



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LIPIDOS DE CADENA MEDIA Y NITROPRUSIATO  
DE SODIO SOBRE LOS NIVELES DE INDOLAMINAS Y DAÑO  
OXIDATIVO EN CEREBRO DE RATAS CON DIFERENTE  
CONDICION NUTRICIONAL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G A**

P R E S E N T A :

**IVONNE ROSARIO ESPITIA VAZQUEZ**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. DAVID CALDERON GUZMAN

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA 11  
MEXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Efecto de lípidos de cadena media y nitroprusiato de sodio sobre los niveles de indolaminas y daño oxidativo en cerebro de ratas con diferente condición nutricional.

realizado por Ivonne Rosario Espitia Vázquez

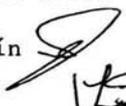
con número de cuenta 9302680-4 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

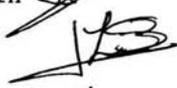
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Q.F.B. David Calderón Guzmán   
Propietario

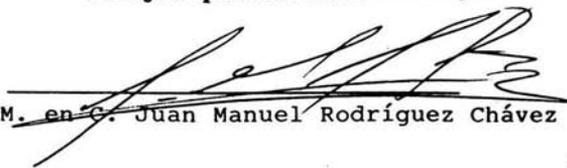
Propietario M. en C. Marco Antonio Martínez Avila 

Propietario Q.F.B. Hugo Mateo Juárez Olguín 

Suplente Biól. José Luis Busto Sánchez 

Suplente Biól. Silvia Bautista Hernández 

Consejo Departamental de Biología

  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGIA

A MIS PADRES

ELOINA Y NAZARIO

GRACIAS POR DAME LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR MIS PROPIOS SUEÑOS (AUN QUE TENGA TROPIEZOS), GRACIAS POR LA FAMILIA QUE ME DIERON Y MUCHAS GRACIAS POR TODOS SUS ESFUERZOS, SACRIFICIOS Y EL AMOR QUE NOS BRINDAN, LOS QUIERE Y ADMIRA.

IVONNE

ENSEÑARÁS A VOLAR,  
PERO NO VOLARÁN TU VUELO.  
ENSEÑARÁS A SOÑAR,  
PERO NO SOÑARÁN TU SUEÑO.  
ENSEÑARÁS A VIVIR,  
PERO NO VIVIRÁN TU VIDA.  
SIN EMBARGO...  
EN CADA VUELO,  
EN CADA VIDA,  
EN CADA SUEÑO,  
PERDURARÁ SIEMPRE LA HUELLA  
DEL CAMINO ENSEÑADO."

MADRE TERESA DE CALCUTA

A MIS QUERIDOS HERMANOS:

ERIKA, MARCO POLO, MARCO ANTONIO Y TRINIDAD

GRACIAS POR APOYARME SIEMPRE Y TENER FE EN MI, LOS QUIERO MUCHO Y SIEMPRE ESTAN EN MI CORAZÓN, PERDON POR NO ESTAR JUNTOS Y POR MIS ERRORES, LOS QUIERE Y ADMIRA: MANNY.

A MIS ABUELITOS OLIVA<sup>†</sup>, JOSEFA, FIDEL Y NAZARIO<sup>†</sup>

MUCHAS GRACIAS POR DARME A LOS MEJORES PAPIS DEL UNIVERSO Y POR TODO SU CARÍÑO, AMOR Y APOYO. SIEMPRE LOS RECUERDA: MOSSHO

GRACIAS A MIS TIOS QUIENES SIEMPRE ME APOYARON, ESCUCHARON Y ANIMARON.

GRACIAS A MIS PRIMOS POR SER UN ALICIENTE, ESPERO QUE ESTE PASO SEA MOTIVO DE UNA GRAN CARRERA PARA TODOS NOSOTROS. LOS QUIERO MUCHO.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS A QUIENES LES AGRADEZCO INFINITAMENTE LAS PALABRAS, LAS ACCIONES QUE TUVIERON PARA CONMIGO, POR ENSEÑARME NO SOLO EL CAMINO ESCOLAR, TAMBIEN EL CAMINO DE LA VIDA, GRACIAS A TODOS:

A LOS AMIGOS Y PROFESORES DEL CCH POR LOS BUENOS MOMENTOS QUE PASAMOS, PERO MUY EN ESPECIAL A MI QUERIDISIMA CHILVIUS, GRACIAS POR ESTAR CONMIGO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS, POR REIR Y LLORAR A MI LADO, TE QUIERO MUCHO AMIGA.

A ROSA F. Y A CARMEN L., GRACIAS POR ESTAR CONMIGO Y ENSEÑARME LA LOCURA DE VIVIR, MUCHAS GRACIAS POR QUE SIEMPRE APRENDI COSAS POSITIVAS DE USTEDES.

GRACIAS A LAS FAMILIAS DE MIS AMIGOS QUE ME ABRIERON LAS PUERTAS DE SU CASA: BAUTISTA-HERNADEZ, MARTINEZ-PARRA, ALVARADO-ALVAREZ, GARCIA-RESENDIZ, HERNANDEZ-HERRERA, ALAVEZ-LOPEZ.

A LULU Y A DOÑA AURE, GRACIAS POR TODO LO QUE HAN HECHO POR MI Y POR EL APOYO QUEME BRINDARON. MUCHAS GRACIAS.

A ROSY, LULA, JOSE LUIS Y ROBERTO, GRACIAS POR SER TAN LINDOS CONMIGO.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, QUE DESDE EL BIOTERIO HASTA EL SOTANO ME HAN APOYADO Y ORIENTADO, A TODOS ELLOS, MUCHAS GRACIAS.

GRACIAS AL DR. AYALA, A GRACIELA, A DON ELIAS Y LEONEL, POR LA OPORTUNIDAD QUE ME BRINDARON EN SU LABORATORIO, POR LO QUE ME PERMITIERON APRENDER, POR EL APOYO Y LA AMISTAD QUE ME OFRECIERON.

GRACIAS A JOSE LUIS, RAUL, MIGUEL ANGEL, EME, NORMA L., GABRIELA, EDNA, VERONICA, ALINE, GABRIEL, MARIANO, MIRÍAN, CARMEN, JANET, MAYRA, SIXTO, FRANCIS, ESPERANZA, JAIRO, ALEJANDRA M., B. ALEJANDRA, CATALINA, PABLO, EDGAR, RAQUEL, SILVIA Y A QUIENES ME BRINDAN EL APOYO Y LAS PALABRAS DE ANIMO QUE SON MI ALICIENTE.

GRACIAS A DANIEL POR DARME LA OPORTUNIDAD DE ENTRAR EN ESTE GRUPO DE TRABAJO Y POR ESCUCHARME CUANDO MÁS NECESITABA SER ESCUCHADA.

GRACIAS GERARDO, POR LA AYUDA BRINDADA EN ESTE TRABAJO Y POR TODAS TUS PALABRAS QUE ME GUIAN, POR TOMARTE EL TIEMPO PARA CONVERSAR.

GRACIAS DAVID, POR TODO TU APOYO, CONOCIMIENTO, TIEMPO, PALABRAS Y ENERGÍA PARA QUE SE REALICEN LOS TRABAJOS EN NEUROQUIMICA, TE ESTOY MUY AGRADECIDA POR PERMITIRME TRABAJAR CONTIGO, A PRENDER DE TÍ Y POR IMPULSARME EN ESTA AREA. MUCHAS GRACIAS POR TODO LO QUE ME HAZ BRINDADO.



A TÍ MI RAZON DE SER, A TI QUE TE DEBO TANTO, GRACIAS POR QUE DESDE QUE ESTAS EN MI TODO ES DIFERENTE, NO SOLO CAMBIASTE MI MUNDO SI NO MI VIDA MISMA, ERES LO MEJOR QUE TENGO, ERES LO UNICO QUE DESEO, POR ELLO QUISIERA ADIVINAR TUS ANTOJOS Y DE SUBITO EN ELLOS TRANSFORMARME, SER TU SUEÑO Y APODERARME DE TODOS TUS RICOS DESPOJOS, AIRE SUTIL QUE CON TUS LABIOS ROJOS TUVIERAS QUE BEBERME Y RESPIRARME, PODER ASOMARME A LAS CLARAS VENTANAS DE TUS OJOS. QUISIERA SER LA MUSICA QUE TE CALMA, TE ADULA EL CORAZON, MAS NADA ESTAN DULCE COMO SER TU AMANTE, PUES TUS CARICIAS SON EL LENGUAJE CON QUE ME HABLAS Y NO QUISIERA QUE CALLES, LA CARICIA NO ES LA COPIA DE OTRA LEJANA, ES UNA NUEVA VERSIÓN MEJORADA. COMO LOS BESOS QUE TE DOY CON LA MIRADA, BESOS QUE PRODUCEN DESVARIOS DE AMOROSA PASIÓN ARDIENTE Y LOCA, TU LOS CONOCES BIEN, SON BESITOS MIOS, INVENTADOS POR MÍ, PARA TU BOCA ... GRACIAS POR TODO, NUNCA PODRÉ COMPENSAR TODO LO QUE HACES POR MÍ, ERES TODO MI SOL, MI LUNA, MI NOCHE, MI DIA, EL AIRE DEL CUAL VIVO, LA RAZON DE MIS SUSPIROS, ESTAS PALABRAS INTENTAN DESCRIBIRTE LO QUE SIGNIFICAS PARA MÍ, AVECES SIENTO QUE NO BASTA LO QUE HAGO AUN QUE TAMBIEN NO TE QUIERO ABRUMAR, PERDONA MIS IMPULSOS DE NIÑA, SOLO QUIERO QUE RECUERDES SIEMPRE QUE COMO ESTAS PALABRAS QUEDARÁN IMPRESAS POR EL RESTO DE LOS DÍAS, YO TE AMARÉ EL RESTO DE MIS DIAS Y MÁS ALLA.

