



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFECTO DE LA RESTRICCIÓN
PROTEÍNICAMATERNADURANTE LA
GESTACIÓN SOBRE EL ESTRÉS
OXIDANTE EN PLACENTA E HÍGADO
FETAL DE RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARISELA ORTÍZ SÁNCHEZ

DIRECTORA: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

ASESOR: DRA. JUANA ROSADO PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2013



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna ORTÍZ SÁNCHEZ MARISELA con número de cuenta 40703168-3 de la carrera de Q. F. B. se le ha fijado el día 27 del mes de Noviembre de 2013 a las 13:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE DRA. ROSALINDA ESCALANTE PLIEGO
VOCAL* DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
SECRETARIO DRA. JUANA ROSADO PÉREZ
SUPLENTE Q.F.B. MARTHA P. OROZCO GÓMEZ
SUPLENTE M. en C. ROSA ELBA GALVÁN DUARTE

Handwritten signatures of the jury members on horizontal lines.

El título de la tesis que se presenta es: "Efecto de la restricción proteínica materna durante la gestación sobre el estrés oxidante en placenta e hígado fetal de rata"

Opción de titulación: Tesis Experimental

ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU" México, D.F. a, 30 de Octubre de 2013.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ DIRECTOR ZARAGOZA DIRECCION

RECIBI: OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo Bo. DRA. MARTHA A. SANCHEZ RODRIGUEZ JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

Dedicatorias

- ❖ A mi mamá, Virginia Sánchez por ser una persona excepcional, digna de la más grade admiración y el pilar más importante de mi vida, este logro es suyo.
- ❖ A mis hermanos Antonio, Javier, Félix, Fernando, Primitivo, Pedro, Jaime, Horacio y Avelino por su apoyo, ejemplo, consejos y demostrarme que la vida es una lucha en la que nunca hay que rendirse.
- ❖ A mis amigos Cecilia, Rebeca, Maribel, Gaby, Casandra, Carla, Margarita, José Antonio, Juan Carlos, Omar, Carlos y Ricardo, por su apoyo siempre incondicional y por formar parte de mi vida.

Agradecimientos

- ❖ A ti señor Jesús por permitirme concluir una más de metas y acompañarme en este caminar.
- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa, por abrirme las puertas a una educación de calidad y alto nivel, que me ha convertido en la profesional que ahora soy.
- ❖ A la Dra. Elena Zambrano por darme la oportunidad y el honor de ser su alumna desarrollando el presente trabajo, bajo su asesoría y guiarme durante esta experiencia con sus conocimientos y paciencia.
- ❖ A la Dra. Juana Rosado, por su interés y atenciones durante mi estancia en la FES Zaragoza así como en la realización de este trabajo.
- ❖ A los profesores del jurado por el tiempo prestado en la revisión de esta tesis: Dra. Rosalinda Escalante, M. en C. Rosa Elba Galván y la Q.F.B. Martha Orozco.
- ❖ A la Dra. Claudia Vega así como a la Dra. Gpe. Leticia Rodríguez y el M. en C. Carlos Alberto Ibáñez por su apoyo en el desarrollo de algunas de las técnicas analíticas de este proyecto, por su amabilidad, conocimientos y experiencia compartidos durante mi estancia en el laboratorio del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 ORÍGENES DEL DESARROLLO DE LA SALUD Y LA ENFERMEDAD	4
3.2. GESTACIÓN	6
3.3 RECOMENDACIONES NUTRICIONALES DE PROTEÍNA EN LA GESTACIÓN	7
3.4 RESTRICCIÓN PROTEÍNICA MATERNA DURANTE LA GESTACIÓN	9
3.5 HÍGADO	11
3.6 PLACENTA	12
3.7 ESTRÉS OXIDANTE	13
3.8 IMPORTANCIA DE LA PLACENTA EN LA PROGRAMACIÓN	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 GENERAL	25
5.2 PARTICULARES	25
6. HIPÓTESIS	25
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	26
7.1 TIPO DE ESTUDIO	26
7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.	26
7.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	26
7.4 VARIABLES	27
7.5 METODOLOGÍA	27

7.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
8.	RESULTADOS	41
8.1	PARÁMETROS DE LAS RATAS MADRE A LOS 19 dG	41
8.2	PESO DE LA PLACENTA Y DEL FETO A LOS 19 dG	42
8.3	PARÁMETROS DE EOx EN PLACENTA A LOS 19 dG	42
8.4	PARÁMETROS DE EOx EN HÍGADO FETAL A LOS 19 dG	43
9.	DISCUSIÓN	49
10.	CONCLUSIÓN	56
11.	PERSPECTIVAS	57
12.	ANEXOS	58
A.	FUNDAMENTO DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	58
B.	FUNDAMENTO DE LA DETERMINACIÓN DE MDA (TBARS)	58
C.	FUNDAMENTO: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOD	59
D.	FUNDAMENTO: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GPx	60
13.	BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 3-1 Proceso por el cual condiciones ambientales durante etapas críticas del desarrollo conducen a cambios permanentes en la estructura y función del tejido. (Modificado de Lucas 1991) (18).	5
Fig. 3-2 A) Ingesta de comida de la rata madre. B) peso corporal durante la gestación. Media±E.E.M. (Modificado de Ôta y Yokoyama 1967) (37).	8
Fig. 3-3 Representación esquemática de la ganancia de reservas energéticas y corporales de la rata gestante, reportada por Naismith (1960) y la ganancia del peso fetal, (modificado de los datos de Beaton, Beare, Ryu y McHenry 1954) (38).	9
Fig. 3-4 Principales vías de generación de ERO. El $O_2^{\bullet-}$ puede ser generado por enzimas como la XOD, Lipoxigenasa y la NADPH oxidasa o como un subproducto del metabolismo celular en cadena de transporte de electrones mitocondrial. La Cu / Zn y Mn SOD, convierte el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , que es eliminado rápidamente del sistema, generalmente la GPx, que utilizan GSH como el donador de electrones, de no ser así se forma el radical HO^{\bullet} y se da el daño a membranas. (Modificado de Mistry H. 2011) (75).	14
Fig. 3-5 Respuestas adaptativas placentarias y programación fetal, (modificado de: Myatt 2006) (7).	21
Fig. 3-6 Posibles mecanismos de la programación de desarrollo en respuesta a la sobrealimentación materna, (modificado de Alfara 2011) (92).	22
Fig. 7-1. Descripción de los grupos experimentales en línea de tiempo.	28
Fig. 7-2 Presentación de dieta control	31
Fig. 7-3 Presentación de dieta restringida	31
Fig. 7-4 Diagrama empleado en la cuantificación de proteína por el método de Bradford.	34
Fig. 7-5 Diagrama para la cuantificación de Malonaldehído (MDA) a través de la reacción de TBARS.	36
Fig. 7-6 Diagrama para la cuantificación de actividad enzimática de SOD, utilizando el kit comercial RANSOD.	38
Fig. 7-7 Diagrama empleado en la cuantificación de la actividad enzimática de GPx, utilizando el kit comercial RANSEL.	39
Fig. 8-1 Efecto de la dieta restringida en la curva de ganancia de peso materno en ratas a los 19 dG.	44
Fig. 8-2 Efecto de la dieta en la concentración de MDA en suero materno de rata con 19 dG.	45
Fig. 8-3 Análisis de MDA, SOD y GPx en homogeneizado de placenta a los 19dG.	47
Fig. 8-4 Análisis de MDA, SOD y GPx en homogeneizado de hígado a los 19dG.	48
Fig. 12-1 Formación del aducto TBA-MDA-TBA por la reacción del MDA y el TBA a altas temperaturas y condiciones ácidas.	59
Fig. 12-2 Inhibición de la formación del rojo formazán por la enzima SOD	59
Fig. 12-3 La enzima GPx cataliza la reacción de los hidroperóxidos lipídicos a sus alcoholes correspondientes o bien la reducción del peróxido de hidrógeno libre a agua, con la concomitante oxidación del NADPH a $NADP^+$.	60

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 7- 1 Composición Nutricional de las Dietas	29
Cuadro 7- 2 Formulación de la dieta control y dieta restringida proteínicamente	30
Cuadro 7-3 Elaboración de la Curva Estándar para SOD	37
Tabla 8-1 Pendientes de la curva ganancia de peso durante la gestación	44
Tabla 8-2 Características maternas a los 19 dG	45
Tabla 8-3 Peso de la placenta y del feto a los 19 dG de ratas Wistar	45
Tabla 8-4 Análisis de MDA, SOD y GPx en homogeneizado de placenta	46
Tabla 8-5 Análisis de MDA, SOD y GPx en homogeneizado de hígado	46

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AGPI	Ácido Graso Poliinsaturado
ANOVA	Análisis de Varianza
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BSA	Suero de Albúmina Bovina
C	Grupo Control
CAT	Catalasa
DCyTA	Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
dG	Días de Gestación
DIEB	Departamento de Investigación Experimental y Bioterio
DOHaD	Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad
EEM	Error Estándar de la Media
EOx	Estrés Oxidante
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GPx o GSH-Px	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GS-SG	Glutación disulfuro
H	Hembras
4-HNE	4-hidroxi-2 nonenal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
I.N.T	2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio
IUGR	Restricción del Crecimiento Intrauterino
LPO	Lipoperóxidos
M	Machos
MDA	Malonaldehído
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato en su forma reducida
NADPH oxidasa	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
•OH	Radical hidroxilo

R	Grupo Restringido
RL	Radicales libres
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución Salina Isotónica
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas de ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
XOD	Xantina oxidasa

1. RESUMEN

Muchas son las investigaciones epidemiológicas y experimentales que han examinado el efecto de la restricción proteínica materna durante la gestación, sin embargo pocos son los estudios que han considerado el impacto sobre el estrés oxidante (EOx) en placenta e hígado fetal, así como la influencia del sexo del feto como un posible factor que predisponente a un mayor efecto del EOx. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la restricción proteínica durante la gestación sobre el EOx en el suero materno, placenta e hígado de fetos de rata Wistar. Las ratas preñadas de 120 días de edad, fueron alimentadas durante 19 dG (días de gestación) con dietas isocalóricas basadas en un contenido de proteína del 20.3%_(p/p) para el grupo control (C) y 10.15%_(p/p), para el grupo restringido (R); a los 19 dG el suero materno, placentas e hígados fetales fueron recolectados. Al suero materno se le determinó malonaldehído (MDA). A las placentas e hígado fetales se les cuantificó MDA y la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx o GSH-Px). El grupo R vs C presentó placentas menos pesadas, mayor concentración de MDA y más alta actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx ($P < 0.05$). Las placentas de fetos hembra (H) del grupo R presentaron mayor concentración de MDA, y mayor actividad de SOD Y GPx vs los machos (M) del mismo grupo y el grupo C. Los hígados correspondientes a los fetos H del grupo R presentaron mayor concentración de MDA y actividad enzimática de GPx vs M del mismo grupo y el grupo C ($P < 0.05$). Los resultados obtenidos durante este trabajo sugieren que la restricción proteínica materna durante la gestación conlleva a la disminución del peso de las placentas y a un incremento en el daño oxidante en la madre así como en la placenta y el hígado fetal, lo cual sugiere al EOx como un posible mecanismo de programación negativa en el desarrollo del feto. Asimismo se sugiere al sexo femenino durante la gestación como un factor asociado a mayor daño causado EOx tanto en la placenta como en el hígado fetal.

2. INTRODUCCIÓN

Los efectos adversos de la desnutrición materna durante el embarazo en las madres y sus descendientes constituyen un gran problema de salud pública, especialmente en los países en desarrollo como lo es México. Es por ello que se siguen haciendo esfuerzos en la investigación en este tipo de desnutrición, su impacto en las crías y los mecanismos por los cuales impacta.

Estudios sobre la restricción proteínica materna durante la gestación apoyan que es uno de los principales factores que afectan la programación del desarrollo; por lo cual ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones en modelos animales que han mostrado numerosos hallazgos, por ejemplo la alteración del metabolismo de glucosa e insulina en las crías, en el cual se ha visto implicado el estrés oxidante (EOx), factor importante que puede alterar la función placentaria en cualquier periodo de la gestación y ha emergido como un probable promotor de varios desórdenes relacionados con la gestación.

Por lo cual el siguiente trabajo fue realizado con el fin de evaluar el efecto de la restricción proteínica durante la gestación sobre el EOx en el suero materno, placenta e hígado fetal, utilizando como modelo biológico a la rata Wistar, con la correspondiente cuantificación de MDA y de la actividad de SOD y GPx, del cual no se tiene precedente.

3. MARCO TEÓRICO

La desnutrición materna durante el embarazo en las madres y sus descendientes constituyen un gran problema de salud pública, especialmente en los países en desarrollo (1). Según la última encuesta de ENSANUT 2012, en México el 18% de las embarazadas fueron clasificadas como anémicas, así como el 17% de las mujeres en edad reproductiva; teniendo una mayor prevalencia en áreas rurales que en las urbanas (2).

La morbilidad fetal y de la descendencia, asociada a esta pobre nutrición materna durante el desarrollo, es un problema preocupante de salud a nivel global que predispone a la descendencia a desarrollar enfermedades en su vida adulta (3), o bien a la “programación del desarrollo”, proceso mediante el cual un estímulo o reto establece una respuesta permanente (4).

La restricción proteínica materna durante la gestación, es un reto que afecta la programación del desarrollo (5); razón por la cual ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones en modelos animales, que han mostrado numerosos hallazgos como se muestra más adelante y algunos de los de los cuales se han visto implicados con el estrés oxidante (EOx) (6). Por lo que este reto aplicado en la gestación podría tener un efecto subsecuente en la función de la placenta, la cual tiene una posición clave y directa en la programación fetal y por tanto en el crecimiento y desarrollo fetal (7). Una de las patologías de la placenta asociadas a la programación del desarrollo es el EOx, ya que puede alterar la función de la placenta en cualquier periodo de la gestación y que ha emergido como un probable promotor de varios desordenes relacionados con la gestación (8).

Por lo que Myatt et al., sugieren que una baja o sobre nutrición, exposición inapropiada en el desarrollo a señales de estrés, isquemia/reperfusión, EOx y/o nitrante afectan la función de la placenta y por tanto el crecimiento fetal y el desarrollo (9).

3.1 ORÍGENES DEL DESARROLLO DE LA SALUD Y LA ENFERMEDAD

Existen estudios epidemiológicos en condiciones adversas, que correlacionan el estrés intrauterino con los problemas que sobrevienen en la vida adulta de la prole; este tipo de estudios demostraron la influencia nutricional materna durante el embarazo como factor dominante en la programación fetal (10), (11).

Uno de los primeros estudios de este tipo fue el realizado al “ invierno hambriento holandés (1944-1945)”, en el que se demostró que la desnutrición presentada en la primera mitad del embarazo, conllevaba a un incremento en la adiposidad y a la alta probabilidad de ser obeso; todo lo contrario se observó cuando esta exposición ocurrió en la segunda mitad de la gestación (12). Otra ciudad que sufrió la ocupación alemana fue Leningrado, donde los niños sobrevivientes, al llegar a la vida adulta tuvieron una mayor susceptibilidad a enfermedades coronarias (13).

Aunado a esto, Barker et al. 1986 encontraron manifestaciones que correlacionaban el bajo peso al nacimiento y el riesgo a enfermedades coronarias en la vida adulta (14); lo que dio el inicio a varios estudios epidemiológicos encaminados a identificar la relación que existe entre la talla y peso del neonato con la hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, obesidad, dislipidemias e intolerancia a la glucosa (11), (15), llegando así al concepto de “Programación del Desarrollo” en el que se postula que la enfermedad cardiovascular y la *diabetes mellitus* no insulino dependiente se originarían como mecanismo de adaptación del feto ante la malnutrición.

En 1992 Hales y Barker retoman la idea de Neel planteada en 1962 (16) y proponen el término “fenotipo ahorrador” sugiriendo que cuando el medioambiente intrauterino es sub-óptimo, se desencadena una respuesta adaptativa en el feto que optimiza el crecimiento de órganos clave a expensas del crecimiento de otros provocando alteraciones en el metabolismo posnatal del individuo (17).

Lo que da origen en la actualidad a la Hipótesis de los “Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad” (*DOHaD, por sus siglas en inglés*), proponiendo que la fisiología y metabolismo fetal y neonatal pueden ser alterados por cambios durante un periodo crítico, como es la gestación y la lactancia, vulnerable a condiciones sub-óptimas. Estas alteraciones generan una respuesta fisiológica permanente en el feto manifestándose con modificaciones en la estructura y fisiología de órganos (Fig. 3-1), (18), así como en la expresión de genes involucrados en su propio metabolismo que se asocian con el desarrollo de enfermedades en el adulto (4), (19), (20).

