caso O_2^\bullet son al mismo tiempo oxidadas y reducidas, la función de SOD es despojar de un electrón a una de estas moléculas y la coloca en la otra. Por lo tanto, una termina con un electrón de menos, formando al O_2 y la otra termina con un electrón extra, uniéndose rápidamente a dos iones de hidrógeno para formar el H_2O_2 [Goodsell, 2007].

Las SOD son una familia de metaloproteínas que se caracterizan por su tipo de cofactor metálico (CuZn-SOD, MnSOD, FeSOD y NiSOD) con ubicaciones diferentes. Las dos últimas han sido aisladas de bacterias, la SOD de manganeso (MnSOD o SOD2) está restringida a la matriz mitocondrial y la de cobre (Cu) y zinc (Zn) (CuZn-SOD o SOD1) se encuentra en el espacio intermembranal [Borton y Jauniaux, 2011]. El Cu^{2+} de la CuZn-SOD es el responsable de su actividad catalítica y lleva la transferencia de electrones, mientras que el Zn^{2+} estabiliza la conformación de la enzima [Hansberg, 2002]. La actividad de esta familia de enzimas es imprescindible para la vida normal de los organismos y para sobrevivir al estrés oxidante [Raamsdonk y Hekimi, 2012].

1.4.1.2 Glutación peroxidasa

El H_2O_2 se puede difundir fácilmente a través de las membranas plasmáticas; además de ser originado vía enzimática, también puede ser producido por la xantina oxidasa, NADPH oxidasa y por los peroxisomas; se descompone en agua por la acción de la enzima GPx que tiene la particularidad de poseer una selenocisteína; es decir, una cisteína en la que el azufre ha sido reemplazado por el selenio (Se), en su sitio activo [Hansberg, 2002]. La actividad de la GPx depende de la presencia de GSH como donador de protones. El GSH es el principal amortiguador redox celular y se sintetiza en el citoplasma a partir de L-glutamato, L-cisteína y glicina. El GSH participa en un gran número de reacciones detoxificantes formando al disulfuro de glutatión (GSSG), que se convierte de nuevo a GSH por la acción de la glutatión reductasa a expensas de NADPH. Esta última se genera a través de la vía de la pentosa fosfato, en donde la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es la primera enzima; por lo que una disminución de su actividad puede comprometer las concentraciones de GSH [Borton y Jauniaux, 2011].

Existen varios tipos de GPx en mamíferos con diferentes localizaciones: la glutatión peroxidasa tipo 1 o citosólica (GPx1) es la más abundante y tiene una mayor afinidad por el H_2O_2 que por los lipoperóxidos, la GPx2 o gastrointestinal, GPx3 o plasmática y la GPx4 de fosfolípidos. Todas son homotetrámeros, con la excepción de la última que es un monómero [Hansberg, 2002].

1.4.1.3 Catalasa

Al igual que la enzima GPx, la CAT puede descomponer al H_2O_2 en agua y oxígeno, utilizando al ión hierro para llevar a cabo su función. Una sola enzima puede descomponer millones de moléculas de H_2O_2 cada segundo, por ello, se le considera una de las enzimas más eficientes encontradas en las células [Goodsell, 2004].

Esta enzima realiza su rápida destrucción del H_2O_2 en dos pasos. En primer lugar una molécula H_2O_2 se une al sitio activo de CAT. Un átomo de oxígeno se une al Fe^{2+} y toma un electrón del hemo, el resto lo libera como una molécula de agua. Consecutivamente una segunda molécula de H_2O_2 se une al sitio activo, cediendo un electrón al ferroxilo y otro al hemo, restableciendo el estado inicial de la enzima y conduciendo así a la formación de agua y oxígeno [Hansberg, 2002].

1.4.2 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos se utilizan principalmente como aditivos alimenticios, en la industria farmacéutica y en la de productos cosméticos; debido a su bajo costo, amplia disponibilidad y alto rendimiento, para prevenir la rancidez, formación de productos tóxicos y decoloración de pigmentos que provocan en sí, la pérdida de los valores nutricionales o de calidad deseables [Xiu-Qin et al., 2009].

Dentro de los antioxidantes sintéticos destacan los que presentan un grupo fenólico en su estructura molecular; tales como butilhidroxianisol

(BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y el tert-butilhidroquinona (tBHQ) [Gunstone, 2006].

Estos antioxidantes muestran una gran eficiencia para suprimir la propagación de la reacción en cadena vía RL que afectan a los ácidos grasos poliinsaturados y que pueden descomponerse en aldehídos, cetonas, alcoholes, etc., responsables del sabor y olor característicos de la rancidez. En modelos experimentales, se ha visto que algunos de estos antioxidantes inhiben la apoptosis mediante la abolición de la liberación del citocromo c, cuando son sometidas a radiación UV en células Sf9 [Mohan et al., 2003], pueden conferir efectos neuroprotectores [Bahia et al., 2012] y acciones citoprotectoras por contribuir a la protección cardiaca [Zhang et al., 2015].

Sin embargo, no hay que perder de vista que aunque se ha demostrado que son eficaces para proteger del EOx, el exceso de éstos puede producir toxicidad o mutagenicidad; poniendo así en riesgo la salud de las personas [Nakagawa et al., 1994].

1.4.2.1 tBHQ

El tBHQ, es considerado el más efectivo de los antioxidantes sintéticos, por presentar una mayor estabilidad ante el proceso de calentamiento de los aceites.

El tBHQ es un antioxidante de calidad alimentaria, que fue desarrollado para la estabilización de aceites vegetales, grasas y alimentos,

frente al deterioro, rancidez y decoloración, ocasionados por la oxidación lipídica [Frankel, 2014]. Este antioxidante es liposoluble y no forma complejos con el hierro o el cobre y está disponible como un polvo amarillento [Shahidi y Wanasundara, 1992].

Estudios realizados en animales de experimentación han demostrado la rápida absorción y excreción de sus metabolitos conjugados sulfurados por la orina, de hasta un 80% en las primeras 24 horas, principalmente encontrados como 4-O-sulfato (65%), 4-O-glucorónido (30%) y en menor proporción tBHQ sin cambios [Esch, 1986].

Sus efectos toxicológicos más importantes se han observado con dosis mayores a 220 mg diarios/Kg de peso corporal, estos efectos consistieron en un aumento en la incidencia de hiperplasia y de inflamación en riñón de ratas macho y en mayor frecuencia de pigmentación en bazo de hembras [OMS, 1999].

El tBHQ ha recibido gran atención en los últimos años, debido a que induce la actividad transcripcional de Nrf2 y por consecuencia ejerce un efecto protector frente al estrés oxidante, al inducir enzimas de la fase II, incluidas la glucoronosiltransferasa y GST [OMS, 1999; Gharavi et al., 2007].

1.5 Hormesis

Los organismos han tenido que adaptarse a condiciones y agentes adversos, por lo que han desarrollado mecanismos complejos para

sobrevivir a lo largo de la evolución, activando un proceso conservado conocido como hormesis [López-Diazguerrero et al., 2013], que se define como una respuesta adaptativa bifásica de las células; caracterizada por una estimulación de dosis baja o subletal de un agente, que es dañino a dosis altas, es capaz de activar una respuesta adaptativa incrementando la resistencia de una célula u organismo frente a un estrés más severo [Calabrese et al., 2010]. Los ejemplos incluyen el ejercicio, la restricción de energía en la dieta y la exposición a dosis bajas de ciertos fitoquímicos [Mattson, 2008].

Hallazgos recientes han aclarado las vías de señalización celulares y mecanismos moleculares que median este tipo de respuesta tales como cinasas y factores de transcripción, entre ellos Nrf2 y NF- κ B. Como resultado las células aumentan la producción de proteínas citoprotectoras y de restauración, incluyendo factores de crecimiento, enzimas antioxidantes y de fase II. Una mejor comprensión de los mecanismos de hormesis en los niveles celulares y moleculares está llevando a nuevos enfoques para la prevención y el tratamiento de enfermedades [Mattson, 2008].

1.6 Factores de transcripción y estrés oxidante

Las ERO pueden inducir la expresión de varios genes implicados en la transducción de señales [Poli et al., 2004]. Por ejemplo, una alta proporción de GSH es importante para la protección de la célula frente al

daño oxidante y un desequilibrio entre el cociente GSH/GSSG puede provocar la activación de factores de transcripción redox sensibles; tales como, el factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), los cuales están implicados en la respuesta inflamatoria [Birben et al., 2012]. Además, del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) que transcribe enzimas que mantienen el estado redox de la célula [Königsberg, 2007].

No obstante, existen otros factores de transcripción que censan el daño oxidante a nivel del ADN con el fin de inducir su reparación o en el último de los casos la muerte celular programada cuando no hay forma de repararlo, como es el caso de p53 [Sablina et al., 2005]. La activación de factores de transcripción a través de ERO se logra por las cascadas de transducción de señales que transmiten la información desde el exterior hacia el interior de la célula [Birben et al., 2012].

1.6.1 Nrf2

El gen *nrf2* se encuentra localizado en el cromosoma 2 (2q31.2) y codifica para un factor transcripcional denominado factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) [Königsberg, 2007]. Este factor transcripcional pertenece a una familia de proteínas básicas con un característico “zipper” o cierre de leucinas (bzip) en el C-terminal, responsable de su unión con el ADN; mientras que la región N-terminal, está conformada por un dominio

ácido rico en ácido glutámico y aspártico que es requerido para su activación transcripcional [Moi et al., 1994].

Su vida media es muy corta, de alrededor de 15-20 minutos, sugiriendo su rápida degradación dentro de la célula, mediante la vía de ubiquitinación y reconocimiento del proteosoma [Nguyen et al., 2009].

La actividad de Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida, por su unión con la proteína citoplasmática Keap1 que fomenta la degradación permanente de Nrf2. Al disociarse este complejo, provoca que Nrf2 se transloque al núcleo conduciendo así a la activación transcripcional. El sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra el estrés oxidante frente a varias patologías [Königsberg, 2007].

Se sabe que Nrf2 regula la transcripción de diversos genes que codifican para enzimas detoxificantes y antioxidantes como: la NADPH quinona oxidoreductasa-1 (NQO1), glutatión-S-transferasa (GST), CAT, GPx1 y SOD1 [Jong y Johnson, 2004; Varady et al., 2012]; o que participan en los mecanismos de sobrevivencia celular, por la inducción de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 [Niture, 2012]. Esto lo logra mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (elemento de respuesta antioxidante) [Lee y Johnson, 2004; Zhu et al., 2005].

Como factor de transcripción Nrf2 tiene un papel muy importante en la regulación metabólica e interactúa con diferentes sistemas de señalización que responden al insumo nutricional [Sykiotis et al., 2011].

1.6.2 NF- κ B

El factor transcripcional de la cadena κ de anticuerpos de células B (NF- κ B), puede ser utilizado para referirse a dos subfamilias relacionadas estructuralmente la Rel (c-Rel, RelB, RelA (p65)) y la NF- κ B (p105, p100); estas últimas después de madurar dan origen a las subunidades p50 y p52, respectivamente. El C-terminal de las proteínas Rel contienen dominios de activación transcripcional (TAD), mientras que el C-terminal de las proteínas de la subfamilia NF- κ B presentan dominios de ankirina; ambas familias comparten un dominio común altamente conservado, llamado dominio de homología Rel (RHD). A través del cual, los miembros de estas familias se unen y forman homodímeros o heterodímeros como p50/p65 o p52/p65 con diferentes consecuencias fisiológicas, además de contener las secuencias de localización nuclear, las de sus inhibidores I κ Bs y las de unión al ADN. Al igual que la subfamilia NF- κ B, las proteínas inhibitoras independientes I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ e I κ B γ) se componen principalmente de repeticiones de ankirina y presentan dos residuos de serina N-terminal que sirven como sitios de fosforilación. Los I κ B inhiben la actividad de este factor transcripcional debido a la unión que presenta con sus dímeros; esto provoca el bloqueo estérico de las secuencias de localización nuclear de NF- κ B y su retención en el citoplasma.

Por lo tanto, la actividad NF- κ B va a depender de su localización celular. Es decir, si se localiza en el citoplasma es debido a que se encuentra formando un complejo trimérico con alguno de sus inhibidores

(I κ B), el que a su vez, oculta la secuencia de destino nuclear y por tanto NF- κ B es transcripcionalmente inactivo. Cuando I κ B se fosforila por cinasas (IKK) en los residuos de serinas S32 y S36, se inicia un proceso de ubiquitinación, lo que permite el reconocimiento por parte del proteosoma y degradación de I κ B; al desaparecer el inhibidor se descubre la secuencia de localización nuclear y permite al dímero trasladarse al núcleo. Entonces NF- κ B se une al ADN y activa la transcripción de sus genes blanco; entre ellos los implicados en la respuesta inmunológica, inflamación, respuesta al estrés, proliferación y diferenciación celular, apoptosis y desarrollo [Baldwin, 1996; López-Bojorquez, 2004; Hernández y Rojas, 2005; Gilmore, 2006; Gloire et al., 2006].

Existen diversas señales que pueden activar a NF- κ B como estímulos mitogénicos, agentes infecciosos, antígenos virales, radiación UV o citocinas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α . También el estado redox o la sobreexpresión de enzimas antioxidantes tienen un fuerte impacto sobre la regulación de NF- κ B; por lo tanto, este factor puede ser regulado por el estado general de óxido-reducción de la célula [López-Bojorquez, 2004]. Por ejemplo, se sugiere que el H₂O₂ activa a este factor transcripcional, principalmente a través de la vía clásica IKK-dependiente, aunque los mecanismos moleculares que conducen a esta activación son de tipo celular específico [Gloire et al., 2006]. A su vez, la generación de ERO puede ser gatillada por un gran número de estímulos; entre ellos, las citocinas que convergen en la activación de este factor transcripcional, y

con ello en la amplificación de la respuesta inflamatoria [Miranda et al., 2007].

También se ha señalado que NF- κ B puede ejercer una acción citoprotectora y proteger a las células del EOX a través de la inducción de MnSOD en respuesta a TNF- α , y esto es al menos parcialmente responsable de la resistencia a la apoptosis; presumiblemente a través de la liquidación de ERO [Delhalle et al., 2002]. Aunque en algunos casos resulta ser pro-apoptótico, dependiendo del estímulo y del contexto celular [Hernández y Rojas, 2005].

1.7 Inflamación

El proceso inflamatorio es en sí mismo, un proceso patológico; mientras que la respuesta antiinflamatoria natural que le precede tiende a revertir la homeostasis del tejido dañado hacia la normalidad y por lo tanto, se le considera como una reacción de defensa [Stankov, 2012] que protege al cuerpo contra infecciones y lesiones [Serhan et al., 2007].

Se sabe que una de las más antiguas y conservadas respuestas homeostáticas del cuerpo frente a la lesión, daño tisular, crecimiento neoplásico, desórdenes inmunológicos o inflamación, es la producción de proteínas de la fase aguda [Guillén et al., 2011], como son la haptoglobina, proteína C reactiva, proteína amiloide A sérica, ceruloplasmina, alfa1-glicoproteína ácida y el fibrinógeno [Gauldie et al., 1987; Martínez-Subiela et al., 2001] que juegan un papel clave en el proceso inflamatorio. Los

cambios en sus concentraciones plasmáticas, responden a un aumento en su síntesis por parte del hígado y aunque, no permiten conocer ni la ubicación, ni las causas de la reacción inflamatoria; constituyen una excelente herramienta como marcadores inflamatorios de origen inmunológico [Iglesias-González et al., 2014].

Por otra parte, la influencia de citocinas, hormonas, factores de crecimiento, dependiendo de los receptores presentes en las células diana, pueden activar un proceso de eliminación celular controlada genéticamente

1.8 Citocinas

Las citocinas son proteínas secretadas por varias células implicadas en la inmunidad innata y adaptativa como respuesta a un estímulo. Se sintetizan en respuesta a antígenos y actúan como reguladores sistémicos a concentraciones del orden de nano o picomoles [Filella et al., 2002; Abbas et al., 2015]. De modo tal, que diferentes citocinas estimulan distintas respuestas que participan en la inmunidad e inflamación. En la inmunidad innata las citocinas median las reacciones inflamatorias iniciales y favorecen la eliminación de los microorganismos. En la inmunidad adaptativa estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos estimulados por antígenos y activan a células especializadas como a los macrófagos [Abbas et al., 2015].

Las citocinas son mediadores necesarios para conducir la respuesta inflamatoria, hacia las regiones de infección o lesión y pueden ser del tipo antiinflamatorias como IL-4, IL-10, IL-13 que atenúan la respuesta inflamatoria o proinflamatorias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 y TNF- α que la aumentan [Oliveira et al., 2011]. A menudo, es la actividad excesiva de citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias las que causan daño al huésped o lo inmunocompromete [Lin et al., 2000].

1.8.1 Interleucina 6

NF- κ B juega un papel central en la respuesta frente a infecciones y lesiones tisulares. Por lo tanto, está implicado en el control de una gran variedad de genes implicados en el proceso inflamatorio; como es el caso del gen de interleucina 6 (IL-6) [Lieberman y Baltimore, 1990; Brasier, 2010].

La IL-6 es una citocina que actúa en la inmunidad innata y adaptativa genera la madurez de neutrófilos y macrófagos, la diferenciación y el mantenimiento de los linfocitos T citotóxicos. Por ejemplo, en la inmunidad innata, estimula la síntesis de proteínas de fase aguda frente a lesiones e infecciones por parte de los hepatocitos y contribuye a los efectos sistémicos de la inflamación. En la inmunidad adaptativa, IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en productores de anticuerpos [Abbas y Lichtman, 2015].

IL-6 es una proteína glicosilada con una masa molecular que oscila entre los 22 a 27 kDa dependiendo del tipo y de la cantidad de modificaciones post-traduccionales que sufre en diferentes tejidos. Es secretada por diferentes tipos celulares, tales como macrófagos, monocitos, eosinófilos, hepatocitos; siendo la IL-1 y el TNF- α sus potentes inductores [Barros et al., 2011; Santos et al., 2013]. Aunque también se sabe que existen otros factores que pueden elevar en plasma su actividad como es el caso de la exposición al estrés psicológico [LeMay et al, 1990].

El receptor de IL-6 (IL-6R) consta de una proteína en donde se une la IL-6 y una subunidad transductora de señales de 130 kDa llamada gp130 que activa la vía JAK/STAT [Abbas y Lichtman, 2015]. Las células que expresan tanto gp130 e IL-6R (señalización clásica) media la respuesta antiinflamatoria. En contraste, las células que expresan gp130 pero no IL-6R, sólo pueden ser activadas por transeñalización mediante el complejo de IL-6 y IL-6R soluble (sIL-6R) que media la respuesta proinflamatoria [Scheller et al., 2011]. En lo que respecta a la respuesta proinflamatoria se ha observado que la expresión de IL-6 incrementa proporcionalmente dependiendo de la gravedad de la inflamación [Yang et al., 2014]. La desregulación de la señalización de IL-6 contribuye a la aparición y el mantenimiento de varias enfermedades [Heinrich et al., 2003]. Puede causar fiebre y activar el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, usando los receptores α (IL-6R α) y la subunidad gp130 y también ejercer propiedades

antiinflamatorias durante la lesión, por liberar receptores solubles de TNF (sTNFRs) e IL-1AR [Barros et al., 2011].

1.8.2 TNF- α

El factor de necrosis tumoral (TNF- α), también conocido como caquectina, es una citocina proinflamatoria producida principalmente por monocitos, macrófagos, mastocitos, linfocitos T y NK. Se presenta en dos formas: una transmembranal de 26 kDa y otra de 17 kDa, ambas son biológicamente activas. Posee los receptores TNFR1 (55 kDa) y TNFR2 (75 kDa). El primer receptor se expresa exclusivamente en neuronas y está asociado a la mayoría de los efectos biológicos de TNF- α , incluyendo la respuesta inflamatoria y la apoptosis. En tanto que el segundo se encuentra principalmente en macrófagos y monocitos; estimulando la proliferación de los linfocitos T y fibroblastos [Oliveira et al., 2011; Abbas y Lichtman, 2015].

La unión de TNF- α a TNFR2, provoca la atracción de las proteínas denominadas factores asociados al receptor TNF (TRAF) hacia los dominios citoplasmáticos de los receptores, los TRAF activan finalmente a factores de transcripción en especial a NF- κ B y a la proteína de activación 1 (AP-1), mientras que la unión de citocinas a TNFR1 induce la atracción de una proteína adaptadora que activa a caspasas y desencadena la apoptosis.

Se le considera uno de los mediadores más precoces y potentes de la respuesta inflamatoria; puesto que su principal función biológica consiste

en estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hacia las zonas de infección y activarlos para erradicar a los microorganismos, a través de varias acciones sobre leucocitos y células endoteliales y vasculares [Abbas y Lichtman, 2015]. Otras acciones del TNF- α consisten en activar la coagulación, estimular la expresión o la liberación de moléculas de adhesión, PGE₂, factor activador de plaquetas, glucocorticoides, etc. Aunque su vida media plasmática es de apenas 20 minutos, esto es suficiente para activar distalmente a otras citocinas y provocar cambios metabólicos y hemodinámicos importantes [Oliveira et al., 2011].