## Indice

1. Resumen	
2. Introducción	1
3. Objetivos	11
4. Hipótesis	12
5. Material y métodos	
5.1. Técnica I. Medición de hemoglobina (Hb)	14
5.2. Técnica II. Medición de peroxidación de lípidos (TBARS)	15
5.3. Técnica III. Medición de glutatión reducido (GSH)	15
5.4. Técnica IV. Medición de serotonina (5-HT) y triptófano (TRP)	16
6. Resultados y Análisis estadístico	19
6.1. 1. Gráfica 1a. Registro de peso corporal promedio semanal	19
6.1. 2. Gráfica 1b. Registro de peso corporal promedio semana 5	20
6.2. Gráfica 2. Niveles de hemoglobina (Hb)	21
6.3. Gráfica 3. Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS)	22
6.4. Gráfica 4. Niveles de glutatión reducido (GSH)	23
6.5. Gráfica 5. Niveles de serotonina (5-HT)	24
6.6. Gráfica 6. Niveles de triptófano (TRP)	25
7. Discusión y conclusiones	25
8. Referencias	28
9. Anexos	
10.1. Anexo 1. Lípidos Ivelip (Baxter)	I

10.2. Anexo 2. Dieta comercial de bioterio: LabDiet 5001 (24% de contenido proteico)	II
10.3. Anexo 3. Dieta hipoproteica (7% de contenido proteico)	III
10.4. Anexo 4. Contrastes de Dunnett (SPSS)	IV
Tabla 1. Contrastes significativos obtenidos de los pesos corporales Promedio	IV
Tabla 2. Contrastes significativos obtenidos para los niveles de hemoglobina	V
Tabla 3. Contrastes significativos obtenidos para los niveles de peroxidación de lípidos	VI
Tabla 4. Contrastes significativos obtenidos para los niveles de glutatión reducido	VII
Tabla 5. Contrastes significativos obtenidos para los niveles de serotonina	VIII
Tabla 6. Contrastes significativos obtenidos para los niveles de triptófano	IX
10.5. Anexo 5. Curva estándar de glutatión reducido (GSH)	X
10.6. Anexo 6. Curva estándar de serotonina	XI
10.7. Anexo 7. Curva estándar de triptófano	XII

## **Resumen.**

**Introducción.** La desnutrición resulta de una inadecuada disponibilidad de nutrientes ya sea por una dieta deficiente, por trastornos digestivos, problemas de absorción u otras. A nivel mundial representa un problema de salud pública, y en México ocupa un lugar relevante según la última encuesta nacional de nutrición en 1999. Esta condición entre otros padecimientos, induce daño en el sistema nervioso y estrés oxidativo, es por ello que el uso de antioxidantes, suplementos alimenticios o la administración de lípidos, como el producto comercial llamado Ivelip, resulta ser una alternativa para sujetos con dietas deficientes en nutrimentos. **Objetivo** Evaluar el efecto de lípidos de cadena media (LCM) (en la presentación comercial Ivelip 20%), como una alternativa para la desnutrición ocasionada por una dieta baja en proteínas y en presencia de un donador de óxido nítrico, como lo es el nitroprusiato de sodio (NTP), midiendo los niveles de peroxidación de lípidos por medio de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatión reducido (GSH), serotonina (5-HT) y triptófano (TRP) en cerebro de ratas jóvenes, así como también los niveles de hemoglobina (Hb) en sangre. **Material y métodos.** En el presente estudio se emplearon 74 ratas Wistar macho de 21 días de edad, 37 animales se alimentaron con dieta comercial de bioterio (23.4% de proteína) y 37 con dieta hipoproteica (7% de proteína) e isocalórica, formando los siguientes grupos para cada dieta: grupo control aplicando solo NaCl 0.9% intraperitonealmente (i.p.) (n=10) un grupo tratado con NTP (20 µg /kg i.p.) (n=10), ambos administrados diariamente durante cinco días antes de su sacrificio, un grupo con LCM en un preparado comercial llamado Ivelip 20%, Baxter (280 mg /kg i.p.) (n=10) y un grupo con LCM + NTP (n=7). Los

animales fueron sacrificados por decapitación y el cerebro homogeneizado para medir los niveles de GSH, 5-HT y TRP por cromatografía de líquidos de alta resolución, TBARS y Hb por medio de espectrofotometría. Además, se llevó a cabo un registro del peso corporal durante el estudio. Para analizar los resultados se utilizó la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA), realizando los contrastes por el método de Dunnett cuyos valores obtenidos de la significancia de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. **Resultados.** El peso corporal de los grupos desnutridos (DN) disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ), respecto a los grupos bien nutridos (BN). Los niveles de Hb se incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los grupos que recibieron LCM tanto BN como DN, respecto a sus grupos control, los niveles de 5-HT aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los grupos DN, respecto a los grupos BN, los niveles de TRP se incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los grupos de animales BN + LCM, respecto a sus controles, los niveles de TBARS aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los grupos DN sin LCM, con respecto a los grupos BN sin lípidos, finalmente, los niveles de GSH se incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los grupos de animales DN sin lípidos, respecto a todos los grupos BN. **Conclusiones.** Estos resultados permiten sugerir que la desnutrición es una condición que altera el sistema serotoninérgico e induce daño oxidativo en el cerebro.

## **Introducción**

La desnutrición es una condición fisiológica que se presenta cuando un organismo no está obteniendo los nutrimentos suficientes, esta puede resultar ya sea del consumo de una dieta inadecuada o mal balanceada, por trastornos digestivos, problemas de absorción entre otras. La desnutrición es un problema de salud pública (1) que afecta a la población mundial, la Organización Mundial de la Salud calculó que 468 millones de niños en el mundo padecen este problema. En México esta condición ocupó para 1996 la quinta causa de mortalidad infantil, y sigue ocupando un lugar relevante de acuerdo a la última encuesta nacional de nutrición realizada en 1999 (2). Para ese mismo año el Instituto de Salud Pública estimó que 4 480 100 niños menores de cinco años presentaban algún grado de desnutrición y de ellos el 18 % sufren desnutrición de alto riesgo. La desnutrición puede considerarse leve como para no presentar síntomas o tan grave que el daño ocasionado sea irreversible, a pesar de que el organismo pueda mantenerse con vida. Cuando esta condición nutricional es causada por la inadecuada cantidad de proteínas (3), ocasiona una elevada mortandad y morbilidad de las enfermedades infecciosas (4,5). Además de causar importantes alteraciones como la hipoplasia del timo y una reducción variable en el número y la actividad de los linfocitos T, también altera el Sistema Nervioso (SN) (6,7). Se menciona que se presenta una reducción de tamaño en las células somáticas en el Sistema Nervioso Central (SNC), afecta la mielinización (8), por lo que hay una reducción de sinapsis en el raquídeo dorsal en animales gestantes y posnatales (3,6,7). En humanos de entre el primero y segundo año de vida, ocurre el retardo en estatura que no se recupera (3), además de inducir un déficit en la cantidad de ácido

desoxirribonucleico (DNA), fosfolípidos, esfingolípidos así como de proteínas nucleares, hipertensión y anomalías cardiovasculares en humanos y animales experimentales (6), la desnutrición también es causal de estrés oxidativo (EO) (3,9,10).

El EO se presenta cuando hay un desequilibrio entre la producción de radicales libres (RL) y antioxidantes (AO); ambos se producen de manera normal en los procesos metabólicos, y cumplen una importante función en varios procesos homeostáticos como intermediarios en reacciones de óxido-reducción (redox) las cuales son esenciales para la vida, la destrucción de microorganismos por fagocitosis, la síntesis de mediadores inflamatorios y la detoxificación constituyen algunos ejemplos; las concentraciones bajas de RL son beneficiosas e incluso indispensables, sin embargo, en cantidades excesivas son tóxicas, afortunadamente los organismos poseen un sistema AO protector que se compone de enzimas y nutrientes esenciales cuya función es evitar la formación de RL, capturar aquellos que se han formado y remover o reparar las biomoléculas dañadas. La mayoría de los RL proceden de las reacciones metabólicas normales y se pueden incrementar por factores externos, pero su producción, accidental o deliberada se localiza en cuatro fuentes claramente definidas:

a) Durante el metabolismo aeróbico normal, las mitocondrias consumen oxígeno molecular y lo reducen secuencialmente hasta producir agua, una pequeña fracción del oxígeno se metaboliza vía reducción univalente y los inevitables productos intermediarios de esta reacción son el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el hidroxilo ( $\cdot OH$ ).

b) Los peroxisomas que contienen acetil-coA oxidasa, dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, urato oxidasa y otros, generan  $H_2O_2$  como producto intermediario.

c) El sistema enzimático del citocromo P-450 constituye una defensa primaria contra varios xenobióticos y sustancias endógenas que aumentan la producción de RL.

d) Los aniones superóxidos pueden ser producidos cuando los fagocitos (monocitos, neutrófilos y macrófagos) destruyen células infectadas con bacterias o virus, mediante una descarga oxidante compuesta básicamente por  $H_2O_2$ , hipoclorito ( $HClO^-$ ),  $O_2^-$  y óxido nítrico (por sus siglas en inglés, Nitric Oxide, NO) (11).

La mayoría de las macromoléculas biológicas pueden ser oxidadas, sin embargo, las biomoléculas más lábiles son los lípidos. La lipoperoxidación ó peroxidación de lípidos (LPO) se ha precisado en los sistemas biológicos, este ocurre bajo un control enzimático o no enzimático; esta última forma es la que se relaciona con el estrés oxidativo y el daño celular. La LPO es particularmente destructiva, e inicia cuando las especies reactivas al oxígeno atacan a un ácido graso polinsaturado (AGP) y le arrebatan un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el RL de ácido graso. Rápidamente esta molécula adiciona oxígeno y se transforma en un RL peroxilo de ácido graso que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros AGP e inicia nuevas reacciones (12). Los productos finales de la LPO son lípidos peroxidados que al degradarse originan nuevos RL y una amplia variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxinonal (4-HNE) y malondialdehído (MDA), aunque este último presenta baja toxicidad. Las

consecuencias del daño en la estructura molecular del AGP son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas celulares o subcelulares y que alteran su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica (12). También las proteínas constituyen un blanco para los RL, aunque su acción es menos dramática debido al lento proceso de reacciones, por ejemplo, dado que el contenido intracelular del ion  $\text{Ca}^{+2}$  es habitualmente diez mil veces menor en comparación con su concentración extracelular, y cualquier perturbación que afecte su transporte altera significativamente la función celular. La enzima  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa, es la encargada de mantener los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$ , ya que un incremento en estos niveles estimula la activación de proteasas que atacan al citoesqueleto, y de nucleasas que fragmentan al DNA. En resumen, la lesión celular acontece como producto del daño que causa sobre las biomoléculas que conforman distintas estructuras, pero particularmente por las alteraciones producidas en la membrana que alteran su función metabólica ya sea por la pérdida de la actividad catalítica o cambios en la polaridad de las proteínas, enzimas de membrana, modificación de canales iónicos, alteración de los canales asociados a respuestas hormonales y neurotransmisores, la unión covalente de los RL con receptores o biomoléculas que modifican la estructura antigénica celular (11). El estrés oxidativo además puede contribuir al desarrollo de disfunciones cardiovasculares, que se caracterizan por inducir hipertensión o hipotensión, dificultando que exista una homeostasis en el organismo (13) y ocasionar graves daños a la salud; uno de los fármacos conocidos por su actividad antihipertensiva, es el NTP (14,15,16), cuya función es incrementar los niveles de NO endógeno, y controlar la tensión arterial (TA), en pacientes con inmadurez pulmonar.