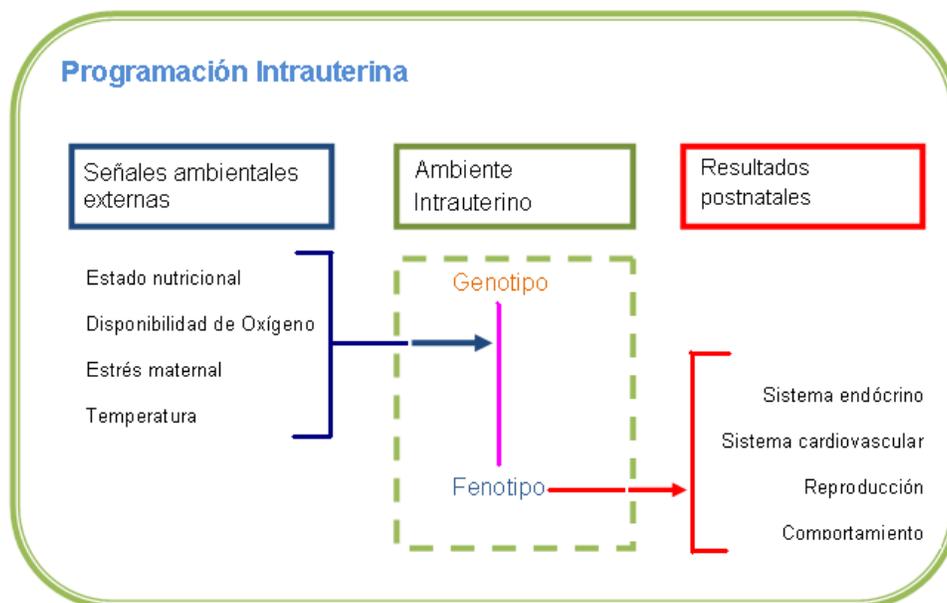


Fig. 3-1 Proceso por el cual condiciones ambientales durante etapas críticas del desarrollo conducen a cambios permanentes en la estructura y función del tejido. (Modificado de Lucas 1991) (18).

Dicha hipótesis ha sido bien aceptada gracias a una serie de Investigaciones científicas tanto en humanos como en animales de experimentación, que la respaldan ya que han demostrado que la salud y la enfermedad están íntimamente relacionadas con la calidad de vida en las primeras etapas del crecimiento (gestación y lactancia), haciendo denotar que el fenotipo del adulto es el producto de los genes, así como del ambiente pre-posnatal (21).

Dentro de los factores principales que afectan la programación del desarrollo están: la exposición fetal a concentraciones altas de glucocorticoides (22), diabetes gestacional (23), alcoholismo (24), restricción del flujo sanguíneo a nivel uterino (25), restricción global de nutrientes (26) y exposición materna a una dieta isocalórica baja en proteínas (5).

Todo lo anterior encuentra apoyo en diversas investigaciones experimentales en ratas, cerdos, ovejas, caballos y primates, donde se plantea la programación metabólica del individuo en etapas tempranas del desarrollo, abordando variables como el funcionamiento de la placenta, flujo de la sangre uterina, hipoxia materna y limitación de energía y proteína materna con la consecuente limitación en el feto. De estos modelos la desnutrición materna es el paradigma que más se ha utilizado para inducir alteraciones en el metabolismo (27), (28).

3.2. GESTACIÓN

Se entiende como gestación a la secuencia de procesos que comienzan con la fecundación, continúa con la implantación y el desarrollo embrionario y fetal, hasta terminar normalmente con el nacimiento (29); con una duración de 21 a 22 días en la rata, las cuales son multíparas (varios embriones se desarrollan al mismo tiempo) (30).

3.2.1 Estados fisiológicos de la gestación y sus demandas nutricionales

La gestación puede dividirse en tres estados fisiológicos principales: implantación, organogénesis y crecimiento (31).

El paso de mórula a blastocisto se da alrededor del cuarto día después del apareamiento y al quinto día este comienza a adherirse el epitelio de los cuernos uterinos, dándose así la implantación, al mismo tiempo que comienza la

decidualización de las células estromales en el sitio de implantación (30), (32). Los nutrientes que proporcionan las secreciones de las glándulas uterinas pasan directamente al óvulo fertilizado y se desarrolla el embrión (31).

La gestación es un estado activo y dinámico en la que el crecimiento del feto se da en tres fases: La primer fase corresponde a los dos primeros tercios de la misma, con el objetivo principal del desarrollo embrionario conocido como organogénesis o embriogénesis, donde existe una hiperplasia (aumento de células en número) siendo dominantes la diferenciación y la formación de órganos, en esta etapa el feto obtiene sus nutrientes de la sangre materna, necesitando aportes suficientes de folato y vitamina B₁₂ (31).

En la siguiente fase continúa la replicación celular con hipertrofia (aumento de tamaño celular) donde existe rápido crecimiento, lo que requiere aportes suficientes de aminoácidos y vitamina B₆. En la fase final predomina la hipertrofia, mientras cesa la división y se da la maduración de órganos (31).

3.3 RECOMENDACIONES NUTRICIONALES DE PROTEÍNA EN LA GESTACIÓN

La nutrición es el conjunto de procesos químicos que realiza un organismo digiriendo, absorbiendo y utilizando los nutrientes contenidos en los alimentos para su requerimiento, mantenimiento y reparación, proceso que no se puede llevar a cabo sin una adecuada alimentación (33).

En las recomendaciones nutricionales de proteína durante la gestación de la rata, se mencionan concentraciones mínimas de un 15% (34), pero éstas son dietas purificadas con proteína altamente digestible como la lacto-albúmina. Estas concentraciones de proteína son demasiado bajas para los animales alimentados con dietas comerciales, con ingredientes naturales como harina de maíz, trigo y soya; por lo que la mayoría de dietas comerciales para rata en Norte América

hechas a base de ingredientes naturales contienen entre el 18% y 23% de proteína (32).

Otra dieta planteada para ratas gestantes es la hecha en base a la recomendación AIN-93 del American Institute of Nutrition (35) y las modificaciones hechas por nuestro grupo de trabajo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), con un contenido de proteína 20.3% _(p/p) y 4 Kcal/g (36).

El que la ingesta alimentaria se mantenga constante (figura 3-2a) y aun así se presente un aumento de peso durante la gestación (figura 3-2b) (37), se debe a que las proteínas y lípidos almacenados en periodos tempranos de la gestación subsidian el alto costo de las demandas energéticas en el último periodo de embarazo (38), (39), (40).

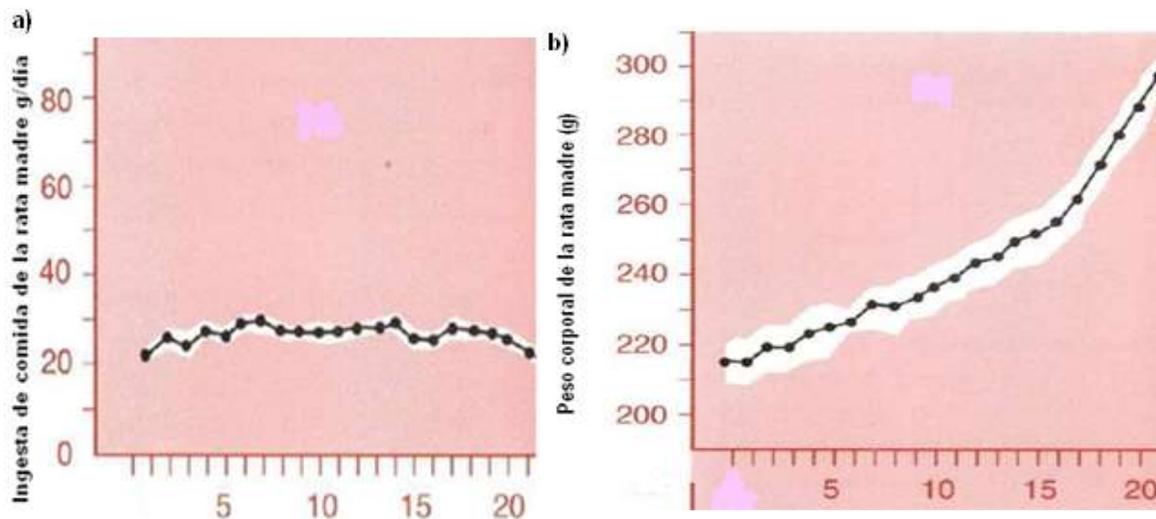


Fig. 3-2 A) Ingesta de comida de la rata madre. B) peso corporal durante la gestación. Media±E.E.M. (Modificado de Ôta y Yokoyama 1967) (37).

Diversos estudios sugieren que la gestación consta de dos fases: la fase anabólica (del día 1-14 en la rata y los primeros dos tercios en la mujer) en la cual la madre

incrementa sus reservas tanto de proteínas como lípidos, lo que ocurre en presencia de una intensa hiperplasia y de una hiperinsulinemia materna aunque la glucemia se encuentre inalterada, el crecimiento fetal y sus requerimientos metabólicos son mínimos; la segunda fase es catabólica (comprendida del día 15-21 en la rata y en la mujer en último trimestre), en la cual hay un crecimiento rápido del feto, por lo que las reservas son retiradas (Fig. 3-1) (41).

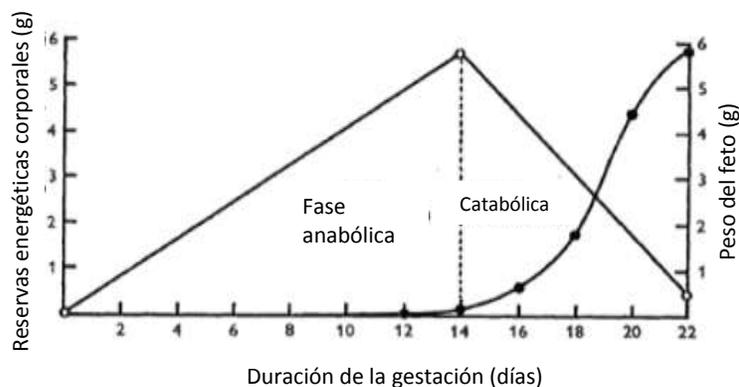


Fig. 3-3 Representación esquemática de la ganancia de reservas energéticas y corporales de la rata gestante, reportada por Naismith (1960) y la ganancia del peso fetal, (modificado de los datos de Beaton, Beare, Ryu y McHenry 1954) (38).

3.4 RESTRICCIÓN PROTEÍNIC MATERNA DURANTE LA GESTACIÓN

La malnutrición es un término general que denota tanto desnutrición como sobre nutrición, donde la primera se produce cuando la ingesta de energía es inferior al gasto energético total, durante un período de tiempo considerablemente prolongado, lo que lleva a una pérdida de peso clínicamente importante (31).

La desnutrición calórico-proteínica es un estado clínico-patológico que se presenta cuando la dieta no es capaz de satisfacer las necesidades corporales de proteínas y/o energía; la predominación de la deficiencia de proteínas puede conducir al síndrome clínico del Kwashiokor (1).

La nutrición antes y durante la gestación y la lactancia tiene un efecto significativo a largo plazo en la salud de las crías y de sus madres, pero el impacto potencial de la nutrición es mayor en la gestación que durante cualquier otra etapa de la vida, ya que en ésta existen periodos críticos, vulnerables a condiciones subóptimas como la organogénesis y el crecimiento fetal.

La restricción proteínica materna durante la gestación es uno de los principales factores que afectan la programación del desarrollo (5); razón por la cual ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones en modelos animales que han obtenido numerosos hallazgos, por ejemplo en estudios realizados en ratas madre sometidas a este modelo se encontraron diferentes efectos en el peso al nacimiento de las crías incluyendo un decremento (19), (42), (43), sin cambios (21) (44), o incremento (45), que muchos atribuyen al nivel de restricción proteínica y/o compensación de carbohidratos en una dieta isocalórica.

En modelos de ratas sometidas a una dieta isocalórica restringida proteínicamente durante la gestación, han reportado la inhibición de la insulina placentaria, asociado con una baja regulación de transportadores de aminoácidos en la placenta (46), por otra parte se ha hallado la reducción de la vascularización, así como de células beta en las crías (47), mismas que presentan hipertensión e intolerancia a la glucosa en la vida adulta (48), (49). La alteración del metabolismo de glucosa e insulina en las crías de ratas sometidas a restricción proteínica, que se han visto implicadas con el EOx (6) y la programación negativa en el comportamiento de las crías macho adultas (50), así como la afectación del desarrollo cerebral fetal por cambios en el metabolismo de lípidos del hígado materno (51).

Otras variantes de este modelo, como es la a restricción calórico –proteínica en ratas se ha establecido un cambio en la adipogénesis de las crías. (1), así como alteraciones en el crecimiento de algunos órganos, protegiendo en cierto grado el desarrollo de órganos esenciales como el cerebro o pulmones a expensas de órganos viscerales como el hígado, páncreas, músculo y bazo (52), también se ha

encontrado cambios permanentes de enzimas hepáticas claves en la glucólisis y gluconeogénesis (52).

En cobayos con restricción proteínica materna severa durante la gestación, han hallado que las crías desarrollan polifagia, obesidad, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e hipertensión en la vida adulta (53), (54), (55). La dieta materna desbalanceada en rata durante periodos tempranos de la gestación causa bajo peso al nacimiento y en periodos tardíos efectos en la proporción corporal del feto y poco efecto sobre el peso al nacimiento (56).

Por otra parte estudios realizados con ovejas de 8 meses, restringidas nutricionalmente han reportado falla de células beta (57); estos son únicamente algunos de los resultados que se han obtenido a partir de este modelo nutricional, planteando por último que la restricción proteínica materna durante la gestación es un factor que modifican permanente los centros principales hipotalámicos de la regulación alimenticia (58), (59).

3.5 HÍGADO

Este es un importante órgano que regula el metabolismo, sintetiza muchas proteínas (enzimas) y otras moléculas, almacena ciertas vitaminas, hierro y degrada o inactiva determinadas hormonas, fármacos y toxinas. Regula el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y desempeña un papel decisivo en el metabolismo de proteínas, ya que en él se sintetizan los aminoácidos no esenciales, así como las proteínas plasmáticas importantes y es el principal depósito para el hierro y vitaminas A, D y B₁₂ (60).

La sangre del feto llega a este órgano a través de dos arterias umbilicales, originadas de las arterias ilíacas internas y retorna a este mediante una única vena umbilical que drena en la vena hepática (61).

En estudios recientes realizados en hígado de embrión de humano se observó el aumento de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) con base a la progresión de la edad gestacional, así como alta actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx o GSH-Px) (62), debido a que el hígado es el sitio de varias reacciones de detoxificación en el cuerpo que aparece al iniciar el funcionamiento de la vida fetal temprana (62).

3.6 PLACENTA

La placenta es un órgano temporal, especializado, que se encuentra sólo en mamíferos y es fundamental para la gestación (63), en la rata y el humano es discoidal, circunscrita y se limita a una zona determinada de la vesícula embrionaria (32). Ambas especies poseen una placentación hemocorial, donde la sangre materna entra en contacto directo con el corion fetal, lo que puede proveer de un mejor transporte de nutrientes, pero pone en desventaja al sistema inmune (64).

La placenta ejerce tres funciones principales: metabolismo, producción de hormonas e intercambio de sustancias incluido el oxígeno (63). Los elementos básicos de la nutrición del feto son glucosa, aminoácidos, lípidos, agua, iones y vitaminas (65), (66). Cada uno de estos componentes atraviesa la placenta por distintos mecanismos ya sea por difusión simple, difusión facilitada, transporte activo y endocitosis. La membrana placentaria no es atravesada por proteínas y péptidos más pequeños, pero sí por aminoácidos, algunos por transporte activo. En etapas tempranas del embarazo la placenta realiza síntesis de colesterol, ácidos grasos y glucógeno, sustancias importantes para la nutrición del feto (63). En cuestiones hormonales sustituye al cuerpo lúteo (que involuciona) en la secreción de progesterona, además secreta inhibidores estrogénicos para inhibir el desarrollo folicular y la ovulación. Estos fenómenos dependerán directamente del propio estado nutricional de la madre (67), dado que la integridad funcional de la placenta

requiere la producción de energía adicional porque su metabolismo puede ser igual al del feto.

Las propiedades intrínsecas de la placenta como el tamaño, estructura, superficie de intercambio, grado de vascularización y abundancia de transportadores específicos para distintas moléculas y síntesis de hormonas así como las extrínsecas nutrición materna y flujo sanguíneo uterino son determinantes en su función (68).

3.7 ESTRÉS OXIDANTE

Una consecuencia inevitable de la respiración aeróbica es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), cuya sobreproducción y/o un decremento en la capacidad antioxidante (69) conduce a un estado de disfunción metabólica denominado EOX, causando alteración en la homeostasis por medio de la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos, nucleótidos y por la acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, toxicidad y apoptosis (70). Un estado de EOX está integrado por sistemas generadores de radicales libres (RL), como pueden ser ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (70).

Los RL son especies químicas que tienen un electrón no apareado, que las habilita como fragmentos moleculares muy reactivos con una vida media de nanosegundos (71); los cuales en cantidades adecuadas son esenciales en una amplia variedad de funciones celulares (72).

Todos los RL de oxígeno son ERO, pero no todas las ERO son RL de oxígeno (70); ambas especies químicas son capaces de aceptar electrones de otras moléculas de su entorno (agentes oxidantes) y por tanto generar reacciones en cadena (73). Su producción endógena se da por la reducción incompleta del oxígeno molecular en la vía univalente en el metabolismo celular, o ya sea por la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) (70), acción del citocromo

P-450, reacción de ERO con los metales de transición, por el complejo enzimático Xantina deshidrogenasa/Xantina oxidasa (XOD), metabolismo de células defensivas y como un subproducto del metabolismo celular en cadena de transporte de electrones mitocondrial (74), (75) (figura 3-4).