Se sugiere que las ERO pueden actuar como mediadores de la señalización de TNF- α . En relación a esto se ha observado que el EOX inducido por TNF- α puede comprometer la funcionalidad mitocondrial, al dañar su ADN y la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, en células cardíacas [Suematsu et al., 2003; Mariappan et al., 2007].

2. Antecedentes

En los últimos años, se ha relacionado al EOx con diversas condiciones patológicas. Entre ellas la desnutrición, considerándose a las infecciones, la proliferación de bacterias y la ingesta de toxinas, algunas de las fuentes de EOx en niños con este padecimiento [Albretch y Pelisser, 1995]. Así mismo, otro factor importante que contribuye al EOx en niños con desnutrición grave es la disminución de ciertos antioxidantes y oligoelementos. Entre ellos, las vitaminas A, C y E [Lenhartz et al., 1998], ceruloplasmina, β -caroteno [Becker et al., 1994], Zn, Se, GSH, la actividad de GPx, GST [Ashour et al., 1999], CAT y SOD, asociado a un aumento en la concentración de MDA y por consiguiente amplificación de LPx en eritrocitos de niños con desnutrición tipo marasmo [Bosnak et al., 2010].

Por su parte en niños con desnutrición tipo kwashiorkor, existe la evidencia que vincula el desarrollo de edema con una disminución en los niveles de ciertos antioxidantes como vitamina E [Becker et al., 1994], GSH [Jackson et al., 1986; Sive et al., 1993] y albúmina sérica. Además, de no encontrarse mecanismos antioxidantes compensatorios, tales como el incremento en las actividades enzimáticas de glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa [Becker et al., 1995]. Las concentraciones bajas de estos antioxidantes pudieran ser el resultado de las restricciones en la dieta, aunque otra opción es que sufran degradación proteolítica por el proceso oxidante [Albretch y Pelisser, 1995].

De igual modo, en modelos experimentales se ha observado una disminución en la actividad enzimática de SOD y CAT en riñón, pulmón, hígado y en algunas áreas del cerebro con un concomitante incremento de LPx en estos órganos [Jimoh et al., 2005; Feoli et al., 2006].

En lo que respecta a los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, se observó que la desnutrición experimental durante el periodo de lactancia está asociada a una disminución en los niveles de expresión relativa de los genes SOD, GPx y CAT que codifican para enzimas antioxidantes en timo. Estos resultados pueden sugerir que existen alteraciones en el manejo del estrés oxidante, desde niveles transcripcionales, por parte de los organismos desnutridos, puesto que los niveles de la expresión de estos genes fueron sumamente bajos e igualmente proporcionales al nivel del desgaste corporal. Estas alteraciones, probablemente se deban a un desequilibrio en los mecanismos de defensa antioxidante que eliminan a los RL, lo que puede repercutir en la función del timo y contribuir a explicar la deficiente respuesta inmunológica que se ha observado en estos organismos [Gavia, 2012].

Por otra parte, la desnutrición no sólo se caracteriza por infecciones recurrentes, sino también por inflamación crónica que puede afectar el crecimiento infantil [Bourke et al., 2016]. Esto último, debido a una dieta inadecuada durante la vida intrauterina y el ambiente inflamatorio crónico de bajo grado materno que pueden conducir a bajos niveles del factor de

crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), asociado a un incremento de marcadores inflamatorios tales como la proteína C-reactiva (PCR) y alfa-1-glucoproteína ácida (AGP) en plasma, que impactan en el peso y crecimiento infantil durante el primer año de vida; incluso si los niños se encuentran aparentemente saludables [Prendergast et al., 2014]. De hecho, se propone que la desnutrición dirige la acción de la hormona de crecimiento (GH) hacia el catabolismo de grasas y producción de glucosa; lejos del crecimiento lineal dependiente de energía y de IGF-1 [Bartz et al., 2014].

Cabe señalar, que en modelos experimentales se ha demostrado que la desnutrición proteica sin otro estímulo exógeno, induce un estado inflamatorio de bajo grado, debido al incremento de ciertas proteínas como son IL-6 y TNF- α en plasma. Estos cambios son similares a las respuestas observadas durante los estados inflamatorios [Ling et al., 2004]. Las alteraciones de estas citocinas por el efecto de la desnutrición pueden comprometer la salud de los individuos, ya que se ha demostrado que un incremento de citocinas como IL-6 y TNF- α predicen la mortalidad de niños con desnutrición severa; aunque, con una rehabilitación nutricional adecuada esto puede revertirse [Bartz et al., 2014].

En un estudio realizado en hígado de ratones bien alimentados F2 (segunda generación) de madres sometidas a restricción dietética durante la gestación, presentaron marcas epigenéticas en el locus *Lxra* [Martínez et al., 2014], el cual codifica para un receptor nuclear implicado en la

regulación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , en el metabolismo de lípidos, en la regulación de la acción de glucocorticoides y leptina [Steffensen et al., 2004]; esto puede implicar un defecto inmunológico subyacente en los organismos desnutridos que inclusive compromete la salud de su descendencia [Martínez et al., 2014].

Así mismo, se ha encontrado un menor contenido de GSH en hígado de ratas con desnutrición proteica [Ling et al., 2004], inversamente asociado con los niveles de activación de NF-kB; dando lugar a un aumento de la transcripción de citocinas proinflamatorias tales como IL-1 y TNF- α [Sies et al., 1999].

3. Justificación

La desnutrición es un grave problema de Salud Pública que alcanza proporciones alarmantes en los países en vías de desarrollo. Dado que, actualmente se estima que existen 209 millones de niños menores de cinco años con algún tipo de desnutrición a nivel mundial y México no queda excluido en estas proporciones, pues se considera que en nuestro país alrededor del 18% de los niños menores de cinco años, están desnutridos. Este padecimiento no sólo afecta la calidad de vida del niño, sino también la compromete; además de que puede conducir a un deterioro permanente en la vida adulta e incluso trascender a generaciones futuras.

En este estudio, se utilizó un modelo experimental en el que se indujo la desnutrición durante el periodo de lactancia, que corresponde al tiempo en donde los efectos ocasionados por la desnutrición pueden ser más significativos. Específicamente se menciona que los organismos desnutridos presentan una respuesta inmunológica alterada, de ahí la importancia de estudiar órganos fundamentales para este tipo de respuesta, tales como el timo.

Se ha propuesto que un factor que contribuye al EOx en los organismos desnutridos es la disminución de ciertos antioxidantes como resultado de las restricciones en su dieta; lo cual puede conducir a un desequilibrio en el estado redox celular. Por lo anterior, se consideró de gran relevancia determinar el contenido y actividades enzimáticas de proteínas encargadas de contrarrestar los efectos de las ERO (tales como

SOD, GPx y CAT); así como, evidenciar si existe EOX en biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN) que son fundamentales para el correcto funcionamiento de la célula. En primer lugar, para establecer si la desnutrición está relacionada con una o ambas alteraciones; ya sea en los mecanismos de defensa antioxidante y/o con daño por estrés oxidante en tino y en segundo lugar, evidenciar cuál de estas biomoléculas presenta mayor grado de susceptibilidad a los efectos de la desnutrición.

Por otra parte, las ERO pueden inducir la expresión de diversos genes implicados en la transducción de señales. Entre ellos, los que participan en la respuesta inflamatoria; tipo de respuesta, que a su vez se ha asociado con la desnutrición; debido principalmente, al incremento de proteínas proinflamatorias. Por lo anteriormente expuesto, es de gran trascendencia establecer el papel que tiene NF- κ B en la desnutrición, un factor implicado en la regulación del proceso inflamatorio y que a su vez, regula a genes que codifican para citocinas proinflamatorias tales como IL-6 y TNF- α , ya que se ha demostrado que un incremento de estas citocinas compromete la salud del individuo y predice la mortalidad infantil en niños con desnutrición severa. Esto con la finalidad de esclarecer si la desnutrición influye en la respuesta inflamatoria y con el factor que regula dicho proceso; y con ello, profundizar y comprender los mecanismos fisiopatológicos de la desnutrición; tales como son el aumento de citocinas proinflamatorias mediadoras de este tipo de respuesta.

Se han implementado en niños con desnutrición severa, terapias de restauración de la capacidad antioxidante mediante la aplicación oral de equivalentes de cisteína en forma de glutatión, como la N-acetil cisteína (NAC) y/o ácido α -lipoico, los cuales han sido beneficiosos para la recuperación bioquímica y clínica; evidenciado por el incremento de GSH en sangre y su velocidad de síntesis; así como, aumento en la concentración total de proteínas. Por su parte en modelos experimentales, se ha evidenciado que la administración de NAC en ratones desnutridos a los que se les provoca una herida cutánea, mejoran el tiempo de cicatrización relacionado con un incremento en la expresión de TNF- α e infiltración de neutrófilos a niveles observados en el grupo control y con ello, restauración de la respuesta inflamatoria.

Sin embargo, aún no se ha evaluado conjuntamente el efecto de un compuesto sobre los mecanismos de protección antioxidante y el proceso inflamatorio sin otro estímulo exógeno, en organismos desnutridos. Con base en lo anterior, se deriva la idea de utilizar un antioxidante sintético (tBHQ), para evaluar el posible efecto protector contra el daño oxidante mediado por mecanismos de protección antioxidante y el estado inflamatorio regulado por NF- κ B; vinculados con la desnutrición y por ende proponer posibles tratamientos preventivos o coadyuvantes en la terapia nutricional para aminorar los daños ocasionados por esta patología. Lo que probablemente traería consigo beneficios en la salud del individuo.

4. Pregunta de investigación

¿El tBHQ tendrá un efecto protector sobre los mecanismos de protección antioxidante y el proceso inflamatorio en ratas lactantes desnutridas?

5. Hipótesis

1. La desnutrición afectará los mecanismos de protección antioxidante e incrementará el daño oxidante y el estado inflamatorio.
2. El tBHQ protegerá del daño por estrés oxidante y disminuirá el proceso inflamatorio por el restablecimiento de los mecanismos de protección antioxidante.

6. Objetivo general

Evaluar el efecto protector del tBHQ sobre los mecanismos de protección antioxidante y el proceso inflamatorio en ratas lactantes desnutridas.

6.1 Objetivos particulares

1. Evaluar el estado antioxidante y el daño por estrés oxidante en lípidos, proteínas y ADN en tino de ratas lactantes desnutridas.
2. Determinar el estado inflamatorio sistémico en ratas desnutridas.

3. Analizar el efecto del tBHQ sobre el estado antioxidante y el daño por estrés oxidante en lípidos, proteínas y ADN.
4. Establecer el efecto del tBHQ sobre el proceso inflamatorio sistémico en ratas desnutridas.

7. Material y métodos

Se emplearon ratas nodrizas de la cepa Wistar, crecidas en los bioterios de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco e Iztapalapa (UAM-X y UAM-I), mantenidas bajo las siguientes condiciones: L12/O12 a 25°C y Humedad relativa del 45%, con agua filtrada y alimento balanceado para roedores PMI 5001 (Lab Diet, St. Louis, EUA) *ad libitum*; mantenidas en cajas de acrílico transparentes (Círculo ADN, México); con cama de viruta de madera estéril, especial para roedores Beta-Chip (Nepco, NY, EUA). 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]; así como, en la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 [SAGARPA, 2001].

7.1 Desnutrición experimental

La desnutrición se indujo por el método de competencia de alimento durante el periodo de lactancia, el cual consiste en incrementar el número de crías por una madre nodriza, basado en la reducción de la cantidad de alimento consumido por cada una de las crías. Se distribuyeron aleatoriamente a cada una de las crías al día siguiente después de su nacimiento en 2 grupos: grupo desnutridas (DN; 15 crías) y grupo bien nutridas (BN; 6 crías). Se llevó a cabo el registro del peso corporal cada

tercer día, desde el día 1 hasta los 21 días de edad (destete). Al día 21, se determinó el grado de desnutrición considerándose con DN3, cuando presentaron un déficit de peso del 40% o más, DN2 cuando fluctuó entre el 25-39%, y DN1 cuando el déficit se encontró entre el 10-24% con respecto al peso promedio de las BN de la misma edad [Ortiz et al., 1996].

7.2 Grupos experimentales

El grupo control (Ct) estuvo conformado por ratas BN, DN1, DN2 y DN3 sin tratamiento; mientras que el grupo experimental estuvo conformado por ratas BN, DN1, DN2 y DN3 con tratamiento, a estas últimas se les administró una dosis de tBHQ (Sigma, St. Louis, EUA) a una concentración de 75 mg/kg de peso corporal, vía intraperitoneal (i.p.) durante tres días desde el día 18 al 20 después de su nacimiento; cabe señalar que la dosis fue previamente establecida en base a una curva dosis- respuesta.

7.3 Tratamiento con tBHQ

Se administraron diferentes dosis de tBHQ [0, 25, 50, 75 y 100 mg/kg de peso corporal] a ratas BN, DN1, DN2 y DN3 vía i.p. por 3 días, desde el día 18 al 20 después de su nacimiento, para realizar una curva dosis-respuesta con el fin de seleccionar una concentración experimental adecuada, basada en la determinación del cociente GSH/GSSG mediante la técnica de HPLC, posteriormente descrita.

7.4 Obtención de muestras

Las ratas de 21 días de edad, tanto Ct como tratadas con tBHQ, se sacrificaron por dislocación cervical, se les disectó el timo y se recolectó alrededor de 500 μ L de sangre venosa por punción cardiaca en tubos BD Microtainer® con EDTA K₂ (Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA) bajo condiciones asépticas [Bolant et al., 1990]; las muestras de sangre se centrifugaron a 1000 xg a 4° C y se obtuvo el sobrenadante.

El tejido y plasma se almacenaron a -70°C, para llevar a cabo las siguientes determinaciones.

7.5 Extracción y cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas totales se realizó de la siguiente manera: Se colocaron 100 mg de tejido tímico en un tubo eppendorf estéril, al cual se le añadió 200 μ L de buffer de lisis T-PER (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) suplementado con inhibidor de proteasas 1 mM DTT y 0.1 mM PMSF (Sigma, St. Louis, EUA) para disgregarlo; posteriormente se incubó el homogeneizado durante 5 min en hielo, se centrifugó a 14 000 xg por 20 min y se recuperó el sobrenadante. A partir del cual, se determinó la concentración de las proteínas totales por medio del método de Bradford utilizando el reactivo comercial (Bio-Rad, CA, EUA) [Bradford, 1976] y un estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1.41 mg/mL (Bio-Rad, CA, EUA), para la realización de una curva estándar.

7.6 Daño a lípidos por estrés oxidante

El grado de lipoperoxidación en timo se estableció por el método que determina la formación de malondialdehído (MDA) en presencia de ácido tiobarbitúrico. 100 mg de tejido tímico de ratas Ct y con tratamiento fueron colectados, disgregados y resuspendidos en 1mL de NaCl al 0.9% (Sigma, St. Louis, EUA), a partir del homogeneizado se cuantificó la proteína utilizando el reactivo comercial Bradford (mencionado en apartado 6.5). A continuación a 200 μ L de esta mezcla se le agregó 2mL del reactivo ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma, St. Louis, EUA) que contenía [0.075 g de TBA, 2.25 mL de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma, St. Louis, EUA) y 397.8 μ L de HCl (Sigma, St. Louis, EUA), en un volumen final 15 mL de H₂O miliQ], se agitó y se dejó incubar a 94°C durante 20 min, junto con diferentes concentraciones de MDA para la elaboración de la curva estándar. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en hielo durante cinco min y se centrifugaron a 3000 xg durante 15 min. La densidad óptica se estimó en el sobrenadante a una longitud de onda de 532 nm. Los resultados se expresaron en μ mol de MDA/mg de proteína, calculados por interpolación en la curva estándar [Buege y Aust, 1978].

7.7 Daño a proteínas por estrés oxidante

Los niveles de proteína oxidada en timo se determinaron de acuerdo con el método descrito por Preston (1996), mediante el uso del kit OxyBlot™ (Chemicon Internacional, MA, EUA), siguiendo las

especificaciones del proveedor como se indica a continuación: 20 µg de proteína cuantificada por el método de Bradford (apartado 6.5), se llevaron a un volumen final de 5 µL con agua miliQ, se desnaturalizaron las proteínas con 5 µL de duodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma, St. Louis, EUA) al 12%, posteriormente se procedió a derivatizar, añadiendo 10 µL de solución 1X de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH), se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadieron 7.5 µL de solución neutralizadora. Las muestras fueron separadas en un gel prefabricado SDS-PAGE al 12% (Bio-Rad, CA, EUA) y transferidas a una membrana de PVDF (GE Healthcare, México). Las membranas se bloquearon con 20 mL de TBS-Tween 0.1% y 0.5% leche libre de grasa durante 1 h, se lavaron tres veces con TBS-Tween y posteriormente se incubaron con anticuerpo primario: conejo Anti-DNP durante toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween, se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano durante 1 h y se lavaron tres veces. Las bandas de las proteínas se revelaron utilizando el reactivo quimioluminiscente comercial (Thermo Scientific Supersignal, MA, EUA) y la proporción de proteínas oxidadas fue cuantificada por análisis densitométrico, utilizando el fotodocumentador KODAK Gel Logic 100 Imaging System (GL 100) y el software Kodak Imaging Molecular v (4-5.1) (Eastman Kodak Corporation, NY, EUA).

7.8 Daño al ADN por estrés oxidante

7.8.1 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de timo de ratas sin tratamiento, mediante el método de yoduro de sodio (NaI) [Wang et al., 1994]. Para ello, se utilizaron 100 mg de tejido, que se homogenizó con 1000 μ L del amortiguador A [0.32M sacarosa (Merck, México), 5mM MgCl₂ (Sigma, St. Louis, EUA), 10 mM Tris-HCl (Promega, WI, EUA), 0.1 mM desferroxamina (Sigma, St. Louis, EUA), 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma, St. Louis, EUA), pH = 7.5]. Se centrifugó a 1500 xg por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 1000 μ L del mismo amortiguador. Se realizó un segundo centrifugado bajo las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 1000 μ L de amortiguador B [10 mM Tris-HCl, 5mM EDTA-Na₂ (Sigma, St. Louis, EUA), 0.15 mM desferroxamina, pH = 8.0]; se agregaron 100 μ L de SDS al 10%, 40 μ L de RNasa T1 (Sigma, St. Louis, EUA) a una concentración de 20 U/ μ L, 60 μ L de RNasa A (Sigma, St. Louis, EUA) a una concentración 20 U/ μ L y se agitó por inversión. Los tubos se incubaron a 37°C por una h en baño de agua para la activación de las RNasas. Pasado este tiempo, se adicionaron 50 μ L de Proteinasa K (Sigma, St. Louis, EUA) a una concentración de 30 U/ μ L y se incubó a 37°C por 1h. Los tubos se centrifugaron a 5000 xg por 15 min 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-Na₂, 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 min 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 min 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 min 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 pureza del ADN fue determinada de acuerdo al cociente A260/A280 y la concentración del ADN fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm utilizando la siguiente ecuación:

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

7.8.2 Hidrólisis enzimática de ADN

Para la hidrólisis enzimática del ADN, se utilizaron las enzimas ADN nucleasa P1 y fosfatasa alcalina, para obtener nucleósidos puros y posteriormente inyectar 100 μL de éstos en la HPLC. La hidrólisis se realizó de la siguiente manera: por cada 100 μg de ADN se adicionaron 2 μL de acetato de sodio (Sigma, St. Louis, EUA) 1M, 2.5 μL de nucleasa P1

(Sigma, St. Louis, EUA) a una concentración 0.4 U/ μ L y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de 100 μ L, se incubaron por 30 min a 37°C; y se adicionaron 4 μ L de Tris-HCl 1M, pH 7.4 y 13.5 μ L de enzima fosfatasa alcalina 0.22 U/ μ L (Sigma, St. Louis, EUA), ésta última, anteriormente disuelta en amortiguador de fosfatasas [50% (v/v) de glicerol (Sigma, St. Louis, EUA), 50 mM de MgCl₂ (Sigma, St. Louis, EUA) y 0.1 mM de ZnCl₂ (Sigma, St. Louis, EUA), pH = 7.5]. Posteriormente se incubó por 1 h a 37°C. Las muestras fueron centrifugadas y la fase acuosa fue obtenida para ser analizada en el equipo de HPLC.

7.8.3 Curvas patrón

Se realizaron curvas patrón tanto para la molécula 8-OHdG como para la desoxiguanosina (dG); usando estándares comerciales (Sigma, St. Louis, EUA). Para ello, 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 y se inyectaron 100 μ L de cada una de estas soluciones, en el sistema cromatográfico HPLC.

7.8.4 Cuantificación de 8-OHdG y dG

Para la cuantificación de 8-OHdG y dG se tomaron 100 μ L de ADN extraído del timo y se inyectaron en el sistema cromatográfico. La cromatografía utilizada fue isocrática en fase reversa con flujo de 1mL/min; la separación se realizó en una columna supelcosil LC-18

(supelco) con una fase móvil de fosfato monobásico de potasio (JT Baker, México) 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.

7.9 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de las enzimas SOD, GPx y CAT en timo fueron determinadas a partir del sobrenadante obtenido de la extracción de proteínas (apartado 6.5) y los resultados fueron expresados como mU/mg de proteína, mediante métodos espectrofotométricos.

7.9.1 Actividad de SOD

La actividad se determinó por el método de Suzuki (2000). En donde se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante

del radical superóxido, el cual, al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce y forma un producto llamado formazán, cuyo cambio de color puede ser detectado mediante espectrofotometría a 560 nm, cuando la SOD inhibe la reducción del NBT [Suzuki, 2000].