El NO es sintetizado por una gran variedad de órganos (se puede encontrar en el endotelio vascular como un citoprotector) y tejidos incluyendo al cerebro, donde recientemente ha sido designado neurotransmisor (17,18), el cual se obtiene a partir de L-arginina por medio de la enzima citoplásmica óxido nítrico sintasa (NOS), dependiente de calcio. De una forma más clara (Fig. 1) se puede concluir que para la formación del NO interviene el aminoácido L-arginina y la incorporación de oxígeno molecular ( $O_2$ ), formándose el intermediario inestable llamado  $N^G$ -hidroxi-L-arginina que posteriormente se transforma en L-citrulina, proceso en el cual interviene el nicotin-adenocin-dinucleótido reducido (NADPH) que se oxida a nicotin-adenocin-dinucleótido (NADP+), L-citrulina y NO, este último es dependiente de la concentración de  $O_2$  presente en este sitio de acción (18).

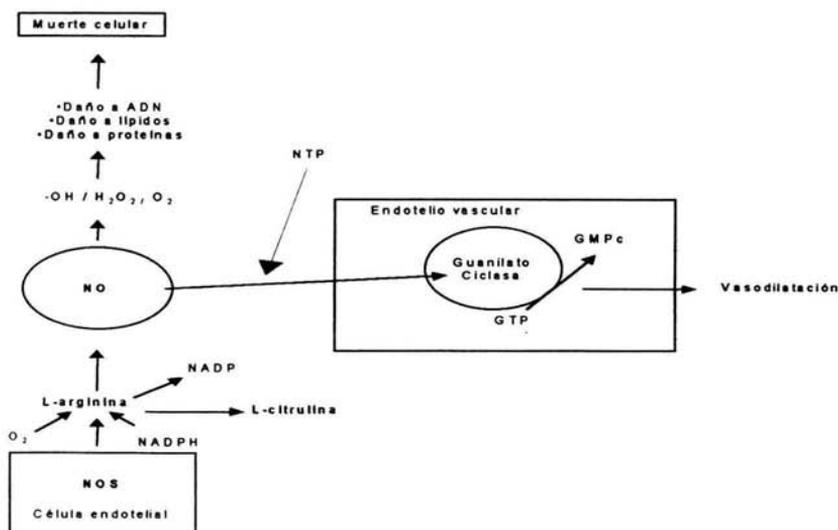


Fig. 1. Esquema que representa la formación del NO, el cual se obtiene a partir de la L-arginina y que en presencia de otros radicales libres ocasiona daño celular, además de que el NO participa en la vasodilatación, el nitroprusiato de sodio es un donador de NO.

El  $\text{NO}^-$  puede servir como agente reductor y oxidante, muestra alta afinidad por las proteínas hemáticas como la guanocilasa (Fig. 1), se ha observado que en bajas concentraciones funciona como neurotransmisor pero en altas concentraciones es dañino, ya que tiene desapareado un electrón en su órbita externa y es considerado un RL con una vida media de seis segundos, capaz de reaccionar con el agua endógena y dar lugar a nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ).

Cuando los RL superan las defensas AO favorecen el desarrollo de algunas enfermedades. La hipertensión pulmonar es una enfermedad que induce la falta de oxigenación en pacientes que la padecen, ocasionando graves problemas de salud. Algunos estudios sugieren que los sujetos desnutridos que padecen disfunciones cardiovasculares se verán beneficiados con el uso de NO (13), debido a que este es un efectivo vasodilatador (20, 21).

El  $\text{NO}^-$  es un precursor del trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) formando  $\text{NO}_2$  y nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ), (Fig. 2) por ello resulta letal la familia de los compuestos reactivos llamados colectivamente "especies reactivas del nitrógeno" de manera análoga al  $\text{O}_2^-$  y su familia de "especies reactivas al oxígeno", pues resulta crítica la regulación de la oxidación lipídica inducida por estas familias, aunque el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) es una especie más citotóxica que sus originarios  $\text{NO}^-$  y  $\text{O}_2^-$ .

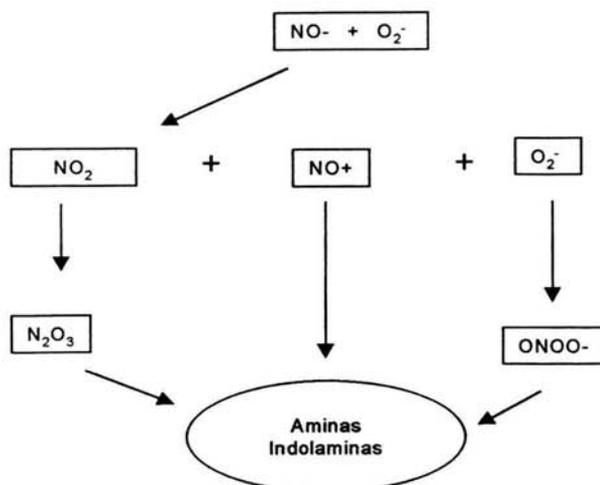


Fig. 2. Representación de la formación del  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{NO}^+$  el cual nitra a las aminas e indolaminas.

La interacción del NO con el glutatión reducido (g-L-glutamyl-L-cisteinil-glicina, GSH), forma S-nitrosoglutatión (GNSO), dependiendo de la presencia de oxígeno endógeno (21,22,23), esta interacción se explica como consecuencia del catabolismo del NO, el cual necesita de GSH para su difusión celular, esta pequeña molécula es un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y constituye el compuesto tiol de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos, sus propiedades químicas le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno y especies reactivas al carbono, además se ha comprobado su participación clave en numerosos desórdenes neurodegenerativos. El glutatión (G) es el principal regulador del

equilibrio redox, y colabora en la protección de los tejidos que están expuestos a los agentes oxidantes, debido a que los RL tienen un efecto dañino sobre los lípidos de la membrana celular (10). El sistema nervioso es particularmente susceptible a este daño oxidativo y depende de la presencia de G, durante el desarrollo, pues juega un papel importante el metabolismo del cerebro y el crecimiento durante éste (22), se considera la relación del glutatión reducido/ glutatión oxidado, como un indicador de estrés oxidativo (23). Es relevante la participación del GSH en la homeostasis celular (24) así como en diversos procesos biológicos: como la síntesis de proteínas, catálisis de enzimas, transporte membranar, acción receptora, intermediario del catabolismo y maduración celular.

Estudios recientes reportan que la desnutrición proteica altera significativamente los niveles de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) en cerebro de animales experimentales (26,27). La serotonina es una amina aromática, que pertenece a la familia de las indolaminas, la cual es sintetizada a partir del aminoácido L-triptófano (TRP) endógeno, es hidroxilado por medio de la enzima triptófano-5-hidroxilasa (T5H) (26). El TRP una vez absorbido en el tracto gastrointestinal se distribuye a los tejidos de todo el organismo y por las distintas membranas, incluyendo la barrera hematoencefálica, esta absorción se realiza por competencia de transporte con el aminoácido tirosina, consecuentemente, su concentración final en el SNC depende de un estricto balance dietario, lográndose un ritmo circadiano propio el cual se encuentra bajo la influencia del ciclo luz/oscuridad, mediado por la glándula pineal, responsable de la nitrometilación de la serotonina a melatonina, considerada esta última molécula como un excelente

atrapador de RL, la cual penetra distintas barreras intracelulares y se acumula en los núcleos donde protege al DNA de estos radicales. La serotonina es producida localmente en el SNC y se halla en grandes concentraciones en los núcleos de rafé, dado que no atraviesa la barrera hematoencefálica como lo hace el TRP (fig. 3). La serotonina participa en la regulación de muchas funciones fisiológicas, entre ellas el ciclo normal de vigilia/sueño (28,29), y también participa en mecanismos bioquímicos relacionados con la anorexia o ingesta deficiente de proteínas de pacientes hospitalizados con disfunciones cardiovasculares (21) o con síndrome urémico (30).

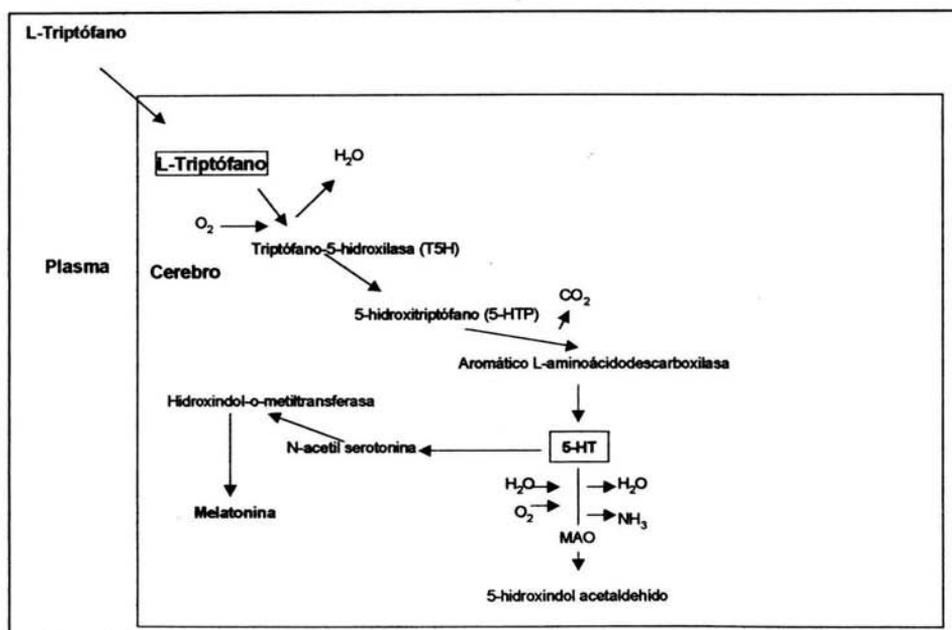


Fig. 3 Representación de la síntesis de la serotonina y sus metabolitos a partir del triptófano.

El sistema límbico contiene niveles particularmente elevados de serotonina, lo cual indica su implicación en la conducta emocional y se involucra también en la termorregulación, funcionamiento cardiovascular, vómito, conducta sexual, regulación de la función motora en la médula espinal. La serotonina es el principal mediador inhibitor del núcleo hipotalámico ventro-medial que regula la ingesta y saciedad de alimentos.