La lipoperoxidación de la membrana es un fenómeno que se da cuando un radical de elevada reactividad como es el radical hidroxilo (HO^\bullet), extrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (AGPI) para producir el radical lipídico, el cual se reorganiza y forma un dieno conjugado que en su reacción con el O_2 da lugar al radical peróxilo con reactividad suficiente como para atacar otro fosfolípido y conducir a la propagación de la reacción radicalaria (76).

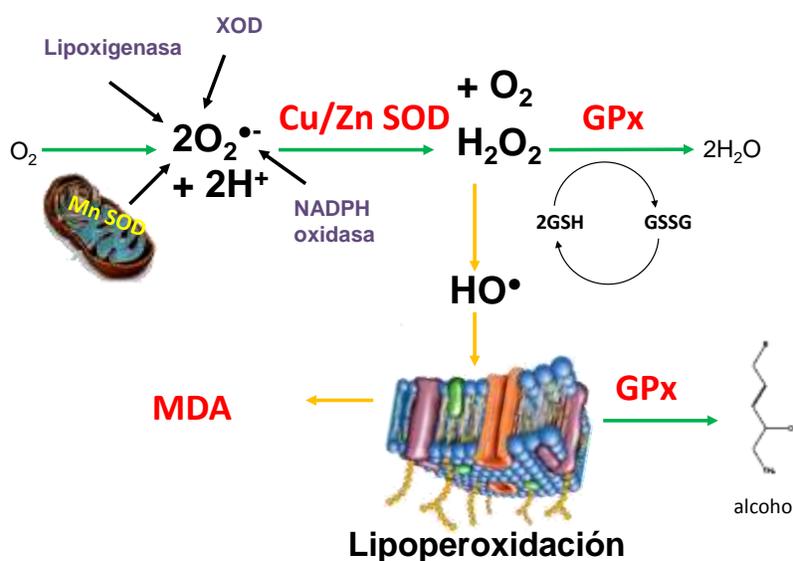


Fig. 3-4 Principales vías de generación de ERO. El $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede ser generado por enzimas como la XOD, Lipoxigenasa y la NADPH oxidasa o como un subproducto del metabolismo celular en cadena de transporte de electrones mitocondrial. La Cu / Zn y Mn SOD, convierte el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , que es eliminado rápidamente del sistema, generalmente la GPx, que utilizan GSH como el donador de electrones, de no ser así se forma el radical HO^\bullet y se da el daño a membranas. (Modificado de Mistry H. 2011) (75).

Los lipoperóxidos (LPO) (Fig. 3-4) y sus productos de degradación como el malondialdehído o malonaldehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos son altamente tóxicos. Este fenómeno es líder en cambios en la permeabilidad y pérdida de la

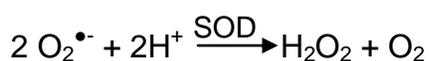
integridad de la membrana que puede resultar en la disfunción o destrucción celular con daño al tejido (72).

3.7.1 Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia que disminuye la generación de productos oxidados en reacciones de RL o bien un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción (77). Estos pueden ser divididos en enzimáticos y no enzimáticos.

Las defensas antioxidantes enzimáticas evitan la reducción univalente del oxígeno (78) e inactivan por diferentes mecanismos a las ERO; tal es el caso de:

La SOD, primera enzima en la línea de defensa contra la toxicidad del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Las SODs son un conjunto de metaloenzimas que pueden dividirse en tres familias filogenéticas: la CuZn-SOD o SOD 1 que es una proteína dimerica localizada esencialmente en el citoplasma, la Mn-SOD o SOD 2 proteína homotetramérica localizada en la mitocondria y la SOD extracelular ó SOD 3, glicoproteína tetramérica que contiene Cu (8). La reacción de dismutación de las SODs podría representarse de la siguiente manera:



En el caso particular de la placenta la MnSOD mitocondrial es débilmente expresada en el sincitiotrofoblasto pero muy intensamente en el endotelio vascular veloso, mientras que la CuZn-SOD es intensamente expresada en el estroma veloso, probablemente en las células de Hofbaver y ligeramente en el trofoblasto (69).

El control de la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el segundo paso enzimático que juega un rol vital contra la propagación de ERO. Las GPxs o GSH-

Pxs, son una familia de enzimas divididas en dos grupos: selenio independiente y selenio dependiente presentes en el citoplasma y la mitocondria (8); proporciona protección mediante la reducción de hidroperóxidos lipídicos a sus alcoholes correspondientes y la reducción del peróxido libre a agua, con la concomitante oxidación del glutatión (GSH) a glutatión disulfuro (GS-SG).



Las formas encontradas en vertebrados son: GPx1 (celular y citosólica), GPx2 (citosólica gastrointestinal), GPx3 (plasmática) y GPx4 (hidroperóxido fosfolipídica); donde su regulación es alterada en función del oxígeno, la diferenciación de células y maduración de tejidos. Las presentes en la placenta son GPx1, GPx3 y GPx4 (69).

La Catalasa (CAT), es una metaloproteína tetramérica que contiene 4 subunidades y cada una contiene un grupo hemo. Se localiza en los peroxisomas (73), mitocondria y se ha observado en el citoplasma del eritrocito. Existen varias isoformas, la mayoría presentan hierro en su sitio activo (grupo hemo), pero algunas poseen manganeso (74). La reacción química en la que interviene la CAT removiendo el H_2O_2 es:



Por otra parte se encuentran los antioxidantes no enzimáticos de los cuales algunos son: el GSH, minerales como el selenio y zinc, vitaminas como riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (vitamina E); los cuales son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes o como antioxidantes secundarios (78).

3.7.2 Estrés oxidante en la gestación

El embarazo es un estado fisiológico donde se forman dos productos, la placenta y el feto, lo cual exige una demanda energética elevada y un incremento en los requerimientos de oxígeno, dando lugar a un estado de EOx que surge por la intensa actividad mitocondrial de la placenta y por consecuente aumento en la producción ERO, siendo así que aún en el embarazo normal se podría esperar un aumento de la carga pro-oxidante (79).

La vida perinatal es uno de los periodos de mayor plasticidad especialmente sensible a factores de estrés (80), (81), donde la placenta humana y el feto son también vulnerables a la toxicidad de las ERO, resultando en un número de enfermedades obstétricas y complicaciones en embarazos (62).

3.7.2.1 Estrés oxidante y desarrollo de la defensa antioxidante en el embrión

La gestación requiere de una cierta cantidad de EOx para permitir un adecuado crecimiento embrionario y fetal (82), por lo que un equilibrio entre fuerzas oxidantes y reductoras permite la progresión normal de la organogénesis, el crecimiento y desarrollo del feto (83). Para lograrlo la unidad feto-placentaria en el primer trimestre en humanos, utiliza vías metabólicas que implican azúcares no fosforilados que no requieren altos niveles de oxígeno para funcionar de manera óptima. La ventaja de tal sistema es que se puede proteger contra los efectos teratogénicos de ERO en este período vulnerable del desarrollo del embrión (84), pero una vez que la circulación sanguínea es establecida, el embrión es expuesto a altas concentraciones de oxígeno para lo cual desarrolla su mecanismo de defensa antioxidante, aumentando lentamente la actividad de las principales enzimas antioxidantes a lo largo de la gestación.

En las etapas de desarrollo embrionario, la actividad antioxidante es aparentemente la misma en todos los órganos. Sin embargo más tarde en el

desarrollo fetal, existen diferencias entre los distintos órganos en su capacidad antioxidante, siendo el hígado y el corazón los con una mayor capacidad antioxidante en comparación con otros órganos (85).

Lo anterior encuentra fundamento en estudios realizados por Hage y Sing los cuales mostraron que en embriones de ratón de 8 días de edad, la presencia de ARNm de SOD Cu/Zn, CAT y GSH-Px, así como su producción aumentada con la edad gestacional. Fenómeno similar fue observado por Khan y Negro en embriones de ratón y conejos donde la actividad de SOD, CAT Y GSH-Px aumentó con la edad embrionaria, alcanzando su punto máximo en el periodo neonatal (85), lo cual fue igualmente observado en embriones de ratas (86).

Esta inmadurez del mecanismo de defensa antioxidante parece predisponer al embrión en etapas tempranas a un alto riesgo de ataques oxidantes en proteínas, ADN y membranas lipídicas por ERO. Siendo así que cuando existe desbalance oxidante ya sea por la producción de ERO y/o ERN (85) el feto puede ser dañado, especialmente durante la organogénesis temprana. Puesto que la mayoría de las ERO son permeables a la membrana pueden atravesar la placenta hacia el feto (62).

Algunos autores hacen notar que las ERO, al ser altamente reactivas tienen una vida útil muy corta de nanosegundos, por lo tanto no se transfieren al embrión en desarrollo o al feto. Razón por la cual se plantea que las ERO embrionarios no son de origen materno y cada que se incrementa en los embriones es a causa de cambios metabólicos embrionarios que provocan una mayor producción de estos (85). Estos cambios metabólicos pueden ser iniciados por varios metabolitos maternos.

Inicialmente cuando un órgano se encuentra bajo EOx, la actividad de las enzimas antioxidantes y las concentraciones de antioxidantes de bajo peso molecular incrementa. Sin embargo ya que el EOx continua hay un agotamiento de los

antioxidantes de bajo peso molecular y la reducción de la actividad enzimática, lo que puede llevar a lesiones en el embrión en desarrollo, retraso del crecimiento, anomalías o la muerte (87), (86).

3.7.2.2 Estrés oxidante en la placenta

Los ERO tales como el óxido nítrico y el $O_2^{\bullet-}$ producido en las células de la placenta pueden regular el desarrollo placentario y la función (69), así como el EOX puede regular la expresión de receptores de citocinas en las células del endotelio vascular, citotrofoblásticas y musculares lisas (85).

El daño oxidante temprano a las células trofoblásticas en el embarazo o durante el establecimiento de la circulación materna puede provocar la pérdida del producto (88). El borde membranar del conjunto de vellosidades del sincitiotrofoblasto es más susceptible a la lipoperoxidación de su membrana, dado a su exposición a la alta tensión de oxígeno del sistema vascular maternal. Investigaciones en placenta humana han demostrado un decremento en la lipoperoxidación con el progreso gestacional (88).

3.8 IMPORTANCIA DE LA PLACENTA EN LA PROGRAMACIÓN

Como ya se ha señalado la programación fetal ocurre cuando el patrón normal del desarrollo fetal es interrumpido por un reto aplicado en puntos críticos del desarrollo (7), (89). Un reto aplicado en la gestación puede tener un efecto subsecuente en la función de la placenta y por tanto en el crecimiento fetal y en el desarrollo (7). Retos aplicados en la placenta a diferentes tiempos podría dar diferentes efectos (9).

La placenta está en constante estado de crecimiento y diferenciación durante la primera mitad del periodo de gestación debido al desarrollo vascular y la diferenciación del trofoblasto (9). Además no es sólo un participante pasivo en el abastecimiento de nutrientes al feto, de hecho participa en su adaptación al ambiente materno y genera cambios tanto en estructura y función como resultado de un cambio en la oferta de sustrato y ambiente hormonal, por esto la placenta tiene una posición clave y directa en la programación fetal (7), además que efectúa roles clave como proveer una barrera inmune, transportar nutrientes, productos de desechos, sintetizar varios péptidos y hormonas esteroideas que tienen influencia fetal, materna y en la placenta (7).

Las patologías de la placenta asociadas a la programación del desarrollo son: IUGR, pre-eclampsia y diabetes, asociados con hipoxia, EOX y nitrato en la placenta (7). Numerosos estudios dan cuenta de alteraciones en las diferentes funciones de la placenta presentes en enfermedades del embarazo, poniendo de manifiesto el papel clave que tiene este órgano durante el desarrollo (90).

Se han realizado diversos estudios que apoyan lo anterior, ya que cambios en el patrón de señales hormonales en el desarrollo o de cantidades de sustrato transportados hacia el feto, alteran el desarrollo fetal (Fig. 3-5), lo que finalmente resulta en desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la vida adulta.

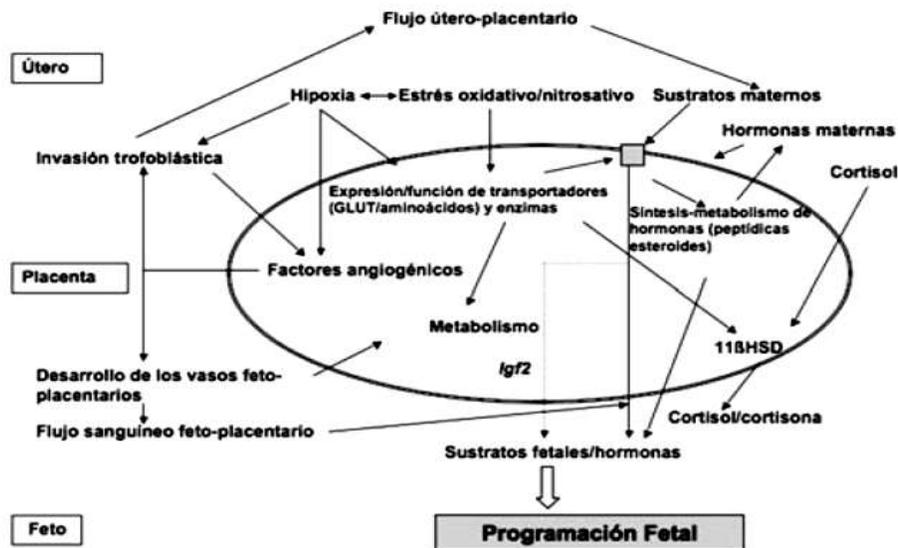


Fig. 3-5 Respuestas adaptativas placentarias y programación fetal, (modificado de: Myatt 2006) (7).

Actualmente se ha establecido modelos experimentales con ovejas, que evalúan el efecto de varios factores en el crecimiento fetal tales como: el exceso o privación de nutrientes maternos (57), incremento del número de fetos, genotipo materno y fetal (91). Dichas condiciones tienen efectos similares con el tamaño placentario, el aporte fetal del oxígeno y alimento, así como la disminución de la angiogénesis y flujo sanguíneo placentario.

El EOX constituye otro factor importante que puede alterar la función placentaria en cualquier periodo de la gestación. Las ERO si se producen a niveles altos pueden activar una variedad de vías de señalización que pueden afectar negativamente el desarrollo (92), (83) (Fig. 3-6).

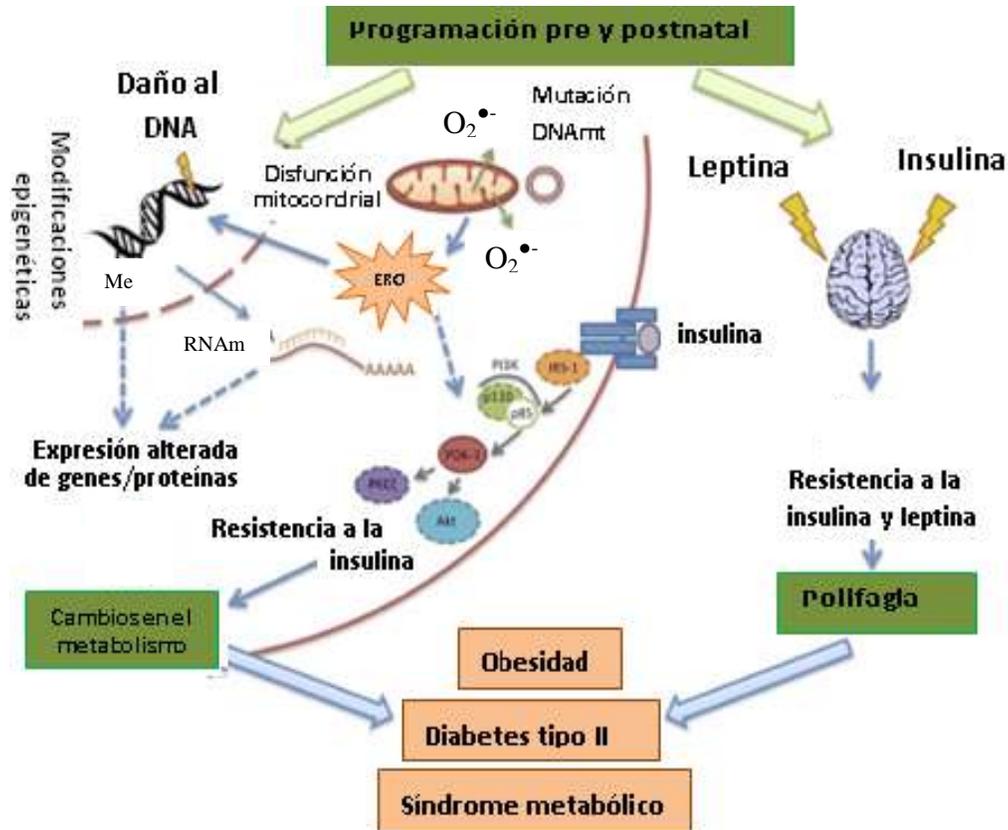


Fig. 3-6 Posibles mecanismos de la programación de desarrollo en respuesta a la sobrealimentación materna, (modificado de Alfara 2011) (92).