Se incorporó a 10 μ L de proteína total, 1.45 mL de la solución de trabajo [100 mL de solución amortiguadora de sodio-carbonato 50 mM (Sigma, St. Louis, EUA), 1.5 mg de xantina (Sigma, St. Louis, EUA), 20.4 mg de NBT (Sigma, St. Louis, EUA), 2.9 mg de EDTA], 25 μ L de solución de xantina oxidasa (Sigma, St. Louis, EUA) preparada en fresco [0.1 U de XO en 1 mL de sulfato de amonio 2 M (Sigma, St. Louis, EUA)]. Para la muestra blanco de calibración, se incorporaron los mismos elementos, excepto que en lugar de muestra se utilizaron 25 μ L de solución para homogenizar. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 560 nm, una lectura cada 30 segundos durante 5 min.

Las actividades se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

- $\% \text{ de inhibición} = \frac{[\Delta A_{560} \text{blanco} - \Delta A_{560} \text{muestra}] * 100}{\Delta A_{560} \text{blanco}}$
- $USOD/mL = (\% \text{ de inhibición}) / (50\%) (mL \text{ de muestra})$.
- $USOD/mg \text{ proteína de tejidos} = [(U/mL) / (mg/mL \text{ de proteína en la muestra})] * \text{Factor de dilución}$.

7.9.2 Actividad de GPx

Se determinó la actividad de GPx mediante la catálisis del H₂O₂ en H₂O, mediada por glutatión reducido; se monitoreó la reducción del

NADPH al mantener constantes los niveles de glutatión reducido [Folhé y Günzler, 1984].

Para realizar la cuantificación: Se utilizó un blanco experimental que contenía 100 μL de solución de azida de sodio 20 mM (Sigma, St. Louis, EUA), 100 μL de solución de glutatión reductasa 15 U/mL (Sigma, St. Louis, EUA), 100 μL de solución de NADPH 1.5 mM (Sigma, St. Louis, EUA) y 500 μL de H_2O desionizada. Se registró la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm en una celda de cuarzo. Todas las soluciones se prepararon en fresco. Posteriormente se preparó un primer blanco, a partir del blanco experimental, agregando 20 μL de solución de GSH 250 mM (Sigma, St. Louis, EUA) y 50 μL de muestra. Se registró el cambio en la absorbancia a 340 nm cada 3 seg durante 40 seg. A continuación se agregaron 20 μL de solución de H_2O_2 10 Mm (Sigma, St. Louis, EUA) y se registró nuevamente la absorbancia durante el mismo intervalo de tiempo. Finalmente para la preparación del segundo blanco, se incorporó en una celda de plástico 100 μL de solución amortiguadora de fosfatos 500 mM pH=7.2, 10 μL de solución EDTA 50 mM, 100 μL de NaN_3 , 100 μL de glutatión reductasa 15 U/mL, 100 μL de solución NADPH 1.5 mM, 550 μL de H_2O desionizada, 20 μL de GSH y 20 μL de H_2O_2 . Se realizó la lectura a 340 nm por el mismo intervalo de tiempo. Las actividades se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \blacksquare \text{ UGPx/mL} &= [(\Delta A_{340} \text{ muestra} - \Delta A_{340} \text{ primer blanco} - \\ &\Delta A_{340} \text{ segundo blanco}) / 6.22] * (400). \end{aligned}$$

- $UGPx/mg \text{ proteína de tejido} = (UGPx) / (mg/mL \text{ de proteína de la muestra}).$

7.9.3 Actividad de CAT

Se determinó la actividad de esta enzima utilizando como sustrato el H₂O₂, midiendo el decremento de su concentración por análisis espectrofotométrico [Aebi, 1984]. Se incorporó en una celda de cuarzo 10 µL de la muestra con 1.5 mL de la solución de trabajo [200 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (Sigma, St. Louis, EUA) y 200 mL de H₂O₂ 20 mM]. Para la muestra blanco de calibración, se incorporaron los mismos elementos pero sin muestra. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 240 nm, midiendo la reducción de la concentración de H₂O₂ cada 15 segundos durante dos minutos.

Las actividades se calcularon mediante la siguiente ecuación:

- $UCAT/g \text{ de proteína} = [(Absorbancia \text{ a } 240nm / 0.0394) * (1000)] / mg/mL \text{ de proteína en la muestra}.$

7.10 Medición de GSH y GSSG

El contenido de glutatión reducido (GSH) y disulfuro de glutatión (GSSG) se determinó por la técnica de HPLC siguiendo el protocolo descrito por [Farris, 1987; Gómez-Quiroz, 2008], con algunas modificaciones. 100 mg de tejido fueron colectados en 1 mL de ácido perclórico/BPDS

(APC/BPDS 1mM (Sigma, St. Louis, EUA)) y disgregado sobre hielo por 30 s; la suspensión fue centrifugada a 10 000 xg por 5 min a 4°C. Enseguida se utilizó el extracto puro a una dilución 1:10 con PBS, sin derivatizar. Se tomaron 100 µL de cada muestra y fueron inyectadas al sistema de HPLC [Waters] y separados por una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 250 mm y 5 µm de partícula, utilizando como fase móvil acetonitrilo al 1% y buffer de fosfato de potasio (KH₂PO₄) 20 mM; pH = 2.7. Los eluidos fueron analizados por detección ultravioleta a 265 nm. El área bajo la curva se determinó mediante el uso de estándares de GSH/GSSG partiendo de diferentes concentraciones [10, 25, 50, 100, 200 y 400 µM].

7.11 Análisis de proteínas

La cuantificación del contenido de las proteínas SOD, GPx, CAT, NF-κB p50, NF-κB p65 y actina en timo de ratas con tratamiento y sin tratamiento fue determinada por medio de la técnica de Western Blot. El tejido fue disgregado manualmente y resuspendido en buffer de lisis (método de extracción mencionado apartado 6.5). Los lisados fueron separados en un gel SDS-PAGE al 12% y transferidos a una membrana de PVDF. Las membranas se bloquearon con TBS-Tween 0.1%, 0.5% leche libre de grasa durante 1 h y posteriormente se incubaron con anticuerpo monoclonal para SOD, GPx, CAT, NF-κB p50, NF-κB p65 y actina (Santa Cruz, TX, EUA) durante toda la noche. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween y se incubaron con su respectivo anticuerpo

secundario, conjugado con peroxidasa de rábano durante 2 h; después se lavaron tres veces y se revelaron las membranas utilizando un reactivo quimioluminiscente comercial. La proporción de estas proteínas fue cuantificada por análisis densitométrico, utilizando el software Kodak Imaging Molecular v (4-5.1).

7.12 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

A partir del plasma obtenido de ratas con tratamiento y sin tratamiento se determinó el contenido de IL-6 y TNF- α mediante el uso de los respectivos kits LEGEND MAX™ Rat (BioLegend, CA, EUA) que consisten principalmente en la utilización de anticuerpos monoclonales específicos que recubren la placa, de tal forma que si está presente el antígeno en la muestra problema, este reacciona específicamente con el anticuerpo fijado al soporte (anticuerpo capturador), posteriormente se agrega un segundo anticuerpo de detección marcado con biotina que es específico para el antígeno y subsecuentemente solución de Avidina-HRP que se utiliza como un segundo paso para la detección del anticuerpo biotinilado. Las cuantificaciones se realizaron en un lector de placas de 96 pozos Hreader I Elisa Reader (HLAB medical, CO, EUA) a una longitud de onda de 450 nm.

7.13 Análisis estadístico

Se obtuvieron datos de estadística descriptiva: media, desviación estándar y error estándar. Los datos obtenidos fueron expresados como promedio \pm E.E de los diferentes ensayos y las muestras utilizadas para cada experimento se realizaron por triplicado. Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Duncan. Para determinar la asociación entre los datos obtenidos, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa NCSS 2001 software Windows Versión 2.0 (NCSS Statistical Software, Kaysville, UT, EUA), considerándose diferencias significativas cuando $p \leq 0.05$.

8. Resultados

8.1 Generalidades de los diferentes grupos de estudio

El grupo control estuvo constituido por 100 ratas organizadas de la siguiente manera (BN=25; DN1=25; DN2=25 y DN3=25). De igual manera, el grupo experimental tratado con tBHQ [75 mg/kg de peso] estuvo conformado por la misma cantidad de animales; es decir (BN-tBHQ=25; DN1-tBHQ=25; DN2-tBHQ=25 y DN3-tBHQ=25); cabe señalar, que la clasificación del grado de desnutrición independientemente del tratamiento, dependió del déficit de peso corporal clasificándolas como (DN1, DN2 y DN3) en base al peso corporal de sus respectivos grupos BN.

La Tabla 1 muestra los promedios de los pesos corporales y tímicos de los grupos controles y experimentales; así como, sus respectivos déficits de peso a los 21 días de edad. En dicha tabla, se puede apreciar una disminución en la ganancia del peso corporal y peso tímico para los diferentes grados de desnutrición DN1, DN2 y DN3 controles con déficits corporales del 16%, 31% y 45% y tímicos del 11%, 21% y 49%; respectivamente, en base al peso corporal y peso del timo del grupo BN control. Por su parte, los grupos DN1, DN2 y DN3 tratados con tBHQ presentaron déficits corporales del 21%, 36% y 54% y tímicos del 18%, 35% y 54% respectivamente, en base a su correspondiente grupo BN tratado con tBHQ.

Así mismo, no se encontraron diferencias significativas entre los pesos corporales y tímicos de los grupos controles desnutridos y con

tratamiento desnutridos; a excepción del grupo BN-tBHQ con un incremento del 4.5% con respecto al grupo control BN sin tratamiento. Adicionalmente, se observó una correlación positiva $r= 0.71$ entre el peso corporal y el peso tímico de todos los grupos controles y del 0.72 para los pesos corporales y tímicos de los grupos tratados con tBHQ.

Tabla 1. Pesos y déficits corporales y tímicos de los grupos controles y experimentales

Promedio \pm E.E	BN n=25	DN1 n=25	DN2 n=25	DN3 n=25
Peso corporal (g)	54.34 \pm 4.0	45.39 \pm 2.6*	37.07 \pm 2.5*	29.39 \pm 3.8*
Déficit corporal (%)		16	31	45
Peso de timo (g)	0.23 \pm 0.04	0.20 \pm 0.05*	0.17 \pm 0.05*	0.11 \pm 0.03*
Déficit tímico (%)		11	21	49
	BN-tBHQ n=25	DN1-tBHQ n=25	DN2-tBHQ n=25	DN3-tBHQ n=25
Peso corporal (g)	56.78 \pm 5.5‡	44.52 \pm 1.6*	36.18 \pm 2.5*	27.81 \pm 5.2*
Déficit corporal (%)		21	36	54
Peso de timo (g)	0.22 \pm 0.04	0.17 \pm 0.03*	0.14 \pm 0.06*	0.10 \pm 0.02*
Déficit tímico (%)		18	35	54

Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en ratas DN tratadas con tBHQ o controles con respecto a su correspondiente grupo BN. Diferencias estadísticamente significativas (‡ $p < 0.05$) entre grupos tratados y no tratados.*

8.2 Niveles de GSH/GSSG

Con el fin de seleccionar una dosis adecuada de tBHQ se determinó el estado redox en timo de ratas desnutridas (n=32) y bien nutridas (n=12), en base al contenido de glutatión reducido y glutatión oxidado; y con ello a su vez, se determinó el cociente GSH/GSSG mediante la realización de una curva dosis-respuesta. Por consiguiente, se administraron dosis de 0, 25,

50, 75 y 100 mg de tBHQ/kg de peso corporal a ratas BN y con diferentes grados de desnutrición, por vía intraperitoneal durante 3 días, desde el día 18 al 20 después de su nacimiento. Es de gran importancia señalar que a ratas BN (n=6) al ser tratadas con una dosis de 100 mg de tBHQ/kg de peso corporal, generó un efecto tóxico. De tal modo, que ésta concentración provocó una letalidad del 50%. Por lo tanto, esta dosis se descartó en los ensayos sucesivos.

Se obtuvieron datos sobre el estado redox a través del cociente GSH/GSSG en timo de ratas BN y con diferentes grados de desnutrición, tratadas con 0, 25, 50 y 75 mg tBHQ/kg de peso corporal, los cuales se pueden observar en la Figura 1. En esta gráfica se puede apreciar que los grupos DN2 y DN3 con dosis de 0 mg/kg de peso presentaron una disminución del 58% y 77%, de este cociente respectivamente en comparación a su grupo BN. Por su parte los grupos DN1, DN2 y DN3 tratados con 25 mg presentaron una disminución de alrededor del 57% en comparación a su respectivo grupo BN. Los grupos tratados con 50 mg de tBHQ no presentaron cambios. En contraste a lo observado en animales DN2 y DN3 a los que se les administró 75 mg de tBHQ/kg de peso corporal, que exhibieron un incremento de 2.8 y 5.8 veces más en los niveles del cociente GSH/GSSG; con respecto a sus grupos desnutridos sin tratamiento.

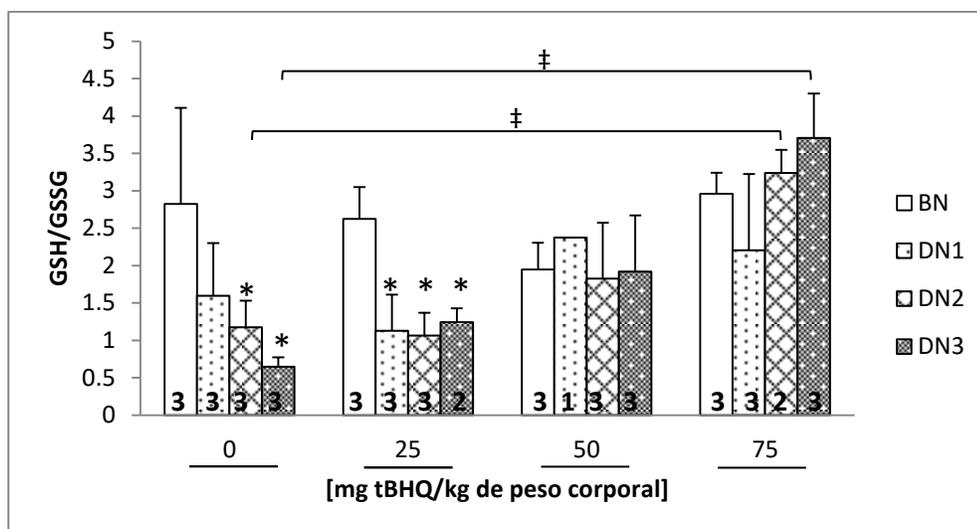


Figura 1. Cambios en el estado redox en timo de ratas BN y DN con diferentes tratamientos. Los animales fueron tratados con dosis de 0, 25, 50 y 75 mg de tBHQ/kg de peso corporal. El cociente GSH/GSSG fue determinado mediante la técnica de HPLC. Las barras representan el promedio \pm E.E de al menos un experimento independiente. * $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DN con diferentes tratamientos en relación a su grupo BN. # $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con una dosis de 75 mg de tBHQ/kg de peso corporal, con respecto a su correspondiente grupo control. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

8.3 Daño a lípidos por estrés oxidante

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos de la evaluación del ensayo de lipoperoxidación en timo de ratas de 21 días de edad, provenientes del grupo control y experimental. En donde se puede apreciar que los niveles de LPx en timo de ratas con DN1 control no presentaron diferencias estadísticamente significativas en relación al BN sin tratamiento. Mientras, que para los grupos con DN2 y DN3 controles se observó un incremento en la oxidación de lípidos estadísticamente significativo por 2.7 y 3.4 veces más, respectivamente; $p < 0.05$, en comparación al grupo BN sin tratamiento. Por su parte, todos los grupos desnutridos con tratamiento no presentaron diferencias significativas en

relación a su respectivo grupo BN. Al comparar los grupos controles sin tratamiento y con tratamiento se pudo observar que las ratas con DN2 y DN3 tratadas con tBHQ presentaron una disminución estadísticamente significativa del 66% y del 80% respectivamente, en comparación a los grupos DN2 y DN3 controles sin tratamiento.

Los valores de correlación entre el peso corporal y peso tímico del grupo control mostraron que ambos se asocian negativamente con el incremento de LPx ($r = -0.657$; $p < 0.01$ y $r = -0.729$; $p < 0.01$, respectivamente). A diferencia de los valores de correlación entre el peso corporal y peso tímico de los grupos experimentales, que mostraron una asociación positiva con respecto a los valores de oxidación de lipídica ($r = 0.602$; $p < 0.01$ y $r = 0.69$; $p < 0.01$, respectivamente).

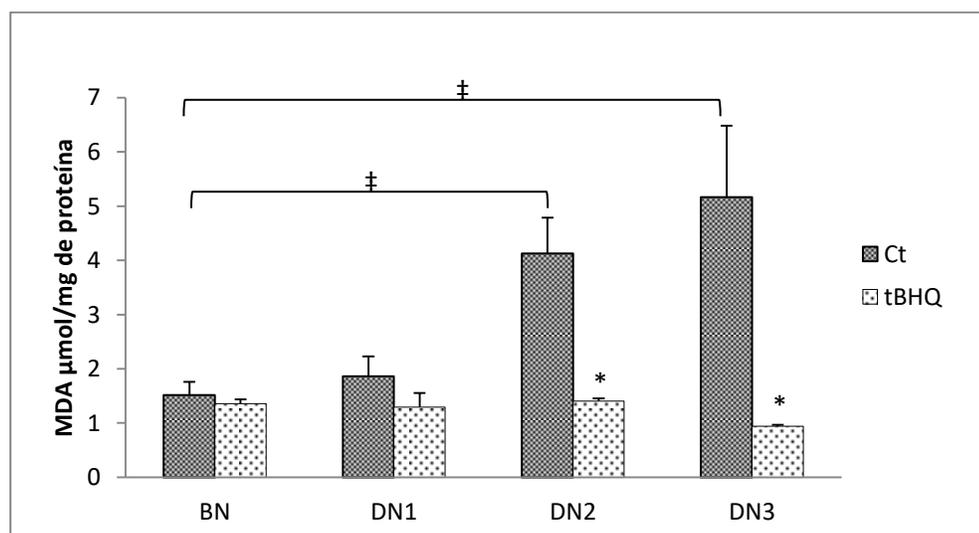


Figura 2. Lipoperoxidación [$\mu\text{mol MDA/mg de proteína}$] en timo de ratas controles y tratadas con tBHQ. Cada barra representa el promedio de la concentración de MDA \pm E.E de cinco determinaciones independientes realizadas por triplicado. * $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grados de DN tratados con respecto a su grupo DN control. # $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos desnutridos controles con respecto al grupo BN control. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

8.4 Daño a proteínas por estrés oxidante

En la Figura 3 se representan gráficamente los promedios de los datos obtenidos de la evaluación del daño oxidante a nivel de proteínas de los grupos control y de los diferentes grupos experimentales, en base al contenido de proteínas carboniladas en timo de ratas de 21 días de edad. En donde, se puede observar nuevamente que los niveles de daño por estrés oxidante a nivel de proteínas no presentaron diferencias estadísticamente significativas para el grupo DN1 control en relación a su respectivo grupo BN. En cambio los grupos DN2 y DN3 controles presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), con un incremento de hasta 2.6 veces y 3.9 de proteínas carboniladas respectivamente, en comparación con el grupo BN control. Por su parte las ratas con DN1, DN2 y DN3 con tratamiento no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo BN experimental. Al comparar los valores de oxidación de proteínas entre grupos DN tratados y no tratados, se pudo observar que los grupos experimentales DN2 y DN3 presentaron diferencias significativas; $p < 0.05$, con respecto a los mismos grados de desnutrición sin tratamiento, con una disminución del 73% y del 84% en la carbonilación de proteínas, respectivamente. La correlación entre el peso corporal y la del timo del grupo control mostró que la disminución de éstos se asocia con mayores valores de daño oxidante a nivel de proteínas ($r = -0,755$; $p < 0,01$ y $r = -0,819$; $p < 0,01$, respectivamente). Mientras que los valores de correlación entre el peso corporal y tímico de los grupos

experimentales no mostraron asociación con el daño oxidante a nivel de proteínas.