En 1971 Dudrick propuso utilizar la alimentación parenteral en los pacientes que no pueden, no deben o no quieren alimentarse por vía oral/enteral o cuando estas vías resultan insuficientes, en otras palabras todo paciente que no cubra sus requerimientos de energía y de proteínas por vía digestiva son candidatos a recibir alimentación parenteral. Se sabe que la alimentación parcial complementaria se basa en un concepto útil: la administración de calorías y/o electrolitos y/o proteínas con el objeto de cubrir los requerimientos nutricionales, especialmente se les utiliza cuando se requiere aumentar el aporte proteico. La alternativa usada por mucho tiempo para combatir la desnutrición es el suplemento de lípidos de cadena larga (LCL), aunque algunos estudios sugieren que influyen de manera importante en la maduración de la función cortical en el sistema nervioso. Su principal desventaja es la mala absorción que dificulta a su vez la biodisponibilidad. Actualmente se utilizan como opción los lípidos de cadena media (LCM) para formulaciones enterales para niños (31), por ser considerados fuente de energía más segura y eficiente. Los lípidos son fuente de energía para el organismo, son muy eficaces en el almacenamiento de esta; a igualdad de peso, la cantidad de adenosintrifosfato (ATP) que se obtiene de la oxidación de los triglicéridos es dos veces y media superior a la correspondiente al glucógeno. Los

LCM o triglicéridos de cadena media, son ésteres formados por el alcohol trihidroxílico glicerol con los ácidos grasos y están formados por 6 y 12 carbonos, los cuales se obtienen de aceite de palma y coco (32). Son de mayor solubilidad que los LCL, así que su hidrólisis en el intestino es más fácil y su digestión se favorece porque no requieren de carnitina (33), cuya función principal es la oxidación de grasas ya que transporta a los ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial para su metabolismo. La utilización de los LCM en una mezcla comercial llamada Ivelip al 20 %, Baxter (Anexo 1), la cual esta indicada como fuente de calorías y de ácidos grasos esenciales polinsaturados que componen la mezcla: ácido linoléico, ácido oléico, ácido palmítico, ácido  $\alpha$ -linolénico y ácido esteárico. Basándonos en lo anteriormente descrito, se propone utilizar a los lípidos de cadena media para proteger al organismo de animales experimentales del estrés oxidativo, inducido por la ingesta deficiente de proteínas y la presencia de un donador de óxido nítrico en cerebro de ratas jóvenes.

#### **Objetivo General.**

Evaluar el efecto de lípidos de cadena media (Ivelip 20%) y nitroprusiato de sodio en animales con diferente condición nutricional sobre los niveles de peroxidación de lípidos, glutatión reducido, serotonina, triptófano y hemoglobina de ratas jóvenes.

#### **Objetivos particulares.**

❖ Evaluar mediante el registro del peso corporal promedio y la medición de los niveles de hemoglobina en sangre, la condición nutricional de animales con una dieta comercial de bioterio (23.4% de contenido proteico) y

una dieta hipoproteica (7% de proteínas) e isocalórica con administración de lípidos de cadena media y en presencia de nitroprusiato de sodio.

❖ Determinar los niveles de peroxidación de lípidos en homogenados de cerebro de ratas sometidas a diferente condición nutricional y con administración de lípidos de cadena media y en presencia de nitroprusiato de sodio.

❖ Relacionar los niveles de glutatión reducido en homogenados de cerebro de animales con diferente condición nutricional y con administración de lípidos de cadena media y en presencia de nitroprusiato de sodio.

❖ Evaluar los niveles de las indolaminas (serotonina y triptófano), en homogenados de cerebro de ratas sometidas a diferente estado nutricional y con administración de lípidos de cadena media y en presencia de nitroprusiato de sodio.

### **Hipótesis.**

La administración de lípidos de cadena media (Ivelip 20%) hará que los niveles de peroxidación de lípidos, serotonina y triptófano en cerebro de ratas desnutridas se encuentren en sus niveles normales, aún en presencia de nitroprusiato de sodio.

### **Material y métodos.**

En el presente estudio de tipo: transversal, prospectivo, comparativo (34) y experimental con diseño 4 x 2, se utilizaron 74 ratas *Wistar* macho de 21 días de edad, las cuales fueron distribuidas en dos condiciones nutricionales: bien nutridos (BN) con dieta comercial de bioterio (*LabDiet 5001*) con 23.4% de proteína (Anexo 2) y desnutridos (DN) con dieta de 7% de proteína (27,35) (Anexo

3), subdivididos en 4 grupos para cada condición nutricional, formando los siguientes grupos:

Condición nutricional	Control (NaCl 0.9%)	Nitroprusiato de sodio (NTP)	Lípidos de cadena media (LCM) <i>Ivelip</i>	LCM + NTP
Bien nutridos (BN)	<b>Grupo A</b> n=10	<b>Grupo B</b> n=10	<b>Grupo C</b> n=10	<b>Grupo D</b> n=7
Desnutridos (DN)	<b>Grupo E</b> n=10	<b>Grupo F</b> n=10	<b>Grupo G</b> n=10	<b>Grupo H</b> n=7

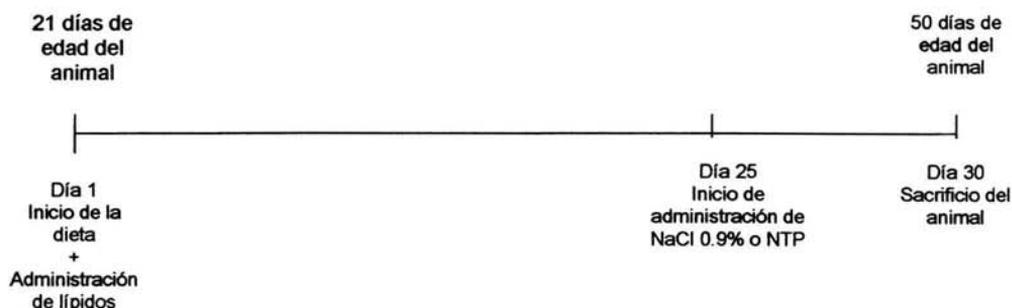


Fig. 4 Representación experimental que muestra el día uno equiparable al día 21 de edad de las ratas y el día 30 experimental representa el día 50 de edad.

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio, fotoperiodo 12 h luz / 12 h oscuridad, con libre acceso a agua y alimento, de acuerdo a la condición nutricional correspondiente.

Como se muestra en la figura anterior (Fig. 4) el día uno o inicio de la dieta fue considerando el día 21 de vida del animal (edad de destete) y como día 30 o fin del tratamiento, el día 50 de edad de las ratas.

La administración de lípidos de cadena media (LCM) en la mezcla comercial conocida como Ivelip (Anexo 1) fue cada 72 h desde el día 1 y hasta el día 30 del experimento, por vía intraperitoneal (i.p.) (280 mg /k), mientras que el nitroprusiato de sodio (NTP) (20 µg /kg i.p.) y el NaCl 0.9% (volumen igual al NTP i.p.) fueron administrados según el grupo al que correspondía a partir del día 25 y hasta el día 30, de forma diaria. El peso corporal de los animales se registro a partir del día 1 y hasta el día 30, cada tercer día.

Al cumplirse el día 30 del tratamiento y después de 10 minutos de haber administrado el NTP según fue el caso, (tiempo suficiente para alcanzar concentraciones elevadas de NO), todos los grupos de animales se sacrificaron por decapitación y se colocó el cerebro en NaCl 0.9% a 4°C. La disección del cerebro se realizó en corte medio sagital, la porción izquierda se usó para ser homogeneizada en 5 volúmenes de buffer TRIS-HCl 0.05M, pH 7.4, para el ensayo de peroxidación de lípidos (II) y la porción derecha en 5 volúmenes de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 0.1M, para la determinación de GSH (III), 5-HT y TRP (IV). Las muestras de homogenados fueron congeladas a -20°C hasta su análisis, no así las muestras de sangre, que inmediatamente después del sacrificio de los animales se llevó a cabo la medición de los niveles de Hb (I).

#### I. Técnica para medición de Hemoglobina (Hb)

La concentración de hemoglobina se midió tomando 20 µl de sangre fresca sin anticoagulante (obtenida al momento de la decapitación de la rata) la cual fue mezclada con 2.5 ml de solución de ferricianuro de potasio, conteniendo: 5 mg de KCN, 20 mg de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, y 100 mg de NaHCO<sub>3</sub>. Posteriormente dicha mezcla fue incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente y se midió la

absorbancia usando una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Helios- $\alpha$  de UNICAM), los valores se calcularon en mg / dl de acuerdo a la fórmula descrita en la misma técnica (36).

## II. Técnica para evaluar la peroxidación de lípidos (TBARS)

La determinación de la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (por sus siglas en inglés: tiobarbituric acid reactive species TBARS) se expresa en  $\mu\text{M}$  de Malondialdehído/g de tejido húmedo; y para ello se realizó la técnica modificada de Gutteridge y cols. (11), como se describe a continuación: se homogeneizó cada sección izquierda del cerebro en 5 ml de buffer de fosfatos pH 7.4, del cual se tomó un mililitro y le fueron agregados dos mililitros de una solución que contenía: 1.25 g de ácido tiobarbitúrico (TBA), 40 g de ácido tricloroacético (TCA), y 6.25 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl), todo ello aforado en 250 ml de agua desionizada; y se calentaron en un baño (Thermomix 1420) a temperatura de ebullición durante 30 minutos.

Posteriormente se colocaron las muestras en hielo durante cinco minutos y fueron centrifugadas a 3,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos, con una centrifuga (Sorvall RC-5B Dupont). Las absorbancias del sobrenadante fueron leídas a 532 nm en un espectrofotómetro (Helios- $\alpha$  de UNICAM).

## III. Técnica para medición de glutatón reducido

Se realizó la medición del GSH mediante la modificación a la técnica propuesta por Asensi y cols. (37) por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). De las muestras de cerebro que fueron homogenizadas con ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 0.1 N y centrifugadas en tubos eppendorf a 10,000 rpm en microcentrifuga (Hettich zentrifugen modelo Mikro 12-24), durante 10 minutos, el

sobrenadante fue clarificado con un filtro (Millex HV de 45  $\mu\text{m}$  para muestras acuosas y no acuosas), y finalmente de este se tomaron 20  $\mu\text{l}$  para ser inyectados en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, equipado con un software Turbochrom versión 4.1 (Perkin Elmer), detector UV de longitud de onda ( $\lambda$ ) variable (Spectra System UV1000); inyector manual (Rheodyne); bomba de 4 gradientes LC-1150 (GBC) e interfase de dos canales (Perkin Elmer). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva (Anexo 5) previamente estandarizada para ser finalmente expresados en  $\mu\text{M}$  / g de tejido húmedo.

Reactivos: Ácido perclórico grado reactivo (Merck), acetonitrilo grado HPLC (Caledon laboratories), agua desionizada, estándares puros de glutatión reducido y glutatión oxidado (Sigma).

Condiciones cromatográficas: Acetonitrilo / ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 0.05%: agua (5:95 v/v), velocidad de flujo 1.0 ml / min, longitud de onda 220 nm, columna LiChrospher 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ) de acero inoxidable (Merck KGaA, AUFS 0.05).

#### IV. Técnica para medición de serotonina (5-HT) y triptófano (TRP).

La determinación de los niveles de 5-HT y TRP fueron realizados por CLAR, mediante la modificación a la técnica propuesta por Calderón y cols. (35). Las muestras del homogenado se filtraron a través de un cartucho Millex HV (Sep-Pack C<sub>18</sub>) para muestras acuosas y no acuosas, y se inyectaron 20  $\mu\text{l}$  del sobrenadante en el equipo para su análisis. Los valores obtenidos de estas indolaminas se interpolaron en una curva (Anexo 6 y 7) previamente estandarizada. Los resultados se expresaron en nM / g de tejido húmedo.