Es posible especular que la plasticidad perinatal de los sistemas fisiológicos es un mecanismo importante para la adaptación del feto o del recién nacido a las condiciones ambientales después del nacimiento. Sin embargo, en estudios bajo condiciones extremas como el estrés, las crías mostraron anomalías fisiológicas y conductuales a corto y largo plazo (93), (94).

Las fluctuaciones programadas del tono oxidante ó cambio redox, alteran el destino de células en el embrión hacia la proliferación, la diferenciación, la apoptosis o necrosis. Un estado muy reducido conduce a la proliferación, la oxidación suave conduce a la diferenciación y la oxidación adicional a la muerte celular (95). El nivel de oxígeno también puede afectar a la diferenciación de las células madre a un fenotipo en particular (96), así como la proliferación de las células β pancreáticas

(97). El EOx fetal podría influir en el desarrollo del síndrome metabólico (Fig. 3-6). (97) (98), por diversos efectos por ejemplo las células β del páncreas dependen de la producción normal de ATP para la secreción de insulina (99), las cuales son células muy susceptibles a ERO por sus bajos niveles de enzimas antioxidantes (100), por lo cual el feto antepone modular y reprogramar la función mitocondrial en el páncreas cuando se da un aumento del EOx (101). Esta interrupción y la modulación de la función de las células β podrían predisponer a la descendencia a la diabetes. Del mismo modo afecta la fosforilación oxidante mitocondrial en el hígado (102).

Las alteraciones en la placenta resultado del EOx afectan la función placentaria, el crecimiento fetal y la programación del desarrollo que lleva a consecuencias a largo plazo en la edad adulta (82), como por ejemplo en la insuficiencia placentaria, hay un aumento de ERO que amplifica la expresión de diversos factores de transcripción y/o factores hormonales, que terminan afectando el metabolismo de la placenta, con la consecuentes alteración del flujo de sanguíneo placentario y la alteración de la programación del desarrollo (90).

Estas observaciones tienen importantes implicaciones para el desarrollo de un organismo, ya que demuestran que el EOx y por tanto el ERO pueden afectar en gran medida el destino del desarrollo (82).

Con base en estos antecedentes se planteó la presente investigación que tiene la finalidad de determinar el efecto de la restricción proteínica materna durante la gestación sobre el EOx en placenta e hígado fetal utilizando como modelo biológico a la rata, del cual no se tiene precedente. La propuesta a evaluar fueron los efectos de la restricción proteínica 10%, durante 19 días de gestación (dG) sobre el EOx en el suero materno, placenta e hígado fetal de rata Wistar.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos adversos de la restricción proteínica materna durante el embarazo tanto en madres como en sus descendientes constituyen un gran problema de salud pública, a nivel mundial, especialmente en los países en desarrollo (1). Recientemente en nuestro país el 12% de mujeres en edad reproductiva y el 18% de las embarazadas, fueron clasificadas como anémicas; teniendo una mayor prevalencia en áreas rurales que en las urbanas (2), según la ENSANUT 2012. Por lo que la morbilidad fetal y de la descendencia, asociada con la pobre nutrición materna durante el desarrollo es un problema preocupante de salud a nivel global que predispone a la descendencia a desarrollar enfermedades en su vida adulta, como es diabetes, hipertensión y obesidad (3).

La restricción proteínica materna durante la gestación es uno de los principales factores que afectan la programación del desarrollo (5). Myatt et al., mencionan que la desnutrición o sobre-nutrición, daños por EOX o nitrante afectan la función de la placenta y por tanto el crecimiento fetal y el desarrollo (9). En las crías de ratas sometidas a restricción proteínica se ha reportado que en la alteración del metabolismo de glucosa e insulina está implicado el EOX (6), puesto que las deficiencias nutricionales como la de proteínas, podrían impactar en la capacidad antioxidante celular, ya que éstas proveen los aminoácidos necesarios para la síntesis de enzimas antioxidantes (8).

Sin embargo no se han llevado a cabo estudios donde se determine el efecto de la restricción proteínica materna durante la gestación sobre el EOX en placenta e hígado fetal de rata. Por ello se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de la restricción proteínica en un 10% durante 19 dG de la rata Wistar sobre el EOX? ¿Este EOX ocasionará daño placentario y esté repercutirá en el feto?

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

- Evaluar el efecto de la restricción proteínica durante la gestación sobre EOx en suero materno, placenta e hígado de fetos de rata Wistar.

5.2 PARTICULARES

- ♣ Determinar a los 19 dG en la rata madre, la ganancia de peso materno y concentración de MDA en suero.
- ♣ Determinar el peso de placentas, la concentración de MDA y la actividad enzimática antioxidantes SOD y GPx a los 19 dG.
- ♣ Evaluar el peso de los fetos a los 19 dG.
- ♣ Determinar la concentración de MDA y la actividad enzimática de la SOD y GPx en hígado fetal a 19 dG.

6. HIPÓTESIS

De acuerdo a los antecedentes teóricos científicos que han demostrado que la restricción proteínica materna durante la gestación es un factor que impactan en la programación del desarrollo fetal, en donde se ha visto implicado al EOx, suponemos que la restricción proteínica materna durante la gestación incrementará el daño oxidante tanto en la madre como en la placenta y el hígado fetal, aumentando la concentración de MDA así como la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 TIPO DE ESTUDIO

Experimental

7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Se emplearon ratas hembras de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) de 120 días de edad, obtenidas del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ, donde se mantuvieron en condiciones de humedad relativa y temperatura controladas 75% y $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, respectivamente con ciclos de luz/obscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de experimentación animal del INCMNSZ. El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* durante todo el estudio. Los machos empleados para aparear a las hembras fueron no experimentales con fertilidad probada.

Los animales fueron alojados en cajas estándar de acrílico con una cama de aserrín de madera virgen (Aspen Chip Laboratory Bedding de Northeastern Products Corp.). Se colocaron 3 animales por cada caja hasta antes del apareamiento, periodo a partir del cual sólo se colocó a una hembra por caja hasta el final del estudio.

7.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

7.3.1 Criterios de inclusión

- a) Se incluyeron en el estudio las ratas preñadas.
- b) Se incluyeron las ratas gestantes con 10 a 12 fetos.

7.3.2 Criterios de exclusión

- a) Se descartaron las ratas no preñadas.
- b) Se excluyeron las ratas con reabsorciones fetales.
- c) Se eliminaron las ratas con más de 12 o menos de 10 fetos.
- d) Se descartaron las ratas con enfermedad alguna.

7.4 VARIABLES

7.4.1 *Independientes:* Tipo de dieta

- a) Control
- b) Restringida isocalórica

7.4.2 *Dependientes:*

- a) Peso de las placentas y fetos.
- b) Concentración MDA.y actividad enzimática de SOD y GPx.

7.5 METODOLOGÍA

7.5.1 *Animales Experimentales:*

Las ratas se dividieron en dos grupos experimentales de acuerdo al tipo de dieta que consumieron en los 19 dG:

- Grupo Control (C): Se alimentaron con dieta control isocalórica durante 19 dG.
- Grupo restringido (R): Se alimentaron con dieta isocalórica restringida proteínicamente durante 19 dG.

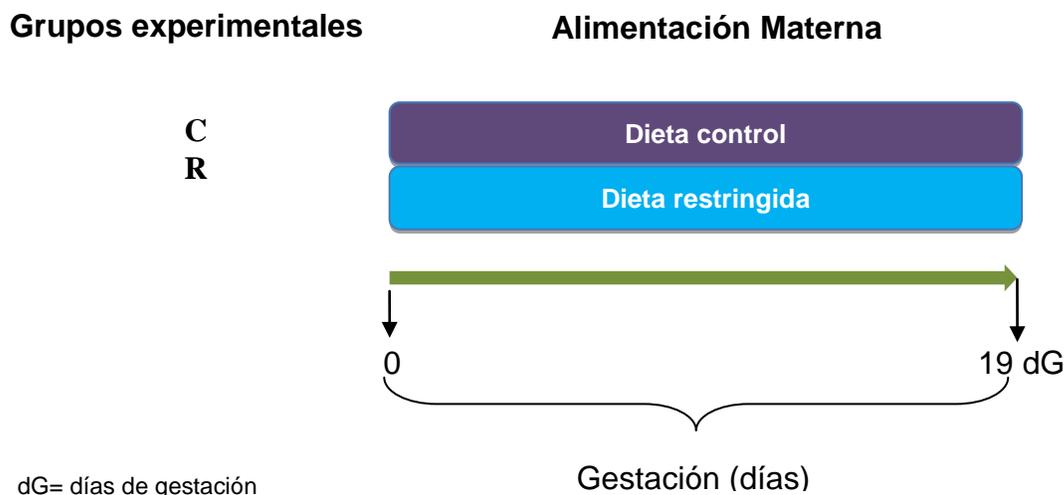


Fig. 7-1. Descripción de los grupos experimentales en línea de tiempo.

7.5.2 Dieta experimental:

La dieta control consistió en alimento elaborado en la planta piloto del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (DCyTA) del INCMNSZ, cuyo contenido energético fue de 4 Kcal/g y de proteína un 20.3% (p/p), con base en la recomendación AIN-93 del American Institute of Nutrition (35), así como modificaciones hechas por nuestro grupo de trabajo (Cuadro 7-1 y Cuadro 7-2), (36). Para su elaboración se utilizó una mezcladora de paletas Hobart modelo A-200 de 20L de capacidad, potencia de 1/3 HP y 1425 rpm.

Los reactivos que utilizados para la elaboración de las dietas se enlistan a continuación:

- Caseína libre de vitaminas, de Harlan Teklad.
- Diclorhidrato L-Cistina, de Sigma Aldrich.
- Mezcla de Minerales AIN-76, de Harlan México S. A. de C. V.
- Mezcla de Vitaminas AIN-93 VX, de Harlan México S. A. de C. V.
- Clorhidrato de Colina, Sigma Aldrich.
- α -Celulosa de Sigma Aldrich.

- Almidón de maíz de Droguería Cosmopolita S. A. de C. V.
- Glucosa anhidra de Droguería Cosmopolita S. A. de C. V.
- Aceite comestible 100% de maíz La Gloria® de Corfuerte, S. A. de C. V.

Cuadro 7- 1 Composición Nutricional de las Dietas

Nutrientes	(%_(p/p))	
	Dieta Control	Dieta Restringida en proteína
Proteína	20.3	10.15
Grasa	5.0	5.0
Polisacáridos	32.52	37.59
Azúcares simples	32.52	37.59
Fibra dietética	5.0	5.0
Minerales	3.5	3.5
Vitaminas	1.164	1.164
Contenido energético	4 Kcal /g	4 Kcal/g

Cuadro 7- 2 Formulación de la dieta control y dieta restringida proteínicamente

Componente	Control Concentración (g/100g de Dieta)	Restringida Concentración (g/100 g de Dieta)
Caseína	20.0	10.0
Diclorhidrato L-Cistina,	0.3	0.15
Mezcla de Vitaminas AIN-93 VX	1.0	1.0
Mezcla de Minerales AIN-76	3.5	3.5
Clorhidrato de Colina	0.164	0.164
α-Celulosa	5.0	5.0
Almidón de maíz	32.5	37.59
Glucosa anhidra	32.5	37.59
Aceite de maíz	5.0	5.0

7.5.2.1 Elaboración de la dieta.

1. Se pesaron según la formulación mencionada anteriormente la cantidad correspondiente de cada componente por separado usando la balanza analítica Sartorius® ED623SCW así como la báscula EURA® 2000/100 (cap. máx.=100 Kg y d=50g), según la sensibilidad requerida en cada caso.

2. Se cernieron todos los polvos, previamente a ser mezclados en una bolsa, después fueron colocados en la mezcladora Hobart, a la cual se agregó la cantidad formulada de aceite, así como un poco de agua para facilitar su mezclado hasta haber obtenido una masa uniforme, (siendo las mezclas de vitaminas AIN-76 y de minerales AIN-93VX las últimas en incorporarse).

3. Una vez agregados todos los componentes se mezclaron durante 10 minutos a una velocidad baja (No. 1) en la mezcladora.

4. Obtenida la masa se moldearon galletas del tamaño del puño de la mano y se colocaron a secar a temperatura ambiente por un día en la planta.
5. La dieta se almacenó en contenedores rígidos opacos, por lapsos no mayores a un mes en un cuarto frío a 4° C (Fig. 7-2 y 7-3).



Fig. 7-2 Presentación de dieta control



Fig. 7-3 Presentación de dieta restringida

7.5.3 *Apareamiento y determinación de la preñez:*

Cuando las hembras alcanzaron 120 días de edad y un peso aproximado de 287 g, fueron colocadas en sus respectivas cajas con un macho no experimental adulto de fertilidad probada para llevar a cabo el apareamiento.

Para comprobar que se realizó el apareamiento posterior a la colocación del macho, se realizó un frotis vaginal a cada hembra cada 24 horas (a las 08:00 hrs a.m.). La observación de espermatozoides se consideró como resultado positivo para el apareamiento (tomando el día del hallazgo como el día cero de gestación), momento en el cual el macho fue retirado de la caja de la hembra. Las ratas negativas a esta prueba por más de cuatro días consecutivos (duración del ciclo estral) fueron descartadas del experimento. Los frotis se tiñeron con solución de lugol (obtenida de la Farmacia del Área de Hospitalización del INCMNSZ) y observados a 100X con un microscopio fotónico (Axiostar Plus de Carl Zeiss®).

7.5.4 Medición de peso corporal e ingesta

A partir del día cero de gestación se asignó dieta ya sea control o restringida. Se midió y registró el peso corporal de cada rata diariamente a las 9:00 a.m. durante los 19 primeros dG, de igual forma para su ingesta de alimento, asegurándose que el comedero contara con una cantidad no menor a 50 g. Las pesadas se realizaron en una balanza analítica ADAM® modelo PGW 1502 e, (capacidad=1500 g, d=0.01 g), usándola en la función de pesaje de animales para el caso del peso corporal.

Los cálculos se realizaron de acuerdo a la presente ecuación:

$$\text{Ingesta individual} = A_i - A_f$$

Donde:

A_i= alimento inicial (g de alimento en el comedero el día anterior a la determinación).

A_f= alimento final (g de alimento en el comedero el día de la determinación)

7.5.5 Sacrificio

Una vez cumplidos los 19 dG, la rata se sacrificó por decapitación con una guillotina para roedor Thomas Scientific, con un ayuno de 6 hrs, las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos de vidrio, dejando coagular a temperatura ambiente y después fueron centrifugadas a 4°C por 15 mín. a 2200 rpm para remover las células sanguíneas, el suero fue almacenado a -70° C hasta su análisis.

Posteriormente mediante la disección del cuerpo se extrajeron del útero los fetos y sus respectivas placentas; ambos se pesaron en una balanza analítica BP 310S de Sartorius® (Cap.max.= 320 g, d=0.001 g) y se realizó su registro del peso; la determinación del sexo fetal se realizó mediante la búsqueda de los testículos. En seguida se obtuvo el hígado fetal y se conservó a -70° C hasta el momento del ensayo.

7.5.6 Determinación de la concentración de biomarcadores de estrés oxidante: MDA, SOD, GPx en suero materno, placenta e hígado fetal.

Se evaluó la concentración de MDA en suero materno, así como en el homogeneizado de placenta e hígado fetales por el método de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS). Por otra parte también se cuantificó la concentración enzimática de SOD y GPx en placenta e hígado fetal por métodos enzimáticos.

A continuación se mencionan las técnicas empleadas correspondientes a cada determinación.

7.5.6.1 Homogeneización del tejido

La homogeneización de la placenta e hígado se realizó en solución salina isotónica (SSI) a 4 °C (baño de hielo), con una proporción 1:10 (g/V, 0.1 g de tejido en 1 mL de SSI para cada tejido obtenido. Para tal proceso se utilizó un homogeneizador marca Polytron® PT 10-35, a una velocidad media, hasta observar la ausencia de fibras de tejido, posteriormente se realizó alícuotas para las diferentes pruebas.

7.5.6.2 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteína en el homogeneizado de placenta e hígado se realizó por el método de Bradford (103). Este análisis se realizó en un espectrofotómetro de placa, Sinergy HT, Biotek® a 595 nm.

Procedimiento

Antes de colocar la muestra en la placa, se encendió el Sinergy HT, Biotek®, durante 30 mín. y se prosiguió a leer los blancos de aire correspondientes a cada placa.