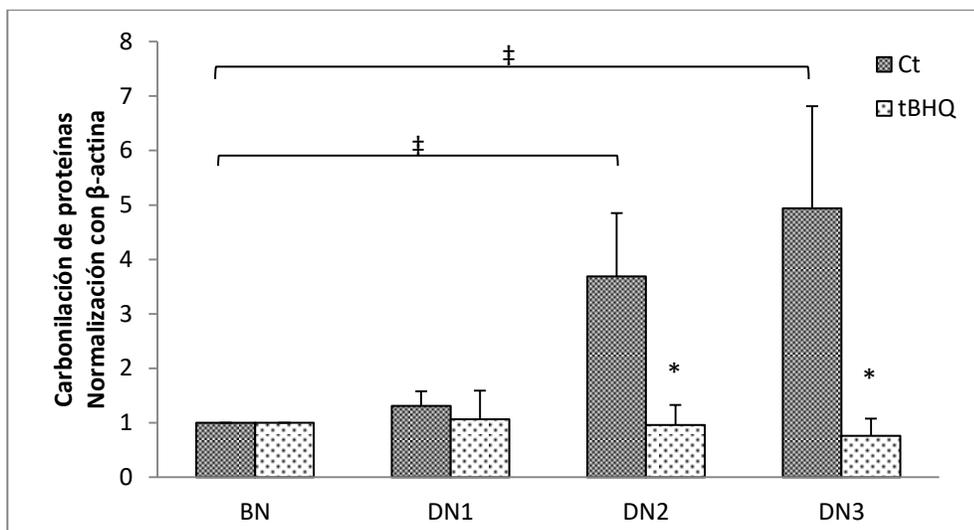


Figura 3. Daño oxidante a nivel de proteínas en timo de ratas controles y tratadas con tBHQ. Cada barra representa el promedio del contenido de proteínas carboniladas \pm E.E de cinco determinaciones independientes realizadas por duplicado. * $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grados de DN tratados con respecto a su grupo DN control. # $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos desnutridos controles con respecto a su grupo BN. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

La Figura 4 representa las imágenes digitales obtenidas a partir de la técnica de Western Blot de proteínas oxidadas en timo, en donde se muestra la comparación de proteínas oxidadas entre los grupos control sin tratamiento (Figura 4a) y los grupos experimentales tratados con tBHQ (Figura 4b), utilizando como control de carga actina (42 kDa). En esta imagen, se puede apreciar un incremento en la oxidación de proteínas para los grupos DN2 y DN3 sin tratamiento en comparación al grupo BN control. Por su parte, las ratas con diferentes grados de desnutrición

tratadas con tBHQ no mostraron diferencias en la oxidación de proteínas con respecto al grupo BN experimental.

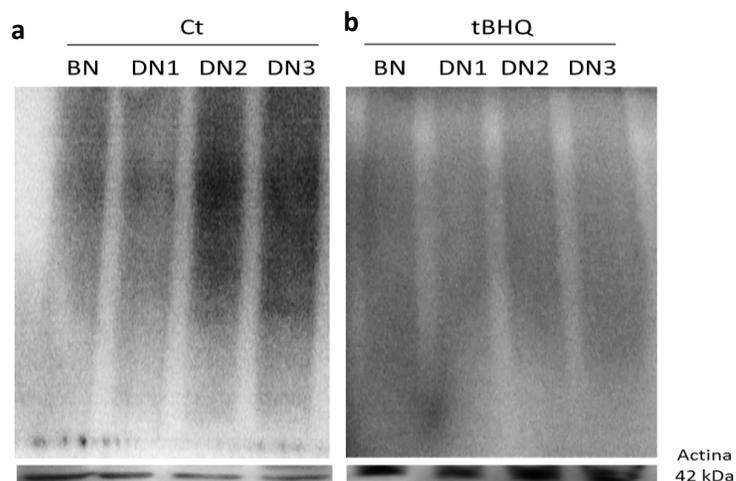


Figura 4. Determinación de proteínas oxidadas en timo de ratas controles y tratadas con tBHQ. La Figura 4a muestra la oxidación de proteínas en timo de ratas con diferentes grados de desnutrición y BN sin tratamiento. A su vez, la Figura 4b representa la oxidación a nivel de proteínas del grupo experimental, utilizando como control de carga actina.

8.5 Daño al ADN por estrés oxidante

La Figura 5 representa los datos obtenidos de la evaluación del daño oxidante a nivel del ADN en timo de ratas de 21 días de edad, provenientes de los grupos BN, DN1, DN2 y DN3 sin tratamiento. En donde, se puede observar nuevamente que los niveles de daño por estrés oxidante a nivel del ADN no presentaron diferencias estadísticamente significativas para el grupo DN1 en relación al grupo BN. En cambio, los grupos con DN2 y DN3 presentaron un incremento estadísticamente significativo de la relación 8-OHdG/dG ($p < 0.05$) de 2.3 y 3.4 veces más respectivamente, en comparación con el grupo BN. A su vez, se encontraron diferencias significativas entre los grupos con DN2 y DN3 en comparación con el

grupo DN1. La correlación entre el peso corporal y la del timo mostró que la disminución de éstos se asocia con mayores valores de daño oxidante al ADN ($r = -0,755$; $p < 0,01$ y $r = -0,819$; $p < 0,01$, respectivamente).

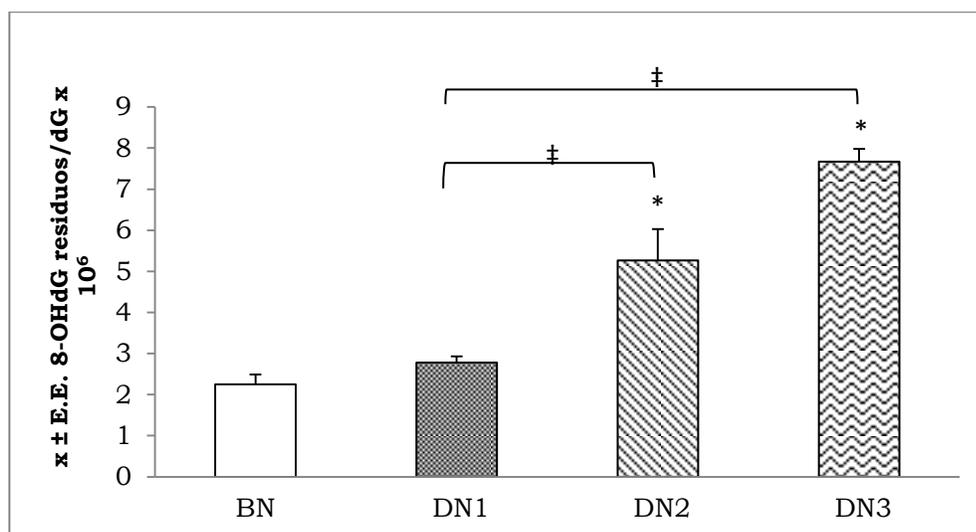


Figura 5. Daño oxidante a nivel del ADN en timo de ratas BN y con diferentes grados de desnutrición sin tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm E.E de 8-OHdG residuos/dG $\times 10^6$ de cinco determinaciones independientes realizadas por triplicado. * $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas comparadas con BN. # $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre grupos DN. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

8.6 Actividad enzimática de SOD

En la Figura 6 se representó la actividad enzimática de SOD como U SOD/ mg de proteína \pm E.E en timo de ratas tratadas y controles. Se puede observar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para el grupo de ratas con desnutrición de segundo y de tercer grado sin tratamiento, con una disminución de la actividad en un 43% y 84% de respectivamente, en comparación a su grupo control. Por su parte, las ratas DN1, DN2 y DN3 tratadas con tBHQ mostraron diferencias significativas; $p < 0.05$, con respecto a su grupo BN, con un incremento de

alrededor del 100%. Así mismo, las ratas DN1 y DN2 con tratamiento presentaron un incremento en la actividad de esta enzima de alrededor de cuatro veces; mientras que el grupo DN3 presentó un incremento de alrededor de 17 veces en comparación a sus respectivos grupos desnutridos sin tratamiento.

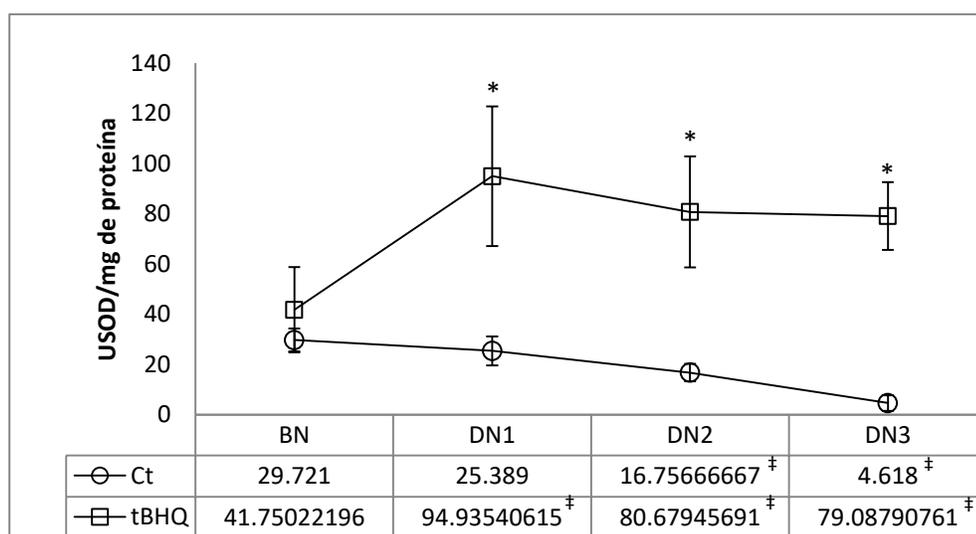


Figura 6. Actividad enzimática de SOD en tino de ratas tratadas con tBHQ y sin tratamiento. Cada punto representa el promedio de U SOD/mg de proteína \pm E.E, de cinco determinaciones independientes realizadas por duplicado. * $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre DN tratados con respecto a su grupo DN control. # $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos desnutridos controles y experimentales con respecto a su grupo BN. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

8.7 Actividad enzimática de GPx

La Figura 7 muestra los resultados obtenidos de la actividad enzimática de GPx, representados como el promedio de U GPx/ mg de proteína \pm E.E de tino de los diferentes grupos sin tratamiento y experimentales. En la cual, se puede apreciar diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0.05$) en ratas DN2 y DN3 sin tratamiento, con una disminución en su actividad del 54% y 81% respectivamente, en comparación al grupo BN control. En lo que respecta, los grupos DN1, DN2 y DN3 tratados presentaron un incremento de alrededor de 2 veces en comparación al grupo BN-tBHQ. Por su parte, los grupos DN1 y DN2 tratados presentaron un incremento de 2 veces y de 6.5 veces para el grupo DN3 tratado en comparación a sus respectivos grupos DN sin tratamiento.

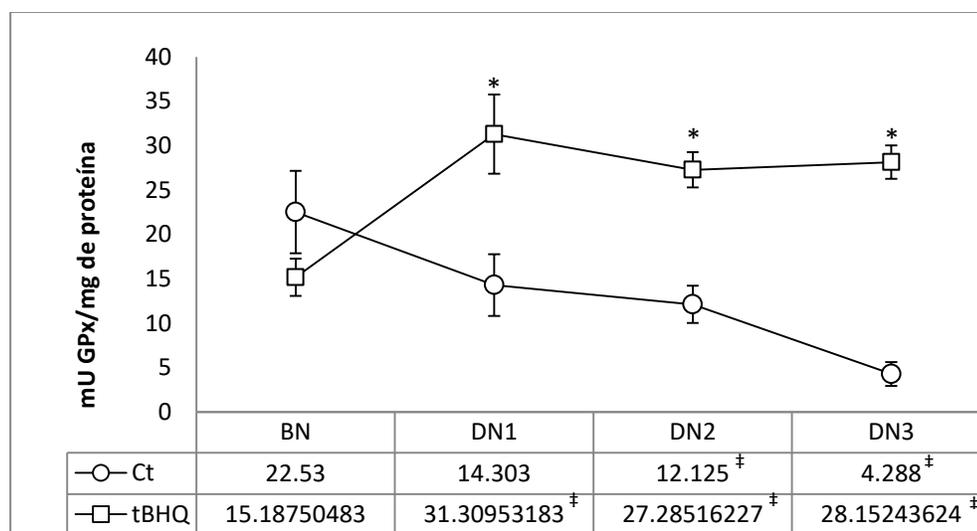


Figura 7. Actividad enzimática de GPx en timo de ratas sin tratamiento y tratadas con tBHQ. Cada punto representa el promedio de mU GPx/mg de proteína \pm E.E, de cinco determinaciones independientes realizadas por duplicado. * $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre DN tratados con respecto a su grupo DN control. # $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos desnutridos controles y experimentales con respecto a su grupo BN. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

8.8 Actividad enzimática de CAT

En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos de la actividad enzimática de CAT representados como el promedio de U CAT/ mg de proteína \pm E.E de tamo de ratas de los diferentes grupos control y experimentales. En la cual, se puede observar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), debido a la evidente disminución en la actividad de esta enzima, para los tres grados de desnutrición DN1, DN2 y DN3 controles por un 44%, 53% y 73%, respectivamente, en comparación con el grupo bien nutrido sin tratamiento. De igual manera las ratas con DN1, DN2 y DN3 tratadas con tBHQ presentaron una disminución del 20% para los dos primeros grupos y de alrededor del 8% para el grupo DN3 con respecto a su grupo BN tratado. Por otra parte, se observó un incremento para los tres grados de desnutrición tratados con tBHQ en alrededor de 1.5 veces para los grupos DN1 y DN2; mientras que el grupo DN3, presentó un incremento de hasta 3.4 veces en comparación a sus respectivos grupos DN. Cabe señalar, que la actividad de ésta enzima en comparación a las actividades enzimáticas de SOD y GPx, fue la única que presentó diferencias estadísticamente significativas para el caso de las ratas DN1 con y sin tratamiento en relación a su respectivo grupo BN. Así mismo, a diferencia del incremento en las actividades de SOD y GPx en los tres grupos experimentales desnutridos, en comparación a su respectivo grupo BN tratado, la actividad de esta enzima se encontró disminuida con respecto al grupo BN tratado.

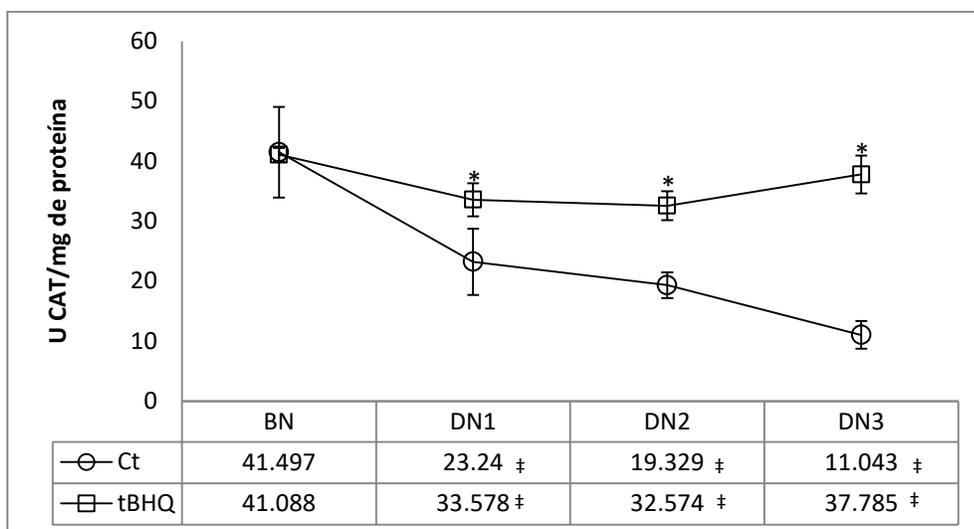


Figura 8. Actividad enzimática de CAT en timo de ratas tratadas con tBHQ y sin tratamiento. Cada punto representa el promedio de U CAT/mg de proteína \pm E.E, de cinco determinaciones independientes realizadas por duplicado. * $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre DN tratados con respecto a su grupo DN control. ‡ $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos desnutridos controles y experimentales con respecto a su grupo BN. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

8.9 Expresión de proteínas

En la Figura 9 se muestran imágenes representativas de la expresión de SOD, GPx, CAT, NF- κ B p50, NF- κ B p65 y actina; así como sus respectivas masas moleculares (kDa), obtenidas a partir de la extracción de proteínas totales de timo de ratas con diferentes grados de desnutrición y bien nutridas de los grupos controles y experimentales. Para el caso de las ratas sin tratamiento, se pudo observar una disminución en el contenido de SOD, GPx y CAT para los grupos DN2 y DN3, a diferencia de NF- κ B p65 que presentó un incremento para los mismos grupos; mientras que NF- κ B p50 se mantuvo sin cambios aparentes; en comparación al grupo BN sin tratamiento. Por su parte, las ratas tratadas con tBHQ

presentaron una disminución de SOD en el grupo DN3-tBHQ; de CAT y de NF- κ B p65 en DN2-tBHQ y DN3-tBHQ; por su parte GPx y NF- κ B p50 no mostraron cambios aparentes en sus contenidos en todos los grupos experimentales; en comparación al grupo BN tratado.

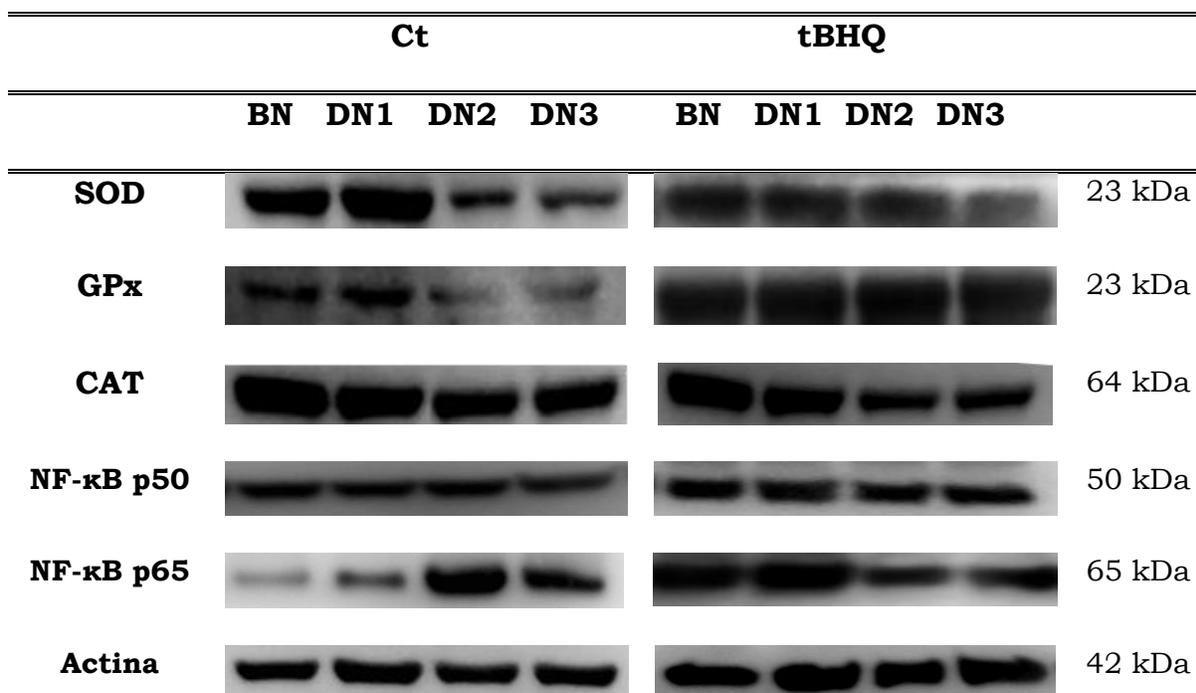


Figura 9. Niveles de expresión de proteínas. Se observan imágenes digitales representativas obtenidas mediante la técnica de Western Blot de SOD, GPx, CAT, NF- κ B, NF- κ B y de actina; en timo de ratas con diferentes grados de desnutrición y BN de los grupos controles y experimentales.

La Figura 10 muestra los resultados del análisis densitométrico obtenido a partir del ensayo de Western Blot. En donde se puede observar la expresión de SOD (Figura 10a), GPx (Figura 10b) y CAT (Figura 10c) en relación a la expresión de actina, cuantificadas en timo de ratas bien nutridas y con diferentes grados de desnutrición tanto de los grupos

controles como experimentales. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión del grupo control, confiriéndole el valor arbitrario de uno, en todos los casos. La expresión relativa de la proteína SOD (Figura 10a) exhibió diferencias significativas ($p < 0.05$) para los grupos DN2 y DN3 controles, evidenciado por una disminución del 35% y 57%, respectivamente en comparación al grupo BN control. A su vez, el grupo DN3 tratado con tBHQ presentó una disminución estadísticamente significativa del 42% en comparación a su respectivo grupo BN. Al comparar los grupos tratados con los grupos controles; solo se pudo apreciar un incremento de 1.3 veces en el grupo DN2-tBHQ en comparación al grupo DN2 control. GPx (Figura 10b) presentó similitudes en comparación al contenido de SOD para los grupos DN2 y DN3 sin tratamiento, debido a una disminución del 49% y 80% para estos grupos respectivamente, en comparación al grupo BN control. Así mismo, el contenido de esta proteína no presentó diferencias significativas entre los diferentes grupos tratados con tBHQ; en cambio, al comparar los grupos experimentales con los grupos controles, los grupos DN2-tBHQ y DN3-tBHQ presentaron un incremento de casi seis veces en comparación a sus respectivos grupos sin tratamiento. La expresión de CAT (Figura 10c) presentó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los grupos con DN2 y DN3 tanto controles como experimentales por un 30% y 40% respectivamente, en comparación a sus correspondientes grupos BN;

aunado a esto no se encontraron diferencias en el contenido de esta proteína entre los diferentes grupos tratados con tBHQ y controles.