Reactivos: Acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) y  $\text{HClO}_4$  grado reactivo (Merck), metanol grado HPLC (Caledon laboratories), estándares puros de serotonina y triptófano y agua desionizada.

Condiciones cromatográficas: fase móvil de acetato de sodio 0.01 M pH 4.0 metanol (85:15 v/v) velocidad de flujo 1.0 ml / min, longitud de onda 254 nm, columna  $\mu\text{Bondapack C-18}$  (3.9 x 150 mm) de acero inoxidable (Waters Asoc. AUFS 0.05).

Equipo: se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con sistema Turbochrom versión 4.1 (Perkin Elmer) equipado con detector de longitud de onda variable (Spectra System UV1000); inyector manual (Rheodyne); bomba de 4 gradientes LC 1150 (GBC); interfase de dos canales (Perkin Elmer).

A continuación se menciona el proceso estadístico utilizado para analizar los resultados:

- ❖ Se utilizó la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías, al no encontrar homogeneidad en las varianzas, los contrastes se realizaron por el método de Dunnett (Anexo 4), mediante el programa SPSS versión 10.0 para Windows, en donde los valores de significancia de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (34).
- ❖ Se contrastaron los pesos corporales promedio de cada uno de los grupos de animales con y sin administración de lípidos de cadena media para las dos condiciones nutricionales consideradas.
- ❖ Se contrastaron los niveles de hemoglobina de cada uno de los grupos de animales con y sin administración de lípidos de cadena media para las dos condiciones nutricionales consideradas.

- ❖ Se contrastaron los niveles de peroxidación de lípidos de cada uno de los grupos de animales con y sin administración de lípidos de cadena media para las dos condiciones nutricionales consideradas.
- ❖ Se contrastaron los niveles de glutatión reducido de cada uno de los grupos de animales con y sin administración de lípidos de cadena media para las dos condiciones nutricionales consideradas.
- ❖ Se contrastaron los niveles de serotonina de cada uno de los grupos de animales con y sin administración de lípidos de cadena media para las dos condiciones nutricionales consideradas.
- ❖ Se contrastaron los niveles de triptófano de cada uno de los grupos de animales con y sin administración de lípidos de cadena media para las dos condiciones nutricionales consideradas.

Así que la estrategia estadística efectuada fue:

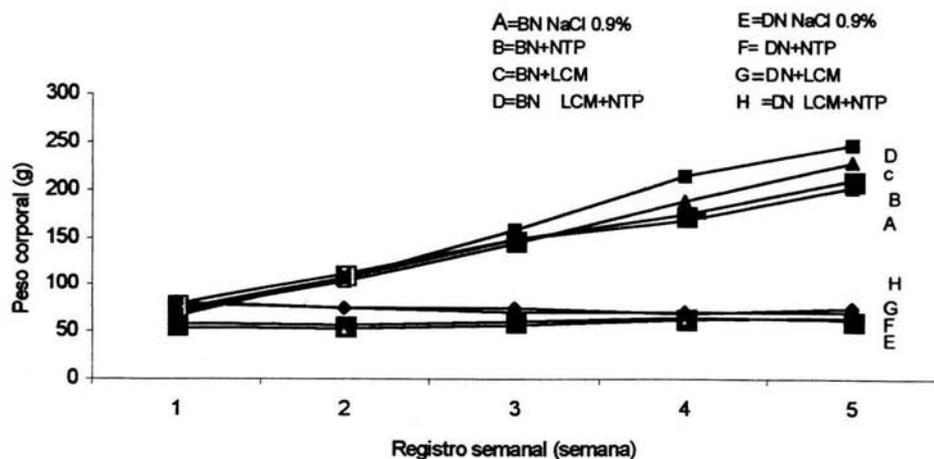
- ❖ El peso corporal promedio se comparó entre los animales con una dieta comercial de bioterio (23.4% de contenido proteico) vs los animales que recibieron una dieta hipoproteica (7% de proteínas) e isocalórica y administración de lípidos de cadena media, en comparación con los demás grupos.
- ❖ Los niveles de hemoglobina en sangre se compararon entre los animales con una dieta comercial de bioterio así como en los animales que recibieron una dieta hipoproteica e isocalórica y administración de lípidos de cadena media, en comparación con los demás grupos.
- ❖ Los niveles de peroxidación de lípidos se compararon entre los animales con una dieta comercial de bioterio y una dieta hipoproteica e isocalórica con

administración de lípidos de cadena media, en comparación con los demás grupos.

- ❖ Los niveles de glutatión reducido se compararon entre los animales que recibieron una dieta comercial de bioterio y una dieta hipoproteica e isocalórica con administración de lípidos, en comparación con los demás grupos.
- ❖ Los niveles de serotonina y triptófano, se compararon entre los animales que recibieron una dieta comercial de bioterio y una dieta hipoproteica e isocalórica con administración de lípidos de cadena media, en comparación con los demás grupos.

### Resultados y Análisis estadístico.

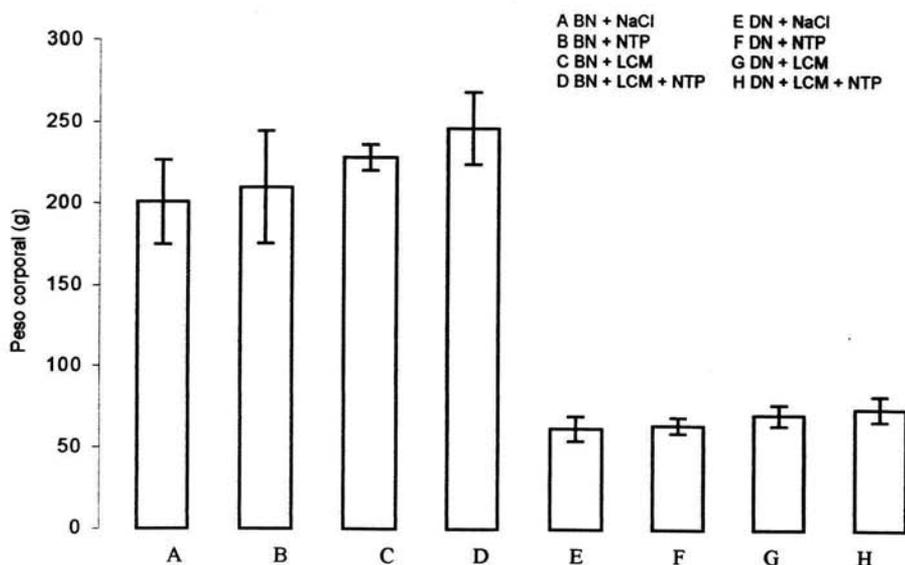
Los resultados obtenidos se representaron en gráficas y representaciones numéricas (promedios y desviaciones estándar).



Gráfica 1a. Registro de peso corporal promedio semanal  
Valores promedio  $p < 0.05$ . En donde BN = Bien Nutridos, DN = Desnutridos, LCM = Lípidos de Cadena Media y NTP = Nitroprusiato de Sodio

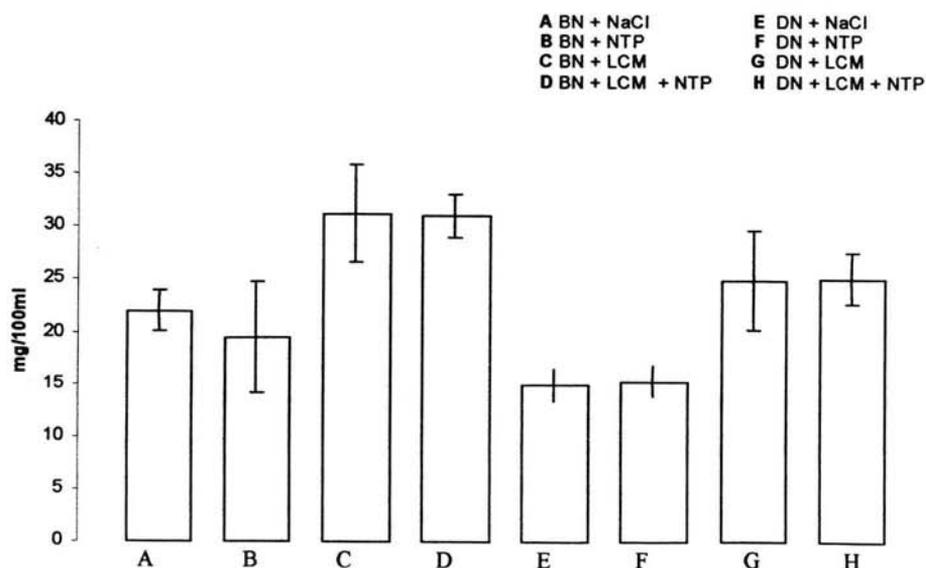
Con base a lo anterior en la gráfica 1a, se pueden observar los registros de peso corporal promedio de los animales tratados con dieta comercial de bioterio (contenido proteico 23.4%) o bien nutridas (BN) vs los animales con administración de la dieta hipoproteica (7% de contenido proteico 27,35) e isocalórica, ó desnutridas (DN), presentan diferencias significativas debido a la dieta.

Además se puede observar que para la semana cinco (gráfica 1b): el grupo A es diferente de todos los grupos excepto del grupo B (Anexo 4, Tabla 1), el cual es diferente de los grupos E, F, G, y H, mientras que este último es diferente de F, así como C y D son diferentes de E, F, G y H.



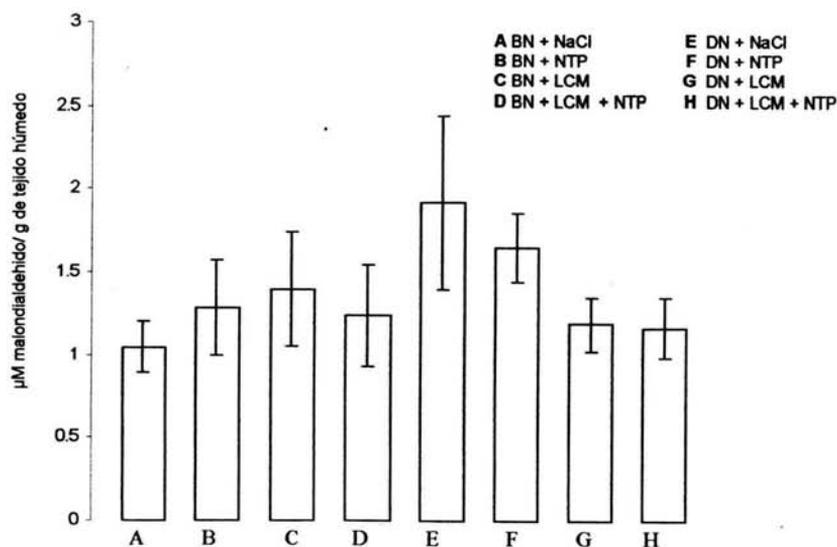
Gráfica 1b. Registro de peso corporal promedio para la última semana del estudio Valores promedio  $\pm$  D.E.  $p < 0.05$ . En donde BN= Bien Nutridos DN= desnutridos, LCM= Lípidos de cadena media y NTP= Nitroprusiato de Sodio

A continuación se muestran los niveles de hemoglobina (gráfica 2) en sangre de ratas con ingesta deficiente de proteínas y con administración de LCM, en presencia de nitroprusiato de sodio. Se observaron diferencias significativas entre el grupo de animales bien nutridos control (grupo A) vs todos los demás grupos; los animales bien nutridos NTP (grupo B) son diferentes de los grupos de animales bien nutridos LCM (grupo C) y los animales bien nutridos LCM + NTP (grupo D). El grupo de animales desnutridos LCM (grupo G) y el grupo animales desnutridos LCM + NTP (grupo H) son estadísticamente diferentes con los grupos de animales desnutridos control (grupo E) y animales desnutridos NTP (grupo F).