De acuerdo al número de muestras a analizar, se preparó la dilución 1/5 del reactivo de Bradford (Bio Rad Cat. 500-006) y a continuación se realizó la dilución de la muestra 1/100 en SSI, posteriormente, se colocaron en una placa de 96 pozos 5 μ L de la dilución de la muestra por duplicado y 200 μ L del reactivo de Bradford, se incubaron 5 mín. a temperatura ambiente y se leyeron a una absorbancia de 595 nm. Para la elaboración de la curva estándar se utilizó suero de albúmina bovina (BSA), partiendo de un stock de 10 mg/mL de BSA obteniendo una dilución con una concentración de 200 μ g/mL, de donde se tomó la alícuota correspondiente para cada punto de la curva a una concentración de 0-2.5 μ g/mL. Al igual que las muestras se agregaron 200 μ L del reactivo de Bradford (Fig. 7-4).

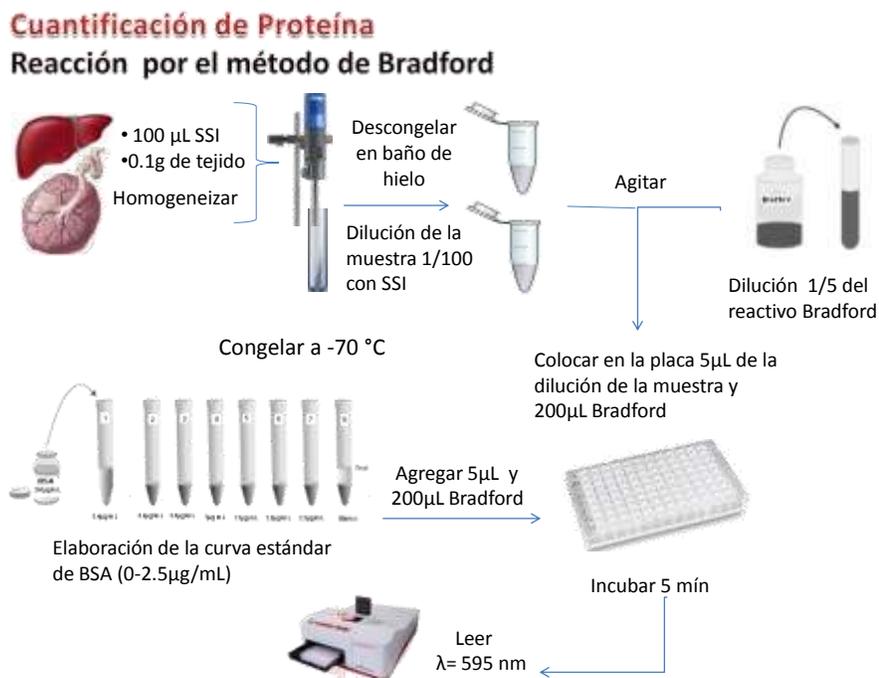


Fig. 7-4 Diagrama empleado en la cuantificación de proteína por el método de Bradford.

7.5.6.3 MDA en suero y en el homogeneizado de tejido 1:10 m/v (104)

Procedimiento

Se encendió el Sinergy HT, Biotek®, durante 30 mín. y se leyeron los blancos de aire correspondientes a cada placa.

Anticipadamente se prepararon con base a las muestras a determinar el Reactivo C: 170 mg de ácido tiobarbitúrico (TBA), 5.9 g ácido tricloroacético (TCA), 680 μ L HCl y agua cbp 34 mL y el Butil-hidroxi-tolueno (BHT) a una concentración de 6.25×10^{-3} g/mL. Con respecto a la preparación de la muestra se realizó por duplicado, partiendo de una alícuota de homogeneizado de 100 μ L previamente conservadas a -70°C , descongelándolas en un baño de hielo, posteriormente se agitaron en un vortex y se agregaron 400 μ L del reactivo C, agitando nuevamente y añadiendo 5 μ L de BHT.

Las muestras se incubaron a 50°C por 1 hr, más tarde se colocaron en baño de hielo a 4°C hasta enfriarse, prosiguiendo a centrifugarlos a 8000 rpm durante 15 mín. a 6°C en Eppendorf Centrifuge® 5417R, posteriormente se colocaron 300 μ L sobrenadante de la muestra en una placa de 96 pozos y se leyeron a $\lambda = 532$ nm, (Fig. 7-5).

Cuantificación de Malondialdehído MDA

Reacción de TBARS

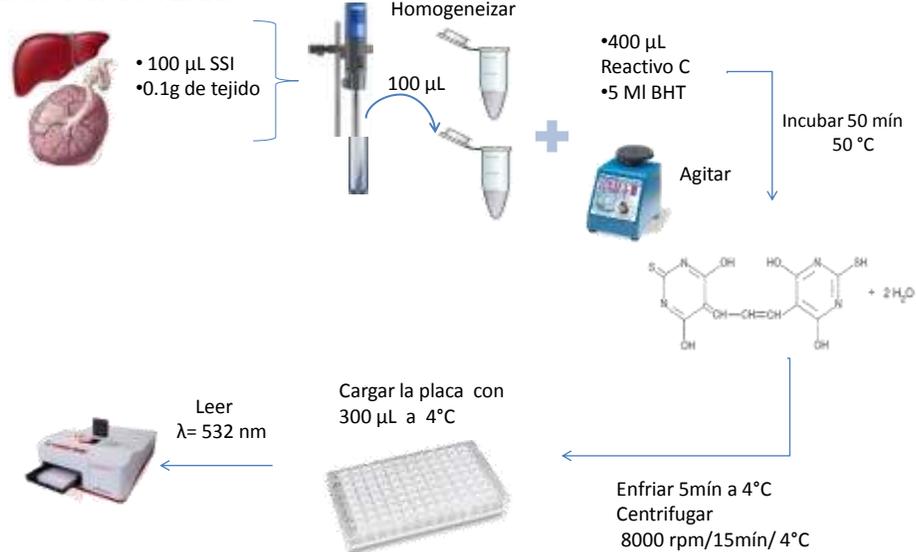


Fig. 7-5 Diagrama para la cuantificación de Malonaldehído (MDA) a través de la reacción de TBARS.

7.5.6.4 Medición de la actividad de la SOD en homogeneizado de tejido 1:10 m/v

La actividad de la SOD se evaluó a través del kit comercial RANSOD de RANDOX; Cat. No. SD125 y SD126 y los datos fueron normalizados por la concentración de proteína. Este análisis se realizó en un espectrofotómetro de placa a 505 nm, Sinergy HT, Biotek®.

Procedimiento

Inicialmente se reconstituyeron los viales de reactivos de acuerdo al número de muestras, correspondientes al sustrato mixto (R1a), XOD (R2) y el calibrador (Patrón), según lo establecido en el inserto del kit comercial RANSOD de RANDOX; Cat. No. SD125 y SD126.

Posteriormente se encendió Sinergy HT Biotek®, durante 30 mín. y tiempo después se prosiguió a leer los blancos de aire correspondientes a cada placa.

Para la preparación de la muestra se partió de una alícuota de homogeneizado de 50 μL conservada a -70°C , la cual se descongeló en baño de hielo y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 mín. a 4°C , obteniendo el sobrenadante del cual se colocaron 7 μL por duplicado en una placa de 96 pozos, adicionando 212.5 μL del R1a y 31.3 μL del R2 e inmediatamente se agitó, todo esto se realizó en baño de hielo y al cabo de 30 s y 3 mín. se leyó la absorbancia A_1 y A_2 , a $\lambda = 505 \text{ nm}$ a 37°C , (Fig. 7-6)

Para la elaboración de la curva estándar se reconstituyó el calibrador del cual se elaboró una curva de 6 puntos, colocando 7 μL correspondientes a cada tubo de S_6 a S_1 , 5 μL R1a y 31.3 μL de R2, (Cuadro 7-3); se trabajó de igual forma que la muestra.

Cuadro 7-3 Elaboración de la Curva Estándar para SOD

Tubo	
S_6	600 μL de calibrador
S_5	500 μL S_6 + 500 μL de diluyente
S_4	500 μL S_5 + 500 μL de diluyente
S_3	500 μL S_4 + 500 μL de diluyente
S_2	300 μL S_3 + 500 μL de diluyente
S_1	50 μL de diluyente



Fig. 7-6 Diagrama para la cuantificación de actividad enzimática de SOD, utilizando el kit comercial RANSOD.

7.5.6.5 Medición de la actividad de GPx en homogeneizado de tejido 1:10 m/v

La actividad de la enzima GPx se analizó con el kit comercial RANSEL de RANDOX; Cat. Mo. RSD504. Los datos fueron normalizados por la concentración de proteína. Este análisis se realizó con el espectrofotómetro de placa, Sinergy HT, Biotek® a 340 nm.

Procedimiento

Se reconstituyeron los viales de reactivos en base al número de muestras a analizar, correspondientes al GSH, GR y Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato en su forma reducida (NADPH) (R1a), Hidroperóxido de cúmeno (R2) preparado a una concentración 0.18 mmol/L y el diluyente (R3), según lo establecido en el inserto del kit comercial RANSEL de RANDOX; Cat. No. RS504.

Con anterioridad se encendió el espectrofotómetro de placa Sinergy HT, Biotek®, durante 30 mín. prosiguiendo a leer los blancos de aire correspondientes a cada placa. Se elaboró un blanco con SSI y para la muestra se partió de una alícuota de homogeneizado de 50 μ L conservada a -70°C , la cual se descongeló en un baño de hielo y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 mín a 4°C para obtener el sobrenadante, posteriormente se colocaron 5 μ L de este en una placa de 96 pozos, así como del blanco de SSI. A la muestra se le agregó 205 μ L del R1a y 10 μ L del R2, esto se realizó por duplicado y bajo baño de hielo. Se mezcló y se leyó a una $\lambda = 340\text{ nm}$ a 37°C , obteniendo la absorbancia inicial al cabo de un minuto y leyendo nuevamente a uno y dos minutos, (Fig.7-7).

Cuantificación Glutación Peroxidasa GPx

Reacción producto comercial Kit RANSEL

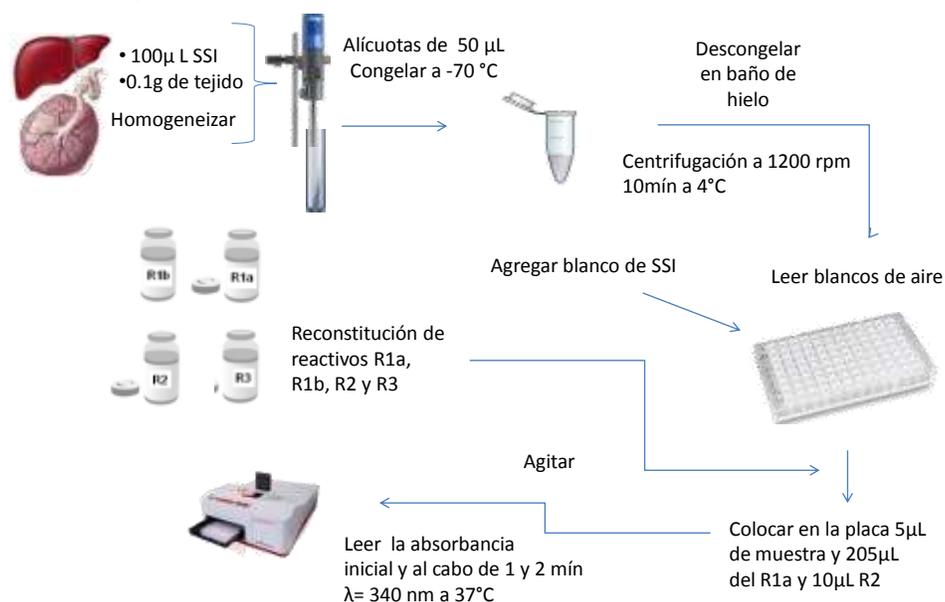


Fig. 7-7 Diagrama empleado en la cuantificación de la actividad enzimática de GPx, utilizando el kit comercial RANSEL.

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se presentan como la media aritmética \pm el error estándar de la media (E.E.M). La comparación de los promedios del peso, concentración MDA y de la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y GPx) en cuanto al efecto de la dieta entre los dos grupos se determinó mediante la prueba *t-Student*, según fuera el caso en ratas gestantes, placenta, feto e hígado fetal.

Adicionalmente la comparación de los promedios de la concentración de MDA y de la actividad enzimática de SOD y GPx de la placenta e hígado fetal con respecto al efecto de la dieta y el sexo del feto, fueron analizados por la prueba ANOVA (Análisis de Varianza) de 2 vías, seguida de la prueba de Tukey.

Se consideró un nivel de significancia al 95%. Se utilizó el programa estadístico SigmaPlot 11.0.

8. RESULTADOS

8.1 PARÁMETROS DE LAS RATAS MADRE A LOS 19 dG

8.1.1 Curva de ganancia de peso en gestación

La alimentación en ratas Wistar con dieta isocalórica restringida proteínicamente (10% de caseína y 0.15% de cistina) durante los 19 dG, no alteró la ganancia de peso materno comparado con el grupo C; los dos grupos experimentales aumentaron de peso de modo paralelo (Fig. 8-1).

La Tabla 8-1 muestra las tres pendientes (m) de la curva ganancia de peso materno referente al grupo R y C durante 19 dG, con su respectivo coeficiente de correlación (R^2), en la cual el periodo de 14 a 19 dG aumentó la velocidad de ganancia de peso a casi el doble de la pendiente de los dos periodos anteriores.

8.1.2 Ganancia de peso e ingesta

El peso materno ganado durante la gestación de los grupos R y C a los 19 dG, fue similar en ambos grupos, al igual que la cantidad de alimento en gramos consumidos por las ratas gestantes cada día (Tabla 8-2).

8.1.3 MDA en suero materno

En la Fig. 8-2 se muestra el efecto de la dieta en la concentración de MDA, determinado en suero de ratas gestantes a 19 dG, donde se observa una concentración significativamente mayor en el grupo R comparado con el grupo C ($P<0.05$).

8.2 PESO DE LA PLACENTA Y DEL FETO A LOS 19 dG

La tabla 8-3 muestra el peso de placentas de ratas gestantes del grupo R son significativamente menos pesadas con respecto al grupo C ($P < 0.05$); por otra parte el peso fetal es el mismo en ambos grupos, al igual que la suma del peso de la placenta más el peso fetal.

8.3 PARÁMETROS DE EOX EN PLACENTA A LOS 19 dG

8.3.1 MDA en placenta

La concentración de MDA en el homogeneizado de placentas de fetos hembras (H) provenientes del grupo R, muestran una concentración de MDA significativamente mayor con respecto a los fetos machos (M) del mismo grupo y al grupo C ($P < 0.05$), (Fig. 8-3 A). Por lo que la concentración del MDA fue significativamente mayor en las placentas del grupo R con respecto al grupo C ($P < 0.05$) (Fig. 8-3 B) (Tabla 8-4).

8.3.2 Enzimas antioxidantes en la placenta (SOD y GPx)

La actividad de la enzima SOD en las placentas de fetos H correspondientes al grupo R, muestra una actividad significativamente mayor de esta enzima comparado con los M del mismo grupo y al grupo C ($P < 0.05$), (Tabla 8-4), (Fig. 8-3 C). De esta forma el análisis grupal el grupo R fue significativamente mayor con respecto al grupo C ($P < 0.05$), (Fig. 8-3 D) (Tabla 8-4).

De igual forma se encontró mayor actividad en las placentas de fetos H del grupo R, contra los fetos H del grupo C ($P < 0.05$), (Tabla 8-4), (Fig. 8-3 E). Siendo así que las placentas del grupo R, mostraron mayor actividad enzimática de la GPx con respecto al grupo C ($P < 0.05$), (Fig. 8-3 F).

8.4 PARÁMETROS DE EOX EN HÍGADO FETAL A LOS 19 dG

8.4.1 MDA en hígado fetal

Los resultados en hígados fetales de H pertenecientes al grupo R, mostraron mayor concentración de MDA, con respecto a los fetos M del mismo grupo y al grupo C ($P < 0.05$), (Fig. 8-4 A). Por lo que en el análisis grupal, el grupo R presentó una más alta concentración de MDA en comparación al grupo C ($P < 0.05$), (Fig. 8-4 B), (Tabla 8-5).

8.4.2 Enzimas antioxidantes en el hígado fetal (SOD y GPx)

Respecto a la enzima SOD, se observó mayor actividad en los hígados de fetos M provenientes del grupo R comparado con el grupo C ($P < 0.05$), con respecto a las H están fueron igualmente diferentes del grupo C ($P < 0.05$) pero menor concentración que los M (Fig. 8-4 C). Así mismo la actividad enzimática en el hígado de fetos pertenecientes al grupo R fue significativamente mayor al grupo C ($P < 0.05$), (Fig. 8-4 D), (Tabla 8-5).

Por otra parte, la actividad enzimática de la GPx en el hígado fetal de H provenientes del grupo R fue mayor en comparación a las del grupo C ($P < 0.05$), (Tabla 8-5), (Fig. 8-4 E). De igual modo en el hígado fetal del grupo R dicha actividad fue significativamente mayor con respecto al grupo C ($P < 0.05$), (Fig. 8-4 F) (Tabla 8-5).