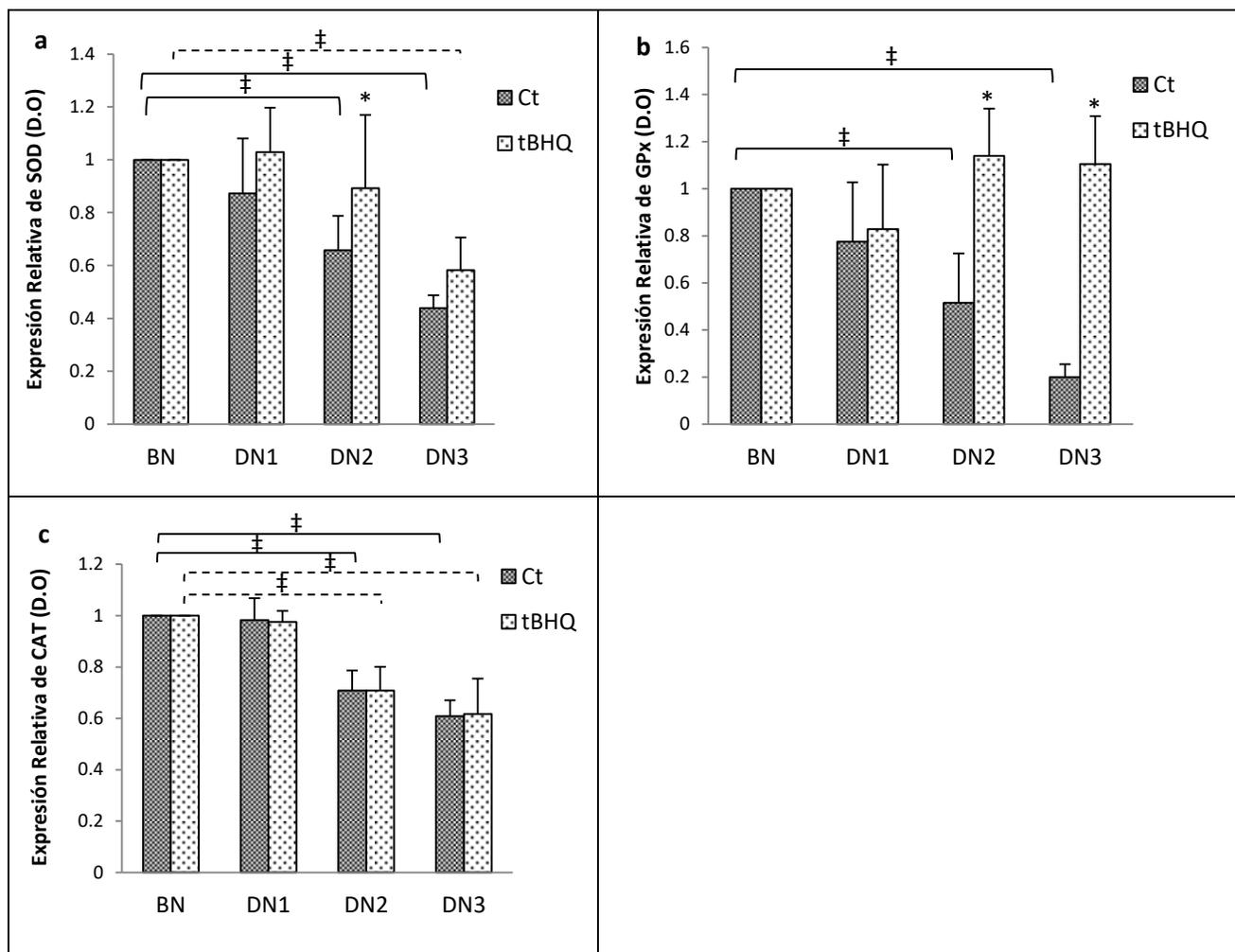


Figura 10. Contenido de proteínas antioxidantes SOD, GPx y CAT en base a la expresión de actina en timo de ratas sin tratamiento (Ct) y tratadas con tBHQ. Cada barra representa el promedio \pm E.E de la densidad óptica de cinco determinaciones independientes realizadas por duplicado. * $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DN tratados con respecto a su grupo DN control. † $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos desnutridos tratados y controles con respecto a su grupo BN. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

En la Figura 11 se muestran los resultados del análisis densitométrico e imágenes obtenidas a partir del ensayo de Western Blot. En donde se puede apreciar la expresión de Nrf2 en relación a la expresión de actina para la extracción de proteína total y citoplasmática, y en base a la expresión de histona para la fracción nuclear; cuantificadas en timo de ratas bien nutridas y con diferentes grados de desnutrición de los grupos controles (sin tratamiento). Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión del grupo control, confiriéndole el valor arbitrario de uno en todos los casos. Se puede observar tanto en las imágenes como en su representación gráfica que no hubo diferencias significativas en el contenido de Nrf2 en la fracción nuclear, citoplasmática y extracción total.

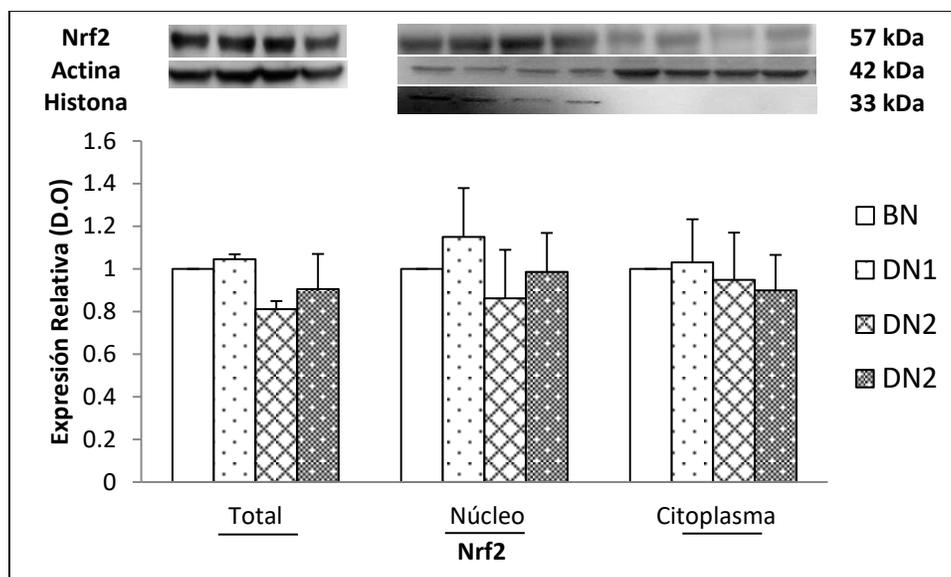


Figura 11. Contenido proteico de Nrf2 en timo de ratas sin tratamiento BN y DN. En base a la expresión de actina para la extracción total y citoplasmática, y con respecto a Histona para la fracción nuclear. Cada barra representa el promedio \pm E.E de la densidad óptica de cinco determinaciones independientes realizadas por duplicado. En la parte superior se muestran las imágenes obtenidas por la técnica de Western blot.

La Figura 12 muestra los resultados del análisis densitométrico obtenido a partir del ensayo de Western Blot. En donde se puede observar la expresión de NF- κ B p50 (Figura 12a) y NF- κ B p65 (Figura 12b) en relación a la expresión de actina, cuantificadas en timo de ratas bien nutridas y con diferentes grados de desnutrición tanto de los grupos controles como experimentales. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión del grupo control, confiriéndole el valor arbitrario de uno, en todos los casos. El contenido de NF- κ B p50 (Figura 10a) no mostró diferencias entre los diferentes grupos controles y tratados con tBHQ. En lo que respecta al contenido de NF- κ B p65 (Figura 10b) se pudo evidenciar un incremento de casi dos veces para los grupos DN2 y DN3 controles con respecto a su grupo BN; sin en cambio, en las ratas con los mismos grados de desnutrición tratadas con tBHQ se encontró una disminución de alrededor del 60% con respecto al grupo BN-tBHQ. Al comparar los grupos tratados con los controles, se pudo observar una disminución estadísticamente significativa en el contenido de NF- κ B p65 en los grupos DN2-tBHQ y DN3-tBHQ por un 84% y 73%, respectivamente; en comparación a los mismos grados de desnutrición sin tratamiento. Curiosamente y de acuerdo a los resultados obtenidos, en general los grupos DN1 controles y DN1-tBHQ no presentaron diferencias significativas con sus correspondientes grupos BN. Sin embargo, los grupos con DN2 y DN3 independiente del tratamiento, son los que

presentaron en mayor medida, alteraciones en los niveles de expresión de las proteínas analizadas en este estudio.

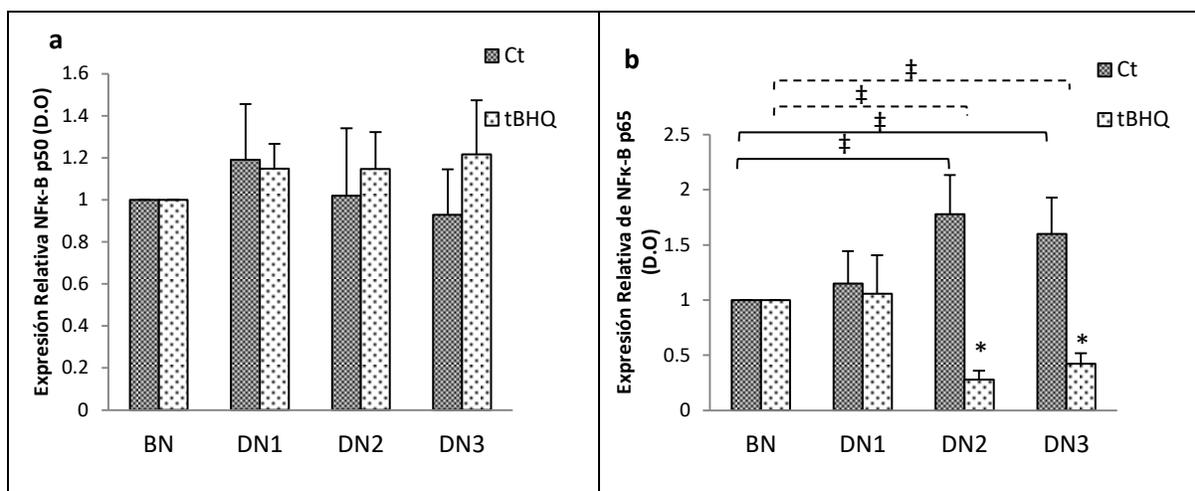


Figura 12. Contenido proteico de NF-κB p50 y NF-κB p65 en base a la expresión de actina en timo de ratas sin tratamiento (Ct) y tratadas con tBHQ. Cada barra representa el promedio \pm E.E de la densidad óptica de cinco determinaciones independientes realizadas por duplicado. * $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DN tratados con respecto a su grupo DN control. † $p < 0.05$ Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos desnutridos tratados y controles con respecto a su grupo BN. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

8. 10 Estado inflamatorio sistémico

Para tratar de conocer si la desnutrición genera un estado de estrés inflamatorio sistémico, se cuantificaron en plasma dos citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α , mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA); tanto en los grupos controles como en los experimentales. Los resultados muestran diferencias significativas; $p < 0.05$, en el grupo DN3 sin tratamiento (Figura 13), con un incremento de hasta 1.5 veces de IL-6 en comparación al grupo BN control. De la misma manera, el grupo DN3 tratado con tBHQ presentó un incremento de dos

veces en comparación a su respectivo grupo BN. Al comparar los grupos tratados con los controles, se pudo observar una disminución en todos los grupos experimentales BN, DN1, DN2 y DN3 por un 51%, 54%, 39% y 30%; respectivamente, en comparación a su grupo control sin tratamiento.

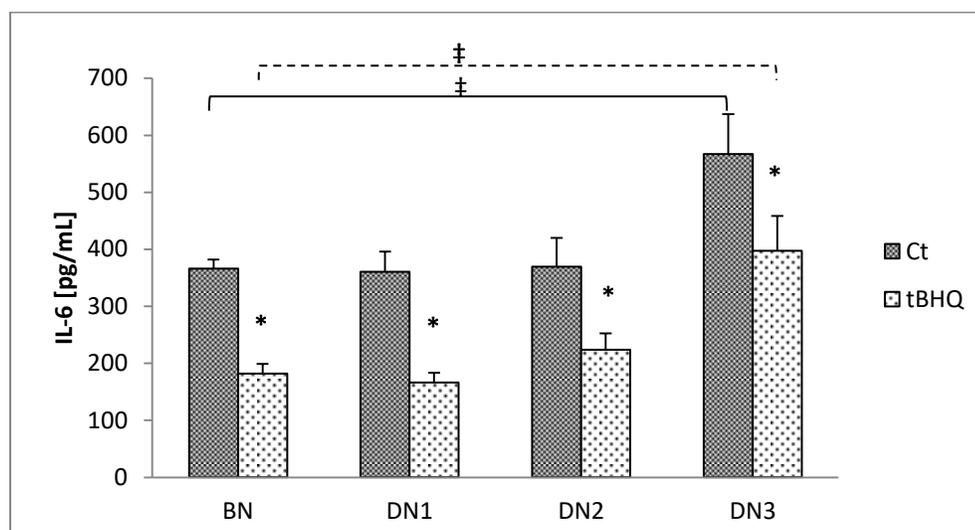


Figura 13. Concentraciones plasmáticas de IL-6 en ratas tratadas con tBHQ y controles. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes \pm E.E. La significancia estadística de los grupos tratados con 75 mg de tBHQ con respecto a su grupo BN sin tratamiento fue marcada con $*p<0.05$. La significancia de los grupos DN3 tratados y no tratados con respecto a su correspondiente grupo BN fue marcada con $\ddagger p<0.05$. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

En cuanto al contenido de TNF- α (Figura 14) en plasma de ratas tratadas con tBHQ y sin tratamiento, se pudo observar diferencias significativas; $p<0.05$, en el grupo de ratas DN3 sin tratamiento por un incremento de hasta 1.2 veces, en comparación al grupo BN control. Así mismo, las ratas DN3 tratadas con tBHQ presentaron un incremento de 2 veces, en comparación al grupo BN tratado con tBHQ. Posteriormente,

cuando se compararon los grupos tratados con tBHQ en relación a los controles; se encontró una disminución en los grupos experimentales BN, DN1 y DN2 por un 39%, 41% y 22%; respectivamente, en comparación a su correspondiente grupo control sin tratamiento.

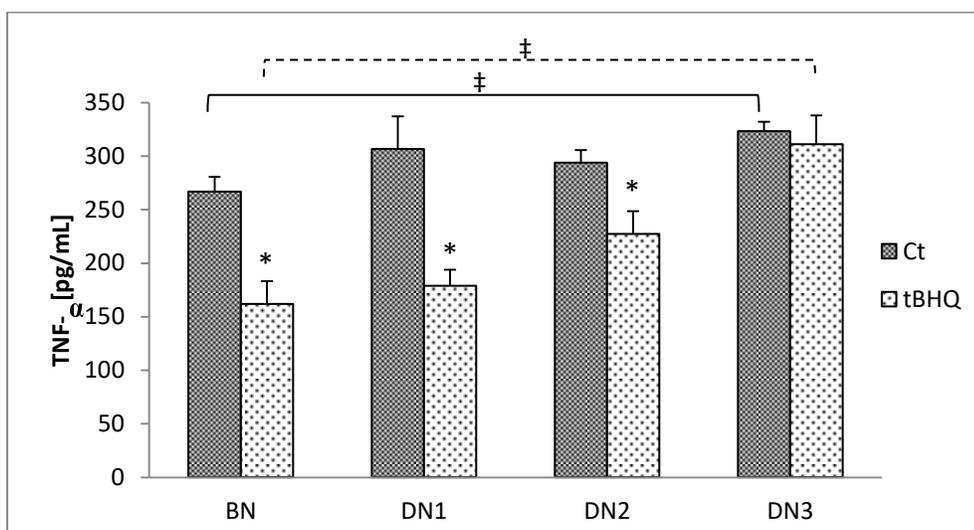


Figura 14. Concentraciones plasmáticas de TNF- α en ratas tratadas con tBHQ y controles. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes \pm E.E. La significancia estadística de los grupos tratados con 75 mg de tBHQ con respecto a su grupo control sin tratamiento fue marcada con * $p < 0.05$. La significancia de los grupos DN3 tratados y no tratados con respecto a su correspondiente grupo BN fue marcada con ‡ $p < 0.05$. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

9. Discusión

En la actualidad las variables somatométricas como el peso y la talla se consideran indispensables para estimar el estado nutricional en un organismo [Campos et al, 2000]. Siendo una de las características más evidentes en la desnutrición infantil, el déficit de peso corporal con

respecto a la edad cronológica [Gómez et al., 1956]. Esta característica, también se ha observado en modelos experimentales [Cortés et al., 2001].

En el presente estudio, se pudo apreciar una disminución en la ganancia del peso corporal en las ratas DN en comparación con el peso corporal de las BN de la misma edad. Esto indica que el modelo de desnutrición experimental por competencia provoca una disminución en la ingesta de alimento consumida por cada una de las crías, lo cual es suficiente para obtener organismos con diferentes grados de desnutrición, como lo establecieron previamente Ortiz y colaboradores (1996).

Esta situación de que algunos organismos presenten uno u otro grado de desnutrición en una misma camada, probablemente se debe a mecanismos de adaptación individuales en respuesta al estrés nutricional [Sánchez, 2007]. Lo cual le puede conferir una ventaja o desventaja en cuanto a la ganancia de peso, frente a los otros organismos en similares condiciones.

Está bien documentado que una disminución en la ingesta de alimento, ya sea en cantidad o calidad, afecta a la gran mayoría de los mecanismos de defensa inmunológica [Prudhon, 2002], favoreciendo el establecimiento de procesos infecciosos [Rodríguez et al., 2005]. Estos mecanismos son regulados principalmente por células que se diferencian y maduran en los órganos linfoides; que se sabe, son altamente susceptibles a los efectos de la desnutrición, afectando de manera particular al timo [Savino et al., 2010]. A pesar de que la atrofia tímica es una de las

características más notorias en los organismos desnutridos, existen otras alteraciones a nivel de este órgano como son la pérdida de timocitos [Feliu y Slobodianik, 2002], incremento en la frecuencia de apoptosis [Ortiz et al., 2008], junto con alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidante [He et al., 2012]. Estas alteraciones pudieran ser causadas por la deficiencia de nutrimentos en el microambiente del timo y repercutir en la diferenciación de los timocitos [Ortiz et al., 2000].

En el presente trabajo, se observó un déficit de peso en el timo de ratas desnutridas tanto de los grupos controles (sin tratamiento) como de los experimentales (tratados con tBHQ) en comparación con el peso tímico de su respectivo grupo BN. Este déficit en peso fue notable en las ratas DN3 independientemente del tratamiento. Es decir, los timos de los grupos DN3 con o sin tratamiento pesan alrededor de la mitad en relación a los pesos tímicos de su correspondiente grupo BN. Adicionalmente, se obtuvo una asociación proporcional entre el peso corporal de los diferentes grupos analizados con respecto al peso tímico de los mismos. Esto indica que el peso corporal de un organismo puede reflejar a su vez el peso de este órgano.

Se ha demostrado que la suplementación de alimentos con 0.001% (p/p) y la administración oral (1.5mg/kg) de tBHQ durante 32 días, tiene un efecto inhibitor sobre la ganancia de peso corporal en ratones [Nam et al., 2013]. En relación a esto; en el presente estudio también se pudo percibir una disminución en la ganancia de peso corporal y del timo por

parte de los grupos desnutridos experimentales tratados con tBHQ, en comparación a los no tratados; aunque no se encontraron diferencias significativas. Esto sugiere que la concentración y el periodo de tiempo de administración del tBHQ, son factores determinantes que pueden repercutir sobre el peso corporal de un organismo.

Entre los compuestos más estudiados en la respuesta hormética se encuentra el tBHQ, capaz de inducir una respuesta celular adaptativa o precondicionante para contrarrestar el estrés oxidante [Mathers et al., 2004; López-Diazguerrero et al., 2013].

Se ha establecido que el tBHQ tiene la capacidad de modificar el estado redox celular y puede jugar un papel pro-oxidante [Verhagen, 1989] e inducir la actividad transcripcional de Nrf2, mediante el incremento de la estabilidad de la proteína y por consecuencia, ejerce un efecto protector frente al estrés oxidante [Gharavi et al., 2007; Tasset, 2010].

Pero para tal efecto, el tBHQ primero debe metabolizarse y sufrir autooxidación, transformándose en tert-butilbenzoquinona (tBQ^o), que finalmente es el inductor de la actividad de Nrf2, debido a sus propiedades electrofílicas, además de estar asociado a la generación de ERO como H₂O₂ y O₂[•] que modifican el estado redox, y por tanto la disociación del complejo Keap1/Nrf2 conduciendo a la subsecuente translocación nuclear y activación de este factor [Wang, 2010; Abiko, 2011; Erlank et al., 2011].

Se ha propuesto que dosis altas de tBHQ pueden generar concentraciones mayores de ERO y provocar citotoxicidad [Alarcón-Aguilar

et al., 2014]. Esto pudiera estar relacionado con lo observado en el presente estudio en donde el grupo BN (n=6), que recibió una dosis de tBHQ [100 mg/ kg de peso] presentó una mortalidad del 50%.

Sin embargo, se sabe que el precondicionamiento de células con bajas concentraciones de tBHQ o H₂O₂, da como resultado una respuesta adaptativa que activa a Nrf2, protegiendo a las células de una citotoxicidad oxidativa adicional [Luna-López et al., 2010; Alarcón-Aguilar et al., 2014].