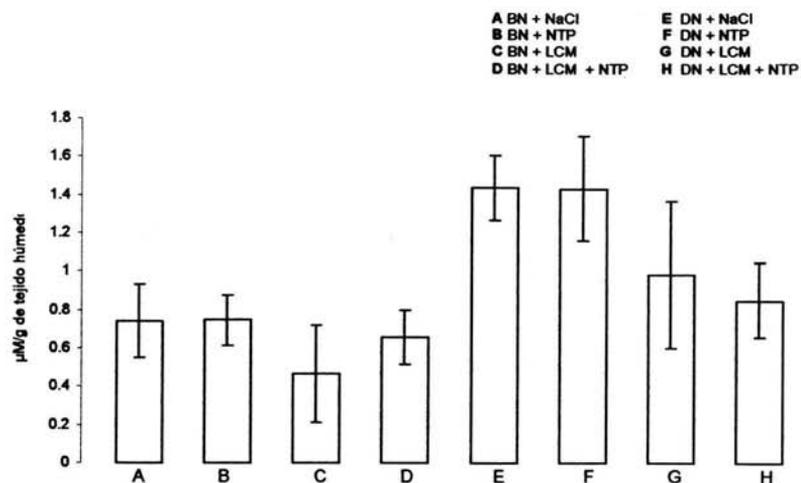
Gráfica 2. Niveles de hemoglobina en sangre de ratas con diferente condición nutricional y administración de LCM en presencia de NTP. Valor promedio  $\pm$  D. E.  $p < 0.05$ . En donde BN = Bien Nutridos, DN = Desnutridos, LCM = Lípidos de Cadena Media y NTP = nitroprusiato de sodio

En la siguiente gráfica (gráfica 3) se muestran niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) en cerebro de ratas con ingesta deficiente de proteínas y con administración de LCM, en presencia de nitroprusiato de sodio. Se observaron que existen diferencias significativas entre el grupo de animales bien nutridos control (grupo A) vs todos los demás grupos, además el grupo C es diferente respecto a los grupos E y F, quienes a su vez son diferentes de los grupos: A, B, D, G y H, respectivamente.



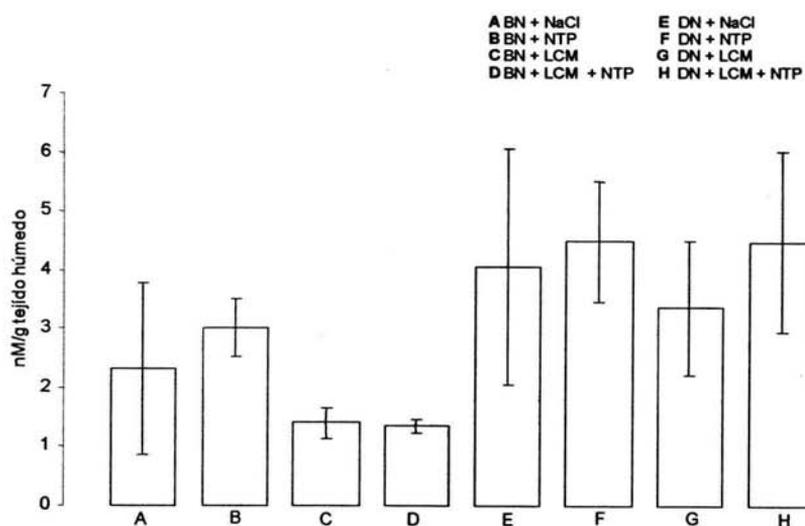
Gráfica 3. Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) en cerebro de ratas con diferente condición nutricional y administración de LCM en presencia de NTP. Valor promedio  $\pm$  D. E.  $p < 0.05$ . En donde BN = Bien Nutridos, DN = Desnutridos, LCM = Lípidos de Cadena Media y NTP = nitroprusiato de sodio

Respecto a los niveles de glutatión reducido (gráfica 4) en cerebro de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de LCM, se observaron diferencias significativas entre los grupos A, B, C, D y H vs los grupos E y F, respectivamente.



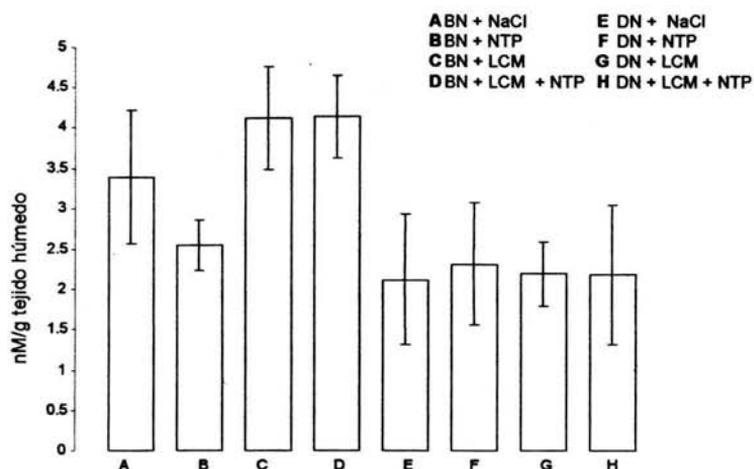
Gráfica 4. Niveles de glutatión reducido en cerebro de ratas con diferente condición nutricional y administración de LCM en presencia de NTP. Valore promedio  $\pm$  D. E.  $p < 0.05$ . En donde BN =Bien Nutridos, DN =Desnutridos, LCM =Lípidos de Cadena Media y NTP =nitroprusiato de sodio

En la siguiente gráfica se muestra los niveles de serotonina (5-HT) en cerebro de ratas con ingesta deficiente de proteínas y administración de LCM, en presencia de NTP. Se observaron incrementos estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en los grupos C y D vs los grupos B, E, F, G y H, este último es diferente de B y A, respectivamente.



Gráfica 5. Niveles de serotonina en cerebro de ratas con diferente condición nutricional y administración de LCM en presencia de NTP. Valores promedio  $\pm$  D. E.  $p < 0.05$ . En donde BN = Bien Nutridos. DN = Desnutridos. LCM = Lípidos de Cadena Media v NTP

En cuanto a los niveles de triptófano (TRP) en cerebro de ratas con ingesta de una dieta comercial y una dieta deficiente de proteínas y con administración de LCM y en presencia de NTP, se observa un incremento con diferencias significativas estadísticamente ( $p < 0.05$ ), los grupos de animales C y D son estadísticamente diferentes de los grupos B, E, F y G, este último es diferente del grupo A.



Gráfica 6. Niveles de triptófano en cerebro de ratas con diferente condición nutricional y administración de LCM en presencia de NTP. Valores promedio  $\pm$  D. E.  $p < 0.05$ . En donde BN = Bien Nutridos, DN = Desnutridos, LCM = Lípidos de Cadena Media y NTP = nitroprusiato de sodio

## Discusión y conclusiones

El peso corporal de los animales con la dieta comercial (23.4 % de proteína) (BN), se incrementó a medida que los animales tuvieron mayor edad, mientras que

en los animales con dieta deficiente en proteínas (DN), el peso corporal no tuvo el desarrollo normal, los resultados del registro de peso obtenido sitúa a los animales en una desnutrición proteica sin aumento de peso (38), estos resultados sirven de complemento para hablar de la condición nutricional de estos animales aunados a los niveles hemoglobina (Hb), los cuales se incrementaron tanto en animales BN como DN, con administración de lípidos de cadena media (LCM). Estos resultados sugieren que los lípidos de cadena media pueden tener participación en el metabolismo bioquímico de la hemoglobina

Los niveles de TBARS se incrementaron por efecto de la desnutrición. Los resultados sugieren que los lípidos de membrana del cerebro están expuestos a la presencia de radicales libres que son inducidos por la condición nutricional. Estos radicales pudieron ser parcialmente disminuidos por los LCM que se administraron como fuente de energía en los animales de estudio, probablemente como consecuencia de aumentar el mecanismo de defensa. Estos resultados son contrarios a los hallazgos realizados por Sambuichi y cols. (9), quienes encontraron que los niveles de TBARS se incrementaron en animales con dieta deficiente en proteínas y lípidos de aceite de maíz. Sugerimos que las diferencias radican en el tipo de lípidos que se emplearon en cada dieta. En el presente estudio se utilizaron lípidos de cadena media y en el estudio de Sambuichi utilizó lípidos polinsaturados que tienen la capacidad de causar oxidación inmediata.

Los niveles de glutatión reducido se incrementaron en los grupos de animales DN, respecto a los BN, es indudable que la presencia de los radicales libres induce el aumento de este indicador bioquímico. Los lípidos de cadena media presentaron ligera disminución de GSH tanto en BN como en DN, como consecuencia de

disminuir la susceptibilidad celular al estrés oxidativo, como lo sugieren los resultados de Ibrahim y cols. (39). Los resultados del presente estudio indican que el uso de GSH es útil en la medición del estado nutricional de los individuos

Los niveles de triptófano (TRP) se incrementaron en los animales BN que recibieron suplemento de lípidos, posiblemente estos compuestos tienen participación en el metabolismo bioquímico del TRP cerebral. El NTP inhibió los niveles del TRP tal vez porque el NO actúa sobre las insaturaciones del grupo indol, que forma parte estructural del TRP, estos resultados son compatibles con los estudios de Donald y cols. (40), quienes sugieren que el NO proveniente del NTP, induce la nitración de la enzima triptófano 5-hidroxilasa (T5-H) y la inactiva, lo cual no concuerda con los resultados del presente estudio, dado que la 5-HT se incrementó en el grupo de animales que recibieron el NTP, y la presencia de los LCM disminuyó los niveles de 5-HT en los animales BN, sugerimos que tal efecto pudo deberse a que los LCM contienen insaturaciones estructurales que sirven de sustrato para los grupos de hierro y azufre que contiene la enzima T5-H y conlleva a su posterior inactivación, tal como lo sugieren los estudios realizados por Donald y col. (40). En los grupos de animales DN, la 5-HT se incremento con respecto a los BN, que probablemente los lípidos de cadena media participan en la biosíntesis de ácidos grasos en el cerebro, cuya función es participar en el metabolismo de la 5-HT (41). Basándose en los resultados del presente estudio es posible pensar que los sujetos que padecen desnutrición proteica e ingieren lípidos de cadena media, pueden incrementar los niveles endógenos de indolaminas (41,42).