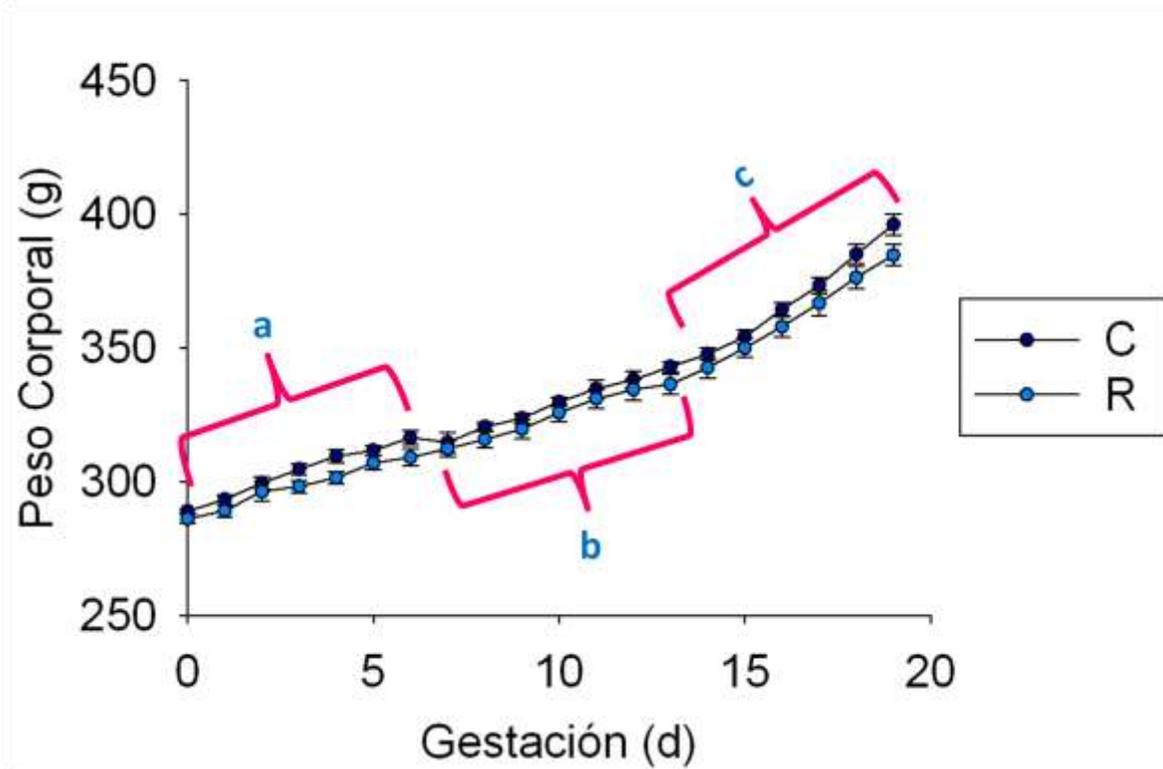


Fig. 8-1 Efecto de la dieta restringida en la curva de ganancia de peso materno en ratas a los 19 dG.

Los resultados se expresan como gramos promedio de la media \pm E.E.M. (n=C: 5, R: 9), analizados por t-Student. No se encontraron diferencias significativas respecto al grupo C.

R: grupo con restricción proteínica, C: grupo control.

Tabla 8-1 Pendientes de la curva ganancia de peso durante la gestación

Pendientes (m)		a	b	c	Total
dG		0-6	7-13	14-19	0-19
C	m (g/d)	5.17 \pm 0.32	5.78 \pm 0.78	9.63 \pm 0.84	5.24 \pm 0.48
	R ²	0.96	0.93	0.96	0.94
R	m (g/d)	4.83 \pm 0.42	4.75 \pm 0.42	8.21 \pm 0.82	4.83 \pm 0.28
	R ²	0.92	0.95	0.96	0.93

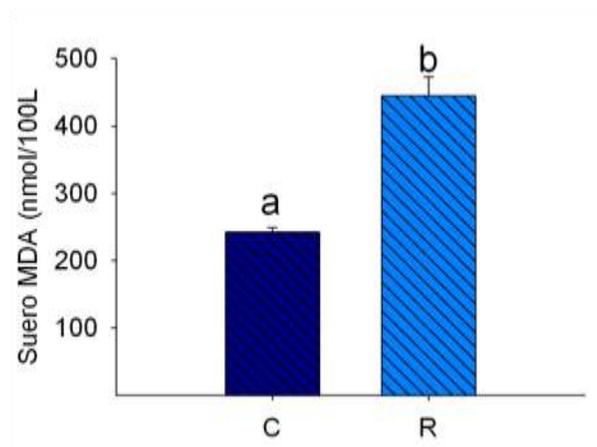
Los resultados se expresan como m promedio de la media \pm E.E.M., (n= C: 5, R: 9) analizados por t-Student. No se encontraron diferencias significativas respecto al grupo C.

m= pendiente en g/ ganados por día, R: grupo con restricción proteínica, C: grupo control, dG: días de gestación.

Tabla 8-2 Características maternas a los 19 dG

	Control	Restringida
Ganancia de peso materno (g)	107±4	99±3.5
Consumo de alimento (g)	27±0.15	27±0.3

Los resultados se expresan como gramos promedio de la media \pm E.E.M., (n= C: 5, R: 9) analizados por t-Student. No se encontraron diferencias significativas respecto al grupo C.

**Fig. 8-2 Efecto de la dieta en la concentración de MDA en suero materno de rata con 19 dG.**

Los resultados se presentan como concentración promedio (nmol/mL) de la media \pm E.E.M., (n= C: 5, R: 9). Diferencia significativa por t-Student, $P < 0.05$ para letras diferentes entre los grupos C vs R. R: grupo con restricción proteínica, C: grupo control.

Tabla 8-3 Peso de la placenta y del feto a los 19 dG de ratas Wistar

	Control (n=5)	Restringida (n=9)
Peso de la placenta (g)	0.7±0.11a	0.5±0.02b
Peso fetal (g)	2.7±0.07	2.6±0.02
Peso de la placenta + peso fetal (g)	3.4±0.16	3.1±0.03

Los resultados se presentan como gramos promedio de la media \pm E.E.M. (n= C: 5, R: 9), analizados por t-Student, $P < 0.05$ para letras diferentes entre los grupos C vs R.

Tabla 8-4 Análisis de MDA, SOD y GPx en homogeneizado de placenta

	C	R
MDA (nmol/mg de proteína)	23±2.1a	38.8±1.7b
Hembras	22.8±3a	41.8±2b*
Machos	23.2±3a	34.9±2b*
SOD (U SOD/mg de proteína)	12.78±0.46a	17.24±1.05b
Hembras	12±1.04a	19.06±1.96b
Machos	13.55±0.63	15.41±1.35
GPx (mU GPx/mg de proteína)	10.14±2.44a	19.60±1.99b
Hembras	5.99±1.14a	22.26±5.71b
Machos	11.44±1.86	16.93±7.14

Los resultados se expresan como la media ± E.E.M.;(n=C: 5, R: 9), P<0.05 para letras diferentes entre los grupos C vs R, * P<0.05 para grupo con diferente sexo y misma alimentación. Analizados por t-Student o ANOVA de 2 vías.

Malonaldehído (MDA), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx).

Tabla 8-5 Análisis de MDA, SOD y GPx en homogeneizado de hígado

	C (n=5)	R (n=9)
MDA (nmol/mg de proteína)	36±3.1a	38.8±2.3b
Hembras	49.8±4.5a	88.6±3.3b*
Machos	22.7±4.5a	55.3±3.3b*
SOD (U SOD/mg de proteína)	16.25±0.61a	26.47±1.77b
Hembras	20.10±0.79a	26.16±0.35b
Machos	12.4±0.62a*	26.77±3.62b
GPx (mU GPx/mg de proteína)	23.48±2.07a	36.84±3.47b
Hembras	22.97±3.84a	42.13±3.75b
Machos	23.98±1.86	31.55±7.06

Los resultados se expresan como la media ± E.E.M.(n=C: 5, R: 9), P<0.05 para letras diferentes entre los grupos C vs R, * P<0.05 para grupo con diferente sexo y misma alimentación. Analizados por t-Student o ANOVA de 2 vías.

Malonaldehído (MDA), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx).

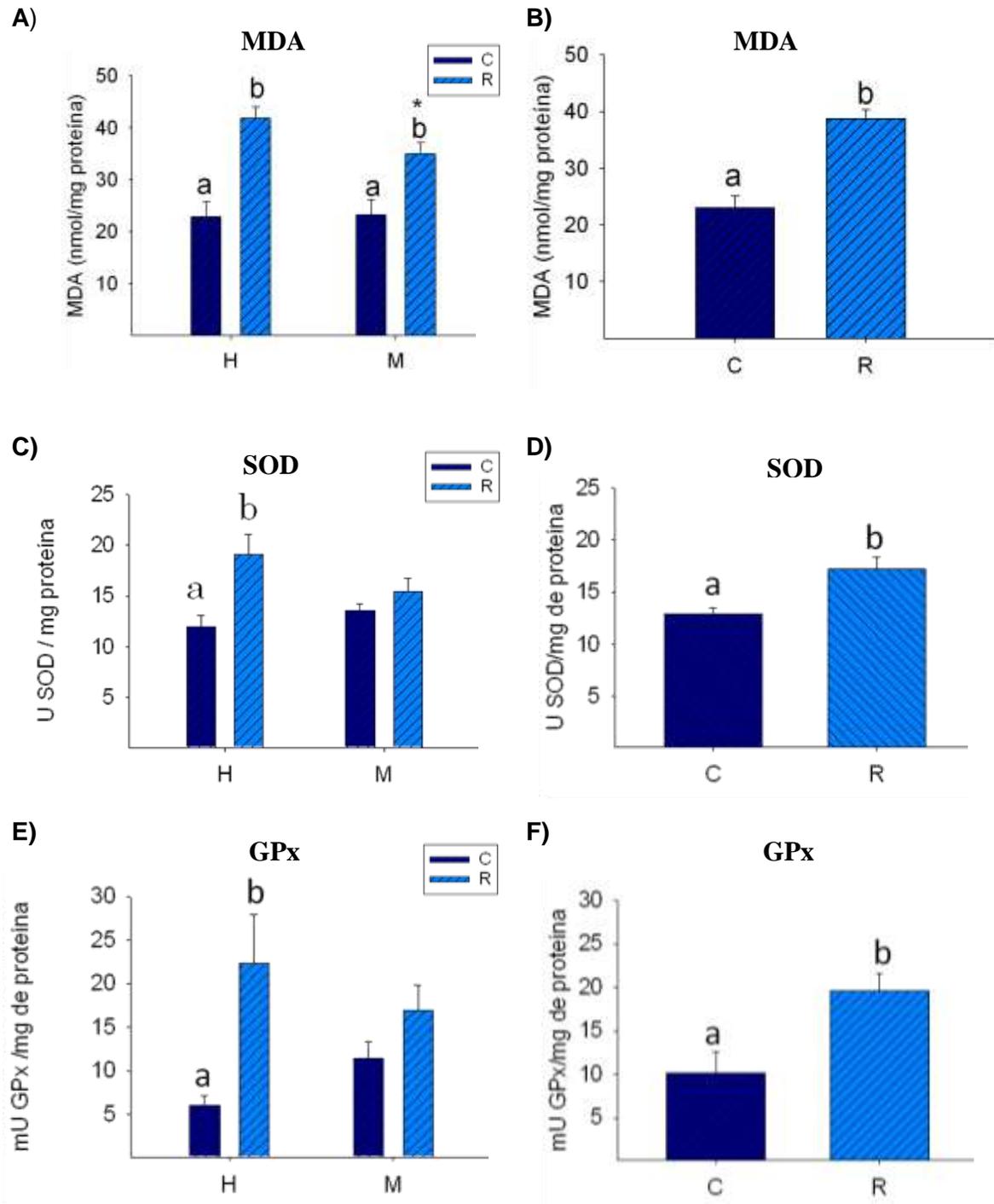


Fig. 8-3 Análisis de MDA, SOD y GPx en homogeneizado de placenta a los 19dG.

Efecto de la dieta y el sexo en la A) concentración de MDA, C) actividad enzimática de la SOD y E) GPx y efecto de la dieta en la B) concentración de MDA, D) actividad enzimática de la SOD y F) GPx en homogeneizado de placenta de rata con 19 dG. Los resultados se presentan como concentración promedio de la media \pm E.E.M. o actividad enzimática promedio de la media \pm E.E.M (n= C: 5, R: 9). $P < 0.05$ para letras diferentes entre los grupos C vs R, * $P < 0.05$ para grupo con diferente sexo y misma alimentación. Los datos fueron analizados por t-Student (B, D y F) o ANOVA de 2 vías (A, C y E).

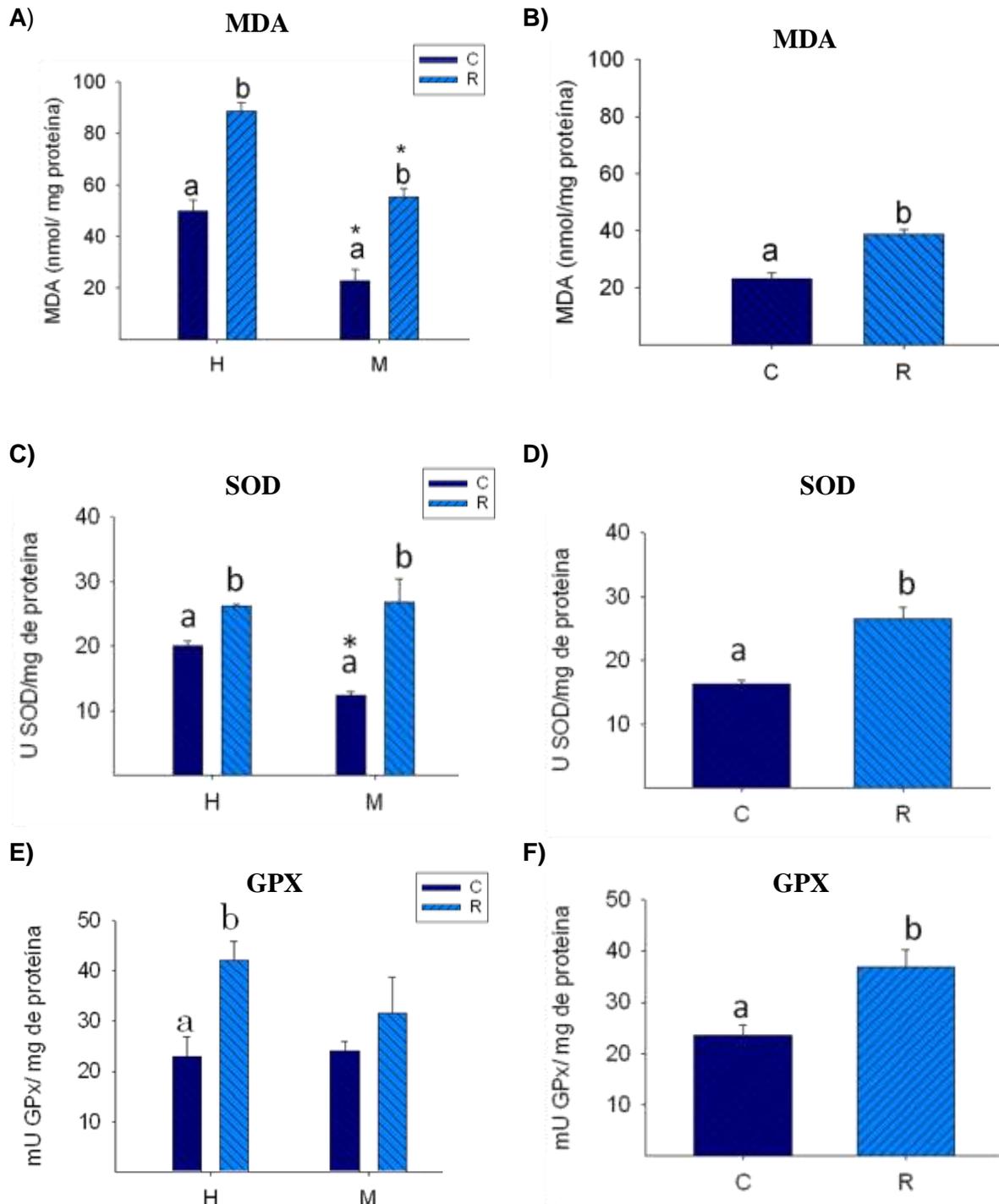


Fig. 8-4 Análisis de MDA, SOD y GPx en homogeneizado de hígado a los 19dG.

Efecto de la dieta y el sexo en la A) concentración de MDA, C) actividad enzimática de la SOD y E) GPx y efecto de la dieta en la B) concentración de MDA, D) actividad enzimática de la SOD y F) GPx en homogeneizado de hígado fetal placenta de rata con 19 dG. Los resultados se presentan como concentración promedio de la media \pm E.E.M. o actividad enzimática promedio de la media \pm E.E.M. (n= C: 5, R: 9). $P < 0.05$ para letras diferentes entre los grupos C vs R, * $P < 0.05$ para grupo con diferente sexo y misma alimentación. Los datos fueron analizados por t-Student (B,D,F,C) y ANOVA de 2 vías (A y E).