En relación a lo anterior, el balance redox se describe como la relación interconvertible de las formas reducida y oxidada de una molécula; por ejemplo, el grupo tiol del residuo de cisteína del GSH, puede ser oxidado a la forma disulfuro GSSG, siendo estas dos moléculas el par redox más importante y comúnmente medido; ya que una evaluación de su relación, proporciona estimaciones fiables del estado redox celular y frecuentemente se mide, como indicador de estrés oxidante. [Han et al., 2006]. Así mismo, se ha evidenciado que varias condiciones patológicas en donde el estrés oxidante juega un papel importante, se caracterizan por un desequilibrio en la relación GSH/GSSG. Por lo tanto, es de gran importancia mantener una estricta regulación de este sistema, ya que una deficiencia de GSH pone a la célula en riesgo de daño oxidante [Towsend et al., 2003].

Debido a lo anterior y puesto que no hay información acerca del posible efecto protector que pudiera inducir el tBHQ en organismos lactantes, se procedió a realizar una curva dosis respuesta; para

determinar la concentración experimental a la cual el tBHQ modificará el estado redox, a través del cociente GSH/GSSG en tимо de ratas BN y DN. En el presente estudio se pudo observar una disminución en los grupos DN2 y DN3 tratados con dosis de 0 y 25 mg de tBHQ en comparación a su respectivo grupo BN. Esto significa que la desnutrición está relacionada probablemente con alteraciones en el estado redox y con mayor estrés oxidante en estos dos grupos; quizá debido a una menor síntesis de GSH como lo reporta Badaloo y colaboradores (2002). Los grupos DN tratados con 50 mg de tBHQ no presentaron diferencias con respecto al grupo BN, por lo que esta dosis, puede mantener los niveles en el cociente GSH/GSSG; sin embargo, la dosis de 75 mg de tBHQ provocó un incremento en los valores de este cociente en los grupos DN2 y DN3. Por lo tanto, la dosis de 75 mg de tBHQ mejora la relación GSH/GSSG; lo cual a su vez, podría traducirse en una probable mejoría en los mecanismos de protección antioxidante y con ello, menor estrés oxidante.

Se ha argumentado que el EOX puede conducir a modificaciones estructurales y funcionales en diversas moléculas, lo que altera de esta manera la fisiología de las células y por consecuencia se ve comprometida la de los organismos [González et al., 2000].

Con base en esto, se sabe que la desnutrición infantil puede resultar en un aumento de LPx en sangre y suero [Bosnak et al., 2010; Aly et al., 2014]; de igual manera, en modelos experimentales se ha observado un incremento de este daño en plasma, hígado, riñones, pulmones [Tatli et al.,

2000] y en algunas regiones cerebrales [Feoli et al., 2006]. Este tipo de daño se ha atribuido a la deficiencia de elementos traza tales como el Zn y el Cu [Jain et al., 2008], necesarios para la actividad funcional de diversas enzimas. Se reconoce que incluso una leve deficiencia de estos micronutrientes, se relaciona con la falta de protección antioxidante y por ende en un aumento de daño por estrés oxidante [Ames, 2001; Aly et al., 2014].

En este sentido, uno de los objetivos propuestos en el presente estudio fue evidenciar el daño por estrés oxidante en lípidos, proteínas y ADN en tino de ratas desnutridas. En cuanto al estrés oxidante a nivel de lípidos, los resultados obtenidos muestran que la desnutrición está claramente relacionada con aumento de LPx, debido al considerable incremento en la concentración de MDA en ratas con DN2 y DN3 sin tratamiento en 2.7 y 2.4 veces respectivamente, en comparación al grupo BN sin tratamiento. Este tipo de daño puede traer graves consecuencias en los organismos desnutridos; ya que se sabe que el incremento de los productos de la LPx; tales como el MDA pueden modificar la permeabilidad iónica de la membrana celular, por el daño directo a nivel de lípidos o por el daño que puede ocasionar en las proteínas membranales [Okunade y Olorunsogo, 1992], que se sabe, están asociados con la patogénesis del edema en la desnutrición tipo kwashiorkor [Manary et al., 2000].

Así mismo, otro de los objetivos planteados, fue observar si el antioxidante tBHQ protegía contra el daño oxidante en ratas desnutridas,

lo cual se comprobó por la disminución del contenido de MDA en un 66% y 80% en los grupos DN2 y DN3 respectivamente, a los cuales se les administró una dosis de tBHQ [75 mg/kg de peso corporal] por tres días, en comparación a los grupos DN2 y DN3 sin tratamiento; otro aspecto relevante observado en los organismos tratados con tBHQ fue que los niveles de oxidación lipídica se mantuvieron constantes en los tres grados de desnutrición e inclusive similares a los del grupo BN sin tratamiento. El efecto protector del tBHQ sobre el daño por estrés oxidante a nivel de lípidos en modelos experimentales, también se ha evidenciado en otros trabajos de investigación en donde se observó una disminución significativa del daño lipídico; por una disminución en el contenido de MDA cuando los organismos son expuestos a cisplatino un fármaco quimioterapéutico importante que causa nefrotoxicidad [Pérez-Rojas et al., 2011].

En cuanto al EOx a nivel de proteínas en organismos desnutridos se han observado niveles elevados de daño por estrés oxidante de proteínas en cerebelo, hipocampo y corteza cerebral de ratas desnutridas; asociado a una disminución en el contenido de tirosina y triptófano en estas áreas cerebrales [Feoli et al., 2006]. Además en orina de niños con desnutrición tipo kwashiorkor se ha hallado un incremento de aminoácidos oxidados tales como o,o'-ditirosina y orto-tirosina. Ambas moléculas surgen cuando un radical hidroxilo las oxida; la primera se forma cuando se oxidan los residuos de tirosina y la segunda los de fenilalanina. Asociado a lo

anterior, se sugiere que las proteínas citosólicas o ligadas a la membrana podrían ser la fuente de aminoácidos oxidados en la orina de estos niños [Manary et al., 2000]. En este estudio se pudo observar que existe un incremento de este tipo de estrés, evidenciado por el aumento de proteínas carboniladas en ratas con DN2 y DN3 sin tratamiento en hasta 2.6 y 3.9 veces, respectivamente, en comparación a su grupo BN. Por consiguiente, la desnutrición está claramente relacionada con aumento de estrés oxidante a nivel de proteínas. Este tipo de daño puede provocar que las proteínas sean más susceptibles a la proteólisis, desnaturalización, agregación, pérdida de su actividad biológica e inclusive provocar la muerte celular [Sánchez-Rodríguez et al., 2004; Borton y Jauniaux, 2011]. Cabe señalar, que este daño disminuyó en los grupos DN2 y DN3 tratados con tBHQ en un 73% y 84%, respectivamente, en comparación a su grupo desnutrido sin tratamiento. En otros trabajos de investigación también se ha evidenciado el efecto protector del tBHQ sobre el daño por estrés oxidante a nivel de proteínas por una disminución en el contenido de proteínas carboniladas cuando los organismos son expuestos a cisplatino en riñón [Pérez-Rojas et al., 2011] o a daño renal inducido por isquemia-reperfusión [Guerrero-Beltrán et al., 2012]. De manera análoga a los resultados obtenidos de LPx, se evidenció que los niveles de oxidación a nivel de proteínas, fueron semejantes en todos los grupos experimentales tratados con tBHQ e inclusive similares al grupo BN.

Se han realizado diferentes estudios para evaluar el efecto de la desnutrición sobre el material genético. Por ejemplo en niños con DN2 y DN3; así como, sus factores asociados entre ellos las infecciones y el tratamiento con medicamentos, provocan daños a nivel del ADN en comparación con los niños bien nutridos infectados [Betancourt et al., 1995]. Por otra parte, en modelos experimentales la DN3 provoca un aumento en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos, apoyando la idea de que la desnutrición tiene un efecto sobre la integridad del ADN [Ortiz et al., 1995]. Adicionalmente, se ha determinado que algunos tipos celulares son más susceptibles que otros a presentar daño a este nivel [Cortés et al., 2001; Betancourt et al., 2005].

Actualmente, se afirma que la sobreproducción de ERO y/o disminución de las defensas antioxidantes resultan en daño oxidante molecular [González et al., 2000]. De ahí la idea, de que uno de los factores que pudieran estar involucrados en el incremento de daño a nivel del ADN en organismos desnutridos fuera el estrés oxidante [González et al., 2002]. Sin embargo, este es el primer estudio que confirma que la desnutrición está relacionada con un incremento de daño por estrés oxidante a nivel del ADN en tino. En este caso el daño, se evaluó mediante la cuantificación del aducto 8-OHdG, un excelente biomarcador de estrés oxidante [Valavidinis et al., 2009], que puede inducir transversiones GC→TA, provocando un mal apareamiento de la guanina con su respectiva base y por consecuencia la ruptura de la cadena del ADN [Halliwell, 2001; Rivera

et al., 2006]. La guanina es la base nitrogenada que presenta el potencial de ionización más bajo entre los componentes de los ácidos nucleicos, por lo tanto, es la base más susceptible a ser oxidada por ERO [Königsberg, 2008].

En los grupos con DN2 y DN3 se observó un incremento en la frecuencia de la molécula 8-OHdG en 2.3 y 3.4 veces respectivamente, en comparación con el grupo BN. Fue evidente, que la frecuencia del aducto aumentó en función del grado de desnutrición, por lo que se puede proponer a esta molécula como un marcador biológico de estrés oxidante en la desnutrición. La evaluación del daño por estrés oxidante a nivel del ADN, realizada en el presente trabajo, complementa los estudios de daño celular y citogenético, realizados anteriormente en organismos desnutridos [Betancourt et al., 1995, Cortés et al., 2001; Betancourt et al., 2005]. Cabe señalar, que este tipo de daño, es quizás el más nocivo de todos, debido a que puede generar efectos perjudiciales en las células, tales como anomalías cromosómicas que pueden bloquear la replicación del ADN, la inducción de la citotoxicidad, muerte celular y carcinogénesis [Valko et al., 2004].

Es de gran importancia señalar, que los productos de la oxidación a nivel del lípidos, proteínas y ADN; tales como MDA, proteínas carboniladas y 8-OHdG, respectivamente; incrementaron de forma similar en los grupos con DN2 y DN3 sin tratamiento, en 2.7 y 3.4 veces respectivamente para lipoperoxidación; 2.6 y 3.9 para oxidación de proteínas y 2.3 y 3.4 veces

respectivamente para daño al ADN. Esto indica que déficits corporales mayores al 25% pueden predisponer a un incremento de daño por estrés oxidante y sugerir que la desnutrición puede promover niveles semejantes de daño oxidante en diferentes biomoléculas. Del mismo modo, se observó una relación inversa entre los pesos corporales y el daño oxidante a nivel de lípidos, proteínas y ADN; es decir, los niveles de daño oxidante en estas moléculas aumentan en relación a los déficits de peso. Contrariamente a estos resultados, el daño oxidante a nivel lípidos y proteínas disminuyó en los grupos DN2 y DN3 tratados con tBHQ en un 66% y 80%; respectivamente para LPx y en un 73% y 84% para oxidación a nivel de proteínas; este efecto protector puede ser producido por la capacidad que se le ha conferido a este compuesto sobre la inducción transcripcional de Nrf2, factor que a su vez regula la transcripción de genes que participan en los mecanismos de protección antioxidante tales como SOD, GPx y CAT [Zhu et al., 2005] y por consecuencia restablezca los mecanismos de protección antioxidante. Aunque otra posibilidad es que los niveles de síntesis de GSH aumenten en respuesta a la administración del tBHQ [Steele et al., 2013] y por ende disminuya el daño oxidante en estas biomoléculas.

Diversos trabajos han determinado los efectos de la desnutrición sobre los mecanismos de defensa antioxidante en niños [Reid et al., 2000; Ahmed et al., 2009], y en animales de experimentación [Jimoh et al., 2005; Feoli et al., 2006]. En estos estudios, se ha observado 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 Se y el Zn [Becker et al., 1994; Ashour et al., 1999]. Existen trabajos en los que se han reportado disminución en las actividades de SOD en suero [Savitri et al., 2004] y de GPx en sangre total, de niños con DN3 [Ashour et al., 1999] en comparación con los organismos bien nutridos.

Debido a que se ha sugerido que un incremento de estrés oxidante está usualmente acompañado por una disminución en la capacidad antioxidante [Akinola, 2010], uno de los objetivos del presente estudio fue determinar las posibles repercusiones de la desnutrición sobre la actividad enzimática de moléculas tales como SOD, GPx y CAT, que participan en la regulación de ERO.

Como era de esperar y en concordancia con estudios anteriores [Aly et al., 2014; He et al., 2012], las actividades enzimáticas de SOD y GPx se encontraron disminuidas en los grupos DN2 y DN3 sin tratamiento en comparación a su respectivo grupo BN. La actividad de CAT fue la más comprometida; ya que se encontró disminuida en todos los grados de desnutrición. La disminución en la actividad de CAT probablemente sea ocasionada por una deficiencia de hierro, un elemento traza indispensable para el sitio activo de esta enzima [Königsberg, 2008], lo cual a su vez pudiera estar asociado con una disminución de ferritina, una proteína almacenadora de hierro que se ha visto disminuida en niños con

desnutrición [Gutiérrez et al., 2007]. A si también pareciera, que la disminución de la actividad de CAT en el grupo DN1 sin tratamiento, está siendo compensada por la actividad de GPx, ya que esta enzima es la principal molécula eliminadora del H₂O₂ [Young y Woodside, 2001] lo que confiere una mayor protección contra el estrés oxidante en este grupo. Lo anterior, puede coincidir con los resultados observados en el grupo de ratas DN1 sin tratamiento, donde no se encontraron diferencias en el daño por estrés oxidante a nivel de lípidos, proteínas y ADN en relación con el grupo BN.

Basándose en lo anterior, se puede sugerir que la desnutrición causa un desequilibrio en los sistemas de inactivación del radical superóxido, mediada por SOD y la eliminación del H₂O₂ mediadas por GPx y CAT en los grupos con DN2 y DN3. Esto a su vez, podría generar moléculas mucho más tóxicas para la célula, tales como el radical hidroxilo, a través de las reacciones de Fenton o de la Haber-Weiss [Kehrer, 2000] y posiblemente, ser una de las fuentes del incremento del daño oxidante observado en estos grupos. Al estar disminuidas las actividades de SOD, GPx y CAT, se puede conducir a la pérdida de la protección antioxidante y contribuir a la fisiopatología de la desnutrición [Savitri et al., 2004]. El descenso en la actividad de estas moléculas puede deberse en parte, a la reducción en su tasa de síntesis, como resultado de las restricciones en la dieta en estos organismos [Albretch y Péliesser, 1995; Jimoh et al., 2005].

Se ha propuesto que en respuesta al EOX el factor transcripcional Nrf2 se transloca del citoplasma al núcleo, permitiendo la expresión de genes que codifican para moléculas con función antioxidante tales como GST, SOD, GPx y CAT entre otras [Zhu et al., 2005; Zhao, 2009; Colín-González, 2013] y entre los inductores de Nrf2 más estudiados se encuentra el tBHQ. En este estudio, se pudo observar un incremento significativo en la actividad enzimática de las tres proteínas analizadas SOD, GPx y CAT en los tres grupos desnutridos tratados con tBHQ en comparación a sus respectivos grupos desnutridos sin tratamiento. No obstante, a pesar de que la actividad de CAT presentó un incremento en los grupos desnutridos tratados con tBHQ, esto no es suficiente para mantener o incrementar su actividad en comparación al grupo BN.

Así mismo, se ha evidenciado que el pretratamiento con tBHQ en ratas evita la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino; mediante el incremento de la actividad enzimática de GPx y GST en la corteza renal [Pérez-Rojas et al., 2011]. El incremento de la actividad de SOD y GPx en DN2 y DN3 tratados con tBHQ podría estar relacionado con los resultados obtenidos en cuanto a la disminución del daño por estrés oxidante en lípidos y proteínas en los mismos grupos.

Para determinar si la disminución o el incremento de la actividad enzimática de estas moléculas en los organismos desnutridos sin tratamiento o tratados con tBHQ estaba asociada con los niveles de proteína, se determinó el contenido proteico mediante la técnica de

Western blot. Los resultados muestran una disminución en el contenido de SOD, GPx y CAT en ratas con DN2 y DN3 sin tratamiento en comparación a su respectivo grupo BN. Por lo tanto; estos resultados confirman que la desnutrición está asociada con disminución en la actividad y con el contenido proteico de estas moléculas; que a su vez, podría estar vinculado con el incremento del daño oxidante en DN2 y DN3.

Ahora bien, el contenido de estas enzimas en los grupos tratados con tBHQ, mostró una disminución en el contenido de SOD para el grupo DN3-tBHQ; lo cual difiere con el incremento de su actividad en el mismo grupo, esto pudiera significar que aunque el contenido sea menor; su funcionalidad no se encuentra comprometida. Así mismo, el contenido de CAT disminuyó en los grupos DN2 y DN3 tratados con tBHQ. Esto pudiera indicar que CAT no mejoró ni en su contenido, ni en su funcionalidad cuando los organismos fueron tratados con tBHQ. En contraste, el contenido de GPx no presentó cambios en los tres grupos DN tratados con tBHQ, en comparación a su respectivo grupo BN; esto podría relacionarse a su vez, con el incremento en la actividad de esta enzima en los mismos grupos desnutridos. Finalmente, se puede plantear que el tBHQ provoca un efecto protector contra el daño oxidante en los organismos desnutridos mediado por el incremento en la expresión y en la actividad enzimática de SOD y GPx.

Como se mencionó anteriormente el tBHQ induce la actividad transcripcional de Nrf2 y en contraste a lo que se hubiera esperado, no se

encontraron diferencias importantes en su contenido en las fracciones analizadas. Sin embargo, la expresión de Nrf2 es un evento transitorio y se da en un tiempo establecido; por lo que probablemente el tiempo en el que se llevaron las determinaciones experimentales, no coinciden con el tiempo de mayor expresión y que quizás fue en las primeras horas posteriores al tratamiento.

Se ha evidenciado que la desnutrición sin otro estímulo exógeno, induce un estado inflamatorio de bajo grado [Ling et al., 2004] y uno de los factores transcripcionales mayormente implicados en la respuesta inflamatoria es NF- κ B, en donde el heterodímero p65/p50 es la forma más común y mejor caracterizada de este factor [Yu et al., 2009]. La dimerización de ambas proteínas es necesaria para proporcionar un dominio de unión eficaz al ADN. El homodímero de p50 es incapaz de llevar a cabo la activación transcripcional, contrariamente a los homodímeros de p65 que contienen el dominio de activación [Baldwin, 1996; López-Bojorquez, 2004; Hernández y Rojas, 2005; Gilmore, 2006; Gloire et al., 2006].

Algunos estudios han confirmado que el incremento de la actividad transcripcional de NF- κ B está asociada con un aumento en la expresión génica y proteica de la subunidad p65, mientras que la expresión y contenido proteico de p50 generalmente no muestra cambios evidentes [Visconti et al., 1997]. En lo que respecta a los resultados obtenidos en la presente investigación el contenido proteico de p50, no mostró diferencias

significativas entre los organismos sin tratamiento y tratados con tBHQ. En cambio, el contenido de p65 mostró un incremento en organismos con DN2 y DN3 sin tratamiento. Lo anterior pudiera sugerir que probablemente NF- κ B esté llevando a cabo su actividad transcripcional como lo han reportado anteriormente Visconti y colaboradores y activar la expresión de diversos genes; entre ellos, los que participan en la respuesta inflamatoria incluyendo aquellos involucrados en la síntesis de TNF- α [Hayden y Gosh, 2008; Vallabhapurapu y Karin, 2009]. Aunado a esto, en macrófagos peritoneales de ratones desnutridos se evidenció que existe un incremento en la actividad de NF- κ B en comparación a las células de los organismos bien nutridos [Fock et al., 2010].

En contraste al incremento del contenido de p65 en los grupos DN2 y DN3 sin tratamiento, los animales que fueron tratados con tBHQ presentaron una disminución en su contenido en los mismos grupos. Esto a su vez, podría indicar una disminución en el contenido de proteínas proinflamatorias; ya propuesto anteriormente por Jin y colaboradores (2011), en donde el pretratamiento con 1% de tBHQ durante una semana y antes de una lesión cerebral traumática, disminuyó marcadamente la activación de NF- κ B, producción de citocinas inflamatorias e incluso atenuó la frecuencia de apoptosis.

Por esta razón, se ha planteado que la inducción de citocinas inflamatorias como TNF- α son inhibidas por antioxidantes fenólicos; entre ellos el tBHQ. De tal modo, que se propone a NF- κ B como blanco de dicha

inhibición; específicamente por el bloqueo de la formación del complejo de unión de NF- κ B con el ADN [Ma et al., 2003].