## Referencias

1. Avila-Curiel A, Shamah-Levy T, Galindo-Gómez C, Rodríguez-Hernández G y Barragán- Herendia L M. Desnutrición infantil en el medio rural mexicano. *Salud Publica Mex* 1998; 40: 150-160.
2. Encuesta Nacional de Nutrición. Secretaría de Salud (SSA). Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). México. 1999.
3. Golden H N M. The Development of concepts of Malnutrition. *American Society for Nutritional Sciences* 2002: 2117S-122S.
4. Saldoval-Prieto AA, Reyes-Morales H, Pérez-Cuevas R, Abrego-Bias R y Orrico-Torres E. Estrategias familiares de vida y su relación con desnutrición en niños menores de dos años. *Salud Pública México*. Vol. 44, No. 1, Enero-Febrero, 2002: 41-49.
5. Rivera AJ, Stres-Alvarez, D, Habicht JP and Villalpando S. Impact of the Mexican Program for Education, Health, and Nutrition (Progresá) on rates of Growth and Anemia in Infants and Young Children *JAMA*, June 2, 2004 Vol. 291, No 21:2563-2570.
6. Resnick O, Miller M, Forbes W, Kemper T, Bronzino J and Morgane PJ. Developmental protein malnutrition: influence on the central nervous system of the rat. *Neurosci Biobehav Rev*. 1979 Winter; 3(4): 233-246.
7. Morgane PJ, Mokler DJ and Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002 Jun; 26 (4): 471-483.

8. Krigman MR and Hogan EL. Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination. *Brain Res* 1976 May 7; 107 (2): 239-255.
9. Sambuichi EJ, Lai A, Kido Y, Shizuka F, Kishi K. Protein deficiency and excess lipid synergistically augmented lipid peroxidation in growing rats. *Tokushima J Exp Med* 1992 Jun; 39 (1-2): 81-87.
10. Srivastava RE, Murthy RC and Chandra SV. Effect of manganese on some bioantioxidants in various organs of protein-deficient rats. *Biochem Int* 1989 May; 18(5): 903-912.
11. Ríos de Molina AC. El estrés oxidativo y destino celular. *Revista Quimica Viva*, 2003 Abril; Vol. 2 (1): 1-14
12. Gutteridge MJ, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 1990;15 April :129-134.
13. Bello-Klein A, Bock PM, Travacio M, Senna SM, Llesuy S, de Bittencourt PI Jr, Irigoyen MC, Bello AA, Kumar D, Singal PK. Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. *Cardiovasc Toxicol* 2001; 1(1): 43-50.
14. Tsuda M, Suzuki T and Misawa M. Aggravation of DMCM-Induced seizure by Nitric Oxide Synthase inhibitors in mice. *Pharmacology Letters* 1997; 60(23): 339-343.
15. Lee P, Son D, Lee J, Kim YS, Kim H, Kim SY. Excessive production of nitric oxide induces the neuronal cell death in lipopolysaccharide-treated rat hippocampal slice culture. *Neuroscience Letters* 2003; 349: 33-36.
16. Goodman and Gilman. 1996 *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Interamericana-McGRAW-HILL-. Vol. II 9° Edición México.

17. Kaehler ST, Singewald N, Sinner C and Philippu A. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Research* 835, 1999; 346-349.
18. Pagliaro P. Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sciences* 2003; 73: 2137-2149.
19. Kinsella JP, Neish SR, Dunbar I, Shaffer E, Abman SH. Clinical responses to prolonged treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn with low doses of inhaled nitric oxide. *J pediatr* 1993; 123:103-108
20. Yoshida K, Kasama K. Biotransformation of nitric oxide. *Environ Health Perspect* 1987; 73:201-206.
21. Wennmalm A, Benthin G, Petersson AS. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. *Br J Pharmacol* 1992; 106:507-508.
22. Benuck M, Banay-Schwartz M, DeGuzman T, Lajtha A. Effect of food deprivation on glutathione and amino acid levels in brain and liver of young and aged rats. *Brain Research* 1995; 678: 259-264.
23. Rougemont M, DO KQ and Castagne V. New model deficit during development: Effect on lipid peroxidation in the rat brain. *J Neurosci Res* 2002 Dec 15; 70 (6): 774-783.
24. Hogg N, Singh RJ and Kalyanaraman B. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Letters* 1996; 382:223-228.
25. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR and Turner ND. Glutathione Metabolism and its Implications for Health. *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.* March 2004; 134:489-492.

26. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1629-1624.
27. Barragán-Mejía MG, Castilla-Serna L, Calderón-Guzmán D, Hernández-Islas JL, Labra-Ruiz N, Rodríguez-Pérez RA, Angel DS. Effect of nutritional status and ozone exposure on rat brain serotonin. *Arch Med Res.* 2002 Jan-Feb; 33 (1): 15-19.
28. Datta S, Patterson EH, Vincitore M, Tonkiss J, Morgane PJ and Galler JR. Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep/wake behavior as adults. *J Sleep Res* 2000; 9:71-79.
29. Cintra L, Galván A, Díaz CS, Escobar C. Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Bol Estud Med Biol Méx* 1994; 42:11-19.
30. Aguilera A, Selgas R, Codoceo R, Bajo A. Uremic anorexia: a consequence of persistently high brain serotonin levels? The tryptophan/serotonin disorder hypothesis. *Perit Dial Int* 2001; 20(6): 810-816.
31. Telliez F, Bach V, Leke A, Chardon K, Libert JP. Feeding behavior in neonates whose diet contained medium-chain triacylglycerols: short-term effects on thermoregulation and sleep. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 1091-1095.
32. Fuentes del Toro S. 2004 *Nutrición, Cirugía y terapia Intensiva. Manual Moderno Vol. I* pc 77-80 México
33. Tsuju H, Kasai M, Takeuchi H, Nakamura M, Okazaki M and Kondo K. Dietary Medium-Chain Triacylglycerol Suppress Accumulation of Body Fat in a Double-

- Blind, Controlled Trial in Healthy Men and Woman. American Society for Nutritional Sciences Journal of Nutrition. 2001; 131:2853-2859.
34. Castilla Sema L. 1999. Estadística simplificada para la investigación en Ciencias de la Salud. Editorial Trillas. 2° Edición. México pp 110
35. Calderón GD, Toledo LA, Hernández IJ, Barragán MG, Rodríguez PR, Hernández GE. Determinación de triptófano en cerebro de ratas expuestas a ozono. Arch Neurocién (Mex) 2001; 6(1): 2-5.
36. Herman MD. 1971 Micromethods for the clinical and biochemical Laboratory. Ann Arbor Science Publishers Inc. N.Y., pp 260.
37. Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, Garcia de la Asunción J, Estrela JM and Viña J. A High-Performance Liquid Chromatography Method for Measurement of Oxidized Glutathione in Biological Samples. Anal Biochem 1994; 217: 323-328.
38. Waynforth HB. 1980 Experimental and Surgical Technique in the Rat. Academic Press Publishers. London, UK. pp 255.
39. Ibrahim W, Lee U S, Yeh C C, Szabo, Bruckner G and Chow C K. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Mouse Liver: Effects of Dietary Lipid, Vitamin E and Iron. American Society for Nutritional Sciences, 1997: 1401-1406.
40. Donald M, Kuhn and Arthur Jr R. Molecular Mechanism of the Inactivation of Tryptophan Hydroxylase by Nitric Oxide: Attack on Critical Sulfhydryls that Spare the Enzyme Iron Center. The Journal Of Neuroscience, October 1, 1997; 17 (19): 7245-7251.
41. Innis SM. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. Dev Neurosci 2000; 22(5-6):474-480.

42. Clark JA, Clark MS, Palfreyman ES and Palfreyman MG. The effect of tryptophan and a tryptophan/5-hydroxytryptophan combination with indoles in the brains of rats fed a tryptophan deficient diet. *Psychopharmacologia*. 1975 Dec 31; 45(2): 183-188.

## Anexo 1

## Lípidos de Cadena Media

Nombre comercial: Ivelip

Laboratorio: Baxter

Presentación: 20%

Cada 100 ml de solución contiene:

Aceite de Soya purificado	20.00 g
Glicerol	2.50 g
Fosfolípidos de yema de huevo Purificados	1.20 g
Oleato de sodio	0.03 g
Agua inyectable c.b.p.	100 ml

Ácidos grasos que contiene la emulsión:

Ácido linoléico 54%

Ácido oléico 26%

Ácido palmítico 9%

Ácido  $\alpha$ -linoléico 8%

Ácido esteárico 3%

## Anexo 2

Dieta Comercial de Bioterio

Nombre comercial: LabDiet 5001

Laboratorio: Laboratory Rodent Diet.

Contenido:

Proteínas 23.4%

Minerales 6.9%

Calcio 0.95%

Magnesio 0.21%

Manganeso 64 ppm

Selenio 0.27 ppm

Vitaminas:

Caroteno 4.5%

A 22 IU/ mg

D<sub>3</sub> 4.5 IU/ mg

E 49 IU/ Kg

B<sub>12</sub> 22 mg/ Kg

K 0.5 ppm

Ácido Pantoténico 24 ppm

## Anexo 3

Dieta hipoproteica (contenido proteico del 7%) e isocalórica (27,35).

Nutrimiento	Contenido (%)
Alimento comercial <i>LabDiet</i> 5001 (23.4% proteínas)	3.926
Almidón	58.445
Salvado	37.629
Vitaminas*	0.05
Minerales*	0.10

**\*Vitaminas**

A 125,000U	D <sub>3</sub> 41,5000U
B <sub>1</sub> 100 mg	E 40U
B <sub>2</sub> 90 mg	K 100 mg
B <sub>6</sub> 50 mg	Ac. Fólico 100 mg
B <sub>12</sub> 500 mg	Ac. Pantoténico 400 mg
C 100 mg	Nicotinamida 3 mg

**\*Minerales:**

Fósforo 14.5%	Sodio 5%	Cobalto 0.01%
Calcio 6%	Magnesio 4%	Selenio 0.01%
Zinc 1%	Azufre 0.4%	
Hierro 0.3%	Cobre 0.25%	
Manganeso 0.20%	Yodo 0.05%	

**Nota:** las vitaminas se administraron disueltas en el agua de beber.

## Anexo 4

Tablas de contrastes que muestran solo los grupos donde hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), obtenidas con el método de Dunnett.

Tabla 1. Contrastes significativos de los pesos corporales de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de lípidos de cadena media.