9. DISCUSIÓN

El periodo de gestación, es una etapa en la cual el impacto potencial de la nutrición en las crías es mayor que en cualquier otra etapa de la vida, ya que en ella existen periodos críticos vulnerables a condiciones subóptimas como es la organogénesis y el crecimiento fetal. Estudios previos basados en la hipótesis de los Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (DOHaD *por sus siglas en ingles*), han reportado que dentro de los principales factores que afectan la programación del desarrollo se encuentra la exposición materna a una dieta baja en proteínas durante la gestación y/o lactancia (5), (27), (28).

En este sentido, nuestros resultados muestran que la alimentación de ratas Wistar con dieta isocalórica restringida proteínicamente (10% de caseína y 0.15% de cistina) durante los 19 dG, no alteró la ganancia de peso materno comparado con las ratas gestantes alimentadas con dieta control, lo que puede deberse al nivel de restricción proteínica y/o compensación de carbohidratos al emplearse una dieta isocalórica (21), (44); dicha compensación pudo ocasionar que las ratas de ambos grupos consumieran la misma cantidad en gramos de dieta, como se muestra en la Tabla 8-2.

Así mismo el que las ratas no consumieran más alimento pero si aumentaran de peso con el avance de la gestación, puede deberse a que proteínas y lípidos almacenados en periodos tempranos de la gestación subsidian de cierta forma el alto costo de las demandas energéticas en el último periodo de embarazo (38), (39), (40); por lo cual observamos que la curva ganancia de peso materno durante la gestación, no fue diferente a la obtenida por el grupo C (Fig. 8-1), y coincide con la reportada por Ôta y Yokoyama 1967 (37) y por nuestro grupo de trabajo en estudios previos (20), (51).

Esta curva muestra claramente tres pendientes, donde en el periodo del día 14 al 19, la velocidad de ganancia de peso es casi el doble de la pendiente de los dos

periodos anteriores en ambos grupos (Tabla 8-1). En este período de rápida ganancia de peso hay gran hipertrofia (aumento de tamaño celular) y se da la maduración de los órganos fetales, lo que explica la rápida ganancia de peso, esto es de suma importancia ya que para esto se requiere aportes suficientes de aminoácidos (31).

Por otro lado la Tabla 8-3, muestra que el peso fetal es el mismo en ambos grupos, al igual que la suma del peso de la placenta más el peso fetal, lo cual sugiere que la madre restringida subsidio la demanda proteínica por el feto o que el nivel de restricción no logra impactar en el peso, lo cual es factible, ya que investigaciones previas han reportado que ratas madre sometidas a este modelo presentan diferentes efectos en el peso al nacimiento de las crías incluyendo un decremento (19), (42), (43), sin cambios (21), (44), o incremento (45), que muchos atribuyen al nivel de restricción proteínica y/o compensación de carbohidratos en una dieta isocalórica.

El peso de placentas del grupo R es estadísticamente menor respecto al grupo C, esto probablemente porque la placenta es capaz de generar cambios tanto en estructura y función, como resultado de un cambio en la oferta de sustrato y ambiente hormonal, lo cual puede impactar en diversas propiedades intrínsecas, como el tamaño, estructura, superficie de intercambio y grado de vascularización las cuales son determinantes para su función (68), y por tanto impactan directamente en el feto.

Respecto a la evaluación del efecto de la restricción proteínica durante la gestación sobre el EOx, en los parámetros determinados se observó una mayor concentración de MDA (principal LPO) en el suero materno del grupo R comparado con el grupo C (Fig. 8-2), cuyas concentraciones indican un proceso de lipoperoxidación, causado por la superación de la respuesta antioxidante de la rata madre, lo cual es de gran importancia ya que la gestación es uno de los periodos de mayor plasticidad especialmente sensible a factores de estrés (80), (81).

Asimismo este desbalance podría causar la liberación de productos de lipoperoxidación a la circulación, con el subsecuente daño de las membranas de células endoteliales, especialmente de la placenta.

Este aumento en el proceso de lipoperoxidación puede deberse al doble reto que implicó la restricción proteínica y la gestación, ya que es un estado fisiológico donde se forman dos productos, la placenta y el feto, lo cual exige una demanda energética elevada y un incremento en los requerimientos de oxígeno, dando lugar a un estado de EOx que surge por la intensa actividad mitocondrial de la placenta y por consecuente aumento en la producción de ERO, por lo que aún en el embarazo normal se podría esperar un aumento de la carga pro-oxidante (79), lo que explica los niveles de MDA en el grupo C (Fig. 8-2).

Este aumento en la producción de MDA por el efecto de la dieta restringida, corroboran lo señalado por estudios previos que correlacionan el EOx con la restricción proteínica y que proponen que la deficiencia nutricional en proteínas y/o micronutrientes, podrían impedir la capacidad celular antioxidante dado que las proteínas proveen los aminoácidos necesarios para la síntesis de enzimas antioxidantes (8) de igual forma la restricción a la mitad de la cistina, dímero de dos cisteínas, las cuales son necesarias para la síntesis de glutatión (73) podría causar un desbalance que lleve a un estado de EOx, asimismo está documentado que la restricción proteínica durante la gestación afecta el metabolismo de lípidos en el hígado (51), lo cual puede generar la liberación ERO por la lipoxigenasa al suero materno.

Con respecto a la placenta, órgano que tiene una posición clave y directa en la programación fetal (7); se observó que las correspondientes a los fetos H del grupo R presentaron mayor actividad enzimática de SOD y GPx (Fig. 8-3 C y Fig. 8-3 E); así mismo el análisis grupal muestra que las pertenecientes al grupo R presentaron una más alta actividad enzimática estadísticamente significativa de SOD y GPx comparadas con el grupo C (Tabla 8-4, Fig. 8-3D y Fig. 8-3F). Este aumento,

puede explicarse como una respuesta del organismo por contrarrestar el EOX, que impacta en la sobreexpresión y activación del sistema antioxidante (105).

Se ha señalado que la eficiencia del sistema antioxidante en la placenta es de gran importancia ya que algunos autores opinan que la mayoría de las ERO son permeables a la membrana y pueden atravesar la placenta hacia el feto (62); otros proponen que las ERO al ser altamente reactivas tienen una vida útil muy corta de nanosegundos, por lo tanto no se transfieren de la placenta al embrión en desarrollo o al feto (85), sin embargo, ambas posturas coinciden en que los RL hacen gran daño al regular la expresión de receptores de citocinas en las células del endotelio vascular, citotrofoblásticas y musculares lisas (85). Las ERO tales como el óxido nítrico y el superóxido producido en las células de la placenta pueden regular y también alterar el desarrollo placentario y su función (69).

Los resultados obtenidos son congruentes puesto que se observó también mayor concentración de MDA en las placentas de fetos H provenientes del grupo R, con respecto a los fetos M del mismo grupo y al grupo C (Fig. 8-3 A), Por lo que los fetos del grupo R, como se aprecia en la Fig. 8-3 B (Tabla 8-4) muestran una concentración de MDA significativamente mayor al grupo C, esto indica que el desbalance antioxidantes oxidantes ha causado la lipoperoxidación de las membranas de células endoteliales, especialmente sensible a RL, como se muestra en varias patologías de el embarazo, tal es el caso de la preeclampsia y diabetes gestacional (62).

En este sentido nuestros resultados apoyan la postura que señala que en la gestación, un reto como lo es la restricción proteínica, podría tener un efecto un efecto subsecuente en la función de la placenta y por tanto en el crecimiento fetal y en el desarrollo (7) como algunos autores han señalado. Cabe destacar que en este caso, el reto fue aplicado durante todo el periodo de gestación pero retos aplicados en la placenta a diferentes tiempos podrían dar diferentes efectos (9).

Respecto a la determinación de parámetros en el hígado, los resultados mostraron mayor actividad enzimática de la SOD en el grupo R (Fig. 8-4 D), entre los cuales, los hígados de fetos M presentaron una mayor expresión con respecto a su control (Fig. 8-4 C), al igual que las H comparadas con el grupo C, pero estas con una menor concentración. De igual forma la actividad de la enzima GPx fue mayor en el hígado fetal del grupo R (Fig. 8-4 F), sin embargo en el caso de los hígados de fetos H provenientes del grupo R, fue mayor con respecto al grupo C (Fig. 8-4 E). Por lo que hay que recordar que las enzimas pueden alterarse en función de la demanda y la capacidad de respuesta.

Aunado a esto la lipoperoxidación en hígado fetal medida a través del MDA fue mayor en los hígados de fetos H provenientes del grupo R, con respecto a los fetos M y al grupo C (Fig. 8-4 A), dicho efecto se ve reflejado el análisis por grupo ya que los hígados fetales del grupo R presentan mayor lipoperoxidación respecto al grupo C (Fig. 8-4 B), lo cual concuerda con los resultados de las enzimas antioxidantes, que en conjunto sugieren que a pesar de que el sistema antioxidante se desarrolla con el avance de la edad gestacional, en los fetos del grupo R, hay cierta susceptibilidad o inmadurez que los predisponen al ataque oxidante lo cual se manifiesta con las alteraciones observadas respecto al grupo C, esto apoya la postura de que las ERO embrionarias causan cambios metabólicos embrionarios que provocan una mayor producción de ERO (85). Estos cambios metabólicos pueden ser iniciados por varios metabolitos maternos y la restricción proteínica. Siendo así que cuando existe un desbalance oxidante como en la restricción proteínica, el feto puede sufrir daño (85).

Estos datos coinciden con lo reportado previamente respecto al papel del hígado en el daño por ERO (72); estudios recientes realizados en hígado de embrión de humano se observó una alta actividad de SOD, y un aumento con base en la progresión de la gestación, así como una muy alta actividad de la GPx (62). Cabe destacar que estos resultados mayores en la actividad enzimáticas del hígado es

más alta que en la placenta, por el hecho de ser órgano de detoxificación del cuerpo.

Los resultados analizados hasta el momento en el presente trabajo indican un estado de adaptación al EOx en el que aun el sistema antioxidante manifiesta una sobreexpresión, sin embargo ya existe como tal el estrés que si continua ocasionará un agotamiento de los antioxidantes de bajo peso molecular y la reducción de la actividad enzimática, lo que resultará en lesiones de EOx que en el embrión en desarrollo podría inducir a retraso del crecimiento, anomalías o la muerte (87) (86).

Lo cual corrobora que la placenta y el feto son en gran parte vulnerables a la toxicidad de las ERO, resultando en un número de enfermedades obstétricas y complicaciones en embarazos (62), y posiblemente en la programación del desarrollo.

Cabe destacar que las placentas y los hígados de fetos H del grupo R, presentaron mayor concentración de MDA y mayor actividad enzimática de SOD y GPx, en la mayoría de los casos, por lo que estos resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el sexo femenino en el feto es un factor asociado a mayor daño por EOx tanto en la placenta como el hígado fetal, probablemente por la influencia hormonal, ya que en estudios previos resaltan que la malnutrición en etapas perinatales provoca, disminución de hormonas genéticamente establecidas para regular el crecimiento del feto y entre otras consecuencias, una anormal programación de el eje hipotálamo-pituitaria adrenal (HPA) (106); por otro lado nuestro grupo de trabajo, ha reportado anteriormente, la elevación de algunas hormonas como la progesterona en las madres pertenecientes al grupo R (19) lo cual puede impactar en los fetos, así mismo la exposición fisiológica en exceso a glucocorticoides programa a trastornos cardiovasculares, metabólicos y neuroendocrinos en la vida adulta (93). Sin embargo dada la falta de información en este sentido es necesario realizar mayor investigación que permita corroborar y explicar este hallazgo.

Cabe destacar que el presente estudio es el primero en demostrar el efecto de la restricción proteínica materna durante 19 dG sobre el EOx en placenta e hígado fetal de rata Wistar. Así como sugerir cierta influencia del sexo femenino del feto como factor que favorece el daño por EOx.

10. CONCLUSIÓN

La restricción proteínica materna durante la gestación incremento el daño oxidante en la madre así como en la placenta y el hígado fetal, lo cual sugiere al EOx como un posible mecanismo de programación negativa en el desarrollo del feto.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar el estrés nitrante en placentas e hígado fetales.
- Determinar el nivel al cual la dieta restringida materna afecta al feto, mediante la cuantificación de proteínas y grasa.
- Evaluar el impacto de la restricción al 50% de la cistina en las ratas gestantes, en la síntesis del glutatión (GSH).
- Valorar el efecto de las hormonas sexuales como un posible factor que favorece el daño por EOX tanto en la placenta e hígado fetal.

12. ANEXOS

A. FUNDAMENTO DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Es un método colorimétrico basado en el cambio de absorbancia de 466 nm a 595 nm de una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G250 (contenida en el reactivo de Bradford), cuyo fundamento es el virre del colorante que en presencia de ácido fosfórico posee un color pardo a un color azul intenso por la interacción relativamente inespecífica entre el colorante hidrofóbico y las proteínas (103).

B. FUNDAMENTO DE LA DETERMINACIÓN DE MDA (TBARS)

La lipoperoxidación es un mecanismo de daño a la membrana celular mediado por ERO, que provocan la destrucción de lípidos de membrana principalmente los AGPI y la producción de sus peróxidos correspondientes, que conlleva a la distorsión de su espacio hidrofóbico y pérdida funcional; el grupo hidroperóxido en el carbono alílico lleva a la ruptura de la cadena carbonada y a la formación de subproductos tales como el MDA y 4-HNE (104).

El método TBARS se basa en que el MDA a bajo pH y alta temperatura, reacciona con el TBA formando un aducto TBA-MDA-TBA cromógeno de color rojo que es detectable por espectrofotometría 532 nm (107). El homogeneizado se desproteinizó con TCA y para evitar la autoxidación de ácidos grasos no oxidados se añadió BHT (108).

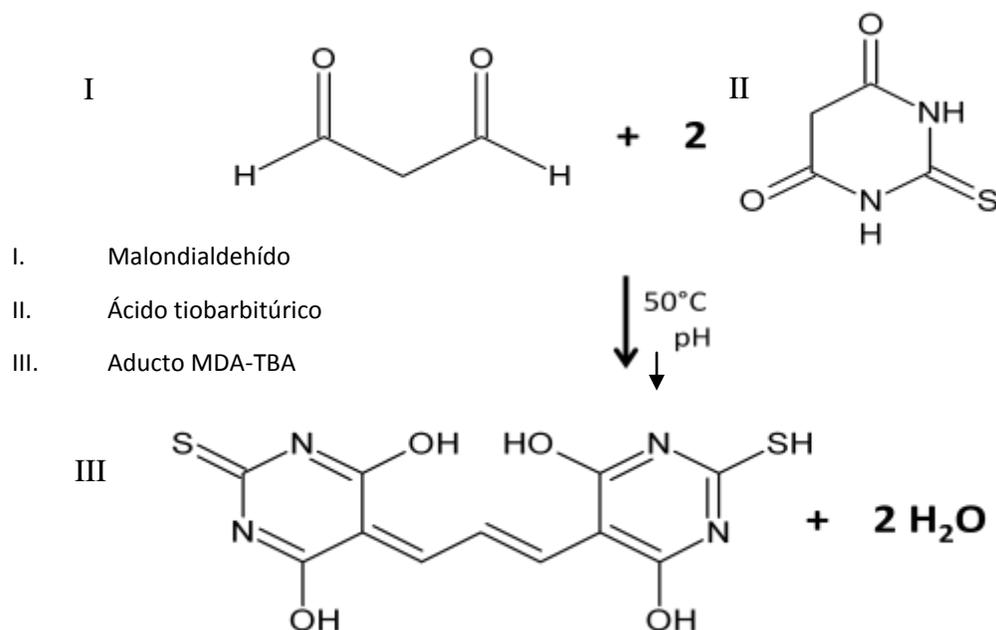


Fig. 12-1 Formación del aducto TBA-MDA-TBA por la reacción del MDA y el TBA a altas temperaturas y condiciones ácidas.

C. FUNDAMENTO: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD

La función de la enzima SOD es acelerar la dismutación del radical tóxico $O_2^{\bullet-}$, producido durante un proceso oxidante energético, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Este método emplea Xantina y XOD para formar el $O_2^{\bullet-}$ los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofebol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T) para dar lugar a un colorante rojo formazán (72) (109). Se midió la actividad de la SOD por el grado de inhibición de esta reacción.

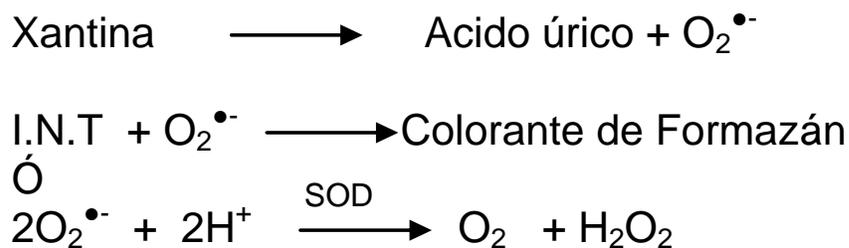


Fig. 12-2 Inhibición de la formación del rojo formazán por la enzima SOD

D. FUNDAMENTO: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GPx

La reacción empleada en la determinación de la actividad de la GPx se basa en el acoplamiento de la reacción catalizada por esta enzima (oxidación de GSH por el hidroperóxido de cumeno) a la reacción catalizada por la enzima Glutati6n Reductasa (GR) que consiste en la reducci6n de la GS-SG con la concomitante oxidaci6n de la NADPH a NADP⁺ (110) (111).