En consecuencia, para tratar de conocer si la desnutrición genera un estado de estrés inflamatorio sistémico, se cuantificó la concentración plasmática de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α . La concentración plasmática de IL-6 se incrementó en el grupo DN3 sin tratamiento en comparación a su respectivo grupo BN. Resultados similares se han observado en modelos experimentales por el evidente incremento de IL-6 en plasma de ratones desnutridos en comparación con el grupo control [Ling et al., 2004]. Así mismo, en suero de niños con desnutrición severa se han encontrado incrementadas las concentraciones de IL-6 y proteína C reactiva, independientemente de la presencia de infección [Sauerwein et al., 1997]. En cuanto a los resultados obtenidos, cabe mencionar que las concentraciones plasmáticas de IL-6 disminuyeron en todos los grados de desnutrición tratados con tBHQ en comparación a sus respectivos grupos desnutridos sin tratamiento. Esto sugiere que la desnutrición por sí misma, causa un estado de estrés inflamatorio y el tBHQ protege de tal consecuencia.

Los resultados de la presente investigación muestran que las concentraciones de TNF- α al igual que IL-6 en plasma, se incrementaron en el grupo DN3 sin tratamiento en comparación a su respectivo grupo BN. Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente, en donde se ha evidenciado un incremento de TNF- α en plasma de ratones desnutridos en

comparación con el grupo control [Ling et al., 2004]. De igual modo, en suero de ratas desnutridas se observó un incremento en los niveles de TNF- α relacionado a un aumento en su contenido proteico y expresión génica en fibras musculares de diafragma [Lewis et al., 2005]. Por su parte, en niños desnutridos sin evidencia de infección se observó que las concentraciones séricas basales de TNF- α fueron significativamente mayores que en los controles [Giovambattista et al., 2000].

Las alteraciones de estas citocinas por el efecto de la desnutrición pueden comprometer la salud de los individuos, ya que se ha demostrado que un incremento de citocinas como IL-6 y TNF- α predicen la mortalidad de niños con desnutrición severa; aunque, con una adecuada rehabilitación nutricional esto puede revertirse [Bartz et al., 2014]. Con la evidencia del incremento de IL-6 y TNF- α en plasma, se puede sugerir que la cascada inflamatoria parece ser activada por el efecto de la desnutrición y mediada a su vez por NF- κ B.

Sin embargo, en los grupos BN, DN1, DN2 y DN3 tratados con tBHQ disminuyó la concentración plasmática de IL-6; mientras que las concentraciones de TNF- α disminuyeron solo en BN, DN1 y DN2 en relación a su respectivo grupo sin tratamiento. El hecho de que la concentración plasmática de TNF- α en el grupo DN3 con tratamiento no haya disminuido en comparación a los otros grupos DN tratados con tBHQ, puede deberse a que existe un mayor déficit de peso corporal en este grupo en comparación a los otros grupos DN, ya que el incremento de

esta citocina ha sido implicada en varios trastornos de pérdida de peso; como caquexia, anorexia y bulimia [Filella, 2002; Lewis et al., 2005]. Por otra parte, no hay que perder de vista que NF- κ B también puede regular la expresión de proteínas con función antioxidante [Morgan y Liu, 2011], siendo la SOD2 una de las proteínas reguladas por este factor transcripcional [Karisalo et al., 2007], además de tiorredoxina [Djavaheri et al. 2004] y GPx [Lei et al., 2007], lo que finalmente desencadena procesos de supervivencia [Echeverri et al., 2008].

En resumen, se puede proponer que la desnutrición en etapas tempranas de la vida está fuertemente asociada con un incremento similar de daño oxidante a nivel de lípidos, proteínas y ADN. Así como, con un estado de estrés inflamatorio, debido principalmente a un aumento de citocinas proinflamatorias tales como IL-6 y TNF- α ; probablemente mediadas por el factor transcripcional NF- κ B. Ambos aspectos, posiblemente, pueden ser desencadenados por un incremento de ERO que se puede atribuir a una deficiente respuesta antioxidante observada en estos organismos; a consecuencia de la pobre disponibilidad de proteínas en su dieta; lo cual reduce la síntesis de las mismas y/o a micronutrientes necesarios para contrarrestar los niveles de ERO. Estas anomalías directamente pueden contribuir a la disfuncionalidad del timo y por consecuencia pueden modificar potencialmente la respuesta inmunológica frente a estímulos infecciosos en estos organismos.

Por su parte, el antioxidante tBHQ ejerció un efecto protector contra el daño oxidante a nivel de lípidos y proteínas en timo de organismos desnutridos; debido quizás, a un incremento en la actividad transcripcional mediada por Nrf2 y/o a un aumento en los niveles de GSH; lo que a su vez, pudo ser reflejado por el restablecimiento de los mecanismos de protección antioxidante tanto de SOD y GPx, aunque en mayor medida de GPx; ya que la actividad reductora de esta enzima depende de la biodisponibilidad de GSH. De igual manera, a este compuesto también se le puede atribuir una función antiinflamatoria, por la disminución en las concentraciones plasmáticas de citocinas proinflamatorias principalmente de IL-6; probablemente mediadas por la inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B. La disminución del daño oxidante; así como del estado inflamatorio puede deberse a una reducción de los niveles de ERO; como resultado del re-establecimiento de los mecanismos de protección antioxidante.

10. Conclusiones

La desnutrición es un factor que predispone a un incremento de daño por estrés oxidante a nivel de diversas biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN, asociado a una disfuncionalidad de moléculas que participan en los mecanismos de protección antioxidante de tipo enzimáticos como son SOD, GPx y CAT; y estas alteraciones, probablemente sean ocasionadas por las restricciones en la ingesta de

alimentos y/o oligoelementos, necesarios para contrarrestar los niveles de ERO. Así mismo, la desnutrición está relacionada a un incremento del estado inflamatorio, debido principalmente al aumento de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) en plasma; proporcionales al nivel del desgaste corporal. Estas alteraciones pueden repercutir en el crecimiento y desarrollo de los organismos desnutridos. Así como, en la funcionalidad del timo lo que puede comprometer la respuesta inmunológica.

El antioxidante tBHQ en organismos desnutridos previene el daño por estrés oxidante a nivel de lípidos y proteínas por el restablecimiento de los mecanismos de protección antioxidante tales como SOD y GPx en timo; así mismo, confiere un efecto antiinflamatorio por la disminución en la concentración plasmática de TNF- α e IL-6, probablemente mediadas por la inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B.

11. Perspectivas

- Determinar la actividad transcripcional de NF- κ B, para confirmar su participación en la mediación de citocinas proinflamatorias tales como TNF- α e IL-6.
- Evaluar el daño por EOX a nivel del ADN en timo de ratas tratadas con tBHQ, con la finalidad de establecer si este antioxidante también confiere protección a nivel de esta biomolécula en organismos desnutridos.

- Identificar ERO en timo de ratas sin tratamiento para confirmar un probable incremento de estas especies y reforzar el hecho del incremento de daño por estrés oxidante.
- Identificar ERO en timo de ratas tratadas con tBHQ con el fin de establecer si este antioxidante disminuye los niveles de estas especies y con ello poder explicar la disminución del estrés oxidante en lípidos y proteínas.
- Confirmar que el restablecimiento de los mecanismos de protección antioxidante y la disminución del EOX por el efecto del tBHQ en un órgano fundamental para el sistema inmunológico confiere protección frente a un factor frecuentemente asociado a la desnutrición como es el caso de las infecciones.

12. Bibliografía

- **Abbas AK**, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología celular y molecular. **2015**. 8ª edición. Elsevier. España.
- **Abiko Y**, Miura T, Phuc BH, Shinkai Y, Kumagai Y. Participation of covalent modification of Keap1 in the activation of Nrf2 by tert-butylbenzoquinone, an electrophilic metabolite of butylated hydroxyanisole. **2011**. *Toxicol Appl Pharmacol*. 255:32-39.
- **Aebi H**. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. **1984**. 105:121-26.
- **Ahmed AE**, Nouraldeen AM, Abdel-Rahman SZ, Rajaraman S. Role of glutathione modulation in acrylonitrile-induced gastric DNA damage in rats. **1996**. *Arch Toxicol*. 70:620-27.
- **Ahmed T**, Rahman S, Cravioto A. Oedematous malnutrition. **2009**. *Indian J Med Res*. 130:651-54.
- **Akinola F**, Oguntibeju O, Alabi O. Effects of severe malnutrition on oxidative stress in Wistar rats. **2010**. *Sci Res Essays*. 5:1145-49.
- **Alarcón-Aguilar A**, González-Puertos VY, Luna-López A, López-Macay A, Morán J, Santamaría A, Königsberg M. Comparing the effects of two neurotoxins in cortical astrocytes obtained from rats of different ages: involvement of oxidative damage. **2014**. *J Appl Toxicol*. 34:127-38.
- **Albretch R**, Pelissier MA. About the oxidative stress status in children with kwashiorkor. **1995**. *Fd Chem Toxic*. 33:1081-83.
- **Aly G**, Shaalan A, Mattar M, Ahmed H, Zaki M, Abdallah H. Oxidative stress status in nutritionally stunted children. **2014**. *Gaz Egypt Pediatr Assoc*. 62:28-33.
- **Ames B**. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. **2001**. *Mutat Res*. 475:7-20.
- **Ashour MN**, Salem SI, El-Gabdan HM, Elwan NM, Basu TK. Antioxidant status in children with protein-energy malnutrition (PEM) living in Cairo, Egypt. **1999**. *Eur J Clin Nutr*. 52:669-73.
- **Ayala A**, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **2014**. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2014/360438.
- **Badaloo A**, Reid M, Forrester T, Heird WC, Jahoor F. Cysteine supplementation improves the erythrocyte glutathione synthesis rate in children with severe edematous malnutrition. **2002**. *Am J Clin Nutr*. 76:646-52.
- **Bahia PK**, Pugh V, Hoyland K, Hensley V, Rattray M, Williams RJ. Neuroprotective effects of phenolic antioxidant tBHQ associate with inhibition of FoxO3a nuclear translocation and activity. **2012**. *J Neurochem*. 123:182-91.

- **Baldwin AS.** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **1996.** *Annu Rev Immunol.* 14:649-83.
- **Barone KS,** O'Brien PC, Stevenson JR. Characterization mechanisms of thymic atrophy in protein-malnourished mice: role of corticosterone. **1993.** *Cell Immunol.*148:226-33.
- **Barros OCM,** Sakata RK, Machado IA, Gerola LR, Salomão R. Citocinas y dolor. **2011.** *Rev Bras Anestesiol.* 61:137-42.
- **Bartz S,** Mody A, Hornik C, Bain J, Muehlbauer M, Kiyimba T, Kiboneka E, Stevens R, Bartlett J, St Peter JV, Newgard CB, Freemark M. Severe acute malnutrition in childhood: hormonal and metabolic status at presentation, response to treatment, and predictors of mortality. **2014.** *J Clin Endocrinol Metab.* 99:2128-37.
- **Becker K,** Bötticher D, Leichsenring M. Antioxidant vitamins in malnourished Nigerian children. **1994.** *Int J Vitam Nutr Res.* 64:306-10.
- **Becker K,** Leichsenring M, Gana L, Bremer HJ, Schirmer RH. Glutathione and associated antioxidant systems in protein energy malnutrition: results of study in Nigeria. **1995.** *Free Rad Biol Med.* 18: 257-63.
- **Bernabeu MJ,** Wanderm-Bergne LC, Sanz V, Castiel LD, Landaeta JM, Anderson H. El abordaje de la malnutrición en el contexto de la cultura científica. **2008.** Club Universitario. España. pp:55-58.
- **Betancourt M,** Cortés E, Pérez V, González C, Ortiz R. Assessment of damage in brain, liver, kidney, and testis from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. **2005.** *Rev Int Cont Ambient.* 21:79-83.
- **Betancourt M,** Ortiz R, González C, Pérez P, Cortés L, Rodríguez L, Villaseñor L. Assessment of damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. **1995.** *Mutat Res.* 331:65-77.
- **Birben E,** Murat SU, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. **2012.** *WAO Journal.* 5:9-19.
- **Blössner M,** de Onis M. Malnutrition: quantifying the health impact at national and local levels. **2005.** Geneva, World Health Organization, Environmental Burden of Disease Series, No. 12.
- **Bolant HB,** Calvo BM, Cajalvo LD, Gimeno FD, Lloris CJ. La eutanasia en los animales de laboratorio. **1990.** *Reach Surg.* 5:45-57.
- **Borton GJ,** Jauniaux E. Oxidative Stress. **2011.** *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 25:287-99.
- **Bosnak M,** Kelekci S, Kocyigit Y, Sen V, Ece A. Oxidative stress in marasmic children relationships with leptin. **2010.** *Eur J Gen Med.* 7:1-8.

- **Bourke CD**, Berkley J, Prendergast AJ. Immune dysfunction as a cause and consequence of malnutrition. **2016**. Trends Immunol. 37:386-98.
- **Bradford M**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **1976**. Anal Biochem. 72:248-54.
- **Brasier AR**. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. **2010**. Cardiovasc Res. 86:211-8.
- **Buege JA**, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. **1978**. Methods Enzymol. 52:302e310.
- **Burcham PC**. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. **1998**. Mutagenesis. 13:287-305.
- **Burguess A**, Glasauer P. Guía de nutrición de la familia. **2006**. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Roma, Italia.
- **Calabrese V**, Cornelius C, Stella AM, Calabrese EJ. Cellular stress responses, mitostress and carnitine insufficiencies as critical determinants in aging and neurodegenerative disorders: role of hormesis and vitagenes. **2010**. Neurochem Res. 35:1880-915.
- **Campos MC**, Rangel SP, Ramos MM, Gómez OJ. La fluidez de la membrana en niños severamente desnutridos. **2000**. Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ. Biomedicina y biología experimental. 1:45-52.
- **Campos-Rosa LM**. ¿Proteínas carboniladas? No, gracias. **2014**. MoleQla. 16:89-92.
- **Castellanos PE**. La nutrición su relación con la respuesta inmunitaria y el estrés oxidativo. **2008**. Rev Habanera de Cienc Méd. 7:1-12.
- **Caulfield LE**, de Onis M, Blösner M, Black RE. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. **2004**. Am J Clin Nutr. 80:193-8.
- **Céspedes C**, Sánchez S. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. **2000**. Rev Cub Cardiol. 14:55-60.
- **Chandra RK**, Kumar R, Newberne PM. Nutrition, immunity and infection: mechanism of interactions. **2012**. Springer Science & Business Media. New York, USA.
- **Colín-González AL**, Orozco-Ibarra M, Chánez-Cárdenas ME, Rangel-López E, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J, Barrera-Oviedo D, Maldonado PD. Heme oxygenase-1 (HO-1) upregulation delays morphological and oxidative damage induced in an excitotoxic/pro-oxidant model in the rat striatum. **2013**. Neuroscience. 231:91-101.

- **Cortés E**, González C, Betancourt M, Ortiz R. Assessment of damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. **2001**. *Teratogen Carcin Mut.* 21:231-47.
- **Cunningham-Rundles C**, Ponda PP. Molecular defects in T and B cell primary immunodeficiency diseases. **2005**. *Nat Rev Immunol.* 5:880-92.
- **de Onis M**, Frongilio EA, Blösner M. ¿Está disminuyendo la malnutrición? Análisis de la evolución del nivel de malnutrición infantil desde 1980. **2001**. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud.* 4:100-10.
- **Delhalle S**, Derogowski V, Benoit V, Merville MP, Bours V. NF-kappaB-dependent MnSOD expression protects adenocarcinoma cells from TNF-alpha-induced apoptosis. **2002**. *Oncogene.* 21:3917-24.
- **Djavaheiri-Mergny M**, Javelaud D, Wietzerbin J, Besancon F. NF-kappaB activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNFalpha-treated Ewing sarcoma cells. **2004**. *FEBS Lett.* 578:111-15.
- **Echeverri R**, Mockus S. Factor nuclear κ B (NF- κ B): Signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. **2008**. *Rev Fac Med.* 56:133-46.
- **ENSANUT**. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. **2012**. Instituto Nacional de Salud Pública. Morelos, México.
- **ENSANUT**. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Distrito Federal. **2012**. Instituto Nacional de Salud Pública. Morelos, México.
- **Erlank H**, Elmann A, Kohen R, Kanner J. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. **2011**. *Free Radic Biol Med.* 51:2319-27.
- **Esch GJ**. Toxicology of tert-butylhydroquinone (TBHQ). **1986**. *Fd Chem Tox.* 24:1063-65.
- **Farris MW**, Reed DJ. High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. **1987**. *Methods Enzymol.* 143:101-09.
- **Feliu MS**, Slobodianik KN. Efectos de la desnutrición proteica y de su repercusión nutricional en el timo de rata. **2002**. *Rev Chil Nutr.* 29:125-35.
- **Feoli AM**, Siqueira IR, Almeida L, Tramontina AC, Vanzella C, Sbaraini S, Goncalves CA. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition.* **2006**. 22:160-65.
- **Filella X**, Molina R, Ballesta AM. Estructura y función de las citocinas. **2002**. *Med Integral.* 39:63-71.
- **Fock RA**, Rogero MM, Vinolo, MAR, Curi R, Borges MC, Borelli P. Effects of protein-energy malnutrition on NF-kappaB signalling in murine peritoneal macrophages. **2010**. *Inflammation.* 33:101-09.

- **Folh  L**, Gunzler WA. Assays of Glutathione Peroxidase. **1984**. Met Enzy. 105:114-21.
- **França TGD**, Ishikawa LLW, Zorzella-Pezavento SFG, Chiuso-Minicucci F, Da Cunha MLRS, Sartori A. Impact of malnutrition on immunity and infection. **2009**. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 15:374-90.
- **Frankel EN**. Lipid oxidation. **2014**. Woodhead Publishing. 2nd. Edition. Philadelphia, USA.
- **García-Triana BE**, Salda a BA, Salda a GL. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. **2012**. Rev Hab de Cienc M d. 12:187-96.
- **Gauldie J**, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. **1987**. Proc Natl Acad Sci USA. 84:7251-55.
- **Gavia GG**. Cuantificación del daño al ADN por estrés oxidante asociado a la expresión relativa de los ARNm de genes que participan en la regulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en timo de ratas desnutridas. **2012**. Tesis Maestría. UAM-I.
- **Gharavi N**, Haggarty S, El-Kadi A. Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. **2007**. Curr Drug Metab. 8:1-7.
- **Gilmore TD**. Introduction to NF- B: palyers, pathways, perspectives. **2006**. Oncogene. 25:6680-84.
- **Giovambattista A**, Spinedi E, Sanjurjo A, Chisari A, Rodrigo M, Pérez N. Circulating and mitogen-induced tumor necrosis factor (TNF) in malnourished children. **2000**. Medicina (B Aires). 60:339-42.
- **Gloire G**, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **2006**. Biochem Pharmacol. 72:1493-505.
- **Golden MH**, Ramdath D. Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. **1987**. Proc Nutr Soc. 46:53-68.
- **G mez F**, Ramos-Galv n R, Frenk S, Cravioto J, Chávez R, Vázquez J. Mortality in second and third degree malnutrition. **1956**. J Trop Pediat. 2:77-83.
- **G mez QL**, Factor VM, Kaposi NP, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. **2008**. J Biol Chem. 283:14581-89.
- **González C**, Nájera O, Cortés E, Toledo G, López L, Betancourt M, et al. Hydrogen peroxide-induced DNA damage and DNA repair in lymphocytes from malnourished children. **2002**. Environ Mol Mutagen. 39:33-42.

- **González-Torres MC**, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. **2000**. *Bioquímica*. 25:3-9.
- **Goodsell DS**. Catalase. **2004**. RCSB PDB. Protein Data Bank.
- **Goodsell DS**. Superoxide dismutase. **2007**. RCSB PDB. Protein Data Bank.
- **Gopalan C**. kwashiorkor and marasmus: evolution and distinguishing features. **1968**. en: McCance RA, Widdowson EM, editores. *Calorie deficiencies and protein deficiency*. London: Churchill. pp:49-58.
- **Guerrero-Beltrán CE**, Tapia E, Sánchez-González D, Martínez-Martínez C, Cristobal-García M, Pedraza-Chaverri J. Tert-Butylhydroquinone pretreatment protects kidney from ischemia-reperfusion injury. **2012**. *JNEPHROL*. 25:84-89.
- **Gui J**, Mustachio LM, Su D-M, Craig RW. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. **2012**. *Aging and Disease*. 3:280-90.
- **Guide for the care and use of laboratory animals**. National research council of the national academics. **2010**. Washington, USA.
- **Guillén J**, Hawkins M, Mislov B, Flores V. Reactantes de Fase Aguda y su impacto en el estado nutricional. **2011**. *Rev Med Cie*. 14:12-18.
- **Gunstone FD**. Modifying lipids for use in food. **2006**. Woodhead Publishing Series in food Science, Technology and Nutrition. Dundee, Scotland.
- **Gutiérrez RC**, Trujillo H, Martínez CA, Pineda LA, Millán GR. Frecuencia de helmintiasis intestinal y su asociación con deficiencia de hierro y desnutrición en niños de la región occidente de México. **2007**. *Gac Méd Méx*. 143:297-300.
- **Gutiérrez SJ**, García OL, Chima GM, Suástegui DS, Rivera BM, Cruz TL. Determinación de la concentración de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos. **2009**. *Rev Mex Patol Clin*. 56:223-34.
- **Halliwell B**, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. **2015**. 5th ed. Clarenton Press. Oxford, United Kingdom.
- **Halliwell B**. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **2001**. *Drugs Aging*. 18:685-716.
- **Han D**, Hanawa N, Saberi B, Kaplowiz N. Mechanisms of liver injury III. Role of glutathione redox status in liver injury. **2006**. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 291:G1-7.
- **Hansberg TW**. Biología de las especies de oxígeno reactivas. **2002**. *Mens Bioq*. 26:19-54.
- **Hayden MS**, Ghosh S. Shared principles in NF-κB signaling. **2008**. *Cell*. 132:344-62.