Grupo	Contrastes				
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
A	C, D, E, F, G, H	D, E, F, G, H	E, F, G, H	E, F, G, H	C, D, E, F, G, H
B	C, D, F, G, H	E, F, G, H	E, F, G, H	E, F, G, H	E, F, G, H
C	A, B	E, F, G, H	E, F, G, H	E, F, G, H	A, E, F, G, H
D	A, B, E, F	A, E, F, G, H	E, F, G, H	E, F, G, H	A, E, F, G, H
E	A, D, G, H	A, B, C, D, G, H	A, B, C, D, G, H	A, B, C, D, G	A, B, C, D
F	A, B, D, G, H	A, B, C, D, G, H	A, B, C, D	A, B, C, D	A, B, C, D, H
G	A, B, E, F	A, B, C, D, E, F	A, B, C, D, E, F	A, B, C, D, E	A, B, C, D
H	A, B, E, F	A, B, C, D, E, F	A, B, C, D, E, F	A, B, C, D	A, B, C, D, F

**A** Bien Nutrido + NaCl

**B** Bien Nutrido + NTP

**C** Bien Nutrido + LCM

**D** Bien Nutrido + LCM + NTP

**E** Desnutrido + NaCl

**F** Desnutrido + NTP

**G** Desnutrido + LCM

**H** Desnutrido + LCM + NTP

Tabla 2. Contrastes significativos obtenidos para los niveles de hemoglobina en cerebro de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de lípidos de cadena media.

Grupo	Contrastes
A	B, C, D, E, F, G, H
B	A, C, D
C	A, B, E, F
D	A, B, E, F, H
E	A, C, D, G, H
F	A, C, D, G, H
G	A, E, F
H	A, D, E, F

**A** Bien Nutrido + NaCl

**B** Bien Nutrido + NTP

**C** Bien Nutrido + LCM

**D** Bien Nutrido + LCM + NTP

**E** Desnutrido + NaCl

**F** Desnutrido + NTP

**G** Desnutrido + LCM

**H** Desnutrido + LCM + NTP

Tabla 3. Contrastes significativos observados en la peroxidación de lípidos (TBARS) en cerebro de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de lípidos de cadena media

Grupo	Contrastes
A	E, F
B	E, F
C	E
D	E, F
E	A, B, C, D, G, H
F	A, B, D, G, H
G	E, F
H	E, F

**A** Bien Nutrido + NaCl

**B** Bien Nutrido + NTP

**C** Bien Nutrido + LCM

**D** Bien Nutrido + LCM + NTP

**E** Desnutrido + NaCl

**F** Desnutrido + NTP

**G** Desnutrido + LCM

**H** Desnutrido + LCM + NTP

Tabla 4. Contrastes significativos obtenidos para los niveles de glutatión reducido en cerebro de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de lípidos de cadena media.

Grupo	Contrastes
A	E, F
B	E, F
C	E, F
D	E, F
E	A, B, C, D, H
F	A, B, C, D, H
H	E, F

**A** Bien Nutrido + NaCl

**B** Bien Nutrido + NTP

**C** Bien Nutrido + LCM

**D** Bien Nutrido + LCM + NTP

**E** Desnutrido + NaCl

**F** Desnutrido + NTP

**G** Desnutrido + LCM

**H** Desnutrido + LCM + NTP

Tabla 5. Contrastes significativos obtenidos para los niveles de serotonina en cerebro de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de lípidos de cadena media.

Grupo	Contrastes
A	H
B	C, D
C	B, E, F, G, H
D	B, E, F, G, H
E	C, D
F	C, D
G	C, D
H	A, B, C, D,

**A** Bien Nutrido + NaCl

**B** Bien Nutrido + NTP

**C** Bien Nutrido + LCM

**D** Bien Nutrido + LCM + NTP

**E** Desnutrido + NaCl

**F** Desnutrido + NTP

**G** Desnutrido + LCM

**H** Desnutrido + LCM + NTP

Tabla 6. Contrastes significativos obtenidos para los niveles de triptófano en cerebro de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de lípidos de cadena media.

Grupo	Contrastes
A	G
B	C, D
C	B, E, F, G, H
D	B, E, F, G, H
E	C, D
F	C, D
G	A, C, D
H	C, D

**A** Bien Nutrido + NaCl

**B** Bien Nutrido + NTP

**C** Bien Nutrido + LCM

**D** Bien Nutrido + LCM + NTP

**E** Desnutrido + NaCl

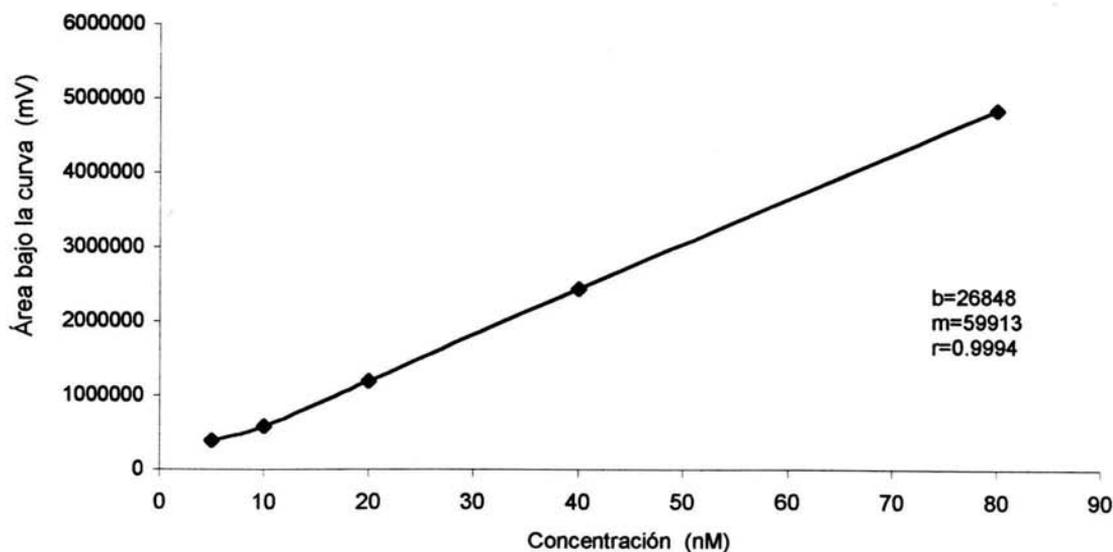
**F** Desnutrido + NTP

**G** Desnutrido + LCM

**H** Desnutrido + LCM + NTP

## Anexo 5

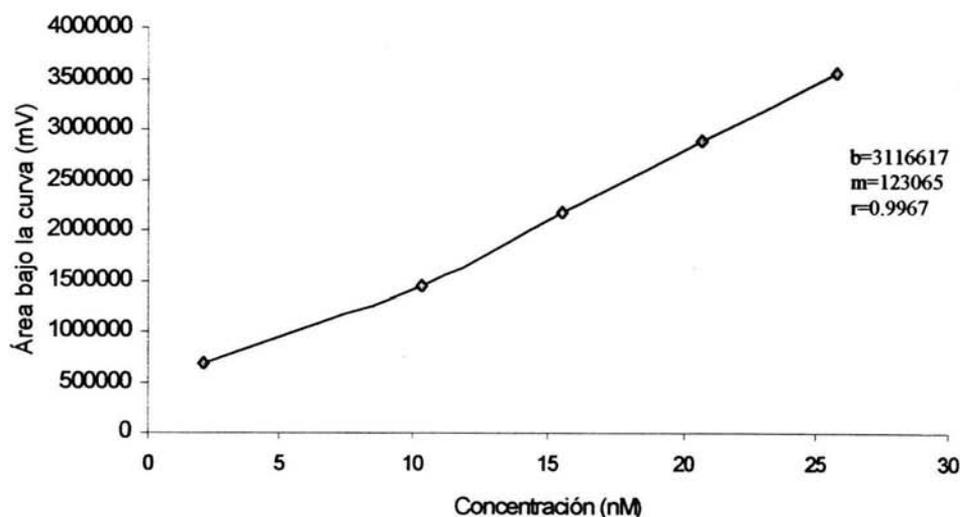
Curva estándar de glutatión reducido que se utilizó para interpolar los valores obtenidos por medio de la cromatografía de alta resolución y obtener así los niveles de glutatión reducido en cerebro de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de lípidos de cadena media.



Gráfica 9. Curva estándar de Glutacion reducido (GSH) corregida mediante regresión lineal  
Valores promedio.

## Anexo 6

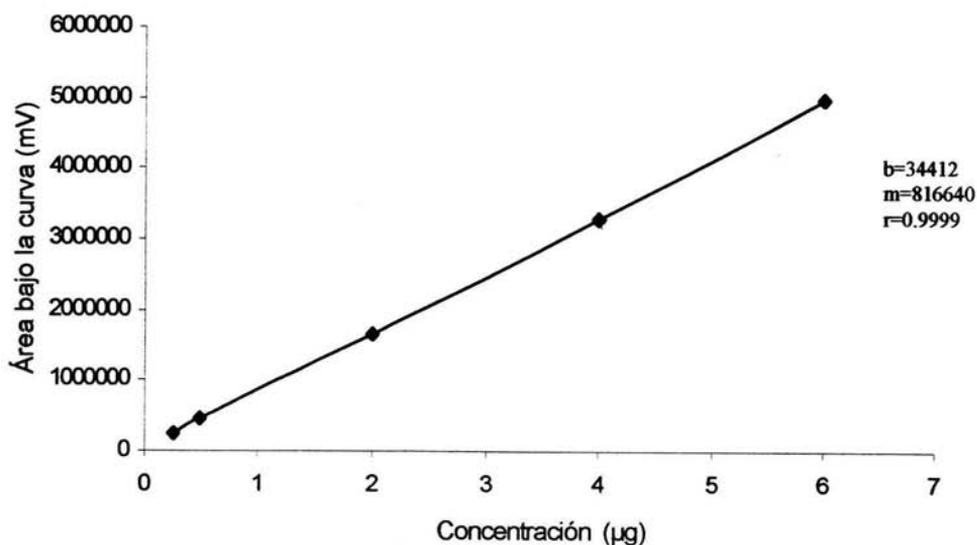
Curva estándar de 5-HT que se utilizó para interpolar los valores obtenidos por medio de la cromatografía de alta resolución y obtener así los niveles de serotonina en cerebro de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de lípidos de cadena media.



Gráfica 7. Curva estándar de Serotonina (5-HT) corregida mediante regresión lineal. Valores promedio.

## Anexo 7

Curva estándar de TRP que se utilizó para interpolar los valores obtenidos por medio de la cromatografía de alta resolución y obtener así los niveles de triptófano en cerebro de ratas con administración de una dieta comercial (23.4 % de contenido proteico) y una dieta hipoproteica (7% de contenido proteico) e isocalórica en presencia de lípidos de cadena media.



Gráfica 8. Curva estándar de Triptófano (TRP) corregida mediante regresión lineal. Valores promedio.