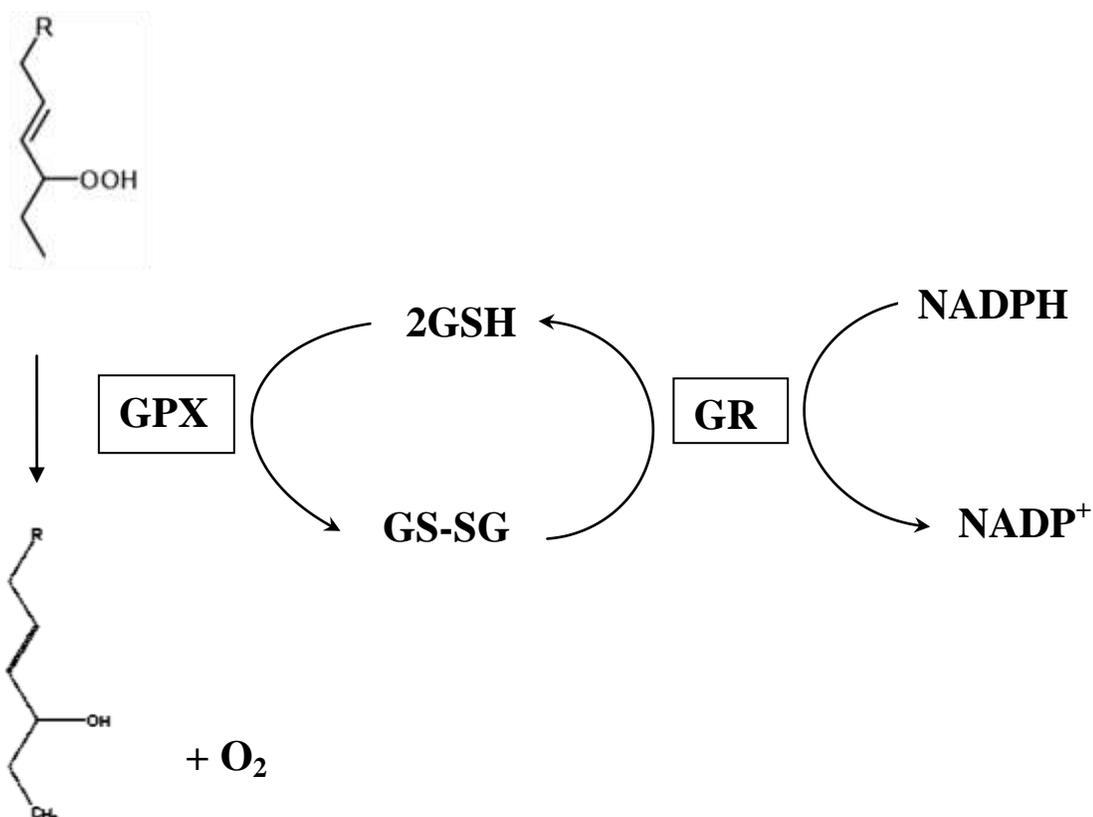


Fig. 12-3 La enzima GPx cataliza la reacci6n de los hidroper6xidos lip6dicos a sus alcoholes correspondientes o bien la reducci6n del per6xido de hidr6geno libre a agua, con la concomitante oxidaci6n del NADPH a NADP⁺.

13. Bibliografía

1. Rojas D, Salazar L. Efecto de la restricción calórico-proteica sobre la adipogénesis. *Biológicas*. 2009;(11): p. 22-8.
2. Encuesta Nacional de Nutrición 2012 resultados nacionales. México D.F.: Secretaria de Salud Pública; 2012.
3. Warner M, Ozanne S, al e. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J*. 2010; 3(427): p. 333-47.
4. Zambrano E, et. a. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol*. 2006; 571 (Pt1): p. 221-30.
5. Reusens B, & Remacle C. Intergenerational effect of an adverse intrauterine environment on perturbation of glucose metabolism. *Twin Res*. 2001a; 4(406-411).
6. Dahri S, al e. Islet dysfunction in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes*. 1991; 2(40): p. 115-20.
7. Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol*. 2006; 572: p. 25-30.
8. Al-Gubory K, Fowler P. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell*. 2010 Junio;(42): p. 1634-1650.
9. Myatt L. Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Functional Adaptation of the Placenta. *Placenta*. 2010;(31(suppl)): p. S66-S69.
10. Godfrey K, Barker D. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*. 2000;(71): p. 1344S-1352S.
11. Barker D. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Colch)*. 1998; 95: p. 115-28.
12. Schulz L. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *PNAS*. 2010 Septiembre; 107(39): p. 16757-8.
13. Stanner S, Yudkin J. Fetal programming and the Leningrad Siege Study. *Twin Res*. 2001; 4(5): p. 287-92.
14. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986; 1(8489): p. 1077-81.
15. Barker DJ, al e. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993; 341(8850): p. 938-41.
16. Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*. 1962; 14: p. 353-62.
17. Hales , CN , Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype. *Diabetología*. 1992; 35(7): p. 595-601.
18. A. L. The Childhood Environment and Adult Disease. In *CIBA Foundation Symposium 156*; 1991; Reino Unido.
19. Guzmán C, Zambrano E, et. a. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol*. 2006;(572.1): p. 97-108.

20. Zambrano E, et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol.* 2005; 566 (Pt 1): p. 225-36.
21. Zambrano E, Rodríguez G, et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol.* 2005; 563(1): p. 275-84.
22. Nyirenda M, Welberg L&SJ. Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect or maternal influence? *J Endocrinology.* 2001; 170: p. 653-660.
23. Holemans K, Aerts L&VAF. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol.* 2003; 547: p. 11-26.
24. Lan N, Yamashita F. Prenatal ethanol exposure alters the effects of gonadectomy on hypothalamic-pituitary-adrenal activity in male rats. *J Neuroendocrinol.* 2006; 8(9): p. 672-84.
25. Neitzke U, Harder T. A Intrauterine Growth Restriction in a Rodent Model and Developmental Programming of the Metabolic Syndrome: A critical Appraisal of the Experimental Evidence. *Placenta.* 2008.
26. Garafano B&RC. Intergenerational effect of an adverse intrauterine environment on perturbation of glucose metabolism. *Twin Res.* 2001a; 4: p. 1114-1120.
27. Claeysens S, Lavoigne A. Metabolic changes during early starvation in rats fed a low-protein diet in the postweaning growth period. *Metabolism.* 1992; 41: p. 722-7.
28. Hales J, Desai CN. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans.* 1996; 24: p. 341-50.
29. Tortora G, Grabowski S. *Principios de Anatomía y Fisiología México: Panamericana; 2002.*
30. Salvador N. *Biología general del reactivo biológico Madrid: Instituto Santiago Ramon y Cajal.*
31. Bowman A. *Conocimientos actuales sobre nutrición. 8th ed. Washington: Organización Panamericana de Salud; 2003.*
32. Maeda K, Ohkura S. *Physiology of Reproduction. In Krink G. The Handbook of experimental animals: The laboratory rat. USA: ACADEMIC PRESS; 2000. p. 145-76.*
33. Higashida H, Yushiko B. *Ciencias de la Salud México: Mc. Graw Hill; 2001.*
34. National Research Council, Subcommittee of Laboratory Animal Nutrition. *Nutrient Requirements of Laboratory Animal. 4th ed. Washington: National Academy Press Experimentales; 1995.*
35. Reeves PG, Nielsen FH, & Fahey GC. *AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. J. Nutr.* 1993; 123: p. 1939-51.
36. Zambrano E, Martínez P. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol.* 2010 mayo; 588: p. 1791-9.
37. Ota K, Yokoyama A. Body weight and food consumption of lactating rats nursing various sizes of litters. *J Endocrinol.* 1967;(38): p. 252-261.

38. Naismith DJ. The foetus as a parasite. *Proc Nutr Soc.* 1969; 28: p. 25-31.
39. Naismith DJ, Morgan BL. The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. *Br J Nutr.* 1976; 36: p. 563-6.
40. Bancon WE, Stanley WC. Effect of deprivation level in puppies on performance maintained by a passive person reinforcer. *J Comp Physiol.* 1963; 56: p. 783-5.
41. Catalano PM, A.J. T, et. a. Effect of maternal metabolism on fetal growth and body composition. *Diabetes Care.* 1988; 21: p. 85-90.
42. Langley E. Critical differences between two low protein diet protocol in the programming of hypertension in the rat. *Int J Food Sci Nutr.* 2000; 51(1): p. 11-7.
43. Galler J, Tonkiss J. Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 1991; 121(5): p. 762-9.
44. Langley S, Browne R, et. a. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol.* 1994; 109(2): p. 223-9.
45. Langley E, Gardner D, et. a. Association of disproportionate growth of fetal rats in late in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J Reprod Fertil.* 1996; 106(2): p. 307-12.
46. Fredrick J, Jansson N, et. a. Maternal Protein Restriction in the Rat inhibits Placental Insulin, mTOR, and STAT3 Signaling and Down-Regulates Placental Amino Acid Transporters. *Endocrinology.* 2011 Marzo; 152(3): p. 1119-1129.
47. Domortier. Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *O. Diabetología.* 2007; 50: p. 2495-2503.
48. Langley E, Garner D. Maternal protein restriction influences the programming of rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr.* 1996; 126: p. 1578-85.
49. Langley SC E, Jackson A. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Colch).* 1994; 86: p. 217-22.
50. Reyes LA, Rodriguez JS, et. a. Pre-and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behavioural Brain Research.* 2011;; p. 1-6.
51. Torres N, Bautista CJ, et. a. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 November.
52. Patel M, Srinivasan M, et. a. Metabolic programming by nutrition during early development. *Indian J Exp Biol.* 2000; 38(9): p. 849-55.
53. Vickers M, et. a. Fetal origins of hyperphagia, obesity and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279(1): p. R91-6.
54. Woodall S, Johnston B, et. a. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res.* 1996; 40: p. 438-43.
55. Robinson J, Moor V, et. a. Origins of fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000; 92: p. 13-9.
56. Mairesse J, Lasage J, et. a. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacenta unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Jun; 292(6).

57. Wallace J, Bourke D, et. a. Nutrient partitioning during adolescent pregnancy. *Reproduction*. 2001; 122: p. 347-357.
58. Plagemann A, et. a. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J Neuroendocrinol*. 1999; 11(7): p. 541-6.
59. Plagemann A, et. a. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res*. 1999; 836(1-2): p. 146-55.
60. Stanton LMN. Berne y Levy "Fisiología". 4th ed. Barcelona: Elsevier Imprint; 2006.
61. Hobbins JC, Reece AL. *Obstetricia Clínica/Clinical Obstetrics*. 3rd ed. Madrid: Médica Panamericana; 2007.
62. Suparna Q, Manju M. Ontogenic profile of some antioxidantes and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem*. 2000; 215: p. 11-19.
63. Genese F. *Histología: Sobre bases biomoleculares*. 3rd ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
64. Saunders. *Dorland`s Medical Dictionary for Health Consumers* : Copyright; 2007.
65. Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiología Médica México*: Mc Graw Hill; 2001.
66. Atalah E, Castillo C, et. a. Propuesta de un Nuevo Estándar de Evaluación Nutricional de Embarazadas. *Rev Med*. 1997; 125: p. 1429-1436.
67. Krause B, Sobrevia L, et. a. Papel de la placenta en la programación fetal de las enfermedades crónicas del adulto. In. *Santiago de Chile* p. 117-133.
68. Cross J, Mickelson L. Nutritional influences on implantation and placental development. *Nutr Res*. 2006; 64: p. 12-S8.
69. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122: p. 369-82.
70. Hicks J, Torres Y. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Endocrinol Nutr*. 2006 Diciembre; 14(4): p. 223-6.
71. Halliwell B, Whiteman M. Measuring species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Clin Pharmacol*. 2004; 142: p. 231-55.
72. Kakkar R, Mantha S, et. a. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci*. 1998; 94: p. 623-32.
73. Villa NA, Ceballos A. Radicales libres e infertilidad en el macho. *Vet Zootec*. 2007 J; Junio(2): p. 87-97.
74. Hernández Y, Delgado L, et. a. Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Endocrino Nutr*. 2010 Septiembre; 18(3): p. 153-8.
75. Mistry H, Williams P. The importance of Antioxidant Micronutrients in Pregnancy. *Oxid Med Cell Longev*. 2011 June.
76. O'Flaherty C, Beorelgui B, et. a. Participacion of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int Androl*. 2003; 26: p. 109-14.
77. Ames B N, Shigenaga M K, et. a. Oxidants, antioxidants, and the degenerative

- diseases of aging. *Acad Scie.* 1993; 90(17): p. 7915-22.
78. Krinski B, Yu B. Mechanism of action of biological antioxidants. *Pro Soc Exp Biol Med.* 2000;; p. 248-54.
 79. Gutierrez A. Estrés oxidativo en la la gestación: ¿una nueva óptica en la atención a la embarazada? *Rev Cubana Obstet Ginecol.* 2005; 31(1).
 80. Tsankova N, Renthal W, et. a. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2007 May; 8: p. 355-367.
 81. Darnaudéry M, Perez M, et. a. Insulin-like growth factor 1 reduces age-related disorders induced by prenatal stress in female rats. *Neurobiol Aging.* 2006 January; 27(1): p. 119-27.
 82. Dennery PA. Oxidative stress in development: Nature or nature? *Free Radical Biology & Medicine.* 2010;(49): p. 1147-51.
 83. Dennery PA. Role of redox in fetal development and neonatal diseases. *Antioxid & Redox Signaling.* 2004;(6): p. 147-153.
 84. Jauniaux E, Gulbis B, et. a. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus-a review. *Placenta* 24. 2003 April; 24: p. S86-S93.
 85. Ornoy A. Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod Toxicol.* 2007 April; 24: p. 31-41.
 86. Zaken V, Kohen R. The development of antioxidant defense mechanism in young rat embryos in vivo and in vitro. *Early Pregnancy Bio Med.* 2000;(4): p. 110-23.
 87. Ornoy A, Zaken V. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and LMWA may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology.* 1999;(60): p. 376-86.
 88. Hempstock J, Jauniaux E. The Contribution of Placental Oxidative Stress to Early Pregnancy Failure. *Hum Pathol.* 2003;(34): p. 1265-75.
 89. Barker D J. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007; 5(261): p. 412-7.
 90. Jansson T, Powell T. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci.* 2007; 113: p. 1-13.
 91. Reynolds L, Redmer D. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod.* 2001; 64(4): p. 1033-40.
 92. Alfaradhi Z M, Ozanne E. Developmental programming in response to maternal overnutrition (rev). *Frontiers in Genetics.* 2011 Junio; 2(27): p. 1-13.
 93. Seckl J. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J. Endocrinol.* 2004.
 94. Maccari S, Morley Fletcher S. Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology.* 2007 August; 32: p. S10-S15.
 95. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the edox state of the glutathione disulfide/ glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001;(30): p. 1191-212.
 96. Powers DE, Millman JR. Effects of oxygen on mouse embryonic stem cell growth, phenotype retention, and cellular energetics. *Biotechnol Bioeng.* 2008;(101): p.

241-54.

97. Simmons RA. Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2006;(40): p. 917-22.
98. Bouanane S, Benkalfat NB, et. a. Time course of changes in serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. *Clin. Sci.* 2009;(116): p. 669–80.
99. Hou JC, Min L, et. a. Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis. *Vitam Horm.* 2009;(80): p. 473-506.
100. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem. Soc Trans.* 2008;(36): p. 343-47.
101. Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1995;(64): p. 689-719.
102. Peterside IE, Selak MA, et. a. Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003;(285): p. E 1258-1266.
103. M B. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: p. 248-54.
104. Bornas A. Efecto Hipoglucemiante y Antioxidante del Extracto Acuoso del *Psidium guayaba* (Guayaba) en ratas diabéticas. TÁCNA. 2003.
105. Sánchez Rodríguez MA, Mendoza Nuñez VM, et. a. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo (ensayo). *Bioquímica.* 2004 Septiembre; 29(3): p. 81-8.
106. Pascual- Leone AM, Goya Suárez L. Síndrome metabólico y desarrollo perinatal: alteraciones corticoadrenales en: Desarrollo perinatal, origen de patologías adultas. Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España y Fundación Areces. ;: p. 27-69.
107. Draper HH, Squires EJ. A Comparative Evaluation of Thiobarbituric Acid Methods for the Determination of Malondialdehyde in Biological Materials. *Free Radic Biol Med.* 1993 Marzo; 15: p. 353-63.
108. Ohkawa H, Ohishi N, et. a. Assay for lipid peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: p. 351-8.
109. Sun Y, Peterson T, et. a. Improved superoxide dismutase assay for clinical use. *Clin Chem.* 1989; 35: p. 49-58.
110. Rudolf L, Otto E. Structure Analysis and Molecular Model of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 2-8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 1979; 134: p. 199-218.
111. Lawrence R, Burk R. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 71: p. 952-8.