- **He ZH**, Sun ZH, Tan ZL, Tang SX, Zhou CS, Han XF, et al. Effects of maternal protein or energy restriction during late gestation on antioxidant status of plasma and immune tissues in postnatal goats. **2012**. *J Anim Sci*. 90:4319-26.
- **Heinrich PC**, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **2003**. *Biochem J*. 374:1-20.
- **Helbock HJ**, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. I Oxidation Matters: The HPLC-Electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. **1998**. *Med. Sci*. 95:288-93.
- **Hernández FD**, Barberena RC, Camacho PJ, Vera LL. Desnutrición infantil y pobreza en México. **2003**. Cuadernos de desarrollo humano. Secretaría de Desarrollo Social, México.
- **Hernández GS**, Rojas CE. El papel del factor de transcripción NF-κB en la célula cardiaca. **2005**. *Arch Cardiol Mex*. 75:363-70.
- **Hicks JJ**, Torres-Ramos YD, Sierra-Vargas MP. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. **2006**. *Rev Endocrinol Nutr*. 14:223-26.
- **Hoffman-Goetz L**. Malnutrition and immunological function with special reference to cell-mediated immunity. **1986**. *Yrbk Phys Anthropol*. 29:139-59.
- **Iglesias-González IM**, Padilla-Docal B, Dorta-Contreras AJ, Junco-Calzadilla R, Ramírez AP, Torres LD, Janero VA. Reactantes de fase aguda en reumatología. **2014**. *Rev Cub Reumatol*. 1:59-62.
- **Jackson AA**. Blood glutathione in severe malnutrition in childhood. **1986**. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 80:911-13.
- **Jain A**, Varma M, Agrawal BK, Jadhav AA. Serum Zinc and malondialdehyde concentrations and their relation to total antioxidant capacity in protein energy malnutrition. **2008**. *J Nutr Sci Vitaminol*. 54:392-95.
- **Jimoh FO**, Odutuga AA, Oladiji AT. Status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the tissues of rats fed low-protein diet. **2005**. *Pakistan J Nutr*. 4:431-34.
- **Jin W**, Ni H, Dai Y, Wang H, Lu T, Wu J, Jiang J, Liang W. Effects of tert-butylhydroquinone on intestinal inflammatory response and apoptosis following traumatic brain injury in mice. **2011**. *Mediators of inflammation*. 2010: doi:10.1155/2010/502564.
- **Jong ML**, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. **2004**. *J Biochem Mol Biol*. 37:139-43.
- **Kairisalo M**, Korhonen L, Blomgren K, Lindholm D. Xlinked inhibitor of apoptosis protein increases mitochondrial antioxidants through NF-κB activation. **2007**. *Biochem Biophys Res Commun*. 364:138-44.

- **Katona P**, Katona-Apte J. The interaction between nutrition and infection. **2008**. CID. 46:1582-88.
- **Kehrer J**. The Haber-Weiss reaction and mechanism of toxicity. **2000**. Toxicology. 149:43-50.
- **Keusch GT**. History of nutrition: malnutrition, infection and immunity. **2003**. J Nutr. 133:336S-40S.
- **Königsberg FM**. Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. **2007**. REB. 26:18-25.
- **Königsberg FM**. Radicales libres y estrés oxidante: Aplicaciones Médicas. **2008**. Manual Moderno. México.
- **Latham MC**. Nutrición Humana en el mundo en desarrollo. **2012**. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
- **Lee JM**, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. **2004**. J Biochem Mol Biol. 37:139-43.
- **Lei XG**, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. **2007**. Annu Rev Nutr. 27:41-61.
- **LeMay LG**, Vander AJ, Kluger MJ. The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. **1990**. Physiol Behav. 47:957-61.
- **Lenhartz H**, Ndasi R, Anninos A, Bötticher D, Mayatepek E, Tetanye E, Leichsering M. The clinical manifestation of the kwashiorkor syndrome is related to increased lipid peroxidation. **1998**. J Pediatr. 132:879-81.
- **Lewis MI**, Da X, Li H, Fournier M. Tumor necrosis factor-alpha and malnutrition-induced inhibition of diaphragm fiber growth in young rats. **2005**. J Appl Physiol. 99:1649-57.
- **Libermann TA**, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-KB transcription factor. **1990**. Mol Cell Biol. 10:2327-34.
- **Lin E**, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **2000**. Surgery. 127:117-26.
- **Ling P**, Smith R, Kie S, Boyce P, Bristian MR. Effects of protein malnutrition on IL-6 mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in rats. **2004**. Am J Physiol Integer Comp Physiol. 287:R801-08.
- **López-Borojorquez LN**. La regulación del factor de transcripción NF-κB un mediador molecular del proceso inflamatorio. **2004**. Rev Inves Clin. 56:83-92.
- **López-Diazguerrero NE**, González PV, Hernández-Bautista R, Alarcón-Aguilar A, Luna-López A, Königsberg FM. Hormesis: lo que no mata, fortalece. **2013**. Gac Med Mex. 149:438-47.
- **Luna-López A**, Triana-Martínez F, López-Diazguerrero NE, Ventura-Gallegos JL, Gutiérrez-Ruiz MC, Damián-Matsumura P, Zentella A,

- Gómez-Quiroz LE, Königsberg M. Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. **2010**. *Free Radic Biol Med*. 49:1192e1204.
- **Ma Q**, Kinneer K, Ye J, Chen BJ. Inhibition of nuclear factor kappaB by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. **2003**. *Mol Pharmacol*. 64:211-19.
 - **Manary MJ**, Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Increased oxidative stress in kwashiorkor. **2000**. *J Pediatr*. 137:421-24.
 - **Marco A**, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. **2003**. *Eur J Clin Nutr*. 57:S66-69.
 - **Mariappan N**, Soorappan RN, Haque M, Sriramula S, Francis J. TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. **2007**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293:H2726-37.
 - **Mark J**, Fraser JA, McMahan M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. **2004**. *Biochem Soc Symp*. 71:157-76.
 - **Marnett LJ**, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with and protein. **2003**. *J Clin Invest*. 111:583-93.
 - **Martínez D**, Pentinat T, Ribó S, Daviaud C, Bloks V, Cebriá Villalmanzo N, Kalko SG, Ramón-Krauel M, Díaz R, Plösch T, Tost J, Jiménez-Chillarón JC. In utero undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered Lxra DNA methylation. **2014**. *Cell Metabolism*. 19:941-51.
 - **Martínez-Subiela S**, Tecles F, Parra MD, Cerón JJ. Proteínas de fase aguda: Conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. **2001**. *An Vet*. 17:97-114.
 - **Mehta NM**, Corkins MR, Lyman B, Malone A, Goday PS, Carney L, Monczka JL, Plogsted SW, Schwenk WF. Defining Pediatric Malnutrition: A paradigm Shift Toward etiology-related definitions. **2013**. *J Parenter Enteral Nutr*. 37:460-81.
 - **Miranda HR**, Castro GP, Verdejo PH, Chiong M, Díaz-Araya G, Mellado R, Rojas D, Concepción R, Lavandero S. Estrés oxidativo e inflamación en insuficiencia cardíaca. Mecanismos de daño y alternativas terapéuticas. **2007**. *Rev Med Chile*. 135:1056-63.
 - **Mittal A**, Woodward B, Chandra RK. Involution of thymic epithelium and low serum thymulin bioactivity in weanling mice subjected to severe food intake restriction or severe protein deficiency. **1988**. *Exp Mol Pathol*. 48:226-35.
 - **Mohan M**, Taneja TK, Sahdev S, Mohareer K, Begum R, Athar M, Sah NK, Hasnain SE. Antioxidants prevent UV induced apoptosis by

- inhibiting mitochondrial cytochrome c release and caspase activation in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells. **2003**. *Cell Biol. Int.* 27:483-90.
- **Moi P**, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. 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 β -globin locus control region. **1994**. *Genetics*. 91:9926-30.
 - **Moore SE**, Fulford AJ, Wagatsuma Y, Persson LA, Arifeen SE, Prentice MA. Thymus development and infant and child mortality in rural Bangladesh. **2014**. *Int J Epidemiol.* 43:216-23.
 - **Mora RJ**. Soporte nutricional especial. **2002**. Edit. Panamericana. Tercera edición. Colombia. pp:75-79.
 - **Nagle D**, Dubey A, Agrawal BK. Study of serum electrolytes and proteins level in severe malnourished within 24 hours of admission (age group 6 month to 5 year). **2014**. *Int J Biol Med Res.* 5:4539-45.
 - **Nakagawa Y**, Nakajima K, Moore G, Moldéus P. On the mechanisms of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole and its metabolites. Induced cytotoxicities in isolated rat hepatocytes. **1994**. *Eur J Pharmacol.* 270:4-48.
 - **Nam KW**, Kim YH, Kwon HJ, Rhee SK, Kim WJ, Han MD. Tert-Butylhydroquinone reduces lipid accumulation in C57BL/6 mice with lower body weight gain. **2013**. *Arch Pharm Res.* 36:897-904.
 - **Nguyen T**, Nioi P, Pickett C. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **2009**. *J Biol Chem.* 284:13291-95.
 - **Nishino M**, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boiselle PM, Hatabu H. the thymus: a comprehensive review. **2006**. *RG.* 26:335-49.
 - **Niture SK**, Jaiswal AK. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. **2012**. *Biol Chem.* 23:9873-86.
 - **Okunade WG**, Olorunsogo OO. Effect of reactive oxygen species on the erythrocyte calcium-pump function in protein-energy malnutrition. **1992**. *Bioscience Rep.* 12:433-43.
 - **Oliveira CMB**, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas y dolor. **2011**. *Rev Bras Anestesiología.* 61:260-65.
 - **OMS**. Estadísticas Sanitarias Mundiales. **2011**. Organización Mundial de la Salud.
 - **OMS**. Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes de alimentos. 49° informe del comité mixto. FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios. **1999**. Roma, Italia.
 - **Ortiz MR**, Cortes ML, Gómez OJ, González TC, Cortés BE. Ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. **2000**. *Ciencia en la Frontera: Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ.* 1:77-84.
 - **Ortiz R**, Cortés E, González C, Pérez L, Betancourt M. Micronucleus frequency in spleen lymphocytes from severely malnourished rats during lactation. **1995**. *Environ Mol Mutagen.* 26:55-59.

- **Ortiz R**, Cortés E, Pérez L, González C, Betancourt M. Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. **1996**. *Med Sci Res*. 24:843-46.
- **Ortiz R**, Cortés L, González M. H, Gómez JL, González C and Cortés E. Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. **2001**. *Brit J Nutr* 86:545-48.
- **Ortiz R**, Cortés L, Medina H. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocytes subpopulations of rats. **2008**. *Clin Exp Immunol*. 155:96-106.
- **Parra SB**, Velásquez RC, Agudelo OG, Cardona HO, Bernal PC, Burgos HL, Morales MG, Betancur AM. El papel del hierro libre y el estrés oxidativo en la etiología del edema de los niños con kwashiorkor. **2005**. *Perspectivas en Nutrición Humana*. 14:49-76.
- **Parra-Gámez L**, Téllez-Girón J, Escobar-Briones C. La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. **2003**. Facultad de Medicina, UNAM. 46:32-6.
- **Pérez JA**, Gutiérrez HG, Vela GG, Flores GE, López PA. Efectos de la malnutrición en el aprendizaje y rendimiento escolar en niños preescolares en Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México. **2012**. *Lacandonia*. 6:99-102.
- **Pérez-Rojas JM**, Guerrero-Beltrán CE, Cruz C, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Pedraza-Chaverri J. Preventive effect of tert-butylhydroquinone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **2011**. *Food Chem Toxicol*. 49:2631-37.
- **Poli G**, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. **2004**. *Curr Med Chem*. 11:1163-82.
- **Prendergast AJ**, Rukobo S, Chasekwa B, Mutasa K, Ntozini R, Mbuya MN, Jones A, Moulton LH, Stoltzfus RJ, Humphrey JH. Stunting is characterized by chronic inflammation in Zimbabwean infants. **2014**. *PloS one*. 9:e86928.
- **Preston GA**, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA, Barrett JC. Induction of apoptosis by c-Fos protein. **1996**. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 16:211-18.
- **Prudhon C**. Evaluación y tratamiento de la desnutrición en situaciones de emergencia: manual de tratamiento terapéutico de la desnutrición y planificación de un programa nutricional. **2002**. Edit. Icaria. Barcelona, España. pp:28-47.
- **Qhihui-Cota L**, Valencia ME, Crompton DWT, Phillips S, Hagan P, Diaz-Camacho SP, Triana TA. Prevalence and intensity of intestinal parasitic infections in relation to nutritional status in Mexican schoolchildren. **2004**. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 98:653-59.
- **Raamsdonk JM**, Hekimi S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. **2012**. *PNAS*. 109:5785-90.

- **Reid M**, Badaloo A, Forrester T, Morlese JF, Frazer M, Heird WC, Jahoor F. In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in children with severe protein-energy malnutrition. **2000**. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278:405-12.
- **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. Valores de 8-hidroxi-2'desoxiguanosina y de peroxidación lipídica en pacientes con insuficiencia cardiaca. **2006**. *Rev Esp Cardiol.* 59:1140-45.
- **Rodríguez L**, González C, Flores L, Graniel J, Ortiz R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. **2005**. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12:502-07.
- **Rytter MJH**, Kolte L, Briend A, Friss H, Christensen VB. The immune system in children with malnutrition a systematic review. **2014**. *PLoS ONE.* 9:e105017.
- **Sablina AA**, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant functions of the p53 tumor suppressor. **2005**. *Nat Med.* 11:1206-13.
- **SAGARPA**. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. **2001**. Diario Oficial de la Federación México.
- **Sánchez RS**. El medio ambiente y su influencia en la adaptación de las especies. **2007**. *REDVET.* 8:12B.
- **Sánchez-Rodríguez MA**, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Núñez VM. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. **2004**. *Bioquímica.* 29:81-90.
- **Santos MJ**, Almada FC, Smalley MS. Interleuquina-6 en la regulación de la ingesta energética post-ejercicio físico. **2013**. *Rev Chil Nutr.* 40:174-80.
- **Sauerwein RW**, Mulder JA, Mulder L, Lowe B, Peshu N, Demacker PN, van der Meer JK, Marsh K. Inflammatory mediators in children with protein-energy malnutrition. **1997**. *Am J Clin Nutr.* 65:1534-39.
- **Savino W**, Dardenne M, Velloso LA, Silva BD. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **2007**. *Brit J Nutr.* 98:11-16.
- **Savino W**, Dardenne M. Micronutrients and immune system nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell mediated immune responses. **2010**. *Proc Nutr Soc.* 69:636-43.
- **Savitri T**, Neelam G, Poonam K. Serum cooper and zinc concentrations and their relation to superoxide dismutase in severe malnutrition. **2004**. *Eur J Pediatr.* 163:742-44.

- **Schaible UE**, Kaufmann SH. Malnutrition and Infection: complex mechanism and global impacts. **2007**. PLoS Med. 4:e115.
- **Scheller S**, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **2011**. Biochim Biophys Acta. 1813:878–88.
- **Schofield C**, Ashworth A. ¿Por qué siguen siendo tan altas las tasas de mortalidad por malnutrición grave?. **1997**. Pan Am J Public Health. 1:295-300.
- **Scrimshaw N**, Taylor C, Gordon J. interactions of nutrition and infection. **1968**. Monograph series N.37. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- **Serhan CN**, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O’Neill LAJ, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **2007**. FASEB J. 21:325–32.
- **Shahidi F**, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. **1992**. Crit Rev Food Nutr. 32:67-103.
- **Sies H**. Glutathione and its role in cellular functions. **1999**. Free Radic Biol Med. 27:916-21.
- **Simon J**. A Physiological Essay on the Thymus Gland. **1845**. London: H Renshaw. London. England.
- **Sive AA**, Subotzky EF, Malan H, Dempster WS, De V, Heese H. Red blood cell antioxidant enzyme concentrations in kwashiorkor and marasmus. **1993**. Ann Trop Pediatr. 13:33-8.
- **Stankov SV**. Definition of Inflammation Causes of Inflammation and Possible Anti-inflammatory Strategies. **2012**. Open Inflamm J. 5:1-9.
- **Steele ML**, Fuller S, Patel M, Kesaltis C, Ooi L, Münch G. Effect of Nrf2 activators on release of glutathione, cysteinylglycine and homocysteine by human U373 astroglial cells. **2013**. Redox Biology. 1:441-55.
- **Steffensen KR**, Gustafsson JA. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). **2004**. Diabetes. 53:S36-42.
- **Suematsu N**, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N. Oxidative Stress Mediates Tumor Necrosis Factor α -Induced Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction in Cardiac Myocytes. **2003**. Circulation. 107:1418-23.
- **Suzuki K**. Measurement of Mn-SOD and CuZn-SOD. En: Taniguchi N, Gutteridge J. experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. **2000**. Oxford University Press. R.U. 244:3855-63.
- **Sykiotis GP**, Habeos IG, Samuelson AV, Bohmann D. The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation. **2011**. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 14:41-48.
- **Tasset I**, Pérez-De La Cruz V, Elinos-Calderón D, Carrillo-Mora P, González-Herrera IG, Luna-López A, Königsberg M, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Ali SF, Túnez I, Santamaría A. Protective effect of

- tert-butylhydroquinone on the quinolinic-acid-induced toxicity in rat striatal slices: role of the Nrf2-antioxidant response element pathway. **2010**. *Neurosignals*. 18:24-31.
- **Tatli M**, Vural H, Koc A, Kosecik M, Atas A. Altered anti-oxidant status and increased lipid peroxidation in marasmic children. **2000**. *Pediatr Int*. 42:289-92.
 - **Thomas D.D.** Oxidative Stress. **2013**. en: *Encyclopedia of Biophysics*. Springer Berlin Heidelberg. pp:1813-18.
 - **Townsend DM**, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. **2003**. *Biomed Pharmacother*. 57:145-55.
 - **UNICEF**, WHO, WBG. Joint child malnutrition estimates - levels and trends. **2016**. New York, NY, USA: UNICEF; Geneva, GE, Switzerland: WHO; Washington, WA, USA: WBG.
 - **Valavidinis A**, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **2009**. *J Environ Sci Heal C*. 27:120-39.
 - **Valko M**, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **2004**. *Mol Cell Biochem*. 266:37-56.
 - **Vallabhapurapu S**, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **2009**. *Annual Review of Immunology*. 27:693-733.
 - **Varady J**, Gessner DK, Most E, Eder K, Ringseis R. Dietary moderately oxidized oil activates the Nrf2 signaling pathway in the liver of pigs. **2012**. *Lipids Health Dis*. 11:1-9.
 - **Venereo GJ**. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **2002**. *Rev Cubana Med Milit*. 31:126-33.
 - **Visconti R**, Cerutti J, Battista S, Fedele M, Trapasso F, Zeki K, Miano MP, de Nigris F, Casalino L, Curcio F, Santoro M, Fusco A. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkB p65 protein expression. **1997**. *Oncogene*. 15:1987-94.
 - **Walker SP**, Chang SM, Powell CA, Simonoff E, Grantham-McGregor SM. Early childhood stunting is associated with poor psychological functioning in late adolescence and effects are reduced by psychosocial stimulation. **2007**. *J Nutr*. 137:2464-69.
 - **Wang L**, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y. Purification of genomic DNA human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. **1994**. *Nucleic Acids Res*. 22:1774-75.
 - **Wang XJ**, Hayes JD, Higgins LG, Wolf CR, Dinkova-Kostova AT. Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and orthohydroquinones. **2010**. *Chem Biol*. 17:75-85.
 - **WHO**. Global Health Organization (GHO) data. Underweight in children. **2013**. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

- **Xiu-Qin L**, Chao J, Yan-Yan S, Min-Li Y, Xiao-Gang. Analysis of syntetic antioxidants and preventives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. **2009**. Food Chemistry. 113:692-700.
- **Yang H**, Qi H, Ren J, Cui J, Li Z, Waldum HL, Cui G Involvement of NF-kappaB/IL-6 pathway in the processing of colorectal carcinogenesis in colitis mice. **2014**. Int J Inflam. 2014:130981. doi:10.1155/2014/130981.
- **Young I**, Woodside J. Antioxidant in health and disease. **2001**. J Clin Pathol. 54:176-86.
- **Yu Y**, Wan Y, Huang C. The Biological Functions of NF-κB1 (p50) and its Potential as an Anti-Cancer Target. **2009**. Curr Cancer Drug Targets. 9:566-71.
- **Zhang Y**, Liu FF, Bi X, Wang S, Wu X, Jiang F. The antioxidant compound tert-butylhydroquinone activates Akt in myocardium, suppresses apoptosis and ameliorates pressure overload-induced cardiac dysfunction. **2015**. Sci Rep. 5:13005.
- **Zhao F**, Wu T, Lau A, Jiang T, Huang Z, Wang XJ, Chen W, Wong PK, Zhang DD. Nrf2 promotes neuronal cell differentiation. **2009**. Free Radic Biol Med. 47:867-79.
- **Zhu H**, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. **2005**. FEBS Lett. 579:3029-36.